



HAL
open science

Etude de la voie de signalisation et du complexe TOR (Target Of Rapamycin) chez Arabidopsis

Thomas Dobrenel

► **To cite this version:**

Thomas Dobrenel. Etude de la voie de signalisation et du complexe TOR (Target Of Rapamycin) chez Arabidopsis. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112291 . tel-00880882

HAL Id: tel-00880882

<https://theses.hal.science/tel-00880882>

Submitted on 7 Nov 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 BIOLOGIE DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Par

Thomas DOBRENEL

Etude de la voie de signalisation et du complexe TOR (Target Of Rapamycin) chez Arabidopsis

Soutenance prévue le **12 décembre 2012**, devant le jury d'examen :

Mohammed BENDAHDANE
Jean-Luc GALLOIS
Michael HODGES
Christian MEYER
Delphine PFLIEGER
Lyubov RYABOVA

DR2-INRA, ENS de Lyon – Rapporteur
CR1-INRA, INRA d'Avignon – Examineur
DR2-CNRS, IBP d'Orsay – Examineur
DR2-INRA, IJPB, INRA de Versailles – Directeur de thèse
CR1-CNRS, CNRS d'Evry – Examineur
DR2-CNRS, CNRS de Strasbourg – Rapporteur

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord exprimer ici toute ma gratitude à Christian MEYER, mon directeur de thèse unique et préféré, pour m'avoir encadré et soutenu pendant ces quatre années, pour m'avoir prodigué tous les enseignements dont j'avais besoin, pour son humour et son optimisme proverbial. Enfin, je le remercie pour m'avoir laissé toute la liberté nécessaire pour mener à bien ce projet tout en maintenant un regard critique et objectif, agrémenté, chaque fois que nécessaire, de devises latines et je me souviendrai toujours que *Fortuna audacies juvat* ou encore que *Felix qui potuit rerum cognoscere causas*.

Ma reconnaissance se porte également vers Marianne, une technicienne hors pair et une biochimiste chevronnée qui m'a apporté non seulement une aide précieuse au laboratoire mais aussi une bonne humeur et une amitié infaillibles.

Je veux également remercier Anne G., ma collègue de bureau pendant près de 3 ans. Merci d'avoir toujours fait preuve d'une amitié honnête et d'avoir contribué à la bonne ambiance dans le bureau. Tu m'as également aidé à m'intégrer au sein de l'équipe et, bien sûr, comment ne pas se souvenir de nos échanges basés sur des questions à trois francs six sous et des réponses qui valaient moins d'un kopek ?

Puisque j'en suis venu à ceux qui m'ont aidé à m'intégrer dans l'équipe, je veux sincèrement remercier Rodnay. Au-delà des enseignements scientifique et technique que tu m'as aidé à acquérir, tu es resté, même après ton départ de l'équipe, disponible et enthousiaste à l'idée de parler de TOR ou du ribosome ou encore, de la vie au sein de l'équipe et de son évolution puisque l'on peut dire que, en quatre ans qu'ont duré mon stage de M2 et ma thèse, évolution il y a eu.

Bien sûr je n'oublie pas Fabienne qui a toujours été une oreille attentive et un esprit prévenant, y compris dans les moments les plus difficiles, quand, précisément, j'avais besoin de me libérer un peu de cette pression accumulée.

Je remercie les doctorants qui m'ont précédé et qui ont bien voulu me conseiller quand je préparais le concours de l'école doctorale ou, par la suite, quand je voulais discuter d'approches techniques ou de questions scientifiques. J'ai déjà remercié Anne mais, à ce titre, je te remercie à nouveau (abondance de biens ne nuit jamais) et je remercie également Manon, Laure G., Julie et Sobia. Je remercie également Thibaud qui a fait sa thèse en même temps que moi, d'abord à l'étage du dessous et, finalement, dans le bureau d'à côté. Au cours de ces quatre années, nous avons été confrontés aux mêmes difficultés et aux mêmes joies en même temps et j'ai vraiment pris beaucoup de plaisir à discuter avec toi de sciences ou de musique ou d'autres choses tout en sachant que, venant dans ton bureau, je serais toujours accueilli par une poignée de bonbons chaleureusement offerts. J'en profite pour

remercier également l'ensemble de ton équipe qui a fait preuve d'une gentillesse et d'une amabilité toujours égale.

Je voudrais également remercier les doctorants qui sont arrivés après moi et avec qui j'ai eu la chance de partager mon bureau (Giorgiana, Liliana et, bien sûr, Michaël) directement suivis de Aude et Camille. Vous avez contribué à créer et entretenir une ambiance appréciable au quotidien. Je veux tout particulièrement remercier Giorgiana et Liliana qui m'ont forcé à prendre l'habitude de communiquer presque quotidiennement en anglais puisque vous ne parliez pas français en arrivant il y a un peu plus d'un an, même si je sais parfaitement que je n'ai aucune nécessité d'écrire ces lignes en anglais et que, maintenant, vous comprenez parfaitement cette langue magnifique. Étant donnée l'heureuse surprise que j'ai eu lors de ma soutenance, je ne saurais vous remercier suffisamment de la chance que vous m'avez ainsi fournie de banaliser l'usage de l'anglais jour après jour.

Je remercie également les autres doctorants de l'IJPB, et tout particulièrement Clémentine et Nahid, pour votre bonne humeur et votre humour décapant et pour les bons souvenirs que je garde de mon séjour à Londres, grâce à vous. Puisque je parle des congrès, je remercie également Erwan et Anso pour la SUPER ambiance que vous avez créée à Cologne, mon 1^{er} congrès international, mon 1^{er} congrès tout court. Là aussi, je garde en mémoire une pléthore d'images que je ne suis pas près d'oublier.

Je remercie également Doc'en herbe et tous les membres qui s'y sont succédés ainsi que le Conseil de l'École Doctorale qui m'ont donné des occasions de sortir du laboratoire et de m'intéresser à tout autre chose qu'à ma petite personne. J'ai fait de mon mieux pour m'investir dans ces deux institutions et participer à la réalisation de plusieurs travaux qui me tenaient à cœur et j'espère que cet investissement ne sera pas vain. Je les remercie également parce qu'elles m'ont également permis d'apprendre énormément sur le fonctionnement et le financement de la recherche académique en France.

Je remercie Michèle qui, malgré les difficultés administratives qui paraissaient insurmontables quand j'ai commencé, m'a aidé à avoir l'opportunité d'enseigner à l'Université de Versailles – Saint-Quentin. Je te remercie également de m'avoir donné tous les conseils nécessaires pour enseigner dans les meilleures conditions possibles.

Enfin, je remercie également tous les gens du NAP, du rez-de-chaussée du Bâtiment 2 et, finalement du Bâtiment 3, bref, vous. J'ai véritablement apprécié vivre ces quatre dernières années à vos côtés. Je voulais vous remercier séparément pour l'amabilité dont vous avez fait preuve à mon endroit et je me suis aperçu que, en fait, je veux tous vous remercier, sans exception, donc, pour éviter une liste longue et fastidieuse et pour être sûr de n'oublier personne (ce que je ne me pardonnerais pas) je veux vous dire un grand MERCI collectif et chaleureux. Je vous prie de trouver, tous, ici, un remerciement qui vous est personnellement adressé.

Enfin, je veux également remercier ma famille, mes amis et mes proches, tout ceux qui ont eu à me subir au quotidien et qui ont eu le bonheur (ou le malheur) d'assister à l'éclosion et à la maturation d'un homme neuf. Christian a dit pendant mon oral qu'il avait eu l'occasion de me voir évoluer scientifiquement au cours de ces quatre années. Je reconnais bien volontiers que j'ai fait le même constat mais je ne me borne pas à un niveau scientifique et j'ai véritablement l'impression que cette thèse m'a également permis de devenir un homme différent et cette transformation n'a été rendu possible que grâce au soutien constant et indéfectible d'une famille soudée et d'un cercle d'amis fidèles, y compris dans l'adversité.

Pour finir, je voudrais remercier les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'être venu à Versailles pour me faire part de leurs remarques, de leurs interrogations et de leurs mises en garde. J'ai trouvé très intéressant l'échange que nous avons eu et qui a suivi ma présentation et je vous remercie de l'avoir alimenté.

*
* *

Sommaire

SOMMAIRE	1
INTRODUCTION	5
I. PRESENTATION DU COMPLEXE TOR	6
<i>I.A. Découverte de la rapamycine et de sa cible</i>	6
<i>I.B. La protéine TOR</i>	7
I.B.1. Structure moléculaire	7
I.B.2. Une kinase essentielle au développement	8
<i>I.C. Organisation en complexes</i>	9
I.C.1. LST8 / GβL (TORC1 & TORC2)	9
I.C.2. KOG1 / RAPTOR (TORC1)	10
I.C.3. TOC89 (TORC1)	11
I.C.4. AVO1 / mSIN1 (TORC2)	11
I.C.5. AVO3 / RICTOR (TORC2)	12
I.C.6. AVO2 (TORC2) & BIT61 / PROTOR (TORC2)	12
<i>I.D. Les régulateurs en amont de TOR</i>	12
I.D.1. Les signaux perçus	13
I.D.2. Mécanismes moléculaires	13
<i>I.E. Chez les végétaux</i>	14
I.E.1. Et la rapamycine ?	15
I.E.2. Les complexes (composition)	16
I.E.2.a. La protéine AtTOR	16
I.E.2.a.i Profil d'expression	16
I.E.2.a.ii Influence du niveau d'expression de TOR	17
I.E.2.b. RAPTOR	19
I.E.2.b.i Structure	20
I.E.2.b.ii Profil d'expression	20
I.E.2.b.iii Mutants	21
I.E.2.c. Les protéines AtLST8 et, plus particulièrement, AtLST8-1	21
I.E.2.c.i Structure, conservation de fonction et localisation	22
I.E.2.c.ii Analyse des mutants	23
I.E.2.d. L'existence d'un complexe TORC2 ?	24
<i>I.F. Les régulateurs en amont</i>	24
I.F.1. Une voie conservée	24
I.F.2. Qui régule TOR chez les plantes ?	25
I.F.3. La voie SnRK1	26
II. LES VOIES REGULEES PAR TOR	26
<i>II.A. Les grandes voies régulées par TOR</i>	26
II.A.1. Contrôle du cycle cellulaire	27
II.A.2. Contrôle de l'activité des protéines phosphatases	27
II.A.3. Régulation du métabolisme	28
II.A.4. Contrôle de l'autophagie	28
II.A.5. Les cibles de TOR chez les plantes	28
<i>II.B. La traduction protéique</i>	30
II.B.1. Mécanisme général de la traduction eucaryote	30
II.B.1.a. Initiation de la traduction eucaryote	30
II.B.1.b. Elongation et terminaison de la traduction	31

II.B.1.c. Le ribosome eucaryote	31
II.B.1.c.i Présentation du ribosome	31
II.B.1.c.ii Biogenèse du ribosome	32
II.B.2. Cas des plantes	35
II.B.2.a. Structure du ribosome cytoplasmique végétal	35
II.B.2.b. Fonctions des protéines ribosomales végétales	36
II.B.2.c. Cas du ribosome plastidial	38
II.B.3. Régulation de la traduction par TOR	39
II.B.3.a. TOR et le contrôle de la traduction	39
II.B.3.b. TOR contrôle la biogenèse du ribosome	41
II.B.3.b.i Contrôle de l'expression des ARN ribosomiaux (ARN polymérase I)	42
II.B.3.b.ii Contrôle de l'expression de l'ARN ribosomal 5S et des ARN de transfert (ARN polymérase III)	43
II.B.3.b.iii Contrôle de l'expression des RiBi et des protéines ribosomales (ARN polymérase II)	43
II.B.3.c. TOR contrôle la traduction des gènes impliqués dans la machinerie de la traduction.	45
III. UNE STRUCTURE TYPIQUEMENT VEGETALE, LE MERISTEME	46
III.A. Organisation tissulaire et cellulaire	47
III.A.1. Le méristème apical caulinaire	47
III.A.2. Le méristème apical racinaire	48
III.B. Régulation moléculaire	49
III.C. Rôle des hormones dans la structure et l'identité cellulaire au sein du méristème	50
III.C.1. Répartition hétérogène des hormones dans le méristème	51
III.C.2. Les phytohormones : des acteurs majeurs de l'organisation du méristème	51
IV. MON PROJET DE THESE	52
RESULTATS	54
I. TOR ET LE CONTROLE DE LA COMPOSITION DU RIBOSOME	54
I.A. Préambule	54
I.B. Mise au point du protocole	55
I.B.1. Essai sur des rosettes	56
I.B.2. Mise au point sur plantules	58
I.B.2.a. Protocole de culture	58
I.B.2.b. Purification des ribosomes	59
I.B.2.c. Analyse par la plateforme de protéomique	59
I.C. Le fichier de résultats	60
I.C.1. Identification des peptides et notion de spectres	60
I.C.2. Les modifications post-traductionnelles	61
I.C.3. Notion de groupes de protéines	61
I.C.4. Identification des protéines	61
I.C.4.a. Méthode d'identification	61
I.C.4.b. Problèmes d'annotation	62
I.C.5. Données extrapolées des résultats	63
I.D. Résultats des expériences M1 à M4	63
I.D.1. Caractéristiques de ces expériences	63
I.D.2. Les résultats obtenus	64
I.D.2.a. Des protéines non ribosomales co-purifiés	64
I.D.2.b. Analyse du phosphoprotéome	65
I.D.2.c. Un cas particulier, celui de la RPS6	66
I.D.2.d. Recherche de cibles putatives de TOR dans le protéome	67
I.D.2.e. TOR pourrait contrôler le métabolisme carboné	68
I.D.3. Des données avec un faible recouvrement	70

I.E. Suite des mises au point	70
I.F. Les expériences M6 à M9	71
I.F.1. Caractéristiques de ces expériences	72
I.F.2. Des ribosomes purifiés	72
I.F.3. Confirmation de l'effet de l'état d'activation de TOR sur la phosphorylation de la RPS6	74
I.F.4. Recherche de cibles de TOR dans le protéome du ribosome	75
I.F.4.a. Régulation des protéines non ribosomales	75
I.F.4.b. Régulation qualitative des protéines ribosomales par TOR	76
I.F.4.c. Régulation quantitative des protéines ribosomales par TOR	77
I.F.5. Recherche de cibles au niveau du phosphoprotéome	79
I.G. Conclusion	80
II. TOR ET SON INFLUENCE SUR L'ORGANISATION DU MERISTEME.	82
II.A. Analyse cytologique de l'inactivation de TOR	82
II.B. Analyse transcriptionnelle de l'impact de l'inactivation de TOR sur l'organisation du méristème	84
II.A.1. Expression de TOR dans le méristème	85
II.B.1. Expression des gènes méristématiques en réponse à l'inactivation de TOR	86
II.B.1.a. L'inactivation de TOR dérégule la voie CLV3-WUS	86
II.B.1.b. L'inactivation de TOR dérégule d'autres gènes méristématiques	90
II.B.1.c. L'inactivation de TOR dérégule le cycle cellulaire	91
II.B.2. TOR, les hormones et le méristème	92
II.C. Conclusion	94
DISCUSSION	96
I. CONTROLE DE LA COMPOSITION DU RIBOSOME PAR LA KINASE TOR	97
II. TOR CONTROLE L'ORGANISATION DU MERISTEME	103
III. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	108
MATERIEL ET METHODES	109
I. MATERIEL VEGETAL	109
II. CONDITIONS DE CULTURE	109
II.A. Milieux de culture	109
II.B. Conditions de culture	110
III. ANALYSE DES RIBOSOMES	110
III.A. Purification des ribosomes	110
III.B. Préparation de la fraction ribosomale	111
III.C. Analyse en LC-MS/MS	111
III.D. Analyse des résultats	112
IV. BIOCHIMIE	113
IV.A. Western Blot	113
IV.A.1. Migration des protéines	113
IV.A.2. Transfert, incubation avec l'anticorps et révélation	113
IV.A. Western blot sur gel bidimensionnel	113
IV.A.1. Gel bidimensionnel	113
IV.A.1.a. Préparation des échantillons	113

IV.A.1.b. Première dimension	114
IV.A.1.c. Deuxième dimension	114
IV.A.1. Transfert et révélation	114
V. BIOLOGIE MOLECULAIRE	115
V.A. <i>Extraction d'ARN</i>	115
V.B. <i>Reverse transcription</i>	115
V.C. <i>PCR quantitative</i>	115
VI. CYTOLOGIE	115
VI.A. <i>Coloration à l'iodure de propidium</i>	115
VI.B. <i>Coloration GUS</i>	116
BIBLIOGRAPHIE	117
ANNEXES	129

Introduction

Les plantes, de par leur immobilité, sont très fortement inféodées aux conditions de leur environnement. En effet, elles dépendent directement de la disponibilité en nutriments et en eau dans le sol, de l'exposition lumineuse, de la température, de la vitesse du vent, ... Les plantes ont donc dû s'adapter en mettant en place des mécanismes particuliers pour percevoir leur environnement et y répondre. Cette réponse passe en partie par le fait que les plantes ont une croissance indéterminée, autrement dit, elles sont capables de produire de nouveaux organes tout au long de leur vie alors que la plupart des animaux ont développé, dès l'embryogenèse, tous les organes présents dans l'organisme adulte. Néanmoins, un grand nombre de processus, cellulaires et moléculaires, sont communs à tous les êtres vivants et, plus particulièrement, à tous les eucaryotes. Ainsi, il semble que les mécanismes contrôlant la croissance et la division cellulaires soient conservés.

Une voie de signalisation, conservée chez tous les eucaryotes, a émergé en tant que régulateur essentiel de la croissance en réponse aux conditions environnementales favorables. Cette voie fait intervenir une kinase, TOR (Target Of Rapamycin), comme élément central et, même si elle a d'abord identifiée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, elle est maintenant bien décrite entre autres chez les levures, les mammifères et la drosophile. Depuis la découverte de TOR chez les plantes, et tout particulièrement chez *Arabidopsis thaliana* (Menand et al., 2002), de nombreuses données ont été acquises et permettent, non seulement de mettre en évidence l'importance de cette voie dans la croissance des plantes, mais aussi de commencer à comprendre les mécanismes de régulation de cette voie chez les végétaux.

C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse et je vais donc articuler mon introduction autour d'un premier chapitre portant sur la présentation du complexe TOR et les mécanismes régulant cette voie de signalisation en amont, chez les eucaryotes en générale et chez les végétaux en particulier. Puis, dans un deuxième chapitre, je présenterai les voies régulées par TOR en insistant sur la régulation de la synthèse protéique. Enfin, dans un dernier chapitre, j'aborderai la question du méristème, structure typiquement végétale, foyer des cellules souches et berceau de l'organogenèse chez les plantes.

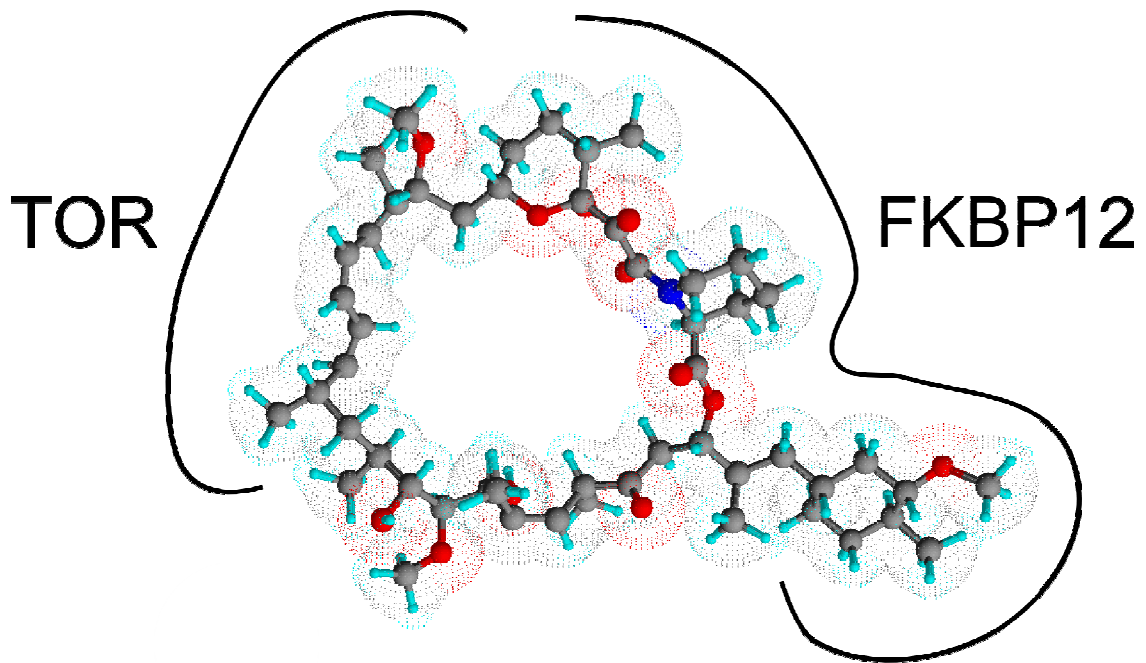


Figure 1 : Structure de la rapamycine : La structure, ici en trois dimensions, est une représentation inspirée de celle proposée par Lorberg et Hall (2004), réalisée avec ChemSketch (gris : carbone, rouge : oxygène, bleu : azote, cyan : hydrogène). Les domaines de fixation de TOR et FKBP12 proviennent de Crespo et Hall (2002).

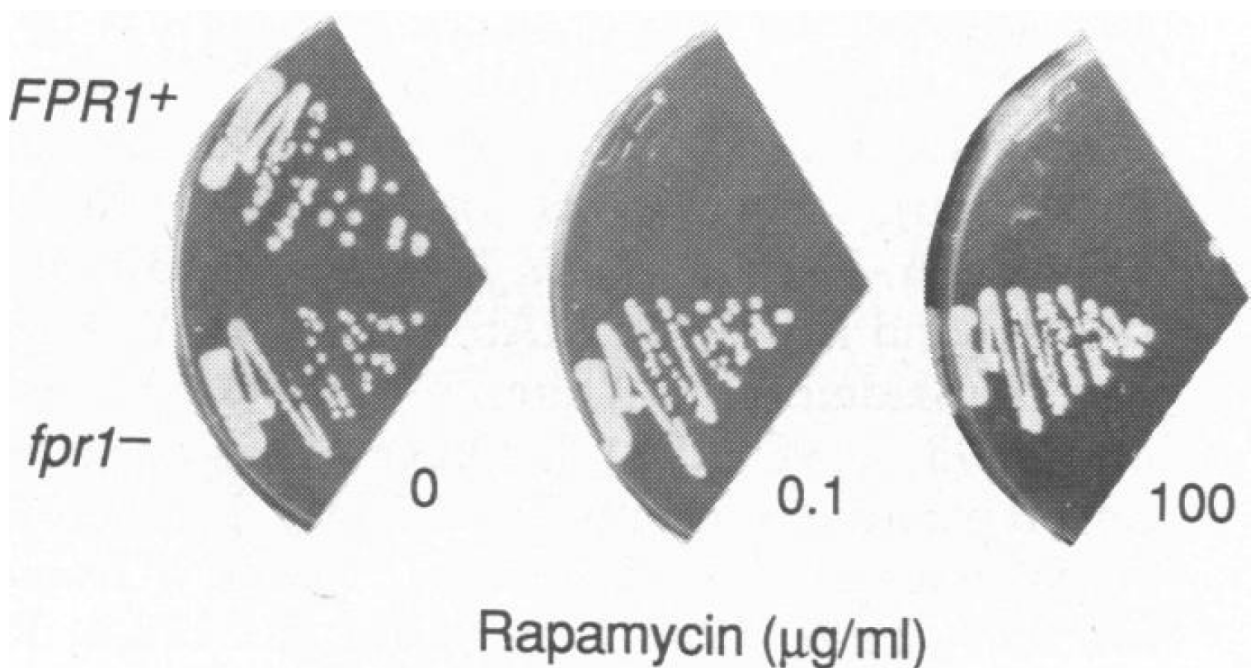


Figure 2 : Effet de la rapamycine sur *S. cerevisiae* et identification des gènes impliqués dans la sensibilité à cette drogue : Un traitement à la rapamycine à 0.1 µg/ml entraîne un arrêt de croissance chez les cellules de levure sauvage tandis que les mutants déficients en FKBP présentent une résistance à la rapamycine, y compris à une concentration de 100 µg/ml (d'après Heitman et al., 1991a)

I. PRESENTATION DU COMPLEXE TOR

La découverte de la voie de signalisation de TOR a d'abord été réalisée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* puis ce domaine d'étude s'est largement étendu grâce aux travaux réalisés chez les mammifères. Il a finalement fallu attendre le début des années 2000 pour que l'on voie apparaître les premières études sur la voie de signalisation de TOR chez les végétaux.

Dans ce premier chapitre, je vais donc présenter un aperçu de l'état actuel des connaissances sur cette kinase, aussi bien chez la levure que chez les mammifères concernant principalement l'organisation en complexes et les régulateurs en amont de la kinase TOR. Enfin, je conclurai en présentant ce qui a été publié sur la voie de signalisation de cette kinase chez les plantes.

I.A. Découverte de la rapamycine et de sa cible

Afin de compléter les connaissances sur la pharmacopée naturelle, une équipe canadienne a, dans les années 1960, prélevé des échantillons de sols dans les îles de Pâques (Rapa Nui dans la langue locale). L'analyse de ces échantillons a permis de révéler l'existence d'une bactérie, *Streptomyces hygroscopicus*, productrice d'un métabolite secondaire, connu depuis sous le nom de rapamycine (**figure 1, d'après Lorberg et Hall (2004) et Crespo et Hall (2002)**). La rapamycine a rapidement révélé des propriétés antifongiques dues à un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 puis des études postérieures ont permis de mettre en évidence le même pouvoir cytostatique chez les cellules mammifères et, notamment, les cellules du système immunitaire, comme les cellules T (Houchens et al., 1983; Thomson et al., 2009), suggérant ainsi que les cibles moléculaires de la rapamycine seraient conservées chez plusieurs eucaryotes et permettant, de ce fait, d'utiliser les cellules fongiques pour mieux comprendre le mode d'action de ce composé chimique (Heitman et al., 1991a) (pour revue Lorberg and Hall, 2004; Loewith, 2011).

Une recherche de mutants de levure insensibles à la rapamycine a mis en évidence l'importance du gène *FPR1* (FK506-binding Proline Rotamase) codant la protéine FKBP12 (FK506-Binding Protein) (**figure 2, d'après Heitman et al. (1991a)**). Cette protéine, bien que non essentielle à la vie cellulaire, est nécessaire pour la toxicité de la rapamycine (Heitman

	ScTOR1	ScTOR2	SpTOR1	SpTOR2	CnTOR1	CeTOR	AtTOR	dTOR	mTOR
ScTOR1	100	67	42	47	39	28	36	37	38
ScTOR2		100	43	48	40	28	38	38	40
SpTOR1			100	52	42	28	38	40	42
SpTOR2				100	44	29	42	42	44
CnTOR1					100	26	35	38	39
CeTOR						100	28	32	35
AtTOR							100	38	40
dTOR								100	53
mTOR									100

Tableau 1 : Pourcentage d'identité entre les kinases TOR de différents organismes : Sc : *Saccharomyces cerevisiae*, Sp : *Schizosaccharomyces pombe*, Cn : *Cryptococcus neoformans*, Ce : *Caenorhabditis elegans*, At : *Arabidopsis thaliana*, d : *Drosophila melanogaster*, m : mammifère (ce qui inclut la souris, le rat et l'être humain) ; D'après Crespo et Hall (2002).

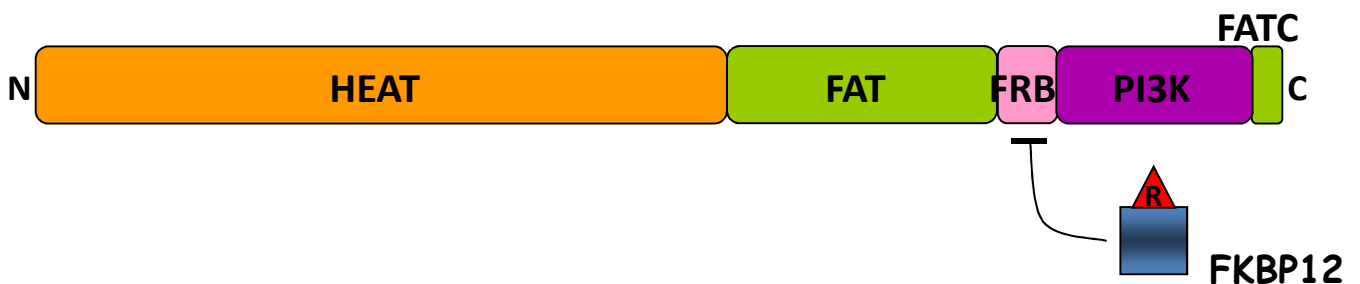


Figure 3 : Structure des protéines TOR : De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, on trouve les répétitions HEAT (Huntingtin, Elongation Factor 3, sous-unité A de PP2A, TOR1), le domaine FAT (FRAP, ATM, TRRAP), le domaine FRB (FKBP12-Rapamycine Binding domain) qui permet l'interaction avec la protéine FKBP12 (FK506 Binding Protein 12) lorsque la rapamycine (R) est fixée dessus, le domaine catalytique kinase et le domaine FATC (FRAP, ATM, TRRAP C-terminal) ; D'après Adami et al. (2007)

et al., 1991a; Heitman et al., 1991b). Etant donné l'insensibilité à la rapamycine des mutants *fpr1* et le caractère non essentiel de ce gène pour la viabilité cellulaire, un modèle a émergé dans lequel la rapamycine se fixe à FKBP12 et ce complexe peut alors inhiber une autre cible qui serait essentiel à la croissance et au bon fonctionnement du cycle cellulaire.

Parmi les autres mutations mises en évidence par ce crible, trois ont été identifiées dans la séquence de la cible du complexe rapamycine-FKBP12 (Bierer et al., 1990; Heitman et al., 1991a; Schreiber, 1991; Heitman et al., 1992) : deux de ces mutants étaient affectés dans la séquence du gène *TOR1* et le dernier dans la séquence du gène *TOR2*. Contrairement aux mutations dans la séquence de *FPR1*, les mutations dans les séquences de *TOR* sont des mutations de gain de fonction qui confèrent une résistance à la rapamycine, y compris à l'état hétérozygote.

Etant données les données citées précédemment, le modèle qui a émergé et qui reste en vigueur pour expliquer le mécanisme moléculaire de l'action de la rapamycine repose donc sur la fixation de la rapamycine sur la protéine FKBP12, puis, le complexe FKBP12-rapamycine se fixe spécifiquement sur un domaine de la protéine TOR, le domaine FRB (FKBP12-Rapamycin Binding domaine), et entraîne son inactivation (Lorenz and Heitman, 1995; Choi et al., 1996).

I.B. La protéine TOR

I.B.1. Structure moléculaire

Les protéines TOR sont présentes chez tous les eucaryotes et de manière très conservée. Comme nous l'avons vu précédemment, chez *S. cerevisiae*, il existe deux gènes TOR (*TOR1* et *TOR2*) mais chez les autres eucaryotes, une seule copie de ce gène a été retrouvée (**tableau 1, d'après Crespo et Hall (2002)**) (Crespo and Hall, 2002; Crespo et al., 2005).

Les protéines TOR sont de très grosses protéines kinases, d'environ 2500 acides aminés et d'un poids moléculaire proche de 280 kDa. Cette protéine est organisée en plusieurs domaines (**figure 3, d'après Adami et al. (2007)**) :

- Au niveau de la région N-terminale, la protéine TOR contient des motifs répétés HEAT (Huntingtin, Elongation Factor3, sous-unité A de PP2A, TOR1) d'environ 40 acides aminés (Andrade and Bork, 1995). Ces répétitions forment des hélices α antiparallèles qui permettent les interactions protéine-protéine. Il a été montré, chez plusieurs eucaryotes, que ces répétitions permettent à la protéine TOR de former des multimères (pour revue, Zinzalla et al., 2010).
- Il est suivi d'un domaine FAT (FRAP, ATM et TRRAP) qui pourrait interagir avec le domaine C-terminal FATC (FAT C-terminal), permettant ainsi le changement de conformation de la protéine et la libération du domaine catalytique (Hay and Sonenberg, 2004).
- Entre les domaines FAT et FATC se trouvent le domaine FRB (FKBP12-Rapamycine Binding domain) dont nous avons déjà parlé et qui est spécifique des protéines TOR et permet la fixation de la rapamycine et, donc, l'inactivation de TOR.
- Enfin, avant le domaine FATC se trouve le domaine sérine/thréonine kinase, semblable à celui des phosphatidylinositol kinases. Ce domaine est très conservé entre la levure et les mammifères et la protéine chimérique formée de l'extrémité N-terminale de TOR de *S. cerevisiae* et de l'extrémité C-terminale de TOR de mammifères permet de compléter les mutants *tor1* et *tor2* de levure alors que c'est impossible avec la protéine mTOR entière (Alarcon et al., 1996).

I.B.2. Une kinase essentielle au développement

TOR est présent chez tous les eucaryotes et sa séquence est relativement bien conservée. Il a également été montré que cette kinase est essentielle au développement. Ainsi, les mutants *tor* de drosophile présentent un arrêt de développement dès le stade larvaire (Zhang et al., 2000), les mutants de *C. elegans* présentent également un arrêt de développement (Long et al., 2002) et les mutants de souris meurent prématurément au cours du développement embryonnaire (Hentges et al., 2001). La perte de fonction de la kinase TOR chez *Arabidopsis* entraîne également une létalité embryonnaire au stade globulaire (voir partiel.E.2.a.ii : Influence du niveau d'expression de TOR, page 17).

Enfin, chez les levures (que ce soit chez *S. cerevisiae* ou chez *S. pombe*), seul le gène TOR2 est essentiel à la croissance de la cellule (Kunz et al., 1993; Weisman, 2010).

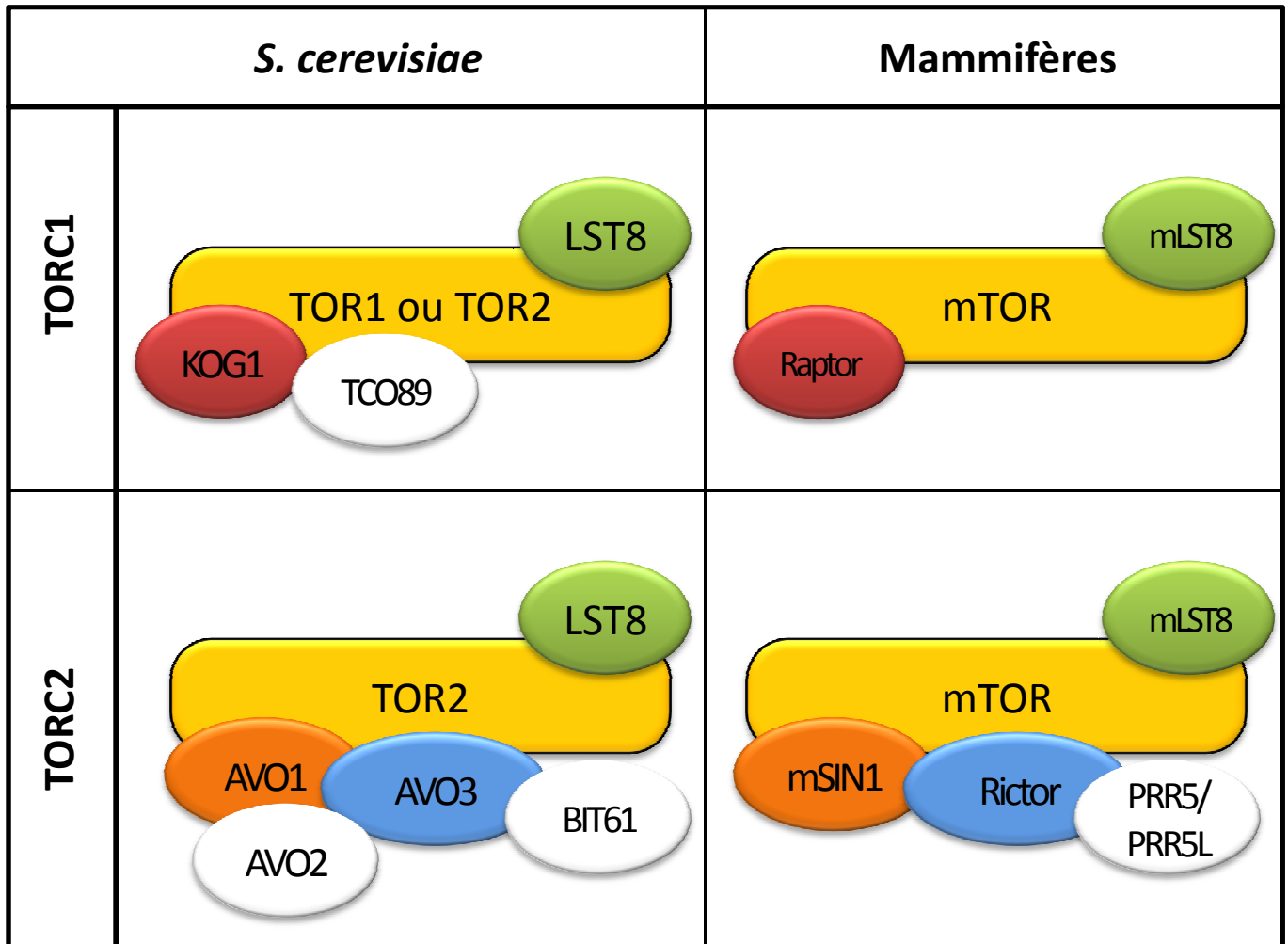


Figure 4 : Composition des complexes TORC1 et TORC2 chez la levure *S. cerevisiae* et chez les mammifères, d'après Zinzalla et al., (2010)

I.C. Organisation en complexes

Une approche de purification biochimique des protéines TOR1 et TOR2 de levure a permis de mettre en évidence l'existence de deux complexes protéiques de très grosse taille TORC1 et TORC2 de composition et de fonction différentes (**figure 4, d'après Zinzalla et al. (2010)**) (Loewith et al., 2002).

Parmi ces deux complexes, le complexe TORC1 (TOR Complex 1) est composé de la protéine TOR1 ou TOR2 ainsi que de KOG1 (Kontroller Of Growth1), LST8 (Lethal with Sec Thirteen 8) et TCO89 (TOR Complex One subunit of 89 kDa) (Loewith et al., 2002; Reinke et al., 2004). Le complexe TORC1 est, de ces deux complexes, le seul à s'être révélé sensible à la rapamycine (Loewith et al., 2002). Le complexe 2, quant à lui, est composé des protéines TOR2, AVO1 (Adheres VOraciously to TOR2p), AVO2, AVO3, LST8 et BIT61 (Blinding partner of TOR2p of 61 kDa) (Loewith et al., 2002; Reinke et al., 2004). Bien que le génome des mammifères ne contienne qu'une seule protéine TOR, des études de purification biochimique ont également permis de mettre en évidence chez ces organismes des complexes de composition et de fonction identiques à ce qui a été mis en évidence chez la levure (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002; Sarbassov et al., 2004).

Bien que le deux complexes TOR participent ensemble à la stimulation de la croissance cellulaire, ils n'agissent pas sur les mêmes mécanismes. Ainsi, le complexe TORC1 régule la traduction et la progression du cycle cellulaire tandis que le complexe TORC2 contrôle l'organisation du cytosquelette et l'activité de la kinase AKT. Autrement dit, le complexe TORC1 contrôle les aspects temporels de la croissance cellulaire tandis que le complexe TORC2 contrôle les aspects spatiaux de la croissance (Barbet et al., 1996; Loewith et al., 2002). Pour plus de détails sur les cibles des complexes TOR, voir le chapitre II, page 26.

I.C.1. LST8/GβL (TORC1 & TORC2)

La protéine LST8 (Lethal with Sec Thirteen 8)/GβL (G protein β-subunit-Like protein) est, avec la protéine TOR, la seule protéine commune aux deux complexes TORC1 et TORC2 (Chen and Kaiser, 2003; Kim et al., 2003). Il s'agit d'une protéine d'environ 35 kDa composée de sept domaines WD40 formant une plateforme d'interaction protéine-protéine, ce qui

pourrait lui permettre de recruter des régulateurs ou des substrats des complexes TOR (Ochotorena et al., 2001; Díaz-Troya et al., 2008).

Le gène *LST8* est essentiel au développement de la levure *S. cerevisiae* (Roberg et al., 1997) et des mammifères (Guertin et al., 2006) et une mutation dans ce gène entraîne, chez *C. elegans*, des problèmes de croissance (Kim et al., 2003).

L'interaction entre TOR et LST8 a été mise en évidence chez plusieurs eucaryotes comme *S. cerevisiae* (Loewith et al., 2002), les mammifères (Kim et al., 2003), *Chlamydomonas reinhardtii* (Díaz-Troya et al., 2008) et *Arabidopsis* (Moreau et al., 2012). Cette interaction entre TOR et LST8 se fait au niveau du domaine kinase de la protéine TOR (Kim et al., 2003; Adami et al., 2007). En outre, il a été montré que la diminution de l'expression de GβL entraîne une diminution de l'association entre TOR et RAPTOR alors que cette association est stabilisée lorsque GβL est surexprimé, entraînant ainsi une augmentation de l'activité kinase TOR. Ces résultats suggèrent que LST8/GβL serait requis pour la formation du complexe RAPTOR-TOR (Kim et al., 2003).

I.C.2. KOG1 / RAPTOR (TORC1)

La protéine KOG1 (Kontroller Of Growth1)/Raptor (Regulatory-Associated Protein of mTOR), d'une masse moléculaire proche de 160 kDa est très conservée au sein des eucaryotes. Elle s'organise en un domaine RNC/C (Raptor N-terminal Conserved, Caspase Like) en sa partie N-terminale puis possède quatre répétitions HEAT et, finalement, sept répétitions WD40 au niveau de son extrémité C-terminale (Loewith et al., 2002). Cette protéine est exprimée de manière similaire à celle de TOR (Kim et al., 2002) et un traitement à la rapamycine dissocie le complexe TOR-RAPTOR, ce qui résulte en une diminution de l'activité kinase de TOR (Oshiro et al., 2004).

La protéine RAPTOR est essentielle et il a été montré que la mutation de cette protéine est létale chez *S. cerevisiae* (Loewith et al., 2002), provoque un arrêt du développement au stade larvaire chez *C. elegans* (Hara et al., 2002) et au stade embryonnaire chez la souris (Guertin et al., 2006). En effet, une baisse d'expression du gène *RAPTOR* engendre une diminution de l'expression de *TOR* et RAPTOR contribue au maintien de la stabilité de la

protéine TOR (Kim et al., 2002). Par ailleurs, il a été montré que les cellules mutantes *kog1* arrêtent leur croissance après quelques heures de culture (Loewith et al., 2002).

Cette protéine est également très importante pour le complexe TOR puisqu'il a été montré qu'elle intervient dans la reconnaissance des motifs TOS (TOR Signaling) et RAIP qui permettent la reconnaissance et la phosphorylation des cibles de TOR par le complexe (Hara et al., 2002; Schalm and Blenis, 2002; Beugnet et al., 2003; Choi et al., 2003; Schalm et al., 2003).

I.C.3. TCO89 (TORC1)

La protéine TCO89 (TOR Complex One subunit of 89 kDa), constitutive du complexe TORC1, n'est pas une protéine essentielle pour la survie de la cellule. Il a notamment été montré que la mutation dans le gène codant cette protéine n'a aucun effet sur l'activité de régulation de la transcription du complexe TORC1 (Reinke et al., 2004). Néanmoins, la mutation *TCO89* conduit à une hypersensibilité à la rapamycine et à des défauts d'intégrité de la paroi cellulaire (Reinke et al., 2004).

I.C.4. AVO1/ mSIN1 (TORC2)

La protéine AVO1 (Adheres VOraciously to TOR2p)/SIN1 (Stress Activated Protein Kinase (SAPK) Interacting protein) est une protéine d'une masse moléculaire prédite proche de 130 kDa (bien qu'elle ait une masse moléculaire apparente de 165 kDa (Loewith et al., 2002)). On la retrouve chez de nombreux eucaryotes (mais pas chez *Arabidopsis*) et les séquences de ces différentes protéines sont assez différentes, aussi bien au niveau de leur longueur que de l'identité de séquence (Wang and Roberts, 2005). Toutefois, Wilkinson et al. (1999) sont parvenus à compléter le mutant *sin1* de *S. pombe* avec le gène humain hSIN1.

Cette protéine est une protéine essentielle qui joue un rôle d'activateur au sein du complexe TORC2 en maintenant l'interaction entre RICTOR et mTOR (Pearce et al., 2007). Les mutants de souris pour ce gène présentent un phénotype de létalité au stade embryonnaire (Jacinto et al., 2006) et les mutants de *S. pombe* sont plus sensibles aux stress par rapport au sauvage (Wilkinson et al., 1999). Comme AVO3, cette protéine peut être autophosphorylée par le complexe TORC2 (Wullschlegel et al., 2005).

Snapshot: mTOR Signaling

Alexandre Souillard and Michael N. Hall
 Biozentrum, University of Basel, CH-4056 Basel, Switzerland

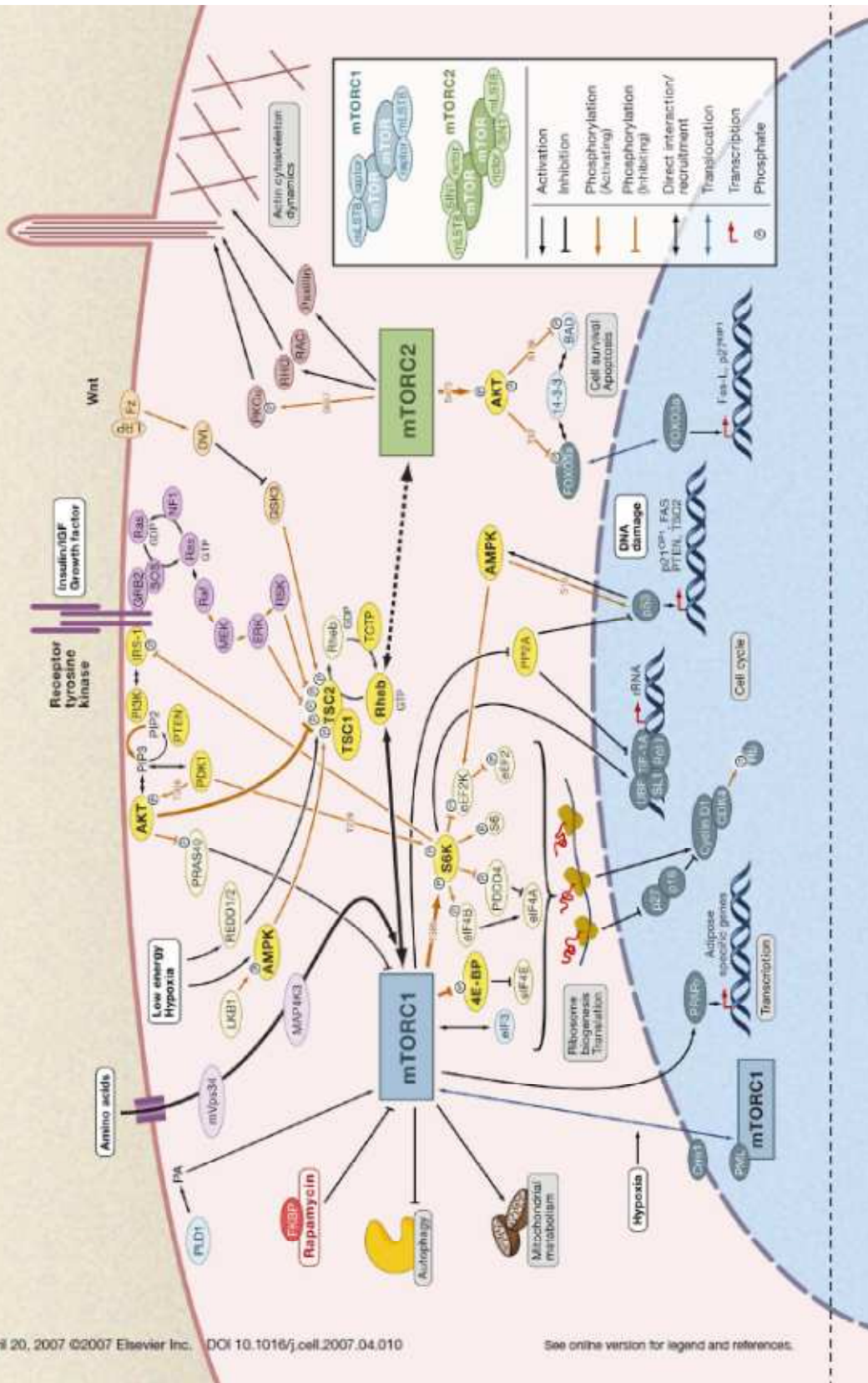


Figure 5 : Voie de signalisation de TOR chez les mammifères : Cette voie permet d'intégrer des facteurs environnementaux et endogènes comme la disponibilité en nutriments, les hormones (l'insuline notamment) ou le niveau d'énergie intracellulaire et, en réponse à ces stimuli, d'activer des voies aussi importantes pour la vie cellulaire que la transcription, la traduction, le cycle cellulaire ou le recyclage nutritionnel (Souillard et Hall, 2007)

I.C.5. AVO3/ RICTOR (TORC2)

La protéine AVO3 (Adheres VOraciously to TOR2p)/RICTOR (Rapamycin Insensitive Companion of mTOR) est une protéine d'environ 150 kDa essentielle à la croissance chez *S. cerevisiae* (Loewith et al., 2002; Sarbassov et al., 2004) et au développement embryonnaire chez la souris (Guertin et al., 2006). Bien que retrouvée chez plusieurs eucaryotes comme la levure, les mammifères, la drosophile et *C. elegans*, aucune protéine RICTOR n'a été identifiée dans le génome d'*Arabidopsis* et, contrairement aux autres protéines des complexes TORC, la séquence de cette protéine est beaucoup moins conservée (Sarbassov et al., 2004). Comme AVO1, cette protéine peut être autophosphorylée par le complexe TORC2 (Wullschleger et al., 2005).

I.C.6. AVO2 (TORC2) & BIT61/ PROTOR (TORC2)

Ces deux protéines, non essentielles au développement de la cellule, sont capables d'interagir physiquement avec les protéines SLM1 et SLM2 qui pourraient être des membres du complexe TORC2 et dont le niveau de phosphorylation est régulé positivement par TOR2 (Fadri et al., 2005). Ces protéines SLM1 et SLM2 (Synthetic Lethal with MSS4) sont impliqués dans la voie de signalisation des PIP2 qui sont nécessaires à la croissance cellulaire et à la polarisation du cytosquelette d'actine. Ainsi, AVO2 et BIT61 pourraient jouer des rôles d'adaptateur pour les substrats de TOR (et notamment SLM1 et SLM2).

I.D. Les régulateurs en amont de TOR

La voie de signalisation de TOR permet d'intégrer de nombreux signaux permettant d'ajuster au mieux la croissance et le développement en réponse aux stimuli interne et externe à la cellule et/ou à l'organisme. Depuis plusieurs années, la voie de signalisation de la kinase TOR en amont de celle-ci a assez bien été décrite, notamment chez les mammifères et la levure, et permet aujourd'hui de pouvoir avoir une vue d'ensemble de tous les signaux pouvant être intégrés dans cette voie.

Parmi ces facteurs régulant l'activité de la kinase TOR, on peut citer les nutriments, les facteurs de croissance, le niveau d'énergie et les stress (**figure 5, d'après Soulard et Hall (2007)**) (pour revue, Robaglia et al., 2004; Wullschleger et al., 2006).

I.D.1. Les signaux perçus

L'état nutritionnel de la cellule est un facteur important dans la régulation de la kinase TOR. Ainsi, il a été montré que, chez les mammifères, un traitement à la rapamycine mime une carence en acides aminés et, plus particulièrement, en glutamine et en leucine et des expériences de transcriptome ont montré qu'un traitement à la rapamycine mime une carence en glucose (Peng et al., 2002). Chez *S. cerevisiae*, les nutriments carbonés et azotés activent la voie de signalisation de TOR (Kuruvilla et al., 2001; Crespo et al., 2002).

L'apport d'insuline ou de facteurs de croissance semblables à de l'insuline active la voie de signalisation de TOR et il a été montré que cet apport entraîne une forte augmentation du degré de phosphorylation des S6 kinase et 4E-BP. Qui plus est, cette phosphorylation est inhibée par l'apport de rapamycine (Chung et al., 1994; von Manteuffel et al., 1996)

La croissance cellulaire nécessite une production abondante de nouvelles protéines et, donc, nécessite également des niveaux d'énergie cellulaire élevés. Le complexe mTORC1 perçoit le niveau énergétique par l'intermédiaire de l'AMPK (AMP-activated kinase) qui est activée lorsque le niveau d'énergie cellulaire est faible et que la quantité d'AMP est trop élevée par rapport à la quantité d'ATP (Wullschleger et al., 2006). Le suppresseur de tumeur LKB1, kinase en amont de l'AMPK, pourrait également jouer un rôle dans cette voie puisque les cellules déficientes en LKB1 présentent une hyperactivation de la voie de signalisation de TOR (Corradetti and Guan, 2006).

Les cellules répondent à divers stress environnementaux comme l'hypoxie, les cassures de l'ADN, une perturbation de l'état d'oxydo-réduction ou encore le déficit énergétique. Il a été montré que TOR joue un rôle important dans la médiation entre la perception de ces stress et la réponse de la cellule (Wullschleger et al., 2006).

I.D.2. Mécanismes moléculaires

La fixation de l'insuline sur son récepteur entraîne le recrutement et la phosphorylation de la protéine IRS1 (Insulin Receptor Substrate) qui recrute alors la PI3 kinase. Cette enzyme catalyse la conversion du PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-phosphate) membranaire en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-phosphate) (la réaction dans le

sens inverse est catalysée par la protéine PTEN). L'accumulation de PIP3 dans la membrane entraîne le recrutement des protéines PDK1 et Akt et la phosphorylation-activation d'Akt par PDK1. Akt phosphoryle et inactive alors la protéine TSC2 (Tuberous Sclerosis Protein) qui forme un hétérodimère avec TSC1 pour contrôler négativement les petites Rheb GTPases. Lorsqu'elles sont actives, les Rheb GTPases se fixent sur le domaine kinase de TOR et active le complexe mTORC1 dans une voie faisant intervenir du GTP (Wullschleger et al., 2006; Dobashi et al., 2011).

Le lien entre la perception des nutriments (et particulièrement des acides aminés) et l'activation du complexe mTORC1 pourrait également se faire par l'inactivation de TSC1-TSC2 et/ou l'activation des Rheb GTPases mais le même effet positif de l'apport d'acides aminés sur l'activité du complexe mTORC1 a également été rapporté chez *S. cerevisiae* qui est dépourvue d'orthologues fonctionnels des TSC et des Rheb GTPases, suggérant ainsi l'existence d'une autre voie qui co-existerait (Wullschleger et al., 2006). Cette autre voie pourrait faire intervenir la MAP kinase kinase MAP4K3 qui est réprimée lors d'une carence nutritionnelle et stimulée après l'apport d'acides aminés. De plus, la surexpression de MAP4K3 entraîne une augmentation de la phosphorylation de la S6 kinase et 4E-BP et limite l'inactivation du complexe TORC1 en réponse à une carence nutritionnelle (Findlay et al., 2007; Avruch et al., 2009).

I.E. Chez les végétaux

Cette partie s'inspire largement d'articles de revue publiés récemment au sein de l'équipe (Moreau et al., 2010; Dobrenel et al., 2011) et des articles qui y sont cités.

Même si certains membres des voies de signalisation de TOR chez les mammifères ou la levure ne sont pas conservés chez les plantes, d'autres en revanche, sont bien conservés et semblent jouer des rôles, au moins en partie, similaires à leurs orthologues. Dans cette partie, nous allons donc passer en revue les connaissances actuelles sur cette partie conservée de la voie de signalisation ainsi que les différences qui existent entre les plantes et les autres eucaryotes.

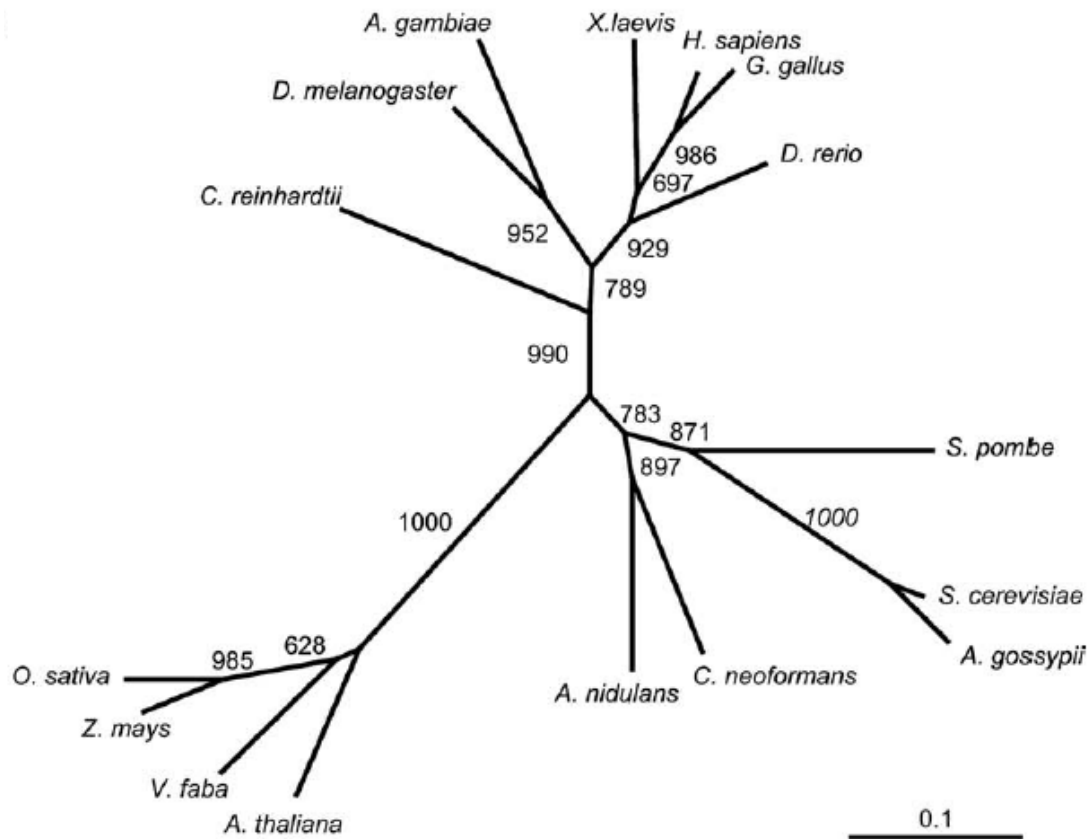


Figure 6 : Analyse phylogénétique des protéines FKBP12 , d'après Crespo et al. (2005)

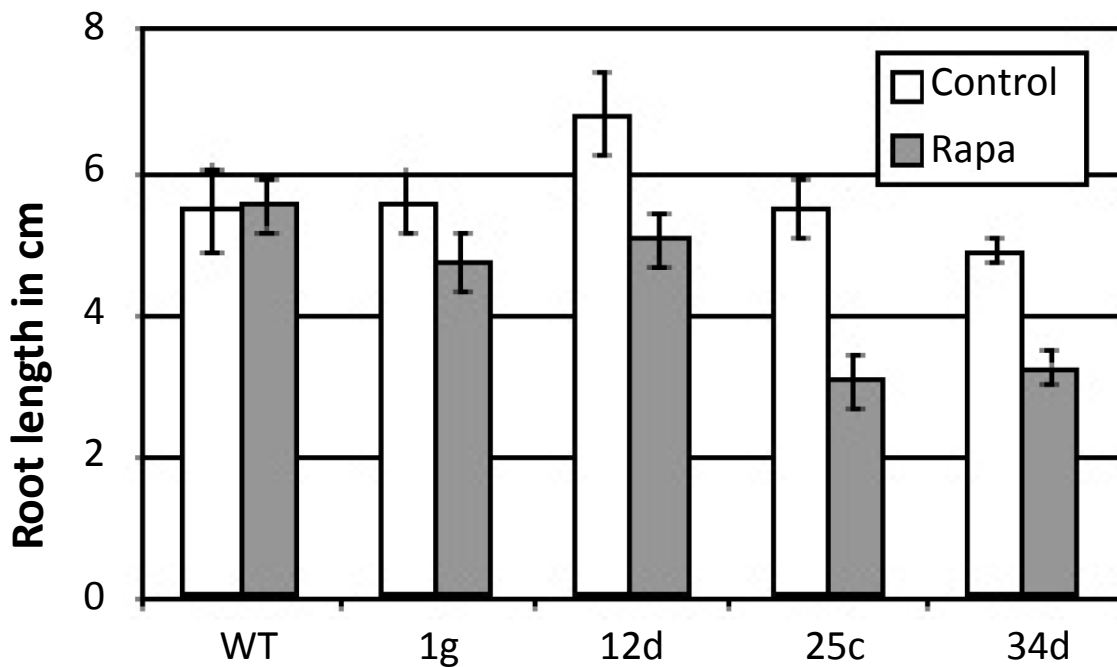


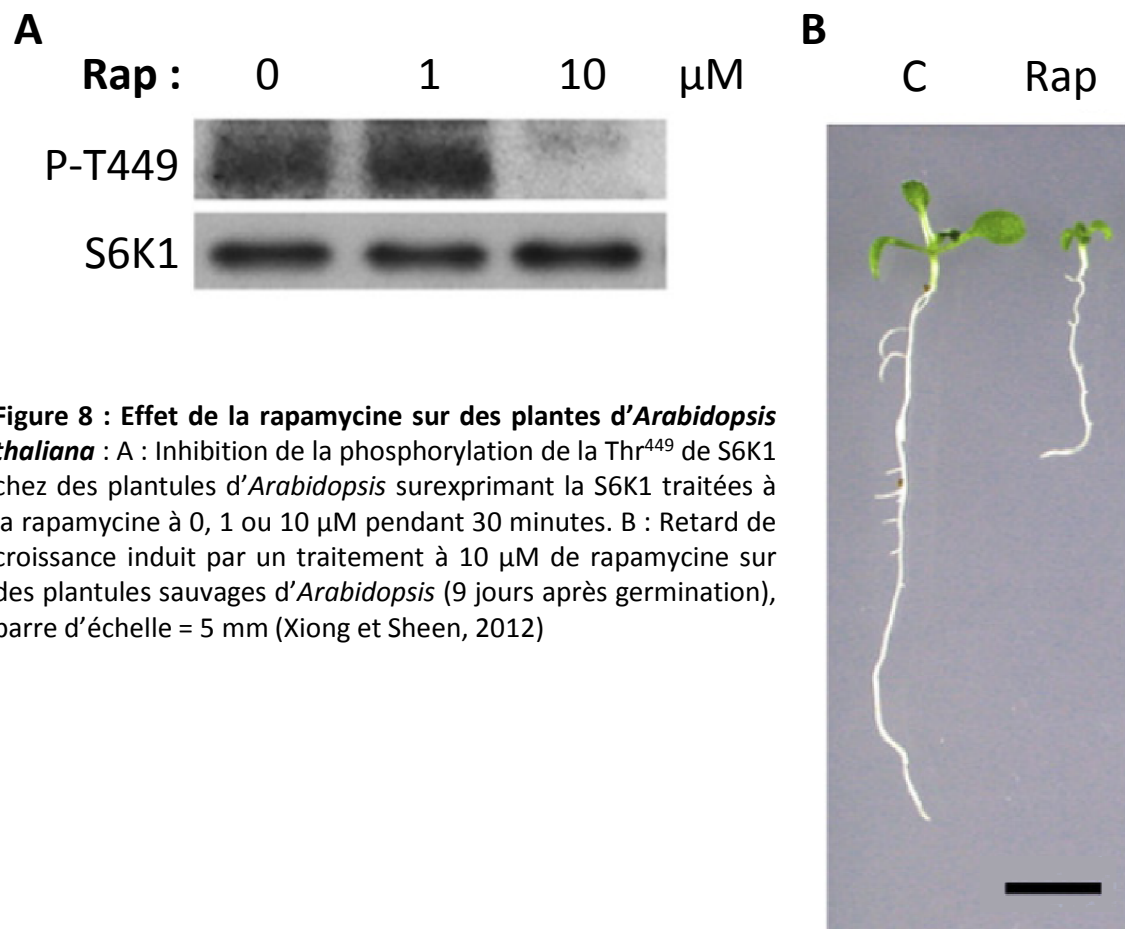
Figure 7 : L'expression ectopique de FKBP12 de *S. cerevisiae* conduit à une sensibilité à la rapamycine chez *Arabidopsis thaliana* : Mesure de l'élongation de la racine primaire de quatre lignées exprimant ScFKBP12 comparé au sauvage, en présence ou en absence de rapamycine à 10 µg/ml. La mesure est réalisée 10 jours après la germination (Sormani et al., 2007)

I.E.1. Et la rapamycine ?

Chez les eucaryotes, la rapamycine agit en formant un complexe ternaire avec la protéine FKBP12 et le domaine FRB de TOR, inhibant l'activité de TOR (pour plus de détails, voir partie I.A : Découverte de la rapamycine et de sa cible, page 6). Plusieurs études ont permis de mettre en évidence une insensibilité des végétaux à la rapamycine, par exemple chez *Arabidopsis*, *Nicotiana tabacum*, *Brassica napus*, et *Oryza sativa*, ainsi que chez la mousse *Physcomitrella patens* (Menand et al., 2002 ; communications personnelles) tandis que les algues unicellulaires, comme *C. reinhardtii*, ont conservé leur sensibilité à la rapamycine (Crespo et al., 2005).

L'hypothèse avancée pour expliquer cette insensibilité à la rapamycine vient d'une trop grande divergence de séquence entre la FKBP12 végétale et celle des autres eucaryotes (**figure 6**) (Crespo et al., 2005). Cette hypothèse est étayée par plusieurs expériences de double hybride qui montrent que le domaine FRB de la protéine AtTOR n'interagit pas avec AtFKBP12 (Menand et al., 2002; Sormani et al., 2007) ni avec AtFKBP15-1, AtFKBP15-2 ou AtFKBP62 (qui peuvent être d'autres orthologues de la protéine FKBP12 de *S. cerevisiae*) (Robaglia et al., 2004) en présence de rapamycine. Enfin, il a été montré *in vitro* que le domaine FRB de AtTOR est capable de fixer la protéine FKBP12 de *S. cerevisiae* en présence de rapamycine et ce constat a permis de produire des plantes partiellement sensibles à la rapamycine en exprimant la protéine ScFKBP12 de manière ectopique sous le contrôle du promoteur constitutif 35S (**figure 7**) (Sormani et al., 2007).

Toutefois, ce dogme a récemment été remis en cause, notamment par deux études qui montrent que le maïs est sensible à la rapamycine (Agredano-Moreno et al., 2007) alors qu'il possède une FKBP12 similaire à celle des autres végétaux (Crespo et al., 2005) et, plus récemment, l'équipe de Jen Sheen est parvenue à mettre en évidence une sensibilité à la rapamycine chez *Arabidopsis* (Xiong and Sheen, 2012). Cette étude montre que 30 minutes de traitement à la rapamycine (10 μ M) sur des plantules est suffisant pour perdre la phosphorylation sur la Thr⁴⁴⁹ de la S6K1 (**figure 8A**) et que cette perte nécessite la présence d'une FKBP12 fonctionnelle. Il est également montré que 10 μ M de rapamycine est suffisant pour inhiber (au moins partiellement) la croissance des plantules (**figure 8B**). Enfin, ils montrent par une expérience de split luciférase que le domaine FRB de la protéine AtTOR



interagit avec AtFKBP12 en présence de rapamycine à des concentrations comprises entre 1 nM et 1 μ M.

Xiong & Sheen (2012) expliquent cette divergence dans les résultats en évoquant l'idée que l'interaction entre AtFKBP12 et AtTOR pourrait être transitoire et faible ou nécessiterait des modifications post-traductionnelles qui ne pourraient pas avoir lieu lors des analyses en double hybride mais qui se produiraient lorsque les analyses sont réalisées *in planta*. Ils expliquent également la « restauration » de la sensibilité chez *Arabidopsis* lorsque l'on y exprime ScFKBP12 par le fait que cette protéine exogène est placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif. En effet, ils obtiennent les mêmes résultats en surexprimant la protéine endogène. Cependant, ils n'expliquent pas pourquoi ils observent un effet de la rapamycine sur la croissance des plantules sauvages là où Sormani et al. (2007) n'en avaient pas vu. Ceci peut néanmoins être dû à la différence dans le mode d'administration. En effet, Xiong & Sheen appliquent la rapamycine dans un milieu liquide qu'ils changent tous les deux jours alors que Sormani et al. appliquent la rapamycine dans un milieu solide en une seule fois. Cette différence peut provoquer des perturbations au niveau de la disponibilité de la rapamycine pour la plante.

I.E.2. Les complexes (composition)

Le génome d'*Arabidopsis* contient un gène *TOR*, deux gènes *RAPTOR* et deux gènes *LST8*. L'interaction physique entre TOR et RAPTOR (Mahfouz et al., 2006) ainsi qu'entre TOR et LST8 (Moreau et al., 2012) ont été vérifiés.

I.E.2.a. La protéine AtTOR

La protéine TOR chez *Arabidopsis* a été pour la première fois décrite par Menand et al. (2002). Dans cet article, les auteurs décrivent le gène *TOR* comme étant unique chez *Arabidopsis* et c'est donc sur l'étude de ce gène que va porter cette partie.

I.E.2.a.i Profil d'expression

Une fusion traductionnelle de la protéine TOR avec le rapporteur GUS a permis de montrer que la protéine chimérique AtTOR-GUS est retrouvée essentiellement dans les parties de la plante où les divisions sont actives. Il s'agit notamment de l'embryon, de l'albumen et des méristèmes. Ainsi, on retrouve cette expression au niveau des méristèmes

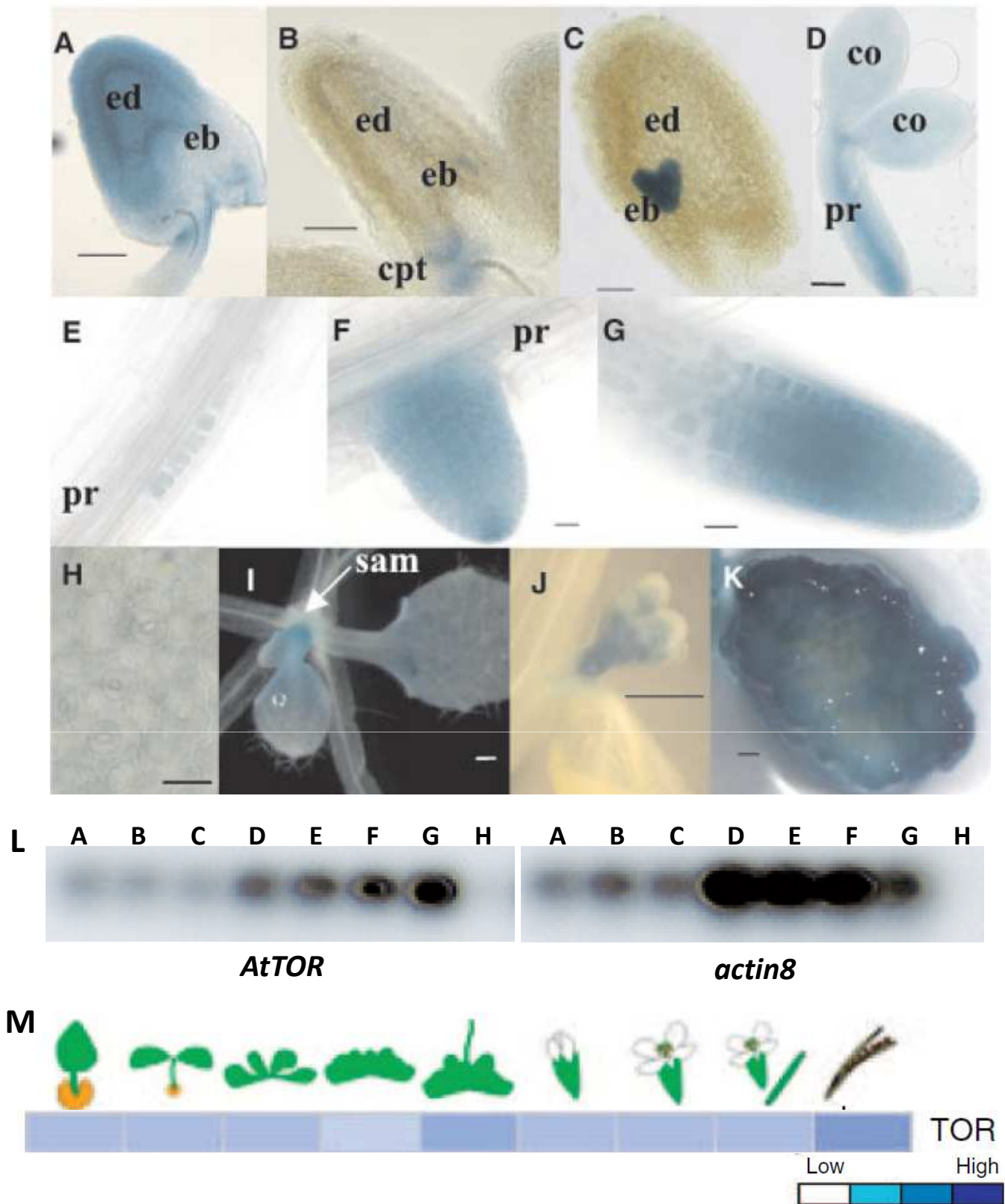


Figure 9 : Localisation de l'expression de TOR chez *Arabidopsis thaliana* : A-K : Expression de la fusion traductionnelle AtTOR-GUS sous le contrôle du promoteur TOR (Menand et al., 2002) dans les embryons à différents stades d'évolution (A-D), lors de l'émergence des racines latérales (E-G), dans les feuilles (H), les primordia foliaires (I), les boutons floraux (J) et des cals d'un mois (K) (échelle : 50µm (A-D), 20µm (E-H), 500µm (I-K), ed = albumen, eb = embryon, cpt = chalaze, pr = racine principale, sam = méristème apical caulinaire.

L : Niveau d'expression du gène *AtTOR* et du gène de contrôle *actin8* dans les pointes des feuilles (A), les graines immatures (B), les feuilles entières (C), les tiges (D), les racines (E), les fleurs (F) et les cultures cellulaires (G), (contrôle négatif H) (Robaglia et al., 2004)

M : Profil d'expression de AtTOR au cours du développement par analyses Genevestigator (Moreau et al., 2010).

apicaux caulinaires et racinaires et, également, au niveau des émergences des racines latérales, dès les premières divisions périclinales des cellules du péricycle (Menand et al., 2002). Cette protéine chimérique n'est pas retrouvée dans les tissus différenciés, ni dans les tissus conducteurs (**figure 9A-K**).

Il semble néanmoins que l'ARN messager de TOR soit exprimé dans tous les tissus à un niveau d'expression équivalent. En effet, une étude du niveau d'expression des transcrits de *AtTOR* dans les cultures cellulaires, les tiges, les racines, les feuilles (feuilles entières, ou pointe des feuilles), les fleurs ainsi que dans les graines immatures n'a pas permis de révéler de différence d'expression de ce gène (**figure 9L**) (Robaglia et al., 2004). Ces résultats sont confirmés par le profil d'expression du gène *TOR* fourni par Genevestigator qui le montre également comme présent tout au long du développement de la plante (**figure 9M**) (Moreau et al., 2010). Robaglia et al. (2004) expliquent cette différence comme pouvant être due à la présence d'un uORF (upstream Open Reading Frame) dans le 5' UTR de l'ARN messager de TOR. Cet uORF, de séquence bien conservée chez les différents écotypes d'*Arabidopsis*, pourrait jouer un rôle de régulateur post-transcriptionnel dans l'expression du gène *AtTOR*.

I.E.2.a.ii Influence du niveau d'expression de TOR

Afin de mieux comprendre le rôle de TOR chez *Arabidopsis*, des études ont été réalisées en utilisant différentes lignées totalement déficientes en protéines (lignées T-DNA) ou présentant une baisse ou une hausse de l'expression de ce gène.

(a) Inactivation complète de TOR

Les premiers travaux portant sur l'impact de l'inactivation de TOR ont utilisés des lignées d'insertion T-DNA avec un insert positionné en amont du domaine FRB et ont révélés que l'absence d'une protéine TOR fonctionnelle entraîne un arrêt du développement embryonnaire au stade globulaire (Menand et al., 2002). De manière intéressante, Robaglia et al. (2004) pointent du doigt le fait que les embryons avortés contiennent des cellules en cours de division et suggèrent que l'on doit mettre en corrélation l'arrêt du développement embryonnaire au stade globulaire avec la transition qui s'opère dans ce même stade vers des divisions qui deviennent couplées à la croissance alors qu'elles ne l'étaient pas avant.

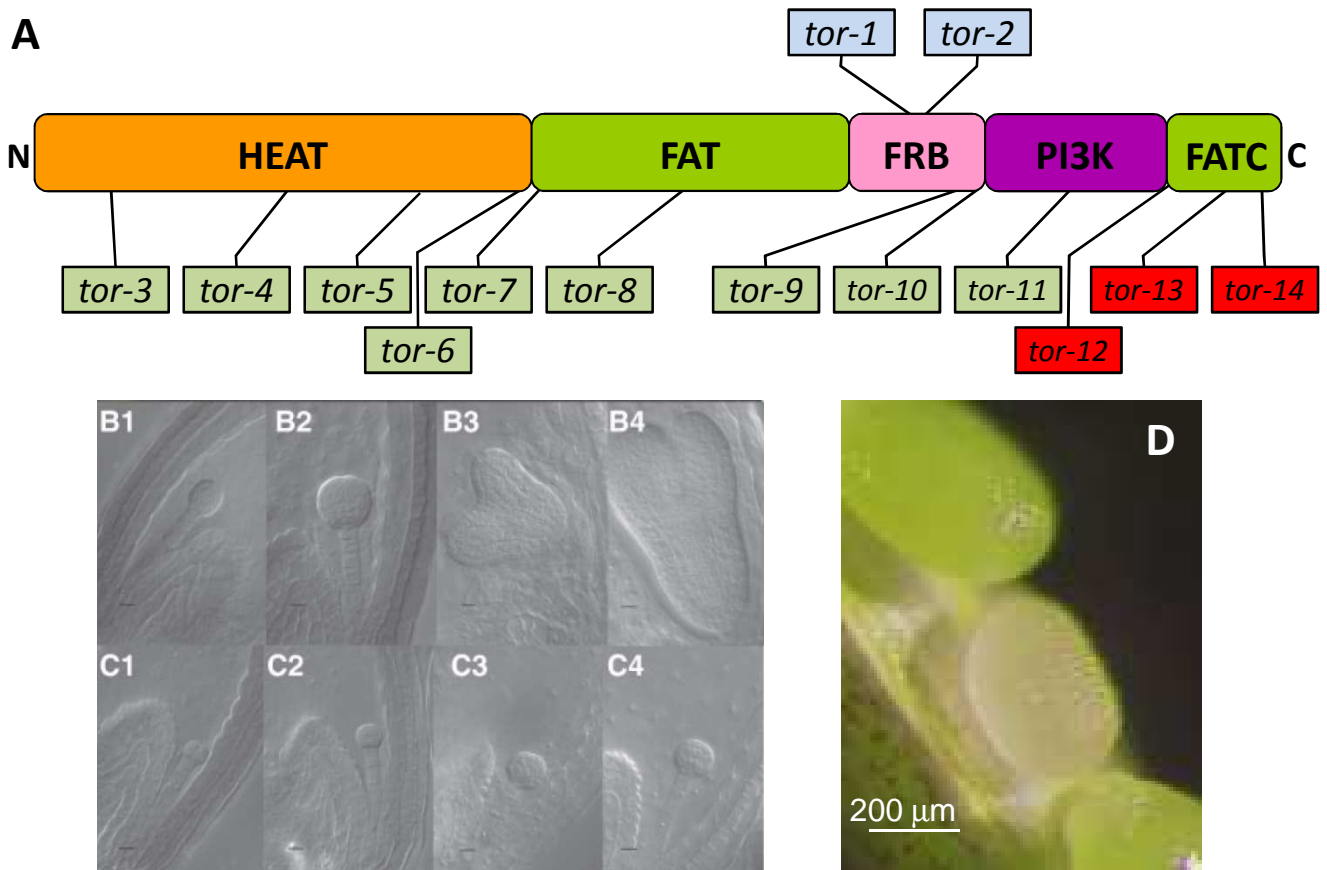


Figure 10 : Effet de l'inactivation complète de TOR chez *Arabidopsis thaliana* : A : Localisation des différentes insertions de T-DNA dans les mutants testés par Menand et al. (2002) (bleu) et Ren et al. (2011) (vert et rouge). Les mutants *tor-1* à *-12* (bleu et vert) entraînent une létalité embryonnaire à l'état homozygote tandis que les mutants *tor-13* et *tor-14* ne perturbent pas le développement des plantes.

B à D : Aspect des embryons sauvages (B) et *tor-1/tor-1* (C) à différents stades de développement. Les embryons TOR-1/TOR-1 et TOR-1/tor-1 permettent de produire d'obtenir des graines matures tandis que les embryons mutants *tor-1/tor-1* bloquent prématurément le développement de la graine (D) (Menand et al., 2002)

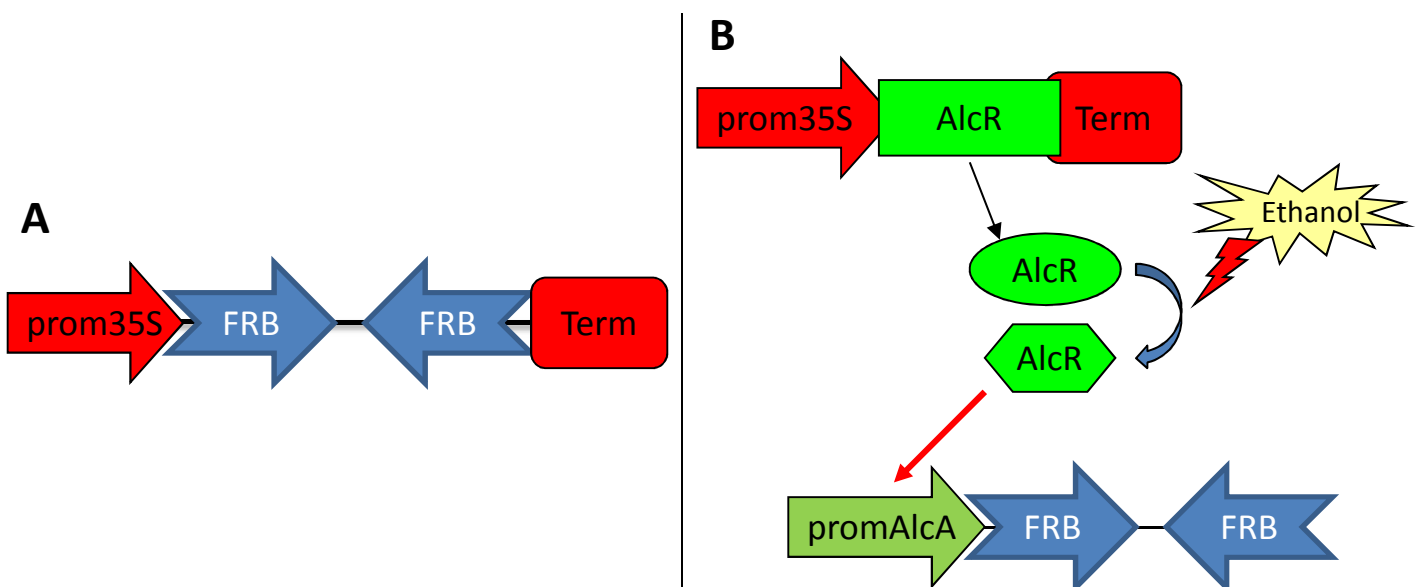


Figure 11 : Constructions permettant l'inactivation de TOR : A : Construction insérée dans les TOR RNAi constitutifs exprimant une structure tige-boucle utilisant le domaine FRB spécifique de TOR, conduits sous le contrôle du promoteur constitutifs viral p35S. B : Construction insérée dans les TOR RNAi inducibles exprimant le RNAi sous le contrôle du système inductible à l'éthanol AlcR-AlcA.

Plus récemment, une autre équipe a voulu vérifier ces résultats et a analysé 12 lignées d'insertion T-DNA dans la séquence génomique de TOR (Ren et al., 2011). Parmi ces 12 lignées, neuf confirment les résultats obtenus par Menand et al. (2002) et aboutissent à un arrêt du développement embryonnaire aux stades 16 à 32 cellules (**figure 10**). Toutefois, ils sont également parvenus à obtenir 3 lignées T-DNA dont l'insertion à l'état homozygote n'entraîne aucun défaut sur le développement embryonnaire. Ces trois lignées présentent toutes un insert au niveau de la région FATC de la protéine, suggérant que cette région pourrait ne pas être nécessaire à tout ou partie des fonctions de TOR, tout du moins chez les plantes.

(b) Impact de la sous-expression de TOR

Etant donné l'insensibilité d'*Arabidopsis* à la rapamycine et la létalité embryonnaire entraînée par l'extinction totale de TOR, une approche d'extinction partielle et/ou conditionnelle a été mise au point au laboratoire ainsi que dans celui de Christophe Robaglia (LGBP, Marseille). Elle repose sur l'utilisation d'un ARN interférant (RNAi) dirigé contre le domaine FRB de TOR et placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif viral ou d'un système inductible à l'éthanol (**figure 11**).

L'utilisation de telles lignées exprimant un ARN interférant dirigé contre TOR de manière constitutive et ectopique a permis de mettre en évidence que le niveau d'expression de TOR est bien corrélé avec la taille des plantes et la résistance au stress osmotique (Deprost et al., 2007). Ces mêmes lignées ont également permis de montrer que l'inactivation de TOR entraîne une activation du processus d'autophagie, comme cela a déjà été décrit chez d'autres eucaryotes (Liu and Bassham, 2010).

L'étude des lignées TOR RNAi inductibles a permis de mettre en évidence que l'inactivation complète de TOR conduit à un phénotype sévère d'arrêt complet de croissance (des parties aériennes comme racinaires), accompagné d'un jaunissement des feuilles dû à la dégradation des chlorophylles et à une sénescence prématurée (**figure 12**). Cet effet visuel de l'inactivation de TOR s'accompagne de nombreuses modifications métaboliques telles que l'accumulation des grandes quantités de sucres solubles, d'acides aminés et d'amidon, ainsi que l'induction des gènes impliqués dans la sénescence foliaire et la remobilisation des

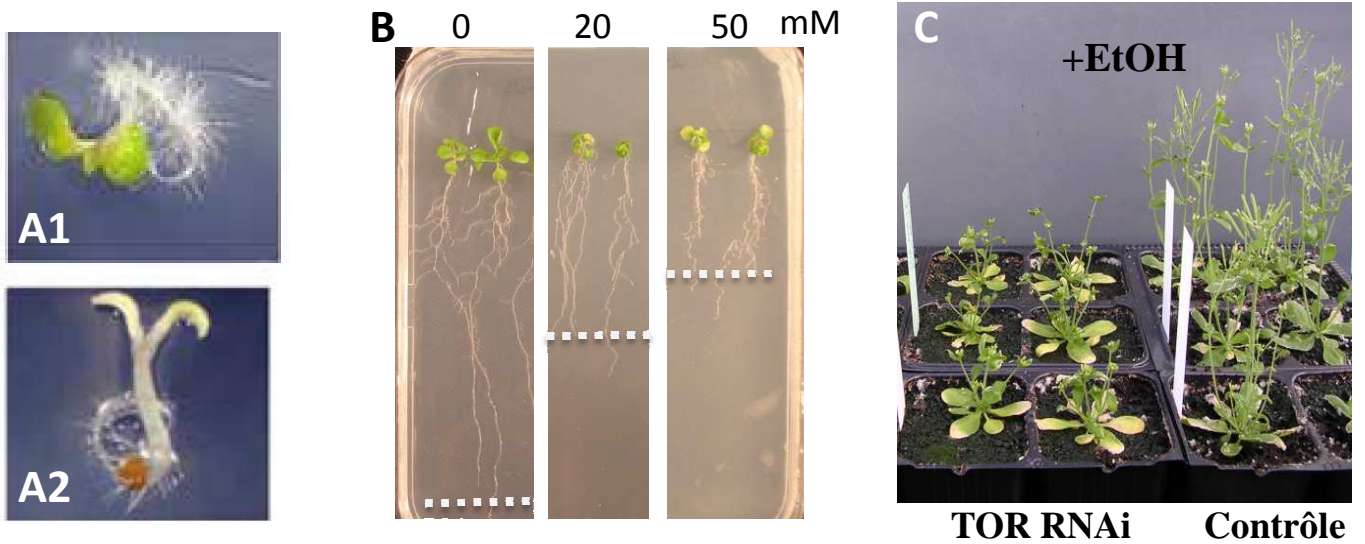


Figure 12 : Effet de l'inactivation inducible de TOR : La présence d'éthanol dans le milieu lors de la germination entraîne un arrêt du développement de la racine et des parties aériennes ainsi qu'un non verdissement des cotylédons dans les lignées TOR RNAi inductibles (A2) alors qu'elle ne provoque aucun effet sur les plantes contrôles (A1) (Deprost et al., 2007). L'ajout d'éthanol sur des plantules déjà germées entraîne un fort ralentissement du développement des racines et des parties aériennes ainsi qu'un début de sénescence de manière dose-dépendante (B et C)(Manon Moreau, Dorothée Deprost).

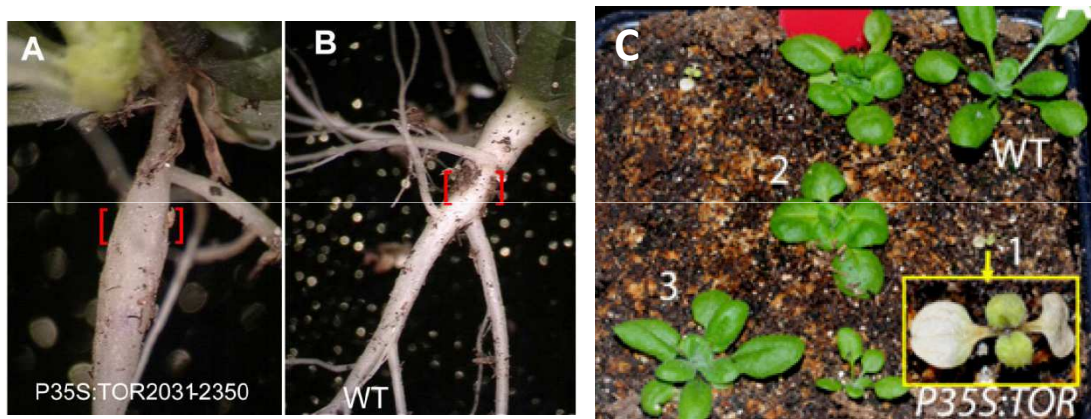


Figure 13 : Effet de la surexpression de TOR (Ren et al., 2011) : La surexpression du domaine kinase de TOR entraîne la tubérisation des racines (A) par rapport au sauvage (B) et la surexpression de la protéine entière conduit à une large gamme de phénotype proportionnel au niveau d'expression allant du développement quasi normal (C3) à l'arrêt très prématuré de développement des plantules (C1)

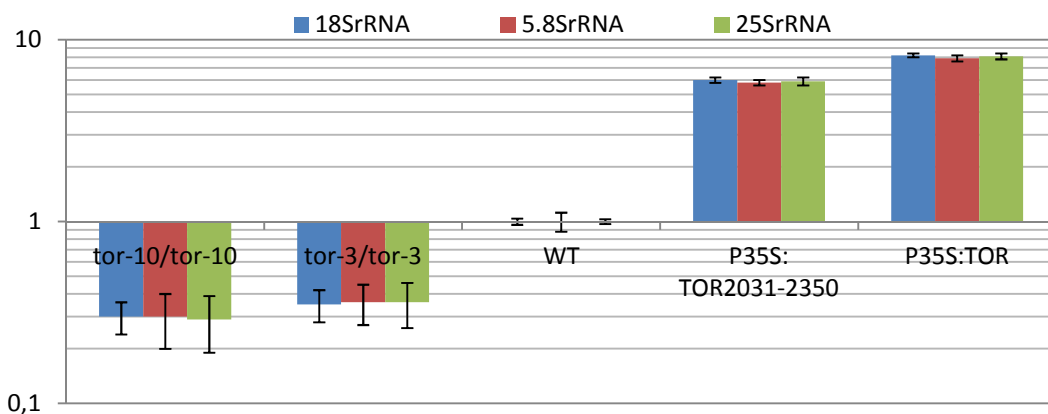


Figure 14 : Analyse du niveau d'expression des ARN ribosomiaux dans les embryons des plantes sauvages et des mutants TOR ainsi que dans les lignées transgéniques surexprimant TOR (Ren et al., 2011) : Les niveaux d'expression sont significativement réduits dans les embryons des mutants *tor-3* et *tor-10* tandis qu'ils sont significativement induits dans les plantes surexprimant le domaine kinase de TOR (P35S:TOR2031-2350) et dans les plantes surexprimants la séquence entière de TOR (P35S:TOR).

nutriments tels que la glutamine synthétase ou la glutamate déshydrogénase (Deprost et al., 2007; Moreau et al., 2010; Dobrenel et al., 2011).

(a) *Impact de la sur-expression de TOR*

Lors du crible visant à obtenir des plantes n'exprimant pas de protéine TOR fonctionnelle par la présence d'un T-DNA dans sa région codante, des lignées ont été trouvées qui surexpriment TOR, conséquence de l'insertion du T-DNA porteur d'un promoteur constitutif dans la région 5'-UTR du gène *TOR*. L'étude de ces lignées, qui présentent donc une légère surexpression de TOR, a permis de confirmer la corrélation entre le niveau d'expression de TOR et la taille de la plante entière ainsi que la résistance aux stress osmotique et salin (Deprost et al., 2007).

De nombreuses équipes ont tenté d'obtenir de « vrais » surexprimeurs de TOR mais, étant donnée la taille très importante du gène *TOR* et de sa protéine, ces recherches sont restées longtemps sans succès. Il a fallu attendre les travaux de Ren et al. (2011) pour que soient publiés les résultats obtenus avec de telles lignées. Dans cette étude, les auteurs montrent que la surexpression de TOR entraîne d'importantes perturbations physiologiques au niveau du nombre ou de la couleur des feuilles, de l'aspect du pétiole, de la structure de la racine et de des siliques (**figure 13**). Ceci s'accompagne également d'un développement accéléré des plantes avec une floraison et une sénescence précoces. Pour les plantes plus affectées, on constate également un nombre anormalement élevé de files cellulaires dans la moelle des racines, entraînant un épaissement de la racine. Dans les cas des plantes les plus affectées, la plante arrête de se développer au stade plantule.

Dans cette même étude, Ren et al. (2011) ont également montré que le niveau d'expression de TOR est corrélé au niveau d'expression des ARN ribosomiaux (**figure 14**).

I.E.2.b. RAPTOR

Contrairement au génome des autres eucaryotes (même si Deprost et al. (2005) suggèrent l'existence de deux gènes *RAPTOR* dans le génome du riz), le génome d'*Arabidopsis* contient deux gènes *RAPTOR*. L'étude détaillée de ces deux gènes a fait l'objet de deux publications (Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2005) dans lesquelles ces deux

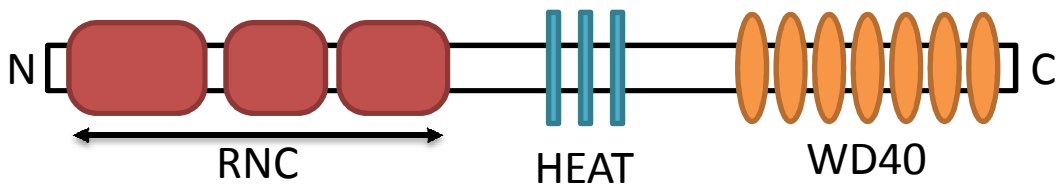


Figure 15 : Structure conservée de la protéine RAPTOR : De l'extrémité N- vers l'extrémité C-terminale, on trouve le domaine RNC/C (RAPTOR N-terminal Conserved / Caspase like), les répétitions HEAT et les motifs WD40 (Yang et Guan, 2007)

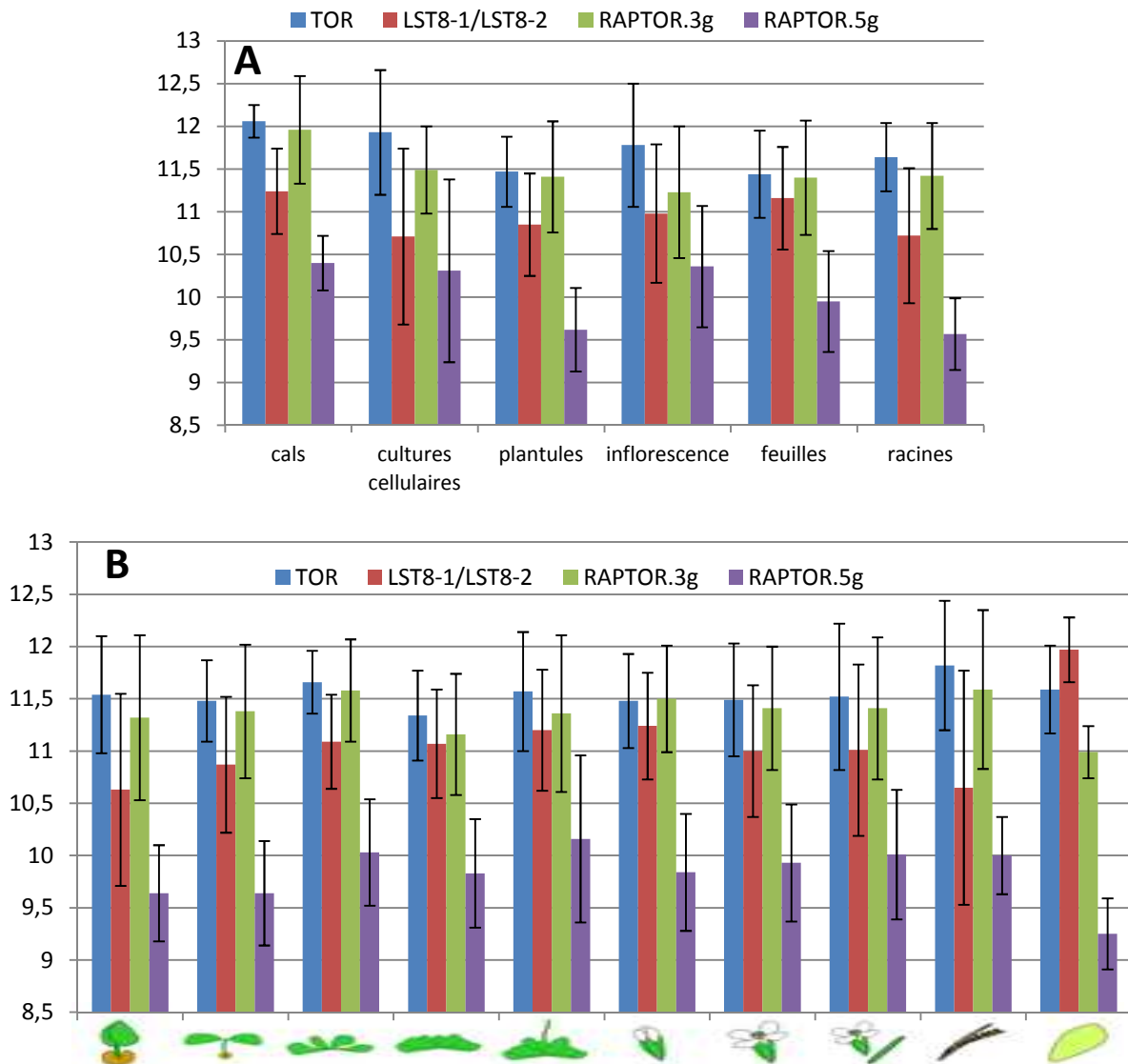


Figure 16 : Profil d'expression des gènes d'Arabidopsis impliqués dans la formation du complexe TORC1 : L'expression en fonction des organes (A) et du niveau de développement (B) est indiquée en valeurs logarithmiques et proviennent des données de puces transcriptomiques fournies par Genevestigator (<https://www.genevestigator.com>)

gènes ne sont pas appelés de la même manière et je propose la nomenclature suivante qui sera utilisée tout le long de cette partie :

AGI	Nomenclature commune	Autres noms
At3g08850	RAPTOR.3g	AtRaptor1 ⁽¹⁾ AtRaptor1B ⁽²⁾
At5g01770	RAPTOR.5g	AtRaptor2 ⁽¹⁾ AtRaptor1A ⁽²⁾
⁽¹⁾ (Deprost et al., 2005) et ⁽²⁾ (Anderson et al., 2005)		

I.E.2.b.i Structure

AtRAPTOR.3g et AtRAPTOR.5g sont très conservées et ont une séquence protéique présentant environ 76% d'identité. Dans les deux cas, la protéine codée fait environ 150 kDa et est organisée en différents domaines (la structure de ces protéines est largement identique à celle de leurs homologues chez les autres eucaryotes).

Ces deux protéines sont composées d'un domaine N-terminal conservé appelé RNC (RAPTOR N-terminal Conserved) contenant un domaine semblable à un domaine caspase, trois répétitions HEAT et sept motifs WD40 (**figure 15, d'après Yang et al. (2007)**).

Les répétitions WD40 pourraient être impliquées dans la formation de complexes protéiques réversibles, tout comme les répétitions HEAT (que l'on retrouve également chez TOR) et qui pourraient être impliquées dans l'interaction TOR-RAPTOR.

I.E.2.b.ii Profil d'expression

Des résultats d'une analyse transcriptomique ont permis de révéler que les gènes *AtRAPTOR.3g* et *AtRAPTOR.5g* sont tous deux exprimés dans tous les tissus mais à des niveaux différents (*AtRAPTOR.3g* est toujours plus exprimé que *AtRAPTOR.5g*) (**figure 16**). Il est d'ailleurs à noter que le niveau d'expression de *AtRAPTOR.3g* est assez similaire à celui de *AtTOR*, comme on pourrait s'y attendre pour des gènes codant des protéines appartenant à un même complexe (Yamada et al., 2003). Une analyse en PCR quantitative a par ailleurs permis de confirmer que l'expression de *AtRAPTOR.5g* est très faible et que celle de *AtRAPTOR.3g* est plus forte et à des valeurs similaires dans les racines, les feuilles et les inflorescences.

Deprost et al. (2005) émettent l'hypothèse que le caractère ubiquitaire de l'expression de *AtRAPTOR.3g*, comparé à l'expression plus spécifique de certains tissus de *AtRAPTOR.5g*

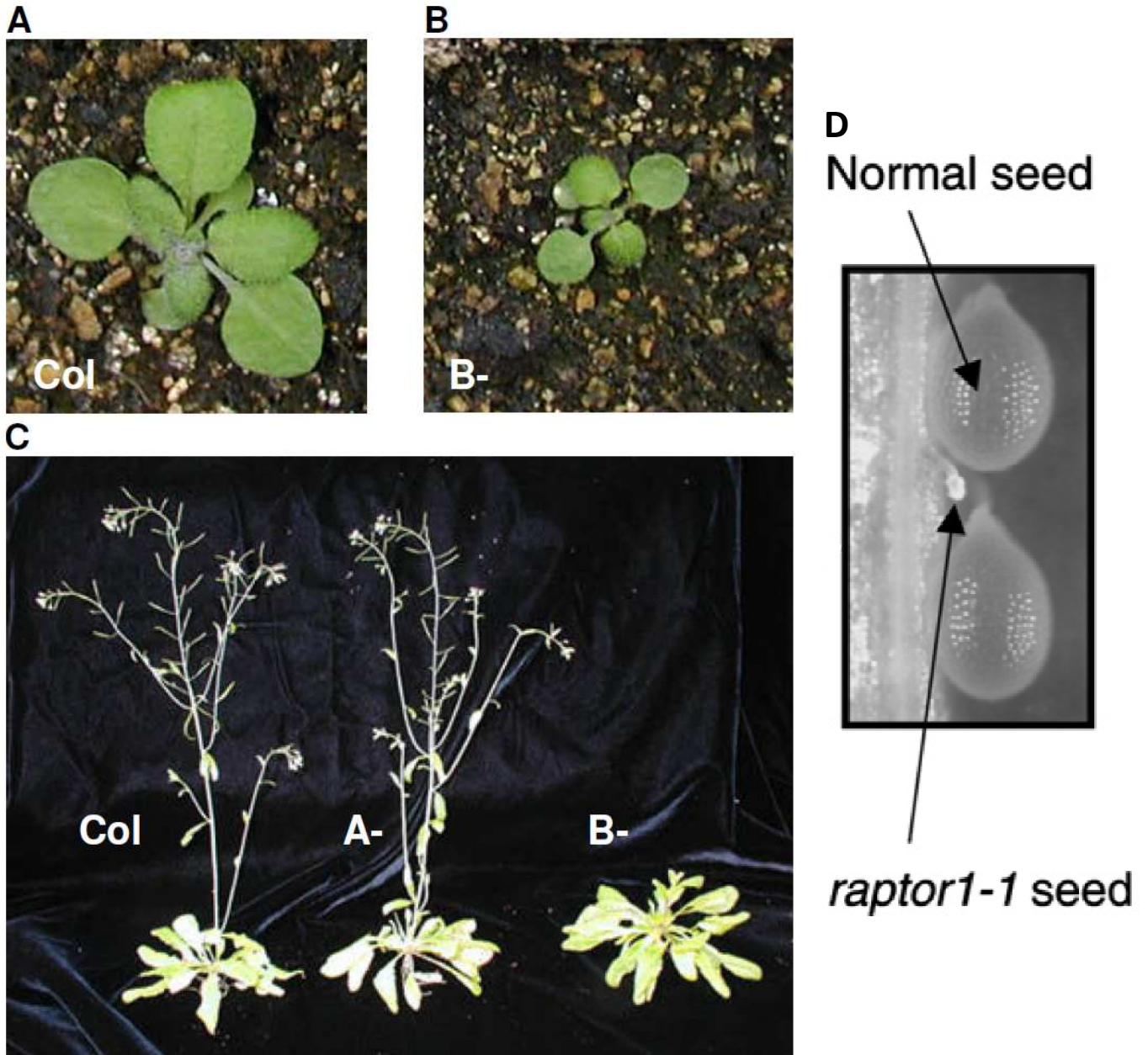


Figure 17 : Phénotype des mutants *atraptor* : Impact de la mutation *atraptor.3g* sur des plantules de 15 jours cultivées sur sol (B) comparé au sauvage (A) et après un mois de culture (Col : sauvage, A- : *atraptor.5g*, B- : *atraptor.3g*) (Anderson et al., 2005). Dans certains cas, la mutation *atraptor.3g* entraîne une létalité embryonnaire (D) (Deprost et al., 2005)

pourrait être dû à une spéciation de ces deux protéines qui pourraient, alors, jouer des rôles différents.

I.E.2.b.iii Mutants

Afin de mieux comprendre le rôle des protéines AtRAPTOR, une analyse de mutants d'insertion T-DNA a été réalisée. Cette analyse a permis de mettre en évidence que les plantules et plantes des mutants homozygotes ne présentant plus d'expression de *atraptor.5g* ne présentent aucun défaut de croissance, que ce soit en serre ou *in vitro*, à la lumière ou à l'obscurité, suggérant ainsi que la protéine AtRAPTOR.5g ne pourrait intervenir dans la cellule que dans des conditions particulières, comme en cas de stress par exemple.

En revanche, les mutants nuls *atraptor.3g* présentent un phénotype beaucoup plus fort. Les plantules des mutants *atraptor.3g*, en effet, sont plus petites que le sauvage, aussi bien au niveau de la racine que des parties aériennes, ce qui semble dû à un défaut de division cellulaire et de production de cellules depuis le méristème apical plutôt qu'à un défaut d'élongation cellulaire puisque la croissance des hypocotyles des plantules de *atraptor.3g* est affectée dans une moindre mesure. En serre, les plantes des mutants *atraptor.3g* sont également largement affectées et sont plus petites et retardée dans leur floraison. Elles ont également un phénotype buissonnant ce qui est dû à un arrêt prématuré de l'apex caulinaire primaire, entraînant un développement des bourgeons axillaires et, donc, une forte augmentation du nombre de tiges. Il semble toutefois que, dans certaines conditions, l'effet de la mutation dans le gène *AtRAPTOR.3g* provoque des effets encore plus forts puisque Deprost et al. (2005) décrivent qu'une telle mutation entraîne un arrêt du développement embryonnaire à un stade très précoce (décrit comme stade pré-globulaire) (**figure 17**).

Ainsi il semble que AtRAPTOR soit impliqué dans la croissance et la division cellulaire post-embryonnaire mais les facteurs influençant le rôle de AtRAPTOR dans les divisions au cours du développement embryonnaire restent à éclaircir.

I.E.2.c. Les protéines AtLST8 et, plus particulièrement, AtLST8-1

Cette partie s'inspire largement des travaux publiés par Moreau et al. (2012).

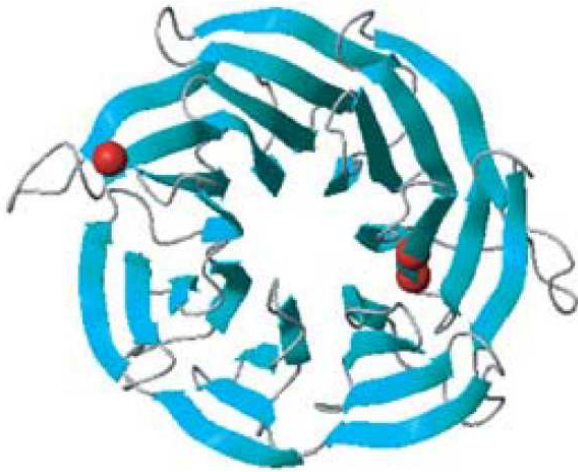
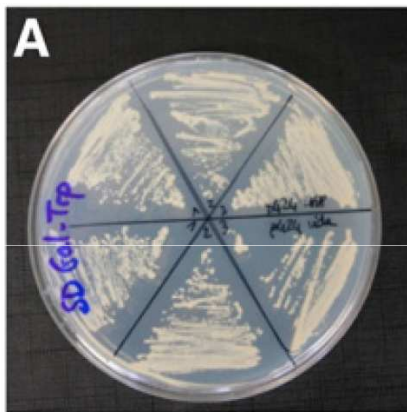
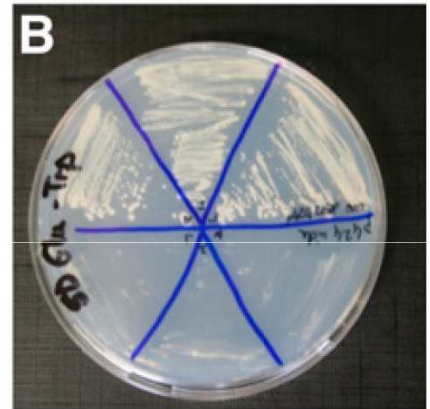
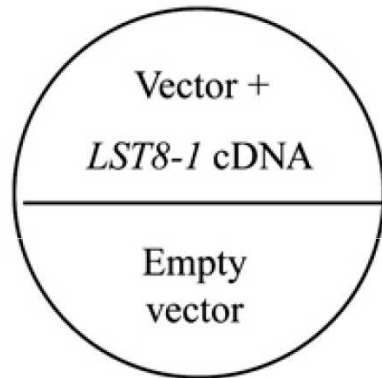


Figure 18 : Structure en plateforme des protéines LST8 : Le modèle a été créé avec le Swiss-Model et l'image a été préparée avec le logiciel MOLMOL à partir de la séquence de CrLST8 (Diaz-Troya et al., 2008)



galactose medium –Trp



glucose medium –Trp

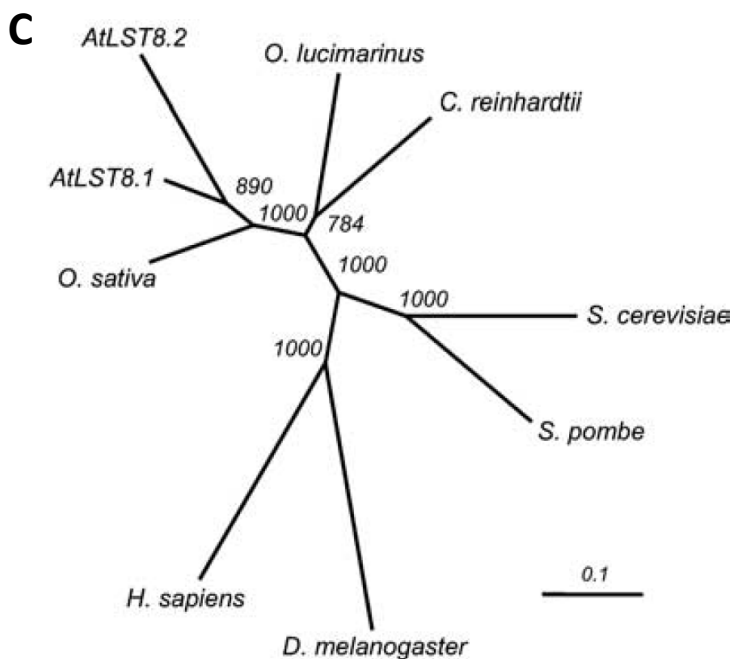


Figure 19 : Complémentation des mutants *Ist8* de levure avec l'ADN complémentaire LST8-1 d'*Arabidopsis* : La souche de levure utilisée exprime le gène LST8 endogène sous le contrôle d'un promoteur inducible au galactose et est complétement par l'expression de l'ADN complémentaire de LST8-1 d'*Arabidopsis* (A). En absence de galactose, seules les souches exprimant le gène d'*Arabidopsis* est capable de cultiver (Moreau et al., 2012). C : Arbre phylogénétique représentant la proximité entre les protéines LST8 de plantes avec les protéines LST8 des autres eucaryotes (Diaz-Troya et al., 2008).

I.E.2.c.i Structure, conservation de fonction et localisation

Comme décrit précédemment, le génome d'*Arabidopsis* contient deux gènes *LST8* dont l'un d'eux seulement semble être exprimé. En effet, seul le gène *LST8-1* (At3g18140) est transcrit tandis qu'aucun EST n'a été ou ADNc complet n'a été identifié pour le gène *LST8-2* (At2g22040). Pour cette raison, c'est principalement le gène *LST8-1* qui a été étudié.

Ce gène, composé de 10 exons, code une protéine d'environ 34 kDa. Elle est organisée en feuillets β , eux-mêmes répartis en sept répétitions WD40, capables de former une plateforme semblable à une hélice, comme chez les autres organismes (Loewith et al., 2002; Díaz-Troya et al., 2008). Cette structure en « propeller-like platform » est décrite comme permettant l'interaction avec d'autres partenaires protéiques (**figure 18**) (Smith et al., 1999) et la conservation de cette structure chez *Arabidopsis* suggère la conservation de la capacité de AtLST8-1 à interagir avec d'autres partenaires.

La protéine AtLST8-1 a une séquence légèrement plus similaire à la protéine LST8 de levure qu'à celle de souris (51% et 45% d'identité de séquence respectivement). Un test de complémentation du mutant *lst8* de levure avec la protéine AtLST8-1 a permis de mettre en évidence que cette dernière est un homologue fonctionnel de la protéine LST8 de levure (**figure 19**). Qui plus est, un test d'interaction par une approche de double-hybride et par une approche *in planta* (split-luciférase) a permis de mettre en évidence une interaction entre AtLST8-1 et le domaine FRB-K (FKBP12 Rapamycin Binding Domain + Kinase Domain) de AtTOR, comme c'est le cas chez la levure et les mammifères (pour revues Crespo and Hall, 2002; Wullschleger et al., 2006).

AtLST8-1 est exprimé tout au long du développement de la plante et dans tous les organes et à des taux plus élevés dans le micropyle et la chalaze. Il est à noter que l'expression semble légèrement plus forte dans les parties aériennes que dans les racines (analyse Genevestigator). Le promoteur de *AtLST8-1* est particulièrement actif dans la plantule (au niveau du cylindre central de la racine, de la pointe racinaire, des émergences de racines latérales et dans le système vasculaire des cotylédons) ainsi que dans les stomates, les stipules foliaires, dans les étamines (filet, anthères, grains de pollen) et dans le système vasculaire des pétales et sépales (fusion transcriptionnelle du promoteur de *AtLST8-1* avec le gène codant la glucuronidase) (**figure 20**). Enfin, dans la cellule, AtLST8-1 a été

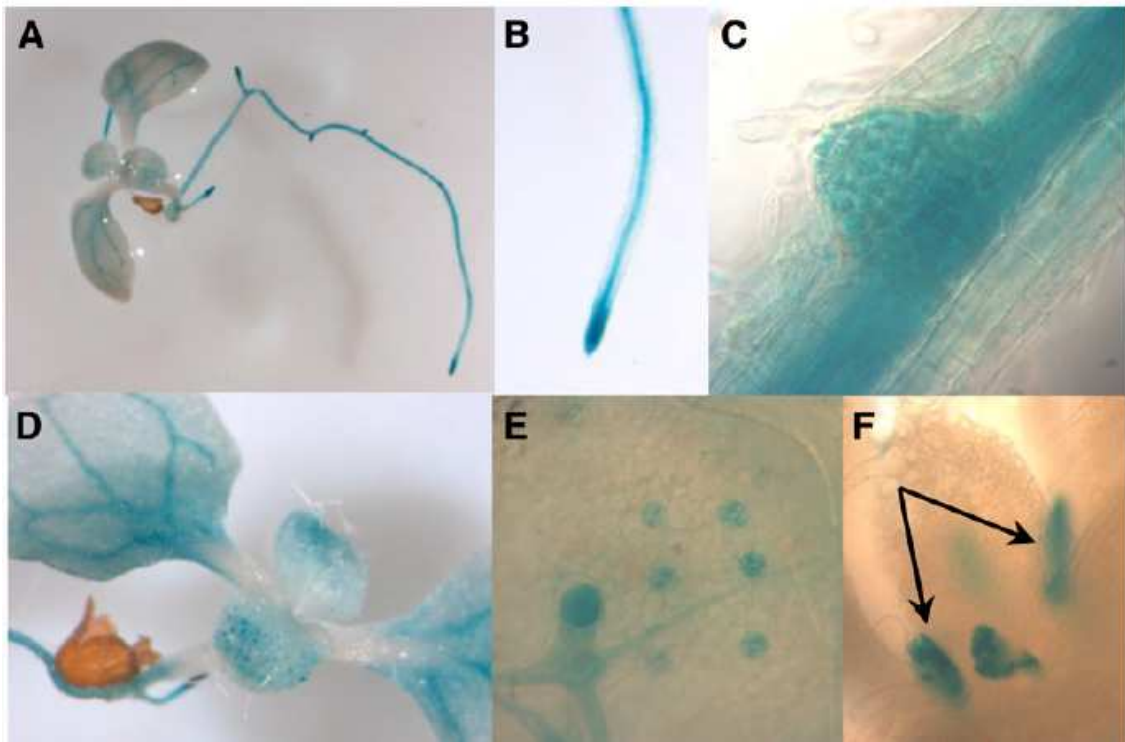


Figure 20 : Profil d'expression du gène LST8-1 : Coloration GUS sur des plantes exprimant une construction promLST8-1(1000pb):GUS. LST8-1 est principalement exprimé dans le système vasculaire (A, B et D), dans les émergences des racines latérales (C), les cellules de garde des stomates (E) et les stipules (F) (Moreau et al., 2012)

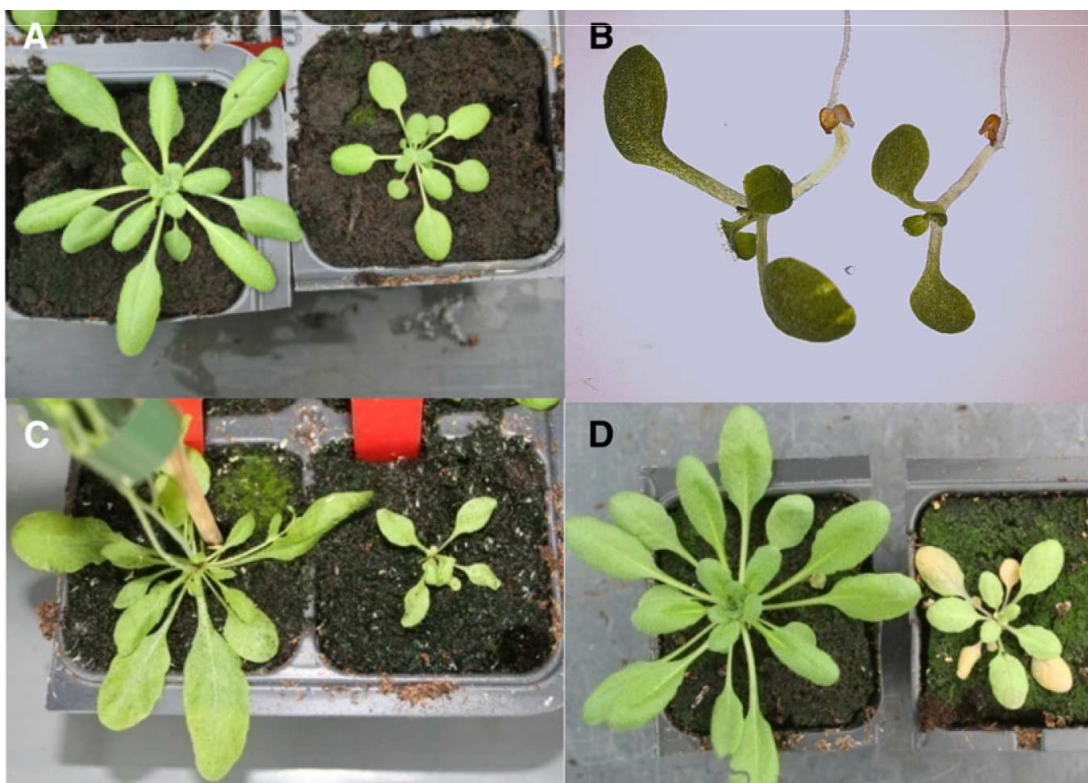


Figure 21 : Phénotype des mutants *lst8-1* : Les mutants présentent un défaut de croissance lorsqu'ils sont cultivés en chambre de culture en jours courts pendant 4 semaines (A) ou *in vitro* pendant 1 semaine (B). En revanche, lorsque les plantes sont cultivées en jours longs, les mutants *lst8-1*, les plantes sont plus sévèrement affectées (en hiver) (c) et présentent même une sénescence accélérée conduisant parfois à la mort (en été) (D) (Moreau et al., 2012)

retrouvé sous forme de points mobiles colocalisant avec RabC1, un marqueur spécifique des endosomes, ainsi que dans la membrane plasmique (expression transitoire dans les cotylédons d'une fusion traductionnelle AtLST8-1-GFP sous le contrôle du promoteur 35S).

I.E.2.c.ii Analyse des mutants

Afin d'élucider le rôle de LST8 chez *Arabidopsis*, Moreau et al. ont étudié le phénotype de deux mutants nuls *atlst8-1* possédant tous deux un ADN-T dans un intron (n'entraînant aucune surexpression de *AtLST8-2*) et fournissant des résultats similaires.

Les deux mutants présentent tous deux des défauts de croissance et de développement (**figure 21**). En effet, lorsqu'ils sont cultivés en jours courts (8h de jour), les mutants présentent une croissance réduite comparée au sauvage et ne fleurissent pas. En revanche, les défauts de croissance des plantes transférées en jours longs (16h de jour) sont beaucoup plus importants et peuvent aller jusqu'à un arrêt complet de croissance et la mort de la plante en deux semaines après le transfert dans les cas les plus sévères. En jours longs, dans les cas les moins sévères, les mutants *atlst8-1* finissent par former une rosette buissonnante et développent plusieurs méristèmes caulinaires. Certaines plantes parviennent à fleurir et produisent des tiges en nombre beaucoup plus élevé que chez le sauvage. La structure de la tige et de la fleur est également affectée par la mutation. Bien que les mutants soient généralement stériles, quelques graines peuvent parfois être obtenues et leur capacité germinative n'est pas affectée par la mutation.

Toutes ces perturbations développementales s'accompagnent de modifications métaboliques aussi bien au niveau du métabolisme azoté que du métabolisme carboné. En effet, on constate que, en jours courts, les perturbations métaboliques sont assez modérées : accumulation de nitrates (d'un facteur proche de 2), de glucose (principalement en fin de journée) ainsi que de quelques acides aminés (glycine, proline, glutamine, asparagine et alanine). En revanche, il semble que les mutants soient incapables d'ajuster convenablement leur métabolisme en réponse à une transition brutale des jours courts vers les jours longs et les perturbations métaboliques en sont d'autant plus fortes : la teneur en nitrates ne diminue pas suffisamment comparée au sauvage, tous les acides aminés s'accumulent, le glucose, le fructose et l'amidon s'accumulent tandis que la teneur en saccharose reste stable (alors qu'elle augmente chez le sauvage) (**figure 22**).

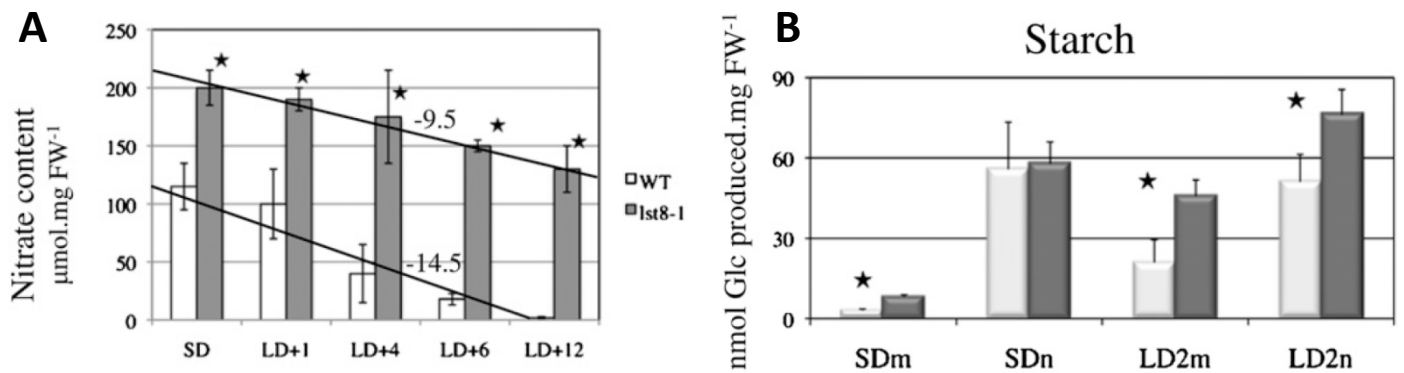


Figure 22 : Phénotype du métabolisme azoté et carboné des mutants *Ist8-1* : En jours courts, les mutants accumulent des nitrates et un peu d'amidon en début de journée mais, après la transition en jours longs, la teneur en nitrates, qui diminue dans les sauvages, semble peu affectée dans les mutants *Ist8-1* (A) et la teneur en amidon est plus élevée dans les mutants que dans le sauvage, en début et en fin de journée (B) : SD : jours courts, LD+n (nombre de jours après la transition jours courts – jours longs), SDm : début de jour court, SDn : fin de jour court, LD2m ; début du 2^{ème} jour de jour long, LD2n : fin du 2^{ème} jour de jour long.

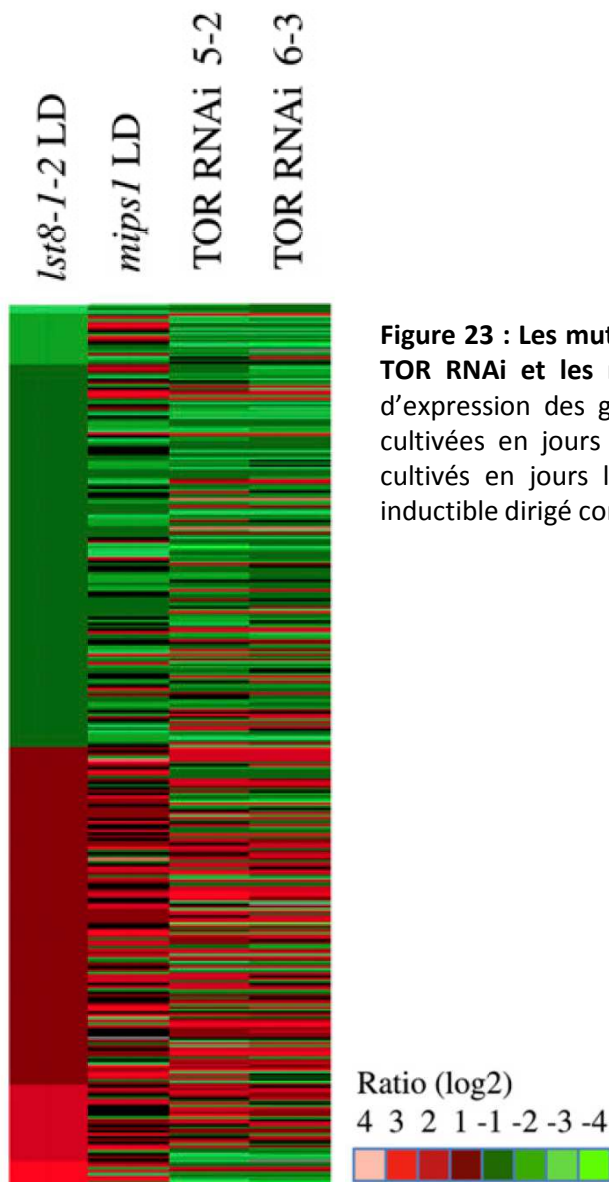


Figure 23 : Les mutants *Ist8-1* présentent les mêmes défauts que les lignées TOR RNAi et les mutants de myo-inositol 1 phosphate synthase : Profil d'expression des gènes différemment exprimés dans les plantes *Ist8-1* cultivées en jours longs (par rapport au sauvage) dans les mutants *mips1* cultivées en jours longs et dans les plantes exprimant un ARN interférant inducible dirigé contre TOR et induites pendant 24h.

Enfin, les perturbations métabolomiques observées lorsque les plantes sont en jours courts et après le transfert en jours longs, couplées aux données de transcriptome permettent de mettre en évidence que certaines réponses observées chez les mutants *atlst8-1* sont également observées chez les lignées exprimant un ARN interférant avec TOR ou encore dans les mutants *mips* affectés dans la myo-inositol 1 phosphate synthase (**figure 23**). Le lien ainsi mis en évidence avec TOR permet d'étayer l'hypothèse d'un rôle de LST8 dans la régulation de l'activité de la kinase TOR. Enfin, la corrélation avec le phénotype des mutants *mips1* suggère qu'une partie importante des conséquences de la mutation dans le gène *AtLST8-1* pourrait être due à un défaut de synthèse de myo-inositol (dont la teneur est largement plus faible dans le mutant *atlst8-1* que dans le sauvage après le transfert en jours longs).

I.E.2.d. L'existence d'un complexe TORC2 ?

A ce jour, aucune trace n'a été rapportée de l'existence d'un complexe TORC2 chez les plantes et les partenaires spécifiques de ce complexe, comme AVO1/hSIN1 ou AVO3/RICTOR semblent ne pas exister dans les génomes des organismes photosynthétiques (Dobrenel et al., 2011).

I.F. Les régulateurs en amont

I.F.1. Une voie conservée

Le génome des plantes, et d'*Arabidopsis* en particulier, contient des homologues pour de nombreuses protéines décrites comme étant des régulateurs en amont de TOR. Ainsi, le génome d'*Arabidopsis* contient une protéine TCTP (Translationally Controlled Tumour Proteins), trois protéines PTEN (AtPTEN1, AtPTEN2 AtPTEN3), une PI3K (Phosphoinositide 3 Kinase) (nommée AtVPS34 pour Vacuolar Protein Sorting 34), deux homologues de LKB1, deux homologues de PDK1 (3-Phosphoinositide Dependent protein Kinase 1). En revanche, aucun homologue n'a été trouvé dans le génome d'*Arabidopsis* pour les protéines du TSC (Tuberous Sclerosis Complex), l'Akt kinase ou encore les protéines Rheb (pour le rôle de chacun de ces facteurs dans la voie de signalisation de TOR, voir la partie I.D : Les régulateurs en amont de TOR, page 12).

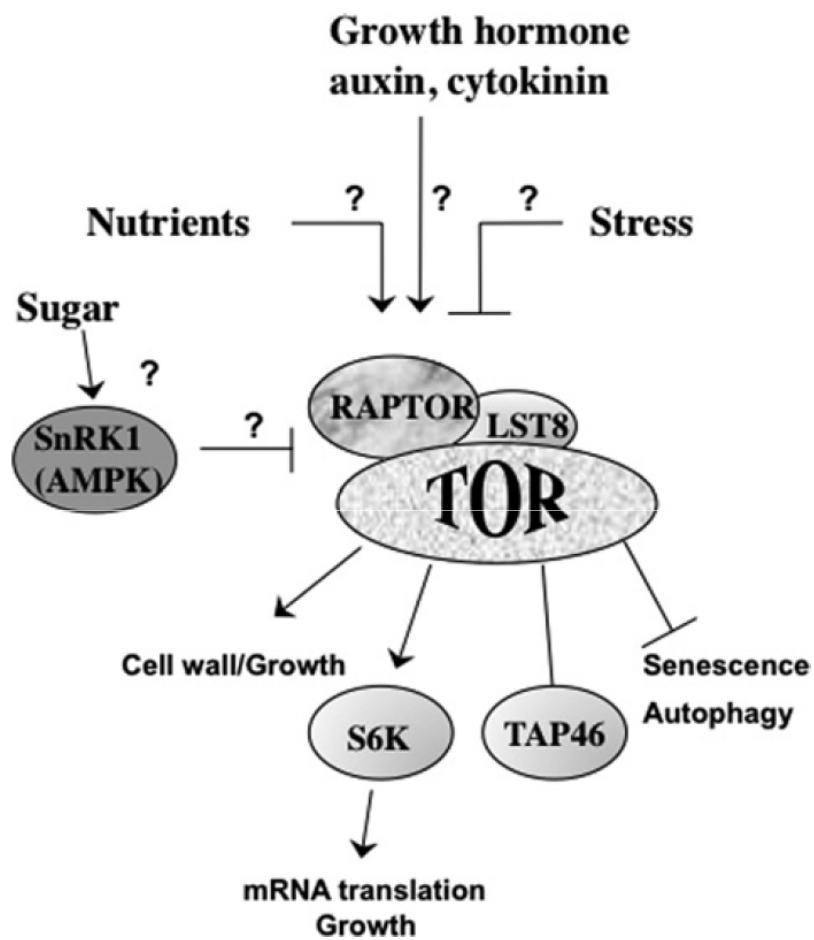


Figure 24 : La voie de signalisation de TOR chez les plantes (Dobrenel et al., 2010)

Ceci suggère qu'au moins une partie de la voie de signalisation de TOR en amont de ce complexe pourrait être conservée chez les végétaux mais l'absence de test d'activité du complexe TOR chez les végétaux a, jusqu'à présent, empêché de montrer clairement le lien entre ces protéines et l'activité kinase du complexe TOR.

I.F.2. Qui régule TOR chez les plantes ?

Etant donné l'absence de test d'activité de TOR chez les végétaux, assez peu d'éléments sont connus sur les acteurs de la voie de signalisation de TOR en amont de ce complexe kinase. Néanmoins, il a été montré que *AtRAPTOR.3g* peut interagir avec les répétitions HEAT de la protéine TOR ainsi qu'avec la protéine S6K1 dont l'activité est régulée par le stress osmotique et les phytohormones (Turck et al., 2004; Mahfouz et al., 2006).

Il a également été montré que la voie de signalisation de TOR semble être liée à la signalisation des stress et de l'état nutritionnel de la plante. En effet, les plantes exprimant un RNAi dirigé contre TOR résistent moins bien au stress salin ou osmotique que les sauvages, contrairement aux surexprimeurs qui résistent mieux (Deprost et al., 2007), les mutants *atraptor.3g* sont affectés dans leur développement par la privation de lumière (Anderson et al., 2005) et les mutants *atlst8-1* sont fortement sensibles aux jours longs et à la transition jours courts – jours longs (Moreau et al., 2012). Tous ces résultats suggèrent donc un lien entre la voie de signalisation de TOR d'une part et, d'autre part, les stress et l'état nutritionnel de la plante (**figure 24**). Ce dernier point est renforcé par le fait que les plantes TOR RNAi ainsi que les mutants *atlst8-1* présentent des modifications de teneurs en acides aminés totaux, en sucres solubles, en amidon ainsi que des modifications des activités des enzymes clés du métabolisme azoté, telles que la glutamate déshydrogénase ou la glutamine synthétase (Dobrenel et al., 2011; Moreau et al., 2012).

En outre, l'inactivation de TOR par l'utilisation des lignées RNAi inductibles entraîne une induction des gènes impliqués dans la réponse au stress. En revanche, cette même inactivation entraîne la répression des gènes impliqués dans la voie de signalisation des phytohormones, comme les auxines ou les gibbérellines (résultats non publiés). Ceci, couplé au fait que l'apport exogène d'auxine entraîne une extension de la zone de présence de la protéine chimérique TOR-GUS (Robaglia et al., 2004) permet de mettre en avant une régulation probable de la voie de signalisation de TOR par les phytohormones.

I.F.3. La voie SnRK1

SnRK1 est l'homologue, chez *Arabidopsis* des complexes protéiques SNF1 (de levure) et AMPK (de mammifères). Comme ses homologues chez les autres eucaryotes, il s'agit d'une sérine/thréonine kinase de structure hétérotrimérique composée d'une unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ , chacune codées par différents gènes.

SnRK1 α est impliqué dans la modulation de l'expression de milliers de gènes, notamment par la phosphorylation de divers facteurs de transcription, et ce, en réponse à l'état de stress et à l'état énergétique de la cellule. SnRK1 α est donc un intégrateur central de la réponse aux stress et à l'état nutritionnel (Baena-Gonzalez et al., 2007).

Contrairement au complexe TOR qui est activé lorsque la cellule perçoit un niveau suffisant de nutriment et n'est pas soumise à un stress, la kinase SnRK1 est induite lorsqu'un stress frappe la cellule, via l'intervention de deux kinases activatrices de SnRK1, les kinases AtSnAK (SNF1-Activating Kinases). Cet antagonisme couplé au fait que, chez les mammifères, l'AMPK est capable de phosphoryler une sérine conservée de la protéine RAPTOR (permettant ainsi un potentiel contrôle direct de l'AMPK sur l'activité du complexe TORC1) (Gwinn et al., 2008) suggère fortement une interaction de ces deux voies de signalisation chez les plantes (Smeekens et al., 2010; Robaglia et al., 2012). Toutefois, l'interaction et la régulation physiques de ces deux voies l'une sur l'autre restent à être montrées et décrites.

II. LES VOIES REGULEES PAR TOR

II.A. Les grandes voies régulées par TOR

Lorsque les conditions environnementales sont favorables, la kinase TOR active les voies métaboliques nécessaires à la croissance et à l'expansion cellulaire et, *a contrario*, réprime les voies impliquées dans le recyclage nutritionnel. Ainsi, il a été montré que TOR régule positivement la traduction des ARN messagers (pour plus de détails, voir la partie II.B.3 : Régulation de la traduction par TOR, page 39) et la progression du cycle cellulaire mais réprime l'autophagie (pour revue, Loewith and Hall, 2011).

II.A.1. Contrôle du cycle cellulaire

Le rôle de TOR dans le contrôle du cycle cellulaire est la première fonction à avoir été découverte puisque les gènes *TOR* ont été identifiés lors d'un crible de levures résistant aux propriétés cytostatiques de la rapamycine.

Il semble que la protéine TOR contrôle chaque étape du cycle cellulaire, notamment par une régulation de l'activité de plusieurs cyclines, CDK et des inhibiteurs de CDK (comme p27^{KIP1} et p21). Le lien moléculaire entre la voie de signalisation de TOR et le contrôle du cycle cellulaire reste mal décrit mais il semble néanmoins que l'effet de la rapamycine sur l'arrêt du cycle cellulaire serait plutôt indirect et pourrait être dû à l'arrêt de la traduction de certains ARN messagers ou à une désorganisation du ribosome décrit comme « stress ribosomale » (pour revue, voir Proud, 2010).

II.A.2. Contrôle de l'activité des protéines phosphatases

La phosphorylation réversible des protéines est un mécanisme essentiel de régulation d'un grand nombre de voies métaboliques. L'activité de déphosphorylation est largement due aux Ser/Thr phosphatases, parmi lesquelles les PP2A (Protein Phosphatase 2A) jouent un rôle essentiel (pour revue, Janssens and Goris, 2001). Chez la levure, la sous-unité catalytique des complexes PP2A est codée par *PPH21* et *PPH22* mais on trouve également d'autres protéines semblables à la phosphatase PP2A. Parmi ces PP2A-like phosphatases, on trouve PPH23, PPG1 et SIT4 (protéine essentielle pour la transition G1/S) (Sutton et al., 1991; Van Hoof et al., 2005). La sous-unité catalytique des PP2A, tout comme SIT4, est capable de se lier à TAP42, connue par ailleurs pour être un substrat de TOR (Di Como and Arndt, 1996). L'étude plus approfondie de cette interaction entre TAP42 et SIT4 a révélé que la fixation de TAP42 (réversible par l'ajout de rapamycine) entraîne une diminution de l'activité phosphatase (en empêchant la fixation des sous-unités régulatrices) et est régulée par TIP41 (TAP42 Interacting Protein) (Jacinto et al., 2001). Des études récentes suggèrent que les protéines TAP42 et Sch9 (homologue des S6 kinases) sont les substrats principaux de TOR chez la levure (Rohde et al., 2008).

II.A.3. Régulation du métabolisme

Lorsque TOR est actif, il contribue à la séquestration des facteurs de transcription GLN3 et GAT1 dans le cytoplasme, inhibant ainsi l'expression des gènes codant les enzymes du métabolisme azoté. En revanche, lors d'une carence ou en présence d'une source d'azote difficilement métabolisable, TOR est inactivé et GLN3 est transporté rapidement dans le noyau, par une voie faisant intervenir TAP42. De plus, TOR agit également sur l'activité des perméases en influençant l'entrée dans la cellule de certains nutriments, préférentiellement à d'autres lorsque la cellule se trouve en présence d'une grande variété de nutriments. A l'inverse, lorsque la cellule est dans un milieu pauvre en nutriment, elle utilise des perméases peu spécifiques et à faible affinité. Cette modification dans son profil de perméases s'opère par des ubiquitinations et des dégradations qui sont réalisées dans une voie faisant intervenir TOR, TAP42 et sa cible, NPR1 (pour revue, Duvel and Broach, 2004; Rohde and Cardenas, 2004; Loewith, 2010).

II.A.4. Contrôle de l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme conservé permettant de recycler les composants cellulaires, que ce soit pour limiter une perte d'énergie ou pour éviter l'accumulation de composés toxiques. L'autophagie passe par l'invagination non sélective de portions de cytoplasme dans une vésicule à double membrane, l'autophagosome. Le contenu de l'autophagosome est ensuite libéré dans la vacuole ou les lysosomes où il est dégradé.

Lorsque TOR est actif, il augmente la phosphorylation de la protéine ATG13, empêchant ainsi son association avec la kinase ATG1. L'interaction entre ATG13 et ATG1 est essentielle à la formation de la vésicule d'autophagie (Kamada et al., 2000; Cebollero and Reggiori, 2009). Il a également été montré par des expériences de transcriptomes chez la levure que TOR régulerait transcriptionnellement l'expression des gènes d'autophagie (Cardenas et al., 1999).

II.A.5. Les cibles de TOR chez les plantes

Plusieurs homologues des cibles de TOR chez d'autres eucaryotes existent aussi chez les plantes, suggérant une conservation de la partie aval de cette voie de signalisation. On peut ainsi citer l'existence de deux protéines S6 Kinases (et de deux protéines ribosomales

S6 ou RPS6), d'une protéine TAP46 (homologue de TAP42 chez la levure) et des protéines impliquées dans l'autophagie. Néanmoins, la protéine 4E-BP semble ne pas exister chez les plantes.

Chez les mammifères, la S6 kinase est activée par phosphorylation par la kinase TOR. Chez les plantes, il a été montré que la protéine AtS6K2 exprimée dans les cellules humaines phosphoryle les protéines RPS6 de mammifères et de plantes et un traitement des cellules à la phosphatase réduit l'activité de cette protéine AtS6K2 immunoprécipitée, suggérant ainsi que son activité nécessite sa phosphorylation (Turck et al., 1998). De plus, un traitement de cellules d'*Arabidopsis* à la wortmanine ou au LY-294002, deux inhibiteurs de PI3 kinases qui répriment également l'activité de TOR, entraîne une diminution de l'activité des S6 kinases. En revanche, un traitement des mêmes cellules en phase stationnaire avec des hormones (auxines et cytokinines) ou du milieu de culture frais augmente l'activité des protéines S6 kinases et l'état de phosphorylation des protéines RPS6 (Turck et al., 2004). Mahfouz et al. (2006) ont montré que l'activité de la S6 kinase diminue en présence de stress osmotique (ajout de mannitol) et que la kinase PDK1 (pleckstrin-dependent kinase 1) phosphoryle la S6K1 *in vitro*. Cette phosphorylation n'est pas régulée par le mannitol, le sel ou la rapamycine. Ils ont également montré que RAPTOR régule la sensibilité de la S6K1 au stress osmotique. Enfin, il a été montré que, chez *Arabidopsis*, TOR active les S6 kinases par phosphorylation sur la même thréonine que chez les animaux (T⁴⁴⁹) (Mahfouz et al., 2006; Schepetilnikov et al., 2011; Xiong and Sheen, 2012). L'expression ectopique, chez *Arabidopsis*, du gène codant la S6 kinase de lys entraîne une stérilité male qui pourrait être due à la traduction accrue de certains gènes régulateurs (Tzeng et al., 2009).

Il a également montré que la répression de l'autophagie par la voie de signalisation de TOR est conservée (Liu and Bassham, 2010).

Enfin, Ahn et al. (2011) ont montré que la protéine TAP46 d'*Arabidopsis* peut être phosphorylée directement par TOR *in vitro* et que TAP régule la mort cellulaire induite par la réaction hypersensible ou les pathogènes ainsi que la croissance et l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme azoté.

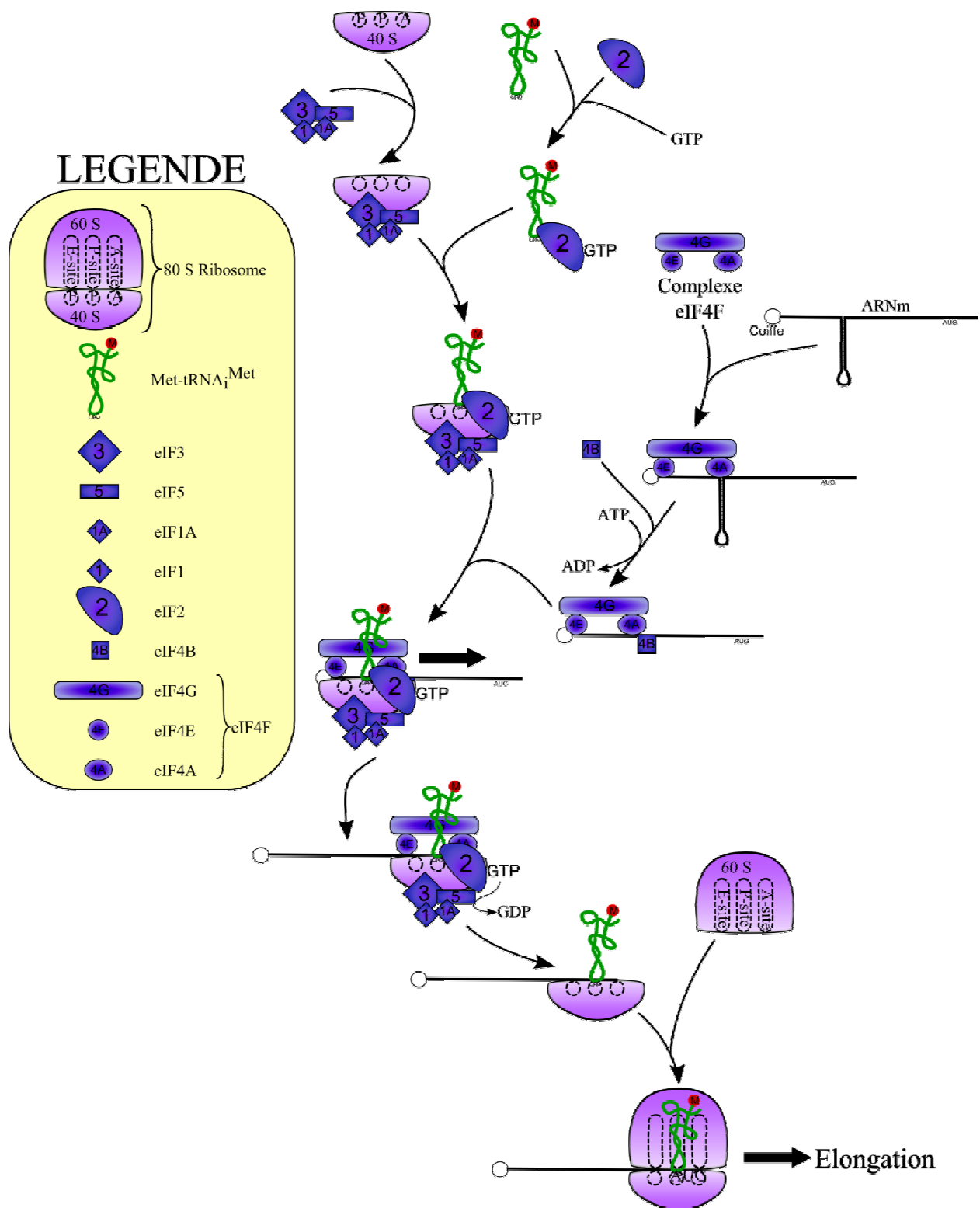


Figure 25 : Mécanismes moléculaires contrôlant l'initiation de la traduction

II.B. La traduction protéique

II.B.1. Mécanisme général de la traduction eucaryote

La traduction protéique est le mécanisme qui permet la synthèse de protéines à partir des ARN messagers. A ce titre, réguler la traduction est essentiel afin de contrôler la croissance et la prolifération cellulaire. Qui plus est, cette régulation permet de s'adapter rapidement à un nouveau stimulus car, contrairement à la transcription, elle ne nécessite pas de synthèse d'ARN messagers ni de transport. Néanmoins, ce mécanisme fait intervenir un très grand nombre de protéines et de complexes macromoléculaires et, donc, consomme beaucoup d'énergie. Une régulation étroite de la traduction peut donc s'opérer afin de « économiser de l'énergie ». En effet, comme nous le verrons plus en détail plus loin, la traduction fait intervenir les trois ARN polymérases : l'ARN polymérase I pour la synthèse des ARN ribosomaux et l'ARN polymérase II pour la synthèse des protéines ribosomales ; l'ARN polymérase II pour la synthèse des protéines impliquées dans la biogenèse du ribosome (ou Rib); l'ARN polymérase III pour la synthèse des ARN de transfert nécessaires pour l'élongation de la chaîne polypeptidique.

II.B.1.a. Initiation de la traduction eucaryote

L'initiation de la traduction est un mécanisme complexe faisant intervenir de nombreuses protéines (eIF pour eukaryotic translation Initiation Factor). L'initiation à proprement parler commence par l'association de la petite sous-unité ribosomale 40S sur un complexe de facteurs d'initiation de la traduction (composé de eIF1, eIF1a, eIF3 et eIF5), formant un complexe d'initiation 40S actif. Dans le même temps, le facteur eIF2 forme un complexe ternaire et stable avec l'ARN de transfert porteur de l'anticodon complémentaire du codon d'initiation de la traduction (généralement AUG) et d'une méthionine (noté Met-tRNA_i^{Met}) ainsi qu'avec un GTP, permettant la fixation de ce Met-tRNA_i^{Met} sur le site P (voir partie II.B.1.c) du ribosome (**figure 25**) (Gingras et al., 2004; pour revue, Jackson et al., 2010).

Vient ensuite l'étape de fixation du ribosome sur l'ARN messager. Cette étape nécessite que l'ARNm soit porteur d'une coiffe au niveau de son extrémité 5'. La coiffe peut alors être reconnue par le facteur eIF4E, membre d'un complexe trimérique eIF4F avec les autres facteurs eIF4A (une hélicase qui facilite la fixation et le passage du ribosome sur le brin d'ARNm) et eIF4G. Le complexe eIF4F, en association avec eIF4B, modifie la structure

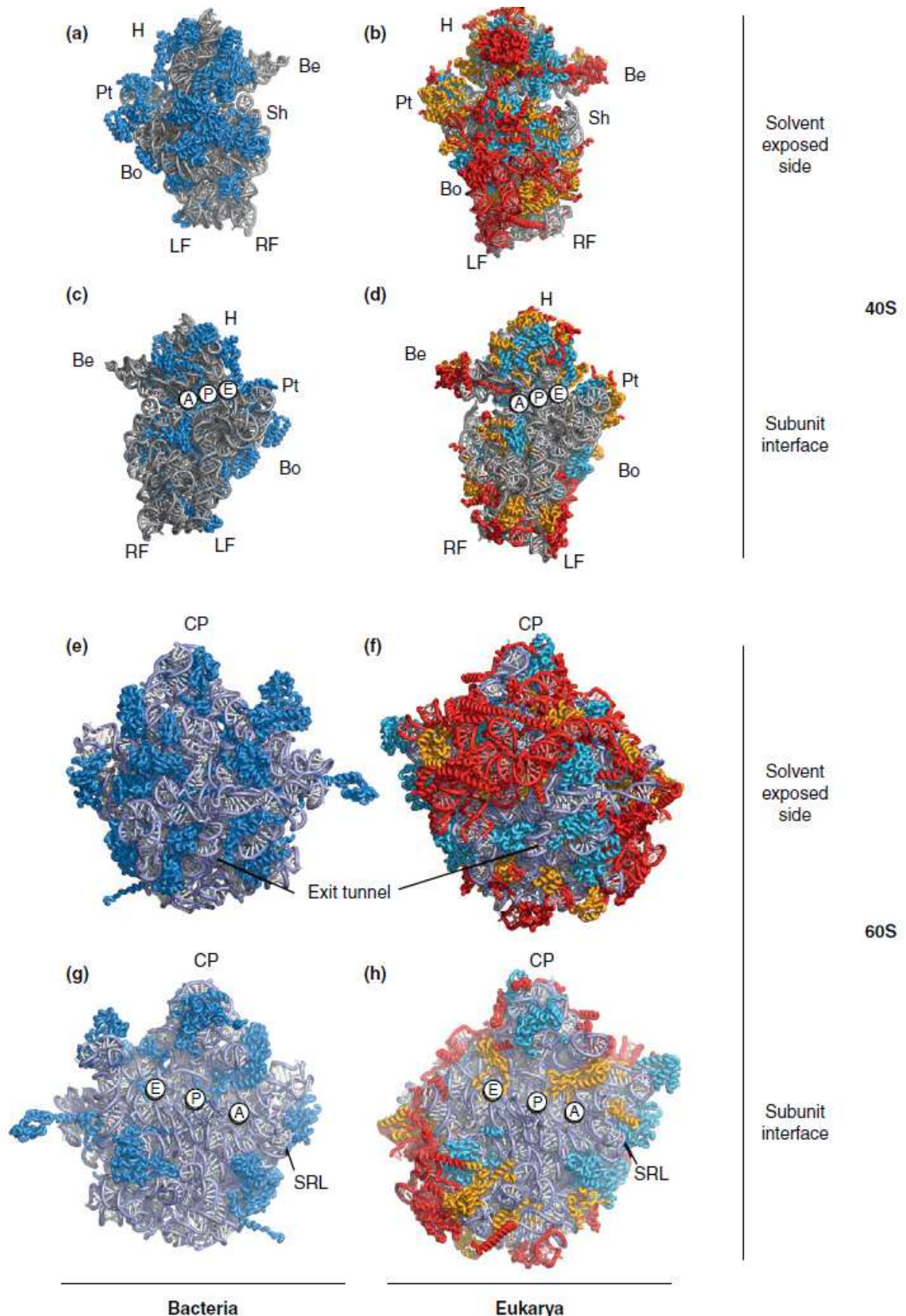


Figure 26 : Aspect des ribosomes procaryote et eucaryote : Les sous-unités du ribosome bactérien sont présentés en bleu et gris pâles. Les protéines universellement conservées sont en bleu, les protéines communes aux archées et aux eucaryotes sont en orange et les protéines et ARN exclusivement présents chez les eucaryotes sont en rouge. Les sous-unités ribosomales procaryotes 30S et 50S proviennent de *Thermus thermophilus* et les sous-unités eucaryotes 40S et 60S proviennent de *Tetrahymena thermophila*. Les motifs caractéristiques de la petite sous-unité sont la tête (H), le bec (Be), la plateforme (Pt), l'épaule (Sh), le corps (Bo), le pied gauche (LF) et le pied droit (RF). Les motifs caractéristiques de la grande sous-unité sont la protubérance centrale (CP) et la boucle sarcine-ricine (SRL). Le tunnel de sortie de la chaîne polypeptidique (Exit tunnel) ainsi que les sites A, P et E sont également indiquées (Klinge et al., 2012)

secondaire de l'extrémité 5' UTR (Untranslated Region) de l'ARNm. Le facteur eIF4G peut alors fixer le facteur eIF3 et, ainsi, recruter la petite sous-unité ribosomale. La petite sous-unité, ainsi que tous les facteurs qui l'accompagnent, scanne ensuite l'ARN messager du 5' vers le 3' jusqu'à arriver au site d'initiation de la traduction qui est reconnu par la présence du Met-tRNA_i^{Met}. A cette étape, eIF5 catalyse la déphosphorylation du GTP en GDP, entraînant la libération de la plupart des facteurs d'initiation de la sous-unité 40S. La grosse sous-unité ribosomale 60S peut alors se fixer sur la sous-unité 40S associée à l'ARN messager, formant le ribosome fonctionnel 80S. L'élongation peptidique peut alors commencer.

Il existe également des mécanismes d'initiation de la traduction faisant intervenir des ARN messagers non coiffés mais ce point ne sera pas développé ici.

II.B.1.b. Elongation et terminaison de la traduction

La vitesse de l'élongation est régulée par un ensemble de facteurs d'élongations eEF (pour eukaryotic translation Elongation Factor). Cette étape est régulée par un apport régulier d'énergie sous forme de GTP.

L'élongation s'arrête lorsqu'un codon STOP se trouve au niveau du site A du ribosome. Des facteurs de libération de la chaîne polypeptidique (eRF pour eukaryotic Release Factors) sont alors recrutés sur le ribosome pour catalyser la libération de la chaîne polypeptidique mature. Les sous-unités ribosomales sont, à leur tour, libérées et recyclées pour une autre initiation.

II.B.1.c. Le ribosome eucaryote

II.B.1.c.i Présentation du ribosome

Dans tous les règnes du vivant, la traduction protéique fait intervenir un organelle essentiel, le ribosome. Il s'agit d'une particule d'une taille estimée à 3,3 MDa chez la levure, de nature ribonucléoprotéique (constitué d'ARN dits ribosomiques ainsi que de protéines) et divisée en deux sous-unités ayant chacune ses fonctions propres. Les informations contenues par le brin d'ARN messager sont décodées par la petite sous-unité 40S tandis que la formation des liaisons peptidiques est catalysée par la grande sous-unité 60S. Chaque ribosome fonctionnel 80S (formé des deux sous-unités 40S et 60S) contient trois sites de fixation des ARN de transfert, notés E, P et A (**figure 26, d'après Klinge et al. (2012)**). Chaque

ARN de transfert entre dans le ribosome en A par complémentarité de l'anticodon qu'il contient avec le codon en position A de la petite sous-unité. L'ARN de transfert se déplace ensuite d'un codon au niveau du site P puis, à nouveau d'un codon, du site P au site E (Klinge et al., 2012).

La petite sous-unité 40S est constituée d'un ARNr 18S et de 33 protéines ribosomales tandis que la grande sous-unité 60S est constituée de trois ARNr, 5S, 28S et 5.8S, et de 49 protéines ribosomales. Chacune des deux sous-unités partage des motifs structuraux communs avec son pendant procaryote. Ainsi, la petite sous-unité 40S se compose, comme la petite sous-unité 30S, d'une tête, d'un bec, d'une plateforme, d'un corps, d'une épaule, d'un pied gauche et d'un pied droit. La grande sous-unité 60S, comme la grande sous-unité procaryotique 50S, se compose quant à elle d'une protubérance centrale, de deux crochets et d'une sarcin-ricin loop (SRL).

La structure du ribosome est relativement bien conservée entre le ribosome eucaryote et le ribosome procaryote. On retrouve néanmoins un certain nombre de motifs et d'extensions spécifiques des eucaryotes qui se trouvent pour la plupart au niveau de la surface accessible aux solvants (par opposition à la surface d'interface entre les deux sous-unités) (Klinge et al., 2011; Rabl et al., 2011). De manière intéressante, Klinge et al. (2012) notent que la protéine RPS6 qui joue un rôle important dans la signalisation se trouve au niveau du pied droit de la sous-unité 40S avec son extrémité C-terminale (qui portent les phosphorylations) au niveau d'une extension spécifique des eucaryotes. En effet, cette protéine RPS6 est d'autant plus intéressante qu'elle est phosphorylée par la S6 kinase qui est elle-même activée par phosphorylation par la kinase TOR.

II.B.1.c.ii Biogenèse du ribosome

La biogenèse du ribosome est un processus nécessitant une grande quantité d'énergie et doit, de ce fait, être coordonnée à l'état nutritionnel de l'individu ou de la cellule ainsi qu'avec les différents stress qui peuvent survenir. Qui plus est, le ribosome est composé de plusieurs ARN ribosomaux codés sous forme de plusieurs précurseurs ainsi que d'un grand nombre de protéines et il est important que la cellule trouve l'ensemble des constituants dans les proportions nécessaires à la synthèse d'un ribosome fonctionnel. Tous ces facteurs imposent donc à la cellule de disposer de voies de régulation afin de coordonner l'ensemble

du processus. Ces facteurs protéiques non ribosomaux impliqués dans la biogenèse du ribosome sont appelés RiBi et on estime leur nombre à plus de 200 chez la levure. Ces RiBi appartiennent à différentes familles d'enzymes nécessitant une grande quantité d'énergie pour fonctionner, parmi lesquelles on trouve des ARN hélicases, des ATPases, des GTPases, des kinases, ... (pour revue, voir Kressler et al., 2010).

Une approche de purification par affinité en tandem (TAP) a permis de purifier un certain nombre de particules pré-ribosomales et de décrire leur composition, révélant ainsi une biogenèse très dynamique au cours de laquelle les ARN ribosomaux sont clivés et épissés et les protéines ribosomales viennent se fixer progressivement sur la particule pré-ribosomale, conduite par une ou plusieurs RiBi. Qui plus est, au fur et à mesure des étapes de la biogenèse, les particules pré-ribosomales changent de compartiment puisque la synthèse commence dans le nucléole, lieu de synthèse des ARNr, se poursuit dans le nucléoplasme et s'achève dans le cytoplasme (pour revue, voir Kressler et al., 2010). Ainsi la biogenèse du ribosome nécessite, non seulement, la présence des éléments constitutifs du ribosome mature dans les proportions stœchiométriques mais elle nécessite également la présence de ces RiBi au bon endroit, au bon moment et dans les bonnes proportions afin de permettre le bon assemblage du ribosome et son transport de compartiment en compartiment. Qui plus est, la biogenèse du ribosome nécessite la présence des trois ARN polymérases : l'ARN polymérase I permet de transcrire, dans le nucléole, les ARN ribosomaux 18S (constitutif de la petite sous-unité), 5.8S et 28S (constitutifs de la grosse sous-unité) sous la forme d'un précurseur unique de 35S ; l'ARN polymérase II permet de transcrire les ARN messagers codant les protéines ribosomales, directement constitutives de la particule ribosomale mature, et les RiBi ; l'ARN polymérase III permet de transcrire, dans le nucléoplasme, l'ARN ribosomale 5S constitutif de la grosse sous-unité ribosomale.

Le ribosome a d'abord été envisagé comme étant une « machine moléculaire », c'est-à-dire une machine complexe capable de réaliser en un temps minime et de manière coordonnée, une succession d'étapes complexes et précises aboutissant à la synthèse de la protéine (Alberts, 1998). Néanmoins, les recherches réalisées plus récemment sur la biogenèse du ribosome en lui-même semblent remettre en cause l'hypothèse d'une machine qui « subirait » les étapes. En effet, un autre modèle de l'organisation du ribosome et, donc, de la traduction, commence à émerger. Ce nouveau modèle repose principalement

sur la grande complexité de la biogenèse du ribosome qui, dès lors, peut contenir des composants qui pourraient réguler de manière divergente la « machine moléculaire » pour aboutir non pas au ribosome mais à un ribosome spécifique d'un état cellulaire. Cette hypothèse est renforcée par le fait que certaines parties du ribosome peuvent être modifiées et/ou activées par de nouvelles étapes de régulation (pour revue, Xue and Barna, 2012) et que la majeure partie des protéines ribosomales n'est pas nécessaire pour assurer la catalyse de formation de liaisons peptidiques et que seuls les ARN ribosomiaux (et quelques protéines ribosomales) sont nécessaires à cette étape (Noller et al., 1992). Qui plus est, certaines protéines ribosomales possèdent des fonctions extra-ribosomales. On peut citer comme exemple le cas de la protéine RPL13A qui est capable de former un complexe tétramérique qui réprime la traduction des protéines de réponse à l'interféron (Mazumder et al., 2003; Kapasi et al., 2007). Par ailleurs, une interaction directe entre les ribosomes et le complexe TORC2 a été mise en évidence chez la levure où l'activité du complexe TORC2 semble régulée par cette interaction (Zinzalla et al., 2011).

Enfin, le dernier point qui vient appuyer cette théorie est le fait que, contrairement aux mammifères qui ne possèdent qu'un seul gène codant chaque protéine ribosomale fonctionnelle, un grand nombre de protéines ribosomales de levure, de plante ou de mouche est codé par plusieurs gènes. Ainsi, par exemple, sur les 78 protéines ribosomales de la levure, on admet que 59 sont codées par au moins deux gènes (Kellis et al., 2004). Dans 70% des cas de duplication de gènes codant des protéines ribosomales chez la levure, ces gènes ne sont pas exprimés de la même manière, suggérant que les différents paralogues ne sont pas tout à fait équivalents et pourraient ne pas avoir les mêmes fonctions (Parenteau et al., 2011). Xue et Barna (2012) proposent ainsi que la variation de composition du ribosome, par l'incorporation de différents paralogues, par exemple, pourrait être un mécanisme permettant de fournir au ribosome une activité régulatrice. Afin de confirmer cette hypothèse, il faudrait étudier l'impact de la perte de fonction des différents paralogues sur le contrôle de la traduction.

II.B.2. Cas des plantes

La traduction est un mécanisme largement conservé chez les eucaryotes qui permet la synthèse de protéines à partir des ARN messagers. Dans cette partie, je vais principalement m'attarder sur les caractéristiques de la traduction et du ribosome chez les végétaux.

Chez les plantes, il existe trois types de ribosomes : le ribosome cytoplasmique, le ribosome chloroplastique et le ribosome mitochondrial. Le ribosome cytoplasmique contient des protéines codées par le génome nucléaire, le ribosome chloroplastique contient des protéines codées par les génomes nucléaire et chloroplastique et le ribosome mitochondrial contient des protéines codées par les génomes nucléaire et mitochondrial. Les protéines constitutives de ces trois ribosomes sont maintenant bien décrites et, récemment, Sormani et al. (Sormani et al., 2011) ont publié la liste des protéines potentiellement constitutives de ce ribosome en se basant sur les données déjà publiées et sur des recherches d'homologie de séquence par bioinformatique.

II.B.2.a. Structure du ribosome cytoplasmique végétal

L'organisation du ribosome, très conservée parmi les eucaryotes, n'est pas très différente chez les plantes. Ainsi, le ribosome cytosolique (80S) d'*Arabidopsis* est composé de 48 protéines pour la grosse sous-unité et 31 pour la petite sous-unité (nombre de protéines équivalent à ce qui a déjà été rapporté chez d'autres eucaryotes). Le ribosome cytoplasmique végétal présente néanmoins quelques modifications notables par rapport à ses homologues chez les autres eucaryotes. Ainsi, Bailey-Serres et al. (1997) rapportent des modifications au niveau du 'stalk' de la grosse sous-unité 60S. Ce 'stalk' a été décrit comme contenant des phosphoprotéines acides interagissant avec les facteurs d'élongation, les ARN messagers et les ARN de transfert au cours de la traduction (pour revue, Remacha et al., 1995). Chez le ribosome cytoplasmique du maïs, ce stalk est formé, non seulement des protéines P0, P1 et P2 retrouvées chez les autres eucaryotes, mais aussi d'une quatrième famille de protéines, baptisée P3, qui partage avec les protéines P1 et P2 divers propriétés structurelles, comme l'extrémité C-terminale conservée, la masse molaire et le point isoélectrique (Bailey-Serres et al., 1997; Szick et al., 1998). Une analyse phylogénique des phosphoprotéines acides ribosomales de plusieurs organismes eucaryotes a révélé depuis

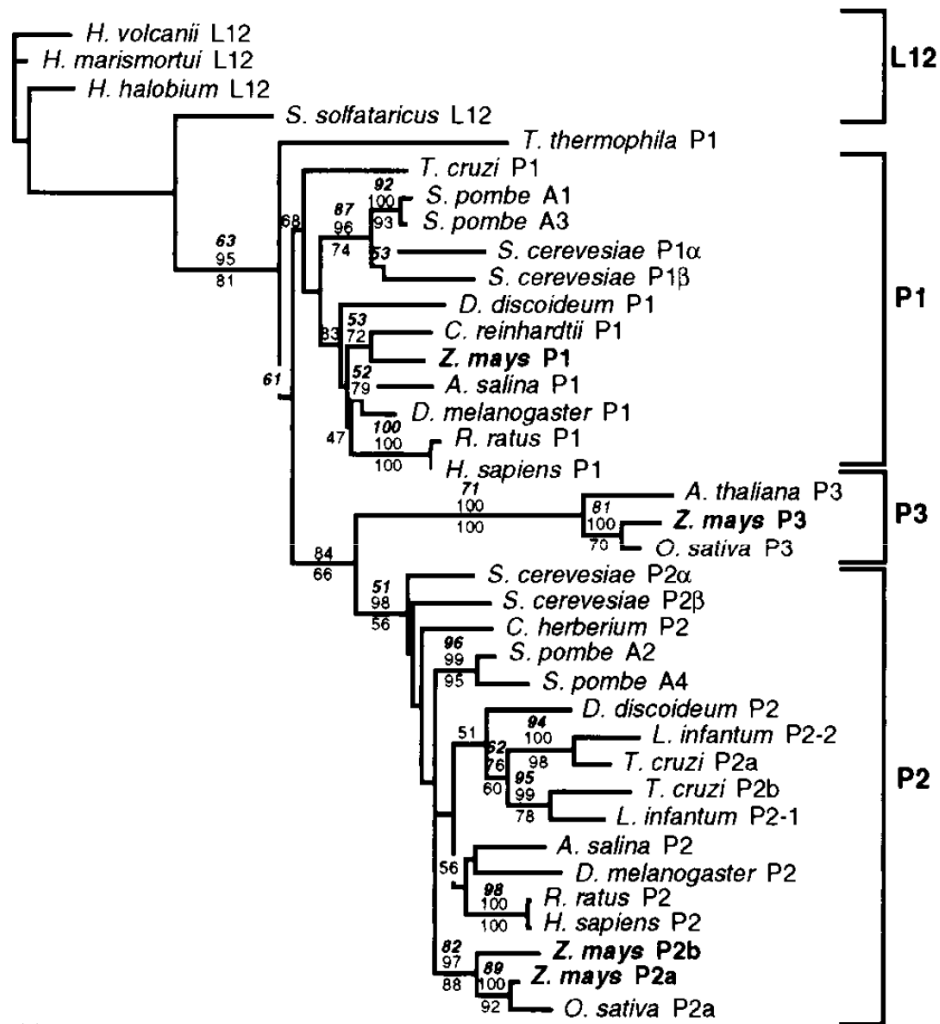


Figure 27 : Analyse phylogénétique des protéines P de 12 kDa constitutive du stalk ribosomal (Szick et al., 1998)

que cette famille de protéines n'est retrouvée que parmi les monocotylédones et les dicotylédones (**figure 27**) (Szick et al., 1998).

Une autre particularité du ribosome cytoplasmique végétal est que toutes les protéines qui le composent sont codées par une famille multigénique de 2 à 7 membres. Ce n'est pas le seul cas de duplication des gènes codant les protéines ribosomales parmi les eucaryotes (seuls les mammifères ne semblent posséder qu'un gène fonctionnel par protéine ribosomale, les autres gènes étant des pseudogènes) puisque l'on rapporte, par exemple, que 59 des 78 protéines ribosomales de levure sont codées par au moins deux gènes (Kellis et al., 2004). Néanmoins, il semble que les végétaux soient les seuls eucaryotes à avoir toutes les protéines ribosomales codées par au moins deux gènes. Cet évènement de duplication donne lieu à beaucoup d'hypothèses sur le rôle d'une telle conservation ainsi que sur son impact sur l'organisation du ribosome et sur la régulation de la traduction (voir partie II.B.2.b, page 36). Sur le plan structural, cette duplication entraîne également des modifications, faisant émerger des sous-familles de protéines ribosomales spécifiques des plantes. Ainsi, on peut citer le cas de la famille RPS15a, orthologue à la famille de protéines bactériennes S8. Cette famille de protéines S8 peut se fixer sur les ARN ribosomaux 16S de la sous-unité 30S et on considère qu'elle est crucial pour l'assemblage du ribosome (Held et al., 1974; Svensson et al., 1988; Brodersen et al., 2002). Le génome d'*Arabidopsis* contient 6 gènes codant une RPS15a et parmi ces 6 gènes, 4 codent une séquence peptidique proche de celle du rat (il s'agit des protéines de type I) tandis que les deux autres (RPS15aB et RPS15aE) en sont plus éloignés (protéines de type II). Une analyse phylogénétique de grande ampleur a révélé que les protéines du type II n'existent que chez les végétaux et qu'elles seraient apparues après la divergence des bryophytes puisqu'elles n'existent pas non plus chez *C. reinhardtii* et chez *P. patens* (Szick-Miranda et al., 2010).

II.B.2.b. Fonctions des protéines ribosomales végétales

Récemment, de nombreuses études ont mis en évidence des différences entre le transcriptome (quantité d'ARN messagers transcrits) et le traductome (quantité d'ARN messagers en cours de traduction et, donc, liés à au moins un ribosome), suggérant l'idée d'une reconnaissance spécifique de certains ARN messagers par le ribosome. Des études ont également été menées afin de tenter de comprendre comment l'environnement régule la composition du ribosome et quelles sont les conséquences de ce changement de

composition. En effet, chaque protéine du ribosome cytoplasmique est codée par une famille multigénique comptant entre 2 et 7 membres. Plusieurs hypothèses ont été élaborées afin d'expliquer la conservation de ces gènes dupliqués codant les protéines ribosomales alors que cet événement est bien moins fréquent chez les autres eucaryotes. Ainsi, Weijers et al. (2001) rapportent le cas des gènes *RPS5A* et *B* codant tous deux pour la protéine RPS5 et dont les promoteurs présentent des activités différentes dans le temps et dans l'espace, évoquant par là l'idée d'une spéciation consécutive à la duplication. La même hypothèse est développée par Sormani et al. (2011) qui ont mis en évidence la présence d'une catégorie de gènes codant des protéines ribosomales dont l'expression est directement corrélée à l'état de stress tandis que d'autres gènes ont un profil d'expression basal peu régulé. Enfin, il a également été rapporté que certains gènes sont capables de compenser la perte de fonction d'un des membres de la même famille, comme c'est le cas pour les RPL4 dont l'expression de la *RPL4D* est induite dans les mutants *rpl4a* et vice-versa, ce qui se caractérise par une plus grande abondance des peptides de l'un ou l'autre gène dans le mutant correspondant (Rosado et al., 2010). Creff et al. (2010) ont également décrit une redondance de fonction dans le cas des protéines ribosomales RPS6A et RPS6B.

Plusieurs études ont récemment permis de mettre en évidence que l'environnement de la plante modifie la composition des ribosomes. Hummel et al. (2012) rapportent que la composition du ribosome n'est pas la même dans des feuilles de plantes de 5 jours récoltées et incubées pendant 24h en présence ou en absence d'une solution de saccharose à 6%. Parmi les principales familles touchées, on peut citer les familles des RPS7, des RPS3a, des RPL8, des RPL19 ainsi que les RACK1. Turkina et al. (2011) ont étudié les différences entre le ribosome diurne et le ribosome nocturne en comparant l'état de phosphorylation des protéines ribosomales dans un ribosome prélevé deux heures avant la fin de la nuit ou quatre après le début du jour. Ils ont ainsi pu mettre en évidence une augmentation de l'état de phosphorylation de la RPS6 sur trois sites différents, des protéines P1 du stalk ribosomal et de la protéine RPL29-1 entre le jour et la nuit. Il est frappant de noter que chacun de ces articles discutent sur la corrélation que l'on pourrait établir entre ces modifications de composition (phospho)protéomique au sein du ribosome et des différences au niveau de traduction ou dans une sélectivité de certains ARN messagers à traduire ou, au contraire à ne plus traduire. Néanmoins, aucune de ces deux études ne présente de résultats

permettant de montrer qu'une telle corrélation existe. Ces analyses, réalisées par spectrométrie de masse, font suite à d'autres publications réalisées par le passé et qui utilisaient une approche biochimique plus « conventionnelle ». Ainsi, il avait déjà été montré, par observation de profils électrophorétiques, que les protéines du stalk peuvent être phosphorylées, induisant un léger retard au niveau de la vitesse de migration. Utilisant ce petit décalage entre la forme phosphorylée et la forme non phosphorylée, Szick-Miranda et Bailey-Serres (2001) ont mis en évidence chez le maïs que le niveau de phosphorylation de ces protéines n'est pas le même dans tous les organes et qu'une privation d'oxygène (pendant 24h) entraîne une diminution du niveau de phosphorylation de ces protéines. Une fois de plus, le rôle de ces modifications est discuté et les auteurs émettent l'hypothèse qu'elles pourraient influencer la traduction de certains ARN messagers spécifiques et que la phosphorylation en position C-terminale pourrait réguler l'étape d'élongation de la traduction.

Enfin, plusieurs mutants de protéines ribosomales ont été décrits comme présentant de forts retards de développement foliaires. Il s'agit notamment des mutants *piggyback* codant des protéines ribosomales de la grande sous-unité cytoplasmique RPL10a, RPL9 et RPL5 (Pinon et al., 2008). Les mutants dans le gène codant la RPS5A, également appelé AML1 (pour *Arabidopsis Minute-Like*) sont également affectés très fortement dans leur développement (Weijers et al., 2001).

II.B.2.c. Cas du ribosome plastidial

Etant donné que mon étude porte principalement sur le ribosome cytoplasmique, ou cytoribosome, j'ai volontairement passé sous silence le cas du ribosome chloroplastique et du ribosome mitochondrial dans les paragraphes précédents. Il faut toutefois prendre en compte que, chez les plantes, un certain nombre de gènes très importants pour assurer la photosynthèse, parmi lesquelles la grosse sous-unité de la RubisCO, est codé par des gènes chloroplastiques et est donc traduit dans le chloroplaste, par le ribosome chloroplastique. Concernant sa structure, il ne diffère par beaucoup du ribosome procaryotique et est donc composé d'une grosse sous-unité de 50S et d'une petite de 30S formant un ribosome fonctionnel de 70S. Il apparaît évident que les régulations concernant l'organisation et la biogenèse du ribosome existent également dans le cas du ribosome chloroplastique. Il faut toutefois ajouter une étape importante de régulation qui repose sur le fait que certaines

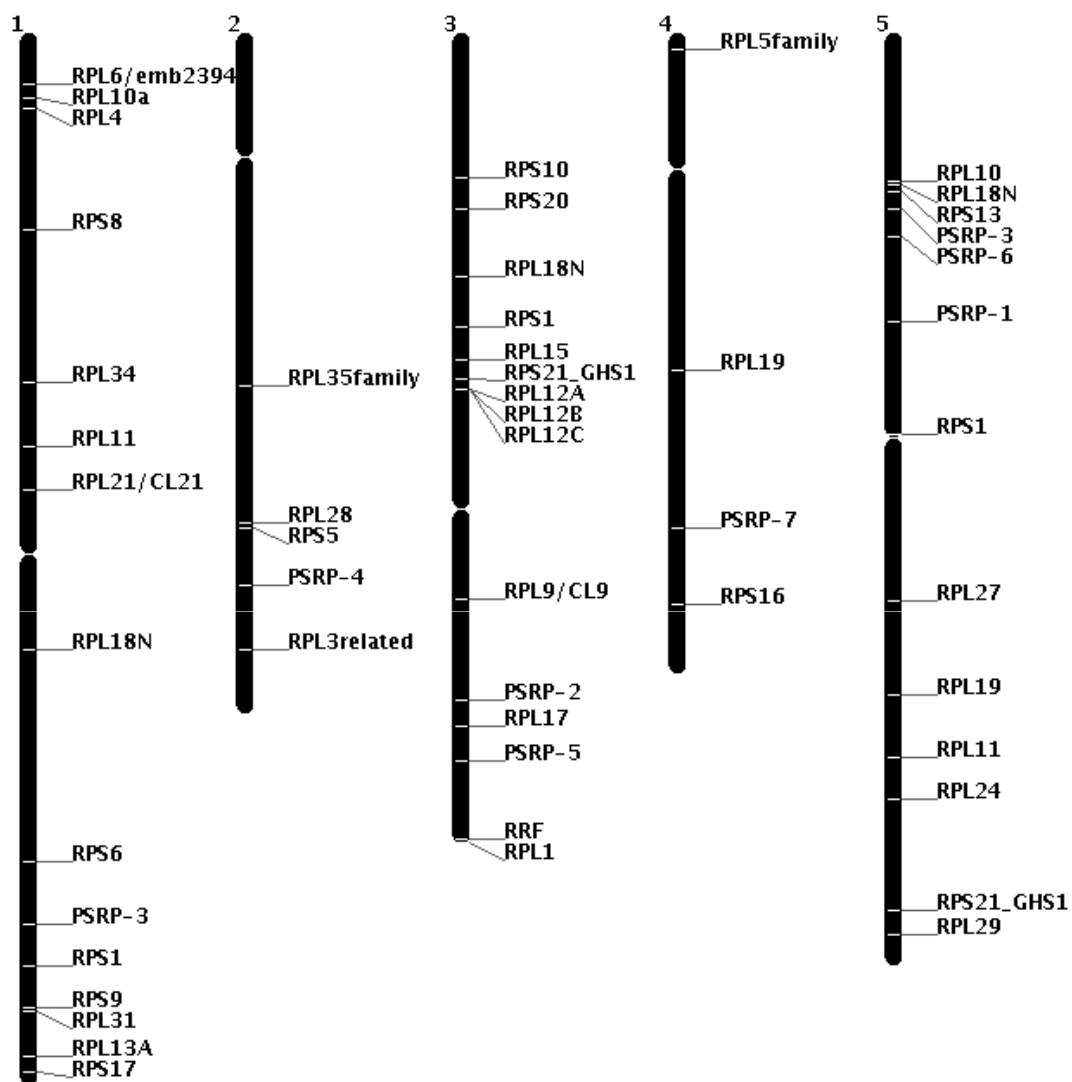


Figure 28 : Localisation des gènes nucléaires codant des protéines ribosomales chloroplastiques. Les AGI des gènes en questions proviennent des données supplémentaires de Sormani et al. (2011) et le positionnement sur la carte a été réalisé avec la fonction ViewChromosomes de TAIR.

protéines ribosomales chloroplastiques sont codées par le génome nucléaire tandis que d'autres sont codées par le génome chloroplastiques (**figure 28**), nécessitant ainsi l'activité synchrone de deux ARN polymérases différentes. La perte des protéines ribosomales plastidiales chez *Arabidopsis* peut avoir des conséquences phénotypiques variées allant de la létalité embryonnaire à l'absence de phénotype. De manière intéressante, même si le ribosome chloroplastique dérive d'une origine procaryotique, le rôle de chaque protéine ribosomale ne peut pas être prédit par homologie avec la sévérité du phénotype du mutant correspondant chez les procaryotes (Romani et al., 2012).

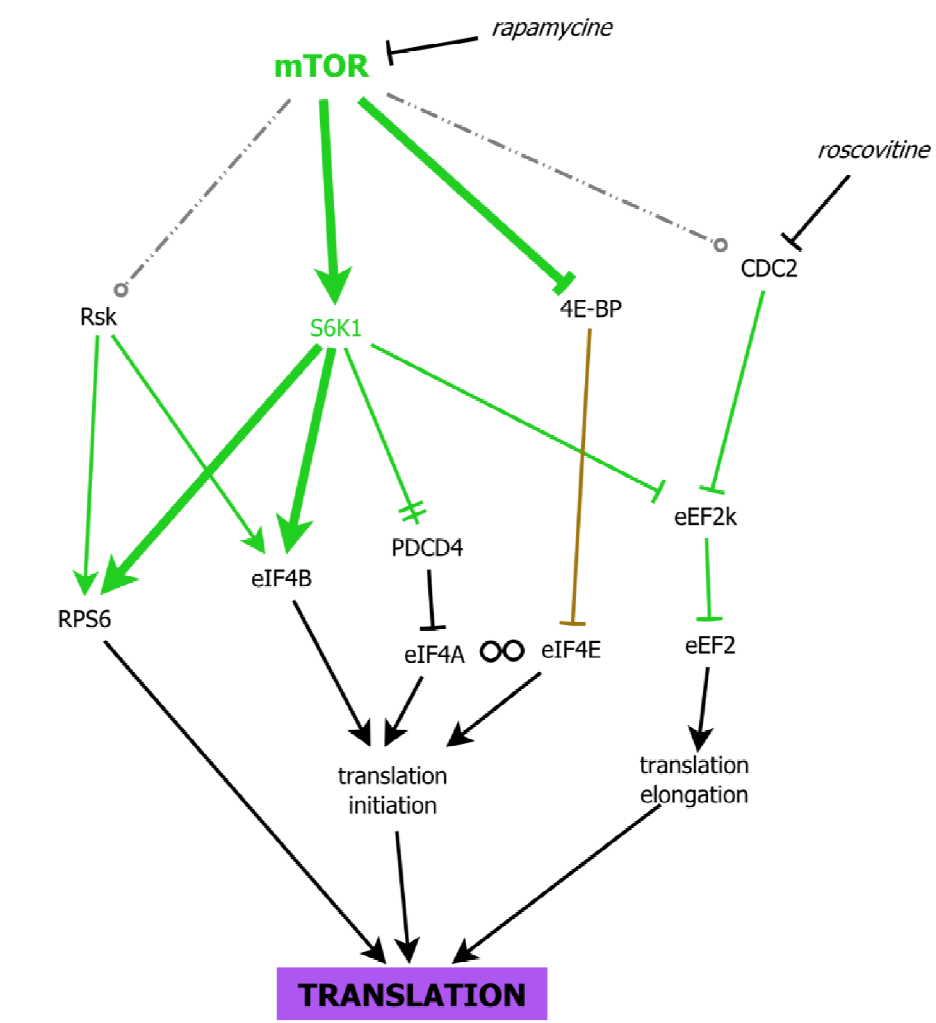
II.B.3. Régulation de la traduction par TOR

Comme nous l'avons vu précédemment, la traduction protéique est un mécanisme qui requiert beaucoup d'énergie et une organisation coordonnée, néanmoins, pour se diviser et croître, la cellule a besoin de produire des protéines et, donc, de réaliser cette traduction protéique. Étant donnée la grande importance de la voie de signalisation de TOR dans la croissance, l'idée d'un contrôle de la traduction par cette voie de signalisation a donc émergé rapidement. Ainsi, Barbet et al. (1996) ont montré que, chez *S. cerevisiae*, l'inactivation de TOR conduit à une diminution de l'initiation de la traduction des ARN messagers. Depuis cette découverte, de nombreuses études ont été menées et permettent maintenant de mieux comprendre le rôle que joue la kinase TOR dans ces régulations.

Cette régulation se fait à plusieurs niveaux : (i) TOR régule la traduction en elle-même, et notamment les étapes d'initiation et d'élongation ; (ii) TOR contrôle la biogenèse du ribosome, notamment en régulant la transcription des gènes impliqués dans la machinerie de traduction ; (iii) TOR contrôle la traduction des protéines impliquées dans la machinerie de traduction.

II.B.3.a. TOR et le contrôle de la traduction

La traduction des ARN messagers en protéines est un processus qui s'articule en trois étapes (initiation, élongation, terminaison) et qui fait intervenir de nombreux facteurs protéiques (voir partie II.B.1, page 30). Les étapes d'initiation et d'élongation de la traduction sont régulées par TOR par des mécanismes qui sont maintenant bien décrits.



LEGENDE

	active l'activité par déphosphorylation
	inhibe l'activité par phosphorylation
	régule transcriptionnellement
	régule indirectement		séquestre (inactive en se fixant dessus)
	régule peut-être (mécanisme pas ou mal décrit)		interaction directe
	entraîne la dégradation par ...	SCH9	Kinase
	ne régule pas ...	PP2A	Phosphatase
	se fixe sur	RRN3	Facteur de transcription

Figure 29 : Régulation de la traduction protéique par la kinase TOR

Cette voie de régulation fait intervenir deux cibles directement phosphorylées par le complexe mTORC1, le facteur 4E-BP (eukaryotic initiation factor 4E Binding Protein) et la S6 Kinase (catalysant la phosphorylation de la protéine ribosomale RPS6).

La S6 Kinase (ou S6K) a d'abord été décrite par son rôle dans la phosphorylation de la protéine ribosomale RPS6 qui est un constituant de la petite sous-unité du ribosome (d'où son nom) sur plusieurs sites (Fingar and Blenis, 2004). Toutefois, l'impact biologique de ces phosphorylations reste encore un peu flou (Ruvinsky and Meyuhas, 2006).

La S6K phosphoryle également le facteur d'initiation de la traduction eIF4B sur la Ser⁴²² ce qui entraîne son activation (Raught et al., 2004; Proud, 2007) et elle phosphoryle également eEF2K (elongation factor 2 kinase) sur la Ser³⁶⁶ ce qui l'inactive (**figure 29**). Dès lors, la protéine eEF2 n'est plus phosphorylée, devient active et induit l'élongation de la traduction (Wang et al., 2001). Enfin, la S6 kinase, activée par la phosphorylation par TOR grâce à son motif TOS (TOR signaling) (Nojima et al., 2003), phosphoryle le facteur suppresseur de tumeur PDCD4 entraînant sa dégradation, ce qui augmente l'activité hélicase du facteur d'initiation de la traduction eIF4A et facilite le passage de la sous-unité ribosomale 40S jusqu'au codon d'initiation de la traduction (Dorrello et al., 2006) (concernant l'initiation de la traduction et les facteurs qui y sont associés, voir la partie II.B.1, page 30).

En ce qui concerne le lien entre TOR et la traduction, par l'intermédiaire de 4E-BP, la protéine eIF4E-Binding Protein (ou 4E-BP) est phosphorylée par TOR et, de ce fait, inactivée. Elle peut alors libérer le facteur d'initiation de la traduction eIF4E qu'elle séquestre. eIF4E peut alors se fixer sur eIF4A et modifier la conformation secondaire de l'extrémité 5' de l'ARN messager afin de faciliter le passage de la petite sous-unité ribosomale. Il est à noter que la protéine 4E-BP n'a pas d'homologue clair chez les plantes.

La traduction est également contrôlée par d'autres voies et d'autres AGC kinases notamment, comme Akt et PKC, qui jouent également un rôle dans la traduction. Mais le mécanisme par lequel ils interviennent reste flou (Grosso et al., 2008). Il est également à noter que l'inactivation de eEF2K se fait par phosphorylation sur trois sites inhibiteurs différents, Ser⁷⁸, Ser³⁵⁹ et Ser³⁶⁶ (Proud, 2007). On sait maintenant la S6 kinase phosphoryle la Ser³⁶⁶ et Smith et Proud (2008) ont montré que la phosphorylation de la Ser³⁵⁹ est due à

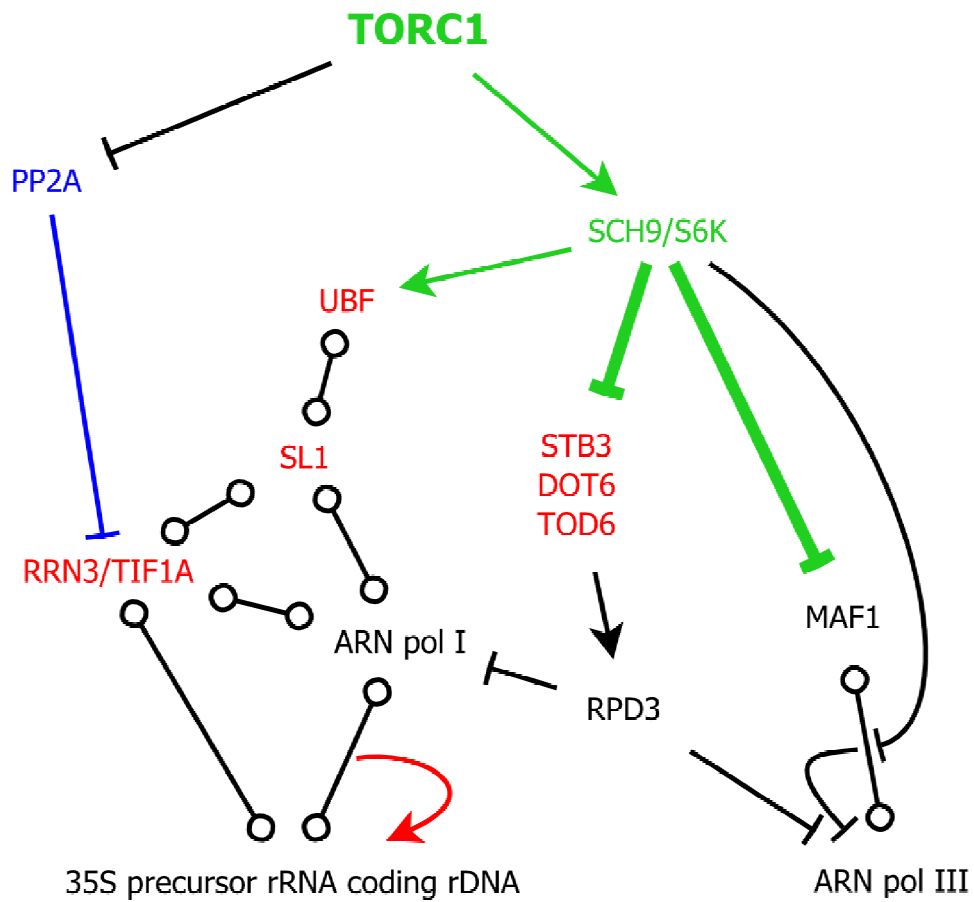
l'activité kinase du cdc2/cyclin B (cdc2 parfois appelé CDK1). Cependant, le rôle de cdc2 dans la voie de signalisation de TOR reste peu clair, étant donné qu'un traitement à la rapamycine ne modifie pas grandement l'activité cdc2 alors que la privation d'acide aminé et l'ablation du TSC2 (respectivement inactivant et activant le complexe mTORC1) ont un effet sur l'activité kinase de cdc2 (Smith and Proud, 2008).

En plus du contrôle de la traduction par TOR, il est également à noter que TOR pourrait jouer un rôle dans la réinitiation de la traduction après un micro ORF. En effet, certains ARN messagers possèdent, en 5', plusieurs ORF (Open Reading Frame) de courte taille appelés μ ORF, uORF (upstream ORF) ou sORF (small ORF). Ces μ ORF permettent une régulation de la traduction puisqu'ils nécessitent une réinitiation de la traduction sur le même ARN messager juste après un site de terminaison. Chez les mammifères, il a été mis en évidence que plusieurs eIF (eIF3, eIF4F et eIF4A) sont importants pour promouvoir la réinitiation de la traduction après ces sORF (Pöyry et al., 2004). Toutefois le mécanisme de réinitiation permettant la traduction des ARN messagers polycistronique est encore mal connu. Schepetilnikov et al. (2011) montrent que, chez Arabidopsis, TOR et S6K1 jouent un rôle crucial dans la formation des complexes ribosomiaux de réinitiation après un site de terminaison. En effet, ces auteurs ont montré que la protéine virale TAV du CaMV (Cauliflower Mosaic Virus) est nécessaire à la réinitiation traductionnelle sur l'ARN viral polycistronique par son rôle de recrutement et d'activation de TOR. Cette protéine induit également un enrichissement de TOR dans la fraction polysomale.

II.B.3.b. TOR contrôle la biogenèse du ribosome

Une croissance rapide nécessite une synthèse protéique abondante. Une telle synthèse implique la production abondante de ribosomes et d'ARN de transfert, ce qui requiert la synthèse d'un certain nombre de facteurs impliqués dans la biogenèse et l'assemblage du ribosome. Ces facteurs sont appelés RiBi. Une croissance rapide nécessite donc une synthèse bien régulée et coordonnée des protéines ribosomiales, des ARN ribosomiaux, des ARN de transfert et des RiBi.

La transcription des gènes codant ces différents facteurs fait intervenir les trois ARN polymérases nucléaires : l'ARN polymérase I régule la transcription des ARN ribosomiaux ; l'ARN polymérase II régule la transcription des gènes codant des protéines, c'est-à-dire les



LEGENDE

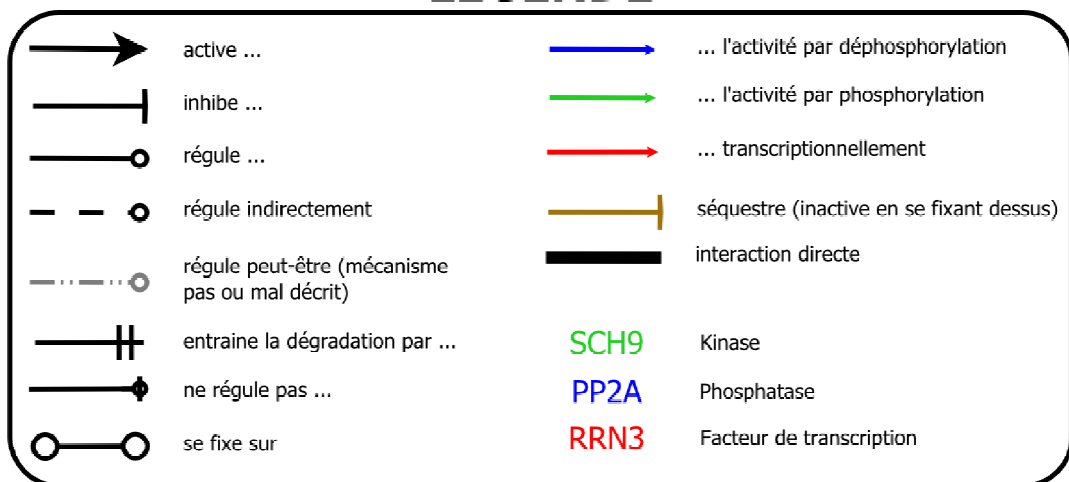


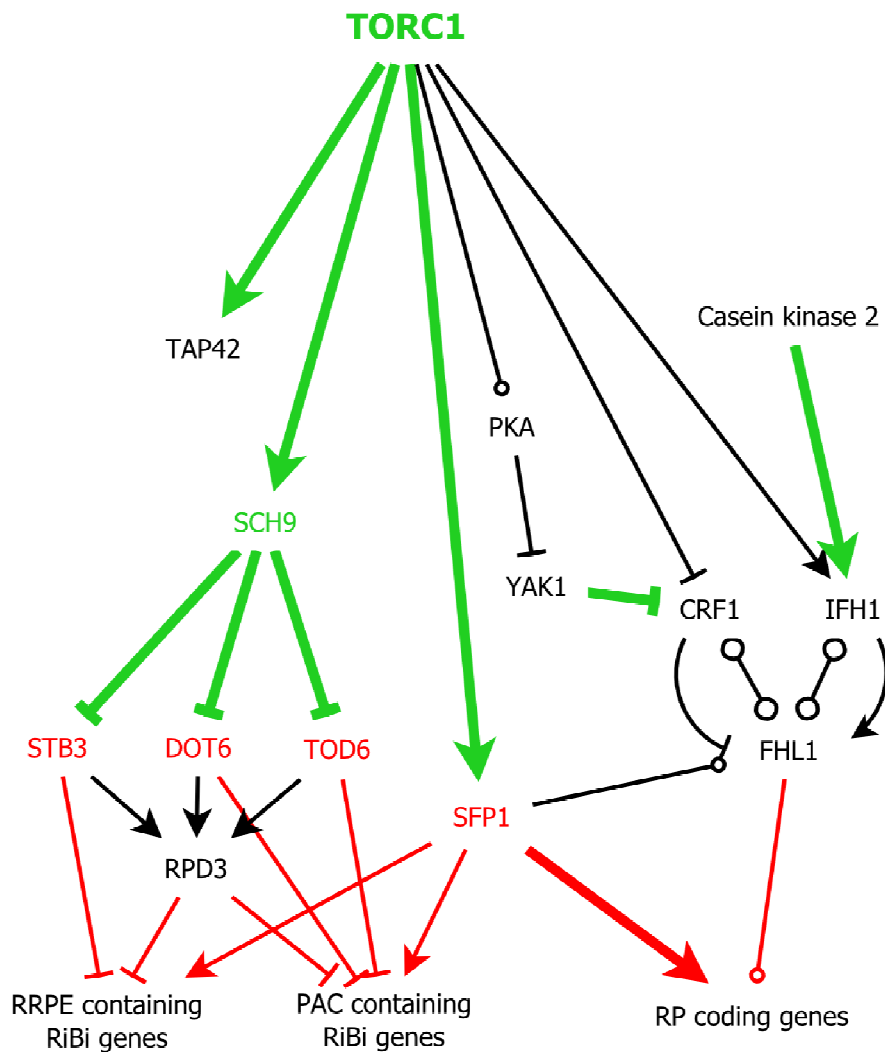
Figure 30 : Régulation des ARN polymérase I et III par le complexe TORC1

protéines ribosomales et les RiBi ; l'ARN polymérase III régule la transcription de l'ARN ribosomal 5S et des ARN de transfert. Etant donné que ces mécanismes consomment une grande quantité d'énergie, la cellule a développé des mécanismes de contrôle afin de réguler étroitement et de coordonner l'expression de ces gènes (Warner, 1999; Lempiäinen and Shore, 2009). Un grand nombre de ces régulations se fait par l'intermédiaire de signaux dépendant du complexe TORC1.

II.B.3.b.i Contrôle de l'expression des ARN ribosomaux (ARN polymérase I)

L'expression des gènes ribosomaux codant les ARN ribosomaux se fait par la mise en place d'un complexe d'initiation de la transcription faisant intervenir plusieurs facteurs de transcriptions, parmi lesquels on peut citer RRN3/TIF1A (RRN3 chez la levure, TIF1A chez les mammifères), SL1 et UBF (Upstream Binding Factor). Ce complexe peut ensuite recruter l'ARN polymérase I qui commence à transcrire l'ADN ribosomal en ARN ribosomal.

Lorsque TOR est actif, il inhibe PP2A qui, lorsqu'elle est active, déphosphoryle TIF1A, ce qui empêche sa fixation au complexe d'initiation de la transcription par translocation du noyau vers le cytoplasme (Claypool et al., 2004; Mayer et al., 2004). TOR contrôle également l'activité de l'ARN polymérase I en régulant l'état de phosphorylation du facteur UBF, par l'intermédiaire de la S6 kinase (Hannan et al., 2003). Enfin, TOR pourrait également agir sur la localisation de l'ARN polymérase I en modifiant la chromatine et la structure du nucléole (Tsang et al., 2003). Huber et al. (2011) ont également mis en évidence une voie de régulation de l'activité des ARN polymérases I et III dans une voie indépendante de RRN3 et qui fait intervenir les facteurs de transcription STB3, DOT6 et TOD6. En effet, SCH9 phosphoryle directement ces facteurs qui sont, alors, inactivés. Tout comme ils sont parvenus à faire un lien entre SCH9, ces facteurs de transcription, le complexe d'histone déacétylase RPD3 et l'activité de l'ARN polymérase II, ils ont montré qu'une mutation dans STB3, DOT6, TOD6 et/ou RPD3 permet d'abolir la diminution d'activité des ARN polymérases I et III en réponse à l'inactivation de SCH9 (**figure 30**). Une partie de cette voie pourrait être conservée chez les plantes puisque Ren et al. (Ren et al., 2011) ont mis en évidence un lien entre TOR et l'ARN polymérase I chez Arabidopsis.



LEGENDE

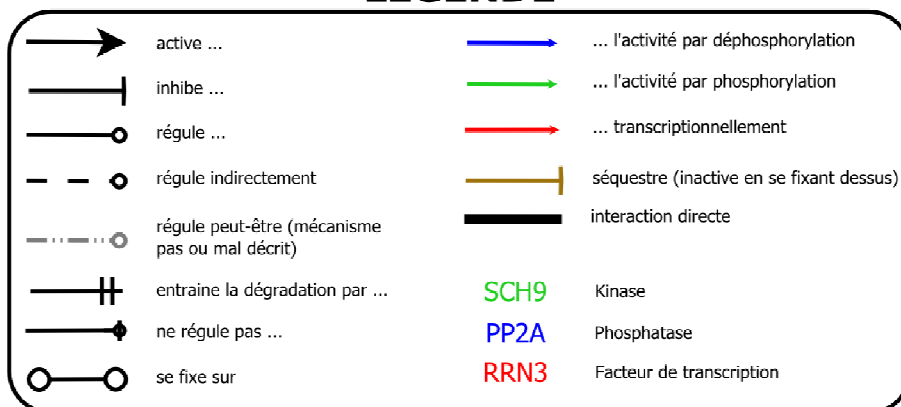


Figure 31 : Régulation de l'ARN polymérase II par le complexe TORC1

II.B.3.b.ii Contrôle de l'expression de l'ARN ribosomal 5S et des ARN de transfert (ARN polymérase III)

L'ARN polymérase III permet, entre autres, la transcription des ARN ribosomaux 5S, constitutifs de la grosse sous-unité ribosomale, et des ARN de transfert et régule, donc, non seulement la biogenèse du ribosome, mais aussi l'activité traductionnelle elle-même.

Le mécanisme par lequel le complexe TORC1 régule l'activité de l'ARN polymérase III n'est pas encore bien élucidé (**figure 30**) mais il semble que la phosphorylation de MAF1, un répresseur conservé de l'ARN polymérase III, par SCH9 joue un rôle important dans cette régulation. En effet, la délétion de MAF1 bloque complètement la diminution de la production des ARN de transfert en réponse à l'addition de rapamycine (Michels, 2011). Néanmoins, il se pourrait que SCH9 agisse sur un autre membre de la voie MAF1 – ARN polymérase III, qui pourrait être un membre du complexe d'initiation TF III B de l'ARN polymérase III (Willis and Moir, 2007). Qui plus est, Huber et al. (2011) ont mis en évidence une voie de régulation de l'activité de l'ARN polymérase III par l'intermédiaire des facteurs de transcription STB3, DOT6 et TOD6 et du complexe d'histone déacétylase RPD3 (pour le mécanisme, voir la partiell.B.3.b.i, page 42).

II.B.3.b.iii Contrôle de l'expression des RiBi et des protéines ribosomales (ARN polymérase II)

(c) Contrôle transcriptionnel de l'expression des RiBi

Les RiBi sont des protéines non ribosomales qui permettent d'accélérer la capacité traductionnelle de la cellule en modulant l'expression, l'assemblage et le transport du ribosome du noyau vers le cytoplasme, ainsi que des ARN de transfert. On estime, chez la levure, que les RiBi seraient au nombre approximatif de 200 (Jorgensen et al., 2004; Lempiäinen and Shore, 2009). L'expression de ces gènes est largement régulée par le complexe TORC1, par l'intermédiaire de SCH9 et SFP1 (**figure 31**) (Jorgensen et al., 2004; Urban et al., 2007).

Les gènes RiBi présentent, dans leur promoteur, deux séquences caractéristiques RRPE et/ou PAC. Le facteur de transcription STB3 est capable de se fixer sur les éléments RRPE et les facteurs de transcription DOT6 et TOD6 (de la famille des protéines myb) sont capables de se fixer sur les éléments PAC. Huber et al. (2011) ont montré que SCH9 phosphoryle

directement les facteurs de transcription STB3, DOT6 et TOD6, *in vitro* et *in vivo*. Lorsqu'ils sont actifs, ces facteurs de transcription agissent en recrutant le complexe histone déacetylase RPD3 qui éteint l'expression des gènes adjacents (Humphrey et al., 2004; Lippman and Broach, 2009; Huber et al., 2011). De plus Huber et al. (2011) ont également montré que les RiBi et les gènes codant les protéines ribosomales dont l'expression est fortement diminuée dans les mutants SCH9, ont un niveau d'expression proche de celle observée chez le sauvage lorsque STB3 et/ou DOT6 et/ou TOD6 et/ou RPD3 sont également mutés. RPD3 semble donc nécessaire à l'extinction de l'expression des gènes impliqués dans la biogenèse des ribosomes en réponse à une mutation dans SCH9.

Enfin, SFP1, un facteur de transcription directement phosphorylé par le complexe TORC1 (Lempiäinen et al., 2009), est capable de stimuler l'expression des RiBi dans les cellules en croissance active (sa localisation est alors principalement nucléaire) (Cipollina et al., 2008b; Cipollina et al., 2008a). Le mécanisme d'action de SFP1 sur la régulation des gènes transcrits par l'ARN polymérase II, et plus particulièrement sur l'expression des RiBi reste peu clair étant donné que SFP1 n'est pas immunoprécipité avec les promoteurs des gènes codant les RiBi (Lempiäinen and Shore, 2009).

(d) Contrôle transcriptionnel de l'expression des gènes codant les protéines ribosomales

Il semble que FHL1 soit constitutivement fixé au promoteur des gènes codant les protéines ribosomales et que cette fixation soit, dans certains cas, facilitée par la protéine HMO1 ainsi que RAP1, une protéine essentielle (De Virgilio and Loewith, 2006). Lorsque le complexe TORC1 est actif, IFH1 se fixe sur FHL1 et l'active alors que, lorsque TORC1 est inactif, CRF1 remplace IFH1 et réprime FHL1. Les mécanismes qui permettent de réguler CRF1 et IFH1 restent à déterminer. On sait que ces deux facteurs sont phosphorylables, IFH1 vraisemblablement par la caséine kinase 2 et CRF1 par la protéine YAK1 mais le lien entre l'activité du complexe TORC1 et la phosphorylation de CRF1 et IFH1 sont peu clairs (Martin et al., 2004; Zhao et al., 2006; Rudra et al., 2007).

Il semble que la répression de l'expression des gènes codant les protéines ribosomales en réponse à la fixation de CRF1 sur FHL1 se fasse par l'intermédiaire du complexe histone déacetylase RPD3. Le facteur de transcription SFP1 est également capable de se fixer au

Nom du gène	Fonction de la protéine codée	Phosphorylation (P), Localisation (L) modifiée par la rapamycine
FAP7	Synthèse de la petite sous-unité	P
SRP40	Transport et assemblage du préribosome	P
RRP14	Constituant de la particule pré-ribosomale 66S	P
RRN3	Facteur d'initiation de l'ARN polymérase I	P, L
NOP9	Préribosome 90S / Ssu processome	L
NHP2	Modifications de l'ARNr	L
NSR1	Modifications de l'ARNr	L
CBF5	Préribosome 90S / Ssu processome	L
UTP4	Préribosome 90S / Ssu processome	L
UTP5	Préribosome 90S / Ssu processome	L
UTP18	Préribosome 90S / Ssu processome	L
UTP22	Préribosome 90S / Ssu processome	L
UTP25	Préribosome 90S / Ssu processome	L
PWP2	Préribosome 90S / Ssu processome	L
BFR2	Préribosome 90S / Ssu processome	L
NOP58	Préribosome 90S / Ssu processome	L
NOP56	Préribosome 90S / Ssu processome	L
RRP5	Préribosome 90S / Ssu processome	L
RPC10	Sous-unité des ARN polymérases I, II et III	L
RPA12	Sous-unité de l'ARN polymérase I	L
RPA135	Sous-unité de l'ARN polymérase I	L
RPA34	Sous-unité de l'ARN polymérase I	L
RPA43	Sous-unité de l'ARN polymérase I	L
RPA49	Sous-unité de l'ARN polymérase I	L
RPA190	Sous-unité de l'ARN polymérase I	L
MRT4	Synthèse de la grosse sous-unité	L
NOG1	Synthèse de la petite sous-unité	L
NAF1	Modifications de l'ARNr	L
SHQ1	Modifications de l'ARNr	L

Tableau 2 : Facteurs impliqués dans la biogenèse du ribosome dont la phosphorylation et/ou la localisation sont altérées par un traitement à la rapamycine (Loewith, 2010)

promoteur des gènes codant les protéines ribosomales et plusieurs études suggèrent que SFP1 régulerait la transcription de ces gènes par l'intermédiaire de la voie FHL1-IFH1 (Marion et al., 2004). Enfin, SCH9 pourrait également jouer un rôle dans la transcription de ces gènes mais utiliserait une voie parallèle, encore peu caractérisée (Urban et al., 2007).

(e) Contrôle post-traductionnel des RiBi

En plus du contrôle transcriptionnel de l'expression des RiBi, TOR régule également leur activité d'une manière plus directe et plus rapide, en les modifiant de manière post-traductionnelle (**tableau 2**). Ainsi, il a été montré récemment qu'une brève exposition à la rapamycine entraîne, chez la levure, des changements au niveau de l'état de phosphorylation et/ou de localisation d'un certain nombre de RiBi (Honma et al., 2006; Loewith, 2010).

II.B.3.c. TOR contrôle la traduction des gènes impliqués dans la machinerie de la traduction.

Certains ARN messagers possèdent, en leur extrémité 5', une cytosine (à la place d'une adénine) suivie par une suite de 4 à 14 bases pyrimidiques (cytosine ou uracile). Ces ARN sont appelés TOP mRNA (5' terminal oligopyrimidine tract mRNA) et sont particulièrement abondants dans les ARN messagers codant les protéines nécessaires à la traduction. Ils ont été décrits comme ayant une traduction fortement activée lorsque les conditions environnementales et nutritionnelles sont favorables (pour revue, Meyuhas, 2000).

L'ajout de rapamycine abolit cette hausse de traduction, impliquant ainsi le complexe TORC1 dans la régulation de ce phénomène (Jefferies et al., 1994; Terada et al., 1994; Hamilton et al., 2006). Le mécanisme permettant de relier TOR à cette activation de la traduction est mal connu et certains travaux suggèrent que la S6 kinase pourrait être impliqué dans cette voie (Jefferies et al., 1997) mais la délétion des deux gènes codant la S6 kinase n'altère pas l'activation de la traduction des 5' TOP mRNA en réponse à l'ajout de sérum chez la souris (Pende et al., 2004). Ils en concluent que TOR affecterait essentiellement la traduction des TOP mRNA par l'intermédiaire de la phosphorylation de 4E-BP.

Plus récemment, Thoreen et al. (2012) ont réalisé une analyse du profil traductionnel des fibroblastes embryonnaires de souris traités pendant deux heures à la Torin1 qui a mis

en évidence un certain nombre d'ARN messagers régulés traductionnellement par l'ajout de Torin1. Parmi ces ARN messagers, les auteurs ont retrouvé des TOP mRNA ainsi que des ARN messagers présentant un motif semblable à un motif TOP mais légèrement dégénéré qu'ils ont appelé TOP-like.

III. UNE STRUCTURE TYPIQUEMENT VEGETALE, LE MERISTEME

Chez les eucaryotes pluricellulaires, la vie commence par la mise en place d'un groupe de cellules totipotentes et indifférenciées. Ces cellules, constitutives de l'embryon, vont, après plusieurs étapes de divisions et de différenciation, permettre de former ce qui deviendra l'organisme adulte. Néanmoins, ces « adultes » contiennent également des foyers de cellules encore non différenciées qui assurent la survie et le maintien de l'organisme. Dans le cas des plantes, ces cellules souches, présentes dans des structures spécialisées, les méristèmes, permettent de créer de nouveaux organes, totalement absents dans l'embryon. Cette croissance est dite indéterminée et permet une croissance plastique et la création de nouveaux organes afin de répondre au mieux aux exigences environnementales.

La plante possède plusieurs types de méristèmes. On trouve tout d'abord les méristèmes primaires qui se trouvent aux extrémités de la tige (méristème apical caulinaire) et de la racine (méristème apical racinaire). Ils sont formés dès l'embryogenèse et permettent la croissance en longueur par la formation de feuilles, de tiges ainsi que de fleurs (après transformation du méristème végétatif en méristème floral) dans le cas du méristème caulinaire et du système racinaire dans le cas du méristème racinaire.

D'autres méristèmes se forment à l'aisselle des feuilles et permettent l'émergence de nouvelles tiges aboutissant à la formation des tiges, des feuilles et des fleurs. On observe également la formation d'autres méristèmes le long de la racine et qui permettent la formation des racines latérales. Ces dernières dérivent de la différenciation des cellules du péricycle racinaire qui créent un nouveau méristème qui, par des divisions successives, formera les racines latérales (Benková and Bielach, 2010).

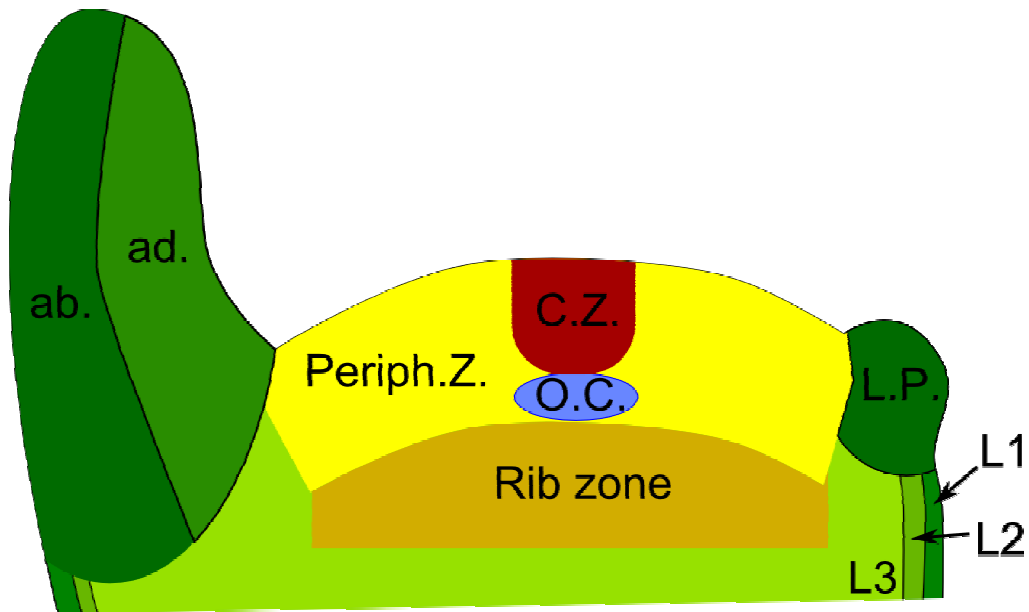


Figure 32 : Organisation des différents tissus constitutifs du méristème apical caulinaire : C.Z. : Zone centrale, O.C. ; Centre organisateur, Periph.Z. ; Zone périphérique, L.P. : Primordium foliaire (face abaxiale (ab.) et face adaxiale (ad.)). D'après Fletcher, 2002

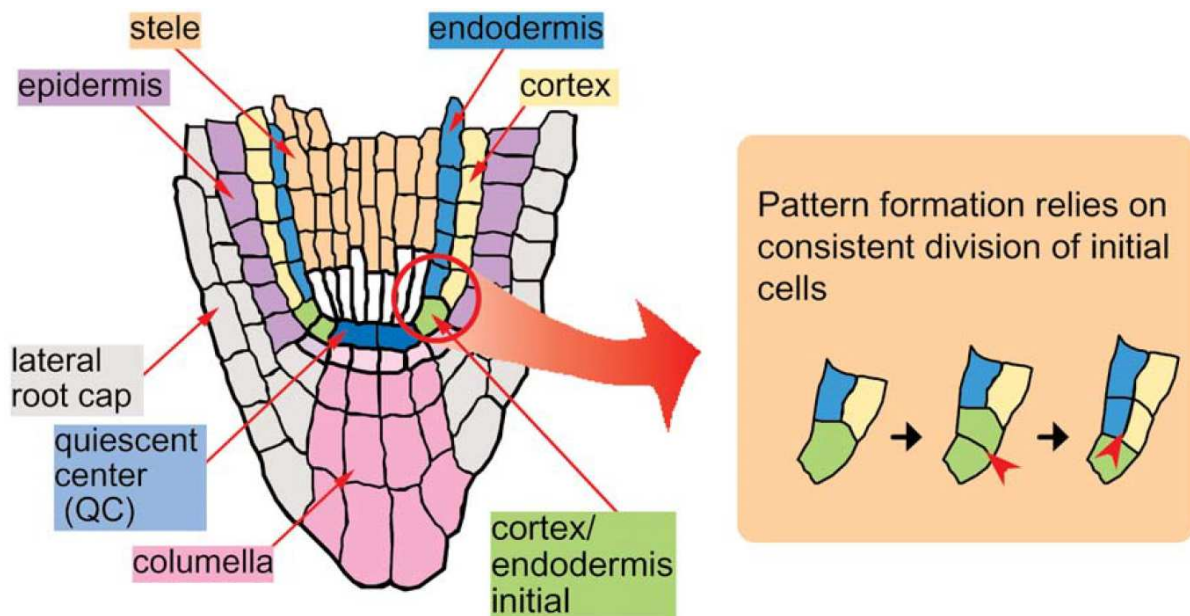


Figure 33 : Les types cellulaires dans le méristème racinaire d'*Arabidopsis*: Section longitudinale de la pointe racinaire d'*Arabidopsis* séparant les différents types cellulaires selon un code couleur. A droite, schéma représentant les deux divisions asymétriques de l'initiale cortex/endoderme et le devenir des cellules filles (Scheres et al., 2002)

Enfin, d'autres méristèmes encore, dits méristèmes secondaires, se développent à partir du cambium et de l'assise subéro-phéllodermique pour permettre l'épaississement des tiges et des racines.

Dans ce chapitre, nous nous intéresserons tout particulièrement aux méristèmes primaires et, notamment, aux méristèmes apicaux en s'appuyant principalement sur l'exemple d'*Arabidopsis*.

III.A. Organisation tissulaire et cellulaire

III.A.1. Le méristème apical caulinaire

Une analyse cytologique et histologique de la composition du méristème permet de distinguer trois zones de structure et de fonction différentes (Fletcher, 2002) :

- Les cellules de la zone centrale forment un petit groupe de cellules élargies, hautement vacuolisées qui se trouvent à l'extrémité du méristème. Ces cellules forment un réservoir de cellules souches pluripotentes qui se divisent peu (comparé aux autres cellules du méristème),
- Les cellules de la zone périphérique qui sont petites et denses et qui se divisent fréquemment,
- Dans les couches plus internes du méristème se trouvent les cellules de la zone médullaire en forme de colonnes et possédant une large vacuole.

Au fur et à mesure que les cellules autour de la zone centrale se divisent, les cellules qui en dérivent se déplacent progressivement vers les flancs du méristème, dans la zone périphérique. Les cellules de la zone périphérique sont incorporées aux primordia foliaires ou permettent la formation de la région interne (**figure 32**).

Il existe également un autre niveau d'organisation du méristème qui permet de distinguer une couche de cellules épidermiques L1 et une couche de cellules sub-épidermiques L2 qui, ensemble forment la tunique. Chacune de ces couches n'est épaisse que d'une cellule qui se divise de manière anticlinale, perpendiculairement au plan du méristème. Sous ces épaisseurs de cellules se trouvent les cellules du corpus L3 qui se divisent dans tous les plans (Fletcher, 2002; Besnard et al., 2011).

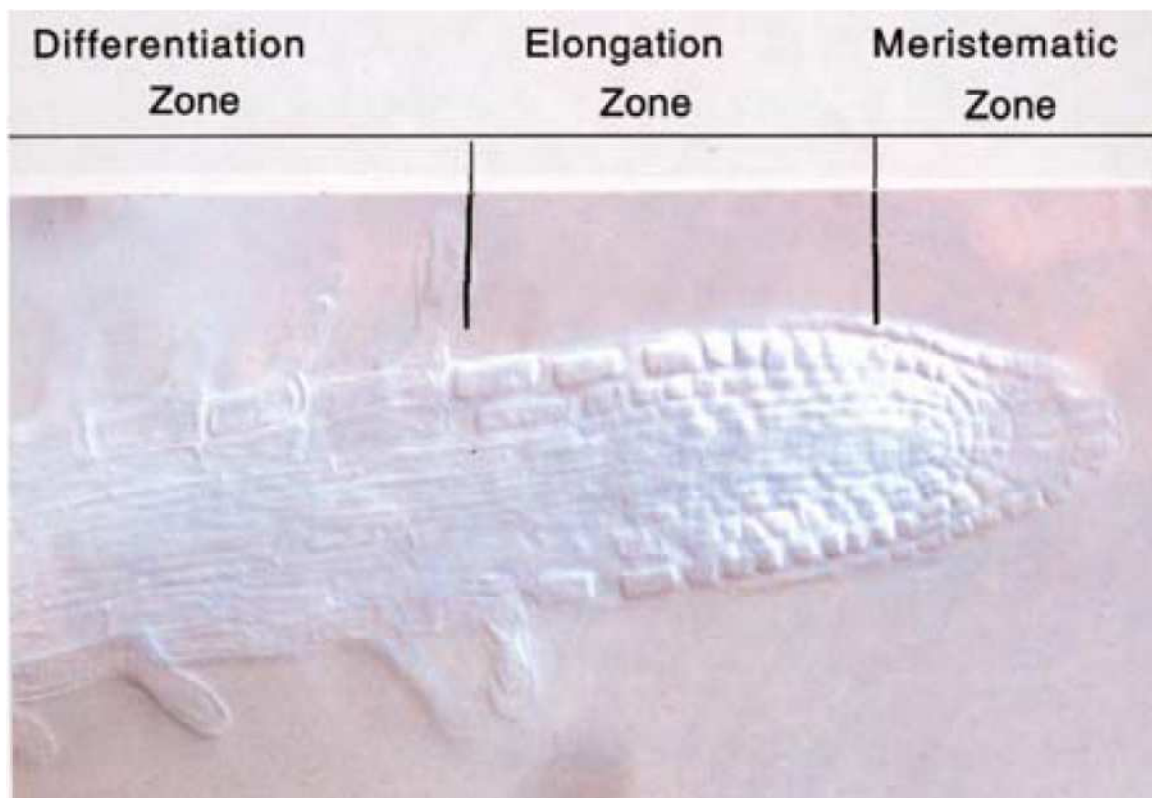


Figure 34 : Expansion cellulaire dans la racine. Dans la zone méristématique, les cellules sont généralement isodiamétriques. L'expansion radiale se termine et l'expansion longitudinale a lieu dans la zone d'élongation (Scheres et al., 2002).

III.A.2. Le méristème apical racinaire

D'un point de vue développemental, la racine d'*Arabidopsis* est un exemple de simplicité. Au niveau de l'extrémité de la pointe racinaire se trouve un petit groupe de cellules souches à l'origine de tous les types cellulaires racinaires qui se mettent en place par des divisions organisées suivies de phases de différenciation et d'expansion. On peut diviser les cellules qui composent ce petit groupe de cellules souches (ou initiales) en quatre types : (i) les initiales de l'épiderme de la coiffe racinaire latérale, (ii) les initiales de la columelle, (iii) les initiales du cortex et de l'endoderme et (iv) les initiales des tissus vasculaires et du péricycle. Entre toutes ces cellules initiales se trouvent un très petit groupe de cellules qui ne se divisent pas et sont décrites comme centre quiescent (**figure 33**) (Scheres et al., 2002).

La formation de la racine à partir de ces initiales se fait par une série de divisions cellulaires. Dans certains cas, les divisions cellulaires n'ont lieu que de manière anticlinales produisant une unique file de cellules clones de l'initiale (c'est notamment le cas de la columelle). Dans d'autres cas, on a tout d'abord une division anticlinale suivie d'une division périclinale, résultant en la formation de deux files cellulaires, voire plus (Scheres et al., 2002).

Ainsi, les cellules de la racine dérivent toutes d'un groupe de quelques cellules initiales qui doivent se diviser, d'allonger et se différencier pour produire les tissus fonctionnels de la racine. Ces différentes étapes se font selon une zonation très précise le long de la racine (**figure 34**). Au niveau de la pointe racinaire, les cellules sont produites par divisions cellulaires puis, lorsqu'elles sont à une certaine distance des initiales (cette distance dépend de l'âge de la racine et des conditions de culture), poussées par les autres cellules dérivant de la même initiale et produites après, les cellules commencent à subir une expansion anisotrope caractérisée par un allongement dans le sens de la racine. Enfin, lorsque la cellule est suffisamment allongée, on observe une différenciation qui permet à la cellule d'acquérir les fonctions qui sont nécessaires à sa bonne intégration dans un tissu fonctionnel. C'est à ce niveau qu'apparaissent les poils racinaires dans certaines files de cellules épidermiques dites trichoblastes (Tominaga-Wada et al., 2011).

III.B. Régulation moléculaire

La régulation moléculaire de l'organisation des méristèmes, bien mieux décrite dans le méristème apical caulinaire que dans le méristème racinaire, semble faire intervenir les mêmes familles de facteurs et des régulations similaires (Sablowski, 2011). Pour plus de clarté, je vais ici m'attarder à décrire le cas du méristème caulinaire.

Parmi les gènes les plus importants pour la mise en place et le maintien du méristème apical caulinaire, on trouve les gènes *STM* (Shoot Meristemless), *CLV3* (Clavata3) et *WUS* (Wuschel). Les études des mutants et des profils d'expression de ces différents gènes ont progressivement permis de comprendre le rôle qu'ils jouent dans l'organisation du méristème. Ceci a permis de proposer un modèle moléculaire du fonctionnement de cette voie.

Les trois gènes *CLAVATA* (*CLV1*, *CLV2* et *CLV3*) sont nécessaires pour réguler la taille du réservoir de cellules souches dans le méristème. Les mutants de perte de fonction de ces gènes forment des méristèmes élargis dès l'embryogenèse et cet élargissement est dû à un accroissement du nombre de cellules dans le méristème. Ainsi, les gènes *CLAVATA* sont impliqués dans la régulation du niveau auquel les cellules de la zone centrale opèrent leur transition du méristème en primordium foliaire (Fletcher, 2002). Au contraire, les gènes *WUSCHEL* (*WUS*), *SHOOT MERISTEM-LESS* (*STM*) et *ZWILLE* (*ZLL*) agissent en maintenant l'identité des cellules souches (Doerner, 2000).

WUS code une protéine à homéodomaine de la famille des *WOX* (Wuschel Homeobox) (van der Graaff et al., 2009) et est exprimé uniquement dans les cellules de la zone centrale. *CLV1* code un récepteur kinase et *CLV2* code un récepteur nécessaire pour stabiliser *CLV1*. *CLV3* code un petit peptide et est exprimé dans les cellules des couches cellulaires superficielles de la zone centrale. *CLV3* est sécrété depuis les cellules de l'extrémité et diffuse vers les cellules proches exprimant *CLV*, ce qui permet à *CLV3* de se fixer sur le récepteur *CLV1-CLV2*. Cette fixation entraîne la répression de l'expression de *WUS*. Il existe également une boucle de rétro-contrôle qui permet de maintenir une population stable de cellules souches et dans laquelle l'expression de *WUS* active l'expression de *CLV3* (Doerner, 2000).

Gene	Famille protéique	Fonction
CLV1	Récepteur kinase	Promotion de la différenciation
CLV2	Protéine « receptor-like »	Promotion de la différenciation ; d'autres fonctions
CLV3	Ligand sécrété	Promotion de la différenciation
WUS	Facteur de transcription à homéodomaine	Maintien et établissement des cellules souches
STM	Facteur de transcription à homéodomaine	Impliqué dans l'identité du méristème et la séparation des organes
KAPP	FHA/phosphatase	Régule négativement <i>CLV1</i>
ROP	Rho/Rac-GTPase	Composant potentiel du complexe CLV1 actif
PAN	Facteur de transcription B-zip	Régule le nombre d'organes dans la fleur
CUC1	Inconnu	Promotion de la séparation des organes
CUC2	Facteur de transcription NAC	Promotion de la séparation des organes
PHAN	Facteur de transcription MYB	Etabli la polarité dans les primordia foliaire
RS2	Facteur de transcription MYB	Promotion de la différenciation des primordia foliaires
AGO1	-	Impliqué dans la polarité des organes. D'autres fonctions
ZLL	-	Impliqué dans la polarité des organes. D'autres fonctions
CRC	Facteur de transcription YABBY	Polarité des carpelles
FIL	Facteur de transcription YABBY	Polarité des organes ; développement de la fleur
REV	HD-zip de classe III	Polarité des organes ; développement des méristèmes latéraux et du système vasculaire

Tableau 3 : Gènes impliqués dans la signalisation au niveau du méristème (Clark, 2001b)

La perte de l'expression de *STM* entraîne l'apparition ectopique de feuilles dans toutes les régions du méristème, y compris au niveau des cellules souches. La surexpression de *STM* provoque l'apparition de méristèmes ectopiques sur la face adaxiale des feuilles. Tout ceci suggère que *STM* pourrait agir dans le maintien des cellules à un état non différencié. Le double mutant *clv-stm* présente un phénotype additif, montrant ainsi que ces gènes agissent dans des voies différentes mais le rôle précis de *STM* reste flou, ce qui est largement compliqué par les multiples rôles de *STM* (Clark, 2001b).

De manière intéressante, il est à noter que la régulation de *WUS* et *STM* fait intervenir des facteurs de remodelage chromatinien. Ainsi, la répression de l'expression de *WUS* en dehors de son domaine normal d'expression est régulée par le facteur d'assemblage chromatinien CAF-1 (Ono et al., 2006).

Je n'ai présenté ici qu'un aperçu sommaire des principaux facteurs influençant l'organisation et le maintien des cellules souches dans le méristème apical caulinaire mais bien d'autres facteurs (**tableau 3**) ont maintenant été décrits comme intervenant dans cette voie. Leur rôle n'est pas toujours très clair et leur régulation reste parfois à élucider (Clark, 2001a).

III.C. Rôle des hormones dans la structure et l'identité cellulaire au sein du méristème

L'identité des cellules au sein du méristème dépend, d'une part, de son profil d'expression et, d'autre part, de la présence de certaines hormones. En effet, les hormones ne sont pas réparties de manière homogène à l'intérieur du méristème et interviennent dans la régulation de l'expression de certains gènes importants pour l'identité des cellules du méristème. Ces mêmes gènes interviennent également dans la régulation de la voie de biosynthèse et/ou de dégradation de ces mêmes hormones.

Les hormones les plus importantes au sein du méristème sont les auxines, les cytokinines et les gibbérellines.

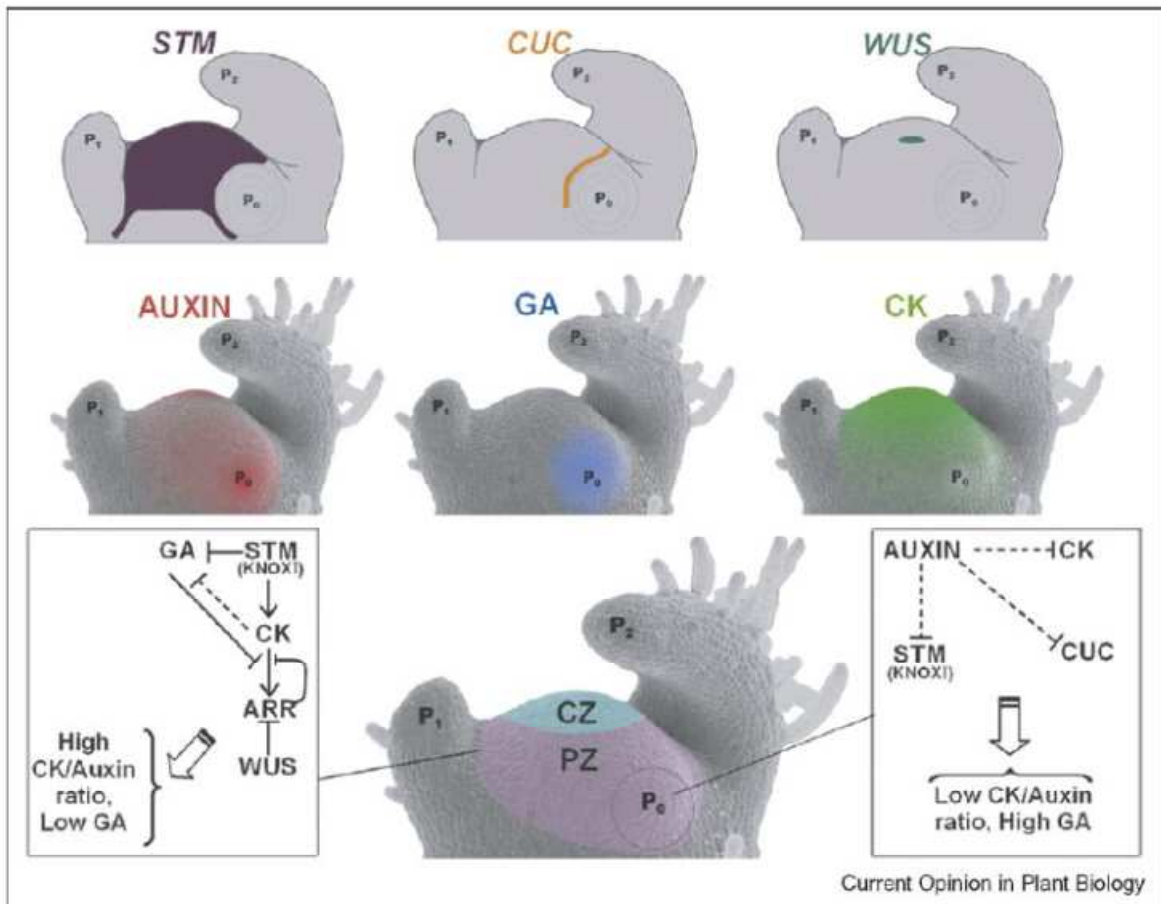


Figure 35 : Interaction entre les hormones et les facteurs de transcription au niveau du méristème apical caulinaire: en haut : profil d'expression des gènes *STM*, *CUC* et *WUS* ; au milieu, distribution des auxines, gibbérellines et cytokinines au sein du méristème ; en bas : modèle de la régulation croisée entre les phytohormones et les gènes d'identité méristématique (Shani et al., 2006)

III.C.1. Répartition hétérogène des hormones dans le méristème

Les cytokinines sont des régulateurs positifs de la division cellulaire. En tant que tel, on les retrouve en abondance dans toutes les cellules en division active et elles permettent de maintenir une population stable de cellules en cours de division (Shani et al., 2006). La réduction des quantités de cytokinines au sein du méristème par des approches de biologie moléculaire réduit la taille du méristème et cause même, parfois, des avortements du méristème (Werner et al., 2003) (**figure 35**).

Les gibbérellines influencent de nombreux processus développementaux chez les plantes, ce qui inclut la morphogenèse et l'initiation foliaire. La restriction spatiale de l'accumulation des gibbérellines est essentielle pour la délimitation de la frontière entre le méristème et les primordia foliaires (Shani et al., 2006). D'une certaine manière, la régulation spatiale des gibbérellines peut être liée à celle des auxines avec des niveaux élevés dans les feuilles en développement où elles contribuent à l'expansion polaire associée à la croissance. En revanche, on en retrouve beaucoup moins dans les régions plus centrales du méristème (Veit, 2009). La localisation exacte des auxines au sein du méristème reste néanmoins peu claire étant donné que les activités DR5:GFP et DR5:GUS sont très faibles au niveau de la zone centrale, ce qui pourrait expliquer l'absence de formation d'organes à partir de cette zone. Néanmoins, la distribution presque aléatoire des protéines PIN dans le méristème suggère que les auxines devraient être présentes aussi bien dans les zones périphérique que dans la zone centrale. Ceci suggère donc que les auxines pourraient être présentes dans la zone centrale mais ne seraient pas capables d'induire l'initiation foliaire, ni d'activer le promoteur DR5 ; cette hypothèse est renforcée par le fait que l'apport exogène d'auxine directement sur la zone centrale n'entraîne aucune réponse alors que l'application sur la zone périphérique adjacente entraîne une forte organogenèse (pour revue, Veit, 2009).

III.C.2. Les phytohormones : des acteurs majeurs de l'organisation du méristème

Les phytohormones sont connues pour leur rôle dans la régulation de l'organogenèse, de la détermination de l'identité cellulaire et de la différenciation ainsi que dans les divisions

cellulaires. Ceci, couplé au fait que leur répartition n'est pas homogène au sein du méristème, suggère la présence de mécanismes permettant une étroite régulation de leur biosynthèse et/ou de leur dégradation et/ou de leur inactivation.

Plusieurs études ont permis de mettre en évidence ces mécanismes et de montrer l'importance des hormones dans la régulation de l'expression des gènes d'identité méristématique et, inversement, de montrer l'importance de ces gènes d'identité méristématique dans la localisation des phytohormones par la régulation des gènes de biosynthèse et de dégradation. Ainsi, Jasinski et al. (2005) ont montré que, en plus du rôle qu'ils jouent dans la répression de la biosynthèse des gibbérellines (Sakamoto et al., 2001; Chen et al., 2004), les facteurs de transcription KNOX de classe I (donc *STM*) agissent également en activant l'expression des gènes de biosynthèse des cytokinines. Il a également été montré que *WUS* intervient directement dans la répression de l'expression des gènes *ARR* (*Arabidopsis* Response Regulateur) de type A, connus pour être induits transcriptionnellement en réponse à l'apport de cytokinines (Leibfried et al., 2005; Sablowski, 2009). L'auxine est également impliquée dans la régulation de l'organisation du méristème et il a été montré que le gène *MP* (*Monopteros*), qui est activé par les auxines, réprime directement les facteurs de réponse aux cytokinines *ARR7* et *ARR15* ce qui, en retour, active au moins partiellement *CLV3* (Zhao et al., 2010; Sablowski, 2011).

IV. MON PROJET DE THESE

Comme nous l'avons vu au cours des chapitres précédents, nos connaissances sur la voie de signalisation de TOR chez les végétaux se sont largement étendues ces dernières années. Néanmoins, de nombreux points d'interrogation subsistent concernant la régulation de TOR et les voies régulées par TOR chez les plantes (**figure 24**). C'est dans ce contexte que s'inscrit ma thèse qui vise à mieux comprendre les mécanismes qui se trouvent en aval de TOR.

Au cours de l'introduction, j'ai insisté sur l'importance de la traduction protéique et de sa régulation par TOR. Ce contrôle de la traduction semble bien conservé et il a également été observé des différences dans le profil de polysomes lors de l'inactivation de TOR (Deprost et al., 2007; Sormani et al., 2007) et ce, malgré l'absence de la protéine 4E-BP. Une

partie de mon travail a donc porté sur l'étude de l'impact de l'inactivation de TOR sur la composition et la phosphorylation du ribosome afin de mettre en évidence de nouvelles cibles de TOR dans ce compartiment. En effet, le ribosome est une particule facile à purifier du fait de sa masse élevée et de sa grande abondance et on peut s'attendre à trouver des cibles de TOR dans les protéines qui le constituent.

Par ailleurs, nous avons vu au cours du chapitre III que le méristème est une structure extrêmement importante dans l'organogenèse chez les plantes. Ainsi, les méristèmes sont à l'origine de l'apparition de nouveaux organes par un contrôle étroit de la prolifération, de l'élongation et de la différenciation cellulaires. Etant donné le rôle central de cette structure et le rôle central de la protéine TOR, une hypothèse a émergé dans laquelle TOR pourrait être impliqué, au moins indirectement, dans l'organisation du méristème. La deuxième partie de ma thèse a donc porté sur l'élucidation de ce lien entre TOR et le méristème. Etant donné que le méristème est une structure purement végétale, la mise en évidence de l'existence d'un tel lien permettrait de révéler des cibles de TOR qui seraient spécifiques des plantes.

Résultats

I. TOR ET LE CONTROLE DE LA COMPOSITION DU RIBOSOME

L'objectif de cette partie de ma thèse était de chercher de nouvelles cibles de TOR dans un compartiment cellulaire nécessaire à la traduction, le ribosome, par une approche protéomique d'identification des protéines et des phosphorylations qu'elles contiennent par LC-MS/MS sur des ribosomes purifiés. En effet, il a été montré chez les mammifères, que TOR contrôle la synthèse et le fonctionnement des ribosomes. Le but de cette partie est donc d'identifier des cibles spécifiques de TOR chez les plantes au sein de cette fraction cellulaire, abondante dans la cellule et facile à purifier en raison de sa taille importante.

I.A. Préambule

Chez les plantes, assez peu de choses sont connues sur la voie de signalisation de TOR et on manque notamment d'informations sur les cibles moléculaires de la kinase TOR et de ses protéines partenaires. En effet, depuis plusieurs années, des efforts ont été fournis dans le but de mettre en évidence les grandes voies métaboliques régulées par TOR mais les cibles moléculaires de cette régulation n'ont pas encore été élucidées. Cependant, deux cibles majeures et directes du complexe TOR ont été décrites chez les plantes : les protéines S6 kinases (Mahfouz et al., 2006; Otterhag et al., 2006) et la protéine TAP46 (Ahn et al., 2011). Ainsi, il a été montré l'existence d'un lien entre la voie de signalisation de TOR et la croissance des plantes, le rendement et la résistance au stress osmotique (Deprost et al., 2007), la sénescence et la régulation des gènes impliqués dans la sénescence foliaire et la remobilisation des nutriments, comme la glutamine synthétase ou la glutamate déshydrogénase (Deprost et al., 2007; Dobrenel et al., 2011), le développement de la paroi cellulaire (Leiber et al., 2010), l'autophagie (Liu and Bassham, 2010), l'accumulation des sucres solubles, des acides aminés et de l'amidon (Dobrenel et al., 2011), des perturbations au niveau du profil transcriptomique avec, notamment, une induction des gènes impliqués dans la réponse aux stress et une répression des gènes liés aux modifications de la paroi cellulaire et de la voie de signalisation des phytohormones comme les auxines et les gibbérellines (Dobrenel et al., 2011). Enfin, il a également été montré qu'une diminution de

l'activité TOR chez les plantes entraîne un défaut d'accumulation de polysomes (Deprost et al., 2007; Sormani et al., 2007) et de réinitiation traductionnelle sur l'ARN du CaMV (Schepetilnikov et al., 2011).

Afin de mieux décrire les cibles moléculaires impliquées dans la voie de signalisation de TOR, nous avons mis en place une approche de protéomique et de phosphoprotéomique, ce qui permet, par ailleurs, de compléter les données de transcriptomique, traductomique et métabolomique déjà obtenues au préalable au sein du laboratoire. Néanmoins, afin de simplifier l'analyse des données, nous avons préféré travailler sur des organites purifiés plutôt que sur des plantules entières. Etant donnée l'importance de la régulation de la traduction dans la voie de signalisation de TOR chez les mammifères et le défaut d'accumulation des polysomes en réponse à l'inactivation de TOR chez les plantes, nous avons choisi de travailler sur cette particule. Qui plus est, il a déjà été rapporté chez les plantes que la S6 kinase, cible directe de TOR, est capable de phosphoryler *in vitro* et *in vivo* la protéine ribosomale RPS6 (Turck et al., 1998). Ce dernier élément constitue un point de départ important puisque le premier enjeu de l'approche que nous avons utilisé était de confirmer le lien entre TOR et le niveau de phosphorylation de la RPS6 *in planta*.

Néanmoins, une telle approche de purification des ribosomes n'ayant pas encore été réalisée au sein du laboratoire, elle a demandé une étape de mise au point avant de pouvoir réaliser les analyses elles-mêmes.

I.B. Mise au point du protocole

Plusieurs articles ont déjà décrit des protocoles de purification du ribosome utilisant, pour la plupart, la grande densité des particules ribosomales. Ces protocoles séparent les ribosomes des autres protéines végétales en procédant à une ultracentrifugation sur un coussin de saccharose mais, pour permettre un enrichissement convenable, nécessitent une grande quantité de matière fraîche. Ainsi, Giavalisco et al. (2005) procèdent à partir de 500 g de feuilles de rosettes d'*Arabidopsis*, Carroll et al. (2008) de 100 g de cultures cellulaires d'*Arabidopsis*, Chang et al. (2005) de 10 g de matière fraîche, Hummel et al. (2012) de plusieurs feuilles de rosettes d'*Arabidopsis* et Szick-Miranda et Bailey-Serres (2001) de 1 à 10 g de tissu de maïs. Quelques protocoles, en revanche, permettent une extraction à

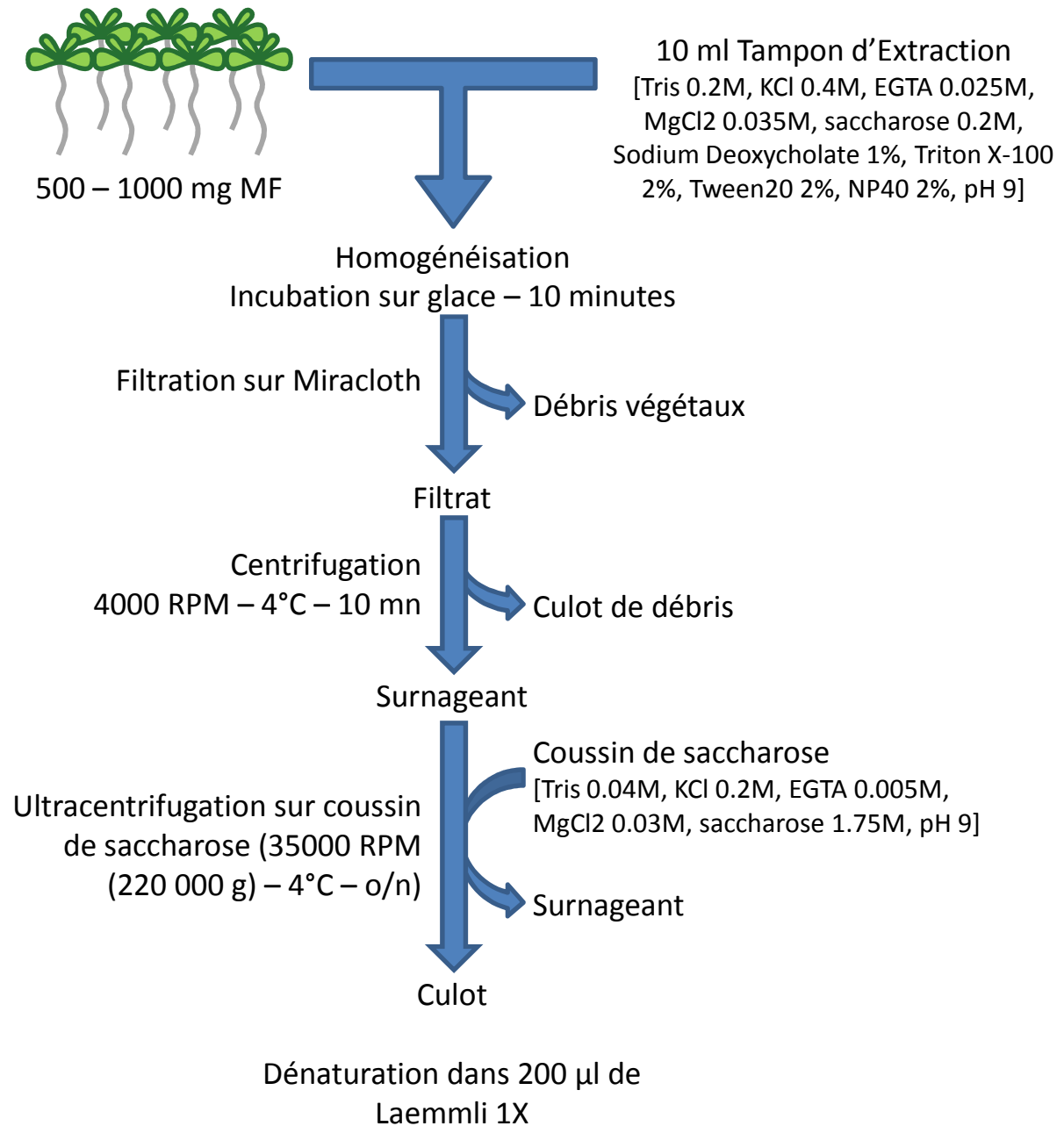


Figure 36 : Protocole d'extraction et purification des ribosomes tel qu'il a été utilisé sur les plantules d'Arabidopsis

partir de quelques grammes de racines de plantules de maïs (Bailey-Serres and Freeling, 1990; Williams et al., 2003) et c'est à partir de ces articles que j'ai basé la mise au point de mon protocole.

Dans ces deux protocoles, l'extraction se fait par incubation de la poudre obtenue par broyage des tissus à l'azote liquide dans un tampon neutre ou basique contenant une grande quantité de sels et de détergents non-ioniques. Ensuite les débris cellulaires sont éliminés par filtration et centrifugation pendant un temps court. Les ribosomes sont alors séparés des autres protéines au cours d'une étape d'ultracentrifugation longue sur un coussin fortement concentrée en saccharose (1.75 M et 1.3 M respectivement). En fin d'ultracentrifugation, après élimination du surnageant et du coussin, les protéines du culot sont récupérées dans un tampon de resuspension de composition différente.

I.B.1. Essai sur des rosettes

Afin de mettre au point les premières étapes de purification des ribosomes ainsi que les étapes de visualisation sur gel, j'ai préféré commencer en utilisant du matériel disponible en grande quantité. Ainsi, j'ai utilisé des rosettes de plantes sauvages de l'accession Columbia cultivées sur sable pendant 50 jours. Ces rosettes ont été fournies par Fabien Chardon et Rodney Sormani.

Une rosette de plante cultivée sur 10 mM de nitrates et 6 rosettes de plantes cultivées sur 2 mM de nitrates ont d'abord été broyées dans l'azote liquide au mortier et au pilon puis homogénéisées dans un tampon d'extraction salin contenant divers détergents non ioniques comme le désoxycholate de sodium, le triton, le tween et le nonidet (**figure 36**) (voir Partie Matériel et Méthodes). Après filtration et centrifugation pendant 10 minutes à 4000 RPM et 4°C, les échantillons sont déposés sur un coussin de saccharose contenant près de 60 % (m/v) de saccharose. J'ai d'abord tenté de mener l'ultracentrifugation à 32 300 RPM pendant 3h30. Pour la suite de cette partie, nous appellerons « fraction ribosomale » la fraction obtenue après ultracentrifugation et élimination du coussin de saccharose. Cette fraction ribosomale a donc été resuspendue dans 1ml de tampon de resuspension (voir composition dans le Matériel et Méthodes).

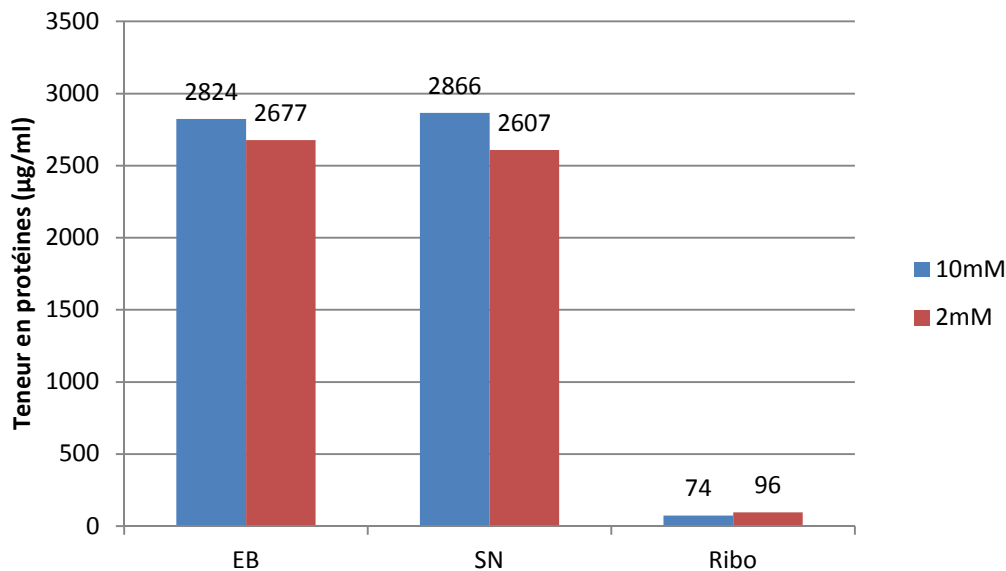


Figure 37 : Concentration protéique dans les différentes fractions obtenues lors de la purification de ribosomes de rosettes d'Arabidopsis : Les ribosomes sont purifiés à partir de rosettes de plantes cultivées sur deux nutriments azotés (2 mM et 10 mM de nitrates) à travers une ultracentrifugation de 3h30 sur un coussin de saccharose (voir Matériel et Méthodes). Les différentes fractions sont l'extrait brut obtenu avant ultracentrifugation (EB), le surnageant obtenu après ultracentrifugation (SN) et la fraction ribosomale (Ribo) passée à travers le coussin de saccharose. La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Bradford.

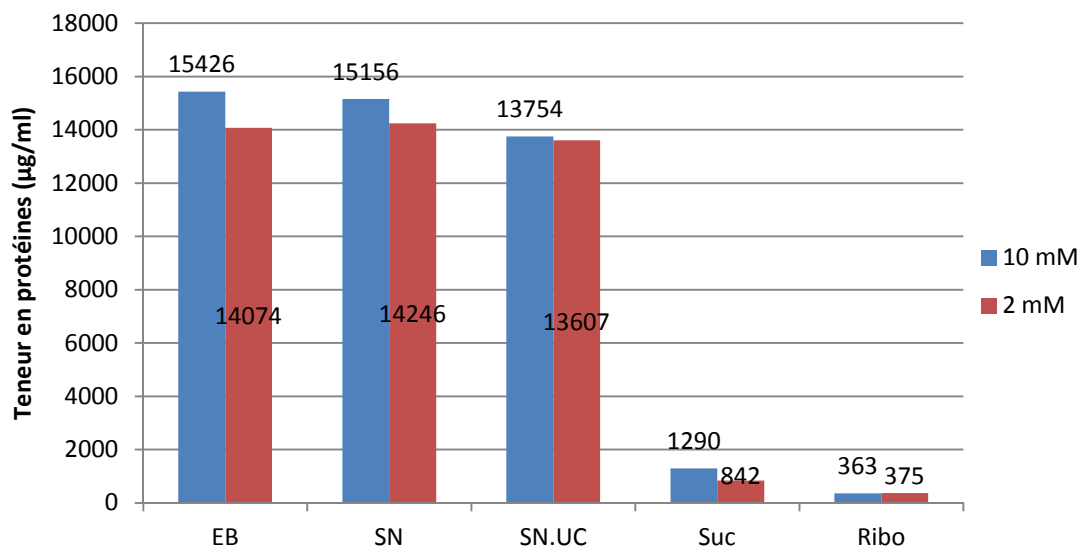


Figure 38 : Concentration protéique dans les différentes fractions obtenues lors de la purification de ribosomes de rosettes d'Arabidopsis après une ultracentrifugation de toute une nuit : Les ribosomes sont purifiés à partir de rosettes de plantes cultivées sur deux nutriments azotés (2 mM et 10 mM de nitrates) à travers une ultracentrifugation de 14h sur un coussin de saccharose (voir Matériel et Méthodes). Les différentes fractions sont l'extrait brut obtenu avant ultracentrifugation (EB), le surnageant obtenu après centrifugation (SN), le surnageant obtenu après ultracentrifugation (SN.UC), le contenu du coussin de saccharose (Suc) et la fraction ribosomale (Ribo) passée à travers le coussin de saccharose. La teneur en protéines est déterminée par la méthode de Bradford.

Malheureusement, un tel protocole n'a pas permis de mettre en évidence la présence de protéines par migration des protéines de la fraction ribosomale sur un gel de SDS-PAGE. La quantification des protéines dans les différentes fractions par la méthode de Bradford révèle en effet que la fraction ribosomale contient peu de protéines (**figure 37**).

J'ai donc choisi d'incuber les échantillons pendant 10 minutes dans le tampon d'extraction refroidi sur la glace avant l'élimination des débris cellulaires et de prolonger l'ultracentrifugation sur la nuit. Au cours de ces étapes de mise au point, j'ai pu voir, comme précédemment, que la quantité de protéines après l'étape d'ultracentrifugation est très faible par rapport à la quantité de protéines présentes dans le tampon d'extraction (**figure 38**). Afin de vérifier le profil des protéines ainsi purifiées, j'ai précipité les protéines contenues dans 500µl de tampon de resuspension à l'acide trichloracétique et à l'acétone puis j'ai repris ce culot protéique dans 30 µl de tampon de resuspension. J'ai quantifié leur teneur en protéines par la méthode de Bradford et la méthode décrite par Turkina et al. (2011) (qui repose sur la mesure directe d'absorbance à 260 nm) (**tableau 4**)

	2 mM	10 mM
Méthode de Bradford (µg/ml)	357	100
Mesure à 260 nm (µg/ml)	546	381

Tableau 4 : Concentration protéique dans les échantillons de la fraction ribosomale déposés sur gel de polyacrylamide

On constate tout d'abord que les concentrations avant et après la précipitation à l'acétone et à l'acide trichloracétique ne concordent pas. Ainsi, alors que la concentration avoisine les 300 µg/ml après précipitation, elle devrait être proche de 18 µg/ml avant, étant donné le facteur de concentration appliqué. Or nous avons une concentration de comprise entre 350 et 400 µg/ml. Ceci suggère que, soit nous avons perdu beaucoup de protéines lors de la précipitation, soit la première quantification avant précipitation était surévaluée (par exemple à cause de la présence de molécules interagissant avec le réactif de Bradford). Afin de vérifier que cet écart n'est pas dû à la précipitation, j'ai quantifié les protéines de la fraction ribosomale avant précipitation par la méthode à 260 nm. J'ai alors trouvé une concentration de 40.32 µg/ml pour l'échantillon cultivé sur 10 mM de nitrates et 46.80 µg/ml pour celui cultivé sur 2 mM. Ces derniers résultats montrent certes qu'une partie des protéines a été perdue au cours de la précipitation mais montrent surtout que la

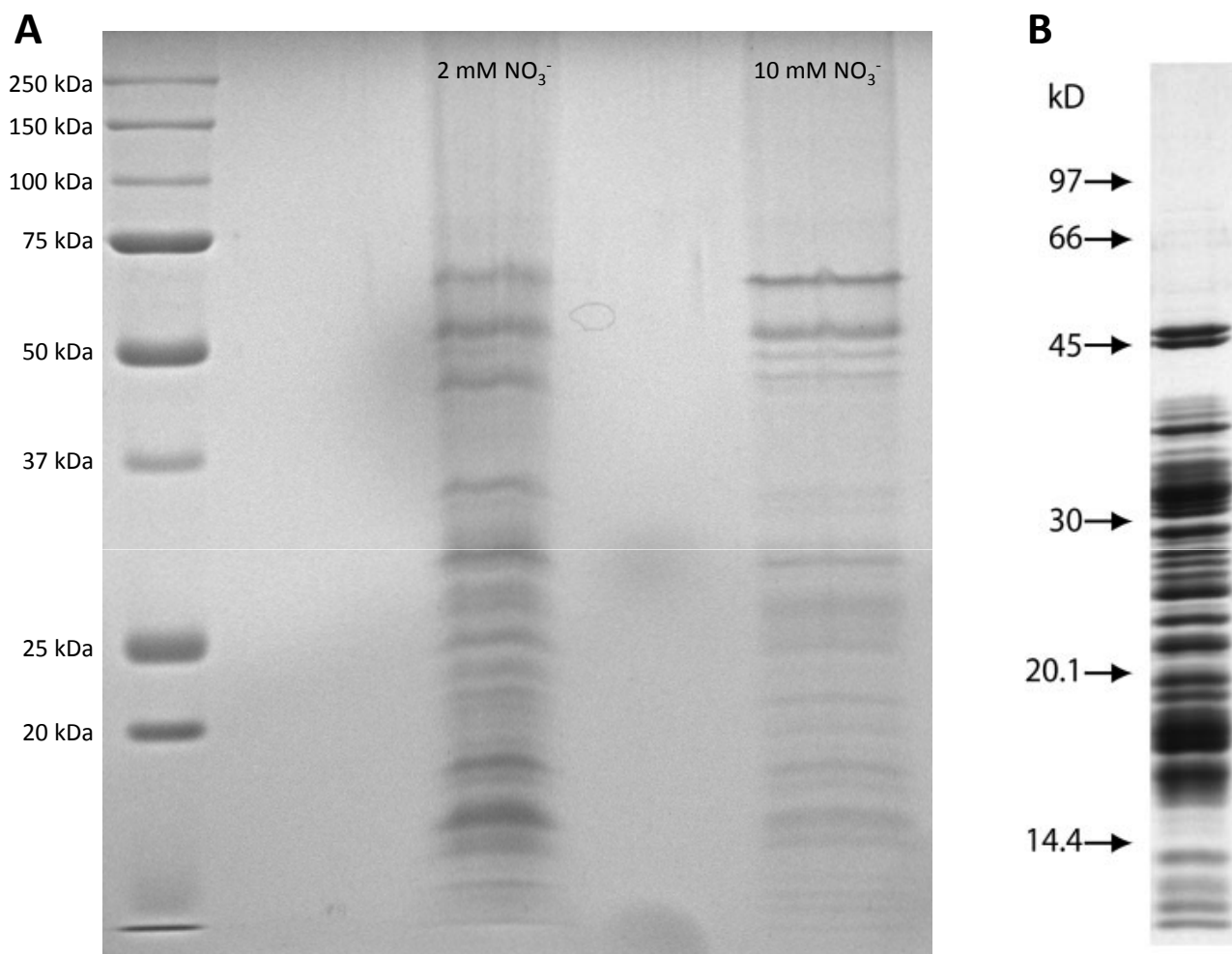


Figure 39 : Profil des protéines ribosomales de plantes cultivées sur 2 et 10 mM de nitrates : (A) Les ribosomes sont purifiés à partir de rosettes de plantes d'*Arabidopsis* de type sauvage Col-0 de 50 jours cultivées sur du sable en jours courts et alimentées avec deux nutrition azotées différentes (une nutrition limitante (2 mM de nitrates) et une nutrition pléthorique (10 mM de nitrates)). Après purification, les particules ribosomales ont été dénaturées dans du Laemmli à 100°C pendant 10 minutes puis déposées sur un gel de SDS-PAGE (5% gel de concentration – 15% gel de séparation). La révélation est réalisée par coloration au bleu de Coomassie. Les plantes ont été fournies par Fabien Chardon et l'analyse a été réalisée avec Rodnay Sormani. (B) Profil des protéines ribosomales purifiées par Carroll et al. (2008) à partir de suspensions cellulaires d'*Arabidopsis* par une succession de centrifugations et d'ultracentrifugations sur des coussins de saccharose.

méthode de Bradford avait fortement surévalué la teneur en protéines dans les échantillons de la fraction ribosomale.

J'ai alors fait migrer les protéines obtenues après précipitation sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (**figure 39**). Je suis alors parvenu à révéler le profil des protéines contenues dans cette fraction. Le profil obtenu montre, comme chez Carroll et al. (2008) et Chang et al. (2005), que les fractions ribosomales sont composées de protéines de moyenne et de petite taille (inférieure à 70 kDa).

I.B.2. Mise au point sur plantules

I.B.2.a. Protocole de culture

Toutes ces analyses ont mis en évidence l'importance de disposer d'une grande quantité de matière fraîche de plantes afin de pouvoir visualiser les protéines sur gel. Néanmoins, le protocole d'inactivation de TOR que j'ai utilisé pour ces analyses est le même que celui utilisé et décrit précédemment au sein du laboratoire et pour lequel un grand nombre de données a déjà été obtenu (Deprost et al., 2007; Moreau, 2009). J'ai donc utilisé deux lignées (5.2 et 6.3) exprimant un ARN interférant dirigé contre TOR et placé sous le contrôle du système fongique inductible à l'éthanol faisant intervenir le facteur de transcription AlcR (actif en présence d'éthanol) et le promoteur AlcA (activé par l'action du facteur AlcR) (**figure 11B**). Etant donné que la présence de ces deux constructions (p35S:AlcR d'une part et pAlcA:TOR RNAi d'autre part), j'ai utilisé, comme contrôle, des plantes exprimant également le facteur AlcR et exprimant le gène rapporteur GUS sous le contrôle du promoteur AlcA (voir Matériel et Méthodes pour plus de détails). Ces plantes sont appelées « Contrôle GUS » dans la suite de ce chapitre. Puisque plusieurs données ont déjà été obtenues avec ce matériel, je me suis placé dans les mêmes conditions que celles utilisées précédemment par Dorothee Deprost et/ou Manon Moreau (ibid.) c'est-à-dire sur des plantules *in vitro* cultivées pendant 7 jours en absence d'éthanol puis l'induction a été faite par ajout d'éthanol dans le milieu à une concentration finale de 100 mM et une culture sur ce milieu pendant 3 jours. En effet, Manon Moreau a montré dans sa thèse que, en milieu solide, une telle concentration et une telle durée permettent une inactivation irréversible de TOR.

	M1	M2	M3	M4
Milieu de culture	MS1/5 + sac 0.3%	MS1/5 – sac 0%	MS1/5 + sac 0.3% Agar 0.7%	MS1/5 + sac 0.3% Agar 0.7%
	liquide	liquide	solide	solide
Conditions de culture	Jour : 10h/14h 20°C cst Rotation 75 RPM HR = 75%	Jour : 10h/14h 20°C cst Rotation 75 RPM HR = 75%	Jour : 16h/8h 25°C cst 80-90 µE	Jour : 16h/8h 25°C cst 80-90 µE
Précipitation à l'acétone / TCA	oui	oui	oui	oui

Tableau 5 : Résumé des conditions de culture des expériences M1, M2, M3 et M4 : MS = Murashige & Skoog, Sac = saccharose, cst = constant, HR = humidité relative, TCA = acide trichloracétique, µE = microeinstein.

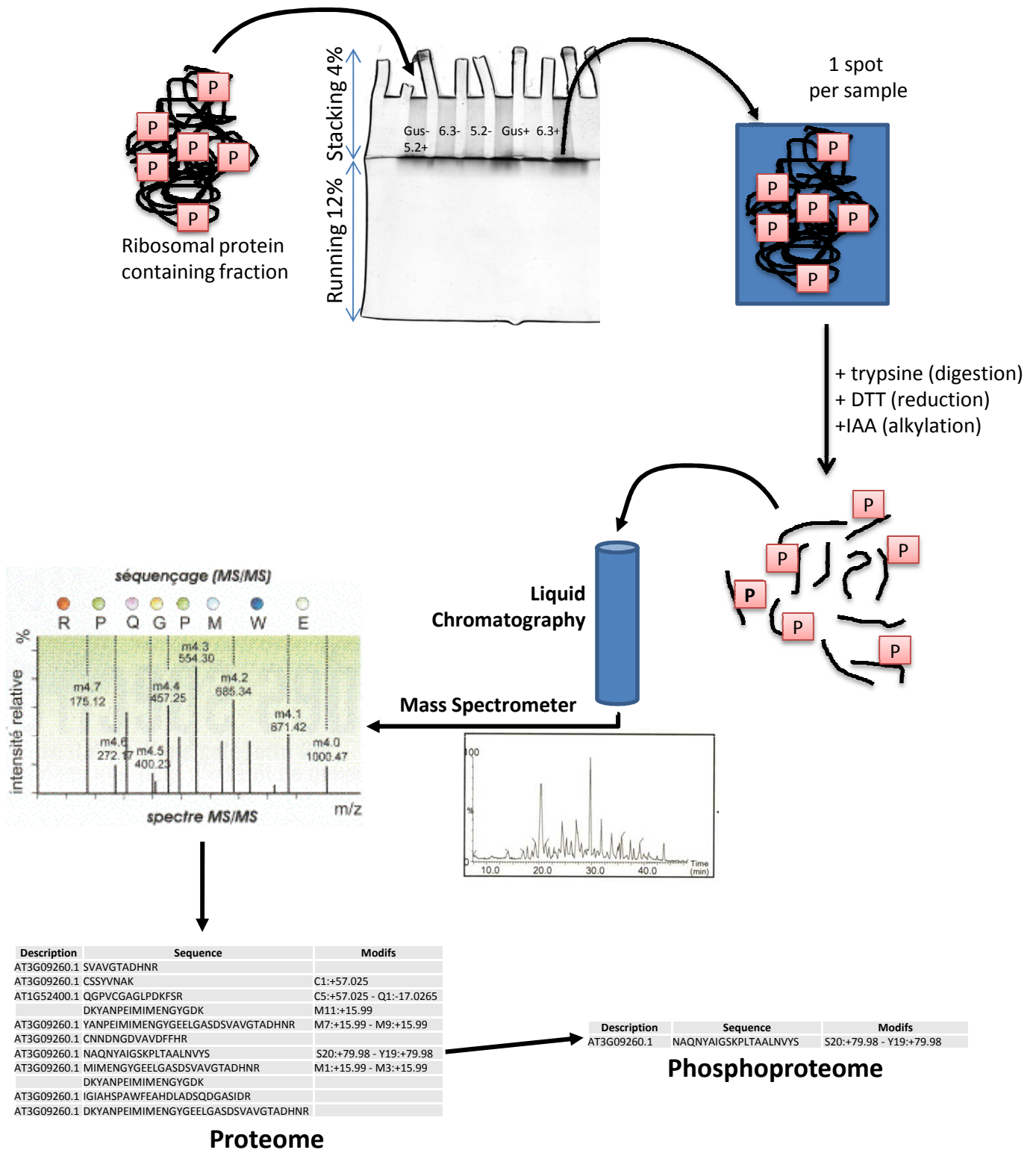


Figure 40 : Principe de l'identification en protéomique par une approche de LC-MS/MS : La fraction ribosomale est d'abord soumise à une migration courte de 1 à 2 mm à travers un gel de SDS-PAGE puis l'unique bande est découpé et soumise à une digestion trypsique (ou trypsinolyse), une réduction au dithiothréitol et une alkylation à l'iodoacétamide. Les peptides ainsi obtenus (phosphorylés ou non) sont séparés par chromatographie liquide puis les peptides élués sont analysés par deux événements de spectrométrie de masse successifs. On obtient alors, pour chaque échantillon, une liste des peptides présents dans l'échantillon avec leurs modifications post-traductionnelles.

Etant données les conditions expérimentales choisies et la nécessité de disposer d'une grande quantité de matière fraîche, j'ai donc décidé de procéder à des cultures de plantules en fioles d'Erlenmeyer dans un milieu liquide. Ce système permet en effet d'obtenir rapidement une grande quantité de biomasse végétale. Malheureusement, des problèmes de contamination fongique à répétition dans mes fioles d'Erlenmeyer ne m'ont pas permis de répéter cette expérience et j'ai dû poursuivre les expériences en milieu solide (voir partie I.D.1 : Caractéristiques de ces expériences, page 63).

La culture est menée sur du milieu Murashige & Skoog 20 % complétement de saccharose à une concentration finale de 0,3 % (m/v) et additionné ou non d'agar à une concentration finale de 0,7 % (voir Matériel et Méthodes). L'induction est menée, dans le cas des cultures liquide, par ajout d'éthanol dans le milieu de culture à une concentration finale de 100 mM et, dans le cas des cultures solides, par ajout de trois bouchons dans la boîte contenant chacun 200 µl d'éthanol 5 % (**tableau 5**).

I.B.2.b. Purification des ribosomes

Les ribosomes sont ensuite purifiés selon le protocole mis au point pour les rosettes et décrit précédemment (**figure 36**). Après l'ultracentrifugation et l'élimination du surnageant et du coussin de saccharose, les protéines ainsi culotées sont reprises dans un tampon de resuspension (voir Matériel et Méthodes). Les protéines ont ensuite été précipitées par ajout d'acide trichloracétique et d'acétone puis les culots secs de protéines ont été conservés à -80°C. Le contenu de ces culots protéiques a alors été analysé par l'équipe de Michel Zivy à la plateforme de protéomique PAPPSO (Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest) du Moulon en collaboration avec Benoit Valot et Marlène Davanture.

I.B.2.c. Analyse par la plateforme de protéomique

Le protocole utilisé pour ces analyses est développé dans la partie Matériel et Méthodes. Néanmoins, il faut préciser que, en amont, quelques mises au point ont été réalisées afin de s'assurer que les conditions analytiques permettaient d'obtenir la meilleure profondeur possible étant donnée la qualité et le contenu des échantillons (**figure 40**).

Afin de mettre au point le protocole analytique utilisé pour l'identification du contenu protéique de nos échantillons, nous avons comparé différentes conditions avec les

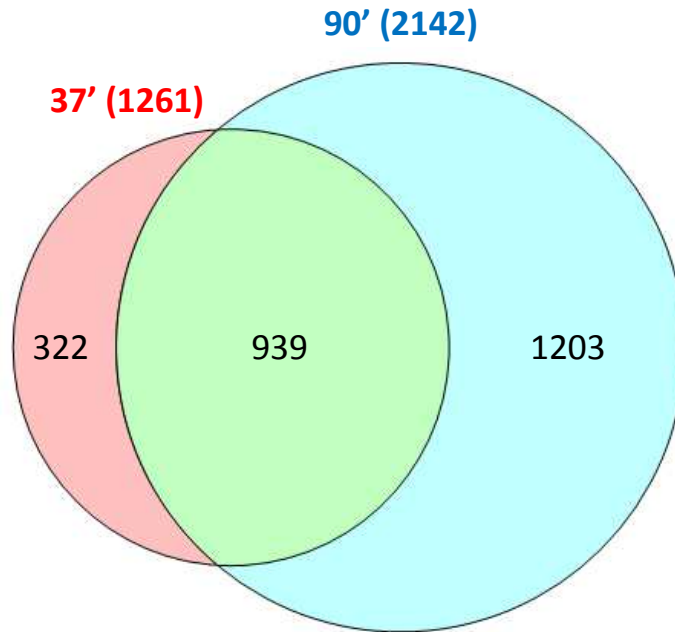


Figure 41 : Comparaison du nombre de peptides uniques identifiés par LC-MS/MS lors d'une séparation par chromatographie liquide de 37 minutes ou de 90 minutes sur les échantillons de la première répétition.

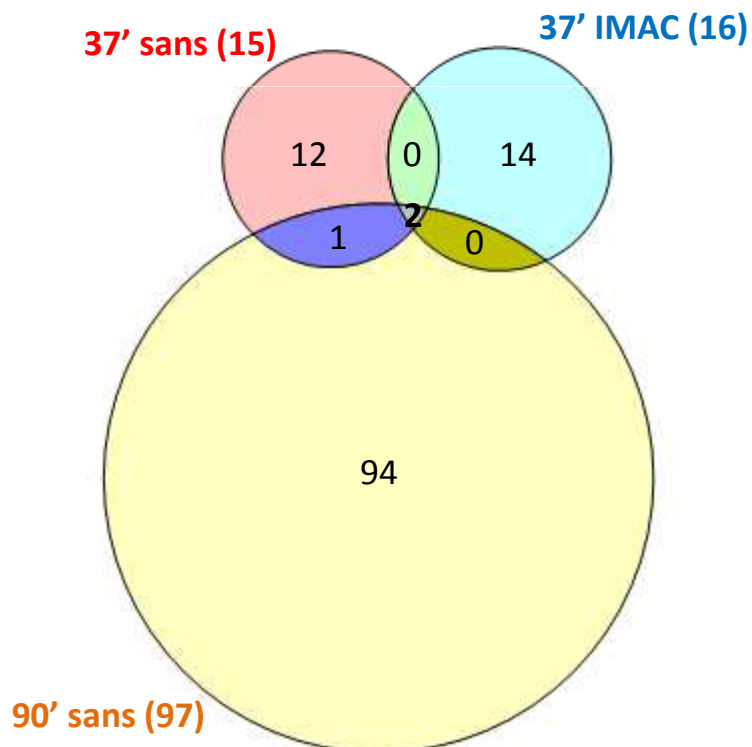


Figure 42 : Comparaison du nombre de peptides uniques phosphorylés identifiés par LC-MS/MS lors d'une séparation par chromatographie liquide de 37 minutes sans enrichissement IMAC (37' sans) ou après un enrichissement IMAC (37' IMAC) ou de 90 minutes (90' sans) sur les échantillons de la première répétition.

échantillons de la première répétition (ci-après dénommée M1). Une de ces comparaisons portait sur la durée de la séparation en chromatographie liquide avant l'analyse en spectrométrie de masse. Nous avons procédé à une migration de 37 minutes et une autre de 90 minutes (**figure 41**). On constate ainsi qu'une séparation par chromatographie liquide de 90 minutes permet d'identifier près de deux fois plus de peptides et que 75% des peptides identifiés au cours d'une séparation de 37 minutes le sont également après 90 minutes de séparation. Nous avons donc choisi de procéder à une séparation de 90 minutes pour le reste des analyses.

Lorsque le nombre de peptides phosphorylés est élevé dans un échantillon, il est conseillé de procéder à un enrichissement de ceux-ci par séparation sur une colonne IMAC (Immobilized metal affinity chromatography) qui retient les formes phosphorylées. Nous avons donc utilisé une colonne IMAC au fer (qui retient principalement les formes monophosphates) et les peptides tryptiques ont été repris, après la réduction et l'alkylation, dans un tampon IMAC pH3 (acide acétique 250 mM, acétonitrile 30%). La comparaison a porté sur une séparation de 37 minutes après un enrichissement par séparation sur colonne IMAC ou non et sur une séparation de 90 minutes sans enrichissement (**figure 42**). Cette analyse montre que l'analyse de 90 minutes permet de mettre en évidence un plus grand nombre de peptides phosphorylés qu'une séparation de 37 minutes. En outre, étant donné que l'on ne s'attend pas à avoir une quantité importante de peptides phosphorylés et le faible gain apporté par l'utilisation de l'IMAC, cette étape supplémentaire a été retirée du protocole pour les analyses suivantes.

I.C. Le fichier de résultats

I.C.1. Identification des peptides et notion de spectres

Après analyse des échantillons en LC-MS/MS, j'ai obtenu les fichiers contenant, pour chaque échantillon donné, les peptides identifiés et séquencés. L'analyse en spectrométrie de masse est réalisée au fur et à mesure de la séparation des peptides par la chromatographie liquide, sans *a priori* sur les peptides déjà identifiés. Ainsi, un même peptide peut être identifié plusieurs fois et le nombre de spectres lus par peptide dépend de l'abondance du peptide (et donc de la protéine correspondante) dans l'échantillon (**tableau**

Group	Description	Sample	Scan	Rt	Sequence	Modifs
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	52M6	2974	13,40	MVAAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT2G21580.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	52M6	3078	13,78	MVSAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	52M6	3434	14,96	MVAAHSSQIYTR	
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	52M6	6342	23,96	VNNMVLFDQATYDK	M4:+15.99491
35		52M6	7016	26,03	LITPSILSDR	
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	52M6	7408	27,30	VNNMVLFDQATYDK	
35		52M6	9044	33,46	PPPSSKPAKSGGGK	S10:+79.96633 - P1:+42.01056
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	52M7	2770	13,66	MVAAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT2G21580.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	52M7	2884	14,10	MVSAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	52M7	3200	15,20	MVAAHSSQIYTR	
35	AT2G21580.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	52M7	5620	23,61	VNNMVLFDQGTYDK	M4:+15.99491
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	52M7	5783	24,16	VNNMVLFDQATYDK	M4:+15.99491
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	52M7	6753	27,51	VNNMVLFDQATYDK	
35		52M7	8263	33,48	PPPSSKPAKSGGGK	S10:+79.96633 - P1:+42.01056
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	63M6	3053	13,48	MVAAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT2G21580.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	63M6	3164	13,88	MVSAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT2G21580.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	63M6	3175	13,91	MVSAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	63M6	3485	14,96	MVAAHSSQIYTR	
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	63M6	3492	15,00	MVAAHSSQIYTR	
35		63M6	3567	15,26	MVAAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT2G21580.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	63M6	6229	23,46	VNNMVLFDQGTYDK	M4:+15.99491
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	63M6	6390	23,96	VNNMVLFDQATYDK	M4:+15.99491
35		63M6	7096	26,13	LITPSILSDR	
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	63M6	7483	27,38	VNNMVLFDQATYDK	
35	AT4G39200.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25E)	63M7	2925	13,73	MVAAHSSQIYTR	M1:+15.99491
35	AT2G21580.1 : 40S ribosomal protein S25 (RPS25B)	63M7	3012	14,06	MVSAHSSQIYTR	M1:+15.99491

Tableau 6 : Extrait d'une feuille du fichier de résultats tel que fourni par la plateforme PAPPSO après une analyse en identification : Les séquences ainsi que les modifications post-traductionnelles sont déterminées en fonction du profil obtenu lors de la deuxième spectrométrie de masse (colonnes Sequence et Modifs). Chaque spectre est caractérisé par son temps de rétention en chromatographie (colonne Rt). Pour chaque peptide, une comparaison de séquence avec les séquences protéiques d'Arabidopsis (TAIR10) a été réalisée et permet d'associer chaque peptide à une protéine ou un groupe de protéines (colonne Description ; lorsqu'une cellule de cette colonne est vide, cela signifie que le peptide en question peut appartenir à plusieurs membres de la même famille). Enfin, en fonction de la spécificité des peptides pour une protéine donnée ou, au contraire, de sa non spécificité, les peptides sont rassemblés par groupes qui correspondent, plus ou moins, aux familles protéiques (colonne Group).

Pour chaque modification post-traductionnelle (colonne Modifs), le numéro du résidu concerné est cité ainsi que l'évènement de modification qui lui est associé en se basant sur la différence de masse de l'ion provoquée par la présence de cette modification (+15 : oxydation des méthionines, +42 : acétylation de l'extrémité N-terminale de la protéine, +79 : phosphorylation des Serine, Thréonine et Tyrosine)

Ici, il s'agit d'un extrait des peptides identifiés dans les échantillons provenant des plantules des lignées 5.2 et 6.3 dans les expériences M6 et M7 (colonne Sample).

6). On peut donc classer les peptides et les protéines en fonction de leur abondance dans l'échantillon.

I.C.2. Les modifications post-traductionnelles

La présence de modifications post-traductionnelles sur les peptides entraîne une différence de masse et de charge de ce peptide qui est mesurable lors de la fragmentation des ions au cours des événements de spectrométrie de masse. Ainsi, l'analyse par spectrométrie de masse permet de révéler les modifications post-traductionnelles et les acides aminés sur lesquels ils sont fixés. Ainsi on peut savoir non seulement le peptide qui a subi cette modification mais aussi l'acide aminé au sein de ce peptide.

Parmi les modifications post-traductionnelles recherchées dans ces analyses, on peut citer l'oxydation des méthionines (M : +15.99) et la phosphorylation des sérines, thréonines et tyrosines (S/T/Y : +79.98). Au cours de mon analyse, je vais surtout m'intéresser aux événements de phosphorylation et déphosphorylation sur les sérines et les thréonines.

I.C.3. Notion de groupes de protéines

Les spectres (et les peptides associés) ainsi que les protéines qui en découlent sont classés en groupes et ces groupes correspondent plus ou moins aux familles de protéines. Cette classification en groupes repose sur le fait que, dans le protéome humain, sauf pour les très petits peptides, chaque peptide n'apparaît que dans une seule famille de protéines et qu'il existe très peu de peptides qui sont partagés par au moins deux familles protéiques (Olivier Langella, non publié).

Les groupes protéiques, classés par ordre d'abondance décroissante dans les échantillons, constituent donc une indication précieuse sur les familles protéiques et leur abondance dans les échantillons.

I.C.4. Identification des protéines

I.C.4.a. Méthode d'identification

Les données brutes en sortie du spectromètre de masse sont ensuite analysées avec le logiciel X!tandem CYCLONE (2011.12.01) (<http://www.thegpm.org/tandem/>) en s'appuyant

sur la base de données TAIR8. Les résultats sont ensuite filtrés et groupés avec X;tandem pipeline v3.3.0 développé par PAPPISO (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>).

Une fois les peptides annotés dans un groupe protéique, ils sont associés à une ou plusieurs protéines du groupe. Cette association repose sur la présence de peptides spécifiques dans le set d'échantillons à tester. Ainsi, si aucun peptide spécifique d'une protéine donnée n'est trouvé dans l'échantillon, alors on considèrera qu'elle n'est pas présente de façon certaine et tous les peptides qu'elle partage avec une autre protéine seront considérés comme spécifiques de cette autre protéine.

I.C.4.b. Problèmes d'annotation

De manière surprenante, malgré la grande homologie de séquences entre les protéines ribosomales et la présence de nombreuses familles multigéniques, presque tous les peptides de protéines ribosomales sont annotés comme spécifiques d'une seule protéine. Ainsi, dans le fichier d'analyse de la première expérience, sur les 623 peptides notés comme provenant de groupes contenant des protéines ribosomales, seuls 86 (13,8 %) correspondent à des peptides communs à au moins deux protéines.

J'ai donc voulu vérifier que les peptides étaient annotés convenablement et, en préambule, qu'ils étaient toujours annotés de la même manière. De manière surprenante, dans la première expérience, sur les 2142 peptides identifiés au cours de l'analyse, 11 peptides présentent des annotations protéiques différentes selon l'échantillon dans lequel on le trouve, certains sont même annotés dans des groupes différents. Ainsi, par exemple, le peptide KKDEPAEESDGLGFLFD possède trois annotations différentes : (i) spécifique de la protéine At1g01100, dans le groupe 93 ; (ii) commun à au moins deux protéines du groupe 93 ; (iii) spécifique de la protéine At4g00810, dans le groupe 324.

Afin de contrecarrer ces annotations incomplètes et afin d'être sûr que les peptides dits spécifiques d'une protéine donnée sont bien spécifiques de cette protéine, j'ai choisi de procéder à la réannotation de plusieurs peptides. J'ai principalement insisté sur les peptides impliqués dans des protéines ribosomales ou présentant des profils potentiellement intéressants. Sur les 1583 peptides réannotés (en utilisant la fonction Patmatch de TAIR), 24 % se sont avérés mal annotés dans la première expérience en identification (dite M1) et

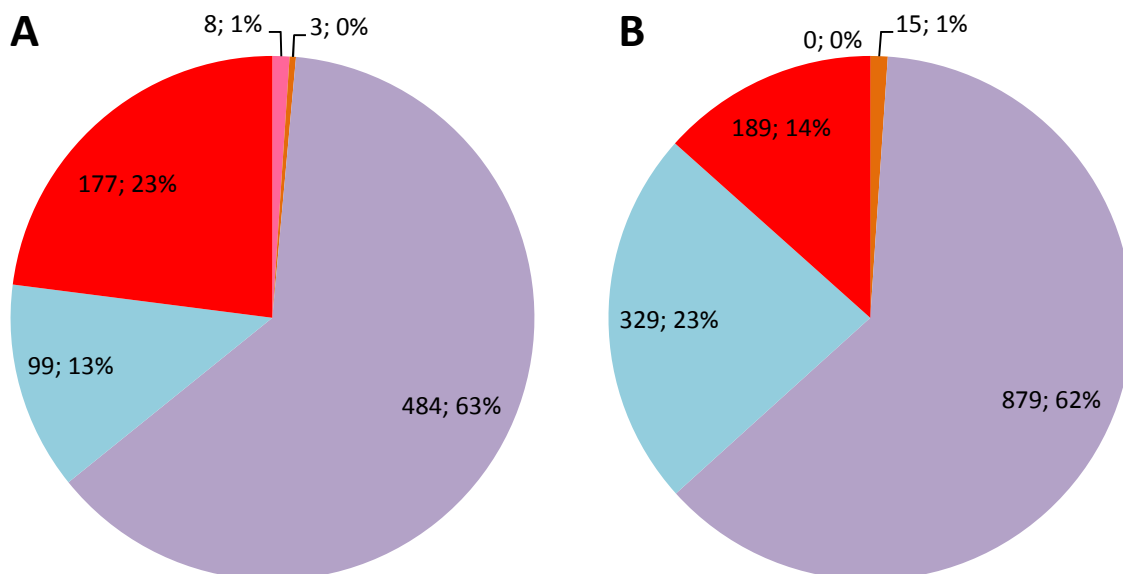


Figure 43 : L'annotation des peptides du fichier de résultats des expériences en identification présente quelques difficultés : Répartition des peptides en fonction de l'exactitude de leur annotation dans le premier fichier correspondant à la M1 (A) et dans le dernier fichier correspondant aux expériences M6 à M9 (B). En violet, les peptides spécifiques annotés convenablement, en bleu, les peptides non spécifiques annotés convenablement ; en rouge, les peptides annotés comme spécifiques alors qu'ils ne le sont pas, en rose, les peptides annotés de plusieurs manières différentes dans des groupes différents, en orange, les peptides annotés de plusieurs manières différentes au sein du même groupe de protéines.

	M1	M2	M3	M4
Milieu de culture	MS1/5 + sac 0.3%	MS1/5 – sac	MS1/5 + sac 0.3% Agar 0.7%	MS1/5 + sac 0.3% Agar 0.7%
Conditions de culture	Jour : 10h/14h 20°C cst Rotation 75 RPM HR = 75%	Jour : 10h/14h 20°C cst Rotation 75 RPM HR = 75%	Jour : 16h/8h 25°C cst 80-90 µE	Jour : 16h/8h 25°C cst 80-90 µE
Précipitation à l'acétone / TCA	oui	oui	oui	oui
Nombre de spectres totaux	6687	491	490	734
Nombre de peptides uniques	2142	271	307	397
Nombre de groupes protéiques	395	105	125	130
Nombre de phosphopeptides différents	97	2	2	7
Nb de spectres ribosomaux	1375	34	31	137
Nb de peptides ribosomaux	438	30	26	94
Nb de groupes ribosomaux	79	26	21	47

Tableau 7 : Résumé des conditions de culture des expériences M1, M2, M3 et M4 : MS = Murashige & Skoog, Sac = saccharose, cst = constant, HR = humidité relative, TCA = acide trichloracétique, µE = microeinstein. Pour les nombres de spectres, peptides et groupes ribosomaux, seules les protéines du ribosome cytoplasmique sont comptabilisées

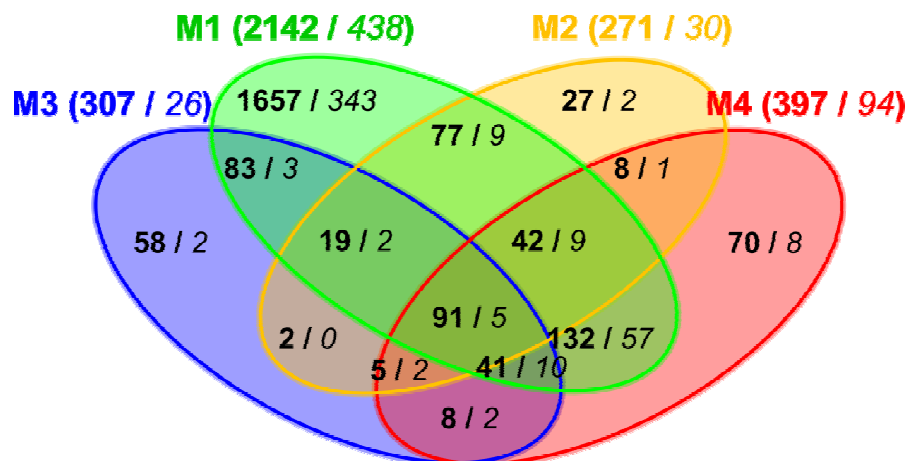


Figure 44 : Recouvrement peptidique entre les répétitions M1, M2, M3 et M4 : Ce diagramme de Venn représente le nombre total de peptides identifiés dans au moins un échantillon de chaque répétition (en gras) suivi du nombre de peptides du ribosome cytoplasmique (en italique). Entre parenthèses se trouve le nombre de peptides identifiés dans une répétition donnée.

14% pour la dernière expérience (dite M6-M9) (**figure 43**). Ceci suggère donc qu'il est nécessaire de vérifier l'annotation de chaque peptide ribosomal avant d'en tirer des conclusions. C'est pour cette raison que j'ai réannoté manuellement au moyen de la fonction Patmatch de TAIR tous les peptides présentant un profil intéressants. Ceci a abouti à la réannotation de 1583 peptides sur les 3935 identifiés au moins une fois dans au moins une expérience.

I.C.5. Données extrapolées des résultats

A partir des données de spectres obtenus pour chaque échantillon, on dérive d'autres paramètres qui dépendent de l'abondance d'une protéine donnée tel que le nombre de spectres, le nombre de peptides uniques (nombre de peptides après avoir retiré les doublons), le nombre de peptides spécifiques (nombre de peptides après avoir retiré les peptides communs à d'autres protéines) et le PAI (Protein Abundance Index) qui correspond au nombre de spectres pour une protéine donnée divisé par le nombre de peptides que l'on peut théoriquement obtenir lorsque l'on soumet la séquence peptidique de la protéine à une digestion trypsique *in silico*.

Toutes ces grandeurs permettent de comparer l'abondance d'une même protéine dans plusieurs échantillons mais nécessitent en amont une annotation efficace de tous les peptides.

I.D. Résultats des expériences M1 à M4

I.D.1. Caractéristiques de ces expériences

Ces expériences, les premières réalisées, n'ont pas toutes été effectuées dans les mêmes conditions expérimentales. Ainsi, étant donné des problèmes de contamination fongique, seules les deux premières expériences M1 et M2 ont été menées en conditions liquides. Les expériences suivantes (M3 et M4) ont, quant à elles, été réalisées sur milieu solide, en boîte de Pétri carrée de 120 × 120 mm (**tableau 7**).

Dans toutes les répétitions, les protéines de la fraction ribosomale ont été précipitées à l'acide trichloroacétique et à l'acétone. La migration des protéines ainsi obtenues sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes ainsi que la quantification par la méthode de

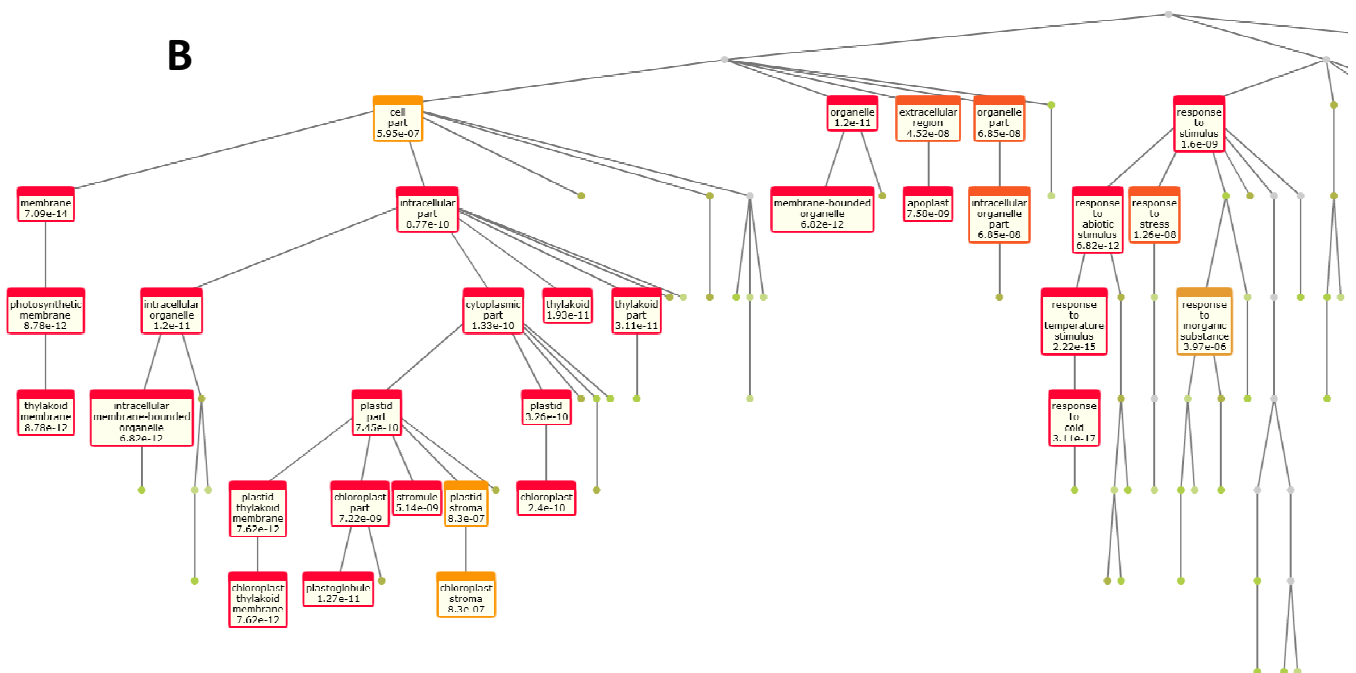
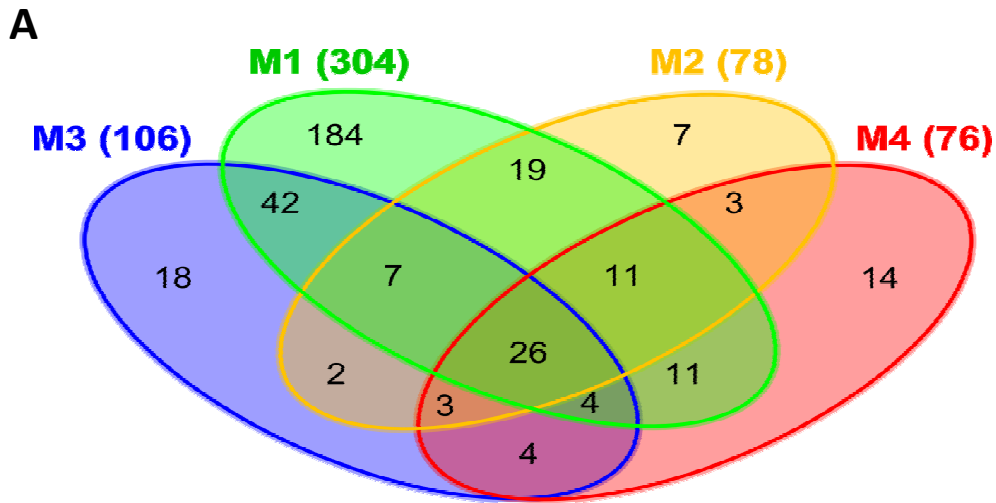


Figure 45 : Les protéines co-purifiées avec les particules ribosomales sont principalement liées au chloroplaste et/ou impliquées dans divers stress abiotiques : A : Diagramme de Venn présentant le recouvrement des protéines non ribosomales co-purifiées dans les fractions ribosomales des expériences M1 à M4. B : Répartition des 26 protéines non ribosomales retrouvées dans les quatre expériences d'après les annotations de TAIR et de TIGR au moyen de Virtual Plant 1.3 (seules les catégories largement sur-représentées avec une p-value inférieure à 10^{-5} sont présentées).

Bradford n'ont pas permis de mettre en évidence des protéines en quantité importante. Toutefois, étant donnée la grande sensibilité de la technique utilisée pour l'identification des protéines contenues dans les échantillons, j'ai choisi de réaliser tout de même l'analyse.*

Si on compare l'ensemble des peptides identifiés dans chacune des expériences, on constate que le recouvrement est relativement faible (**figure 44**) et seulement 5 peptides ribosomaux sont communs aux quatre expériences. Ceci vient principalement du fait que, dans le cas des expériences M2, M3 et M4, le nombre de peptides identifiés est très faible.

I.D.2. Les résultats obtenus

Pour ces quatre expériences, les résultats obtenus ont permis d'avoir un premier aperçu de l'influence que l'inactivation de TOR peut avoir sur la composition protéique des particules ribosomales ainsi que sur l'état de phosphorylation de ces protéines.

I.D.2.a. Des protéines non ribosomales co-purifiées

Comme Giavalisco et al. (2005) l'ont déjà rapporté, la purification du ribosome (nommé « crude ribosome » dans cet article) par séparation sur coussin de saccharose entraîne la co-purification d'un grand nombre de protéines non ribosomales dont certaines sont en quantité importante. Ces protéines sont impliquées dans un grand nombre de voies métaboliques différentes. Leur co-purification avec les ribosomes peut s'expliquer par plusieurs raisons telles que leur association aux ribosomes ou aux protéines en cours de traduction. Une autre raison pouvant entraîner leur co-purification pourrait être leur association à des complexes ou à des particules d'une densité telle qu'ils sont co-purifiés avec les ribosomes.

J'ai également constaté, au cours de mes analyses, que la fraction ribosomale contient des protéines non ribosomales. Une analyse globale de ces protéines au moyen de VirtualPlant 1.3 (Katari et al., 2010) révèle qu'elles sont majoritairement impliquées dans le chloroplaste et dans divers stress abiotiques (**figure 45**). Parmi les groupes de protéines non ribosomales particulièrement abondantes dans ces quatre expériences, on retrouve notamment les protéines PYK10 (avec une activité d'hydrolyse des groupements glycosyl) et PBP (PYK10 Binding Protein), des lectines et des jacalines. La protéine PYK10 est retrouvée dans des corps dérivant du réticulum endoplasmique appelés ER bodies. Ces corps

Groupe	AGI	Sequence	M1 37'		M1 90'		M1 IMAC		M3	M4	
			5.2 (+)	6.3 (+)	5.2 (+)	6.3 (+)	5.2 (+)	6.3 (+)	6.3 (+)	5.2 (+)	6.3 (+)
1	at3g09260 (PYK10)	NAQNYAIGSKPLTAALNVYS WDTPQDLEDEYGGFLSER	1			1					
		YVNAKCQDGRSGYEAYLVTHNLLISHAEVEAYR		1	1						
		YVNAKCQDGRSGYEAYLVTHNLLISHAEVEAYR	1								
	at3g21370 (BGLU19)	TPADLEDEYGGFLSER TVFHWDTPADLEDEYGGFLSER				1					
3	at3g16460 (Mannose-binding lectin superfamily protein)	AQGNSTGGTSWDDGSDYDGVTK EGAGSEAGTLWDDGAFDGVK SSTTPVPSTPLK SVGQAQDGI GAVSFVYDK	1	1					1		
5	at3g16470 (JR1)	VYVYQGDSSVVY		1		1					
6	at1g54000 (GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein)	GANDYLNFTKNNPTADASAQQAFVTSVTNK	1								
	at1g54010 (GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein)	FFDGRHNTKAKEMFGHLLFGADTNVIQPMNIR		1							
9	at1g20620 (CAT3)	PSSAYNAPFYTTNGGAPVSNISLITIGER	1	1							
11	at1g48920 (nucleolin like 1)	GDSSGGGGFGR				1					
12	at3g16450 (Mannose-binding lectin superfamily protein)	VYVYQGDGISA			1	1					
17	At4g31700 (RPS6A)	SRLSSAAAKPSVTA				1					
	At5g10360 (RPS6B)	SRLSSAPAKPVAA				1					
21	At5g20290 (RPS8A)	TGNYSWGSEATTR			1						
22	at3g25520 (RPL5A), at5g39740 (RPL5B)	AVAHLPQYGLTVGLTNYAAAYCTGLLLAR	1	1	1						
45	at2g40010 (RPP0A)	HADKTGNQAFLLPLQLQNVGLIFTK			1						
	at2g40010 (RPP0A), at3g09200 (RPP0B), at3g11250 (RPP0C)	KGLRGDSVVLGMKNTMMKRS	1								
54	at4g25500 (arginine/serine-rich splicing factor 35)	GASPVAAYR					1				
59	at4g36700 (RmlC-like cupins superfamily protein)	MTRFAVLPLVLLVLL	1								
71	at1g52000 (Mannose-binding lectin superfamily protein)	AGGSKPSSGSAGTNPASAGNGETEK AGGSKPSSGSAGTNPASAGNGETEK NAGGSKPSSGSAGTNPASAGGN		1		1					
82	at2g27720 (RPP2A)	GGGGVAVASATSGGGGGGAPAAESK	1								
91	At1g01100 (RPP1A), At5g47700 (RPP1C), At4g00810 (RPP1B)	KKDEPAEESDGLDGLFLFD			2	2				1	
94	at4g31880	SKMNDSSAKKSGGAGSSK	1								
99	at3g49430 (SER/ARG-rich protein 34A)	YGGGGSGYGGGGGGGSAR RGGYGGGGSGYGGGGGGGSARFGV RGGYGGGGSGYGGGGGGGSARFGVSR			1	1	1				
100	at4g39680 (SAP domain-containing protein)	VPEAQITNSATPTTTPR						1	1		
103	at1g61730 (DNA-binding storekeeper protein-related transcriptional regulator)	IKSPSATAAAPPK		1	1		2	1	1		
113	at2g27710 (RPP2B)	VASATSGGGGGGASAAESK	1								
150	at3g03920 (H/ACA ribonucleoprotein complex, subunit Gar1/Naf1 protein)	LPQPKGSTGRRGGAGRGRGDSR	1								
152	at4g17620 (glycine-rich protein)	LELLQAQSCPDAITNHVHLLQNPASPPPPPQ NASSSSSSSSSSSSSAAG			1						
158	at4g26600 (S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase)	YMLQSASFPLVMALAPREK			1						
164	at1g29270	EYEDLKITK								1	
168	at2g44730 (Alcohol dehydrogenase transcription factor Myb/SANT-like)	IPDPSPLAPLPPPLSS		1							
178	at3g61860 (RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein)	RRSPDYGR								1	
184	at5g52490 (Fibrillarin family protein)	GLARGGEGSAVRGSRGGESGRG			1						
198	at2g37340 (arginine/serine-rich zinc knuckle-containing protein 33)	NSVSPVVGAGGDSK				1	1				
200	at3g13120 (RPS10)	VSLPSSSTHGLLSSCVL	1								
202	at3g28730 (SSRP1)	MADGHSFNNISLGRGGKN	1								
254	at1g11940 (Core-2/1-branching beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase)	MSPVPIEEK						1			
255	at1g33940	RQGVISSNVPDENSSANEIPTSPEAR						1			
258	at5g16860 (Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein)	CGMMDEANTVFSNMSVK					1				
259	at5g19040 (IPT5)	DKVVFVMGATGTGK					1				
261	at1g19400 (Erythronate-4-phosphate dehydrogenase family protein)	MGMYSEGGSSQLRR									1
262	at5g13310	FNTSASQPSESK									1
263	at3g60240 (EIF4G)	SQGEVGGPTNPTEFNR							1		

Tableau 8 : Effet de l'inactivation de TOR sur l'état de phosphorylation des protéines : Répartition des peptides (avec leurs sites de phosphorylation) dans les différents échantillons des expériences M1 à M4. Chaque peptide a été ré-annoté au moyen de Patmatch et les AGI correspondants sont renseignés dans la deuxième colonne. Pour l'expérience M1, les résultats de la séparation de 37 minutes sans enrichissement par IMAC (37'), de la séparation de 90 minutes sans enrichissement par IMAC (90') et de la séparation de 37 minutes après enrichissement par IMAC (IMAC) sont présentés dans des colonnes différentes. Les lignes surlignées en jaune correspondent à des peptides de protéines ribosomales. Pour chaque expérience, nous avons analysé deux lignées indépendantes permettant une extinction inductible à l'éthanol de l'expression de TOR (TOR RNAi 5.2 et 6.3). La lignée témoin exprime le gène GUS sous contrôle du même promoteur alcA inductible par l'éthanol (voir Matériel et Méthodes). Pour chaque expérience, le nombre de fois où le peptide a été détecté est indiqué pour chacune des lignées TOR RNAi ainsi que pour le contrôle GUS traités à l'éthanol (+) pendant 72 heures.

s'accumulent principalement dans l'épiderme des plantules en condition de stress et au niveau des blessures (Yamada et al., 2009). Ces ER bodies seraient impliqués dans le métabolisme des glycosides, supposés produire des molécules repoussant les insectes et les champignons (Yamada et al., 2011). Il a également été montré que, lorsque les cellules sont cassées, PYK10 forme un complexe de taille importante contenant également les protéines JAL (jacalin-related lectin) et des GLL (GDSL-lipase-like protein) (Nagano et al., 2008).

I.D.2.b. Analyse du phosphoprotéome

En rassemblant ces quatre premières expériences, on retrouve un grand nombre de phosphopeptides (provenant principalement de l'analyse de la 1^{ère} répétition) (**tableau 8**). Dans tous ces phosphopeptides, on constate qu'un grand nombre de phosphosites sont des sérines. Ainsi, sur tous ces phosphosites, on retrouve 53 sérines phosphorylées, 22 thréonines phosphorylées et 15 tyrosines phosphorylées. Comme cela a déjà été montré (Luan, 2002), les tyrosines phosphorylées sont des événements plus rares que ce que l'on observe pour les thréonines ou les sérines, même si elles pourraient être plus abondantes que ce qui était prédit et qu'elles seraient impliquées dans des fonctions importantes de la vie végétale (de la Fuente van Bentem and Hirt, 2009).

Parmi les phosphopeptides retrouvés dans ces expériences, un grand nombre de sites n'avaient pas encore été décrits. Ceci est souvent le cas dans les expériences d'analyse de phosphoprotéome végétal et ce faible recouvrement avec les bases de données suggère qu'un grand nombre de sites de phosphorylation reste à découvrir.

Un certain nombre de peptides ne sont retrouvés phosphorylés que lorsque TOR est actif ou, inversement, lorsque TOR est inactivé. Ceci suggère donc que certains de ces sites pourraient être des cibles plus ou moins directes de TOR (même si elles ne sont pas retrouvées dans toutes les expériences). Néanmoins, dans la plupart des cas, ces peptides phosphorylés ne sont retrouvés que dans un seul échantillon, ne permettant pas d'affirmer, avec une confiance suffisante, qu'il pourrait s'agir de cibles de TOR.

Trois phosphopeptides présentent un profil intéressant et ont été identifiés dans au moins deux échantillons : il s'agit des peptides NSVV**p**SPVVGAGGSSK (spécifique de At2g37340, une protéine de la famille des arginine/serine-rich zinc knuckle-containing-

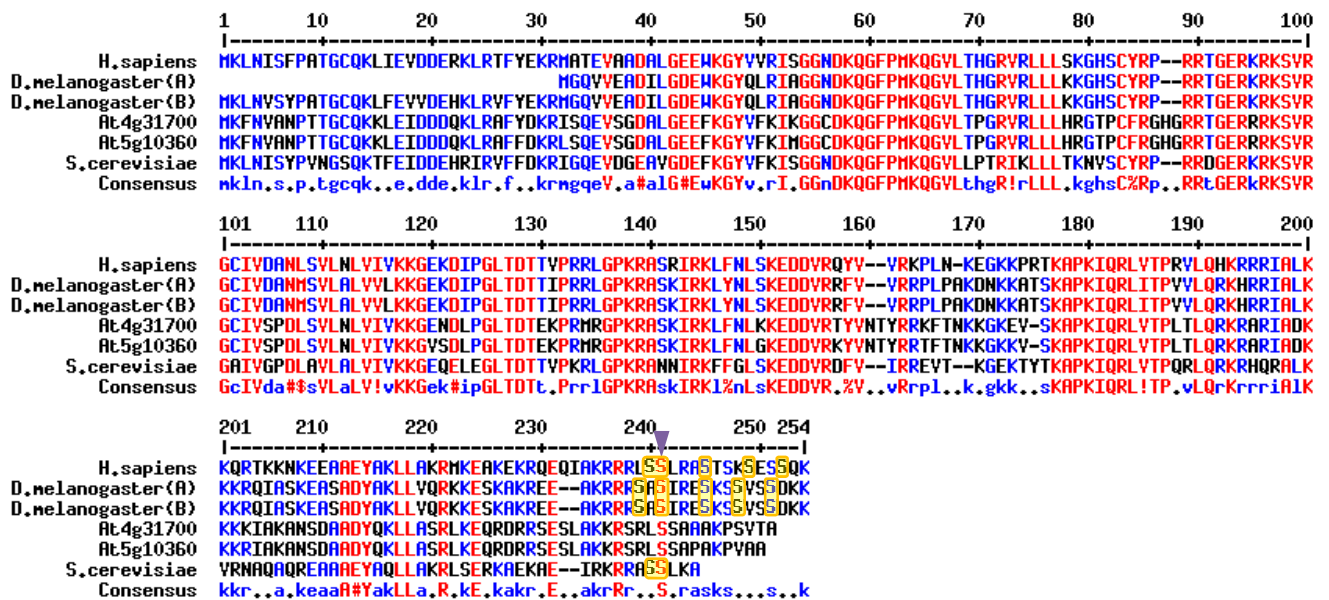
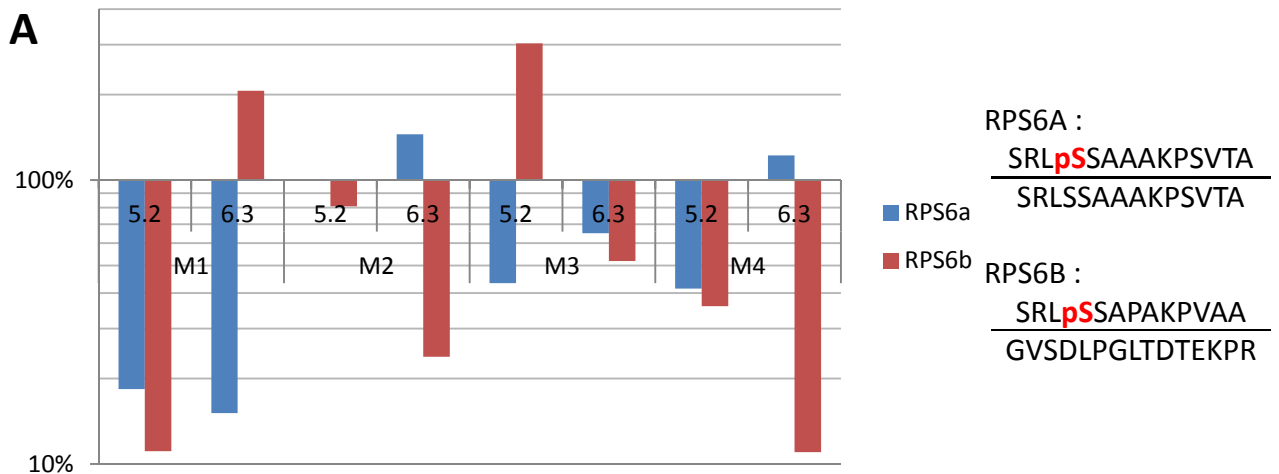


Figure 46 : La phosphorylation des RPS6A et B observée dans nos échantillons se produit sur l'unique sérine conservée de l'extrémité C-terminale des protéines RPS6A parmi les eucaryotes : Alignement des séquences protéiques des protéines ribosomales RPS6 de l'homme (*H. sapiens*), de la drosophile (*D. melanogaster* (A) et *D. melanogaster* (B), de la levure (*S. cerevisiae*) et d'Arabidopsis (*At4g31700* et *At5g10360*). Le site de phosphorylation identifié et quantifié et noté par une flèche violette et les résidues déjà décrits comme phosphorylés dans la littérature sont encadrés en orange.

La numérotation repose sur la séquence de la protéine RPS6A d'Arabidopsis, incluant les délétions.



RPS6A :
 SRLpSSAAAKPSVTA
 SRLSSAAAKPSVTA
 RPS6B :
 SRLpSSAPAKPVAA
 GVSDLPGLTDEKPR

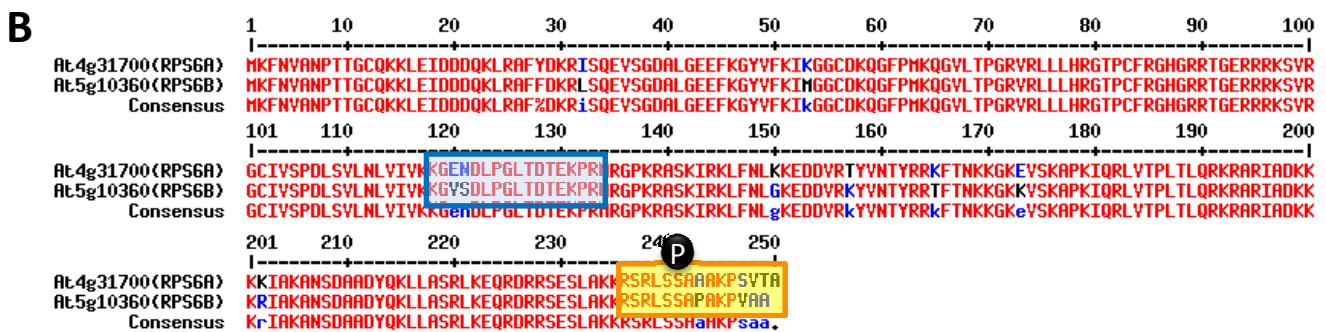


Figure 47 : L'inactivation de TOR chez Arabidopsis entraîne une diminution du niveau de phosphorylation des protéines ribosomales RPS6A et RPS6B : (A) La quantification des peptides C-terminaux phosphorylés normalisés par la quantité de peptides spécifiques de ces protéines RPS6A et RPS6B a été ramenée en pourcentage du niveau de phosphorylation dans le contrôle GUS correspondant. Nous pouvons voir que la plupart des échantillons de lignées TOR RNAi présentent une baisse du niveau de phosphorylation des protéines RPS6A et RPS6B. (B) Alignement des séquences protéiques des RPS6A et RPS6B mettant en évidence les peptides utilisés pour la quantification : en bleu, les peptides spécifiques de chacune des formes et, en jaune, les peptides phosphorylés (P noir) utilisés pour quantifier le taux de phosphorylation

protein) et WDpTPQDLEDEYGGFLSER (spécifique de At3g09260, PYK10) qui ne sont présents que lorsque TOR est inactivé et VYVGQGDpSGVVpY (spécifique de At3g16470, une lectine lié aux jacalines) qui n'est présent que lorsque TOR est activé. Ces deux derniers peptides appartiennent à des protéines en lien avec les ER bodies (PYK10 et JR1 respectivement) et suggèrent que TOR pourrait jouer un rôle dans l'organisation et la composition de ces ER bodies.

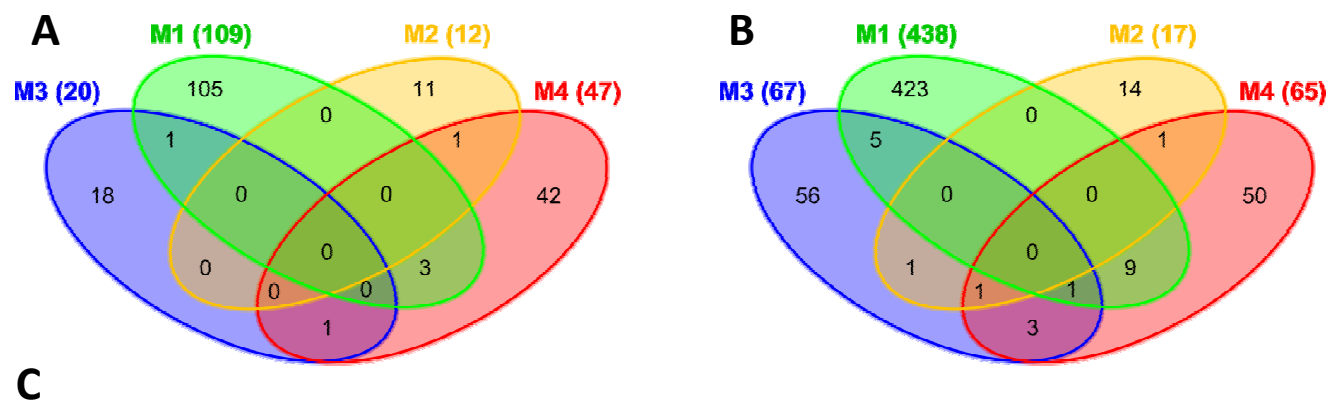
On constate également que les protéines RPS6A et RPS6B n'ont été retrouvée que dans des échantillons dans lesquels TOR est actif. Je me suis intéressé plus particulièrement à l'étude de ce cas.

I.D.2.c. Un cas particulier, celui de la RPS6

Au cours de ces analyses menées sans *a priori*, très peu de phosphopeptides ont été identifiés (**tableau 8**). Parmi ces quelques peptides, on note la présence d'un peptide spécifique de la protéine RPS6A (At4g31700) et d'un peptide spécifique de la protéine RPS6B (At5g10360). Il apparaît que ces deux peptides présentent la caractéristique de n'être phosphorylés que dans les échantillons des plantes contrôles GUS, suggérant que l'inactivation de TOR pourrait entraîner la déphosphorylation de ce résidu.

La sérine phosphorylée dans ce peptide correspondant à l'extrémité C-terminale de ces deux protéines correspond à une sérine conservée identifiée comme phosphorylable chez d'autres eucaryotes (Krieg et al., 1988; Radimerski et al., 2000; Ruvinsky and Meyuh, 2006) (**figure 46**). Cette déphosphorylation confirme donc que les lignées que nous avons utilisées ainsi que le protocole d'induction permettent effectivement l'inactivation de TOR puisque, chez les mammifères, la protéine ribosomale RPS6 est phosphorylée par la protéine S6 kinase, elle même activée directement par phosphorylation par TOR. Dans le même temps, cette différence de phosphorylation permet de suggérer que, chez Arabidopsis également, la phosphorylation de la protéine ribosomale RPS6 dépend de l'activité de TOR.

Afin de confirmer plus finement la baisse du niveau de phosphorylation des deux protéines RPS6A et RPS6B, j'ai réalisé la quantification des peptides C-terminaux phosphorylés, notés respectivement S6A-OP et S6B-OP ainsi que d'un peptide permettant de normaliser la quantification en tenant compte de l'effet de l'injection et de la concentration



Séquence peptidique	Exp.	Protéines
ELLAQGVSQSR	M1, M3	At3g56150 (eIF3C)
SLEGLQTNVQR	M1, M4	At3g49010 (RPL13B) ^c
TLLFGKPVTVFGIR	M1, M4	At1g13440 (GAPC1), At3g04120 (GAPC2) : Glycéraldéhyde-3-P déshydrogénase
VSCLSIVDPGDSIIK	M1, M4	At3g18740 (RPL30C) ^c , At1g77940 (RPL30B) ^c , At1g36240 (RPL30A) ^c
VTGGVEGAASSLAPK	M2, M4	At2g37190 (RPL12A) ^c , At5g60670 (RPL12C) ^c , At3g53430 (RPL12B) ^c
VTVVPSAAALVIK	M3, M4	At2g37190 (RPL12A) ^c , At5g60670 (RPL12C) ^c , At3g53430 (RPL12B) ^c
FAMLGAAGAIAPILGK	M1, M3	At1g61520 (LHCA3)
GILAADESTGTIGK	M1, M3	At2g36460 (Aldolase), At3g52930 (Aldolase), At4g26530 (Aldolase), At5g03690 (Aldolase)
LASIGLENTEANR	M1, M3	At2g21330 (FBA1, fructose-bisphosphate aldolase 1)
TIDNFFNETEQALFNPGLVVPGIYSDDK	M1, M3	At1g20620 (CAT3)
YAAISQDSGLVPIVEPEILLDGEHDIDR	M1, M3	At4g38970 (FBA2, fructose-bisphosphate aldolase 2)
EITFNFPIDK	M2, M3	Atcg00490 (RBCL, RubisCO)
ALSMYGLNVNEIFRPYEK	M1, M4	At3g20370 (TRAF-like family protein)
DKYANPEIMIMENGYGEELGASDSV	M1, M4	At3g09260 (PYK10)
AVGTADHNR	M1, M4	At3g09260 (PYK10)
FETLSYLPDLTDVELAK	M1, M4	At5g38430 (RubisCO (small chain))
FTLPPNLTGK	M1, M4	At3g14415 (Aldolase-type), At3g14420 (Aldolase-type)
HNDVNFVGTQDHNR	M1, M4	At1g52400 (beta glucosidase 18)
IDMTTTLVLFK	M1, M4	At3g14420 (Aldolase-type)
KVYVGQGGQDVAVK	M1, M4	At3g16460 (Mannose-binding lectin superfamily protein)
KYFTIQDQTDVWK	M1, M4	At3g20370 (TRAF-like family protein)
TWLTSLGYR	M1, M4	At5g44020 (HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase)
VSIPFGIGAGTAFEFKK	M2, M4	At3g16460 (Mannose-binding lectin superfamily protein)
ALDFILGWHLDTTTFGDYPQIMK	M3, M4	At3g09260 (PYK10)
SIWISYWSQADK	M3, M4	At1g20630 (CAT1), at4g35090 (CAT2)
SYLFFDGR	M3, M4	At1g54010 (GDSL-like Lipase)
TGALLLDGNTLNYFGK	M1, M3, M4	At4g10340 (LHCB5)
VLPADPFVINHPDEHLVSVGEWYSPGIIQGIK	M2, M3, M4	At3g16420 (JAL30, PYK10-binding protein 1)

Figure 48 : Les premières expériences suggèrent l'existence de cibles potentielles de l'inactivation de la kinase TOR : Les diagrammes de Venn représentent les peptides uniquement présents dans les échantillons des TOR RNAi (A) ou des contrôles GUS (B). La liste (C) présente les protéines dont l'abondance pourrait être régulée par TOR : les protéines surlignées en violet ne sont présentes que dans les échantillons des lignées contrôles GUS et sont donc potentiellement réprimées lors de l'inactivation de TOR et les protéines surlignées en orange ne sont présentes que dans les échantillons des lignées TOR RNAi et sont donc potentiellement induites lors de l'inactivation de TOR. La colonne « exp. » indique les numéros des expériences dans lesquelles ce peptide a été identifié. ^c Ribosome cytosolique

protéique dans les échantillons. J'ai donc quantifié le peptide C-terminal non phosphorylé de la RPS6A (noté S6A-OH) (pour des raisons techniques, le peptide spécifique de la RPS6A non phosphorylable n'a pas pu être quantifié) et un peptide spécifique de la RPS6B non phosphorylable (noté S6B-spé). Les quantifications ont été effectuées par une approche de SRM (Selected Reaction Monitoring) qui permet la quantification spécifique d'un peptide en se basant sur son temps de rétention au cours de la chromatographie liquide, de son rapport m/z au cours du premier évènement de spectrométrie de masse et du rapport m/z de deux ions fils au cours du deuxième évènement de spectrométrie de masse. Cette approche SRM met en évidence que le niveau de phosphorylation des protéines RPS6A et RPS6B est globalement réprimé lorsque TOR est inactivé (**figure 47**).

I.D.2.d. Recherche de cibles putatives de TOR dans le protéome

Avant le travail de vérification des annotations des peptides, j'ai cherché à mettre en évidence des cibles de l'inactivation de TOR dans la fraction ribosomale. Pour ce faire, j'ai considéré chaque lignée RNAi et chaque expérience comme une répétition biologique indépendante, parvenant ainsi à un groupe de huit répétitions indépendantes. Dans chacune de ces huit répétitions, j'ai recherché les protéines induites (présente dans l'échantillon de TOR RNAi et non dans le contrôle GUS) ou réprimés (présente dans le contrôle GUS et non dans les plantes du TOR RNAi) par l'inactivation de TOR. De manière intéressante, certaines de ces protéines ont été retrouvées dans plusieurs de ces huit répétitions (jusqu'à cinq fois). La liste de ces cibles potentielles est fournie en **Annexe 1**. Le contenu de ces listes, mis en perspective avec d'autres résultats, sera discuté plus loin dans ce chapitre.

Comme nous l'avons vu précédemment (**figure 44**), le contenu peptidique des échantillons présente un recouvrement faible, ce qui ne permet pas de mettre en évidence des cibles de l'inactivation de TOR qui seraient communes aux quatre répétitions (**figure 48 A et B**). Cependant, on constate que, si on s'attarde sur les peptides induits ou réprimés dans au moins deux expériences indépendantes, l'inactivation de TOR entraîne vraisemblablement des modifications au niveau de l'abondance de certaines protéines ribosomales ou en lien avec la traduction (qui sont induites) et réprime plusieurs peptides de la protéine PYK10 et une β -glucosidase ainsi que des jacalines, des lectines et une GDSL-like lipase. Il est également à noter que, parmi les protéines qui semblent être réprimées, on

MATVTASSNFVSRSTSLFNNHGASSCSDDVAQITLKGQSLTHCGLRSFNMVDNLQRRSQAKPVSAKSSKRSSKVKTAGKIVCEKGMMSVI
 FIGAEVGPWSKTGGGLGDVLGGLPPALAARGHRVMTICPRYDQYKDAWDTCVVVQIKVGDKVENVRFFHCYKRGVDRVFVDHPIFL
 AKVVGKTGSKIYGPITGVDYNDNQLRFSLLCQAALAPQVNLNLSKYFSGPYGEDVVVFVANDWHTALLPCYLKSMYQSRGVYMNNA
 KVVFCIHNIAYQGRFAFDYSLNLPISFKSSDFMDGYEKPVKGRKINWMKAAILEAHRVLTVSPYYAQELISGVDRGVELHKYLRMK
 TVSGIINGMDVQEWNPSTDKYIDIKYDITVTDAKPLIKEALQAAVGLPVRDVPVIGFIGRLEEQKGS DILVEAISKFMGLNVQM VIL
 GTGKKKMEAQILELEEKFP GKAVGVAKFNVPLAHMITAGADFIIVPSRFEP CGLIQLHAMRYGTVP I VASTGGLVDTV KDG YTG FHIG
 RFNVKCEVVD PDDVIATAKAVTRAVAVYGT SAMQEMVKN CMDQDFSWKGP AR LW EKVLLSLNVAGSEAGTEGEEIAPLAKENVA

TP

Figure 49 : L'inactivation de TOR semble réprimer l'accumulation de l'amidon synthase : Séquence peptidique de l'amidon synthase (At1g32900) présentant les différents peptides tels qu'ils ont été retrouvés dans les expériences M1 à M4. Les peptides soulignés d'un rectangle bleu ont été trouvés uniquement dans l'échantillon du contrôle GUS de l'expérience M1 et le peptide souligné d'un rectangle rouge a été retrouvé uniquement dans le contrôle GUS de l'expérience M4. Les flèches bleues symbolisent les sites de clivage trypsinolytique.

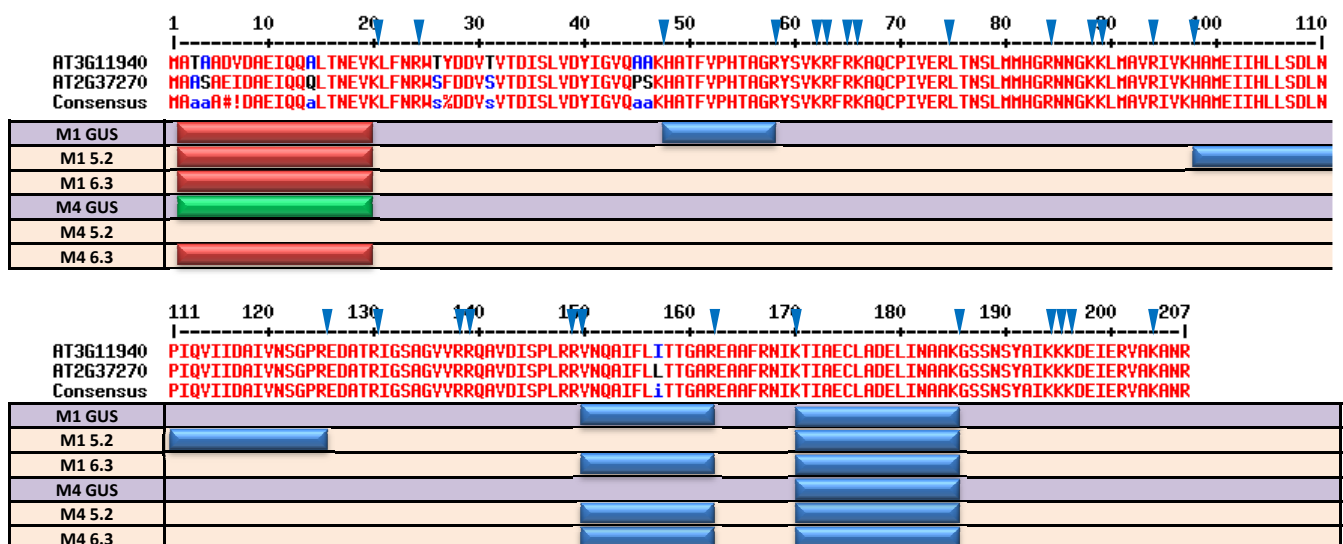


Figure 50 : L'inactivation de TOR semble réprimer l'accumulation de la RPS5B mais pas de la RPS5A: Séquence peptidique des protéines ribosomales RPS5A (At3g11940) et RPS5B (At2g37270) présentant les différents peptides tels qu'ils ont été retrouvés dans les expériences M1 à M4. Les rectangles représentent les différents peptides, leur couleur représente leur spécificité (bleu: non spécifique, rouge: spécifique de RPS5A, vert: spécifique de RPS5B) et leur position indique l'échantillon dans lequel ils ont été identifiés. Les flèches bleues symbolisent les sites de clivage trypsinolytique.

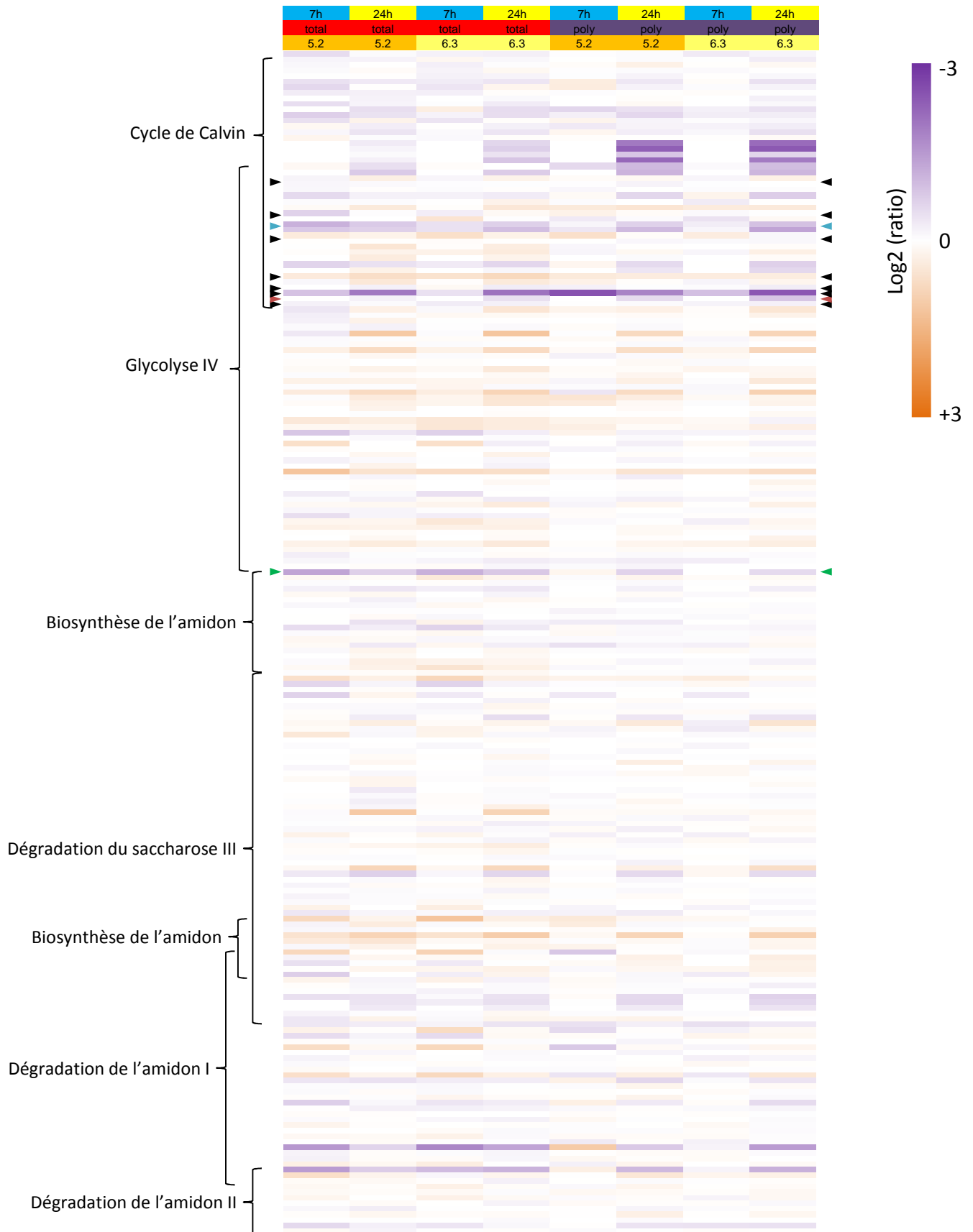


Figure 51 : Régulation de l'expression des gènes impliqués dans quelques voies du métabolisme carboné au niveau transcriptomique et traductomique : Les plantes des lignées TOR RNAi inductibles à l'éthanol 5.2 et 6.3 sont cultivées pendant 7 jours en absence d'éthanol puis transférées sur un milieu contenant de l'éthanol pendant 7h ou 24h. Les ARN messagers totaux ainsi que les ARN messagers contenus dans la fraction polysomales des TOR RNAi sont quantifiés par analyse sur puces CATMA et comparés à ceux des contrôles GUS traités dans les mêmes conditions. L'annotation des voies a été réalisée au moyen d'Aracyc (PMN). Les deux flèches vertes désignent la starch synthase At1g32900, les bleues et rouges désignent les fructose-bisphosphate aldolase plastidiales (At2g21330 et At4g38970 respectivement) et les noires désignent les fructose-bisphosphate aldolase cytosolique. Les données brutes ont été obtenus par Manon Moreau durant sa thèse.

trouve des aldolases (notamment des fructose-bisphosphate aldolases) et plusieurs protéines impliquées dans la photosynthèse telles que des protéines liées aux photosystèmes (LHCA) et plusieurs sous-unités de la RubisCO.

Enfin, d'autres protéines présentent également des profils intéressants, suggérant une régulation potentielle par la voie de TOR. On peut notamment citer le cas d'une enzyme impliquée dans la synthèse d'amidon (At1g32900) dont plusieurs peptides spécifiques ont été retrouvés dans plusieurs expériences différentes mais jamais dans les échantillons des lignées TOR RNAi (**figure 49**). Ceci suggère que cette enzyme pourrait être réprimée lors de l'inactivation de TOR ou qu'elle pourrait être moins abondante dans la fraction des protéines ribosomales ou liées à des particules de forte densité comme les grains d'amidon en formation qui seraient éliminés par la première centrifugation..

Une autre famille de protéines qui présente un profil intéressant est la famille des RPS5 (constitutive de la petite sous-unité 40S du ribosome cytoplasmique) dont le peptide spécifique de la RPS5B n'est retrouvé que dans les contrôles GUS, suggérant que TOR pourrait réguler l'abondance de la RPS5B et non la RPS5A (**figure 50**). De manière intéressante, il a été publié que ces deux protéines ne présentent pas le même profil d'expression : la RPS5A est principalement exprimée dans les cellules en divisions actives tandis que la RPS5B est exprimée dans les cellules en cours de différenciation (Weijers et al., 2001).

I.D.2.e. TOR pourrait contrôler le métabolisme carboné

Plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme carboné (des fructose-bisphosphate aldolases et une amidon synthase notamment) semblent être réprimées au niveau protéomique en réponse à l'inactivation de TOR. Ceci suggère donc que l'inactivation de TOR pourrait entraîner une réorientation du métabolisme carboné. Afin de vérifier si cette différence de profil d'expression est propre à ces enzymes et uniquement à un niveau protéomique ou si, au contraire, l'ensemble du métabolisme carboné est impliqué dans cette réorientation, j'ai vérifié dans les résultats de transcriptomique et traductomique que Manon Moreau avait obtenus le profil d'expression de ces gènes et, plus généralement, des gènes impliqués dans plusieurs voies du métabolisme carbonés dont la glycolyse, la synthèse et la dégradation de l'amidon (**figure 51**). En effet, le transcriptome qui quantifie

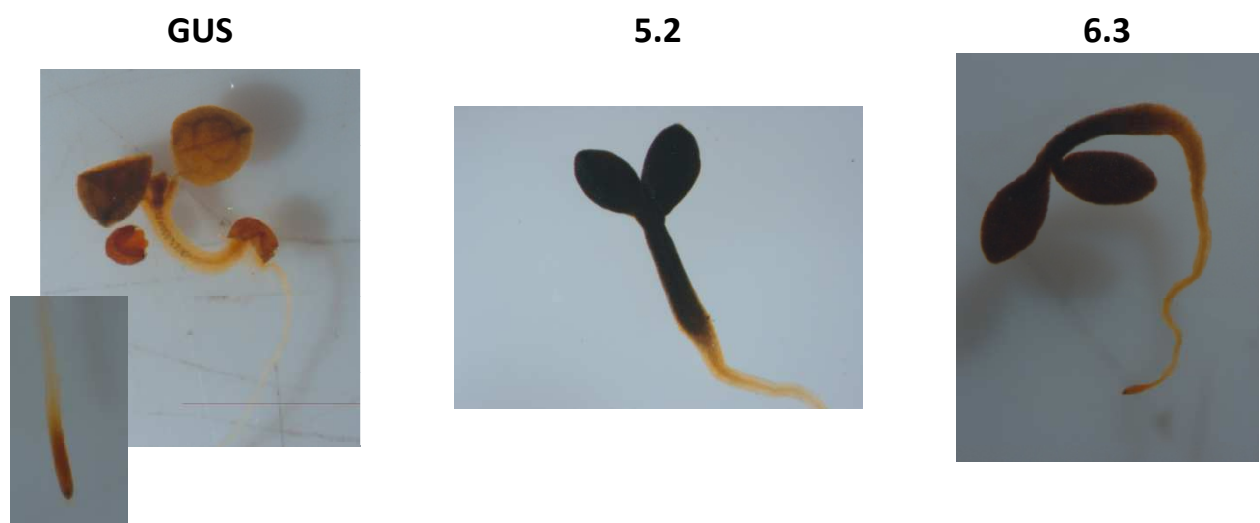


Figure 52 : L'inactivation de TOR entraine l'accumulation d'amidon dans les plantules : Des graines des lignées TOR RNAi inductible 5.2 et 6.3 ainsi que de la lignée contrôle GUS ont été germés sur un milieu contenant de l'éthanol puis cultivés pendant 10 jours. La révélation de l'amidon a été menée par coloration au lugol.

l'abondance des ARN messagers totaux pour un gène donné nous renseigne sur le niveau de transcription de ce gène tandis que le traductome qui quantifie l'abondance des ARN messagers présents dans les ribosomes nous renseigne sur le niveau de traduction de ce gène. Ainsi, la comparaison du transcriptome, du traductome et du protéome permet d'avoir une vue d'ensemble de l'expression d'un gène.

On y voit notamment que la diminution de la quantité de la protéine de l'amidon synthase peut s'expliquer par une diminution de sa transcription dans les 7h qui suivent l'inactivation de TOR et au niveau traductionnel dans les 24h qui suivent l'inactivation de TOR. En outre, on constate également que plusieurs fructose-bisphosphate aldolase sont également réprimées au moins au niveau traductionnel dans les 24h qui suivent l'inactivation de TOR.

On constate également que les gènes impliqués dans la glycolyse semblent globalement induits par l'inactivation de TOR, à l'exception des gènes en commun avec le cycle de Calvin qui sont globalement réprimés (comme les autres gènes du cycle de Calvin, ce qui est à mettre en relation avec la diminution observée au niveau protéomique de l'abondance en plusieurs sous-unités de la RubisCO et des protéines liées aux photosystèmes). De manière intéressante, on peut également noter que les voies de biosynthèse et de dégradation de l'amidon semblent globalement réprimées lorsque TOR est inactivé.

Cette dérégulation des voies de biosynthèse et de dégradation de l'amidon ainsi que celle de l'amidon synthase au cours de l'inactivation de TOR suggère que TOR pourrait être impliqué dans la synthèse d'amidon. Afin de vérifier ces hypothèses, j'ai suivi l'accumulation d'amidon par coloration au lugol dans les plantules de TOR RNAi lorsque TOR est inactivé. Une telle expérience a montré que l'inactivation de TOR au cours de la germination entraîne une accumulation d'amidon dans l'ensemble des parties aériennes (**figure 52**). En outre, Manon Moreau a montré dans sa thèse (2009) que l'inactivation de TOR sur des plantules déjà germées entraîne également une accumulation d'amidon.

I.D.3. Des données avec un faible recouvrement

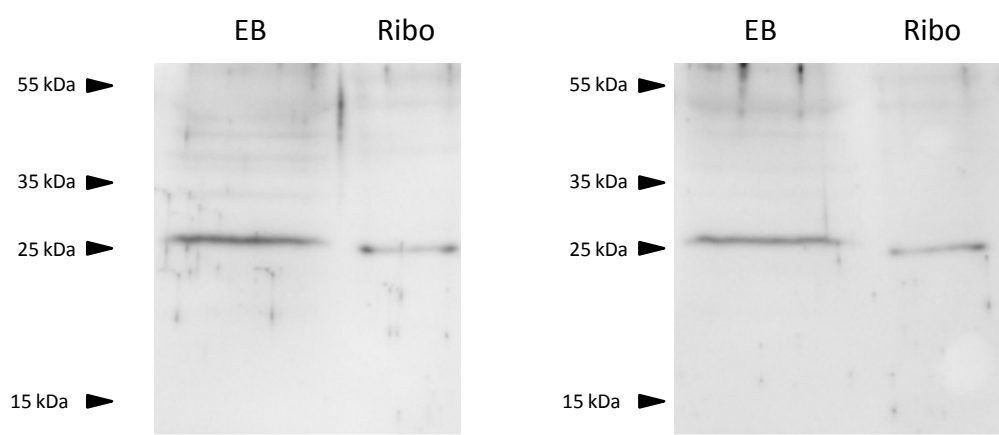
Nous l'avons déjà vu, il existe une très grande hétérogénéité au niveau du nombre de spectres, de peptides et de groupes (ribosomaux ou non) dans les quatre expériences considérées ici (**figure 44**). Une des conséquences de cette hétérogénéité est que très peu de peptides sont communs aux quatre répétitions : seul 91 peptides sont communs aux quatre répétitions, ce qui représente 33,6 % des peptides de la M2 et seulement 4,2 % des peptides de la M1. Ce faible recouvrement empêche une identification convenable des cibles potentielles de l'inactivation de TOR.

Afin de permettre une meilleure analyse des échantillons, j'ai préféré, avant de poursuivre les expériences, faire à nouveau quelques étapes de mises au point afin (i) de vérifier et d'améliorer le rendement de la purification, (ii) d'obtenir des échantillons plus concentrés en protéines et plus homogènes et (iii) de vérifier les concentrations et les profils des protéines ainsi obtenues.

I.E. Suite des mises au point

Etant donnée le recouvrement incomplet des premières expériences, j'ai réalisé quelques mises au point avant de préparer de nouveaux échantillons. En outre, étant donnée la faible concentration de nos échantillons, il s'est avéré qu'il serait désormais plus judicieux d'utiliser la Q-Exactive plutôt que le LTQ-XL, équipé d'une trappe linéaire. Ce changement de machine devrait nous permettre de gagner en résolution et en précision grâce à la présence d'une orbitrappe qui déduit le rapport m/z des ions par calcul de transformée de Fourier à partir de la fréquence axiale des ions autour de la trappe. Nous avons également choisi de réaliser l'analyse des différentes répétitions de façon simultanée afin de limiter au maximum les perturbations qui pourraient survenir à cause des paramètres non contrôlables durant l'analyse LC-MS/MS (telles que la température ambiante, la présence de solvants dans l'air, ...).

Dans un premier temps, on a réalisé une purification sur des plantules de l'accession Columbia-8 cultivée en boîte de Pétri selon le même protocole que les expériences M3 et M4. J'ai mené la culture pendant 10 jours avant de réaliser la purification des ribosomes selon le protocole déjà utilisé auparavant. Toutefois, afin de limiter la perte de protéines qui



Volume dépôt (µl)	40	5		40	5
Matière fraîche (mg)	10.56	93.5		3.52	31.17
Intensité de la RPL13 (UA)	18138	7818		12828	5962
Concentration RPL13 (UA/µl)	453	1594		320.7	1192.4
Rendement	4.87 %			5.25 %	
Enrichissement	352%			372%	

Figure 53 : Détermination du rendement de purification des protéines ribosomales dans la fraction ribosomale : Western blot utilisant un anticorps dirigé contre la protéine ribosomale RPL13 après migration de 40 µl de l'extrait brut et de 5 µl de la fraction ribosomale sur deux expériences successives. Les quantités de matière fraîche sont calculées en utilisant la quantité de matière fraîche utilisée pour la purification et le volume total de chacune des deux fractions.

semblent déjà trop peu abondantes, je choisis de ne pas précipiter les protéines à l'acétone et acide trichloracétique mais de reprendre directement le culot de protéines, en sortie d'ultracentrifugation, dans un tampon de dénaturation contenant du SDS et du β -mercaptoéthanol (type Laemmli). La teneur en protéines dans les différentes fractions (y compris la fraction ribosomale) est ensuite déterminée au moyen du kit RC DC Protein Assay (Biorad) selon les instructions du kit. Ce kit permet la quantification des protéines peu abondantes dans un tampon présentant des quantités assez élevées de détergents et d'agents réducteurs. Cette quantification révèle une concentration voisine de $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ pour un volume total de $300 \mu\text{l}$, soit une quantité de protéines inférieure à la quantité optimale pour une analyse en identification mais encore tolérable pour une analyse convenable. Afin de vérifier le rendement de la purification, j'ai réalisé un western blot sur l'extrait brut et la fraction ribosomale en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine ribosomale RPL13 de colza et généreusement donnée par Julio Saez-Vasquez (Sáez-Vásquez et al., 2000). Cette analyse a mis en évidence que seuls 5 % de la RPL13 est purifié (**figure 53**), suggérant ainsi une perte importante de ribosomes au cours des différentes étapes de la purification. Néanmoins, ces étapes de purifications ont permis d'enrichir environ trois fois la concentration en ribosomes.

Pour la suite des expériences, il faudra sans doute réaliser un suivi plus fin de chacune des étapes de la purification afin d'identifier l'étape la plus critique entraînant la perte massive des ribosomes et tenter d'y remédier. Un autre point limitant la quantité de protéines ribosomales obtenues pourrait être la quantité de matière fraîche initiale qui serait trop faible. Cependant, étant donné que je parviens tout de même à obtenir une quantité de protéines suffisantes pour l'analyse LC-MS/MS et le manque de temps, j'ai choisi de ne pas procéder à cette dernière mise au point.

I.F. Les expériences M6 à M9

En accord avec les dernières étapes de mise au point, j'ai décidé de ne plus procéder à la précipitation des protéines ribosomales à l'acide trichloracétique – acétone. En outre, pour chaque expérience, afin de contrôler la qualité de la purification et la concentration des protéines ainsi obtenues, j'ai réalisé une quantification des protéines au moyen du kit RC DC Protein Assay (Biorad), une migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

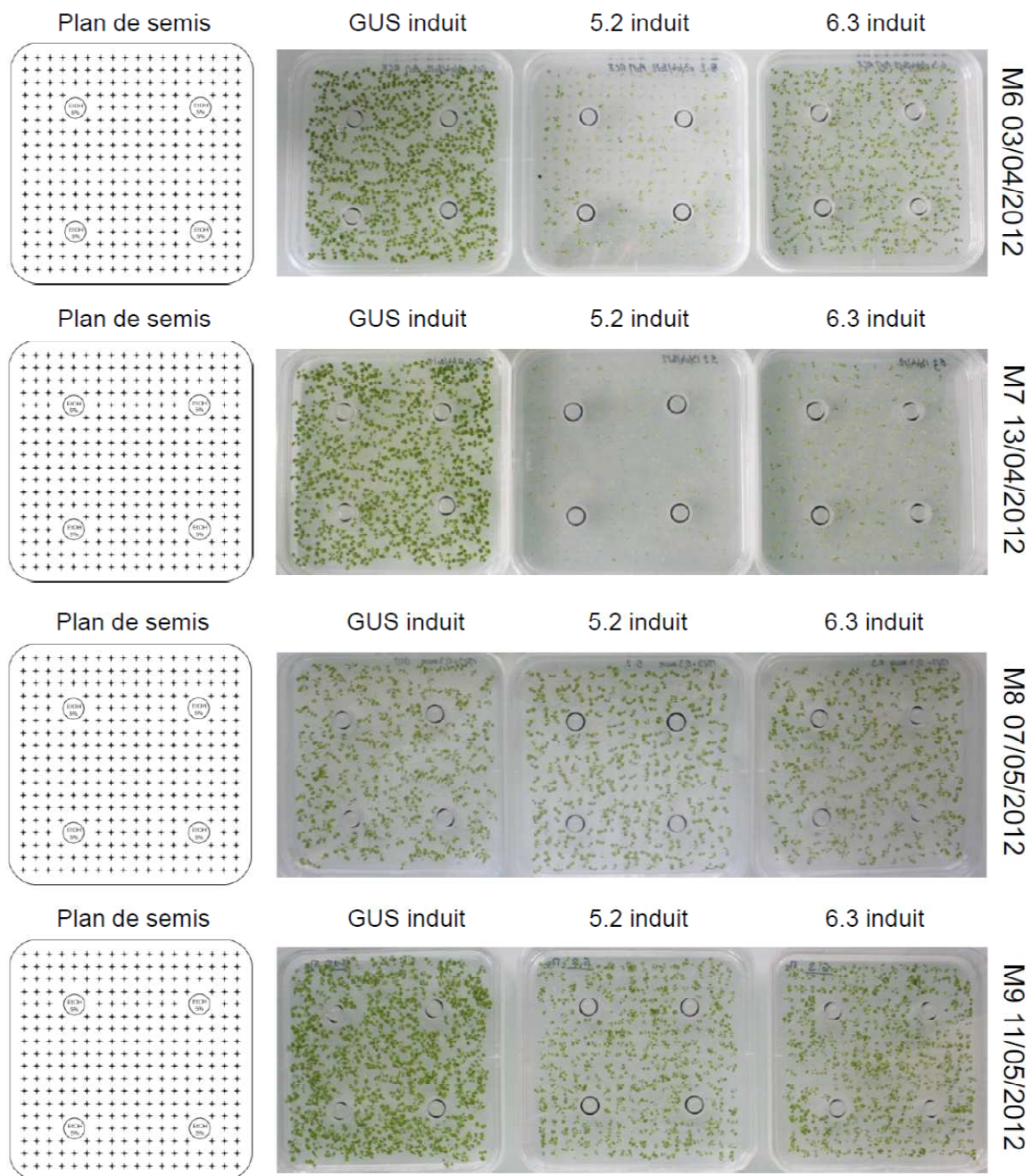


Figure 54 : Phénotypes des lignées TOR RNAi inducibles à l'éthanol utilisées pour les purifications de ribosomes dans les expériences M6 à M9 : Le contrôle GUS ainsi que les deux lignées de TOR RNAi (5.2 et 6.3) ont été cultivées *in vitro* sur du MS 1/5 additionné de saccharose à 0.3% pendant 7 jours en chambre de culture puis l'induction a été réalisée pendant 3 jours par ajout de bouchons contenant de l'éthanol à 5%. Les conditions de culture étaient en jours longs, 25°C constant, 80-90 μ E (A-B) et en jours longs, 24°C jour / 22°C nuit, 50% d'humidité (C-D).

	M1	M6	M7	M8	M9
Milieu de culture	Liquide	MS1/5 + sac 0.3% Agar 0.7%	MS1/5 + sac 0.3% Agar 0.7%	MS1/5 + sac 0.3% Agar 0.7%	MS1/5 + sac 0.3% Agar 0.7%
Conditions de culture	10h/14h	Jour : 16h/8h 25°C cst 80-90 µE	Jour : 16h/8h 25°C cst 80-90 µE	Jour : 16h/8h 24°C J / 22°C N HR = 50%	Jour : 16h/8h 24°C J / 22°C N HR = 50%
Précipitation à l'acétone / TCA	oui	non	non	non	non
Nombre de spectres totaux	1656	4580	2515	3464	3131
Nombre de peptides uniques	818	1631	1096	1439	1181
Nb de groupes protéiques	205	261	217	240	215
Nombre de phosphopeptides différents	7	5	4	3	4
Nb de spectres ribosomaux	477	1392	834	1367	1476
Nb de peptides ribosomaux	220	489	319	495	510
Nb de groupes ribosomaux	56	69	66	69	70

Tableau 9 : Résumé des conditions de culture des expériences M6, M7, M8 et M9 : sac = saccharose, MS = Murashige & Skoog, cst = constant, J = jour, N = nuit, HR = humidité relative, TCA = acide trichloracétique. Les nombres de spectres, peptides, groupes protéiques et phosphopeptides ont été obtenus au cours d'une analyse sur la Q-Exactive, le même jour et dans les mêmes conditions et les résultats ont été traités dans la même analyse X!tandem. L'expérience M1 a également été ré-injectée dans les mêmes conditions.

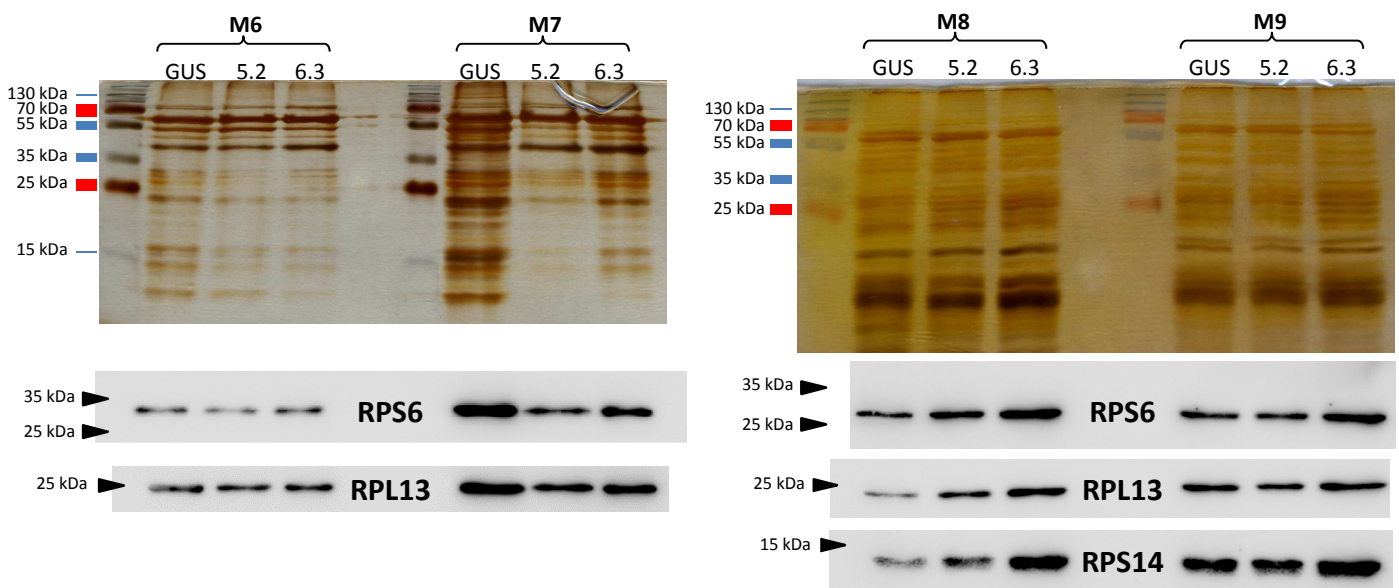


Figure 55 : Profil des protéines ribosomales de plantules de lignées TOR RNAi obtenues au cours de quatre répétitions indépendantes (M6 à M9) : Les ribosomes sont purifiés à partir de plantules de lignées TOR RNAi (5.2 ou 6.3) ou de contrôle (GUS) de 7 jours puis induites pendant 3 jours par ajout de trois bouchons d'éthanol à 5%. Après purification, les particules ribosomales ont été dénaturées dans du Laemmli à 100°C pendant 10 minutes puis déposées sur un gel de SDS-PAGE (5% gel de concentration – 15% gel de séparation). La révélation est réalisée par coloration au nitrate d'argent (en haut) et par western blot utilisant des anticorps dirigés contre la RPS6 et la RPL13 ainsi que la RPS14 (pour les expériences M8 et M9) (en bas).

suivie d'une coloration au nitrate d'argent (plus sensible que le bleu de Coomassie) et des western blot utilisant des anticorps dirigés contre la RPS6 de mammifères (Cell Signaling Technology #2317S), la RPL13 de colza (Sáez-Vásquez et al., 2000) et la RPS14 d'Arabidopsis (Agrisera AS09 477). Une telle approche me permet non seulement de vérifier que la purification a été réalisée convenablement, mais aussi de quantifier les protéines ribosomales afin de normaliser les échantillons par ajout de Laemmli dans les plus concentrés avant l'injection en LC-MS/MS, évitant ainsi des biais trop importants.

I.F.1. Caractéristiques de ces expériences

Contrairement aux expériences précédentes, j'ai choisi de travailler dans des conditions les plus homogènes possibles afin d'obtenir plusieurs répétitions d'une même expérience. Toutefois, j'ai relevé des problèmes d'induction précoce pour les expériences M6 et M7, probablement dues à la présence de solvant dans la chambre de culture, suite au déménagement de nos laboratoires dans des locaux neufs (**figure 54**). J'ai donc réalisé les expériences M8 et M9 dans une autre chambre de culture afin de limiter le plus possible les risques d'induction prématurée (**tableau 9**). Etant donnée cette différence dans les conditions d'induction, les expériences M8 et M9 seront considérées comme ayant été induites pendant 72h tandis que les expériences M6 et M7 seront considérées comme ayant été induites pendant un temps plus long appelé « 10 jours ».

Après migration des protéines sur un gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et plusieurs Western blot ciblant des protéines ribosomales (**figure 55**), j'ai pu ajuster les volumes afin que les échantillons d'une même expérience aient approximativement la même concentration en protéines ribosomales, pré-requis nécessaire pour une analyse quantitative fidèle.

I.F.2. Des ribosomes purifiés

Parmi les protéines identifiées au cours de ces expériences, on note, comme précédemment, la présence d'un nombre relativement important de protéines non ribosomales. Ainsi, sur les 318 groupes protéiques identifiés, près des 2/3 des groupes ne comportaient pas de protéines ribosomales (**figure 56**). Les groupes sont classés par ordre d'abondance décroissante. Ainsi, le groupe de protéines sortant en premier est celui pour

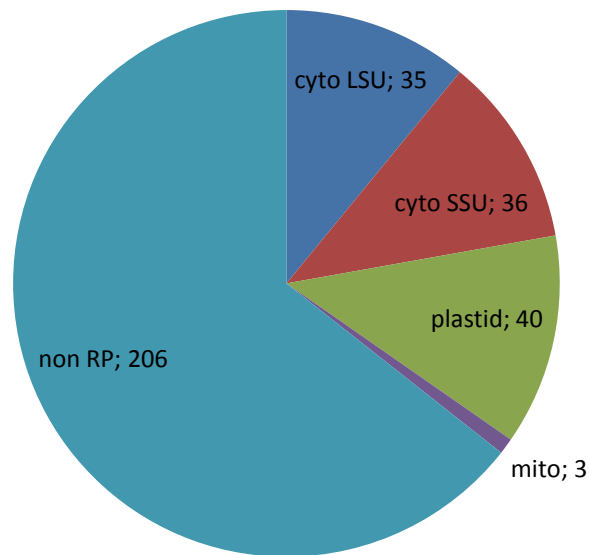


Figure 56 : Répartition des groupes de protéines identifiées dans les expériences M6 à M9 en fonction de leur composition en protéines ribosomales : non RP: protéines non ribosomales ; cyto LSU: protéines de la grande sous-unité du ribosome cytoplasmique ; cyto SSU: protéines de la petite sous-unité cytoplasmique ; plastid: protéines du ribosome chloroplastique ; mito: protéines du ribosome mitochondrial.

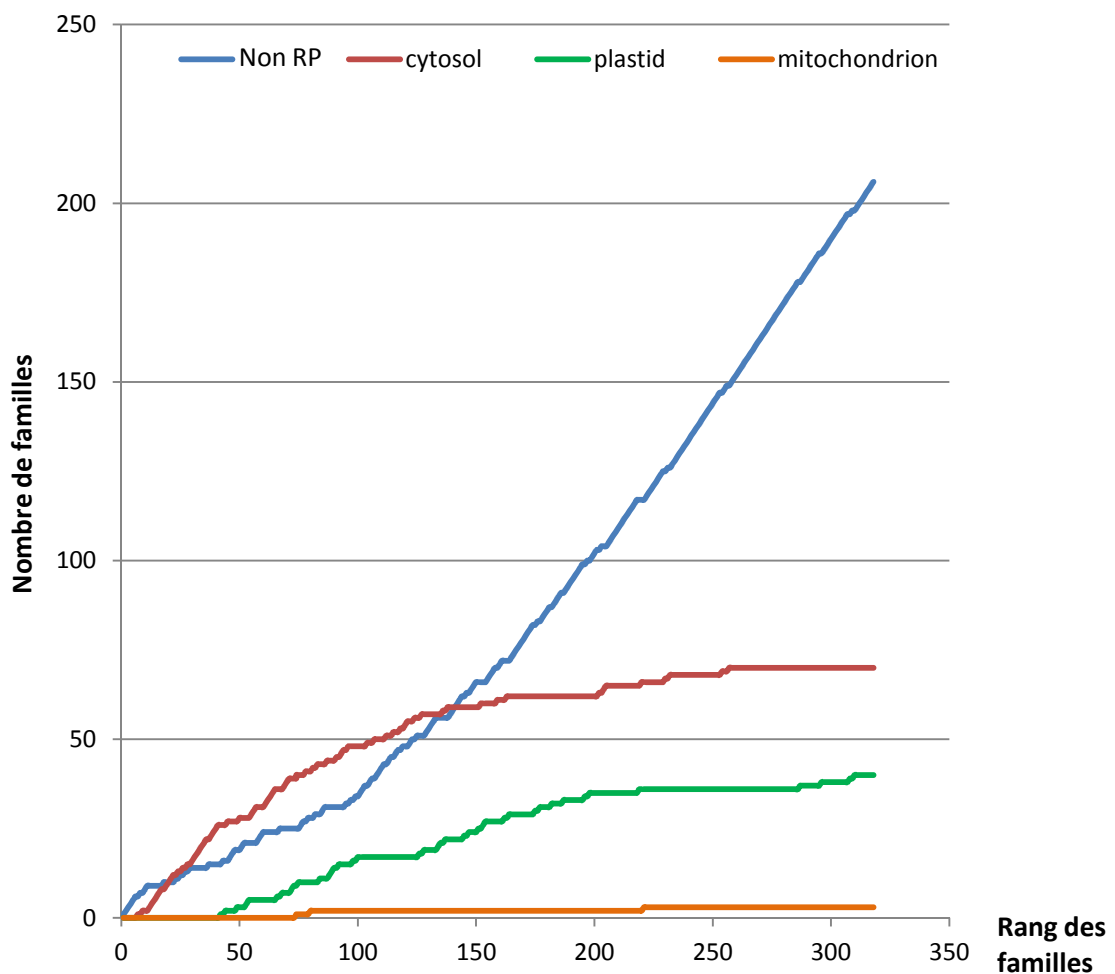


Figure 57 : La répartition des groupes de protéines en fonction de leur composition en protéines ribosomales montre que les analyses permettent d'obtenir un bon recouvrement du ribosome cytoplasmique et chloroplastique : Fréquence cumulée des protéines non ribosomales (Non RP), du ribosome cytoplasmique (cytosol), du ribosome chloroplastique (plastid) et du ribosome mitochondrial (mitochondrion) en fonction du numéro des groupes (et donc de leur abondance décroissante).

Sous-unité	No. groupe	Famille protéique	M1	M6	M7	M8	M9
Grande	163	RPL21A-F	X				
	202	RPL31A-C	X				
	204	RPL27aA-aC	X				
	205	RPL36A-C			X		
Petite	159	RPS15AA-AF			X		
	220	RPS21A-C	X		X		
	254	RPS27A-E	X			X	

Tableau 10 : La grande majorité des groupes contenant des protéines ribosomales est retrouvée dans toutes les expériences : Liste des groupes de protéines ribosomales absents de certaines expériences réparties en fonction de leur appartenance à la grande ou à la petite sous-unité du ribosome cytoplasmique. Les croix indiquent les expériences dans lesquelles le groupe est absent.

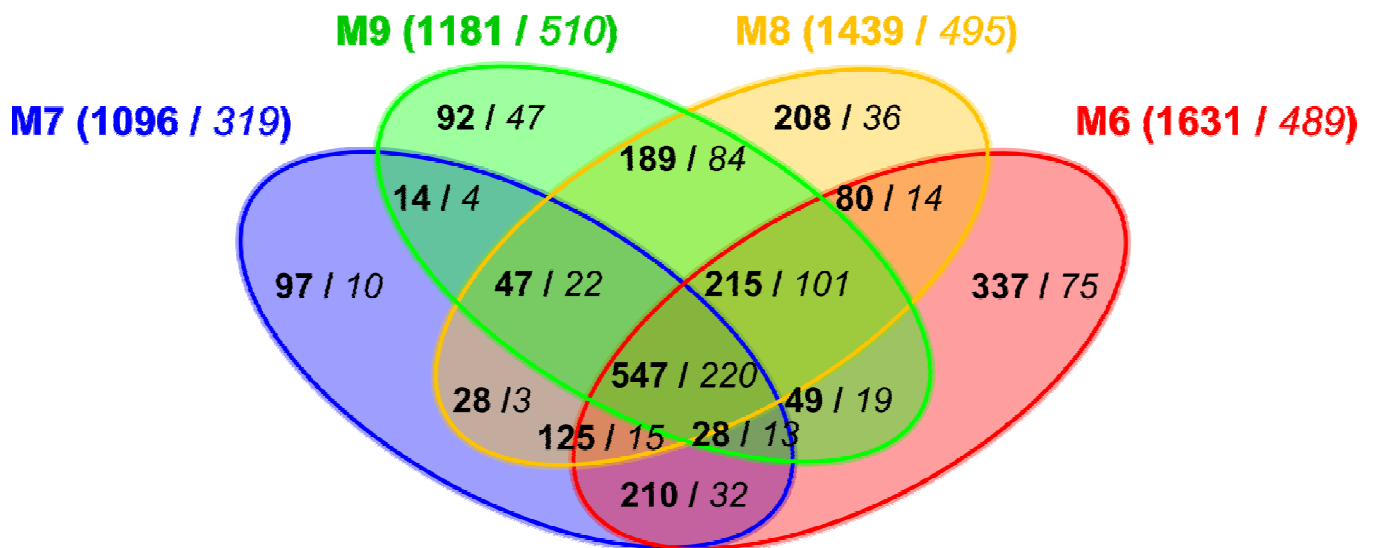


Figure 58 : Recouvrement peptidique entre les répétitions M6, M7, M8 et M9 : Ce diagramme de Venn représente le nombre total de peptides identifiés dans au moins un échantillon de chaque répétition (en gras) suivi du nombre de peptides du ribosome cytoplasmique (en italique). Entre parenthèses se trouve le nombre de peptides identifiés dans une répétition donnée.

lequel le plus de spectres ont été obtenues et l'ordre dans lequel les groupes sont classés nous donne une indication sur l'abondance du groupe au sein de l'échantillon (même s'il dépend également du nombre de membres qui composent le groupe et de la longueur des séquences protéiques). Si on regarde attentivement l'ordre d'apparition des différents ensembles de protéines, on constate que, sur les 320 groupes, les protéines du ribosome cytoplasmique apparaissent dès le 7^{ème} groupe et les protéines du ribosome chloroplastique dès le 42^{ème} groupe. Toutefois, il faut attendre le 74^{ème} groupe pour voir le premier des trois groupes de protéines du ribosome mitochondrial. Il est également à noter que du 16^{ème} au 130^{ème} groupe (environ), les groupes qui sont présents contiennent majoritairement des protéines du ribosome cytoplasmique et que, à partir de ce point, on constate une stagnation du nombre de groupes de protéines du ribosome chloroplastique et une rapide progression du nombre de groupes de protéine non ribosomale (**figure 57**).

Enfin, pour le ribosome cytoplasmique, on sait que la grande sous-unité contient environ 50 protéines pour la grande sous-unité et 30 pour la petite (Chang et al. (2005) avancent les chiffres de 44 et 30 respectivement et Barakat et al. (2001) de 48 et 32 respectivement). Concernant ce ribosome, on parvient, dans cette dernière analyse, à obtenir 35 groupes contenant des protéines de la grande sous-unité et 36 groupes contenant des protéines de la petite sous-unité.

Toutes ces données suggèrent un assez bon recouvrement du ribosome cytoplasmique dans ces dernières expériences. Il semble également que la composition du ribosome plastidial soit représentée convenablement dans nos échantillons et, là aussi, il semble que les derniers groupes soient peu abondants en protéines ribosomales, indiquant que la grande majorité des protéines abondantes ont déjà été identifiées. En revanche, en ce qui concerne le ribosome mitochondrial, le faible nombre de groupes le composant et leur répartition montrent qu'il n'était pas présent en quantité suffisante dans les échantillons.

Dans ces expériences, il est également important de noter que presque tous les groupes de protéines du ribosome cytoplasmique ont été identifiés dans toutes les expériences. Ainsi, parmi les 71 groupes de protéines du ribosome cytoplasmique, seuls sept d'entre eux n'ont pas été identifiés dans chacune des cinq expériences (**tableau 10**). On constate également que près de la moitié des peptides du ribosome cytoplasmique identifiés

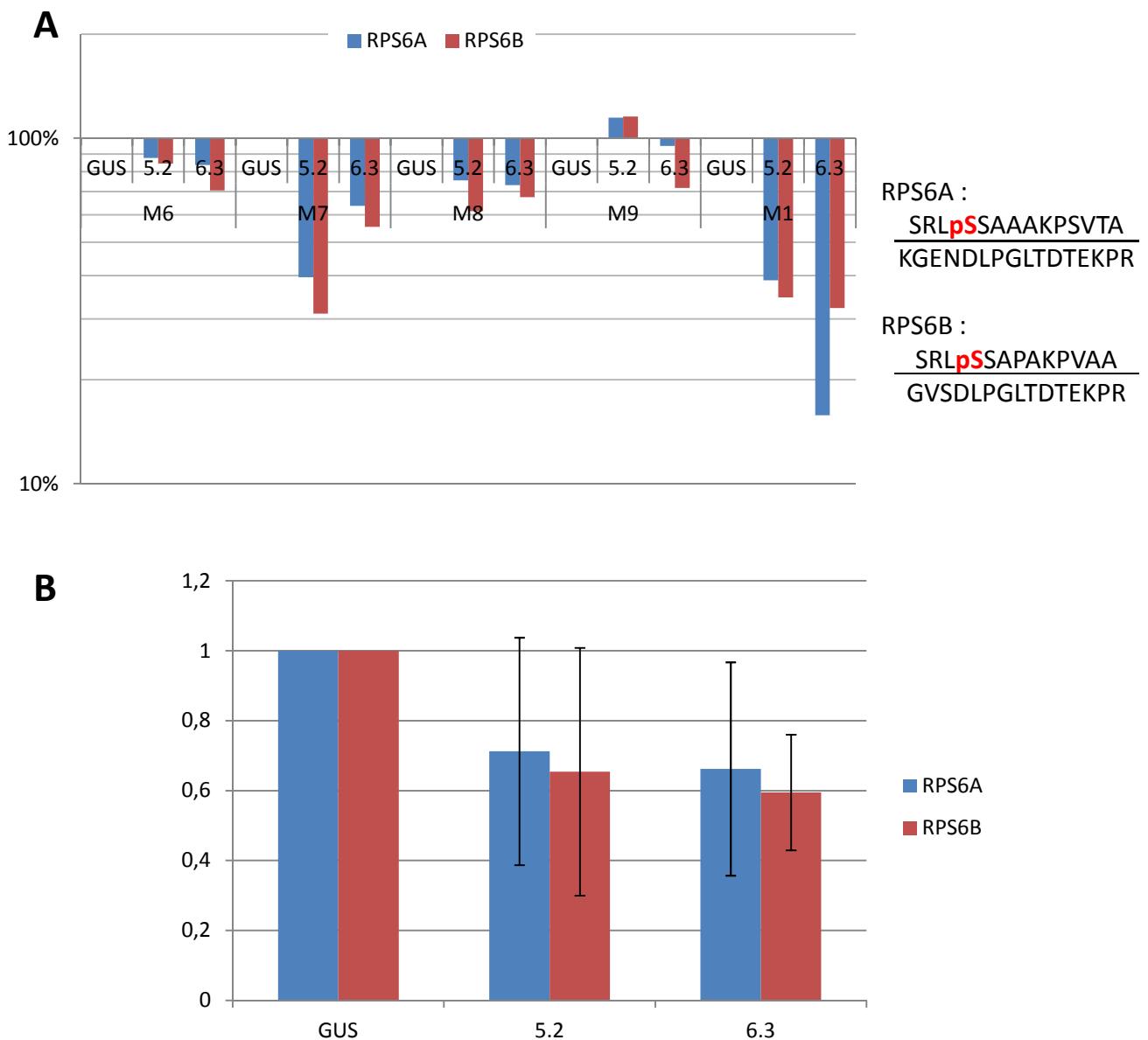


Figure 59 : Vérification de l'inactivation de TOR dans les différents échantillons des expériences M6 à M9 par suivi de l'état de phosphorylation des protéines ribosomales RPS6A et RPS6B : (A) La quantification des peptides C-terminaux phosphorylés normalisés par la quantité de peptides spécifiques de ces protéines RPS6A et RPS6B a été ramenée en pourcentage du niveau de phosphorylation dans le contrôle GUS correspondant. Nous pouvons voir que la plupart des échantillons de lignées TOR RNAi présentent une baisse du niveau de phosphorylation des protéines RPS6A et RPS6B. **(B)** Moyenne \pm Ecart-type de ces expériences

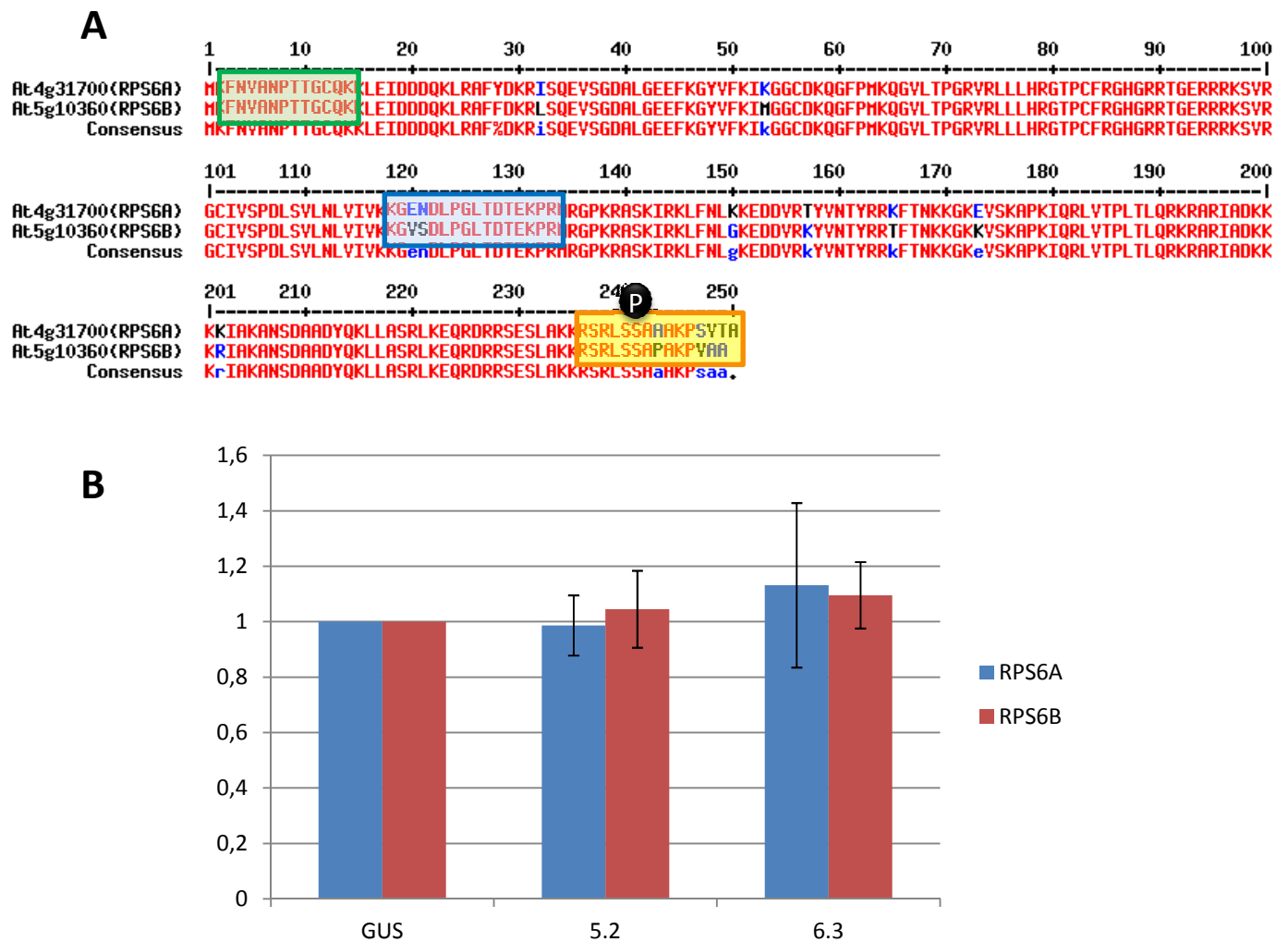


Figure 60 : Suivi de l'effet de l'inactivation de TOR dans les différents échantillons des expériences M6 à M9 sur l'abondance des protéines RPS6A et RPS6B : (A) Alignement des séquences protéiques des RPS6A et RPS6B mettant en évidence les peptides utilisés pour la quantification : en vert, le peptide commun utilisé pour normaliser les quantifications au sein de la famille, en bleu, les peptides spécifiques de chacune des formes utilisés pour quantifier chacune des protéines et pour normaliser au sein des protéines et, en jaune, les peptides phosphorylés (P noir) utilisés pour quantifier le taux de phosphorylation. (B) La quantification des peptides spécifiques de ces protéines a été normalisée par la quantité de peptides communs à ces deux protéines puis ramenée en pourcentage du niveau de phosphorylation dans le contrôle GUS correspondant.

dans l'expérience M9 (220 sur 510) ont été retrouvés dans l'ensemble des quatre expériences (**figure 58**), ce qui représente près de 70% des peptides du ribosome cytoplasmique identifiés dans l'expérience M7.

I.F.3. Confirmation de l'effet de l'état d'activation de TOR sur la phosphorylation de la RPS6

Avant de pousser plus en avant l'analyse des résultats et étant donné que l'on a vu précédemment que l'état de phosphorylation des RPS6A et RPS6B semble être un bon marqueur de l'inactivation de TOR dans nos échantillons, j'ai voulu vérifier cette différence dans les nouveaux échantillons. Ici, l'analyse n'a pas été réalisée en SRM comme précédemment mais directement par mesure des aires sous les pics en utilisant le logiciel MassChroQ v1.2 (Valot et al., 2011). Contrairement à l'analyse que l'on avait réalisée en SRM au cours de laquelle nous n'avions pas pu identifier et quantifier le peptide spécifique de la RPS6A, nous incitant à utiliser le peptide C-terminal non phosphorylé pour normaliser les valeurs, cette approche nous a permis d'utiliser ce peptide spécifique. J'ai donc préféré utiliser ce dernier pour les normalisations, étant donné que c'est un marqueur plus fidèle de l'abondance de la protéine et qui ne dépend aucunement de l'état de phosphorylation de la protéine.

Cette analyse révèle que, comme précédemment, les lignées TOR RNAi inductibles présentent une diminution du niveau de phosphorylation des protéines ribosomales RPS6A et RPS6B (**figure 59**). Ceci confirme bien que l'activité de TOR est nécessaire pour maintenir le niveau de phosphorylation des protéines ribosomales RPS6A et RPS6B.

Étant donné que les quantifications des peptides phosphorylés sont normalisées sur les quantifications des peptides spécifiques, ceci nous permet de s'affranchir de deux variations : l'écart qui pourrait exister au niveau de la quantité de ribosomes dans les échantillons ainsi que la différence d'abondance entre la RPS6A et la RPS6B puisque l'on cherche ici à quantifier le niveau de phosphorylation de chacune de ces protéines indépendamment. Toutefois il est également intéressant de regarder l'abondance de chacune de ces deux protéines au sein de la famille et on constate alors que l'inactivation de TOR ne semble pas entraîner de modification sur la répartition (**figure 60**), signifiant ainsi que, que TOR soit actif ou non, il y a autant de ribosomes utilisant la RPS6A ou la RPS6B et

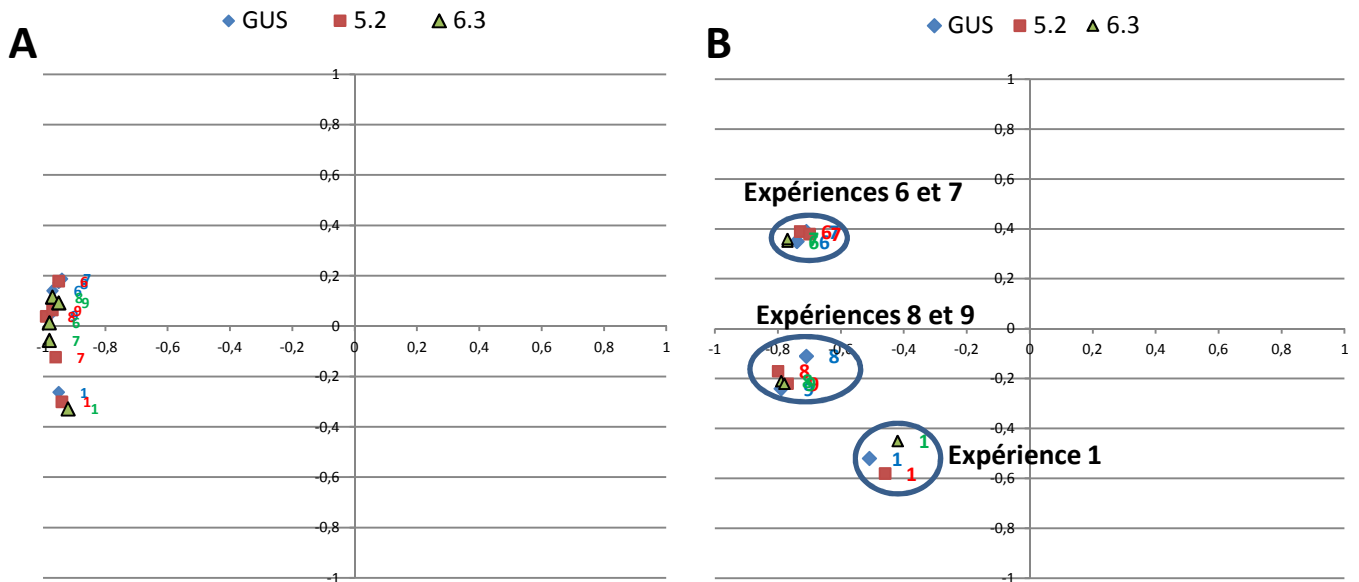


Figure 61 : Analyse en composante principale (ACP) représentant la dispersion des échantillons en fonction des résultats du protéome : Les plantules des lignées TOR RNAi (5.2 et 6.3) ainsi que le contrôle GUS sont représentés en fonction du nombre de spectres obtenus par groupe protéique (A) ou par peptide (B) dans les différents échantillons des répétitions biologiques (M1, M6, M7, M8 et M9). La couleur des points varie en fonction de la lignée et les chiffres à côté représentent le numéro de la répétition associée.

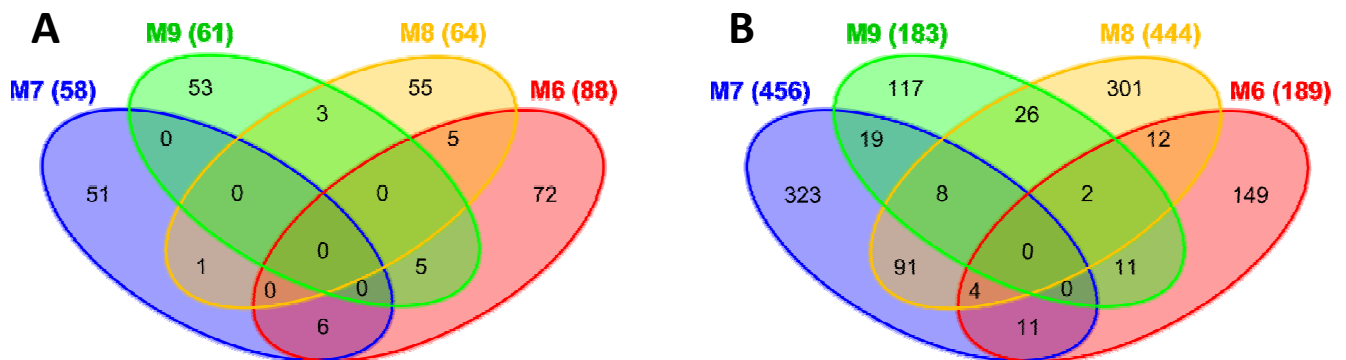


Figure 62 : Les différences de conditions expérimentales entre les expériences M6 et M7 d'un côté et M8 et M9 d'un autre ne permettent pas de mettre en évidence des cibles communes en réponse à l'inactivation de TOR : Les diagrammes de Venn représentent les peptides uniquement présents dans les échantillons des TOR RNAi (A) ou des contrôles GUS (B). Pour la recherche de cibles induites, les peptides présentés ici sont ceux retrouvés dans les deux lignées TOR RNAi et non dans les plantes contrôle GUS. Pour la recherche de cibles réprimées, les peptides présentés ici sont ceux retrouvés dans les plantes contrôles GUS mais dans aucune des deux lignées TOR RNAi

que c'est effectivement uniquement leur taux de phosphorylation qui répond à l'inactivation de TOR.

I.F.4. Recherche de cibles de TOR dans le protéome du ribosome

Le profil de migration des protéines de la fraction ribosomale ne montre pas de différences majeures entre les échantillons contrôle et les échantillons des plantules des lignées de TOR RNAi, suggérant que la réponse à l'inactivation de TOR entraînerait plutôt des modifications de certaines cibles précises et non une perturbation profonde de l'ensemble du protéome (**figure 55**). Afin de vérifier cette hypothèse, j'ai regardé en détail le profil global en nombre de spectres par groupe protéique ou par séquence peptidique de chaque échantillon (**figure 61**). Comme nous pouvons le voir sur ces analyses en composantes principales, le profil des plantes contrôles GUS et celui des lignées TOR RNAi semble identique et la différence de profil est plus forte entre les expériences qu'au sein des expériences. Ceci confirme donc que l'impact de l'inactivation de TOR ne porte pas sur une réorientation complète du protéome de la fraction ribosomale. Ces différences fortes entre les expériences proviennent probablement des différences de conditions de culture et d'induction puisque les expériences M6 et M7 ont été réalisées exactement dans les mêmes conditions ainsi que les expériences M8 et M9.

En outre, ceci suggère également que l'impact des conditions environnementales est fort et risque de ne pas permettre de mettre en évidence des cibles de TOR communes à toutes les expériences. En effet, aucun peptide induit ou réprimé en réponse à l'inactivation de TOR n'est retrouvé dans chacune des quatre expériences (**figure 62**). Cependant, ces mêmes diagrammes mettent en évidence qu'il existe des cibles communes aux expériences M6 et M7 d'un côté et M8 et M9 d'un autre et l'étude de ces cibles va nous permettre de mieux comprendre l'impact de l'inactivation de TOR sur une période de 72h pour l'étude des expériences M8 et M9 et pour des temps plus longs pour les expériences M6 et M7.

I.F.4.a. Régulation des protéines non ribosomales

La liste des cibles ainsi obtenus (**tableau 11**) permet de confirmer un certain nombre d'observations qui avaient déjà été faites sur les premières expériences et permet également de mettre en évidence des cibles potentielles nouvelles. Ainsi, comme au cours

Séquence peptidique	Exp.	Groupe	Protéines
KYYLQR	M6, M7	1	at1g52400 (BGLU18), at1g54350 (ABC transporter), at1g66270 (BGLU21), at1g66280 (BGLU22), at3g09260 (PYK10), at3g21370 (BGLU19)
GPALWDIFCK	M8, M9	1	at1g66280 (BGLU22)
GEPYESSIFEAGYK	M6, M7	8	at5g26260 (TRAF-like)
GGDVVDDGGAYDNVK	M8, M9	10	at3g16470 (JR1)
WIPCVFELEHGFVYR	M8, M9	11	at1g67090 (RBCS1A (Rubisco (small))), at5g38410 (Rubisco (small)), at5g38420 (Rubisco (small)), at5g38430 (Rubisco (small))
VLAHTQIR	M6, M7	12	at1g43170 (RPL3A) ^c , at1g61580 (RPL3B) ^c
APGSFTNR	M8, M9	13	at4g34670 (RPS3aB) ^c
KVYVGGQGDGISAVK	M8, M9	18	at3g16450 (Mannose-binding lectin superfamily protein)
VDAPVKEPAK	M8, M9	20	at1g18540 (RPL6A) ^c
ASFHNFSYR	M8, M9	23	at5g62390 (BCL-2-associated athanogene 7)
ENGEVSHTYIHK	M8, M9	23	at5g62390 (BCL-2-associated athanogene 7)
NVVEQLVR	M6, M7	29	at3g14420 (Aldolase)
PVVFALAAEAGEAGVK	M6, M7	29	at3g14415 (Aldolase)
VETVTLGPSVR	M8, M9	31	At3g11510 (RPS14B) ^c
VENVTLGPAVR	M8, M9	31	at3g52580 (RPS14C) ^c
LPHIPRPK	M8, M9	33	at1g08360 (RPL10aA) ^c , at2g27530 (RPL10aB) ^c
DAGVIAGLNVAR	M8, M9	37	at5g28540 (heat shock protein 70 (Hsp 70) family protein), at5g42020 (Heat shock protein 70 (Hsp 70))
EKLEASGCTLTVLPGR	M6, M7	42	at3g25920 (RPL15) ^p
GTVEITPVELIK	M6, M7	45	at2g40010 (RPP0A) ^c , at3g11250 (RPP0C) ^c , at3g09200 (RPP0B) ^c
SFQCCLVMAK	M8, M9	48	at2g39730 (rubisco activase)
TIASPGHGIMAMDESATCGK	M8, M9	51	at2g21330 (fructose-bisphosphate aldolase 1)
ASDHVNTDKPWVVDATDK	M6, M7	54	at1g78630 (RPL13A)
KIEDNNTLVFIVDIR	M6, M7	55	At2g39460 (RPL23aA) ^c , At3g55280 (RPL23aB) ^c
EKYETNPALYGELAK	M8, M9	58	at3g01500 (carbonic anhydrase 1), at5g14740 (carbonic anhydrase 2)
NVTDLIMNVGAGGGGAPVSAAPAAAGAAAAAPAKEEK	M6, M7	61	at4g00810 (RPP1B) ^c
DLQEQIQEGEIEIPEN	M6, M7	63	at3g53430 (RPL12B) ^c
AHFTAPSSVR	M8, M9	64	at5g67510 (RPL26B)
GILDVCDAPLVSVDNR	M6, M7	67	at1g42970 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
PASPGTGVIAGGAVR	M6, M7	68	at2g33800 (RPS5) ^p
YSEGLEEDKK	M8, M9	72	atcg00800 (RPS3aN) ^p
GPIENLADHLADPVNNNAWAFATNFVPGK	M8, M9	76	at1g29910 (LHCB1.2), at1g29920 (LHCB1.1), at1g29930 (LHCB1.3)
VCTDLVR	M8, M9	91	at3g45030 (RPS20A) ^c , at3g47370 (RPS20B) ^c , at5g62300 (RPS20C) ^c
YLFAGVVDGR	M8, M9	95	at3g03780 (methionine synthase 2), at5g17920 (Cobalamin-independent synthase family protein)
IAPEEHPVLLTEAPLNPK	M8, M9	99	at1g49240 (actin 8), at3g18780 (actin 2)
IFTHNSTIVIK	M8, M9	100	at5g54600 (RPL24) ^p
VMDLADYR	M8, M9	106	at1g56110 (NOP56), at3g12860 (NOP56-like)
QEEEGKEPVDASVK	M8, M9	106	at1g56110 (NOP56)
ALFANDLPSELVEATTFLSDAEVK	M8, M9	122	at5g20630 (ATGER3, germin 3)
AGAPADYQPGFR	M6, M7	124	at5g41520 (RPS10B) ^c
DMAEELIILR	M8, M9	126	at5g14320 (RPS13) ^p
NVGSVAVDQDPK	M8, M9	131	at2g20260 (photosystem I subunit E-2), at4g28750 (Photosystem I reaction centre subunit IV)
SFVALPVIAR	M8, M9	134	at1g79850 (RPS17) ^p
KLENNDFAGAVFEGK	M8, M9	147	at5g13510 (RPL10) ^p
VKEEAQLAMVFTQVGAFAK	M6, M7	154	At3g44890 (RPL9/ CL9) ^p
TDAAATLIQSNIDAR	M6, M7	174	at3g21720 (isocitrate lyase)
ILYEMGGVPENIAR	M8, M9	175	Atcg00790 (RPL16) ^p
AIDLIDEAGSR	M8, M9	180	at3g48870 (HSP93-III), at5g50920 (ATHSP93-V), at5g51070 (CLPD, ERD1, SAG15, Clp ATPase)
TIEAAAHGTVTR	M8, M9	183	at1g54340 (isocitrate dehydrogenase), at1g65930 (cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase)
AVSETSDELAK	M8, M9	189	at4g10340 (LHCB5)
EGFIENVR	M6, M7	196	atcg00770 (RPS8) ^p
AVFVDLEPTVIDEVR	M8, M9	200	at4g14960 (Tubulin/FtsZ family protein), at1g50010 (tubulin alpha-2 chain), at1g04820 (tubulin alpha-4 chain), at5g19780 (tubulin alpha-5), at5g19770 (tubulin alpha-3)
FGSDAQYVAVGSMR	M8, M9	214	at2g33340 (MOS4-associated complex 3B)
EIEEQCLGNVEK	M8, M9	216	At1g15200 (protein-protein interaction regulator family protein)
MGNITPTTGTGQQR	M6, M7	227	at3g49120 (peroxidase CB), at3g49110 (peroxidase CA)
VHACVGGTSVR	M8, M9	235	at1g54270 (EIF4A-2), at3g13920 (EIF4A1)
WLAYGEIINGR	M8, M9	239	at1g61520 (LHCA3)
SAYELSSVAGNADK	M8, M9	270	at1g09770 (AtCDC5)
KYPGGAFDPLGYSK	M6, M7	272	at3g54890 (LHCA1)
IYAGVNASDVNFSSGR	M6, M7	274	at1g49670 (NQR, ARP protein (REF))
EALQAAVGLPVDR	M6, M7	286	at1g32900 (UDP-Glycosyltransferase)

Tableau 11 : Liste des peptides dont l'abondance varie entre les lignées TOR RNAi et les contrôles GUS : Les peptides surlignés en violet ne sont présents que dans les échantillons des lignées contrôles GUS tandis que les peptides surlignés en orange ne sont présents que dans les échantillons des lignées TOR RNAi. La colonne « Exp. » indique les numéros des expériences dans lesquelles ce peptide a été identifié. ^c Ribosome cytosolique, ^p Ribosome plastidial

des premières répétitions, on retrouve une répression des protéines impliquées (i) dans la machinerie photosynthétique telles que les différentes sous-unités de la RubisCO, des protéines liées aux photosytèmes ou encore des RubisCO activases, (ii) dans la composition des ER bodies telles que la protéine PYK10, des lectines ou encore des jacalines et (iii) des protéines impliquées dans le métabolisme du carbone dont de nombreuses aldolases.

Parmi les protéines réprimées se trouvent également plusieurs protéines de cytosquelette comme les actines et les tubulines. Enfin, on peut également noter que certains peptides de protéines en lien avec la germination sont également dérégulés. Ainsi, la protéine GER3 (Germin 3) est réprimée et l'isocitrate lyase, impliquée dans la mobilisation des réserves carbonées lipidiques durant la germination, est induite.

Toutefois, les raisons pour lesquelles de telles protéines ont été co-purifiées restent à être élucidées. Certaines d'entre elles ont vraisemblablement été co-purifiées avec les ribosomes en raison de leur participation à des complexes de grosse taille, comme les ER bodies, d'autres en revanche, peuvent être présentes dans les échantillons en raison de leur fixation sur le ribosome au cours de la traduction protéique. Afin de vérifier cette dernière hypothèse, il faudrait séparer le ribosome des autres complexes macromoléculaires en procédant à des centrifugations successives ou en immunoprécipitant les ribosomes en utilisant des anticorps dirigés contre des protéines ribosomales. Toutefois, étant donnée la faible concentration en protéines dans la fraction ribosomale obtenue ici, j'ai choisi de ne pas chercher à être trop stringent dans la préparation des échantillons.

I.F.4.b. Régulation qualitative des protéines ribosomales par TOR

On constate que, dans ces expériences, de nombreuses protéines ribosomales semblent dérégulées, contrairement à ce que l'on avait observé dans les premières expériences. On retrouve ainsi des protéines des petites et grandes sous-unités du ribosome cytosolique et du ribosome plastidial. De manière intéressante, on constate que tous les peptides des protéines du ribosome plastidial (qu'elles soient codées par le génome nucléaire ou chloroplastique) qui sont dérégulés montrent une abondance plus faible lors de l'inactivation de TOR. Cette diminution peut être partiellement due à une diminution de l'abondance de ribosomes chloroplastiques dans l'échantillon puisqu'un des symptômes les

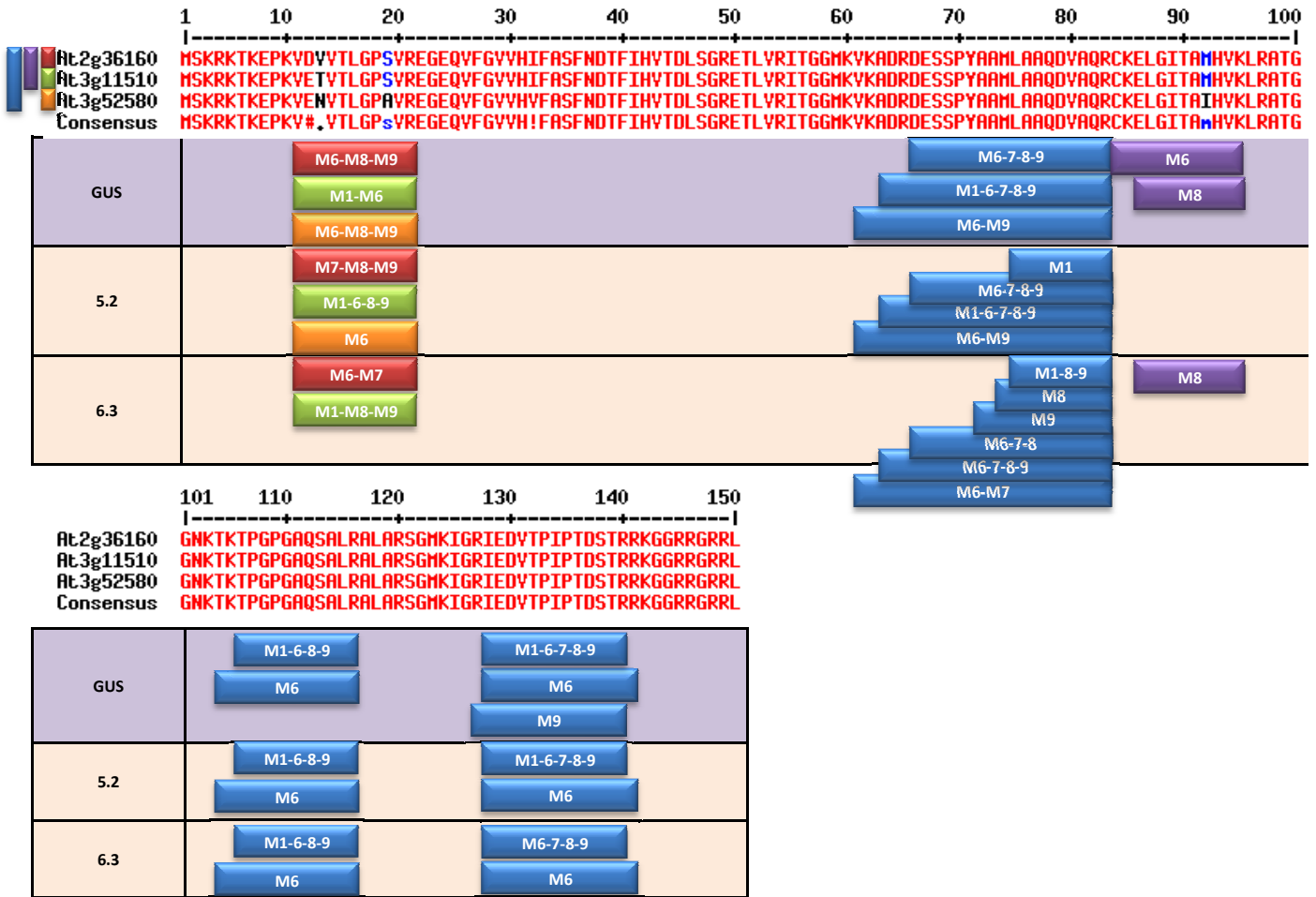


Figure 63 : 72h d'inactivation de TOR semble induire l'accumulation de la RPS14C et réprimer l'accumulation de la RPS14B : Séquence peptidique des protéines ribosomales RPS14A (At2g36160), RPS14B (At3g11510) et RPS14C (At3g52580) présentant les différents peptides tels qu'ils ont été retrouvés dans les expériences M1, M6, M7, M8 et M9. Les rectangles représentent les différents peptides, leur couleur représente leur spécificité (bleu: non spécifique, rouge: spécifique de RPS14A, vert: spécifique de RPS14B, orange : spécifique de RPS14C, violet : commun aux RPS14A et B) et leur position indique l'échantillon dans lequel ils ont été identifiés. Les numéros dans les rectangles représentent les numéros des expériences dans lesquelles on les a trouvés.

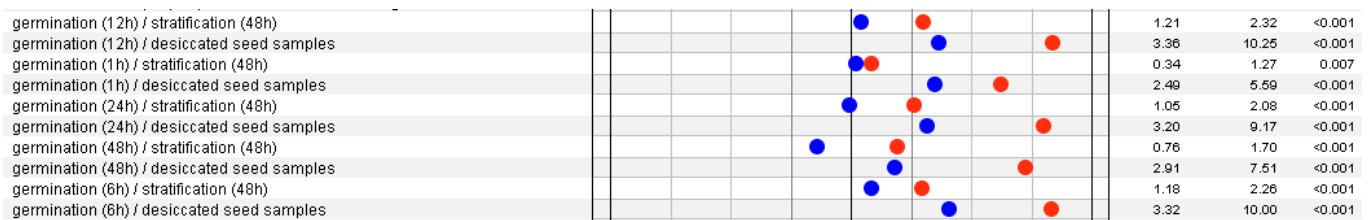


Figure 64 : L'expression des gènes codant la RPS14B (rouge) et codant la RPS14C (bleu) varie beaucoup au cours de la germination : Données extraites de Genevestigator.

Expériences	M1			M6			M7			M8			M9		
	5.2	6.3	GUS	5.2	6.3	GUS	5.2	6.3	GUS	5.2	6.3	GUS	5.2	6.3	GUS
Spectres non ribosomaux	342	389	325	983	949	943	380	448	681	472	368	780	477	364	517
Spectres ribosomaux	267	161	172	548	470	687	230	297	479	544	558	742	553	589	631
Total général	609	550	497	1531	1419	1630	610	745	1160	1016	926	1522	1030	953	1148

Tableau 12 : Quantification des spectres totaux dans les différents échantillons différenciés selon qu'ils sont ribosomaux ou non : Le nombre de spectres peut être considéré comme une indication de l'abondance des protéines et, donc, le nombre de spectres totaux peut être utilisé pour normaliser les échantillons.

plus précoces consécutifs à l'inactivation de TOR est l'apparition de chloroses. En revanche, concernant les peptides des protéines du ribosome cytosolique, quatre peptides sont induits et huit sont réprimés.

Un cas intéressant est celui de la RPS14. En effet, un peptide spécifique de la RPS14B n'a été retrouvé, pour les expériences M8 et M9, que dans les lignées TOR RNAi alors qu'un peptide spécifique de la RPS14C n'a été retrouvé que dans les lignées contrôles GUS dans ces mêmes expériences. Ceci suggère donc une dérégulation divergente des protéines RPS14B et RPS14C en réponse à l'inactivation de TOR (**figure 63**). Une analyse Genevestigator révèle que ces deux gènes sont fortement coexprimés dans les mutants et au cours des stress et que At3g11510 (RPS14B) est toujours un peu plus exprimés que At3g52580 (RPS14C) dans les différents tissus de la plante. Toutefois, on remarque une grande disparité de réponse au cours de la germination (**figure 64**).

On note également la présence d'une catégorie de protéines dont la variation n'avait pas encore été mise en évidence au cours des premières expériences et qui contient les protéines acides du stalk ribosomal RPP0, RPP1, RPP2 et RPP3. Deux peptides (un commun aux RPP0A, RPP0B et RPP0C et un spécifique de la RPP1B) apparaissent comme réprimés en réponse à l'inactivation de TOR dans les expériences M6 et M7.

I.F.4.c. Régulation quantitative des protéines ribosomales par TOR

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation des dérégulations au sein du ribosome en réponse à l'inactivation de TOR, j'ai réalisé une analyse quantitative des différentes protéines ribosomales. Etant donné la méthode expérimentale utilisée, la méthode de quantification la plus convenable était une méthode non marquée reposant sur le décompte des spectres totaux de peptides correspondant à une protéine donnée (Bantscheff et al., 2007). Cette technique de « comptage des spectres » a été montrée comme présentant une bonne corrélation avec l'abondance de la protéine correspondante dans les mélanges protéiques complexes (Old et al., 2005). Toutefois, étant donnée la grande homologie de séquences entre les protéines ribosomales d'une même famille et le nombre important de peptides pouvant provenir de plusieurs protéines d'une même famille, une telle approche était un peu compliquée. Je l'ai donc quelque peu modifiée en ne comptabilisant que les

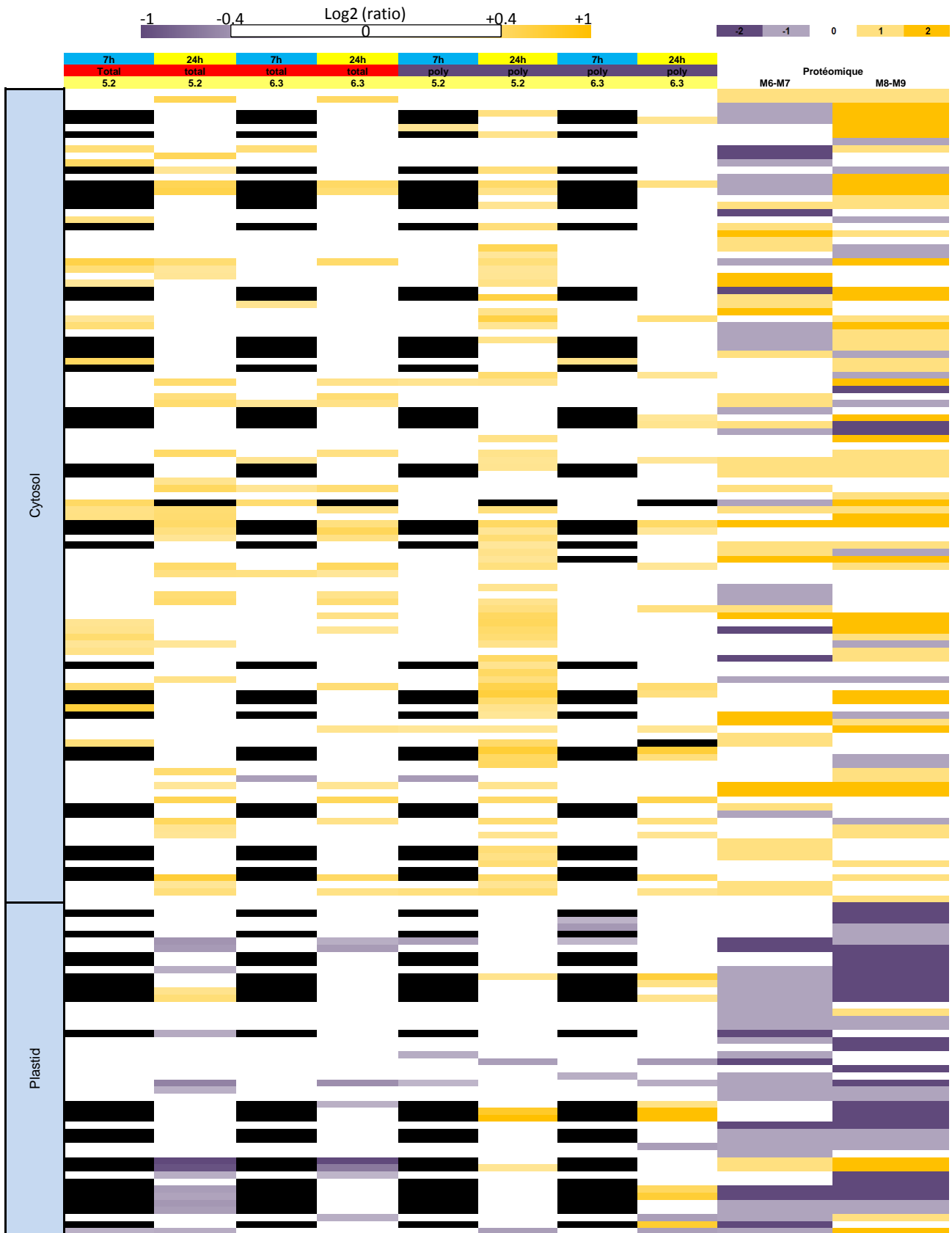


Figure 65 : Comparaison des résultats du transcriptome, du traductome et du protéome des protéines ribosomales : Seules les protéines identifiées au moins une fois dans une expérience de protéome sont représentées ici. Les données brutes de transcriptome et de traductome ont été obtenues par Manon Moreau sur des puces CATMA. La « quantification » des expériences de protéome a été menée en comptant le nombre de spectres spécifiques pour chaque protéine et en rapportant cette valeur au nombre de spectres ribosomaux dans l'échantillon : Les chiffres correspondent au nombre d'expériences dans lesquelles cette protéine a été trouvée induite (positif) ou réprimée (négatif). Les cases noires représentent des absences de données. L'annotation des colonnes de gauche repose sur les travaux de Sormani et al. (2011).

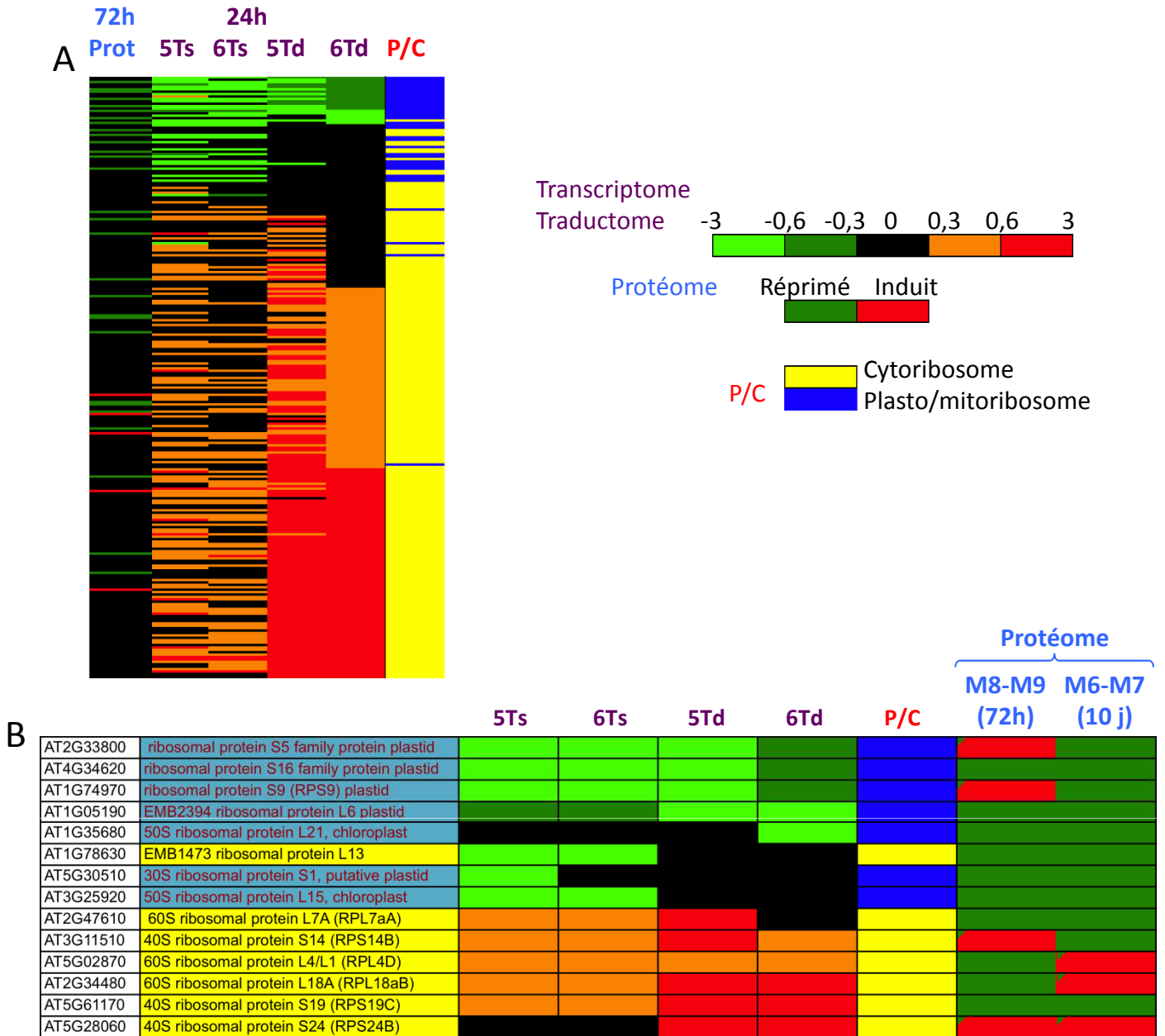


Figure 66 : (A) Comparaison des profils transcriptomiques (Ts), traductomiques (Td) et protéomiques (Prot) des gènes nucléaires et mitochondriaux codant des protéines ribosomiques plastidiales, mitochondriales et cytosoliques. Seuls les gènes exprimés de façon différentielle dans les expériences de transcrip/traductomique ont été retenus (250 gènes). Prot: expériences M6 et M7 de protéome. (B) Gènes exprimés de façon différentielle dans les expériences de transcrip/traductomique et de protéomique (temps d'induction à l'éthanol : 24h pour les expériences de transcriptomique et traductomique et 72h ou 10 jours (72h et 10 j) pour les expériences de protéomique).

5, 6: lignée 5-2 et 6-3

24h: temps d'induction par l'éthanol

spectres correspondant aux peptides spécifiques de chaque protéine. Etant donné que, dans plusieurs cas, cette quantification ne repose que sur un seul peptide, elle devra être complétée *a posteriori* d'une quantification des peptides par une autre méthode. Pour réaliser cette étude quantitative, j'ai utilisé, pour chaque protéine, le nombre de spectres correspondant à des peptides spécifiques et j'ai normalisé en utilisant le nombre de spectres totaux des groupes ribosomaux (**tableau 12**). On constate, comme précédemment, que les résultats obtenus pour les expériences M6 et M7 d'une part et M8 et M9 d'autre part ne sont pas toujours concordants (**figure 65, Annexe 2**).

Lorsque l'on compare ces résultats avec ceux du transcriptome (abondance des ARN messagers totaux) et du traductome (abondance des ARN messagers liés aux ribosomes et, donc, en cours de traduction) obtenus après 7h et 24h d'inactivation de TOR, on retrouve une répression bien conservée de l'abondance des protéines du ribosome chloroplastique, corrélée à une diminution de la quantité d'ARN messagers transcrits et traduits. Ceci tend donc à montrer que le phénomène de chlorose observé lors de l'inactivation de TOR peut certes s'expliquer par une dégradation des chloroplastes, mais aussi par une diminution de leur synthèse et, notamment, des protéines du ribosome chloroplastique codées par le génome nucléaire.

De manière intéressante, on note que les protéines du ribosome cytosolique sont peu dérégulées transcriptionnellement et traductionnellement mais qu'il semble que l'inactivation de TOR entraîne une induction, certes légère mais globale, de la transcription et de la traduction de ces mêmes gènes. Il est également à noter que les protéines du ribosome cytosolique sont plus nombreuses à être induites dans les expériences M8 et M9 qui n'ont eu que 72h d'inactivation que dans les expériences M6 et M7 qui ont été induites pendant plus longtemps. Ceci pourrait s'expliquer par une réponse dynamique et cinétique à l'inactivation de TOR. Enfin, la comparaison de l'expression des gènes ribosomaux à l'échelle transcriptomique, traductomique et protéomique (à différents temps d'induction) met en évidence des modifications d'expression (**figure 66**).

Lorsque l'on compare les profils de régulation des protéines lors de l'inactivation de TOR au sein des familles de protéines ribosomales, on constate que certains membres de ces familles montrent des variations d'abondance qui ne vont pas dans le même sens. Il en va

Familles protéiques	Protéines	72h (M8-M9)	10 j (M6-M7)
RPL10	RPL10A	rouge	rouge
	RPL10C	rouge	vert
RPL13	RPL13B	rouge	rouge
	RPL13D	blanc	vert
RPL3	RPL3A	rouge	blanc
	RPL3B	vert	blanc
RPL7a	RPL7aA	vert	vert
	RPL7aB	rouge	blanc
RPP1	RPP1A	rouge	vert
	RPP1B	rouge	rouge
	RPP1C	rouge	blanc
RPS14	RPS14A	rouge	blanc
	RPS14B	rouge	vert
	RPS14C	vert	blanc
RPS15	RPS15A	vert	blanc
	RPS15D	rouge	vert
RPS5	RPS5A	blanc	rouge
	RPS5B	blanc	vert

Tableau 13 : Comparaison des profils d'abondance des protéines du ribosome cytosolique suite à l'inactivation de TOR : Les protéines sont regroupés en familles protéiques et l'effet de l'inactivation de TOR sur la régulation de ces protéines est représenté en vert (réprimé), blanc (non dérégulé) ou rouge (induit). L'intégralité des données brutes est données en Annexe 1.

ainsi notamment pour les familles de protéines RPL10, RPL13, RPL3, RPL7a, RPP1, RPS14, RPS15, RPS5 (**tableau 13**).

Afin de vérifier l'exactitude de ces profils, une approche de quantification non marquée de certains peptides spécifiques de chacune de ces protéines va être utilisée. Cependant ce qui est connu et publié sur ces protéines et leurs familles sera développé au cours de la partie Discussion.

I.F.5. Recherche de cibles au niveau du phosphoprotéome

De manière très surprenante, cette dernière analyse n'a permis d'identifier que quelques rares peptides phosphorylés qui sont, pour la quasi-totalité, des peptides appartenant à des protéines ribosomales (**figure 67**). Il semble que l'inactivation de TOR entraîne des modifications quantitatives du niveau de la phosphorylation de ces protéines mais, principalement du fait qu'un seul spectre ou moins ne soit retrouvé par peptide et par échantillon, cette modification quantitative est difficilement appréciable en l'état.

Parmi ces peptides, on en retrouve plusieurs qui correspondent à l'extrémité C-terminale des protéines acides constitutives du stalk ribosomal. Qui plus est, ces phosphorylations semblent régulées par l'inactivation de TOR. Ainsi, on constate que les phosphorylations sur les peptides des protéines RPP2 et RPP3 pourraient être réprimées lors de l'inactivation de TOR puisqu'on ne les retrouve que dans les contrôles GUS alors qu'un peptide de la RPP1 semble être induit par l'inactivation de TOR. Ainsi, il semble que la phosphorylation de l'extrémité C-terminale des protéines acides constitutives du stalk (RPP) semble jouer un rôle important. L'importance de la phosphorylation des protéines de cette famille sera abordée au cours de la Discussion. La modulation de phosphorylation de ces protéines est d'autant plus intéressante que les différentes RPP1 semblent également être différenciellement régulés par l'inactivation de TOR au niveau protéomique.

Afin de pouvoir aller plus loin dans la discussion des résultats de phosphoprotéome, il faudrait quantifier chacun de ces peptides et, en l'absence de ces résultats, les commentaires seraient trop spéculatifs.

A

Sequence	Modifs	M1			M6			M7			M8			M9		
		5.2	6.3	GUS	5.2	6.3	GUS	5.2	6.3	GUS	5.2	6.3	GUS	5.2	6.3	GUS
AAEISTPER	T6:+79.96633	1	1													
GRSPPPPPPR	S3:+79.96633	1														
KDEPAEESDGLGFLFD	S8:+79.96633										1			1		
KEEKEESDDDMGFSLFE	M11:+15.99491 - S7:+79.96633				1	1	1									
	S7:+79.96633						1									
KKDEPAEESDGLGFLFD	S9:+79.96633				1	1	1	1	1	1						
KKEESEEEDGDFGDLFG	S5:+79.96633															1
PPSSKPAKSGGGK	S10:+79.96633 - P1:+42.01056				1			1	1							
SRLSSAAAKPSVTA	S1:+79.96633			1							1					
	S4:+79.96633				1		1		1	1		1	1	1	1	1
SRLSSAPAKPVAA	S4:+79.96633					1				1	1	1	1	1	1	1
VASPENGAVR	S3:+79.96633		1													
VSSPPKPVSAAPK	S3:+79.96633	1		1												

B

Séquences peptidiques	Annotations
AAEISTPER	At4g31880
GRSPPPPPPR	At3g55460 (SCL30)
KDEPAEESDGLGFLFD	At1g01100 (RPP1A), At4g00810 (RPP1B), At5g47700 (RPP1C)
KEEKEESDDDMGFSLFE	At2g27710 (RPP2B), At3g44590 (RPP2D), At2g27720 (RPP2A)
KKDEPAEESDGLGFLFD	At1g01100 (RPP1A), At5g47700 (RPP1C), At4g00810 (RPP1B)
KKEESEEEDGDFGDLFG	At4g25890 (RPP3A), At5g57290 (RPP3B)
PPSSKPAKSGGGK	At4g39200 (RPS25E), At2g21580 (RPS25B), At4g34555 (RPS25F)
SRLSSAAAKPSVTA	At4g31700 (RPS6A)
SRLSSAPAKPVAA	At5g10360 (RPS6B)
VASPENGAVR	At5g52040 (AT-RS41)
VSSPPKPVSAAPK	At1g16610 (RNPS1)

Figure 67 : L'inactivation de TOR semble modifier le profil phosphoprotéomique au sein de la fraction ribosomale : A : Le nombre de spectres de chaque peptide phosphorylé est indiqué pour chaque échantillon au sein des différentes expériences. Les peptides potentiellement induits sont surlignés en orange tandis que les peptides surlignés en violet sont potentiellement réprimés. B : Annotation des peptides présentant un phénomène de phosphorylation au moyen de Patmatch. Les lignes écrites en rouge correspondent aux protéines du stalk ribosomal.

I.G. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était d'identifier des cibles de TOR au sein d'une particule subcellulaire abondante et facile à purifier du fait de sa densité et de sa masse élevées. Le choix de cette particule repose également sur le fait que le ribosome est une cible clé de TOR chez les mammifères. En effet, la protéine ribosomale RPS6 est phosphorylée par la S6 kinase qui a été activée par une phosphorylation due à la kinase TOR. Qui plus est, il a également été montré, chez les plantes, que l'inactivation de TOR entraîne une différence d'abondance de ces particules.

L'approche utilisée est une approche de protéomique et phosphoprotéomique par LC-MS/MS qui permet de suivre la présence et l'abondance des protéines et de leur phosphorylation dans une fraction enrichie en ribosomes. Ces résultats viennent compléter des résultats déjà obtenus par Manon Moreau durant sa thèse (Moreau, 2009) sur l'effet de l'inactivation de TOR sur la transcription et la traduction des gènes.

Un des résultats les plus intéressants est que nous avons pu mettre en évidence que l'inactivation de TOR entraîne une diminution de la phosphorylation des protéines ribosomales RPS6A et RPS6B. L'enjeu que constitue une telle découverte est largement développé dans la partie Discussion.

Cette étude a permis de mettre en évidence que l'activation de TOR pourrait entraîner des modifications à l'intérieur du ribosome. En effet, certaines protéines ribosomales présentent des différences d'abondance selon le niveau d'activité de TOR. On peut ainsi citer en exemples les protéines suivantes :

Familles protéiques	RPL10		RPL13			RPL3		RPL7a		RPP1			RPS14			RPS15		RPS5	
Protéines	RPL10A	RPL10C	RPL13A	RPL13B	RPL13D	RPL3A	RPL3B	RPL7aA	RPL7aB	RPP1A	RPP1B	RPP1C	RPS14A	RPS14B	RPS14C	RPS15A	RPS15D	RPS5A	RPS5B
72h (M1-M4)																			
72h (M8-M9)																			
10 j (M6-M7)																			

Tableau 14 : Impact de l'inactivation de TOR sur l'accumulation des protéines ribosomales. Synthèse des résultats les plus marquants des expériences de protéomes (rouge : induits, verts : réprimés, blanc : non significatif).

En outre, nous avons également pu mettre en évidence que l'inactivation de TOR entraîne également des différences de phosphorylation qui pourrait influencer la traduction, comme par exemple, la phosphorylation sur les protéines RPP1, RPP2 et RPP3 qui composent le stalk du ribosome.

Enfin, nous avons également observé que l'inactivation de TOR entraîne également une répression globale des protéines du ribosome chloroplastique, aussi bien au niveau de leur transcription, que de leur traduction ou concernant l'abondance des protéines elles-mêmes.

Ces analyses nous ont également permis de mettre en évidence que l'inactivation de TOR a des conséquences sur l'abondance de protéines qui ne sont pas ribosomales mais qui sont copurifiées avec les ribosomes. Parmi ces protéines, on peut citer les protéines constitutives des ER bodies que l'on retrouve réprimées lors de l'inactivation de TOR. On constate également que l'inactivation de TOR entraîne également une répression de l'accumulation de plusieurs protéines liées au métabolisme du carbone.

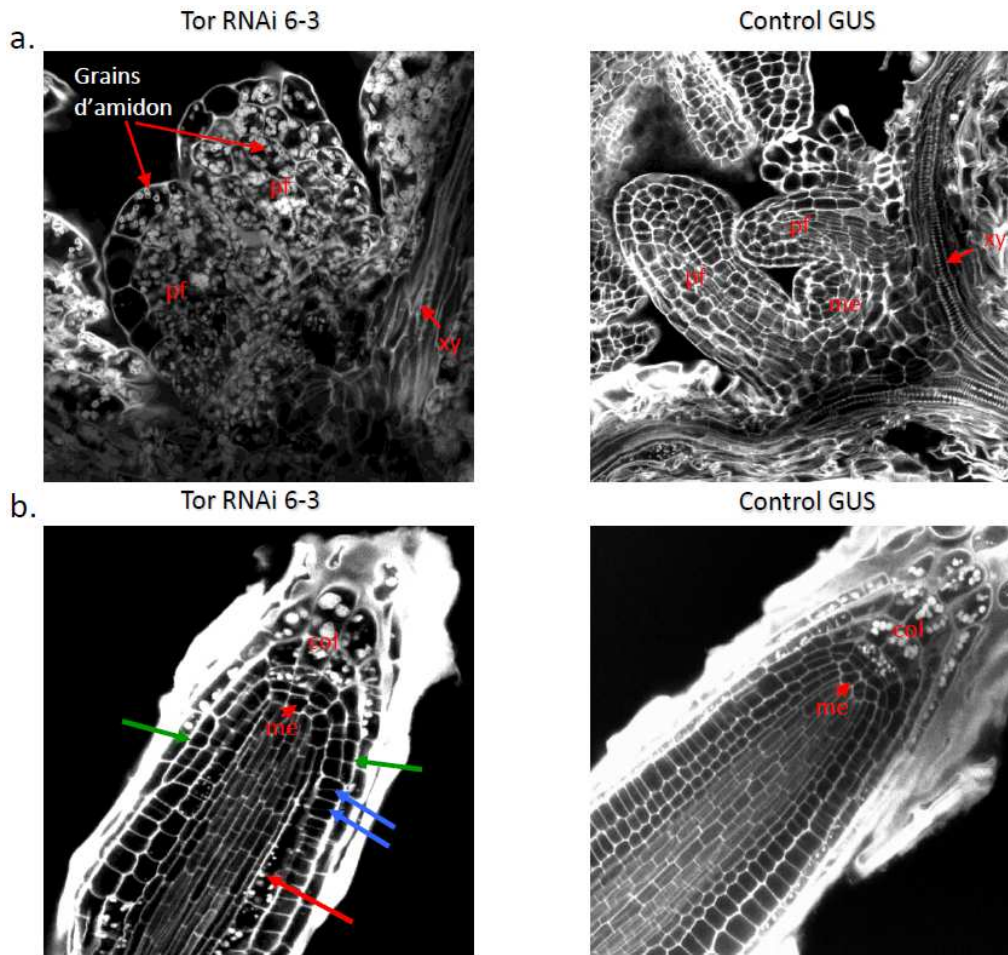


Figure 68 : L'inactivation de TOR au cours de la germination entraîne des perturbations d'organisation au sein des méristèmes apicaux caulinaires (a) et racinaires (b) : Les graines des lignées contrôles pAlcA-GUS ou des lignées TOR RNAi inductibles à l'éthanol ont été semées *in vitro* sur un milieu contenant 100 mM d'éthanol. Les plantules ont ensuite été colorées à l'iodure de propidium et au réactif de Schiff (Truernit et al., 2008). me: méristème, pf: primordium foliaire, xy: xylème, col: columelle; flèches vertes: désorganisation au niveau des assises cellulaires, flèches bleues: plan de division anormaux, flèche rouge: accumulation de grains d'amidon. (Moreau, 2009)

II. TOR ET SON INFLUENCE SUR L'ORGANISATION DU MERISTEME.

Au cours de sa thèse, Manon Moreau (Moreau, 2009) a montré que l'inactivation de TOR au cours de la germination entraîne des perturbations au niveau de l'organisation cellulaire dans les méristèmes apicaux caulinaires et racinaires (**figure 68**). Ces analyses révèlent, entre autres, une augmentation du volume cellulaire et une désorganisation des plans de division.

L'objectif du projet de thèse a donc été de (i) élucider les mécanismes moléculaires impliqués dans l'organisation du méristème et qui seraient dérégulées par une inactivation de TOR au cours de la germination et (ii) de suivre l'évolution des méristèmes aussi bien sur le plan organisationnel que moléculaire au cours d'une cinétique d'inactivation de TOR sur des plantules déjà développées.

II.A. Analyse cytologique de l'inactivation de TOR

Afin de mieux caractériser l'impact d'une cinétique d'inactivation de TOR sur l'organisation des méristèmes racinaires, nous avons réalisé des observations en microscopie confocale après coloration à l'iodure de propidium et au réactif de Schiff qui permet de mettre en évidence les polymères glucidiques tels que les parois pecto-cellulosiques et les grains d'amidon (Truernit et al., 2008). Cette technique a été utilisée pour suivre les perturbations au cours d'une cinétique d'inactivation de TOR par utilisation de plantules exprimant un ARN interférant sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'éthanol (**figure 11B**). Pour ce faire, les plantules sont mises à germer et cultivées *in vitro* pendant 7 jours puis sont induites par transfert sur un milieu contenant 100 mM d'éthanol pendant le temps indiqué. J'ai choisi de ne réaliser mes observations que sur le méristème racinaire dont l'observation est plus accessible et l'organisation plus simple.

Cette cinétique a permis de mettre en évidence une évolution graduelle dans l'impact de l'inactivation de TOR sur l'organisation cellulaire de la racine. Ainsi, après 24h d'inactivation de TOR, on remarque que les cellules composant le centre quiescent semblent être d'un volume plus important et l'accumulation d'amidon, normalement restreinte aux cellules de la columelle, gagne progressivement les cellules du centre

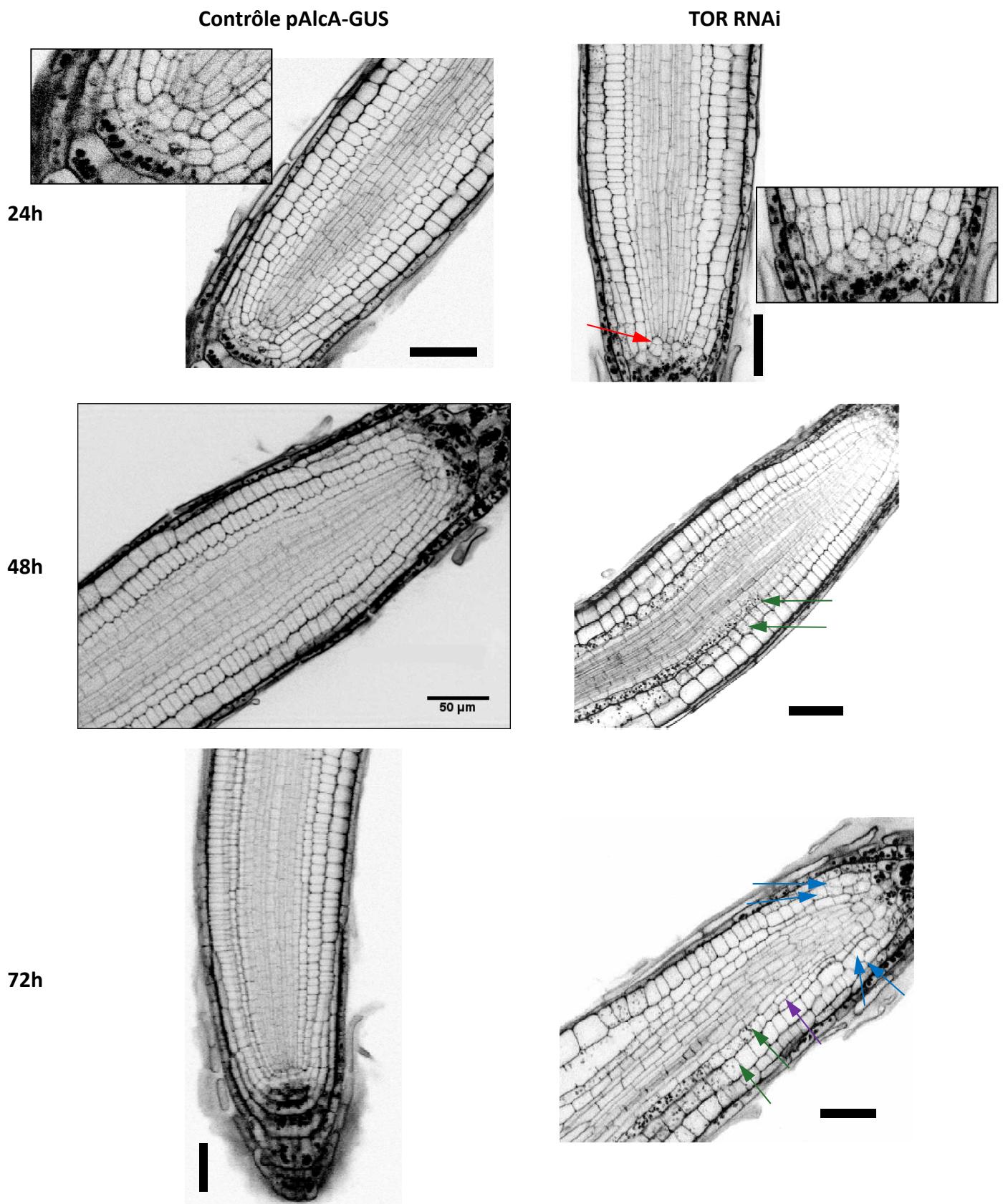


Figure 69 : L'inactivation de TOR après la germination entraîne des perturbations d'organisation cellulaire et d'accumulation des grains d'amidon dans la pointe racinaire : Les plantules sont germées et cultivées pendant 7 jours sur un milieu dépourvu d'éthanol puis transférées sur un milieu contenant 100 mM d'éthanol pendant le temps indiqué dans la colonne de gauche. La flèche rouge désigne les perturbations dans le centre quiescent, les flèches vertes, l'accumulation de grains d'amidon dans le cortex et l'endoderme, les flèches bleues, les perturbations de l'organisation des initiales des files cellulaires et la flèche violette, l'apparition de files surnuméraires cortico-endodermiques. Barres = 50 μ m

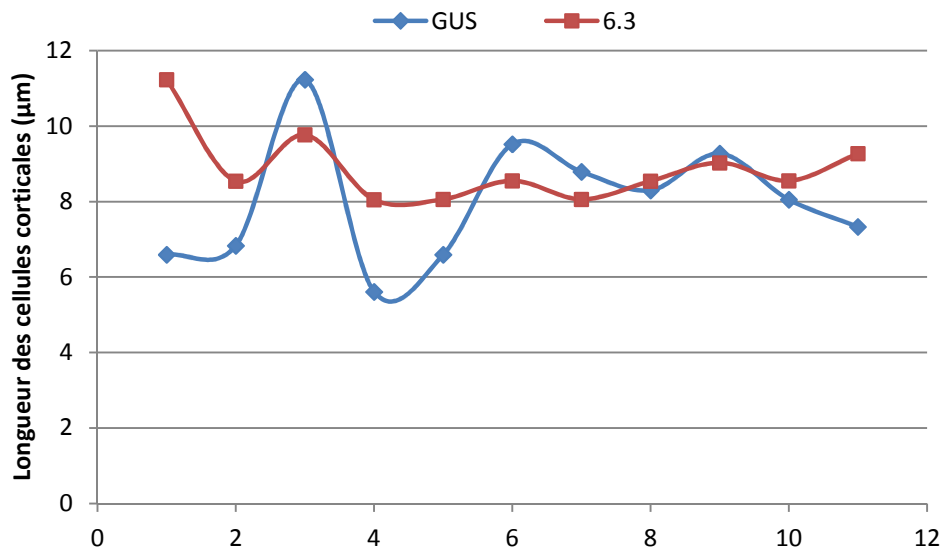


Figure 70 : L'inactivation de TOR perturbe les divisions cellulaires : Longueur des cellules corticales dans le méristème racinaire (le numéro en abscisse correspond à la position de la cellule depuis le centre quiescent) de plantes des lignées TOR RNAi (6.3) et du contrôle pAlcA-GUS (GUS). Les plantes ont été cultivées pendant 7 jours en absence d'éthanol puis induites pendant 24h.

quiescent. Après 48h d'inactivation, les différences commencent à être plus marquées et on note un début d'accumulation de grains d'amidon au niveau des cellules du cortex et de l'endoderme ainsi que, parfois, de l'épiderme. Enfin, après 72h d'inactivation, les désorganisations sont beaucoup plus fortes avec notamment l'apparition de files cellulaires surnuméraires entre le cortex et l'endoderme. Qui plus est, on note que les cellules initiales des files cellulaires semblent totalement désorganisées. Ceci pourrait être dû à une différenciation de ces cellules initiales (**figure 69**).

Ainsi, il apparaît que l'inactivation de TOR au cours de la germination entraîne de fortes perturbations au niveau de l'organisation cellulaire dans la pointe de la racine, ce qui pourrait expliquer l'arrêt de croissance de celle-ci. Cette désorganisation apparaît graduellement et 72h d'inactivation de TOR semblent suffisantes pour obtenir des racines semblables à celles observées lorsque l'inactivation de TOR survient au cours de la germination. Ceci corrobore le test de réversibilité qui a montré que, après 48h d'inactivation de TOR, la croissance foliaire et racinaire est définitivement arrêtée (Moreau, 2009).

Ces observations ont également permis de suivre l'évolution de la taille des cellules au cours de l'inactivation de TOR. Ainsi, on constate que, après 24h d'inactivation, alors que la lignée contrôle pAlcA-GUS possède des binômes de cellules corticales plus courtes, marqueur d'une division cellulaire qui vient d'avoir lieu, les lignées TOR RNAi ont des cellules corticales de taille constante (**figure 70**). Après 72h d'inactivation de TOR, les plantes de la lignée TOR RNAi 5.2 possèdent des cellules corticales jusqu'à deux fois plus grandes que dans la lignée contrôle. Tous ces résultats suggèrent que l'inactivation de TOR pourrait entraîner un arrêt des divisions cellulaires mais n'affecterait pas l'élongation cellulaire, préliminaire à ces divisions.

Les observations des pointes racinaires colorées à l'iodure de propidium et au réactif de Schiff ont également révélé que l'inactivation de TOR semble entraîner des interruptions au niveau des fils de xylème. Étant donné qu'il s'agit d'un tissu fortement lignifié, nous avons voulu étudier, par une coloration au carmin aluné et au vert d'iode, l'effet de l'inactivation de TOR sur l'accumulation des lignines le long des files de xylème. Cette coloration permet de mettre en évidence les parois cellulaires en distinguant les parois cellulodiques des parois

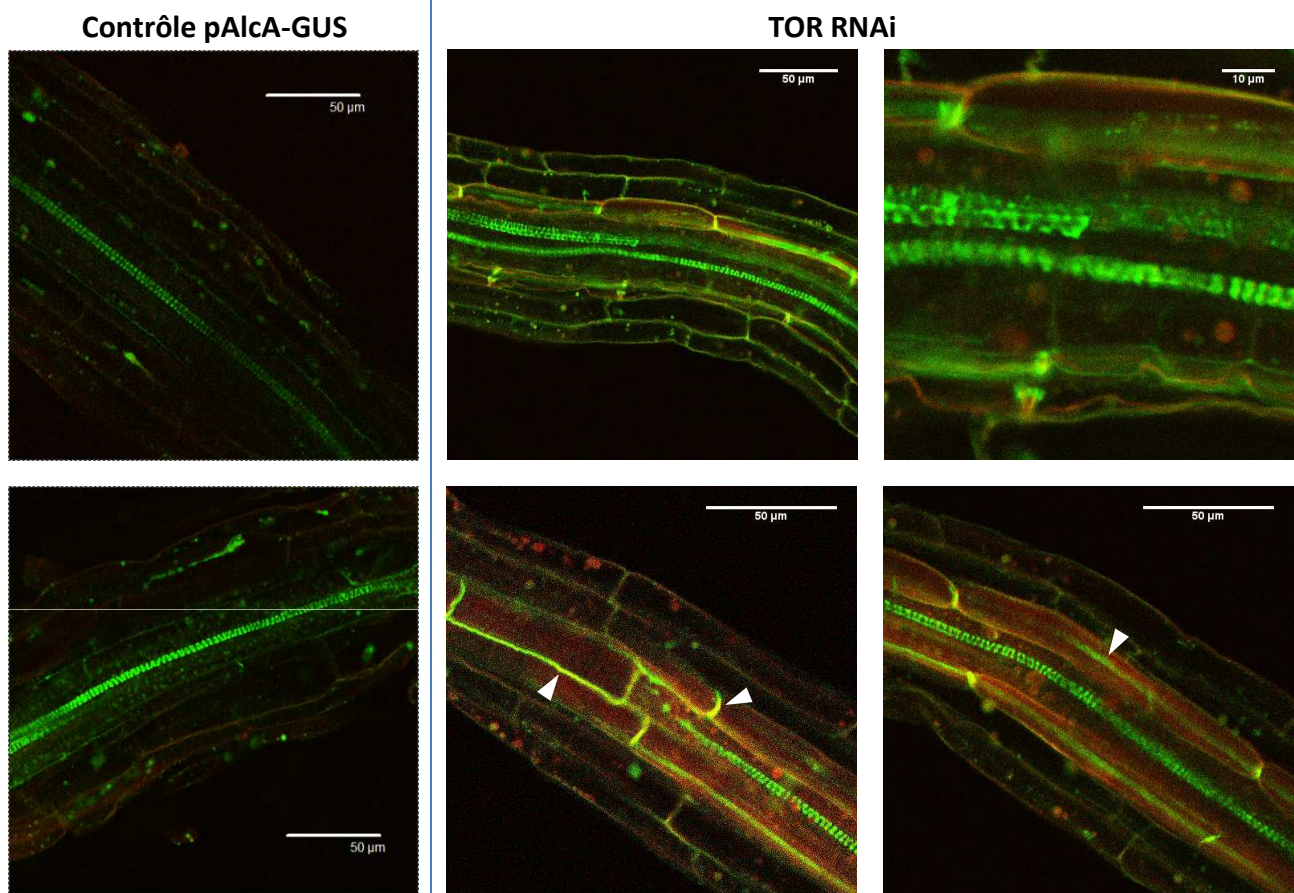


Figure 71 : L'inactivation de TOR au cours de la germination entraîne des altérations de différenciation au sein des files de cellules xylémiennes ainsi qu'une lignification anormale de certaines cellules situées autour des files de xylème : Coloration au Carmin aluné – Vert d'iode de racines de plantules de TOR RNAi 6.3 cultivées pendant 10 jours sur un milieu contenant 100 mM d'éthanol. L'observation a été réalisée au microscope confocal. Les lignines sont excitées à 405 nm et émettent entre 425 et 570 nm (ici, en vert). La cellulose est excitée à 633 nm et émet entre 678 et 764 nm (ici, en rouge).

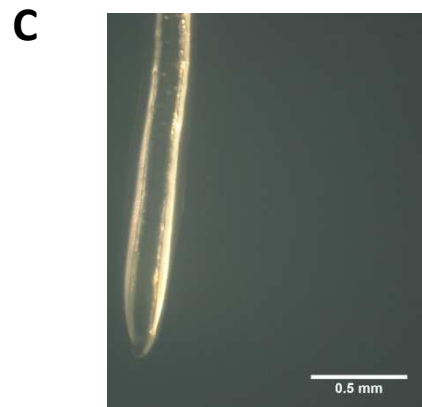
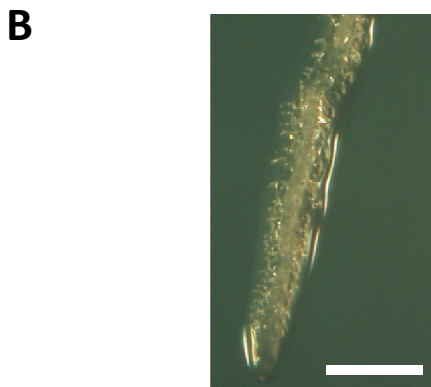
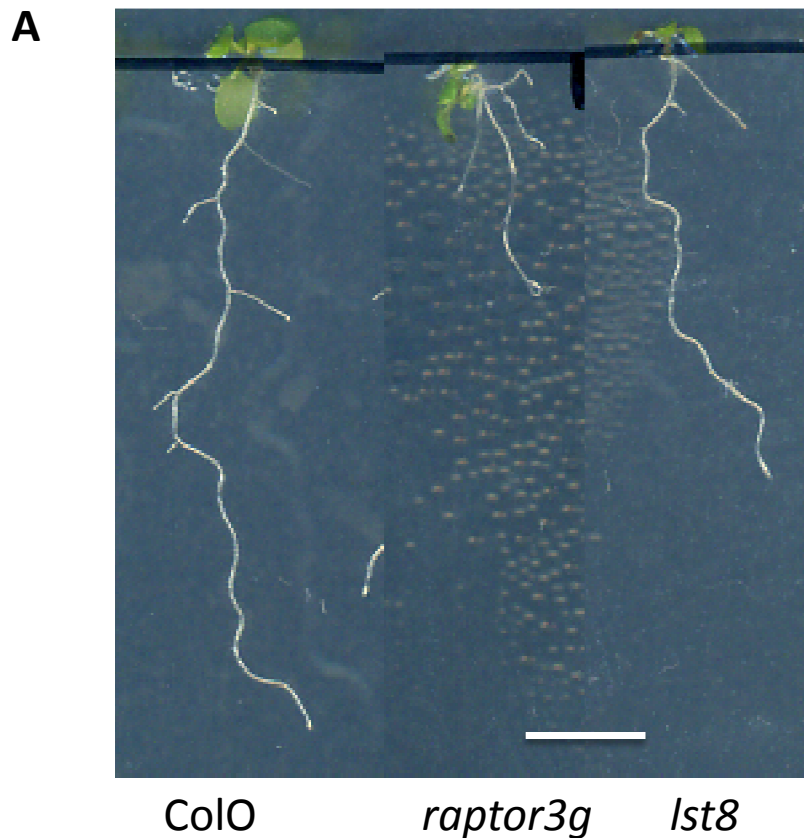


Figure 72 : Les mutants *lst8-1* et *raptor* présentent un ralentissement de croissance qui peut être lié à un raccourcissement du méristème racinaire : (A) Aspect des plantules de 10 jours des mutants *raptor.3g* et *lst8* comparés au sauvage Col-0. (B et C) Pointes racinaires de plantules cultivées pendant 25 jours *in vitro* sur un milieu de Murashige and Skoog au ½ additionné de 1% de saccharose en jours longs. (B) Racine principale d'une plante de mutant homozygote *lst8-1*. (C) Racine principale d'une plante du double mutant *raptor.3g -/-* × *raptor.5g -/-*. Barres = 1 cm (A) et 0.5 mm (B et C)

lignifiées par des couleurs différentes. En outre, ces colorants possèdent la capacité de fluorescer et Olivier Grandjean et Sylvie Dinant ont mis au point une méthode qui permet de visualiser ces colorants en microscopie confocale afin de réaliser des observations des différents organes sans nécessiter de coupes de tissus (non publiés). Cette coloration des lignines a permis de mettre en évidence que l'inactivation de TOR entraîne non seulement des ponctuations de cellules non xylémiennes au sein des files xylémiennes mais aussi une accumulation de lignines dans les parois des cellules qui se trouvent en périphérie des cellules du tissu vasculaire (**figure 71**). Des perturbations dans l'organisation de la paroi en conséquence de l'inactivation de TOR ont déjà été rapportées (Leiber et al., 2010) mais de tels défauts de différenciation n'avaient jamais été décrits. Ces observations suggèrent non seulement un défaut de différenciation dans les cellules xylémiennes, ce qui peut avoir des conséquences importantes sur les flux de sève, mais aussi sur la différenciation des tissus adjacents, ce qui permettrait d'expliquer, au moins en partie, l'arrêt de croissance observé lors de l'inactivation de TOR.

Un tel ralentissement de croissance de la pointe racinaire a également été observé chez les plantes mutées pour les gènes *LST8* et *RAPTOR*. Les protéines codées par ces gènes interagissent physiquement avec TOR chez *Arabidopsis* et sont les homologues des protéines partenaires de TOR dans le complexe TORC1 de mammifère et de levure. Une observation de la pointe des racines principales de ces deux mutants montre que l'émergence de poils racinaires, normalement restreinte à la zone où les trichoblastes sont clairement différenciés, a lieu dans ces mutants jusqu'à l'extrémité de la racine (**figure 72**). Dans le cas des mutants *raptor*, cette observation est compliquée par le fait que les poils racinaires sont presque inexistant, toutefois, il semble que des origines de poils racinaires se trouvent également, chez ce mutant, au niveau de l'extrémité de la pointe racinaire. Cette observation suggère que ces mutants pourraient présenter une diminution de la taille des méristèmes racinaires.

II.B. Analyse transcriptionnelle de l'impact de l'inactivation de TOR sur l'organisation du méristème

L'observation de l'organisation cellulaire de la pointe racinaire au cours de l'inactivation de TOR a révélé que la kinase TOR est essentielle au maintien de l'activité

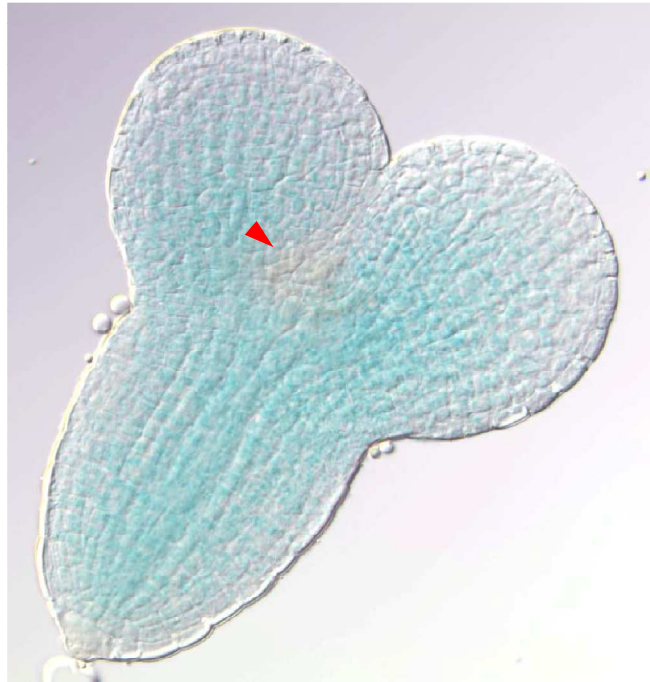


Figure 73 : Localisation de la protéine TOR dans les embryons : Les embryons hétérozygotes des plantes portant le gène *uidA* codant la β -glucuronidase inséré dans la séquence codante de TOR montrent que la protéine est présente dans l'ensemble de l'embryon à l'exception d'une petite zone à la base des cotylédons (flèche rouge). (Image obtenue par Benoit Menand ; Menand et al., 2002)

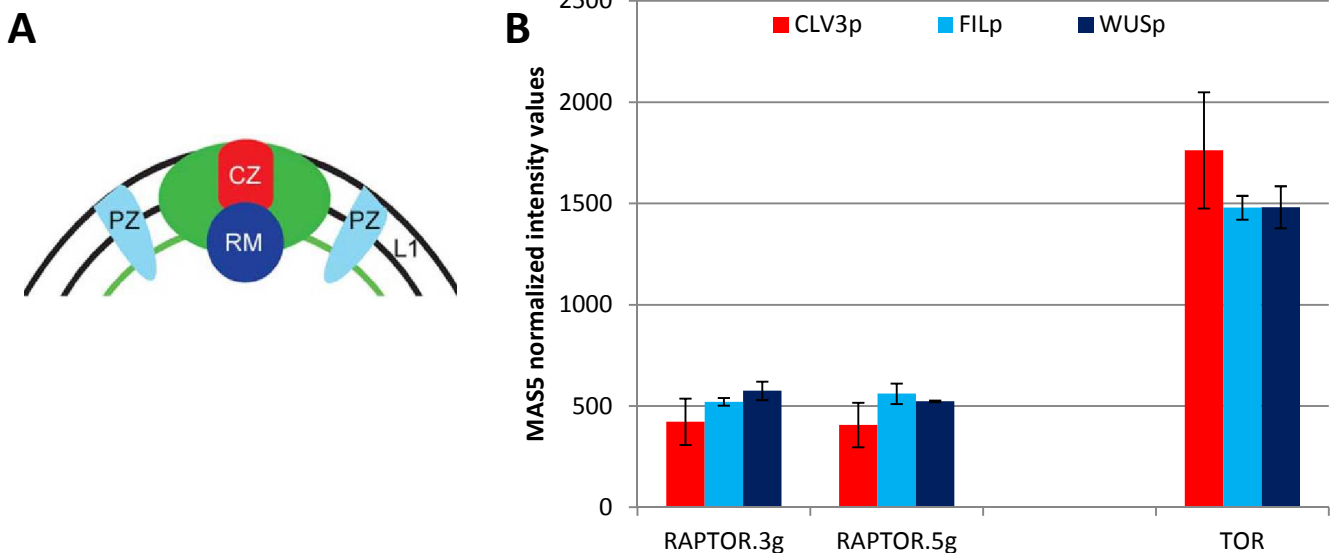


Figure 74 : Profil d'expression des gènes TOR et RAPTOR dans le méristème : (A) Les protoplastes provenant de différentes parties du méristème sont obtenus par tri cellulaire en couplant les promoteurs de gènes spécifiques à des protéines fluorescentes: CLV3 pour la zone centrale (CZ), WUS pour la zone médullaire (RM) et FIL pour les primordia foliaires (PZ); (B) Expression des gènes *RAPTOR* et du gène *TOR* dans ces différents protoplastes (n=3) (Yadav et al., 2009).

méristématique, suggérant ainsi que cette kinase pourrait agir sur le maintien de l'identité des cellules souches ou sur la différenciation et/ou la prolifération dans les méristèmes. Etant donné la zonation très importante de ces événements dans le méristème et leur contrôle par un certain nombre de gènes dits « gènes méristématiques » (voir chapitre III de l'introduction, page 46), nous avons étudié non seulement le profil d'expression de TOR dans le méristème mais aussi le profil d'expression de ces gènes méristématiques lors de l'inactivation de TOR.

I.A.1. Expression de TOR dans le méristème

Les ARN messagers de TOR ont été retrouvés dans tous les organes de la plante tandis que la fusion traductionnelle TOR-GUS n'a été retrouvée que dans les organes présentant des cellules en prolifération rapide (Robaglia et al., 2004). Ceci suggère donc l'existence potentielle d'une répression traductionnelle de l'expression de TOR dans les cellules différenciées.

Une observation des embryons des plantes possédant la construction TOR-GUS placée sous le contrôle du promoteur TOR endogène a permis de mettre en évidence que la protéine est présente dans l'ensemble de l'embryon à l'exception d'une zone qui semble définir le méristème (**figure 73**). Cette observation permet de mettre en évidence un lien qui existerait entre le profil d'expression de TOR et l'identité des cellules au sein du méristème. Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de cette variation d'expression, j'ai voulu vérifier si, au sein du méristème, il existe des zones dans lesquelles TOR est plus ou moins exprimé. Yadav et al. (2009) ont publié des données sur l'expression transcriptionnelle de l'ensemble du génome dans des protoplastes exprimant un gène rapporteur fluorescent placé sous le contrôle des promoteurs de CLAVATA3 (CLV3), WUSCHEL (WUS) ou FILAMENTOUS FLOWER (FIL). Ces gènes présentent des profils d'expression différents dans le méristème caulinaire végétatif : CLV3 est principalement exprimé dans la zone centrale, WUS, dans la zone médullaire et FIL au niveau des ébauches d'organes, dans la zone périphérique (**figure 74A**). L'analyse de ces résultats a montré que, à l'intérieur du méristème, TOR est d'avantage exprimé dans la zone d'expression de CLV3 que dans le reste du méristème. *A contrario*, les gènes RAPTOR semblent légèrement moins exprimés dans la zone d'expression de CLV3 que

	7h	7h	7h	7h	24h	24h	24h	24h	7h	7h	7h	7h	24h	24h	24h	24h
	5.2								6.3							
	AlcA-GUS								AlcA-GUS							
	Red	Green	Rat	Pval	Red	Green	Rat	Pval	Red	Green	Rat	Pval	Red	Green	Rat	Pval
STM	6,43	6,57	-0,14	1	6,10	6,11	-0,01	1	6,31	6,44	-0,13	1	6,29	6,26	0,03	1
CLV2	7,78	7,53	0,24	1	6,92	6,84	0,08	1	7,90	7,51	0,39	1	7,02	6,83	0,18	1
CLV1	7,14	7,95	-0,81	3,18E-5	6,86	7,33	-0,46	1	7,24	8,05	-0,81	1,16E-2	6,86	7,30	-0,44	1
WUS	6,21	6,35	-0,14	1	6,14	6,25	-0,11	1	6,15	6,30	-0,15	1	6,17	6,11	0,06	1
CLV3	6,15	6,08	0,07	1	6,18	6,12	0,06	1	5,93	5,98	-0,05	1	6,24	6,28	-0,05	1
KNAT1	7,90	7,44	0,46	1	8,50	8,21	0,29	1	7,67	7,37	0,30	1	8,40	8,13	0,28	1

Figure 75 : Profil d'expression des gènes méristématiques en réponse à l'inactivation de TOR : la transcription des gènes *SHOOT-MERISTEMLESS* (STM), *CLAVATA1* (CLV1), *CLAVATA2* (CLV2), *CLAVATA3* (CLV3), *WUSCHEL* (WUS) et *BREVIPEDICELLUS* (KNAT1) a été quantifiée dans les plantules des lignées TOR RNAi inductibles 5.2 et 6.3 après 7h et 24h d'inactivation de TOR et comparée au contrôle AlcA-GUS traité dans les mêmes conditions. Les valeurs de fluorescence sont données dans les colonnes « Red » et « Green », le logarithme des ratios dans la colonne « Rat » et la significativité de la différence dans la colonne « Pval ». Les cellules de la colonne « Rat » sur fond noir sont considérées comme non significativement différentes. Les cellules kaki des colonnes Red et Green représentent une expression en dessous du seuil de détection. Les données ont été obtenues au moyen de puces CATMA.

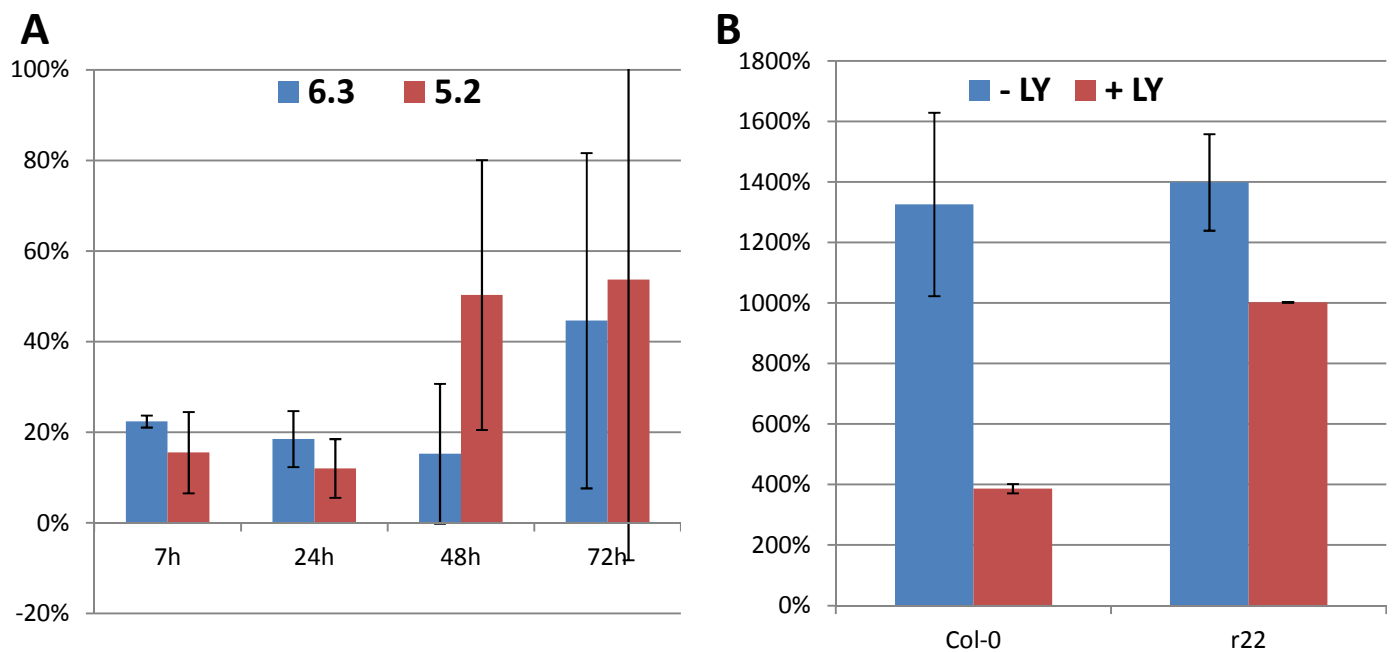


Figure 76 : L'inactivation de TOR entraîne la répression de l'expression de CLV1 : Quantification de l'expression de *CLAVATA1* par RT-PCR quantitative dans les lignées TOR RNAi inductibles à l'éthanol au cours d'une cinétique d'inactivation (A), ou lors d'un traitement au LY294002 à 10 µM final, un inhibiteur de PI3 kinases, sur des plantes de la lignée sauvage Col-0 ou sur la lignée mutante *raptor22* présentant une mutation dans le gène *RAPTOR.3g* (B). La normalisation est effectuée par quantification de l'expression du gène *APT1*. Les résultats sont exprimés en pourcentage du niveau d'expression dans le contrôle AlcA-GUS traité à l'éthanol pendant le même temps (A), ou en pourcentage d'expression du gène *APT1* (B). Pour chaque expérience, n=3.

dans celles de *FIL* et *WUS* (**figure 74B**) mais le niveau d'expression de ces deux gènes est à la limite du niveau de détection.

Toutes ces données suggèrent donc une régulation de l'expression de *TOR* à l'intérieur du méristème en fonction de l'identité cellulaire.

II.B.1. Expression des gènes méristématiques en réponse à l'inactivation de TOR

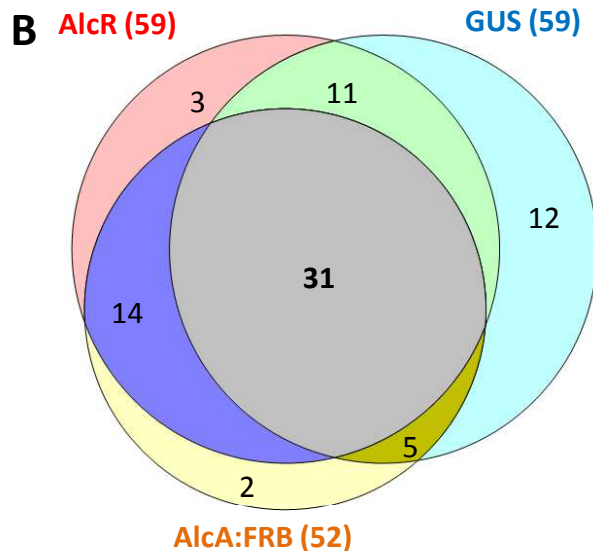
Afin de suivre l'expression des gènes méristématiques en réponse à l'inactivation de TOR, j'ai utilisé des lignées exprimant un ARN interférant spécifiquement avec les ARN messagers du gène TOR et placé sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'éthanol (**figure 11B**). Ces lignées sont appelées 5.2 et 6.3 ou regroupés sous le vocable TOR RNAi. Afin de distinguer l'impact de l'inactivation de TOR de celui du traitement à l'éthanol ou de l'expression du facteur de transcription AlcR, les données obtenues sont comparées à celles obtenues dans les mêmes conditions pour des plantes possédant les mêmes constructions mais où le gène de la β -glucuronidase est placé sous le contrôle du promoteur AlcA. Dans la suite de cette partie, ces plantes seront appelées AlcA-GUS.

II.B.1.a. L'inactivation de TOR dérégule la voie CLV3-WUS

Afin d'étudier l'impact de l'inactivation de TOR sur l'expression des gènes méristématiques, nous avons cherché si ces gènes apparaissaient comme transcriptionnellement dérégulés en réponse à des temps courts d'inactivation (7h et 24h) dans des expériences de transcriptome sur les lignées TOR RNAi inductibles réalisées sur des puces CATMA (collaboration avec Jean-Pierre Renou). Cette étude montre que le gène *CLV1* est réprimé au cours de l'inactivation de TOR (**figure 75**). La protéine CLAVATA1 est un récepteur kinase transmembranaire qui agit en tandem avec CLAVATA2 pour fixer le ligand CLAVATA3. Cette fixation entraîne la répression transcriptionnelle de l'expression de *WUSCHEL*. Les autres gènes ne semblent pas significativement dérégulés, ce qui peut être dû au faible niveau de leur expression. Afin de confirmer ces résultats sur l'influence de l'inactivation de TOR sur la dérégulation de l'expression de *CLV1*, j'ai suivi l'expression de ce gène en utilisant plusieurs méthodes d'inactivation de TOR. Ces méthodes sont (i) l'utilisation des lignées TOR RNAi inductibles décrites ci-avant, (ii) le traitement au LY294002, un inhibiteur de PI3 kinases de classe III (VPS34 chez Arabidopsis) entraînant également une

A

Caractère	Nom de l'oligo	Séquence
p35S:AlcR	AlcR 3'	GCT TTG GCA AAC GAG TGA AT
	AlcR 5'	GAG ACA GGT CCC GAG CAA T
GUS	GUS 3'	CTT CTC TGC CGT TTC CAA ATC G
	GUS 5'	AAA GTG TGG GTC AAT AAT CAG GAA GTG
pAlcA:TOR	TOR RNAi 3'	GAC TAG CTT CTT CTA GTG CT
	AlcA 5'	ACG CAC CGT TCA AGA GGT ACG

**C**

p35S:AlcR (59)	-	+	-	-	+	-	+	+
pAlcA:TOR RNAi (52)	-	-	+	-	-	+	+	+
pCLV3:GUS (59)	+	+	+	-	-	-	-	+
Nb de plantes	12	11	5		3	2	14	31

Contrôles

pCLV3:GUS +/-
TOR RNAi +/-

Figure 77 : Ségrégation des caractères dans des plantes issues d'un croisement entre les lignées TOR RNAi inducibles et la lignée pCLV3:GUS : (A) Liste des oligonucléotides utilisés pour vérifier la présence de chacun des trois caractères ségrégeant dans la population issue de ce croisement. **(B et C)** Présence des caractères ségrégeant (les caractères « p35S:AlcR » et « pAlcA:FRB (TOR RNAi) » proviennent des lignées TOR RNAi et le caractère « GUS » provient de la lignée pCLV3:GUS) dans les 78 plantes testées par PCR. Les nombres entre parenthèses indiquent le nombre de plantes positives pour chaque caractère.

inactivation de TOR en raison de son domaine kinase apparentée à celui des PI3 kinases et (iii) l'étude des lignées présentant une mutation dans le gène *RAPTOR.3g*. Ce gène code une protéine partenaire de TOR et les mutants dans ce gène, maintenant bien caractérisés (Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2005, données non publiées), présentent un fort retard de croissance. Ainsi, on peut voir que l'inactivation de TOR par l'utilisation des lignées TOR RNAi inductibles à l'éthanol entraîne une forte répression de l'expression de *CLV1* dès après 7h d'inactivation. On note également que le traitement des lignées sauvage Col-0 ou du mutant *raptor.3g* avec un inhibiteur de PI3 kinases, le LY294002, entraîne également une répression de l'expression de *CLV1* (**figure 76**). Ces résultats confortent les précédents et suggèrent donc fortement que l'inactivation de TOR entraînerait une répression transcriptionnelle de l'expression de *CLAVATA1*.

Etant donné le rôle de *CLV1* dans la voie de signalisation et la perception de *CLV3* et le rôle de la fixation du ligand *CLV3* sur le récepteur *CLV1* dans l'expression de *WUS*, nous avons voulu suivre les variations de l'expression de *CLV3* et *WUS* lors d'une cinétique d'inactivation de TOR. Pour cela, dans le cadre d'une collaboration avec Bruce Veit (AgResearch, Palmerston North, Nouvelle-Zélande), nous avons réalisé des croisements entre les lignées TOR RNAi inductibles à l'éthanol avec des lignées disponibles exprimant le gène *GUS* sous le contrôle du promoteur de *WUSCHEL* ou *CLAVATA3* (Groß-Hardt et al., 2002).

Pour l'étude de la localisation de l'expression de *CLV3*, nous avons travaillé sur des plantes en ségrégation issue du croisement entre les lignées TOR RNAi et des lignées exprimant le gène *uidA* sous le contrôle du promoteur de *CLV3*. Nous avons donc sélectionné, en F2, des lignées possédant, au moins à l'état hétérozygote, le gène *uidA* ainsi que les deux composants du système inductible d'inactivation de TOR. Cette sélection a été réalisée par PCR ainsi que par vérification sur la descendance de la sensibilité à l'éthanol et de la capacité à hydrolyser l'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique. Ainsi, sur les 78 plantes testées, 59 possédaient la construction p35S:AlcR (75.6%), 59 possédaient le gène *uidA* (75.6%) et 52 possédaient la construction pAlcA:TOR-RNAi (66.7%). Parmi ces plantes, 31 (39.7%) étaient positives pour les trois caractères. Ces lignées ont été utilisées pour vérifier l'effet de l'inactivation de TOR sur le profil d'expression de *CLV3* et le génotype des plantes a été confirmé *a posteriori* par PCR en utilisant des couples d'oligonucléotides

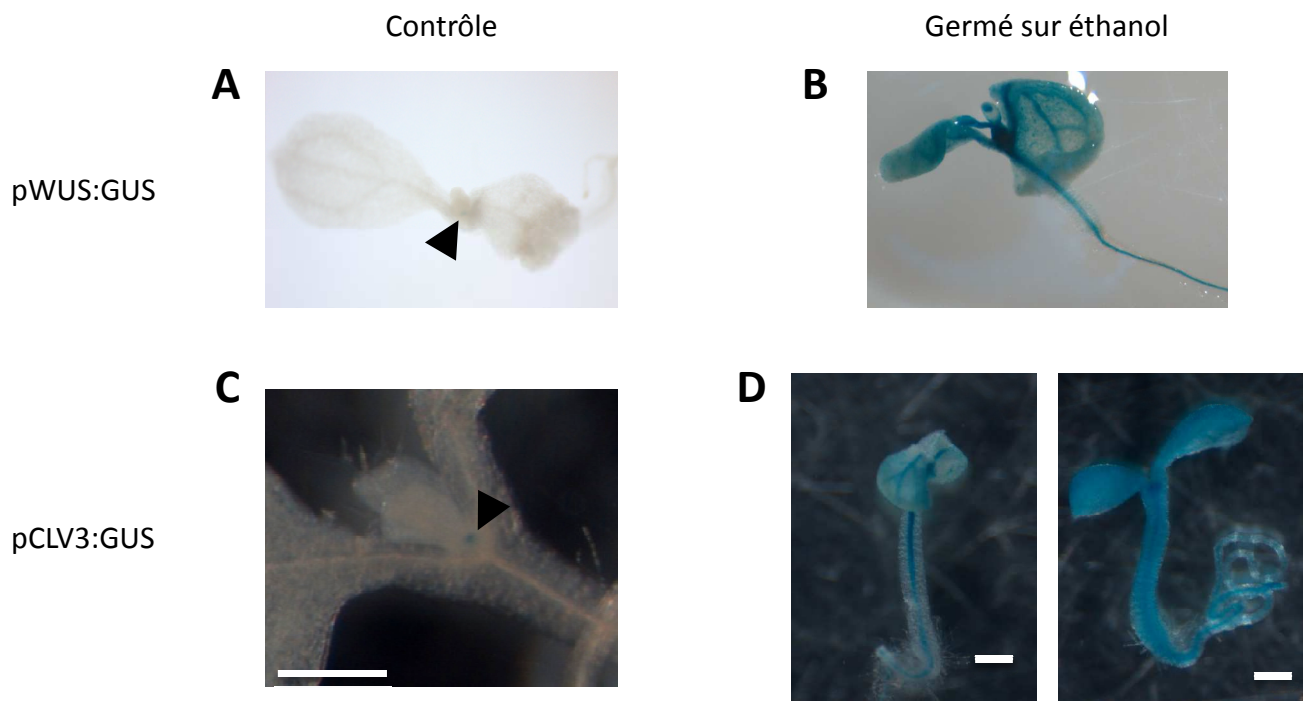


Figure 78 : L'inactivation de TOR au cours de la germination entraîne l'induction de l'expression de *WUS* et de *CLV3* : Localisation du gène de la β -glucuronidase fusionné au promoteur du gène *WUS* (**A et B**) ou *CLV3* (**C et D**) dans les plantes des lignées TOR RNAi inducibles à l'éthanol germées *in vitro* en présence de 100 mM d'éthanol (B et D). Dans le cas du croisement avec la lignée pWUS:GUS, il s'agit de plantes de première génération issue du croisement entre la lignée pWUS:GUS et les TOR RNAi inducibles et le contrôle correspond à des plantes cultivées sans éthanol (**A**). Concernant la localisation de *CLV3*, il s'agit de plantes de deuxième génération ségrégeant les caractères et dépourvus d'une partie du système et le contrôle correspond à des plantes dépourvues d'une partie du système inducible à l'éthanol et germées sur un milieu contenant de l'éthanol (**C**)

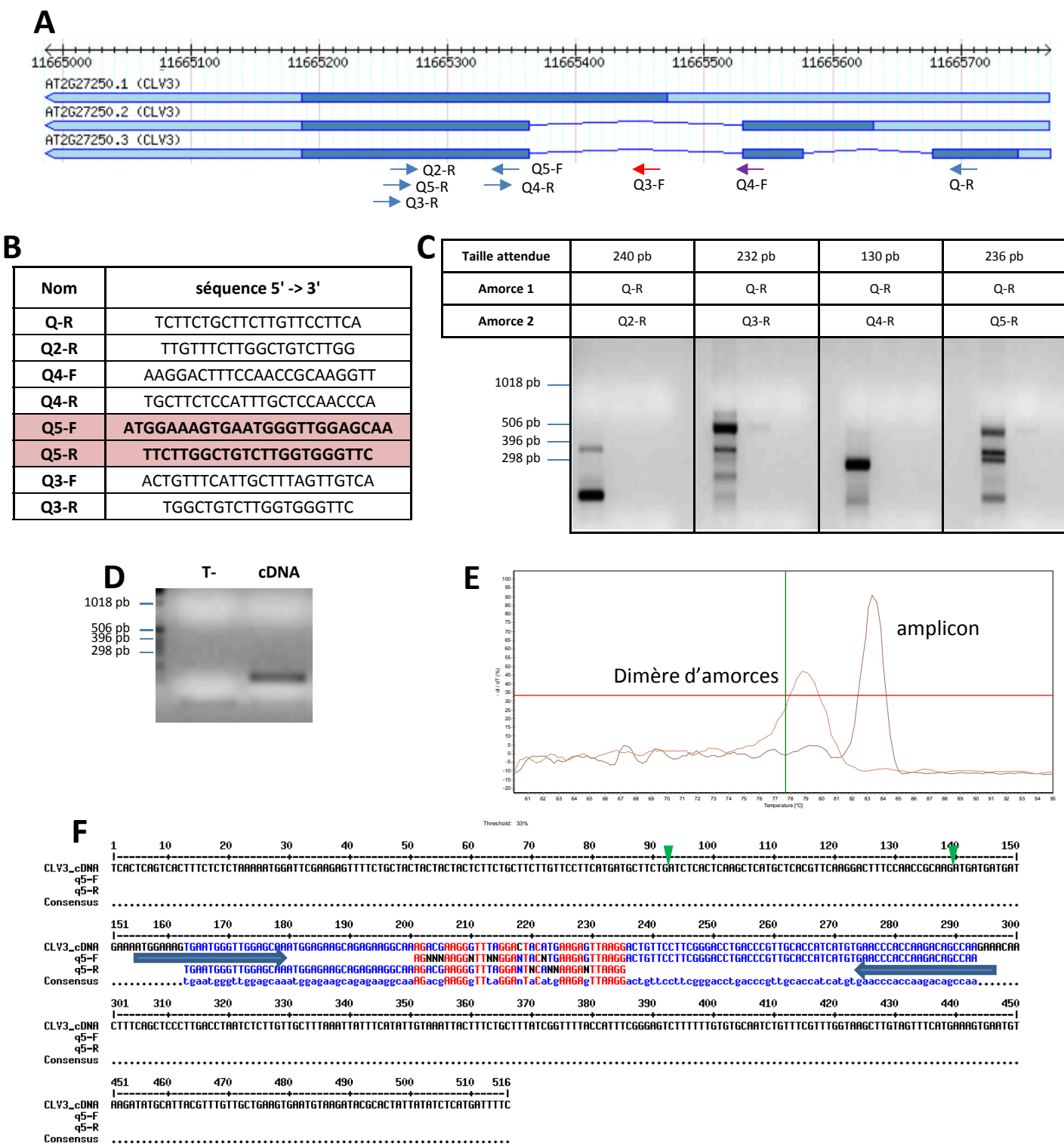
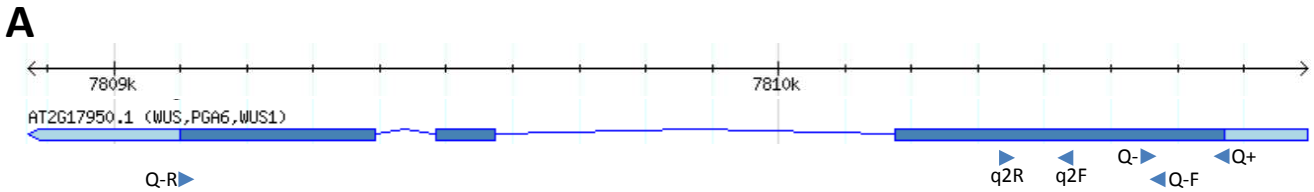


Figure 79 : Mise au point des conditions expérimentales permettant de quantifier l'expression de *CLV3* : (A) Représentation graphique de la structure du cDNA de *CLV3* et position de différentes amorces (en bleu, l'amorce est entièrement dans un exon, en violet, elle est à cheval sur un exon et un intron et en rouge, elle est entièrement dans un intron) ; (B) Séquence des amorces citées en A ; (C) Test d'amplification d'un fragment de cDNA de *CLV3* au moyen de plusieurs couples d'amorces, un mélange de plusieurs cDNA de plantules est utilisé comme matrice ; (D) Amplification d'un fragment de cDNA de *CLV3* au moyen des amorces Q5-F et Q5-R (T- : témoin négatif) ; (E) Courbes de fusion de l'amplicon et du dimère d'amorces (tel qu'on le retrouve dans les témoins négatifs ou dans les échantillons dans lesquels *CLV3* n'est pas suffisamment exprimé) obtenues avec le couple Q5-F et Q5-R ; (F) Validation de l'amplicon par séquençage, les flèches bleues représentent la position des amorces et les flèches vertes la position des introns.

cDNA : ADN complémentaire



B

oligo	séquence 5' -> 3'
wus q2 F	TCGAAAGATTGAGGGCAAGAACG
wus q2 R	TGGGTGATGAAGATGGTGTGGTCA
wus_q_plus	ATGGAGCCGCCACAGCATCAG
wus_q_minus	CTCCGTCGTCGGTGTCCACCT
Wuschel-q-R	GCGACACCGGCGTAAGAGCT
Wuschel-q-F	TCGCCAGACCAGCACGAGGT

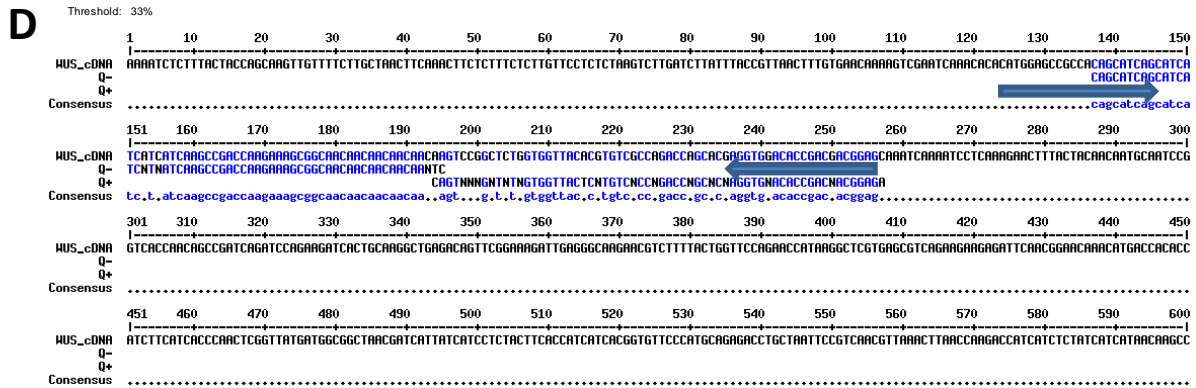
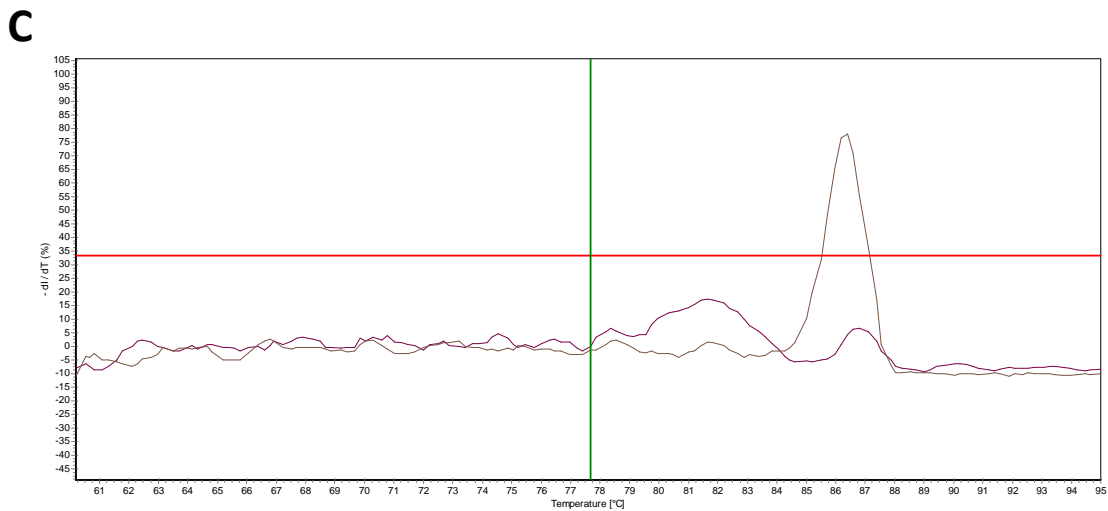


Figure 80 : Mise au point des conditions expérimentales permettant de quantifier l'expression de WUS: (A) Représentation graphique de la structure du cDNA de WUS et position de différents amorces ; (B) Séquence des amorces cités en A ; (C) Courbes de fusion de l'amplicon et du dimère d'amorces (tel qu'on le retrouve dans les témoins négatifs ou dans les échantillons dans lesquels WUS n'est pas suffisamment exprimé) obtenues avec le couple Q+ et Q- ; (D) Validation de l'amplicon par séquençage, les flèches bleues représentent la position des amorces.
cDNA : ADN complémentaire

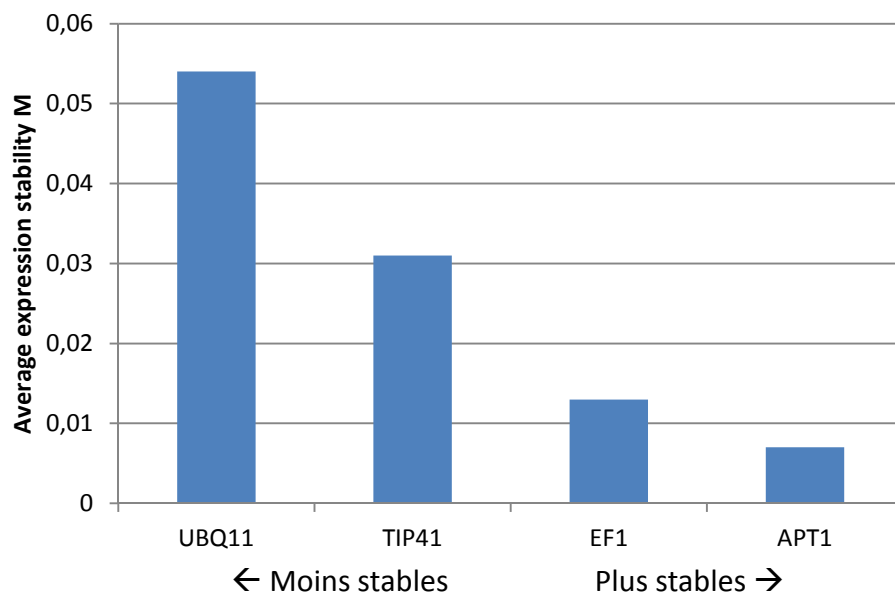


Figure 81 : Classement geNORM de quatre gènes de référence communément utilisés au laboratoire afin de déterminer le gène le plus stable qui sera utilisé dans les expériences de Q-PCR : L'analyse a été réalisée au moyen d'ADN complémentaire obtenue au cours d'une cinétique d'inactivation de TOR dans les lignées TOR RNAi et les plantes contrôles pAlcA-GUS. Une valeur faible de stabilité d'expression, tel que calculé par le logiciel geNORM, indique une expression stable.

amplifiant le gène GUS et les deux composants du système inductible d'inactivation de TOR (**Figure 77**). Enfin, afin de s'assurer que les lignées TOR RNAi ne possèdent pas le gène codant la β -glucuronidase, une vérification de ces dernières a été réalisée par PCR et par coloration GUS en présence et en absence d'éthanol.

Grâce à ces croisements, nous avons pu montrer que l'inactivation de TOR au cours de la germination entraîne une forte surexpression de *WUSCHEL* principalement localisée au niveau du système vasculaire ainsi qu'une forte surexpression de *CLAVATA3* localisée au niveau du système vasculaire pour les plantes les moins affectées et étendue à l'ensemble de la plantule pour les plantes les plus affectées (**figure 78**).

Afin de vérifier si les variations du niveau d'expression du gène endogène reflètent et valident les résultats obtenus pour ces deux marqueurs, nous avons quantifié l'expression transcriptionnelle de ces gènes par PCR quantitative après transcription réverse au cours de l'inactivation de TOR.

Toutefois, de par la petite taille de ces deux gènes, leur appartenance à des familles multigéniques et leur faible niveau d'expression, cette quantification a demandé quelques étapes de mise au point préalable. J'ai donc, pour ces deux gènes, recherché plusieurs couples d'oligonucléotides et j'ai éliminé ceux ne permettant pas d'amplification ou présentant plusieurs produits d'amplification. J'ai ensuite vérifié que la taille de l'amplicon correspond à celle prédite. Malheureusement, aucun couple n'a permis d'éviter totalement la formation de dimères d'oligonucléotides mais ceux-ci ne se forment que lorsque le niveau d'expression est trop faible, d'où la nécessité de valider chaque quantification par une migration des produits de Q-PCR. Enfin, j'ai vérifié par séquençage pour le couple sélectionné pour chaque gène que le produit d'amplification correspond bien au gène amplifié (**figures 79 et 80**). Un autre paramètre devant être mis au point préalablement à l'analyse quantitative, j'ai recherché un gène de ménage ayant une expression stable dans mes échantillons. Pour cela, j'ai quantifié l'expression de plusieurs gènes de ménage communément utilisés au laboratoire (*APT1*, *UBQ11*, *TIP41* et *EF1*) dans une cinétique complète d'inactivation de TOR. Au moyen du logiciel GeNorm, j'ai ainsi pu mettre en évidence que le gène *APT1* est le plus stable dans mes conditions (**figure 81**) et c'est ce gène



Figure 82 : L'inactivation de TOR au cours de la germination entraine l'induction de l'expression de *WUS* : Quantification de l'expression de *WUS* par RT-PCR dans les lignées TOR RNAi inducibles à l'éthanol germées sur un milieu contenant 100 mM d'éthanol.

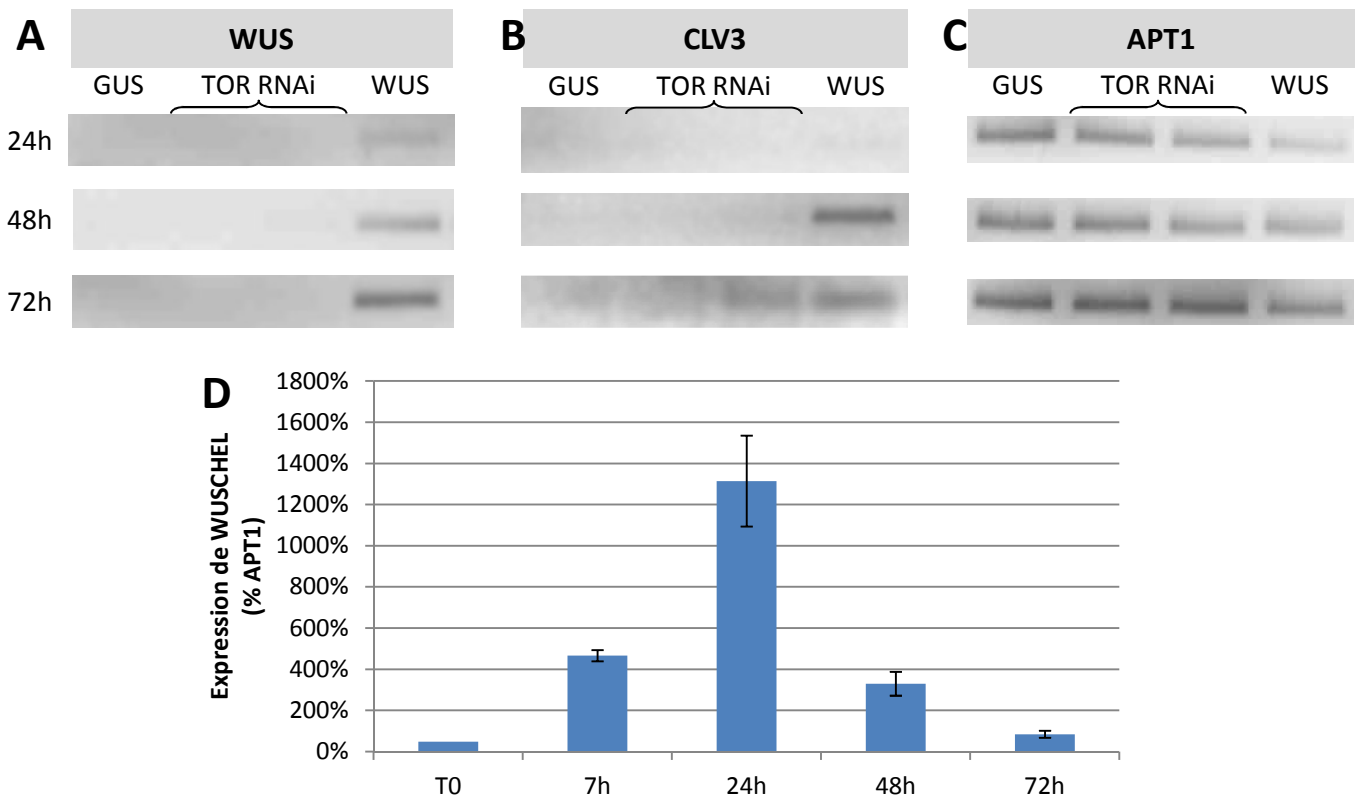
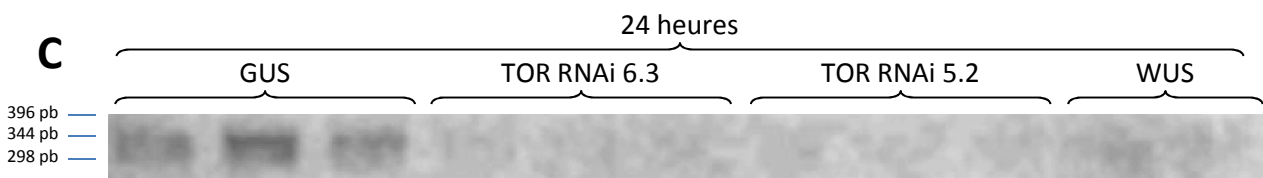
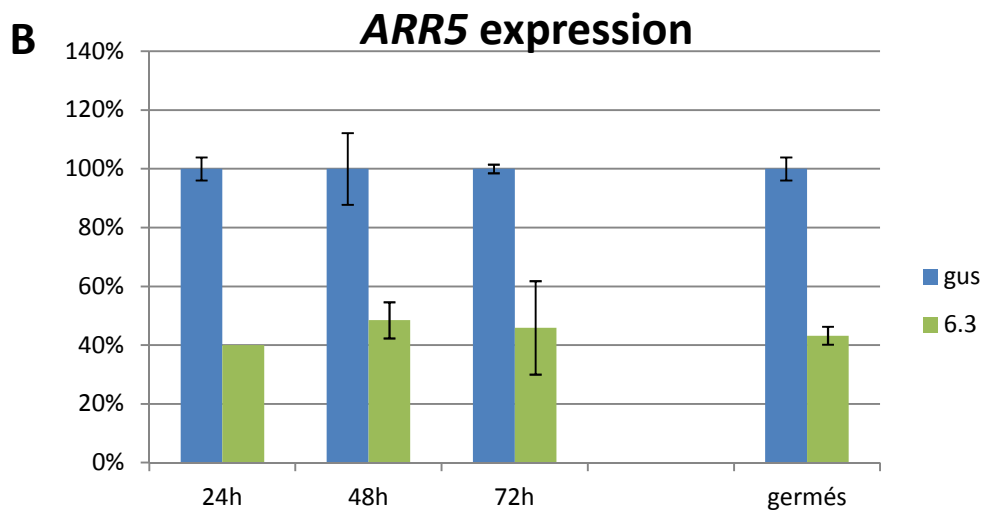
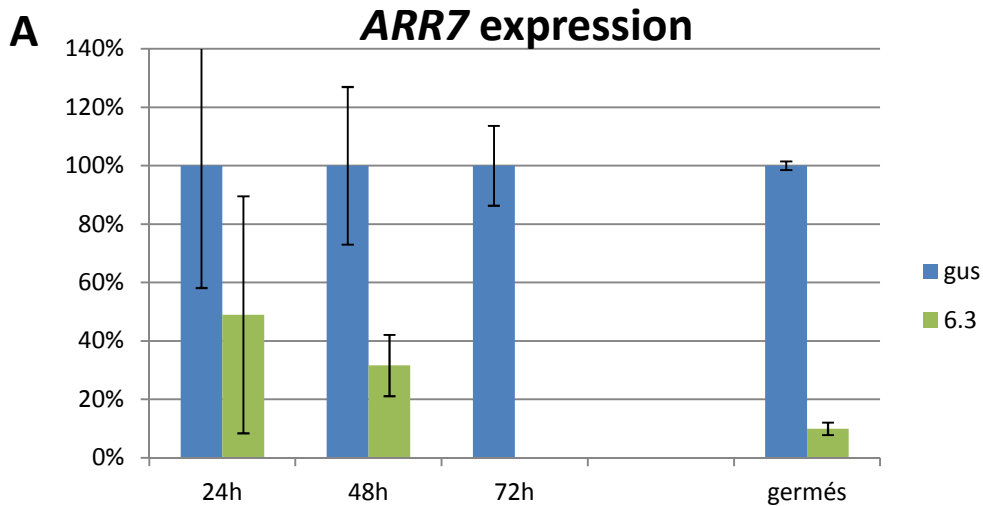


Figure 83 : L'inactivation de TOR après la germination entraine une légère induction de l'expression de *CLV3* mais ne permet pas de détecter de surexpression de *WUS* : Les plantules ont été cultivées *in vitro* pendant 7 jours en absence d'éthanol puis ont été induites par ajout d'un bouchon d'éthanol à 5% pendant le temps indiqué dans la colonne de gauche. Les géotypes sont : le contrôle pAlcA-GUS, les deux lignées TOR RNAi 5.2 et 6.3 et un surexprimeur de *WUSCHEL* inducible à l'éthanol (Patrick Laufs). L'expression des gènes *WUS* (A) *CLV3* (B) et d'un gène de référence *APT1* (C) a été mesurée par RT-PCR. (D) Quantification de l'expression de *WUSCHEL* par RT-PCR quantitative dans les plantes surexprimant *WUS* sous le contrôle d'un système inducible à l'éthanol (la quantification est exprimée en pourcentage d'expression de *APT1*) (n=3).



D

	5.2				6.3				5.2				6.3			
	7h	7h	7h	7h	24h	24h	24h	24h	7h	7h	7h	7h	24h	24h	24h	24h
	AlcA-GUS								AlcA-GUS							
	Red	Green	Rat	Pval	Red	Green	Rat	Pval	Red	Green	Rat	Pval	Red	Green	Rat	Pval
ARR7	6,82	7,86	-1,04	1,91E-10	9,77	10,60	-0,83	2,57E-3	6,89	7,42	-0,54	1,00E+0	9,63	10,42	-0,79	2,57E-3
ARR5	6,03	6,11	-0,08	1,00E+0	6,29	6,21	0,07	1,00E+0	5,98	6,03	-0,05	1,00E+0	6,16	6,05	0,11	1,00E+0

Figure 84 : L'inactivation de TOR entraine la répression de l'expression de ARR7 et ARR5 : (A-C) Les plantules des lignées TOR RNAi 5.2 et 6.3 ainsi que de la lignée contrôle pAlcA-GUS (notée GUS) et du surexpresseur inductible à l'éthanol de WUS (noté WUS) ont été cultivées *in vitro* pendant 7 jours en absence d'éthanol puis ont été induites par ajout d'un bouchon d'éthanol à 5% pendant le temps indiqué ou directement mises à germer en présence d'éthanol (colonne « germés »). L'expression d'ARR7 (A et C) et d'ARR5 (B) a alors été quantifiée (n=3). (D) Profil d'expression de ARR7 et ARR5 dans le transcriptome des lignées TOR RNAi (voir figure M7 pour les conditions expérimentales). Les cellules kaki des colonnes Red et Green représentent une expression en dessous du seuil de détection. Les données ont été obtenues au moyen de puces CATMA.

que j'ai utilisé comme gène de référence dans les expériences subséquentes de quantification des transcrits.

Grâce à ces étapes de mise au point, nous avons pu étudier l'expression des gènes *CLV3* et *WUS* au cours de l'inactivation de TOR. Nous avons ainsi montré que les plantules des lignées TOR RNAi inductibles à l'éthanol induites dès la germination, surexpriment fortement *WUSCHEL* (**figure 82**). Lorsque cette inactivation de TOR est provoquée sur des plantules déjà germées, on constate une légère induction de l'expression de *CLV3* et on ne parvient pas à détecter de surexpression de *WUS* (**figure 83**). Nous avons également utilisé des lignées exprimant *WUS* sous le contrôle du même système inductible à l'éthanol que celui utilisé pour les lignées TOR RNAi (collaboration avec Patrick Laufs). Cette lignée a été utilisée comme témoin positif pour l'expression de *WUS* et a permis de mettre en évidence les conséquences transcriptomiques de la surexpression de *WUS* dans nos conditions expérimentales. Nous avons effectivement mis en évidence une surexpression de *WUS* dans ces lignées mais nous avons également constaté que, après 48h d'induction à l'éthanol, le niveau d'expression de *WUS* est fortement diminué et, après 72h, il est revenu à la normale. De manière intéressante, on constate que cette diminution d'expression est concomitante avec l'induction de l'expression de *CLV3* qui pourrait alors réprimer post-transcriptionnellement l'expression de *WUS*. Etant donné que *WUSCHEL* est un gène très faiblement exprimé, nous avons voulu vérifier si cette absence de détection est effectivement due à une absence d'induction de l'expression de *WUSCHEL* ou si elle est due au seuil de détection de la méthode utilisée. Pour ce faire, nous avons suivi l'expression des gènes *ARR* de type A, *ARR5* et *ARR7*, qui sont directement réprimés transcriptionnellement par la surexpression de *WUSCHEL* (Leibfried et al., 2005). Cette expérience a montré que l'inactivation de TOR entraîne une répression de l'expression des gènes *ARR7* et *ARR5* (**figure 84**), suggérant que, même si on ne parvient pas à la mettre en évidence, la surexpression de *WUSCHEL* a lieu très rapidement après l'inactivation de TOR.

Nous avons également cherché à savoir si la même dérégulation pouvait être observée avec d'autres méthodes d'inactivation de TOR. Pour cela, nous avons utilisé une approche génétique avec les mutants *raptor.3g* et une approche pharmacologique avec un traitement au LY-294002, un inhibiteur de PI3 kinases. Ces deux approches ont permis de mettre en évidence que l'inactivation de TOR par ces méthodes entraîne une augmentation de

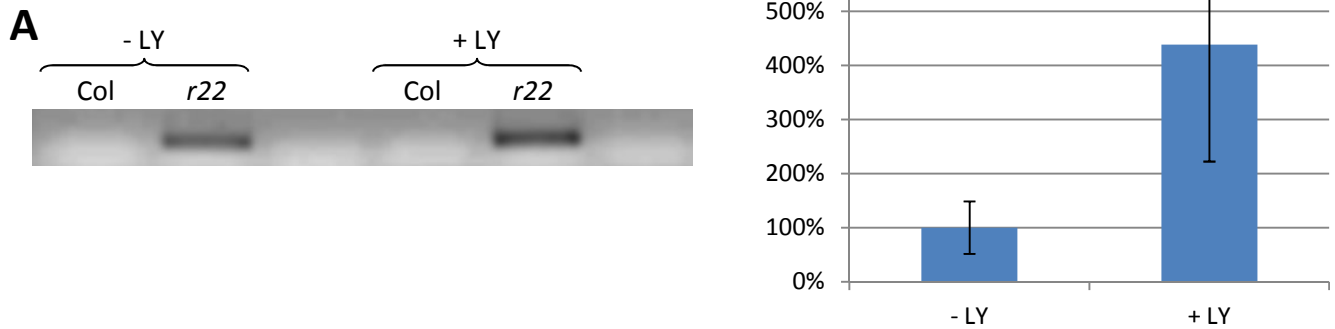


Figure 85 : L'inactivation de TOR dans les mutants *raptor.3g* ou par application de LY-294002 entraîne une surexpression de *CLV3* : (A) Mesure du niveau d'expression de *CLV3* dans les plantules de 10 jours du mutant *raptor.3g* comparé au sauvage Col-0 par RT-PCR en présence ou en absence de 10 μ M de LY-294002 ; (B) Quantification de l'expression de *CLV3* dans les plantules de 10 jours du mutant *raptor.3g* cultivé sur un milieu contenant ou non 10 μ M de LY-294002. (Le gène *APT1* a été utilisé comme gène de référence).

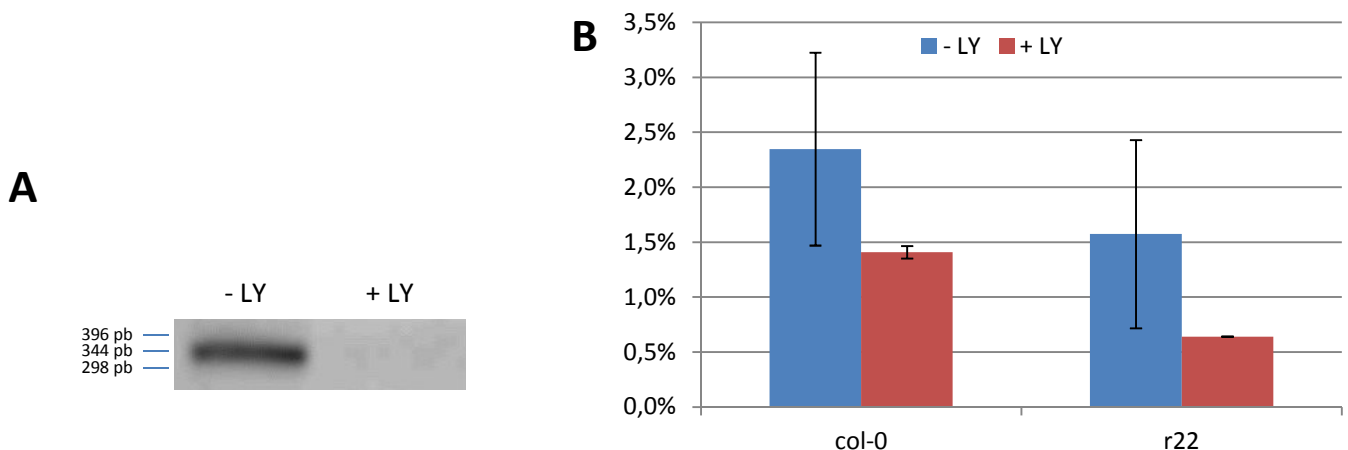


Figure 86 : L'inactivation de TOR dans les mutants *raptor.3g* ou par application de LY-294002 entraîne une répression de l'expression de *ARR7* : (A) Mesure par RT-PCR du niveau d'expression de *ARR7* dans les plantules de 10 jours de l'accession sauvage Col-0 cultivée en présence ou en absence de 10 μ M de LY-294002 ; (B) Quantification de l'expression de *ARR7* dans les plantules de 10 jours du mutant *raptor.3g* ou du sauvage Col-0 cultivé sur un milieu contenant ou non 10 μ M de LY-294002. L'expression est donnée en pourcentage du niveau d'expression d'*APT1*. Pour chaque expérience, n=3

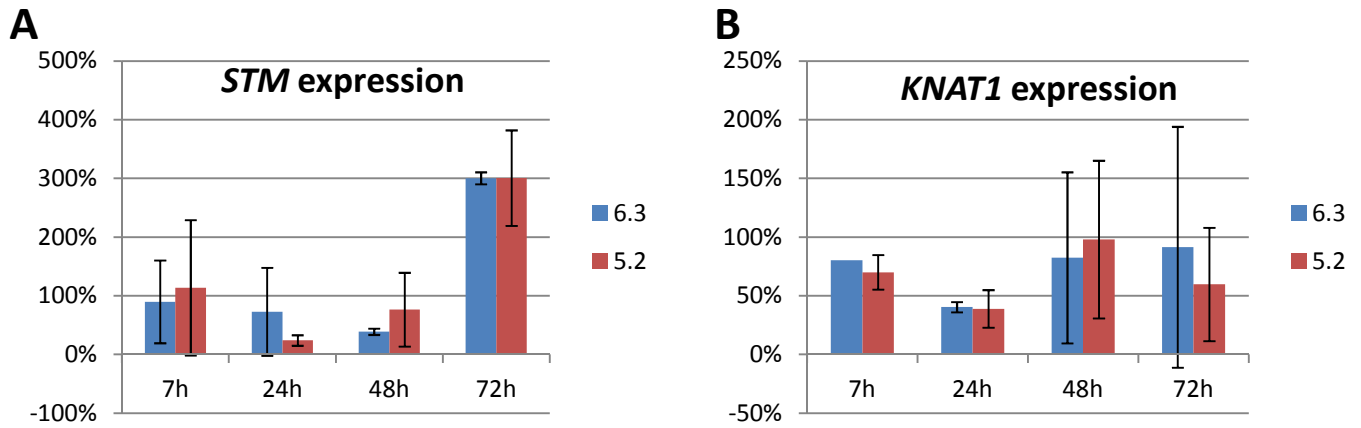


Figure 87 : L'inactivation de TOR après la germination dérègle l'expression des gènes de la famille des class I knotted1-like homeobox : Quantification de l'expression de *STM* (A) et *KNAT1* (B) dans les plantules cultivées *in vitro* pendant 7 jours en absence d'éthanol puis induites par ajout d'un bouchon d'éthanol à 5% pendant le temps indiqué. La quantification est exprimée en pourcentage du niveau d'expression dans les plantules du contrôle pAlcA-GUS traité dans les mêmes conditions. Le gène *APT1* est utilisé comme gène de référence (n=3).

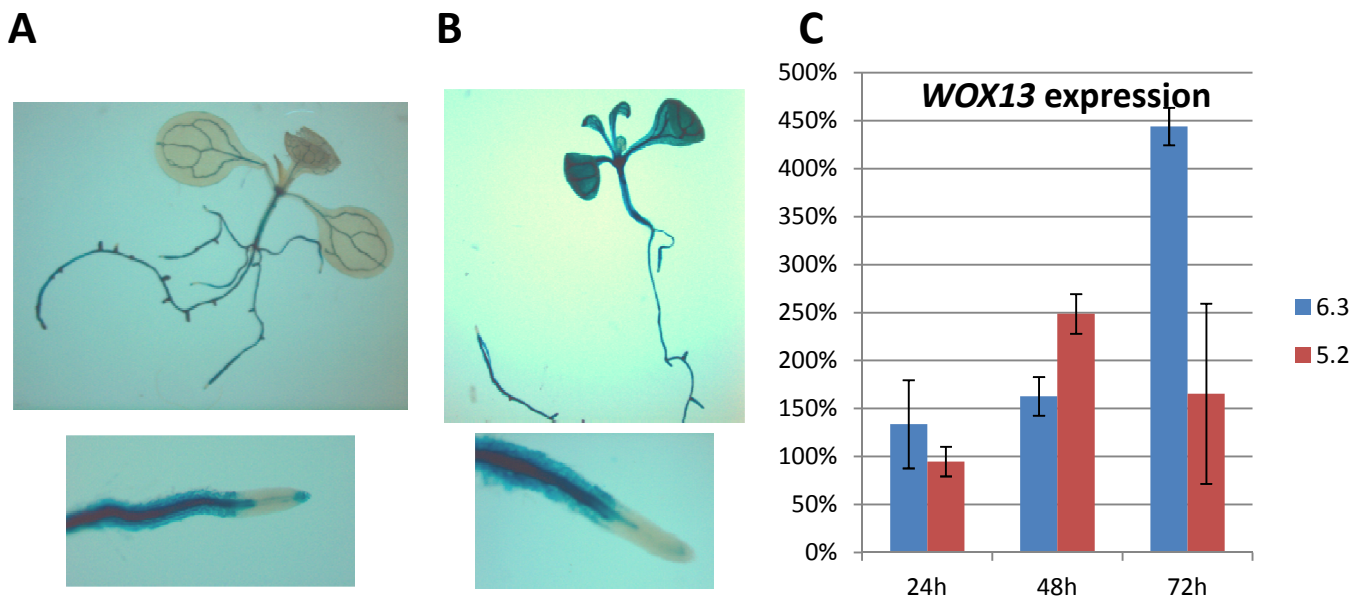


Figure 88 : L'inactivation de TOR après la germination induit l'expression de WOX13 : (A et B) Croisement entre les plantes pWOX13:GUS (WS) et les TOR RNAi (*Ler*). Les plantules ont été cultivées *in vitro* pendant 7 jours en absence d'éthanol (A) puis ont été induites par ajout d'un bouchon d'éthanol à 5% pendant 48h (B). (C) Quantification de l'expression de *WOX13* dans les TOR RNAi au cours d'une cinétique d'inactivation. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de l'expression dans les contrôles GUS correspondants. Le gène *APT1* est utilisé comme gène de référence (n=3).

l'expression de CLV3 (**figure 85**), confortant ainsi les résultats précédents. Ces approches n'ont pas permis de mettre en évidence d'induction de l'expression de WUSCHEL mais l'inactivation de TOR par ces approches révèle également une répression de l'expression de ARR7 (**figure 86**), suggérant que WUSCHEL pourrait également être induit dans ces plantes.

Tous ces résultats ont permis de mettre en évidence que l'inactivation de TOR entraîne une dérégulation importante de la transcription de CLV1, CLV3 et WUS, des gènes majeurs contrôlant l'organisation du méristème. Une telle dérégulation de l'expression de ces gènes pourrait expliquer comment l'inactivation de TOR entraîne un arrêt du développement des parties aériennes.

II.B.1.b. L'inactivation de TOR dérégule d'autres gènes méristématiques

Afin d'étudier l'impact de l'inactivation de TOR sur l'ensemble du méristème, nous avons choisi de suivre la transcription de quelques gènes clés de cette organisation. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que l'inactivation de TOR conduit à une dérégulation des gènes de la première classe de la famille des Knotted1-like Homeobox, tels que STM ou KNAT1 (**figure 87**). Ces gènes permettent d'empêcher la différenciation prématurée des cellules en les maintenant à un état non différencié. Il apparaît que des temps courts d'inactivation conduisent à une répression modérée de leur expression. Cependant, pour des temps plus longs d'inactivation de TOR, on constate une induction de l'expression de STM.

D'autres gènes présentent également un intérêt tout particulier dans le contrôle et le maintien de l'intégrité des méristèmes caulinaires et racinaires. Ainsi, il apparaît que les protéines CLAVATA3 et WUSCHEL appartiennent à des familles multigéniques : les CLE (ou CLV3/ESR-Related), au nombre de 45, pour CLAVATA3 et les WOX (ou WUS Homeobox), au nombre de 14, pour WUSCHEL. Il existe également un grand nombre d'autres facteurs impliqués dans l'induction ou la répression de la division cellulaire ou de la différenciation.

Dans le but d'étudier si l'inactivation de TOR entraîne le même impact sur l'expression des gènes WOX que sur celle de WUS, nous avons réalisé des croisements entre les lignées TOR RNAi inductibles et des lignées pWOX13:GUS (collaboration avec Yves Deveaux, IBP, Orsay) (Deveaux et al., 2008). Cette étude a montré que l'inactivation de TOR dans les

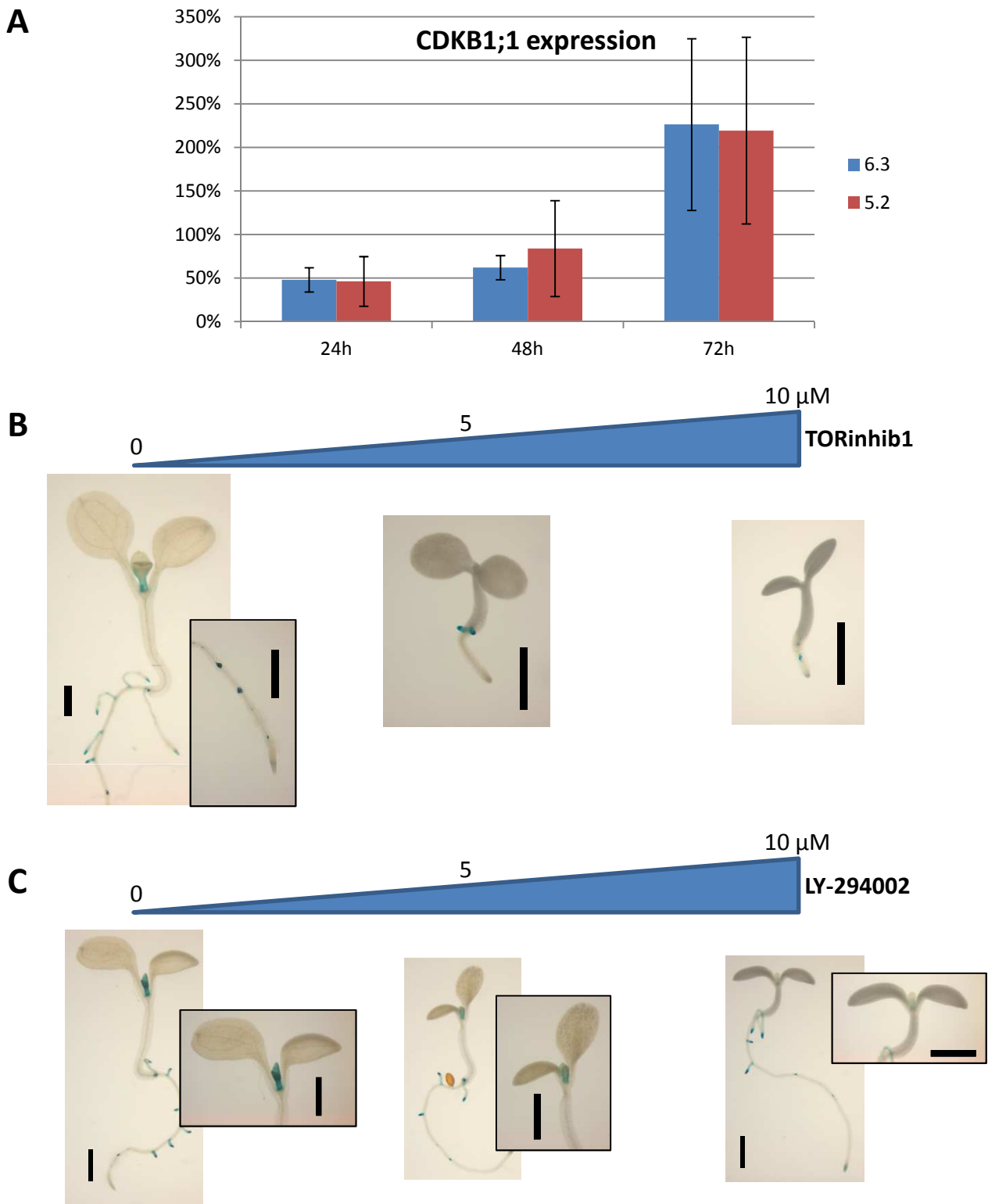


Figure 89 : L'inactivation de TOR dérégule le cycle cellulaire : (A) Quantification de l'expression de CDKB1;1 dans des plantules de TOR RNAi induites après la germination. Les plantules ont été cultivées *in vitro* pendant 7 jours en absence d'éthanol puis ont été induites par ajout d'un bouchon d'éthanol à 5% pendant le temps indiqué. Les valeurs sont exprimées en pourcentage de l'expression dans les contrôles Alca-GUS correspondants. Le gène *APT1* est utilisé comme gène de référence (n=3). (B et C) Activité du promoteur *CycB1* dans des plantules de 10 jours germées et cultivées *in vitro* sur du milieu contenant du TORinhib1 (B) ou du LY-294002 (C) à la concentration précisée. Barres = 1 mm.

plantes des lignées TOR RNAi induit l'expression de *WOX13*. Cette expression, normalement restreinte aux tissus vasculaires, s'étend à l'ensemble des cellules du parenchyme des cotylédons lorsque TOR est inactivé (**figure 88**). Cependant, il est à noter que le profil d'expression de *WOX13* au niveau de la pointe racinaire ne semble pas dérégulé par l'inactivation de TOR. Ces résultats ont été confirmés par PCR quantitative (**figure 88C**).

II.B.1.c. L'inactivation de TOR dérégule le cycle cellulaire

La régulation des gènes méristématiques joue un rôle crucial dans la régulation coordonnée dans le temps et dans l'espace des divisions cellulaires.

Afin de vérifier si l'impact de l'inactivation de TOR joue également un rôle dans la mise en place des divisions cellulaires, nous avons étudié le profil d'expression de la Cycline B1 (*CycB1*), une cycline qui intervient dans la transition entre les phases G2 et M du cycle cellulaire et qui présente donc un pic d'expression juste avant la mitose. En tant que telle, elle est donc un bon marqueur des mitoses. Nous avons utilisé des lignées exprimant le gène *uidA* sous le contrôle du promoteur du gène codant la *CycB1*. Dans ces expériences, l'inactivation de TOR a été réalisée par application d'inhibiteurs chimiques tels que le LY-294002 (inhibiteur des PI3 kinases) ou un inhibiteur de TOR que nous appellerons TORinhib1 et dont l'action inhibitrice de la croissance des plantes a été préalablement démontrée lors d'un crible réalisé par Marie-Hélène Montané et Benoit Menand (LGBP, Marseille, Manuscrit en préparation). Nous avons ainsi montré que l'inactivation de TOR par ces méthodes entraîne une répression de l'activité du promoteur *CycB1* (**figure 89B et C**).

Afin de confirmer ces résultats, nous avons suivi l'expression de la Cyclin-Dependent Kinase CDKB1 (anciennement nommée *Cdc2b*) dont l'activité est également maximale pendant la transition G2-M. L'inactivation de TOR sur des plantules déjà germées entraîne d'abord une répression de l'expression de CDKB1 puis son augmentation à partir de 72h d'inactivation (**figure 89A**). Ce profil est semblable au profil d'expression du gène *STM* et pourrait expliquer que la réversibilité de l'inactivation de TOR ne soit plus possible après 48h (Moreau, 2009).

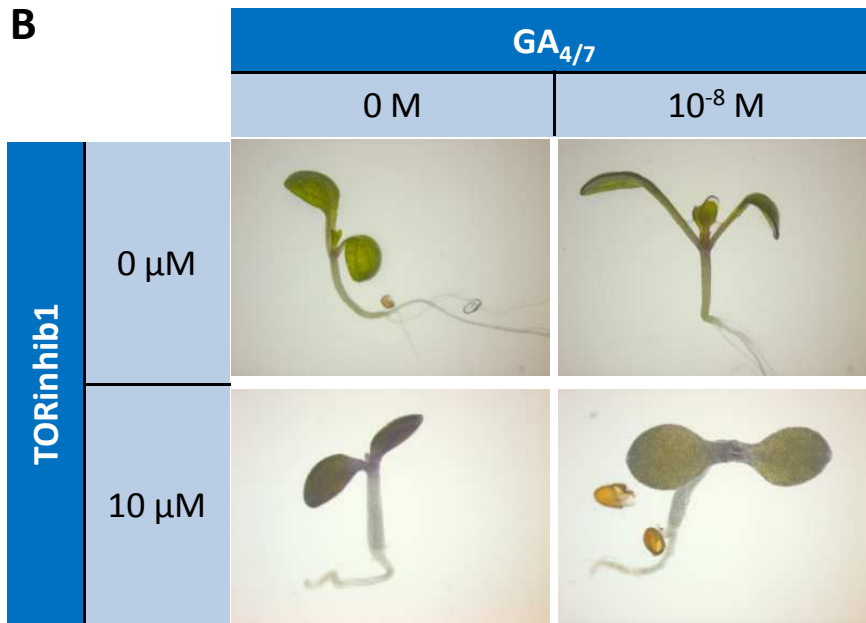
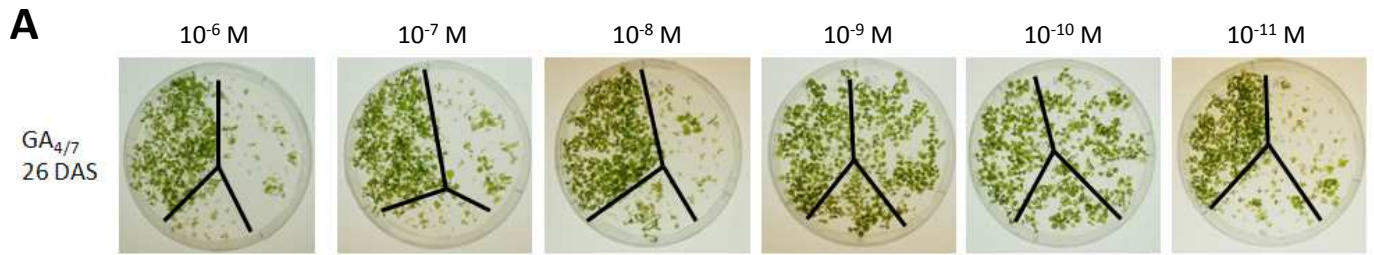


Figure 90 : L'application exogène de gibbérellines permet de réverter une partie du phénotype dû à l'inactivation de TOR : (A) Aspect des plantules des lignées TOR RNAi après 26 jours de culture *in vitro* sur un milieu solide (Murashige & Skoog 1/5 additionné de 0.3% de saccharose) additionné de GA_{4/7} à la concentration indiquée. Chaque boîte contient, en haut à gauche, le contrôle GUS, en haut à droite, le TOR RNAi 6.3 et, en bas, le TOR RNAi 5.2. (B) Aspect des plantules de la lignée sauvage Col-8 cultivées pendant 7 jours *in vitro* dans un milieu liquide (Murashige & Skoog 1/5 additionné de 1% de saccharose) et additionné également de GA_{4/7} à la concentration indiquée et/ou de TORinhib1 à la concentration indiquée.

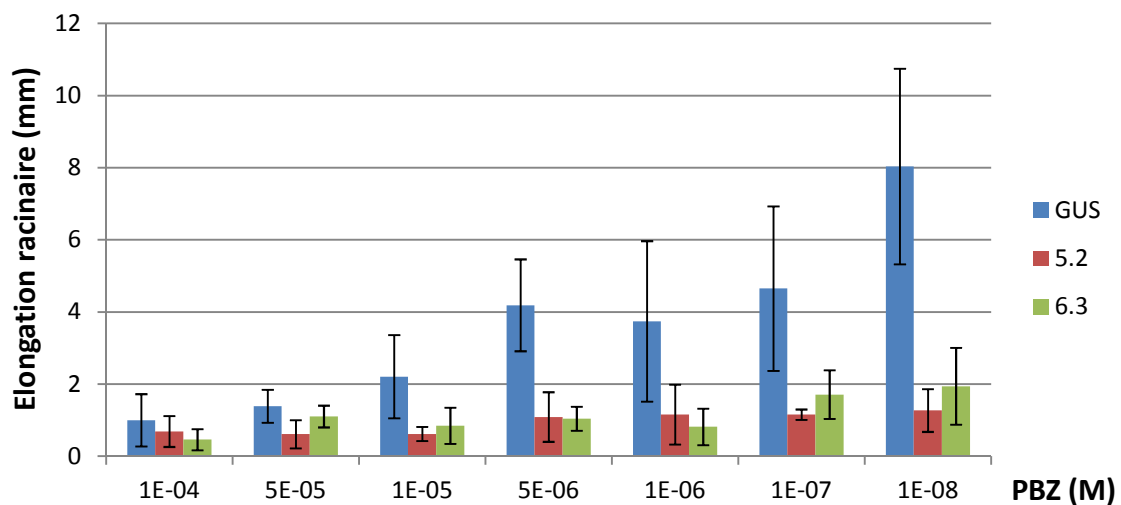


Figure 91 : L'application exogène de paclobutrazol a peu d'effet sur les TOR RNAi : Les plantules des lignées TOR RNAi ont d'abord été cultivées pendant 7 jours en absence d'éthanol et de paclobutrazol puis transférées sur un milieu contenant 100 mM d'éthanol et du paclobutrazol (PBZ) à la concentration indiquée. La mesure de l'élongation racinaire a été mesurée après 3 jours (n=10).

II.B.2. TOR, les hormones et le méristème

Les hormones jouent un rôle crucial dans la régulation de l'organisation des méristèmes, de concert avec la régulation de l'expression des gènes méristématiques. Il a déjà été montré que l'apport exogène d'auxines conduit à une augmentation de la zone d'expression de TOR (Menand et al., 2002; Deprost, 2005, Sormani, non publié). Il a également été rapporté que l'apport exogène de cytokinines entraîne une diminution de l'expression de TOR dans la pointe racinaire (Rodnay Sormani, données non publiées). Ces données ainsi que l'impact de l'inactivation de TOR sur l'organisation du méristème et sur l'expression des gènes méristématiques suggère que TOR pourrait participer à la régulation de certaines voies hormonales.

Afin d'étudier l'impact de l'inactivation de TOR sur la biosynthèse, l'accumulation et la signalisation des hormones, nous avons observé l'impact de l'apport exogène de divers hormones sur le développement des plantes dans lesquelles TOR est inactivé. L'étude a principalement porté sur (i) l'observation visuelle des parties aériennes de plantules de TOR RNAi inductibles germées sur un milieu contenant de l'éthanol et additionné ou non d'hormones ou sur (ii) l'élongation racinaire de plantules de TOR RNAi cultivées pendant 7 jours en absence d'éthanol puis transférées sur un milieu contenant de l'éthanol et additionné ou non d'hormones. Les hormones testées étaient les gibbérellines ($GA_{4/7}$ et GA_3), les auxines (2,4-D et ANA), une cytokinine (BAP), un inhibiteur du transport polaire d'auxines (TIBA) et un inhibiteur de la biosynthèse de gibbérellines (paclobutrazol).

Concernant l'inactivation de TOR au cours de la germination et en présence d'hormones, nous n'avons pas observé de différence notable sauf celle due à l'application exogène de gibbérellines. En effet, nous avons vu que, en présence de $GA_{4/7}$, les plantes des TOR RNAi inductibles à l'éthanol et germées en présence d'éthanol présentent un meilleur développement des parties aériennes (**figure 90A**). Nous avons voulu confirmer ce résultat en utilisant une approche pharmacologique de l'inactivation de TOR par application de TORinhib1. Nous avons ainsi pu mettre en évidence que l'application de gibbérellines permet également de réverter une partie du phénotype des plantes cultivées en présence d'une telle drogue (**figure 90B**). Ainsi, les gibbérellines permettent un meilleur développement des parties aériennes accompagné d'un verdissement des cotylédons.

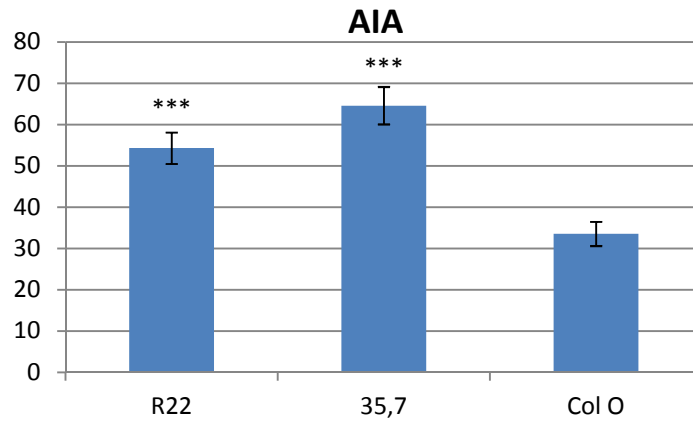


Figure 92 : Quantification de l'acide indole-acétique dans des rosettes de différents mutants de la voie de TOR : Les plantes ont été cultivées pendant 40 jours en chambre de culture en jours courts puis ces deux hormones ont été extraites et quantifiées. Les génotypes utilisés sont : un mutant *raptor.3g* (R22) et une lignée exprimant de manière constitutive un RNAi dirigé contre TOR (35.7). Toutes les quantifications sont comparées à celles dans la lignée sauvage Col-0. Les quantités sont exprimées en picogrammes d'hormone par milligramme de matière sèche (n=3). *** p-value < 0.01

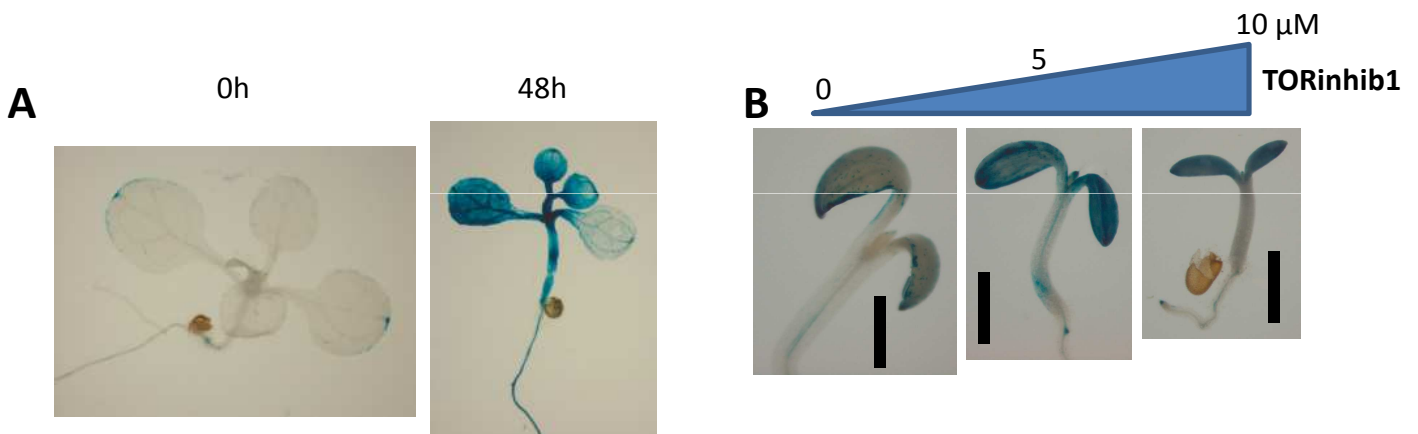


Figure 93 : L'inactivation de TOR conduit à une extension du domaine d'activité du promoteur synthétique DR5 : (A) Les plantes issues du croisement entre la lignée TOR RNAi 6.3 et la lignée rapportrice pDR5:GUS ont été cultivées pendant 7 jours *in vitro* sur un milieu dépourvu d'éthanol puis induites par ajout d'un bouchon contenant de l'éthanol à 5% pendant le temps indiqué. (B) Les graines de la lignée rapportrice pDR5:GUS ont été semées directement sur un milieu de culture liquide (Murashige & Skoog 1/5 additionné de saccharose à 1%) et additionné dès le semis de TORinhib1 à la concentration indiquée. Les plantes ont ensuite été cultivées pendant 7 jours avant coloration.

Toutefois, on constate que l'application de gibbérellines ne permet pas de diminuer l'accumulation d'anthocyanes dans les cotylédons et dans l'hypocotyle, suggérant ainsi que la réponse à l'inactivation de TOR pourrait suivre deux voies dont l'une uniquement serait dépendante des gibbérellines.

Concernant l'étude de l'impact sur l'élongation racinaire de plantules déjà germées, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence majeure. Il semble toutefois que les plantes des TOR RNAi inductibles à l'éthanol soient moins sensibles à l'application exogène de paclobutrazol que les plantes contrôles Alca-GUS (**figure 91**).

Ainsi, nous n'avons pas pu observer d'effet de l'apport exogène d'auxines sur le développement tant foliaire que racinaire des plantes dans lesquelles TOR est inactivée. Cependant, étant donné qu'il s'agit d'une hormone extrêmement importante pour l'organisation du méristème et la division cellulaire, nous avons tout de même cherché à savoir si la voie des auxines n'est pas altérée dans ces plantes. Dans un premier temps, nous avons quantifié les auxines par une approche de chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en réponse à l'inactivation de TOR (collaboration avec Stéphanie Boutet, plateforme LC2V, IJPB). Etant donnée la quantité importante de matériel végétal à fournir pour une telle analyse (50 mg de matière sèche), je n'ai pas pu la réaliser sur les lignées TOR RNAi inductibles. J'ai donc travaillé sur des rosettes de plantes de mutants *raptor* ou sur des plantes exprimant un ARN interférant avec les ARN messagers de TOR et exprimé sous le contrôle du promoteur constitutif viral p35S. De manière intéressante, cette quantification a mis en évidence une forte accumulation d'auxines lorsque TOR est inactivé (**figure 92**), suggérant que cette hormone pourrait également jouer un rôle important dans la voie de signalisation de TOR.

J'ai voulu confirmer ce résultat en suivant la domaine d'activité du promoteur synthétique DR5 dérivant de l'auxine Response Element (AuxRE) provenant du promoteur du gène GH3. L'utilisation des lignées pDR5:GUS permet donc de suivre la localisation des auxines actives dans la plante. Nous avons ainsi pu montrer que l'inactivation de TOR sur des plantules après la germination (**figure 93A**) ou au cours de la germination (**figure 93B**), par utilisation des lignées TOR RNAi inductibles à l'éthanol ou par application de TORinhib1,

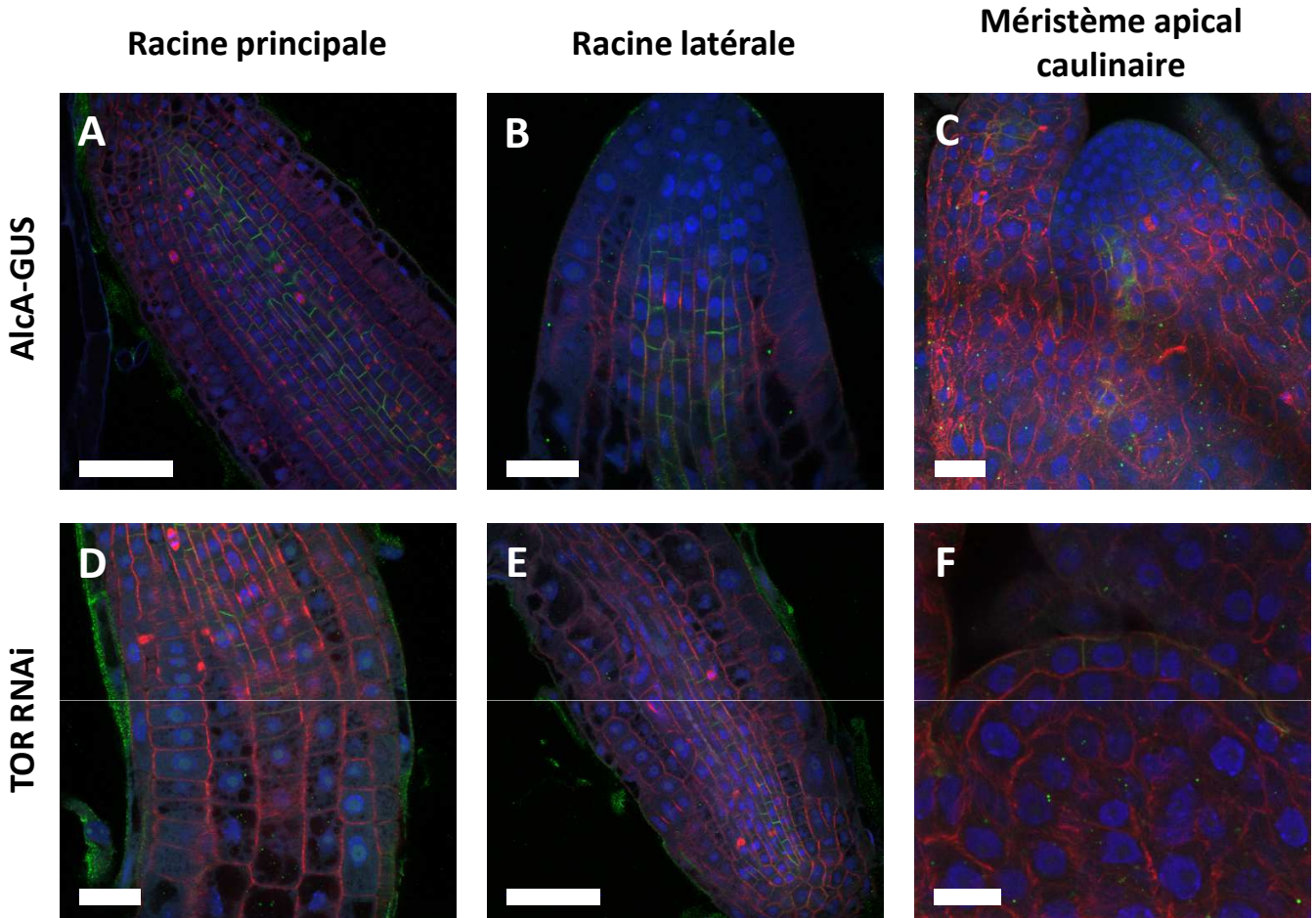


Figure 94 : L'inactivation n'entraîne pas de perturbation dans la localisation polaire du transporteur PIN1 : Immunolocalisation sur des plantules de contrôles GUS (**A-C**) et de TOR RNAi 5.2 (**D-F**) mettant en évidence la localisation des noyaux (marquage au DAPI – bleu), du cytosquelette (immunolocalisation des tubulines – rouge) et du transporteur PIN1 (immunolocalisation – vert) dans des racines principales (**A et D**), des pointes de racines secondaires (**B et E**) et des méristèmes caulinaires (**C et F**). Les plantes ont été cultivées pendant 7 jours en absence d'éthanol puis induites pendant 72 heures par ajout d'un bouchon contenant de l'éthanol à 5%. Barres = 50 μm (**A et E**), 20 μm (**B, C et D**) et 10 μm (**F**).

conduit à une extension du domaine d'activité du promoteur DR5, suggérant également une extension de la zone d'accumulation des auxines dans les parties aériennes.

Cette accumulation d'auxines dans les parties aériennes peut être due à une activation de la biosynthèse de cette hormone, à une répression de sa dégradation ou de son stockage sous des formes inactives ou à un défaut de son transport polarisée. Afin de tester cette dernière hypothèse, nous nous sommes intéressés à la localisation subcellulaire de PIN1, un transporteur impliqué dans l'efflux polarisée de l'auxine dans les cellules. Nous avons donc vérifié la bonne localisation de ce transporteur dans les cellules lors de l'inactivation de TOR sur des plantules de TOR RNAi inducibles induites pendant 72h (collaboration avec Halima Morin, plateforme de cytologie, IJPB). Nous avons alors confirmé qu'une telle inactivation entraîne, au niveau de la pointe de la racine principale, au niveau des pointes des racines latérales et au niveau du méristème caulinaire entraîne des perturbations d'organisation cellulaire comme nous l'avons déjà décrit au début de ce chapitre. Toutefois, il apparaît que, malgré ces désorganisations cellulaires, les protéines PIN1 semblent convenablement localisées (**figure 94**). En effet, on constate que, dans les racines des plantes TOR RNAi, cette protéine est effectivement localisée au niveau de la face basale des cellules et, dans la L1 du méristème caulinaire, on la retrouve orientée de façon à favoriser le transport le long de la L1.

II.C. Conclusion

L'objectif de ce chapitre était de documenter l'impact de l'inactivation de TOR sur l'organisation du méristème aussi bien au niveau cytotologique que moléculaire ou hormonal. Ainsi, nous avons pu voir en utilisant des approches complémentaires d'inactivation de TOR par des méthodes génétiques et pharmacologiques que celle-ci entraîne d'importante dérégulation au sein du méristème.

Ceci a permis de mettre en évidence que l'inactivation de TOR perturbe l'organisation cellulaire des méristèmes de manière graduelle au fur et à mesure de l'inactivation de TOR.

Nous avons également mis en évidence que l'inactivation de TOR entraîne une désorganisation importante du profil d'expression des gènes impliqués dans l'organisation du méristème :

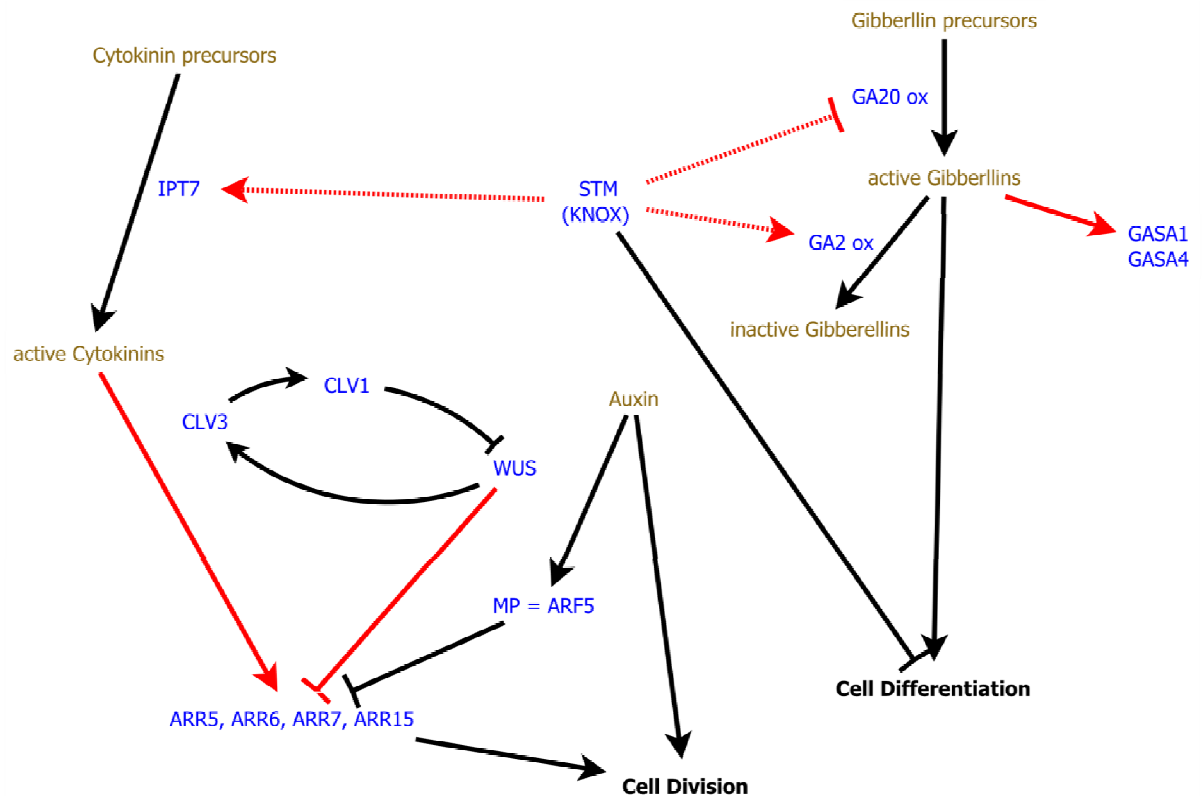


Figure 95: Représentation schématique simplifiée du rôle moléculaire des gènes principaux impliqués dans l'organisation méristématique et des hormones. L'expression de WUS permet l'expression de CLV3, un oligopeptide qui est excrété et se fixe sur un récepteur transmembranaire CLV1/CLV2, ce qui entraîne une diminution de l'expression de WUS. WUSCHEL, quant à lui, réprime l'expression des gènes ARR5, ARR6, ARR7 et ARR15, intervenant ainsi dans la transduction du signal en réponse à la perception des cytokinines. Ces gènes de réponse aux cytokinines sont également régulés par MONOPTEROS, en réponse à la perception du signal auxine. Cette voie permet de réguler la division cellulaire. Par ailleurs, le gène STM (qui fait partie de la famille des KNOX) est capable de réprimer la production de gibbérellines actives en contrôlant l'expression de la GA20 oxydase et de la GA2 oxydase, ce qui résulte en un contrôle de la différenciation cellulaire. Il est également à noter que le gène STM intervient également dans le contrôle de l'expression de IPT7, une enzyme clé de la biosynthèse des cytokinines.

	STM	CLV1	CLV3	WUS	ARR7	ARR5	WOX13	CDKB1;1
TOR RNAi inducible à l'éthanol	Green	Green	Red	Red	Green	Green	Red	Green
P35S :AlcR – pAlcA :WUS	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Red	Red
Traitement LY et/ou TORinib1		Green	Red	Red	Green	Green		

Tableau 15 : Impact de l'inactivation de TOR sur l'expression des gènes STM, CLV1, CLV3, WUS, ARR7, ARR5, WOX13 et CDKB1;1. Les méthodes utilisées pour inactiver TOR sont l'utilisation des lignées TOR RNAi inducibles à l'éthanol et l'application de LY-294002, un inhibiteur des PI3 kinases, ou de TORinib1, un inhibiteur spécifique de TOR. Les résultats obtenus avec des lignées surexprimant WUSCHEL sous le contrôle d'un promoteur inducible à l'éthanol sont donnés à titre indicatif. Les cases rouges représentent une surexpression tandis que les cases vertes représentent une répression.

Enfin, nous avons pu mettre en évidence que l'application exogène de gibbérellines entraîne une réversion (au moins) partielle de l'inactivation de TOR et que les plantes dans lesquelles TOR est inactivé accumulent les auxines mais que cette accumulation ne semble pas due à une dérégulation du transport polarisé des auxines.

A l'intérieur du méristème, il a été décrit que toutes ces voies interagissent les une avec les autres et se contrôlent mutuellement (**figure 95**). Même s'il serait encore trop spéculatif pour l'instant de présenter un modèle expliquant clairement comment TOR intervient dans la régulation de ces différentes voies au sein du méristème, nous avons pu constater que l'ensemble de ces voies semblent impliqué dans la réponse à l'inactivation de TOR suggérant ainsi que TOR contrôle plus ou moins directement ces voies de signalisation de TOR. Nous avons également pu mettre en évidence que l'inactivation de TOR entraîne parfois des variations d'expression qui changent de sens au cours de cette inactivation (comme nous l'avons vu pour l'expression de *STM* ou de *CDKB1*) suggérant l'existence de boucles de rétrocontrôle qui devraient être étudiées et prises en compte dans ce modèle. Plusieurs hypothèses permettant d'expliquer, au moins partiellement, les observations réalisées dans ce chapitre seront développées dans la partie Discussion.

Discussion

Chez les plantes, comme chez les autres eucaryotes, la kinase TOR intègre un certain nombre de stimuli endogènes ou environnementaux tels que la disponibilité en nutriments, la présence de phytohormones (et notamment d'auxines), la présence de métaux lourds ou de stress salin dans le milieu de culture, ... En réponse à ces facteurs, la voie de signalisation de cette kinase contrôle positivement la croissance et réprime la sénescence, l'autophagie.

Depuis quelques années, il a été montré que, chez les plantes, cette kinase peut agir en complexe en faisant intervenir les protéines RAPTOR (Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2005) et LST8 (Díaz-Troya et al., 2008; Moreau et al., 2012). Les cibles moléculaires directes de ce complexe pourraient être la S6 kinase (Mahfouz et al., 2006) et TAP46 (Ahn et al., 2011) qui ont été montrées comme étant directement phosphorylées par TOR.

Toutefois, les mécanismes moléculaires permettant de faire le lien entre le niveau d'activité de TOR et la croissance chez les plantes restent toujours à élucider. En effet, récemment, un effort a été fourni afin d'identifier des voies métaboliques dérégulées en réponse à l'inactivation de TOR (pour revue : Moreau, 2009; Dobrenel et al., 2011) mais les mécanismes moléculaires en jeu n'ont toujours pas été décrits. C'est dans cet objectif de grande envergure que s'inscrit ma thèse.

Mon travail a donc été de chercher à identifier de nouvelles cibles potentielles de TOR. A cette fin, je me suis intéressé à un compartiment subcellulaire abondant et facile à purifier, le ribosome. Qui plus est, on sait, chez d'autres organismes, que l'inactivation de TOR entraîne des modifications au sein du ribosome et que, chez les plantes, une telle inactivation entraîne également une différence au niveau de l'abondance de ces particules, suggérant une conservation de cette voie. Je me suis également intéressé à l'étude d'une structure pluricellulaire typique des végétaux, berceau de la croissance végétative et reproductive, le méristème. De par la spécificité végétale de cette structure, l'objectif de ce chapitre était donc d'identifier des cibles de TOR spécifiques des plantes.

Chacune de ces deux études a permis de rappeler que TOR joue un rôle central dans les voies de signalisation permettant la croissance et c'est sans surprise que nous avons

montré que l'inactivation de TOR entraîne des conséquences pléiotropes. Ces deux études ont également permis de suggérer un certain nombre d'acteurs qui pourraient être des cibles potentielles de TOR et permettraient de moduler son effet sur la croissance et le développement. Le rôle de ces cibles va être discuté dans ce chapitre.

I. CONTROLE DE LA COMPOSITION DU RIBOSOME PAR LA KINASE TOR

La vie cellulaire nécessite la synthèse *de novo* de protéines, que ce soit pour assurer le métabolisme de base, la division ou le changement d'identité. Cette synthèse implique nécessairement l'intégralité de la machinerie traductionnelle dans laquelle on trouve le ribosome, siège de la traduction protéique elle-même. En outre, la synthèse du ribosome nécessite elle-même un grand nombre de protéines diverses et de mécanismes très énergivores tels que la transcription des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert. Cette synthèse doit donc être parfaitement coordonnée avec l'état énergétique de la cellule. Etant donné le lien qui existe entre la voie de signalisation de TOR et la perception de l'état énergétique intracellulaire, il apparaît comme évident qu'il pourrait y avoir un lien entre la voie de signalisation de TOR et la biosynthèse ou l'activité des ribosomes.

Ce lien a déjà été mis en évidence chez les mammifères et la levure. Ainsi, chez ces organismes, il a été montré un lien entre la phosphorylation de la protéine ribosomiale RPS6 et le complexe mTORC1 (via la S6 kinase) et il a également été montré que les mutants *sch9* de levure présentent une répression globale de la transcription des gènes codant les protéines ribosomiales (Huber et al., 2011). Par ailleurs, TOR régule l'activité des ARN polymérase I et III et, donc, la transcription des ARN ribosomiaux et des ARN de transferts. Ce lien semble également exister chez les plantes dans lesquelles il a été montré que l'inactivation de TOR entraîne également une modification du profil des polysomes.

Chez les plantes, il a également été montré que la kinase TOR phosphoryle la S6 kinase sur la même thréonine que chez les animaux (Mahfouz et al., 2006; Schepetilnikov et al., 2011; Xiong and Sheen, 2012). Chez le maïs, les protéines RPS6 présentent cinq sites de phosphorylation à l'extrémité C-terminale (S^{238} , S^{241} , S^{247} , T^{250} et S^{251}) et l'activation des protéines s'effectuerait par phosphorylations séquentielles (Williams et al., 2003). La

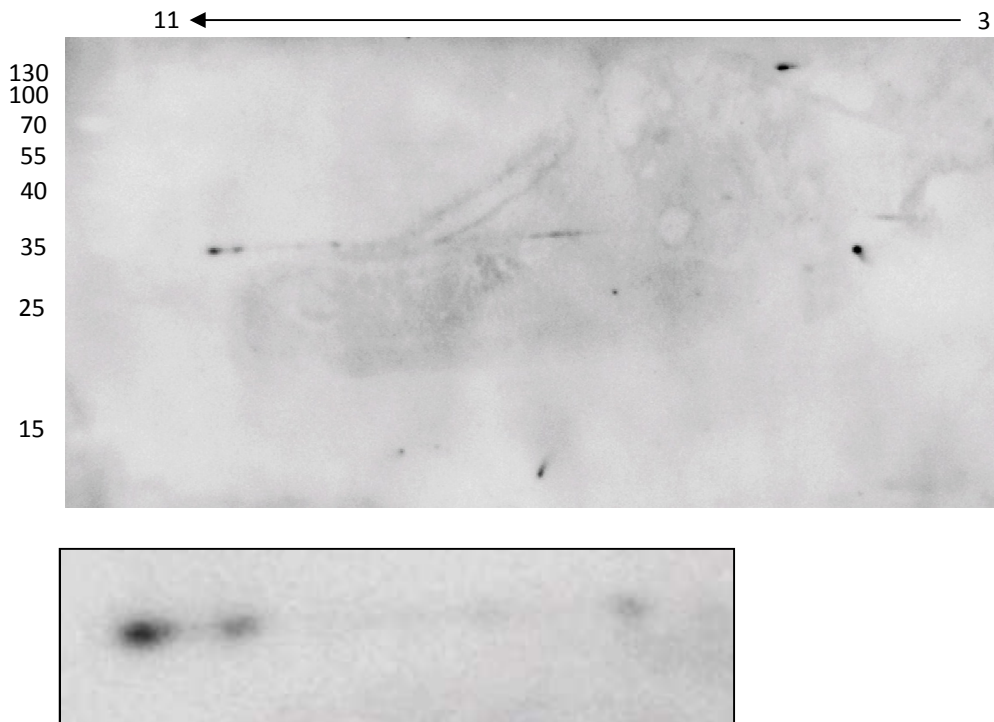


Figure 96: Recherche des sites de phosphorylation sur la RPS6 d'Arabidopsis. Un extrait brut de protéines d'Arabidopsis a été soumis à une migration sur un gel de polyacrylamide à 2 dimensions puis révélé après transfert avec un anticorps dirigé contre la protéine RPS6 humaine. Un agrandissement de la zone où devrait se trouver la RPS6 montre la présence d'un train de spots, caractéristique de la présence de plusieurs sites de phosphorylation.

phosphorylation de la Ser²³⁸ est réduite en réponse à la privation d'oxygène et les stress chauds mais induite en cas de stress froid (Williams et al., 2003) et, chez Arabidopsis, la phosphorylation de la RPS6 (dont celle de la Ser²⁴¹) est plus élevée lorsque la plante est à la lumière par rapport à des plantes à l'obscurité (Turkina et al., 2011).

De manière intéressante, nous avons montré dans cette étude que l'inactivation de TOR dans les lignées TOR RNAi inductibles entraîne une diminution de la phosphorylation des deux RPS6A et RPS6B sur la Ser²⁴¹. Ce résultat suggère donc fortement que, chez les plantes, TOR phosphoryle et active la S6 kinase qui, à son tour phosphoryle les protéines ribosomales RPS6. La phosphorylation sur le site que nous avons identifié dépend donc du niveau d'activité de TOR. Ce résultat suggère fortement que les lignées RNAi présentent bien moins d'activité de TOR et a également permis de développer un marqueur robuste de l'activité de TOR qui fait encore défaut chez les plantes. Un tel marqueur va nous permettre de suivre l'activité de TOR dans différents mutants ou en réponse à des stress par exemple.

Il est à noter que nous n'avons identifié qu'un seul site de phosphorylation dans la RPS6 alors que plusieurs ont déjà été décrits chez les plantes (Williams et al., 2003; Turkina et al., 2011). Il est possible que l'approche utilisée n'ait pas été suffisamment sensible pour détecter les autres sites de phosphorylation ou que les autres phosphorylations aient été perdues dans nos échantillons. En effet, nous avons montré sur des fractions protéiques totales de plantules d'Arabidopsis que les RPS6 possèdent vraisemblablement plusieurs sites de phosphorylation (**figure 96**). Il est également possible que le taux de phosphorylation de la Ser²⁴¹ soit plus important. L'efficacité de traduction d'ARNm avec une extrémité 5' TOP est souvent corrélée avec l'activité de TOR, l'activation de la S6 kinase et donc la phosphorylation de la RPS6 (Wullschleger et al., 2006). Ce modèle est malgré tout remis en question (pour revue, Ruvinsky and Meyuhas, 2006). Ainsi des souris exprimant une RPS6 où l'ensemble des sérines phosphorylables a été remplacé par des résidus non-phosphorylables ne montrent aucune différence dans la traduction des ARNm de type 5' TOP (Ruvinsky et al., 2005) ce qui va dans le même sens que les résultats obtenus chez les levures où la substitution des sérines en C-terminal par des alanines n'a pas d'effet sur la croissance en présence de divers substrats carbonés, sur la sporulation ou la sensibilité aux chocs thermiques (Johnson and Warner, 1987).

Le rôle exact de la phosphorylation de la RPS6 reste donc à établir et il se pourrait que ces modifications aient un rôle plus global de régulation du métabolisme et du développement. En effet les souris exprimant une version non-phosphorylable de la RPS6 montrent une taille réduite de certains types cellulaires et des perturbations du métabolisme du glucose (Ruvinsky and Meyuhas, 2006). Par contre il est établi que la RPS6 est phosphorylée de façon plus importante dans les tissus en prolifération. Des hybridations *in situ* avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la phospho-RPS6 chez les plantes pourraient apporter des informations importantes sur le rôle de ces modifications chez ces organismes.

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence plusieurs conséquences globales de l'inactivation de TOR. En premier lieu, nous avons montré que l'inactivation de TOR entraîne une répression de l'expression des protéines du ribosome chloroplastique en réprimant la transcription et la traduction des gènes nucléaires codant ce ribosome. Nous avons également montré que ceci résulte en une diminution de l'abondance des protéines de ce ribosome. Ce résultat est à mettre en lien avec la diminution que nous avons également observée de la quantité de protéines impliquée dans la photosynthèse comme la RubisCO, les photosystèmes et les protéines liées aux photosystèmes. Ce résultat suggère donc une répression globale des protéines chloroplastiques et nous pouvons penser que ceci est lié à la diminution de la quantité de chloroplaste dans les cellules. Cette conséquence de l'inactivation de TOR pourrait expliquer pourquoi une telle inactivation entraîne l'apparition de chloroses sur des plantules déjà développées mais aussi le non verdissement des cotylédons dans les plantules dans lesquelles TOR est inactivé dès la germination.

Concernant le ribosome cytoplasmique, nous avons mis en évidence une réponse dynamique à l'inactivation de TOR. Ainsi, il apparait que des temps courts d'inactivation de TOR (7h et 24h) entraînent une légère induction transcriptionnelle et traductionnelle de l'ensemble des gènes codant des protéines ribosomales. Moreau et al. (2012) ont également montré que, après deux jours de jours longs, les mutants *atlst8-1* surexpriment plusieurs gènes codant des protéines ribosomales. Cette induction de l'expression des gènes en réponse à l'inactivation de TOR est relativement surprenante étant données que chez la levure, les mutations dans *SCH9* (une cible de TOR de la famille des AGC kinases comme la S6 kinase) entraîne une répression de la transcription de l'ensemble des gènes codant des

protéines ribosomales (Huber et al., 2011). Après 72h d'inactivation de TOR (ou une inactivation prolongée), nous avons mis en évidence que certaines protéines ribosomales sont induites pendant que d'autres sont réprimées suggérant une différence de composition du ribosome. De manière intéressante, nous avons constaté que les modifications observées après 72h d'inactivation ne sont pas toujours observées pour des temps d'inactivation plus longs et que certaines perturbations apparaissent qui n'avaient pas été rapporté après 72h d'inactivation. Afin de confirmer ces résultats, il faudrait réaliser suivre quantitativement la présence de ces protéines dans les ribosomes et dans un extrait protéique total afin de vérifier si la modification d'abondance est due à une différence d'abondance dans la cellule ou à une différence d'abondance uniquement dans le ribosome.

Parmi ces cibles, deux familles de protéines ont attiré notre attention. La première est la famille des RPS5 cytosoliques dans laquelle nous avons vu que l'abondance de la RPS5A est plus élevée et que celle de la RPS5B est diminuée lors de l'inactivation de TOR. De manière intéressante, il a été montré que la RPS5A est exprimé dans les cellules en divisions alors que la RPS5B est exprimé dans les cellules en différenciation (Weijers et al., 2001). Ceci suggère que l'inactivation de TOR pourrait entraîner des perturbations d'identité cellulaire (ce point est développé dans la partie Discussion qui traite du lien entre TOR et le méristème, page 103). Des lignées d'*Arabidopsis* exprimant le gène rapporteur GUS sous contrôle des promoteurs des gènes RPS5A et RPS5B sont disponibles (Weijers et al., 2001) et pourraient être utilisées pour confirmer le rôle de TOR dans l'expression de ces deux gènes RPS5.

Nous avons également montré que l'inactivation de TOR entraîne des modifications des protéines constitutives du stalk de la grosse sous-unité ribosomale, à la fois au niveau de sa composition protéique et au niveau de l'état de phosphorylation de ces protéines. Cette modification est particulièrement importante puisqu'il a été rapporté que ce stalk est essentiel pour l'activité du ribosome et qu'il permet l'interaction entre le ribosome et les facteurs d'élongation de la traduction (Tchórzewski et al., 2003) et il a également été montré que le niveau de phosphorylation de ces protéines peut affecter la traduction (Ballesta et al., 1999). Toutefois, la phosphorylation de ce peptide n'est pas affectée entre le jour et la nuit (Turkina et al., 2011) mais il a été montré que, chez le maïs, une privation d'oxygène

pendant 24h entraîne une diminution du degré de phosphorylation de ces protéines (Szick-Miranda and Bailey-Serres, 2001).

L'impact de l'inactivation de TOR sur le ribosome mitochondrial n'a pas pu être étudié ici puisque très peu des protéines qui le constituent ont été identifiées dans nos échantillons. Cette absence de protéines du ribosome mitochondrial peut être due à un nombre de mitochondries relativement faible dans les cellules constitutives de nos échantillons ou sur une activité ribosomale relativement faible dans les mitochondries de ces cellules.

D'autres protéines ont été copurifiées en même temps que les ribosomes. Il s'agit de protéines liées à des ribosomes ou en cours de traduction ou encore des protéines constitutives de particules de taille importante. De manière surprenante, nous n'avons pas retrouvé dans ces protéines de peptides pouvant correspondre à TOR, LST8 ou RAPTOR ou encore de peptides des protéines RICTOR et SIN1 humaines dans la fraction ribosomale. Ceci suggère que TOR ni aucune des protéines qui lui sont associées n'ont été copurifiées avec les ribosomes et que TOR ne serait pas associé aux ribosomes dans nos échantillons. En effet, il a été rapporté que le complexe TORC2 interagit physiquement avec le ribosome dans les cellules humaines et qu'ils peuvent être copurifiés (Zinzalla et al., 2011) et l'interaction entre TOR et le ribosome d'*Arabidopsis* a également déjà été rapportée (Schepetilnikov et al., 2011). Malgré tout, le complexe TOR est très peu abondant et il est vraisemblable que sa détection soit difficile dans nos échantillons.

Parmi les protéines qui ont été purifiées avec les particules ribosomales, nous avons retrouvé plusieurs protéines liées au métabolisme du carbone comme des enzymes de la glycolyse et une amidon synthase. De manière intéressante, l'inactivation de TOR entraîne une diminution de l'abondance de ces protéines dans la fraction ribosomale. Ces différences constatées au niveau protéomique ont également été constatées pour plusieurs autres protéines du métabolisme carboné au niveau transcriptomique et traductomique. Qui plus est, cette perturbation des enzymes liées au métabolisme carboné ont des répercussions sur l'accumulation de certains métabolites. Ainsi, j'ai montré que l'inactivation de TOR entraîne une accumulation d'amidon et Manon Moreau avait montré (2009) qu'une telle inactivation

entraîne également une accumulation de saccharose, d'amidon, de glucose, de glucose-6-phosphate et de fructose-6-phosphate ainsi qu'une diminution de la quantité de 3-phosphoglycérate. Il est intéressant d'insister sur la hausse de la teneur en Fructose-6-phosphate et sur la diminution de la teneur en 3-phosphoglycérate. En effet, nous avons observé dans nos échantillons une diminution de l'abondance des Fructose bisphosphate aldolases qui catalysent la synthèse glyceraldéhyde-3-phosphate et de dihydroxyacétone phosphate à partir de Fructose-1,6-bisphosphate. Ainsi, la diminution de l'abondance de cette enzyme entraîne l'accumulation du précurseur de son substrat et entraîne la diminution de sa teneur en un dérivé du produit de la réaction qu'elle catalyse. Tous ces résultats, ensemble, suggèrent fortement que l'inactivation de TOR pourrait modifier le métabolisme primaire du carbone en induisant la glycolyse et en réprimant le cycle de Calvin.

Comme nous venons de le voir, nous avons constaté que l'inactivation de TOR entraîne une diminution de l'accumulation de l'amidon synthase dans les fractions ribosomales mais que cette même inactivation entraîne une accumulation massive d'amidon dont la synthèse nécessite la présence d'amidon synthase. Cette amidon synthase fait partie des enzymes liées aux grains d'amidon et, donc, étant donné que les grains d'amidon sont éliminés au cours des premières étapes de centrifugation, il est possible que toutes les enzymes liées à ces grains aient été éliminées à ce stade. Ainsi l'amidon synthase active et associée aux grains d'amidon en cours de synthèse serait présente dans les culots des centrifugations préliminaires à l'ultracentrifugation. Il reste à expliquer pourquoi l'enzyme inactive est associée aux ribosomes ou se retrouve dans des complexes protéiques de masse élevée. Un aperçu du protéome complet des plantules nous permettraient de vérifier cette hypothèse.

Enfin, nous avons également mis en évidence que l'inactivation de TOR entraîne une diminution de quantité des protéines impliquées dans l'organisation des ER bodies et entraîne également des modifications dans leur état de phosphorylation. Ces particules s'accumulent principalement en cas de stress et, notamment, en cas de blessures (Yamada et al., 2011). La diminution de l'accumulation de ces protéines peut, une fois de plus, être due à une dissociation de ces complexes protéiques qui serait due à une diminution de la quantité d'ER bodies ou à une diminution de la quantité totale de ces protéines. Toutefois, il apparaît intéressant de constater que l'inactivation de TOR entraîne une diminution de la

quantité de ces particules, ce qui indique qu'une telle inactivation ne présente pas les mêmes caractéristiques qu'une blessure physique.

Finalement, il est important de préciser que l'analyse des résultats obtenus peut avoir été compliquée par le travail sur plusieurs types cellulaires différents, constitutifs de tissus différents puisque nous avons travaillé sur des plantules entières. Il serait peut être nécessaire, à l'avenir, de travailler séparément sur différentes parties de la plante, telles que les parties photosynthétiques d'une part et les racines de l'autre. Une telle séparation permettrait de simplifier l'interprétation des résultats et d'obtenir une vision plus complète et précise de l'effet de l'inactivation de TOR. D'autre part, il est probable que l'on puisse améliorer le recouvrement entre les expériences en augmentant la quantité de protéines ribosomales purifiées.

II. TOR CONTROLE L'ORGANISATION DU MERISTEME

Le méristème végétatif, qu'il soit racinaire ou caulinaire, est le siège de la croissance et est le lieu de l'apparition des nouveaux organes et de la croissance des tissus. Etant donné l'impact de l'inactivation de TOR sur la croissance, nous avons donc émis l'hypothèse que TOR pourrait moduler l'activité de certaines cellules de cette structure pluricellulaire. Qui plus est, ces méristèmes ont l'avantage de contenir un grand nombre de cellules présentant des activités totalement différentes (cellules non différenciées ne se divisant pas, cellules en divisions actives, cellules en cours de division, cellules en cours de différenciation, cellules différenciées, ...) et l'étude de cette structure permet d'avoir un aperçu large de l'impact de l'inactivation de TOR sur des mécanismes aussi divers que le contrôle de la division et de la différenciation. Enfin, du fait de la spécificité végétale du méristème, chercher des cibles moléculaires de TOR au sein de ce méristème permet de mettre en évidence de nouvelles cibles potentielles de TOR qui, par définition, ne peuvent pas avoir été décrites dans d'autres organismes.

Les premières expériences ont été réalisées sur des lignées exprimant un ARN interférant avec TOR et placé sous le contrôle d'un système inductible à l'éthanol. Ce

système a déjà largement été utilisé au laboratoire, est facile d'utilisation et permet de contrôler dans le temps la survenue de l'inactivation de TOR. En outre, nous disposons, au début de ma thèse, d'une grande quantité d'informations sur les effets de l'inactivation de TOR pendant la germination et après la germination en utilisant ce système (Deprost et al., 2007; Moreau, 2009; Moreau et al., 2010). Ces données ont permis d'avoir déjà une vue d'ensemble de l'effet d'une telle inactivation. Néanmoins, il s'agit malgré tout d'un système d'inactivation indirecte impliquant la présence d'un facteur de transcription fongique (AlcR) exprimé sous le contrôle d'un promoteur viral constitutif (p35S) et impliquant également l'application d'éthanol. Donc, pour vérifier les informations obtenues avec un tel système, nous avons choisi, chaque fois que c'était possible, d'utiliser également d'autres méthodes d'inactivation. Il s'agissait de méthodes génétiques (par utilisation de mutants homozygotes *raptor* et *lst8* qui n'ont malheureusement été disponible au laboratoire qu'au cours de ma dernière année de thèse) et d'une approche pharmacologique par utilisation d'un inhibiteur spécifique de TOR que nous avons appelé TORinhib1 et d'un inhibiteur des PI3 kinases (inactivant également TOR du fait que le domaine kinase de TOR est un domaine semblable à celui des PI3 kinases). Il est nécessaire de garder en mémoire que ces approches sont, certes, des méthodes alternatives d'inactiver TOR mais qu'elles n'inactivent pas TOR de la même manière. Ainsi, dans les mutants *raptor* et *lst8*, on n'agit pas directement sur TOR mais sur des protéines partenaires qui pourraient avoir également des fonctions indépendantes du complexe TOR et l'approche pharmacologique inhibe l'activité de la kinase mais n'agit pas directement sur l'abondance de l'ARN messager ou de la protéine codée par ce gène.

Au cours de ce travail, j'ai montré que l'inactivation de TOR dérégule l'organisation cellulaire du méristème et perturbe également l'expression d'un très grand nombre de gènes clés dans l'organisation du méristème. Ainsi, nous avons pu voir que cette inactivation réprime l'expression de *CLV1* et induit fortement l'expression des gènes *CLV3* et *WUS* en étendant grandement leur domaine d'expression. Nous avons également vu que d'autres gènes, comme les gènes *STM*, *KNAT1* ou *WOX13* sont également fortement dérégulés par l'inactivation de TOR. Ces dérégulations suggèrent que l'inactivation de TOR pourrait totalement perturber le profil transcriptomique des cellules du méristème et entraîner ainsi une perte d'identité cellulaire.

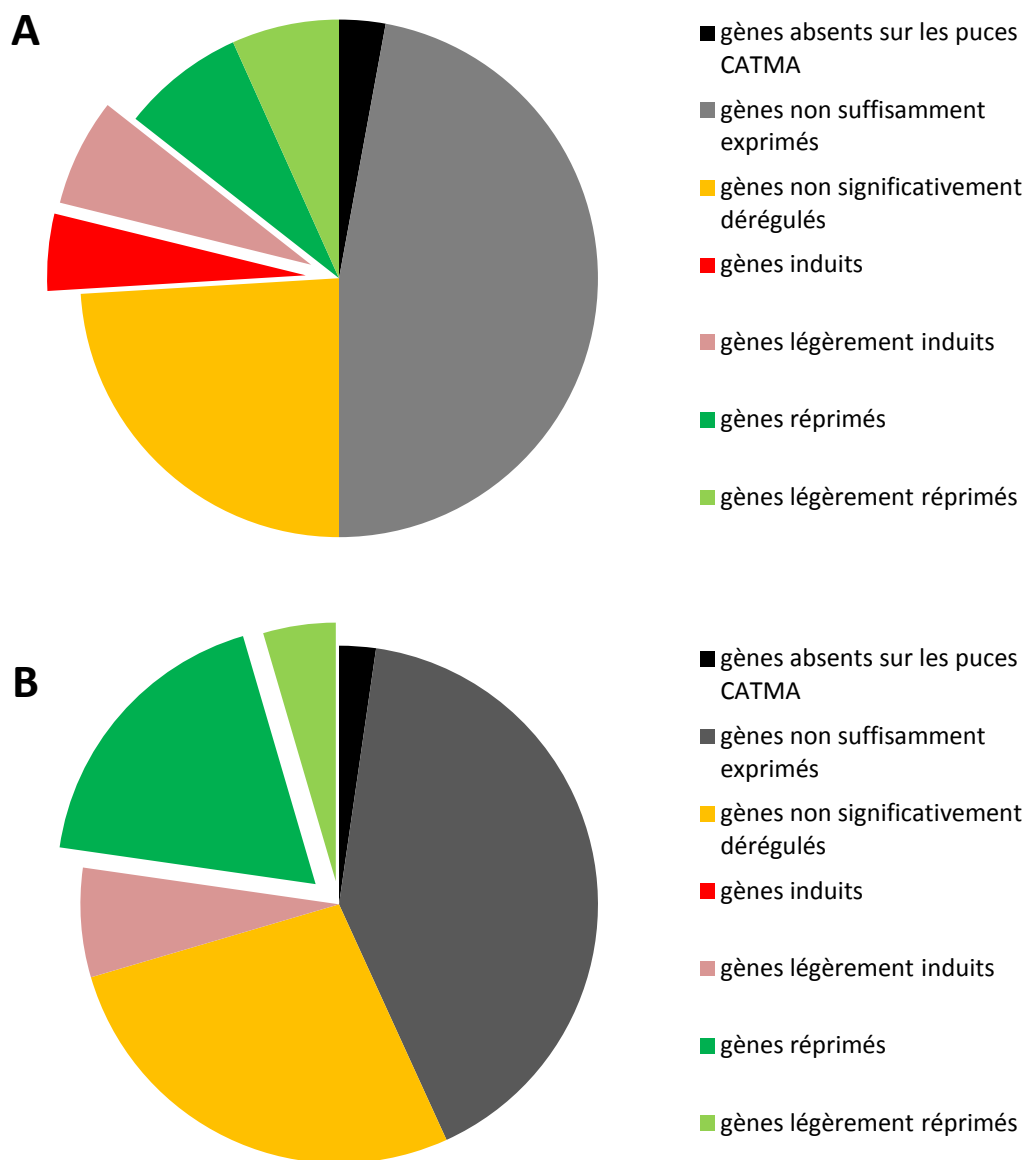


Figure 97: Dérégulation de l'expression des gènes induits lors de la surexpression de WUS (A) ou réprimés lors de cette surexpression (B) au cours de l'inactivation de TOR. La liste des gènes induits et réprimés en réponse à la surexpression de WUS provient de Leibfried et al. (2005). La réponse transcriptionnelle de l'expression de ces gènes en réponse à l'inactivation de TOR a été obtenue en étudiant leur expression après 24h d'inactivation de TOR dans les deux lignées exprimant un ARN interférant avec TOR sous le contrôle d'un système inductible à l'éthanol (5.2 et 6.3).

Afin de mieux comprendre comment l'inactivation de TOR peut entraîner de telles perturbations, nous nous sommes penchés sur les conséquences des inductions et des répressions de l'expression d'un certain nombre de ces marqueurs. En effet, beaucoup de ces acteurs ont été maintenant largement étudiés et on connaît bien l'impact de la répression ou de la surexpression de ces acteurs, tant au niveau de l'organisation de la plante et de ses tissus que de son profil transcriptomique.

Une première hypothèse que j'ai voulu tester portait sur l'impact de la surexpression de *WUS*. En effet, Leibfried et al. (2005) ont publié la liste des gènes dérégulés (induits et réprimés transcriptionnellement) en réponse à la surexpression de *WUS*. De manière intéressante, on constate que 12% des gènes induits en réponse à la surexpression de *WUS* sont également induits lors de l'inactivation de TOR et que 23% des gènes réprimés en réponse à la surexpression de *WUS* sont également réprimés lors de l'inactivation de TOR (**figure 97**). J'ai également montré que des lignées surexprimant *WUS* sous le contrôle du même système inductible à l'éthanol que celui utilisé pour générer les lignées TOR RNAi inductibles et traitées dans les mêmes conditions présentent une légère surexpression de *CLV1* alors que les lignées TOR RNAi répriment cette expression. Il semble donc que *WUS* ne soit pas un acteur majeur de la voie de signalisation de TOR mais que sa surexpression soit la résultante d'autres facteurs.

Je me suis alors intéressé à *CLV1* qui compose le récepteur transmembranaire sur lequel vient se fixer *CLV3* qui est un oligopeptide excrété par les cellules. La fixation de ce ligand sur ce récepteur entraîne la répression transcriptionnelle de l'expression de *WUS* (pour revue : Sablowski, 2011). En se basant donc sur la surexpression combinée de *CLV3* et *WUS*, j'ai émis l'hypothèse que la boucle de rétrocontrôle permettant la répression de l'expression de *WUS* pourrait être abolie lorsque TOR est inactivé. Étant donnée cette hypothèse et le fait que *CLV1* est transcriptionnellement réprimé lorsque TOR est inactivé, j'ai cherché à confirmer l'impact de la répression de *CLV1* lorsque TOR est inactivé en étudiant la sensibilité de mutants dans ce gène et en étudiant la localisation subcellulaire d'une fusion traductionnelle *CLV1*-GFP au cours de l'inactivation de TOR. Faute de temps et étant donné que les mutants *clv1* en présentent pas de défauts de croissance comme ceux que l'on observe dans les lignées TOR RNAi, je n'ai pas pu mener cette hypothèse à son terme.

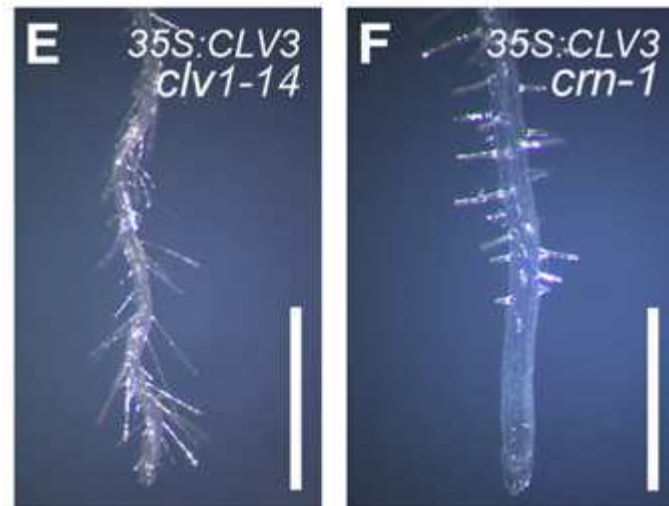


Figure 98: La surexpression de CLV3 entraîne une réduction de la taille du méristème apical dans un fond muté pour CLV1 (E) mais la mutation dans CORYNE (CRN) permet de restaurer l'organisation du méristème racinaire (F). (Müller et al., 2008)

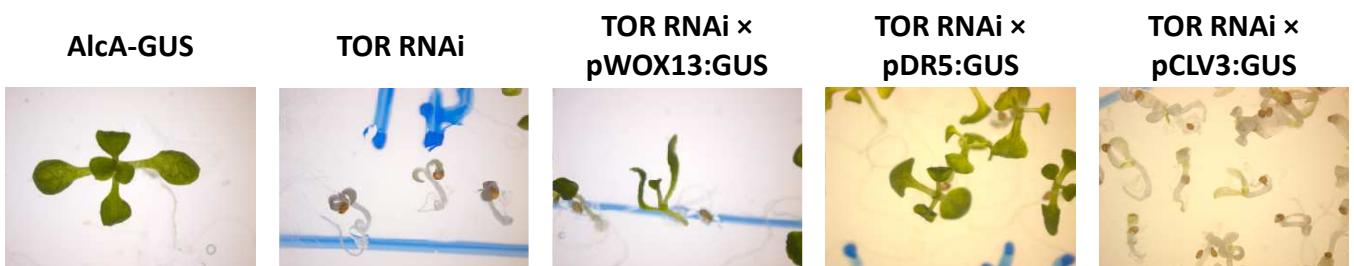


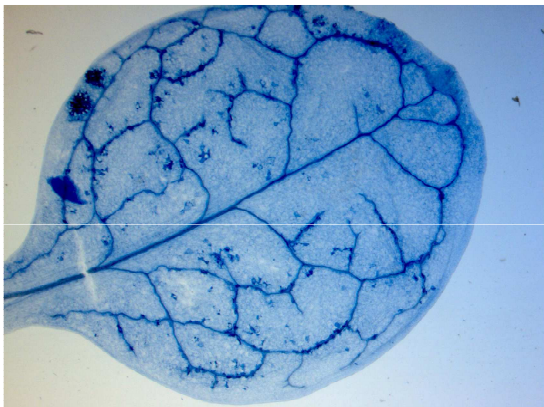
Figure 99: Influence de la mutation *erecta* sur la réponse à l'inactivation de TOR. Les plantes ont été semées directement sur un milieu contenant de l'éthanol et cultivées pendant 10 jours avant prélèvement. Les génotypes sont indiqués sur la ligne du haut. Les plantes notées comme issues d'un croisement sont des plantes de F1.

Les lignées AlcA-GUS, TOR RNAi et pCLV3:GUS sont dans un fond génétique Ler. La lignée pWOX13:GUS est dans un fond génétique WS et la lignée pDR5:GUS est dans un fond Col-0.

Un autre élément qui pourrait s'avérer central dans les conséquences de l'inactivation de TOR pourrait être la surexpression de CLV3. En effet, il a été montré que la surexpression de CLV3 sous le contrôle d'un promoteur constitutif entraîne une réduction de la croissance racinaire en réduisant la taille du méristème racinaire, ce qui se caractérise par l'émergence de poils racinaires au niveau de l'extrémité de la pointe racinaire, comme nous avons pu le voir pour les mutants *raptor* et *Ist8* (**figure 98**) (Müller et al., 2008). Ceci suggère donc que la surexpression de CLV3 pourrait être suffisante pour entraîner l'arrêt de croissance racinaire observé lors de l'inactivation de TOR. Qui plus est, Müller et al. (2008) indiquent également que la mutation dans le gène *CLV1* ne permet pas de compenser le défaut de croissance racinaire dans les plantes surexprimant CLV3 ce qui pourrait expliquer que, dans nos plantes, la répression de l'expression de CLV1 ne permette pas de compenser l'effet qu'aurait la surexpression de CLV3. Avant d'aller plus avant dans cette hypothèse, il s'avèrerait nécessaire de suivre l'expression de CLV3 dans la racine et, plus précisément, dans la pointe racinaire, au cours de l'inactivation de TOR. Enfin, étant donné qu'il a été montré que les mutations *crn* (*coryne*) et *clv2* (CRN et CLV2 étant deux autres éléments du récepteur transmembranaire de CLV3) permettent de compléter l'effet de la surexpression de CLV3 sur l'organisation de la pointe racinaire, il pourrait être intéressant d'étudier la sensibilité de ces deux mutants aux différents inhibiteurs de TOR.

Cette différence entre CLV1 d'une part et CLV2 et CRN d'autre part avait également été rapportée concernant la complémentation de la mutation *erecta* dans les lignées *Ler* (Landsberg *erecta*). En effet, les plantes des lignées *Ler* présentent des pédicelles plus courts que les types sauvages *LER* (Torii et al., 1996), ce qui est dû à une mutation ponctuelle dans le gène *ERECTA* qui code un récepteur transmembranaire de type protéine kinase (Rédei, 1992; Bowman, 1993; Torii et al., 1996). La mutation dans *CLV2* ou *CRN* permet de compenser un peu cette diminution de la taille du pédicelle alors que les mutants *clv1* présentent des pédicelles de la même taille que ceux des plantes *Ler* (Kayes and Clark, 1998; Müller et al., 2008). L'effet de ces mutations sur le phénotype des mutants *erecta* est d'autant plus intéressant que nous avons également constaté un potentiel rôle de ce récepteur dans la voie de signalisation de TOR. En effet, lorsque j'ai réalisé le croisement des lignées TOR RNAi inducibles (fond génétique *Ler*) avec les lignées exprimant le marqueur pWOX13:GUS (fond génétique Wassilewskija) ou avec des plantes exprimant le marqueur

AlcA-GUS



TOR RNAi

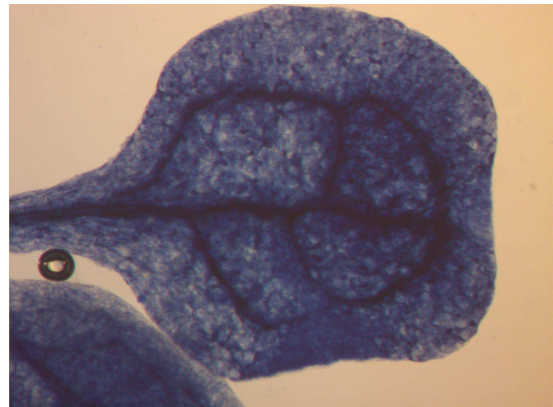


Figure 100 : L'inactivation prolongées de TOR entraine l'apparition de nécroses. Des graines du contrôle AlcA-GUS ou du TOR RNAi ont été mises à germer sur un milieu contenant 100 mM d'éthanol et cultivées pendant 21 jours sur ce même milieu. La mise en évidence des nécroses a été faite par une coloration des plantules au bleu trypan. Les photos correspondent aux cotylédons de ces plantes.

pDR5:GUS (fond génétique Col-0), je suis parvenu à obtenir des plantes ayant un bien meilleur développement en présence d'éthanol que les TOR RNAi seuls ou les TOR RNAi croisés avec des plantes dans un fond génétique *Ler* (**figure 99**). Afin d'élucider le rôle potentiel de la mutation *erecta* dans la voie de signalisation de TOR, il faudrait étudier la descendance des croisements entre les lignées TOR RNAi avec des lignées *Ler* et des mutants *erecta* dans un fond génétique Columbia et de les comparés aux croisements entre les TOR RNAi et les lignées *LER* (également appelées La-0) et avec les sauvages Col-0. En outre, il faudrait également vérifier si les mutants *erecta* présentent une sensibilité accrue aux inhibiteurs de TOR.

Cette étude a également permis de mettre en évidence que l'expression de CDKB1 et de STM sont réprimés lors de l'inactivation de TOR pendant des temps courts (inférieurs à 48h) puis induits pendant des temps longs (supérieurs à 48h). Ceci suggère donc que la dérégulation de l'expression de ces gènes n'est pas directement liée à TOR mais serait une cible indirecte ou qu'il existe une boucle de rétrocontrôle qui finit par compenser l'effet de l'inactivation. Quoi qu'il en soit, cette différence pourrait expliquer le fait qu'il soit possible de restaurer la croissance des lignées TOR RNAi si elles ne sont pas soumises à plus de 48h d'inactivation de TOR. Ces résultats suggèrent donc qu'il est possible que cette transition qui s'opère autour de 48h après l'inactivation de TOR soit la résultante de modifications transcriptionnelles qui pourraient être mises en évidence en comparant le transcriptome de plantes dans lesquelles TOR aurait été inactivé pendant un temps court ou pendant un temps plus long. En outre, l'induction de l'expression de CDKB1 après 72h d'inactivation de TOR suggère une ré-activation des divisions cellulaires. Ceci permettrait d'expliquer l'apparition de prolifération cellulaire après une semaine d'inactivation de TOR (Moreau et al., 2010). En revanche, l'absence d'expression de *CycB1* dans les plantules germées en présence d'inhibiteurs de TOR explique pourquoi nous n'avons jamais observé de prolifération cellulaire sur les plantules dans lesquelles TOR a été inactivé au cours de la germination. En effet, dans ces plantes, l'inactivation prolongée de TOR conduit à un arrêt de croissance qui peut être dû à l'accumulation ectopique de lignines dans les parois cellulaires empêchant ainsi non seulement l'expansion mais aussi la division cellulaire. Un résultat préliminaire suggère qu'une inactivation de TOR au cours de la germination et prolongée pendant un temps long entraîne l'apparition de mort cellulaire (**figure 100**)

Concernant le lien qui existe entre TOR et les hormones, les résultats que j'ai obtenus suggèrent fortement une interaction entre la voie de signalisation de TOR et les voies de signalisation de diverses hormones comme les gibbérellines et les auxines. Il est à noter que ces deux hormones jouent un rôle clé dans l'organisation du méristème et que leurs voies de biosynthèse et/ou de signalisation sont contrôlées par les gènes méristématiques et les gènes méristématiques contrôlent la biosynthèse et/ou la signalisation de ces hormones. Il semble donc cohérent qu'il existe un lien entre TOR et les hormones étant donné qu'il existe un lien entre l'inactivation de TOR et l'expression des gènes méristématiques. Toutefois il reste à déterminer laquelle de ces deux cibles est régulée par TOR et laquelle est la résultante de l'autre.

Enfin, afin d'avoir une vue d'ensemble tout à fait exhaustive, il serait bon de vérifier si l'inactivation de TOR par des approches génétiques ou pharmacologiques a les mêmes conséquences cytologiques que l'inactivation dans les lignées TOR RNAi inducibles.

III. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Comme nous l'avons vu dans les deux chapitres précédents, l'inactivation de TOR entraîne des dérégulations au niveau de l'organisation et de la composition du ribosome d'une part et, d'autre part, au niveau de l'expression des gènes impliqués dans l'organisation du méristème et de différentes voies hormonales.

Etant donné que les cibles directes de TOR permettant de contrôler ces deux phénomènes n'ont pas été mises en évidence, il serait hasardeux d'émettre l'hypothèse de deux voies parallèles n'interagissant pas. Qui plus est, il a déjà été rapporté que plusieurs mutants de protéines ribosomales présentent des phénotypes développementaux forts. On peut ainsi citer le cas des mutants *rps6a* et *rps6b* qui présentent des méristèmes racinaires plus courts (Creff et al., 2010) ou encore la mutation *rps5a* qui entraîne une létalité embryonnaire à l'état homozygote et des retard de croissance à l'état hétérozygote. Plusieurs gènes codant des protéines ribosomales ont également été annotés comme EMB (embryo defective gene), c'est-à-dire comme faisant partie des gènes essentiels au développement de la graine (Meinke et al., 2008). C'est notamment le cas de la protéine RPS6B, également appelée EMB3010.

Matériel et méthodes

I. MATERIEL VEGETAL

Le travail de cette thèse repose principalement sur l'étude de lignées exprimant un ARN interférant dirigé contre TOR et placé sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'éthanol. Ces lignées (appelées 5.2 et 6.3) contiennent deux constructions : tout d'abord une construction p35S:AlcR qui permet l'expression du facteur de transcription fongique AlcR de manière constitutive ainsi qu'une construction pAlcA:FRB qui exprime le domaine FRB (FKBP12-Rapamycine Binding) spécifique de TOR en sens-antisens sous le contrôle du promoteur pAlcA qui est activé lorsque le facteur AlcR est mis en présence d'éthanol (**voir figure 11**). Ces plantes sont dans un fond génétique Landsberg *erecta*. Le contrôle (appelé AlcA-GUS) exprime également la construction p35S:AlcR mais a été transformé avec la construction pAlcA:GUS (et non pAlcA:FRB). Ces lignées ont déjà été décrites (Deprost et al., 2007).

D'autres lignées ont également été utilisées afin de confirmer les résultats obtenus avec les lignées TOR RNAi inductibles. Ces lignées sont les suivantes :

- La lignée TOR RNAi constitutive (appelée 35.7) qui exprime le domaine FRB en sens-antisens sous le contrôle du promoteur constitutif p35S.
- La lignée mutante *raptor.3g* qui a déjà été décrite (Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2005).
- La lignée mutante *atlst8-1-1* qui a déjà été décrite (Moreau et al., 2012).

II. CONDITIONS DE CULTURE

II.A. Milieux de culture

Sauf en cas de précisions particulières, les cultures ont été réalisées en boîte de Pétri contenant du milieu de Murashige & Skoog dilué au 1/5 et additionné de saccharose à une concentration finale de 0.3% et d'agar à 0.7%.

D'autres cultures ont été réalisées en conditions liquides. Le milieu alors utilisé est le même que celui décrit ci-avant (sauf précision contraire) mais dépourvu d'agar. Les cultures liquides en vue de la purification des ribosomes ont été menées en fiole d'Erlenmeyer tandis que celles réalisées en vue de réaliser des tests de sensibilité aux inhibiteurs de TOR ont été menées dans des microplaques 24 puits.

II.B. Conditions de culture

Les cultures ont été réalisées en chambre de culture avec une température de 25°C, une longueur du jour de 16h et une intensité lumineuse de 75µE. Tous les prélèvements ont été réalisés au milieu de la phase de jour.

III. ANALYSE DES RIBOSOMES

III.A. Purification des ribosomes

Les plantes sont broyées au mortier et au pilon dans de l'azote liquide. La poudre ainsi obtenue est alors reprise dans 10 ml de tampon d'extraction (Tris 0.2M, KCl 0.4M, EGTA 0.025M, MgCl₂ 0.035M, Saccharose 0.2 M, pH 9) additionné de 1 ml de mix de détergents (Triton X-100 20%, Tween-20 20%, NP-40 20%, Désoxycholate de sodium 10%). Les échantillons sont incubés dans la glace pendant 10 minutes avant de subir une centrifugation à 4000 RPM pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est alors déposé sur un coussin de 4 ml de tampon de saccharose (Tris 0.04M, KCl 0.2M, EGTA 0.005M, MgCl₂ 0.03M, saccharose 1.75M, pH 9). Les échantillons sont ainsi soumis à une ultracentrifugation d'une nuit à 35000 RPM dans un rotor swinging.

En sortie d'ultracentrifugation, le surnageant ainsi que le coussin de saccharose sont éliminés. Le culot des protéines ribosomales est repris dans 300 µl d'un tampon de dénaturation (Tris 80mM, SDS 2%, glycérol 10%, β-mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0.04%, pH 6.8). La dénaturation est alors menée par un traitement de 10 minutes à 100°C suivi par un transfert dans la glace.

III.B. Préparation de la fraction ribosomale

Les protéines ainsi dénaturées sont soumises à une migration sur un gel de polyacrylamide (12% pour le gel de séparation et 4% pour le gel de concentration) de 1 à 2 mm dans le gel de séparation. Après coloration au bleu de Coomassie, la bande ainsi obtenue est coupée en 5 fragments.

Après une étape de fixation à l'éthanol / acide acétique (40% / 10%), les échantillons sont lavés à l'acétonitrile et au bicarbonate d'ammonium (25mM). La réduction est menée par un traitement de 30 minutes dans du DiThioThréitol 10mM à 56°C puis l'alkylation est menée par un traitement de 45 minutes dans de l'iodoacétamide 55mM à température ambiante à l'obscurité. Les morceaux de gel sont à nouveau rincés au bicarbonate d'ammonium 25mM et à l'acétonitrile. La trypsinolyse est menée dans 120ng de trypsine (Proméga) pendant 5h à 37°C. Les peptides sont alors repris dans des bains successifs d'acétonitrile / TFA (50% / 0.5%) puis séchés au speed vac avant d'être repris dans le tampon d'injection du spectro composé d'acide formique / acide trifluoroacétique / acétonitrile (0.05% / 0.05% / 3%).

III.C. Analyse en LC-MS/MS

La chromatographie liquide, couplée au spectromètre de masse, est réalisée sur une colonne NanoLC-Ultra (Eksigent). L'échantillon (4 µl) est injecté à un débit de 7.5µl/min sur une précolonne (phase stationnaire : C18 PepMap100, particules de 5µm, colonne : 100µm i.d, 1 cm de long ; Dionex). Le chargement et le dessalage s'effectue en 3 minutes dans un tampon eau / acide formique (0.1%). La précolonne est ensuite connectée à la colonne analytique PepMapC18 (phase stationnaire : C18 PepMap100, particules de 3µm, colonne : 75µm i.d, 150mm de long ; Dionex). La séparation des peptides s'effectue en gradient linéaire de 5 à 80% de tampon acétonitrile / acide formique (0.1%) pendant 37 minutes.

Les peptides élués sont analysés en direct avec un Qexactive (Thermo Electron) équipé d'une source nano-electrospray. L'ionisation (1.5 kV de potentiel d'ionisation) est réalisée avec une jonction liquide et une aiguille non métallique. La mesure des ions via Xcalibur 2.07 se fait sur l'ensemble des ions ayant un ratio masse sur charge compris entre 300 et 1400 puis répété pour le huit ions détectés précédemment.

L'identification des peptides et protéines est réalisée par recherche sur la base de données TAIR (version 8) et s'effectue avec le logiciel X!tandem CYCLONE (2011.12.01) (<http://www.thegpm.org/tandem>). La recherche est lancée avec les paramètres : trypsinolyse, possibilité d'un misscleavage, carboxyamidométhylation des cystéines (+57), oxydation possible des méthionines (+16), phosphorylation possibles des sérines, tyrosines et thréonines (+80).

Les résultats sont filtrés et groupés avec X!tandem pipeline v3.3.0, un outil informatique développé par le PAPPSO (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline>).

III.D. Analyse des résultats

Pour l'analyse des protéines non ribosomales, les quantités de chaque protéine sont estimées par la méthode du comptage spectral qui repose sur le dénombrement de tous les spectres de tous les peptides d'une protéine donnée et qui a été montré comme étant proportionnel à la quantité de protéine (Liu et al., 2004). Concernant les protéines ribosomales, étant donnée la forte homologie de séquence à l'intérieur des familles, j'ai choisi de ne compter que les spectres des peptides spécifiques et de ne pas compter les spectres des peptides pouvant être communs à au moins deux protéines. Cette méthode, bien que moins quantitative, tient compte de cette homologie de séquence et donne une indication sur l'abondance de chaque protéine.

Pour les protéines ribosomales, afin de limiter l'effet d'enrichissement en ribosomes dans les différents échantillons qui peut varier un peu, j'ai normalisé l'abondance de chaque protéine par la quantité de spectres ribosomaux dans l'échantillon.

IV. BIOCHIMIE

IV.A. Western Blot

IV.A.1. Migration des protéines

En l'absence de précision, les protéines sont migrées sur un gel de polyacrylamide additionné de SDS avec des concentrations de 15% pour le gel de séparation et de 5% pour le gel de concentration.

IV.A.2. Transfert, incubation avec l'anticorps et révélation

Le transfert est réalisé sur une nuit à 4°C en conditions liquides sur une membrane de nitrocellulose sous un voltage constant à 36 V. La membrane est bloquée dans du lait à 5% puis incubé dans l'anticorps primaire (l'anticorps dirigé contre la RPL13 au 1/5000 dans du lait 1% ; l'anticorps dirigé contre la RPS6 au 1/1000 dans du lait 2% ; l'anticorps dirigé contre la RPS14 au 1/1000 dans du lait 2%). Après rinçages, les membranes sont incubées dans l'anticorps secondaire (anticorps anti-lapin pour la RPL13 et la RPS14 et anticorps anti-souris pour la RPS6, tous deux couplés à la peroxydase). La révélation se fait par observation de la luminescence.

IV.A. Western blot sur gel bidimensionnel

IV.A.1. Gel bidimensionnel

IV.A.1.a. Préparation des échantillons

Après broyage des échantillons végétaux dans l'azote liquide, les protéines contenues dans 30 mg de matière fraîche sont précipitées pendant 3 heures à -20°C dans une solution de précipitation (90% acétone, 10% acide trichloracétique, 0.07% β -mercaptométhanol). Après élimination du surnageant, les protéines sont lavées dans un tampon d'acétone 100% additionnée de β -mercaptoéthanol à 0.07% durant la nuit à -20°C puis, après élimination du surnageant, séchées à l'air libre et à température ambiante pendant 15 minutes. Le culot sec ainsi obtenu est ensuite repris dans un tampon de resolubilisation (7M Urée, 2M Thiourée, 4% CHAPS, 18 mM Trizma HCl, 14 mM Trizma Base, 0.2% Triton X-100, 20 mM DTT, pH 8.5).

IV.A.1.b. Première dimension

Après quantification par la méthode de Bradford des protéines ainsi solubilisées, 60µg de celles-ci sont reprises dans un volume final de 200µl de solution de réhydratation (7M Urée, 2M Thiourée, 4% CHAPS, 18 mM Trizma HCl, 14 mM Trizma base, 20 mM DTT, 2% Triton X-100, 1% Pharmalytes pH3-10 NL. La strip d'isoélectrofocalisation a été réhydratée avec les protéines pendant une nuit à température ambiante puis les protéines ont été séparées selon leur point isoélectrique par une isoélectrofocalisation à 18000 VhT et un ampérage bloqué à 50 µA. Les strips ainsi obtenues ont été congelées à -20°C et ainsi conservées jusqu'à la réalisation de la 2^{ème} dimension.

IV.A.1.c. Deuxième dimension

Avant dépôt sur le gel de SDS-PAGE, les strips sont équilibrées, et les protéines qui y sont contenues sont réduites et alkylées. Ces étapes sont réalisées par un bain 30 minutes dans un tampon d'équilibration (6M Urée, 30% glycérol, 2,5% SDS) et additionné de DTT à 2% puis, après un rinçage dans le tampon d'équilibration, par une incubation de 20 minutes dans le tampon d'équilibration additionné d'iodoacétamide à 4%.

La strip est ensuite déposé sur un gel de SDS-PAGE concentré à 12% d'acrylamide pour le gel de séparation et à 4% pour le gel de concentration et la migration est réalisée à 35V pendant 20 minutes dans le gel de concentration et à 120V pendant 2 heures dans le gel de concentration.

IV.A.1. Transfert et révélation

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est réalisé en montage semi-sec à 200 mA pendant 1 heure. La membrane est ensuite saturée pendant 2h30 dans du lait à 5%. Après lavage, la membrane est hybridée au moyen de l'anticorps primaire dirigé contre la RPS6 dilué au 1/1000 dans du lait à 5% pendant une nuit à 4°C. La membrane est alors lavée puis hybridée avec l'anticorps secondaire dirigé contre les anticorps de souris et couplé à la peroxydase et dilué au 1/2000 dans du lait à 5%. Cette dernière hybridation est menée à 4°C pendant 4 heures.

La révélation est réalisée au moyen du kit ECL Advance (GE Healthcare) et menée avec le LAS-4000 (Fuji).

gène	oligo	séquence 5' -> 3'
APT1	Q2-APT+	GAGACATTTTGCCTGGGATT
APT1	Q2-APT-	CGGGGATTTTAAGTGGAAACA
ARR5	ARR5-Q-F	CATCTTGCCTCGTATCGATAG
ARR5	ARR5-Q-R	GTCTCTAGATCAGATCTTTGCGCGT
ARR7	ARR7-Q-F	GCATTGAGAGAAGTACCAGTAGTG
ARR7	ARR7-Q-R	GCTAAGGTCTTGGCCTCTATAC
CDKB1;1	CDKB1 q F	GGTGGTGACATGTGGTCTGTTGG
CDKB1;1	CDKB1 q R	CGCAGTGTGGAAACACCCGG
clv1	clv1 q F	AGGTGGGTGAGGAACACGGAAGA
clv1	clv1 q R	CTCGGGTCAACAATCGCAACAACA
CLV3	CLV3 q5 f	ATGGAAAGTGAATGGGTTGGAGCAA
CLV3	CLV3 q5 R	TTCTTGGCTGTCTTGGTGGGTTCC
EF1	EF1.4F	CTGGAGGTTTTGAGGCTGGTA
EF1	EF1.4R	CAAAGGGTGAAAGCAAGAAGA
KNAT1	knat1 q f	ATTACGGCGGCACGGCAAGA
KNAT1	knat1 q r	TAGAGGAGGCAGAGACAGACGGT
STM	stm q3 f	TGCTTGATTGGTGGAGCCGTCA
STM	stm q3 r	TGGTGAGGATGTGTTGCGTCC
TIP41	Q-tip41+	TCCATCAGTCAGAGGCTTCC
TIP41	Q-tip41-	GCTCATCGGTACGCTCTTTT
UBQ11	UBI11F	GCAGATTTTCGTAAAACC
UBQ11	UBQ11R	CCAAAGTTCTGCCGTCC
WOX13	WOX13-Q-R	ACTGCTTATGACTGACTACCAAATCC
WOX13	WOX13-Q-F	AAGATGGGACTGGCGGAAA
wus	wus_q_plus	ATGGAGCCGCCACAGCATCAG
wus	wus_q_minus	CTCCGTCGTCGGTGTCCACCT

Tableau 16 : Liste des amorces utilisées pour les expériences de PCR quantitative.

V. BIOLOGIE MOLECULAIRE

V.A. Extraction d'ARN

Les extractions d'ARN ont été réalisées par la méthode au Trizol (Invitrogen) selon le protocole fourni par les fabricants.

V.B. Reverse transcription

Les ADN complémentaires ont été générés à partir de 750 ng d'ARN messagers en utilisant la reverse transcriptase Moloney Murine Leukemia Virus (MMLV) (Invitrogen) selon le protocole fourni par le fabricant.

V.C. PCR quantitative

Les expériences de PCR quantitatives ont été réalisées sur le thermocycleur MasterCycler®ep realplex de chez Eppendorf en présence de 5 µl d'ADN complémentaires dilués au 1/10 au moyen du kit MESA FAST qPCR MasterMix Plus for SYBR Assay (Eurogentec) selon le protocole du fournisseur. Les quantifications sont normalisées selon l'expression du gène APT1. Les mesures se font en utilisant les amorces citées dans le **tableau 16**.

Pour chaque couple d'amorce, j'ai vérifié, préalablement à leur utilisation, qu'ils ne produisent qu'un seul amplicon et que leur efficacité permet une quantification convenable.

VI. CYTOLOGIE

VI.A. Coloration à l'iodure de propidium

La coloration à l'iodure de propidium et au réactif de Schiff a été réalisée selon le protocole décrit par Truernit et al. (2008).

VI.B. Coloration GUS

La localisation *in situ* de l'activité de la β -glucuronidase a été réalisée par immersion des plantules dans la solution de coloration ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50mM pH7, ferricyanure de potassium 2mM, ferrocyanure de potassium 2mM, Triton X-100 0.1%, X-gluc 1mg/ml) puis incubée pendant une nuit à 37°C après l'application du vide. Pour l'observation des plantules, les chlorophylles sont éliminées par plusieurs bains successifs d'éthanol à 70% avant d'être conservées dans un mélange éthanol/glycérol 70%/30%.

Bibliographie

- Adami, A., Garcia-Alvarez, B., Arias-Palomo, E., Barford, D., and Llorca, O.** (2007). Structure of TOR and its complex with KOG1. *Mol Cell* **27**, 509-516.
- Agredano-Moreno, L.T., Reyes de la Cruz, H., Martinez-Castilla, L.P., and Sanchez de Jimenez, E.** (2007). Distinctive expression and functional regulation of the maize (*Zea mays* L.) TOR kinase ortholog. *Molecular BioSystems* **3**, 794-802.
- Ahn, C.S., Han, J.-A., Lee, H.-S., Lee, S., and Pai, H.-S.** (2011). The PP2A Regulatory Subunit Tap46, a Component of the TOR Signaling Pathway, Modulates Growth and Metabolism in Plants. *The Plant Cell Online* **23**, 185-209.
- Alarcon, C.M., Cardenas, M.E., and Heitman, J.** (1996). Mammalian RAFT1 kinase domain provides rapamycin-sensitive TOR function in yeast. *Genes Dev* **10**, 279-288.
- Alberts, B.** (1998). The Cell as a Collection of Protein Machines: Preparing the Next Generation of Molecular Biologists. *Cell* **92**, 291-294.
- Anderson, G.H., Veit, B., and Hanson, M.R.** (2005). The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biology* **3**, (21 April 2005).
- Andrade, M.A., and Bork, P.** (1995). HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nat Genet* **11**, 115-116.
- Avruch, J., Long, X., Ortiz-Vega, S., Rapley, J., Papageorgiou, A., and Dai, N.** (2009). Amino acid regulation of TOR complex 1. *American Journal of Physiology - Endocrinology And Metabolism* **296**, E592-E602.
- Baena-Gonzalez, E., Rolland, F., Thevelein, J.M., and Sheen, J.** (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* **448**, 938-942.
- Bailey-Serres, J., and Freeling, M.** (1990). Hypoxic Stress-Induced Changes in Ribosomes of Maize Seedling Roots. *Plant Physiology* **94**, 1237-1243.
- Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K., and Lee, C.** (1997). Acidic Phosphoprotein Complex of the 60S Ribosomal Subunit of Maize Seedling Roots (Components and Changes in Response to Flooding). *Plant Physiology* **114**, 1293-1305.
- Ballesta, J.P.G., Rodriguez-Gabriel, M.A., Bou, G., Briones, E., Zambrano, R., and Remacha, M.** (1999). Phosphorylation of the yeast ribosomal stalk. Functional effects and enzymes involved in the process. *FEMS Microbiology Reviews* **23**, 537-550.
- Bantscheff, M., Schirle, M., Sweetman, G., Rick, J., and Kuster, B.** (2007). Quantitative mass spectrometry in proteomics: a critical review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1017-1031.
- Barakat, A., Szick-Miranda, K., Chang, I.-F., Guyot, R., Blanc, G., Cooke, R., Delseny, M., and Bailey-Serres, J.** (2001). The Organization of Cytoplasmic Ribosomal Protein Genes in the Arabidopsis Genome. *Plant Physiology* **127**, 398-415.
- Barbet, N.C., Schneider, U., Helliwell, S.B., Stansfield, I., Tuite, M.F., and Hall, M.N.** (1996). TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* **7**, 25-42.
- Benková, E., and Bielach, A.** (2010). Lateral root organogenesis — from cell to organ. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 677-683.
- Besnard, F., Vernoux, T., and Hamant, O.** (2011). Organogenesis from stem cells *in planta* multiple feedback loops integrating molecular and mechanical signals. *Cellular and Molecular Life Sciences* **68**, 2885-2906.
- Beugnet, A., Wang, X., and Proud, C.G.** (2003). Target of rapamycin (TOR)-signaling and RAIIP motifs play distinct roles in the mammalian TOR-dependent phosphorylation of initiation factor 4E-binding protein 1. *J Biol Chem* **278**, 40717-40722.
- Bierer, B.E., Somers, P.K., Wandless, T.J., Burakoff, S.J., and Schreiber, S.L.** (1990). Probing immunosuppressant action with a nonnatural immunophilin ligand. *Science* **250**, 556-559.

- Bowman, J.** (1993). *Arabidopsis: An atlas of morphology and development.* (New York: Springer-Verlag).
- Brodersen, D.E., Clemons Jr, W.M., Carter, A.P., Wimberly, B.T., and Ramakrishnan, V.** (2002). Crystal structure of the 30 s ribosomal subunit from *Thermus thermophilus*: structure of the proteins and their interactions with 16 s RNA. *Journal of Molecular Biology* **316**, 725-768.
- Cardenas, M.E., Cutler, N.S., Lorenz, M.C., Di Como, C.J., and Heitman, J.** (1999). The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & Development* **13**, 3271-3279.
- Carroll, A.J., Heazlewood, J.L., Ito, J., and Millar, A.H.** (2008). Analysis of the Arabidopsis Cytosolic Ribosome Proteome Provides Detailed Insights into Its Components and Their Post-translational Modification. *Molecular & Cellular Proteomics* **7**, 347-369.
- Cebollero, E., and Reggiori, F.** (2009). Regulation of autophagy in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 1413-1421.
- Chang, I.-F., Szick-Miranda, K., Pan, S., and Bailey-Serres, J.** (2005). Proteomic Characterization of Evolutionarily Conserved and Variable Proteins of Arabidopsis Cytosolic Ribosomes. *Plant Physiology* **137**, 848-862.
- Chen, E.J., and Kaiser, C.A.** (2003). LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *The Journal of Cell Biology* **161**, 333-347.
- Chen, H., Banerjee, A.K., and Hannapel, D.J.** (2004). The tandem complex of BEL and KNOX partners is required for transcriptional repression of *ga20ox1*. *The Plant Journal* **38**, 276-284.
- Choi, J., Chen, J., Schreiber, S.L., and Clardy, J.** (1996). Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science* **273**, 239-242.
- Choi, K.M., McMahon, L.P., and Lawrence, J.C., Jr.** (2003). Two motifs in the translational repressor PHAS-I required for efficient phosphorylation by mammalian target of rapamycin and for recognition by raptor. *J Biol Chem* **278**, 19667-19673.
- Chung, J., Grammar, T.C., Lemon, K.P., Kazlauskas, A., and Blenis, J.** (1994). PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* **370**, 71-75.
- Cipollina, C., van den Brink, J., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Vai, M., and de Winde, J.H.** (2008a). Revisiting the role of yeast Sfp1 in ribosome biogenesis and cell size control: a chemostat study. *Microbiology* **154**, 337-346.
- Cipollina, C., van den Brink, J., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Porro, D., and de Winde, J.H.** (2008b). *Saccharomyces cerevisiae* SFP1: at the crossroads of central metabolism and ribosome biogenesis. *Microbiology* **154**, 1686-1699.
- Clark, S.E.** (2001a). Cell signalling at the shoot meristem. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 276-284.
- Clark, S.E.** (2001b). Meristems: start your signaling. *Current Opinion in Plant Biology* **4**, 28-32.
- Claypool, J.A., French, S.L., Johzuka, K., Eliason, K., Vu, L., Dodd, J.A., Beyer, A.L., and Nomura, M.** (2004). Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Mol Biol Cell* **15**, 946-956.
- Corradetti, M.N., and Guan, K.L.** (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR? *Oncogene* **25**, 6347-6360.
- Creff, A., Sormani, R., and Desnos, T.** (2010). The two Arabidopsis RPS6 genes, encoding for cytoplasmic ribosomal proteins S6, are functionally equivalent. *Plant Mol Biol* **73**, 533-546.
- Crespo, J.L., and Hall, M.N.** (2002). Elucidating TOR Signaling and Rapamycin Action: Lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 579-591.
- Crespo, J.L., Díaz-Troya, S., and Florencio, F.J.** (2005). Inhibition of Target of Rapamycin Signaling by Rapamycin in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **139**, 1736-1749.
- Crespo, J.L., Powers, T., Fowler, B., and Hall, M.N.** (2002). The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 6784-6789.

- de la Fuente van Bentem, S., and Hirt, H.** (2009). Protein tyrosine phosphorylation in plants: more abundant than expected? *Trends in Plant Science* **14**, 71-76.
- De Virgilio, C., and Loewith, R.** (2006). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* **25**, 6392-6415.
- Deprost, D.** (2005). Etude du rôle de la voie de signalisation de TOR (Target Of Rapamycin) dans le contrôle de la croissance des plantes. In Ecole Doctorale "Du Génome aux Organismes" (Versailles - Saint-Quentin-en-Yvelines), pp. 122.
- Deprost, D., Truong, H.N., Robaglia, C., and Meyer, C.** (2005). An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem Biophys Res Commun* **326**, 844-850.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., and Meyer, C.** (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep* **8**, 864-870.
- Deveaux, Y., Toffano-Nioche, C., Claisse, G., Thareau, V., Morin, H., Laufs, P., Moreau, H., Kreis, M., and Lecharny, A.** (2008). Genes of the most conserved WOX clade in plants affect root and flower development in Arabidopsis. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 291.
- Di Como, C.J., and Arndt, K.T.** (1996). Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & Development* **10**, 1904-1916.
- Díaz-Troya, S., Florencio, F.J., and Crespo, J.L.** (2008). Target of Rapamycin and LST8 Proteins Associate with Membranes from the Endoplasmic Reticulum in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* **7**, 212-222.
- Dobashi, Y., Watanabe, Y., Miwa, C., Suzuki, S., and Koyama, S.** (2011). Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **4**, 476-495.
- Dobrenel, T., Marchive, C., Sormani, R., Moreau, M., Mozzo, M., Montane, M.H., Menand, B., Robaglia, C., and Meyer, C.** (2011). Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase. *Biochem Soc Trans* **39**, 477-481.
- Doerner, P.** (2000). Plant stem cells: The only constant thing is change. *Current Biology* **10**, R826-R829.
- Dorrello, N.V., Peschiaroli, A., Guardavaccaro, D., Colburn, N.H., Sherman, N.E., and Pagano, M.** (2006). S6K1- and β TRCP-Mediated Degradation of PDCD4 Promotes Protein Translation and Cell Growth. *Science* **314**, 467-471.
- Duvel, K., and Broach, J.R.** (2004). The role of phosphatases in TOR signaling in yeast. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**, 19-38.
- Fadri, M., Daquinag, A., Wang, S., Xue, T., and Kunz, J.** (2005). The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Mol Biol Cell* **16**, 1883-1900.
- Findlay, G.M., Yan, L., Procter, J., Mieulet, V., and Lamb, R.F.** (2007). A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signalling. *Biochem J* **403**, 13-20.
- Fingar, D.C., and Blenis, J.** (2004). Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene* **23**, 3151-3171.
- Fletcher, J.C.** (2002). Shoot and floral meristem maintenance in arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 45-66.
- Giavalisco, P., Wilson, D., Kreidler, T., Lehrach, H., Klose, J., Gobom, J., and Fucini, P.** (2005). High heterogeneity within the ribosomal proteins of the Arabidopsis thaliana 80S ribosome. *Plant Molecular Biology* **57**, 577-591.
- Gingras, A.C., Raught, B., and Sonenberg, N.** (2004). mTOR signaling to translation. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**, 169-197.
- Groß-Hardt, R., Lenhard, M., and Laux, T.** (2002). WUSCHEL signaling functions in interregional communication during Arabidopsis ovule development. *Genes & Development* **16**, 1129-1138.

- Grosso, S., Volta, V., Sala, L.A., Vietri, M., Marchisio, P.C., Ron, D., and Biffo, S.** (2008). PKC beta II modulates translation independently from mTOR and through RACK1. *Biochemical Journal* **415**, 77-85.
- Guertin, D.A., Stevens, D.M., Thoreen, C.C., Burds, A.A., Kalaany, N.Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K.J., and Sabatini, D.M.** (2006). Ablation in Mice of the mTORC Components raptor, rictor, or mLST8 Reveals that mTORC2 Is Required for Signaling to Akt-FOXO and PKC \pm , but Not S6K1. *Developmental cell* **11**, 859-871.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J.** (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* **30**, 214-226.
- Hamilton, T.L., Stoneley, M., and Bushell, M.** (2006). TOPs and their regulation. *Biochemical Society Transactions* **34**, 12-16.
- Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B., and Hannan, R.D.** (2003). mTOR-Dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* **23**, 8862-8877.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K.-i., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K.** (2002). Raptor, a Binding Partner of Target of Rapamycin (TOR), Mediates TOR Action. *Cell* **110**, 177-189.
- Hay, N., and Sonenberg, N.** (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes & Development* **18**, 1926-1945.
- Heitman, J., Movva, N., and Hall, M.** (1991a). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-909.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N.** (1992). Proline isomerases at the crossroads of protein folding, signal transduction, and immunosuppression. *New Biol* **4**, 448-460.
- Heitman, J., Movva, N.R., Hiestand, P.C., and Hall, M.N.** (1991b). FK 506-binding protein proline rotamase is a target for the immunosuppressive agent FK 506 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1948-1952.
- Held, W.A., Ballou, B., Mizushima, S., and Nomura, M.** (1974). Assembly Mapping of 30 S Ribosomal Proteins from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* **249**, 3103-3111.
- Hentges, K.E., Sirry, B., Gingeras, A.C., Sarbassov, D., Sonenberg, N., Sabatini, D., and Peterson, A.S.** (2001). FRAP/mTOR is required for proliferation and patterning during embryonic development in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 13796-13801.
- Honma, Y., Kitamura, A., Shioda, R., Maruyama, H., Ozaki, K., Oda, Y., Mini, T., Jenou, P., Maki, Y., Yonezawa, K., Hurt, E., Ueno, M., Uritani, M., Hall, M.N., and Ushimaru, T.** (2006). TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients. *EMBO J* **25**, 3832-3842.
- Houchens, D.P., Ovejera, A.A., Riblet, S.M., and Slagel, D.E.** (1983). Human brain tumor xenografts in nude mice as a chemotherapy model. *Eur J Cancer Clin Oncol* **19**, 799-805.
- Huber, A., French, S.L., Tekotte, H., Yerlikaya, S., Stahl, M., Perepelkina, M.P., Tyers, M., Rougemont, J., Beyer, A.L., and Loewith, R.** (2011). Sch9 regulates ribosome biogenesis via Stb3, Dot6 and Tod6 and the histone deacetylase complex RPD3L. *EMBO J* **30**, 3052-3064.
- Hummel, M., Cordewener, J.H.G., de Groot, J.C.M., Smeekens, S., America, A.H.P., and Hanson, J.** (2012). Dynamic protein composition of *Arabidopsis thaliana* cytosolic ribosomes in response to sucrose feeding as revealed by label free MSE proteomics. *PROTEOMICS* **12**, 1024-1038.
- Humphrey, E.L., Shamji, A.F., Bernstein, B.E., and Schreiber, S.L.** (2004). Rpd3p relocation mediates a transcriptional response to rapamycin in yeast. *Chem Biol* **11**, 295-299.
- Jacinto, E., Guo, B., Arndt, K.T., Schmelzle, T., and Hall, M.N.** (2001). TIP41 Interacts with TAP42 and Negatively Regulates the TOR Signaling Pathway. *Molecular cell* **8**, 1017-1026.

- Jacinto, E., Facchinetti, V., Liu, D., Soto, N., Wei, S., Jung, S.Y., Huang, Q., Qin, J., and Su, B.** (2006). SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* **127**, 125-137.
- Jackson, R.J., Hellen, C.U., and Pestova, T.V.** (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 113-127.
- Janssens, V., and Goris, J.** (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.* **353**, 417-439.
- Jasinski, S., Piazza, P., Craft, J., Hay, A., Woolley, L., Rieu, I., Phillips, A., Hedden, P., and Tsiantis, M.** (2005). KNOX Action in Arabidopsis Is Mediated by Coordinate Regulation of Cytokinin and Gibberellin Activities. *Current Biology* **15**, 1560-1565.
- Jefferies, H.B.J., Reinhard, C., Kozma, S.C., and Thomas, G.** (1994). Rapamycin selectively represses translation of the polypyrimidine tract messenger-RNA family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4441-4445.
- Jefferies, H.B.J., Fumagalli, S., Dennis, P.B., Reinhard, C., Pearson, R.B., and Thomas, G.** (1997). Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70(S6k). *Embo Journal* **16**, 3693-3704.
- Johnson, S.P., and Warner, J.R.** (1987). Phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* equivalent of ribosomal protein S6 has no detectable effect on growth. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* **7**, 1338-1345.
- Jorgensen, P., Rupes, I., Sharom, J.R., Schneper, L., Broach, J.R., and Tyers, M.** (2004). A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes Dev* **18**, 2491-2505.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y.** (2000). Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* **150**, 1507-1513.
- Kapasi, P., Chaudhuri, S., Vyas, K., Baus, D., Komar, A.A., Fox, P.L., Merrick, W.C., and Mazumder, B.** (2007). L13a blocks 48S assembly: role of a general initiation factor in mRNA-specific translational control. *Mol Cell* **25**, 113-126.
- Katari, M.S., Nowicki, S.D., Aceituno, F.F., Nero, D., Kelfer, J., Thompson, L.P., Cabello, J.M., Davidson, R.S., Goldberg, A.P., Shasha, D.E., Coruzzi, G.M., and Gutiérrez, R.A.** (2010). VirtualPlant: A Software Platform to Support Systems Biology Research. *Plant Physiology* **152**, 500-515.
- Kayes, J.M., and Clark, S.E.** (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development* **125**, 3843-3851.
- Kellis, M., Birren, B.W., and Lander, E.S.** (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617-624.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M.** (2002). mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery. *Cell* **110**, 163-175.
- Kim, D.-H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Latek, R.R., Guntur, K.V.P., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M.** (2003). GβL, a Positive Regulator of the Rapamycin-Sensitive Pathway Required for the Nutrient-Sensitive Interaction between Raptor and mTOR. *Molecular cell* **11**, 895-904.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., and Ban, N.** (2012). Atomic structures of the eukaryotic ribosome. *Trends Biochem Sci* **37**, 189-198.
- Klinge, S., Voigts-Hoffmann, F., Leibundgut, M., Arpagaus, S., and Ban, N.** (2011). Crystal structure of the eukaryotic 60S ribosomal subunit in complex with initiation factor 6. *Science* **334**, 941-948.
- Kressler, D., Hurt, E., and Bassler, J.** (2010). Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta* **1803**, 673-683.

- Krieg, J., Hofsteenge, J., and Thomas, G.** (1988). Identification of the 40 S ribosomal protein S6 phosphorylation sites induced by cycloheximide. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 11473-11477.
- Kunz, J., Henriquez, R., Schneider, U., Deuter-Reinhard, M., Movva, N.R., and Hall, M.N.** (1993). Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell* **73**, 585-596.
- Kuruvilla, F.G., Shamji, A.F., and Schreiber, S.L.** (2001). Carbon- and nitrogen-quality signaling to translation are mediated by distinct GATA-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7283-7288.
- Leiber, R.-M., John, F., Verhertbruggen, Y., Diet, A., Knox, J.P., and Ringli, C.** (2010). The TOR Pathway Modulates the Structure of Cell Walls in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **22**, 1898-1908.
- Leibfried, A., To, J.P.C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J., and Lohmann, J.U.** (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**, 1172-1175.
- Lempiäinen, H., and Shore, D.** (2009). Growth control and ribosome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 855-863.
- Lempiäinen, H., Uotila, A., Urban, J., Dohnal, I., Ammerer, G., Loewith, R., and Shore, D.** (2009). Sfp1 Interaction with TORC1 and Mrs6 Reveals Feedback Regulation on TOR Signaling. *Molecular cell* **33**, 704-716.
- Lippman, S.I., and Broach, J.R.** (2009). Protein kinase A and TORC1 activate genes for ribosomal biogenesis by inactivating repressors encoded by Dot6 and its homolog Tod6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 19928-19933.
- Liu, H., Sadygov, R.G., and Yates, J.R.** (2004). A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Analytical Chemistry* **76**, 4193-4201.
- Liu, Y., and Bassham, D.C.** (2010). TOR Is a Negative Regulator of Autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **5**, e11883.
- Loewith, R.** (2010). 9 - TORC1 Signaling in Budding Yeast. In *The Enzymes*, N.H. Michael and T. Fuyuhiko, eds (Academic Press), pp. 147-175.
- Loewith, R.** (2011). A brief history of TOR. *Biochem Soc Trans* **39**, 437-442.
- Loewith, R., and Hall, M.N.** (2011). Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* **189**, 1177-1201.
- Loewith, R., Jacinto, E., Wullschleger, S., Lorberg, A., Crespo, J.L., Bonenfant, D., Oppliger, W., Jenoe, P., and Hall, M.N.** (2002). Two TOR Complexes, Only One of which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control. *Molecular cell* **10**, 457-468.
- Long, X.M., Spycher, C., Han, Z.S., Rose, A.M., Muller, F., and Avruch, J.** (2002). TOR deficiency in *C. elegans* causes developmental arrest and intestinal atrophy by inhibition of mRNA translation. *Current Biology* **12**, 1448-1461.
- Lorberg, A., and Hall, M.N.** (2004). TOR: the first 10 years. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**, 1-18.
- Lorenz, M.C., and Heitman, J.** (1995). TOR mutations confer rapamycin resistance by preventing interaction with FKBP12-rapamycin. *J Biol Chem* **270**, 27531-27537.
- Luan, S.** (2002). Tyrosine phosphorylation in plant cell signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 11567-11569.
- Mahfouz, M.M., Kim, S., Delauney, A.J., and 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. *The Plant Cell Online* **18**, 477-490.
- Marion, R.M., Regev, A., Segal, E., Barash, Y., Koller, D., Friedman, N., and O'Shea, E.K.** (2004). Sfp1 is a stress- and nutrient-sensitive regulator of ribosomal protein gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14315-14322.
- Martin, D.E., Souldard, A., and Hall, M.N.** (2004). TOR regulates ribosomal protein gene expression via PKA and the Forkhead transcription factor FHL1. *Cell* **119**, 969-979.

- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X., and Grummt, I.** (2004). mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev* **18**, 423-434.
- Mazumder, B., Sampath, P., Seshadri, V., Maitra, R.K., DiCorleto, P.E., and Fox, P.L.** (2003). Regulated release of L13a from the 60S ribosomal subunit as a mechanism of transcript-specific translational control. *Cell* **115**, 187-198.
- Meinke, D., Muralla, R., Sweeney, C., and Dickerman, A.** (2008). Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science* **13**, 483-491.
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C.** (2002). Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 6422-6427.
- Meyuhas, O.** (2000). Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *European Journal of Biochemistry* **267**, 6321-6330.
- Michels, A.A.** (2011). MAF1: a new target of mTORC1. *Biochem Soc Trans* **39**, 487-491.
- Moreau, M.** (2009). Analyse de la voie de signalisation TOR chez *Arabidopsis thaliana*. In Ecole Doctorale "Sciences du Végétal" (Paris Sud XI), pp. 154.
- Moreau, M., Sormani, R., Menand, B., Veit, B., Robaglia, C., and Meyer, C.** (2010). Chapter 15 - The TOR Complex and Signaling Pathway in Plants. In *The Enzymes*, N.H. Michael and T. Fuyuhiko, eds (Academic Press), pp. 285-302.
- Moreau, M., Azzopardi, M., Clément, G., Dobrenel, T., Marchive, C., Renne, C., Martin-Magniette, M.-L., Tacconat, L., Renou, J.-P., Robaglia, C., and 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. *The Plant Cell Online* **24**, 463-481.
- Müller, R., Bleckmann, A., and Simon, R.** (2008). The Receptor Kinase CORYNE of *Arabidopsis* Transmits the Stem Cell-Limiting Signal CLAVATA3 Independently of CLAVATA1. *The Plant Cell Online* **20**, 934-946.
- Nagano, A.J., Fukao, Y., Fujiwara, M., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2008). Antagonistic Jacalin-Related Lectins Regulate the Size of ER Body-Type β-Glucosidase Complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **49**, 969-980.
- Nojima, H., Tokunaga, C., Eguchi, S., Oshiro, N., Hidayat, S., Yoshino, K., Hara, K., Tanaka, N., Avruch, J., and Yonezawa, K.** (2003). The mammalian target of rapamycin (mTOR) partner, raptor, binds the mTOR substrates p70 S6 kinase and 4E-BP1 through their TOR signaling (TOS) motif. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 15461-15464.
- Noller, H.F., Hoffarth, V., and Zimniak, L.** (1992). Unusual resistance of peptidyl transferase to protein extraction procedures. *Science* **256**, 1416-1419.
- Ochotorena, I.L., Hirata, D., Kominami, K., Potashkin, J., Sahin, F., Wentz-Hunter, K., Gould, K.L., Sato, K., Yoshida, Y., Vardy, L., and Toda, T.** (2001). Conserved Wat1/Pop3 WD-repeat protein of fission yeast secures genome stability through microtubule integrity and may be involved in mRNA maturation. *J Cell Sci* **114**, 2911-2920.
- Old, W.M., Meyer-Arendt, K., Aveline-Wolf, L., Pierce, K.G., Mendoza, A., Sevinsky, J.R., Resing, K.A., and Ahn, N.G.** (2005). Comparison of Label-free Methods for Quantifying Human Proteins by Shotgun Proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics* **4**, 1487-1502.
- Ono, T., Kaya, H., Takeda, S., Abe, M., Ogawa, Y., Kato, M., Kakutani, T., Scheid, O.M., Araki, T., and Shibahara, K.-i.** (2006). Chromatin assembly factor 1 ensures the stable maintenance of silent chromatin states in *Arabidopsis*. *Genes to Cells* **11**, 153-162.
- Oshiro, N., Yoshino, K., Hidayat, S., Tokunaga, C., Hara, K., Eguchi, S., Avruch, J., and Yonezawa, K.** (2004). Dissociation of raptor from mTOR is a mechanism of rapamycin-induced inhibition of mTOR function. *Genes Cells* **9**, 359-366.
- Otterhag, L., Gustavsson, N., Alsterfjord, M., Pical, C., Lehrach, H., Gobom, J., and Sommarin, M.** (2006). *Arabidopsis* PDK1: identification of sites important for activity and downstream phosphorylation of S6 kinase. *Biochimie* **88**, 11-21.

- Parenteau, J., Durand, M., Morin, G., Gagnon, J., Lucier, J.F., Wellinger, R.J., Chabot, B., and Elela, S.A.** (2011). Introns within ribosomal protein genes regulate the production and function of yeast ribosomes. *Cell* **147**, 320-331.
- Pearce, L.R., Huang, X., Boudeau, J., Pawłowski, R., Wullschleger, S., Deak, M., Ibrahim, A.F.M., Gourlay, R., Magnuson, M.A., and Alessi, D.R.** (2007). Identification of Protor as a novel Rictor-binding component of mTOR complex-2. *Biochem J* **405**, 513-522.
- Pende, M., Um, S.H., Mieulet, V., Sticker, M., Goss, V.L., Mestan, J., Mueller, M., Fumagalli, S., Kozma, S.C., and Thomas, G.** (2004). S6K1(-)/S6K2(-) mice exhibit perinatal lethality and rapamycin-sensitive 5'-terminal oligopyrimidine mRNA translation and reveal a mitogen-activated protein kinase-dependent S6 kinase pathway. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* **24**, 3112-3124.
- Peng, T., Golub, T.R., and Sabatini, D.M.** (2002). The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY* **22**, 5575-5584.
- Pinon, V., Etschells, J.P., Rossignol, P., Collier, S.A., Arroyo, J.M., Martienssen, R.A., and Byrne, M.E.** (2008). Three PIGGYBACK genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development* **135**, 1315-1324.
- Pöyry, T.A.A., Kaminski, A., and Jackson, R.J.** (2004). What determines whether mammalian ribosomes resume scanning after translation of a short upstream open reading frame? *Genes & Development* **18**, 62-75.
- Proud, C.G.** (2007). Signalling to translation: how signal transduction pathways control the protein synthetic machinery. *Biochem. J.* **403** 217-234.
- Proud, C.G.** (2010). Chapter 8 - mTORC1 and Cell Cycle Control. In *The Enzymes*, N.H. Michael and T. Fuyuhiko, eds (Academic Press), pp. 129-146.
- Rabl, J., Leibundgut, M., Ataide, S.F., Haag, A., and Ban, N.** (2011). Crystal structure of the eukaryotic 40S ribosomal subunit in complex with initiation factor 1. *Science* **331**, 730-736.
- Radimerski, T., Mini, T., Schneider, U., Wettenhall, R.E.H., Thomas, G., and Jenö, P.** (2000). Identification of Insulin-Induced Sites of Ribosomal Protein S6 Phosphorylation in *Drosophila melanogaster*. *Biochemistry* **39**, 5766-5774.
- Raught, B., Peiretti, F., Gingras, A.-C., Livingstone, M., Shahbazian, D., Mayeur, G.L., Polakiewicz, R.D., Sonenberg, N., and Hershey, J.W.B.** (2004). Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *EMBO J* **23**, 1761-1769.
- Rédei, J.** (1992). *A note on Columbia wild type and Lansberg erecta.* (Singapore: World Scientific).
- Reinke, A., Anderson, S., McCaffery, J.M., Yates, J., Aronova, S., Chu, S., Fairclough, S., Iverson, C., Wedaman, K.P., and Powers, T.** (2004). TOR Complex 1 Includes a Novel Component, Tco89p (YPL180w), and Cooperates with Ssd1p to Maintain Cellular Integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14752-14762.
- Remacha, M., Jimenez-Diaz, A., Santos, C., Briones, E., Zambrano, R., Rodriguez Gabriel, M.A., Guarinos, E., and Ballesta, J.P.** (1995). Proteins P1, P2, and P0, components of the eukaryotic ribosome stalk. New structural and functional aspects. *Biochem Cell Biol* **73**, 959-968.
- Ren, M., Qiu, S., Venglat, P., Xiang, D., Feng, L., Selvaraj, G., and Datla, R.** (2011). Target of Rapamycin Regulates Development and Ribosomal RNA Expression through Kinase Domain in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **155**, 1367-1382.
- Robaglia, C., Thomas, M., and Meyer, C.** (2012). Sensing nutrient and energy status by SnRK1 and TOR kinases. *Current Opinion in Plant Biology* **15**, 301-307.
- Robaglia, C., Menand, B., Lei, Y., Sormani, R., Nicolai, M., Gery, C., Teoule, E., Deprost, D., and Meyer, C.** (2004). Plant growth: the translational connection. *Biochem Soc Trans* **32**, 581-584.
- Roberg, K.J., Bickel, S., Rowley, N., and Kaiser, C.A.** (1997). Control of Amino Acid Permease Sorting in the Late Secretory Pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8. *Genetics* **147**, 1569-1584.
- Rohde, J.R., and Cardenas, M.E.** (2004). Nutrient signaling through TOR kinases controls gene expression and cellular differentiation in fungi. *Curr Top Microbiol Immunol* **279**, 53-72.

- Rohde, J.R., Bastidas, R., Puria, R., and Cardenas, M.E.** (2008). Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Microbiology* **11**, 153-160.
- Romani, I., Tadini, L., Rossi, F., Masiero, S., Pribil, M., Jahns, P., Kater, M., Leister, D., and Pesaresi, P.** (2012). Versatile roles of arabidopsis plastid ribosomal proteins in plant growth and development. *The Plant Journal*, no-no.
- Rosado, A., Sohn, E.J., Drakakaki, G., Pan, S., Swidergal, A., Xiong, Y., Kang, B.-H., Bressan, R.A., and Raikhel, N.V.** (2010). Auxin-Mediated Ribosomal Biogenesis Regulates Vacuolar Trafficking in Arabidopsis. *The Plant Cell Online* **22**, 143-158.
- Rudra, D., Mallick, J., Zhao, Y., and Warner, J.R.** (2007). Potential interface between ribosomal protein production and pre-rRNA processing. *Mol Cell Biol* **27**, 4815-4824.
- Ruvinsky, I., and Meyuhas, O.** (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends in Biochemical Sciences* **31**, 342-348.
- Ruvinsky, I., Sharon, N., Lerer, T., Cohen, H., Stolovich-Rain, M., Nir, T., Dor, Y., Zisman, P., and Meyuhas, O.** (2005). Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. *Genes & Development* **19**, 2199-2211.
- Sablowski, R.** (2009). Cytokinin and WUSCHEL tie the knot around plant stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 16016-16017.
- Sablowski, R.** (2011). Plant stem cell niches: from signalling to execution. *Current Opinion in Plant Biology* **14**, 4-9.
- Sáez-Vásquez, J., Gallois, P., and Delseny, M.** (2000). Accumulation and nuclear targeting of BnC24, a Brassica napus ribosomal protein corresponding to a mRNA accumulating in response to cold treatment. *Plant Science* **156**, 35-46.
- Sakamoto, T., Kamiya, N., Ueguchi-Tanaka, M., Iwahori, S., and Matsuoka, M.** (2001). KNOX homeodomain protein directly suppresses the expression of a gibberellin biosynthetic gene in the tobacco shoot apical meristem. *Genes & Development* **15**, 581-590.
- Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Kim, D.H., Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M.** (2004). Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**, 1296-1302.
- Schalm, S.S., and Blenis, J.** (2002). Identification of a conserved motif required for mTOR signaling. *Curr Biol* **12**, 632-639.
- Schalm, S.S., Fingar, D.C., Sabatini, D.M., and Blenis, J.** (2003). TOS motif-mediated raptor binding regulates 4E-BP1 multisite phosphorylation and function. *Curr Biol* **13**, 797-806.
- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M., and Ryabova, L.A.** (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *Embo Journal* **30**, 1343-1356.
- Scheres, B., Benfey, P., and Dolan, L.** (2002). Root development. *Arabidopsis Book* **1**, e0101.
- Schreiber, S.L.** (1991). Chemistry and biology of the immunophilins and their immunosuppressive ligands. *Science* **251**, 283-287.
- Shani, E., Yanai, O., and Ori, N.** (2006). The role of hormones in shoot apical meristem function. *Current Opinion in Plant Biology* **9**, 484-489.
- Smeekens, S., Ma, J., Hanson, J., and Rolland, F.** (2010). Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 273-278.
- Smith, E.M., and Proud, C.G.** (2008). cdc2-cyclin B regulates eEF2 kinase activity in a cell cycle- and amino acid-dependent manner. *Embo Journal* **27**, 1005-1016.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J.** (1999). The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends in Biochemical Sciences* **24**, 181-185.
- Sormani, R., Masclaux-Daubresse, C., Daniele-Vedele, F., and Chardon, F.** (2011). Transcriptional Regulation of Ribosome Components Are Determined by Stress According to Cellular Compartments in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **6**, e28070.

- Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C., and Robaglia, C.** (2007). *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol* **7**, 26.
- Soulard, A., and Hall, M.N.** (2007). SnapShot: mTOR Signaling. *Cell* **129**, 434.e431-434.e432.
- Sutton, A., Immanuel, D., and Arndt, K.T.** (1991). The SIT4 protein phosphatase functions in late G1 for progression into S phase. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2133-2148.
- Svensson, P., Changchien, L.-M., Craven, G.R., and Noller, H.F.** (1988). Interaction of ribosomal proteins, S6, S8, S15 and S18 with the central domain of 16 S ribosomal RNA. *Journal of Molecular Biology* **200**, 301-308.
- Szick-Miranda, K., and Bailey-Serres, J.** (2001). Regulated Heterogeneity in 12-kDa P-protein Phosphorylation and Composition of Ribosomes in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Biological Chemistry* **276**, 10921-10928.
- Szick-Miranda, K., Zaniel, A., Zaniel, A., Abidayo, S., and Slater, K.** (2010). Analysis of RPS15aE, an Isoform of a Plant-Specific Evolutionarily Distinct Ribosomal Protein in *Arabidopsis thaliana*, Reveals its Potential Role as a Growth Regulator. *Plant Molecular Biology Reporter* **28**, 239-252.
- Szick, K., Springer, M., and Bailey-Serres, J.** (1998). Evolutionary analyses of the 12-kDa acidic ribosomal P-proteins reveal a distinct protein of higher plant ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 2378-2383.
- Tchórzewski, M., Krokowski, D., Rzeski, W., Issinger, O.-G., and Grankowski, N.** (2003). The subcellular distribution of the human ribosomal "stalk" components: P1, P2 and P0 proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 203-211.
- Terada, N., Patel, H.R., Takase, K., Kohno, K., Nairn, A.C., and Gelfand, E.W.** (1994). Rapamycin selectively inhibits translation of messenger-RNAs encoding elongation-factors and ribosomal-proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 11477-11481.
- Thomson, A.W., Turnquist, H.R., and Raimondi, G.** (2009). Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nat Rev Immunol* **9**, 324-337.
- Thoreen, C.C., Chantranupong, L., Keys, H.R., Wang, T., Gray, N.S., and Sabatini, D.M.** (2012). A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature* **485**, 109-113.
- Tominaga-Wada, R., Ishida, T., and Wada, T.** (2011). Chapter two - New Insights into the Mechanism of Development of *Arabidopsis* Root Hairs and Trichomes. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, W.J. Kwang, ed (Academic Press), pp. 67-106.
- Torii, K.U., Mitsukawa, N., Oosumi, T., Matsuura, Y., Yokoyama, R., Whittier, R.F., and Komeda, Y.** (1996). The *Arabidopsis* ERECTA Gene Encodes a Putative Receptor Protein Kinase with Extracellular Leucine-Rich Repeats. *The Plant Cell Online* **8**, 735-746.
- Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthélémy, J., and Palauqui, J.-C.** (2008). High-Resolution Whole-Mount Imaging of Three-Dimensional Tissue Organization and Gene Expression Enables the Study of Phloem Development and Structure in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **20**, 1494-1503.
- Tsang, C.K., Bertram, P.G., Ai, W., Drenan, R., and Zheng, X.F.** (2003). Chromatin-mediated regulation of nucleolar structure and RNA Pol I localization by TOR. *EMBO J* **22**, 6045-6056.
- Turck, F., Kozma, S.C., Thomas, G., and Nagy, F.** (1998). A heat-sensitive *Arabidopsis thaliana* kinase substitutes for human p70s6k function in vivo. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 2038-2044.
- Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S.C., Thomas, G., and Nagy, F.** (2004). Phytohormones Participate in an S6 Kinase Signal Transduction Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **134**, 1527-1535.
- Turkina, M.V., Klang Årstrand, H., and Vener, A.V.** (2011). Differential Phosphorylation of Ribosomal Proteins in *Arabidopsis thaliana* Plants during Day and Night. *PLoS ONE* **6**, e29307.
- Tzeng, T.-Y., Kong, L.-R., Chen, C.-H., Shaw, C.-C., and 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 and Cell Physiology* **50**, 1695-1709.

- Urban, J., Soulard, A., Huber, A., Lippman, S., Mukhopadhyay, D., Deloche, O., Wanke, V., Anrather, D., Ammerer, G., Riezman, H., Broach, J.R., De Virgilio, C., Hall, M.N., and Loewith, R.** (2007). Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* **26**, 663-674.
- Valot, B., Langella, O., Nano, E., and Zivy, M.** (2011). MassChroQ: A versatile tool for mass spectrometry quantification. *PROTEOMICS* **11**, 3572-3577.
- van der Graaff, E., Laux, T., and Rensing, S.** (2009). The WUS homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biology* **10**, 248.
- Van Hoof, C., Martens, E., Longin, S., Jordens, J., Stevens, I., Janssens, V., and Goris, J.** (2005). Specific interactions of PP2A and PP2A-like phosphatases with the yeast PTPA homologues, Ypa1 and Ypa2. *Biochem. J.* **386**, 93-102.
- Veit, B.** (2009). Hormone mediated regulation of the shoot apical meristem. *Plant Molecular Biology* **69**, 397-408.
- von Manteuffel, S.R., Gingras, A.C., Ming, X.F., Sonenberg, N., and Thomas, G.** (1996). 4E-BP1 phosphorylation is mediated by the FRAP-p70s6k pathway and is independent of mitogen-activated protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 4076-4080.
- Wang, S.Z., and Roberts, R.M.** (2005). The evolution of the Sin1 gene product, a little known protein implicated in stress responses and type I interferon signaling in vertebrates. *BMC Evol Biol* **5**, 13.
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D.R., and Proud, C.G.** (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90RSK1 and p70 S6 kinase. *EMBO J* **20**, 4370-4379.
- Warner, J.R.** (1999). The economics of ribosome biosynthesis in yeast. *Trends Biochem Sci* **24**, 437-440.
- Weijers, D., Franke-van Dijk, M., Vencken, R.-J., Quint, A., Hooykaas, P., and Offringa, R.** (2001). An Arabidopsis Minute-like phenotype caused by a semi-dominant mutation in a RIBOSOMAL PROTEIN S5 gene. *Development* **128**, 4289-4299.
- Weisman, R.** (2010). 13 - Fission Yeast TOR and Rapamycin. In *The Enzymes*, N.H. Michael and T. Fuyuhiko, eds (Academic Press), pp. 251-269.
- Werner, T., Motyka, V., Laucou, V., Smets, R., Van Onckelen, H., and Schmölling, T.** (2003). Cytokinin-Deficient Transgenic Arabidopsis Plants Show Multiple Developmental Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *The Plant Cell Online* **15**, 2532-2550.
- Wilkinson, M.G., Pino, T.S., Tournier, S., Buck, V., Martin, H., Christiansen, J., Wilkinson, D.G., and Millar, J.B.** (1999). Sin1: an evolutionarily conserved component of the eukaryotic SAPK pathway. *EMBO J* **18**, 4210-4221.
- Williams, A.J., Werner-Fraczek, J., Chang, I.-F., and Bailey-Serres, J.** (2003). Regulated Phosphorylation of 40S Ribosomal Protein S6 in Root Tips of Maize. *Plant Physiology* **132**, 2086-2097.
- Willis, I.M., and Moir, R.D.** (2007). Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends in Biochemical Sciences* **32**, 51-53.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N.** (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **124**, 471-484.
- Wullschleger, S., Loewith, R., Oppliger, W., and Hall, M.N.** (2005). Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *J Biol Chem* **280**, 30697-30704.
- Xiong, Y., and Sheen, J.** (2012). Rapamycin and Glucose-Target of Rapamycin (TOR) Protein Signaling in Plants. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 2836-2842.
- Xue, S., and Barna, M.** (2012). Specialized ribosomes: a new frontier in gene regulation and organismal biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 355-369.
- Yadav, R.K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., and Reddy, G.V.** (2009). Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 4941-4946.

- Yamada, K., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M.** (2011). Unique Defense Strategy by the Endoplasmic Reticulum Body in Plants. *Plant and Cell Physiology*.
- Yamada, K., Nagano, A.J., Ogasawara, K., Hara-Nishimura, I., and Nishimura, M.** (2009). The ER body, a new organelle in *Arabidopsis thaliana*, requires NAI2 for its formation and accumulates specific beta-glucosidases. *Plant Signal Behav* **4**, 849-852.
- Yamada, K., Lim, J., Dale, J.M., Chen, H., Shinn, P., Palm, C.J., Southwick, A.M., Wu, H.C., Kim, C., Nguyen, M., Pham, P., Cheuk, R., Karlin-Newmann, G., Liu, S.X., Lam, B., Sakano, H., Wu, T., Yu, G., Miranda, M., Quach, H.L., Tripp, M., Chang, C.H., Lee, J.M., Toriumi, M., Chan, M.M.H., Tang, C.C., Onodera, C.S., Deng, J.M., Akiyama, K., Ansari, Y., Arakawa, T., Banh, J., Banno, F., Bowser, L., Brooks, S., Carninci, P., Chao, Q., Choy, N., Enju, A., Goldsmith, A.D., Gurjal, M., Hansen, N.F., Hayashizaki, Y., Johnson-Hopson, C., Hsuan, V.W., Iida, K., Karnes, M., Khan, S., Koesema, E., Ishida, J., Jiang, P.X., Jones, T., Kawai, J., Kamiya, A., Meyers, C., Nakajima, M., Narusaka, M., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Tamse, R., Vaysberg, M., Wallender, E.K., Wong, C., Yamamura, Y., Yuan, S., Shinozaki, K., Davis, R.W., Theologis, A., and Ecker, J.R.** (2003). Empirical Analysis of Transcriptional Activity in the *Arabidopsis* Genome. *Science* **302**, 842-846.
- Yang, Q., and Guan, K.-L.** (2007). Expanding mTOR signaling. *Cell Res* **17**, 666-681.
- Zhang, H., Stallock, J., Ng, J., Reinhard, C., and Neufeld, T.** (2000). Regulation of cellular growth by the *Drosophila* target of rapamycin dTOR. *Genes Dev* **14**, 2712-2724.
- Zhao, Y., McIntosh, K.B., Rudra, D., Schawalder, S., Shore, D., and Warner, J.R.** (2006). Fine-structure analysis of ribosomal protein gene transcription. *Mol Cell Biol* **26**, 4853-4862.
- Zhao, Z., Andersen, S.U., Ljung, K., Dolezal, K., Miotk, A., Schultheiss, S.J., and Lohmann, J.U.** (2010). Hormonal control of the shoot stem-cell niche. *Nature* **465**, 1089-1092.
- Zinzalla, V., Sturgill, T.W., and Hall, M.N.** (2010). Chapter 1 - TOR Complexes: Composition, Structure, and Phosphorylation. In *The Enzymes*, N.H. Michael and T. Fuyuhiko, eds (Academic Press), pp. 1-20.
- Zinzalla, V., Stracka, D., Oppliger, W., and Hall, Michael N.** (2011). Activation of mTORC2 by Association with the Ribosome. *Cell* **144**, 757-768.

Annexes

Annexe 1 : Liste des protéines potentiellement dérégulées par l'inactivation de TOR d'après les résultats obtenus dans les répétitions M1 à M4. Pour réaliser cette analyse, tous les échantillons des TOR RNAi ont été considérés indépendamment les uns des autres. Seules sont présentées ici les protéines identifiées comme dérégulées dans au moins trois répétitions sur les huit (colonne Nb). Les annotations de chacune des protéines proviennent de Virtual Plant 1.2 (Katari et al., 2010) et les protéines ribosomales sont surlignées en bleu.

Réprimés

AGI	Nb	Annotation
ATCG00680	5	encodes for CP47, subunit of the photosystem II reaction center.
AT1G32900	4	starch synthase, putative
AT2G36460	4	fructose-bisphosphate aldolase, putative
AT2G45960	4	PIP1B (NAMED PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 1B); water channel
AT4G37930	4	SHM1 (SERINE TRANSHYDROXYMETHYLTRANSFERASE 1); glycine hydroxymethyltransferase/ poly(U) binding
AT1G01100	3	60S acidic ribosomal protein P1 (RPP1A)
AT1G13440	3	GAPC2 (GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE C2); NAD or NADH binding / binding / catalytic/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating)/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
AT1G29270	3	unknown protein
AT1G54030	3	GDSL-motif lipase, putative
AT1G54270	3	EIF4A-2; ATP-dependent helicase/ translation initiation factor
AT1G55490	3	CPN60B (CHAPERONIN 60 BETA); ATP binding / protein binding
AT1G58380	3	XW6; structural constituent of ribosome
AT1G61520	3	LHCA3; chlorophyll binding
AT2G39310	3	JAL22 (JACALIN-RELATED LECTIN 22)
AT2G39460	3	RPL23AA (RIBOSOMAL PROTEIN L23AA); RNA binding / nucleotide binding / structural constituent of ribosome
AT3G08580	3	AAC1 (ADP/ATP CARRIER 1); ATP:ADP antiporter/ binding
AT3G26520	3	TIP2 (TONOPLAST INTRINSIC PROTEIN 2); water channel
AT3G26650	3	GAPA (GLYCERALDEHYDE 3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE A SUBUNIT); glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/ protein binding
AT4G10340	3	LHCB5 (LIGHT HARVESTING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II 5); chlorophyll binding
AT5G62390	3	ATBAG7 (ARABIDOPSIS THALIANA BCL-2-ASSOCIATED ATHANOGENE 7); calmodulin binding

Induites

AGI	Nb	Annotation
AT4G24280	5	cpHsc70-1 (chloroplast heat shock protein 70-1); ATP binding
AT1G05190	4	emb2394 (embryo defective 2394); structural constituent of ribosome
AT1G15820	4	LHCB6 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII SUBUNIT 6); chlorophyll binding
AT1G53240	4	malate dehydrogenase (NAD), mitochondrial
AT1G67090	4	RBCS1A (RIBULOSE BISPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A); copper ion binding / ribulose-bisphosphate carboxylase
AT2G18020	4	EMB2296 (embryo defective 2296); structural constituent of ribosome
AT2G37190	4	60S ribosomal protein L12 (RPL12A)
AT3G01500	4	CA1 (CARBONIC ANHYDRASE 1); carbonate dehydratase/ zinc ion binding
AT3G04840	4	40S ribosomal protein S3A (RPS3aA)
AT5G10360	4	EMB3010 (embryo defective 3010); structural constituent of ribosome
AT5G19090	4	heavy-metal-associated domain-containing protein
AT1G26880	3	60S ribosomal protein L34 (RPL34A)
AT1G27400	3	60S ribosomal protein L17 (RPL17A)
AT1G43170	3	ARP1 (ARABIDOPSIS RIBOSOMAL PROTEIN 1); structural constituent of ribosomeXAT5G02450: 60S ribosomal protein L36 (RPL36C)
AT1G61520	3	LHCA3; chlorophyll binding
AT2G20450	3	60S ribosomal protein L14 (RPL14A)
AT3G04230	3	40S ribosomal protein S16 (RPS16B)
AT3G05590	3	RPL18 (RIBOSOMAL PROTEIN L18); structural constituent of ribosome
AT3G09630	3	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4A)
AT3G12780	3	PGK1 (PHOSPHOGLYCERATE KINASE 1); phosphoglycerate kinase
AT3G15190	3	chloroplast 30S ribosomal protein S20, putative
AT3G22660	3	rRNA processing protein-related
AT3G25520	3	ATL5 (A. THALIANA RIBOSOMAL PROTEIN L5); 5S rRNA binding / structural constituent of ribosome

AT3G60750	3	transketolase, putative
AT4G20360	3	ATRABE1B (ARABIDOPSIS RAB GTPASE HOMOLOG E1B); GTP binding / GTPase/ translation elongation factor
AT4G24770	3	RBP31 (31-KDA RNA BINDING PROTEIN); RNA binding / poly(U) binding
AT4G31700	3	RPS6 (RIBOSOMAL PROTEIN S6); structural constituent of ribosome
AT5G01530	3	chlorophyll A-B binding protein CP29 (LHCB4)
AT5G02870	3	60S ribosomal protein L4/L1 (RPL4D)
AT5G14740	3	CA2 (CARBONIC ANHYDRASE 2); carbonate dehydratase/ zinc ion binding

Annexe 2 : Comparaison des résultats du transcriptome, du traductome et du protéome des protéines ribosomales : Seules les protéines quantifiées au moins une fois dans une expérience des protéome sont représentées ici. Les données brutes de transcriptome et de traductome ont été obtenues par Manon Moreau sur des puces CATMA. La « quantification » des expériences de protéome a été menée en comptant le nombre de spectres spécifiques pour chaque protéine et en rapportant cette valeur au nombre de spectres ribosomaux dans l'échantillon : les chiffres correspondent au nombre d'expériences dans lesquelles cette protéine a été trouvée induite (positif, orange) ou réprimée (négatif, violet). Les cases noires représentent des absences de données. L'annotation des colonnes de gauche repose sur les travaux de Sormani et al. (2011).

			repet-	repet-	repet-	repet-	repet-	repet-	repet-	Protéomique		
			7h	24h	7h	24h	7h	24h	7h	24h	M6-M7	M8-M9
			total	total	total	total	poly	poly	poly	poly		
RPL10A	cytosol	AT1G14320	0,06	0,07	-0,16	-0,05	-0,07	-0,11	0,00	-0,11	1	1
RPL10A	cytosol	AT1G14320	0,30	0,67	0,16	0,61	0,30	0,34	0,22	0,31	1	1
RPL10aA	cytosol	AT1G08360	0,05	-0,08	0,04	-0,12	-0,04	0,05	-0,14	0,05	-1	2
RPL10aA	cytosol	AT1G08360		0,32		0,33		0,50		0,37	-1	2
RPL10aA	cytosol	At1g08360		0,39		0,34		0,39		0,44	-1	2
RPL10aB	cytosol	AT2G27530	0,18	0,39	0,35	0,16	0,42	0,39	0,26	0,12	0	2
RPL10aB	cytosol	At2g27530		0,25		0,19		0,46		0,31	0	2
RPL10aC	cytosol	AT5G22440	0,32	0,07	0,28	0,04	0,05	0,22	0,16	0,06	0	-1
RPL10C	cytosol	AT1G66580	0,54	0,28	0,53	0,22	0,27	0,01	0,14	-0,02	-2	1
RPL12B	cytosol	AT3G53430	0,30	0,65	0,19	0,36	0,18	0,18	0,21	0,14	-2	0
RPL12C	cytosol	AT5G60670	0,61	0,27	0,13	0,27	0,06	0,38	0,37	0,20	-1	0
RPL13aA	cytosol	At3g07110		0,42		0,34		0,53		0,17	0	-1
RPL13aB	cytosol	AT3G24830	0,15	0,16	-0,03	0,11	-0,04	0,07	0,05	0,08	-1	2
RPL13aB	cytosol	At3g24830		0,67		0,61		0,59		0,50	-1	2
RPL13aB	cytosol	AT3G24830		0,70		0,55		0,47		0,39	-1	2
RPL13aD	cytosol	At5g48760		0,12		0,09		0,15		0,03	0	1
RPL13B	cytosol	AT3g49010		0,16		0,30		0,43		0,31	1	1
RPL13D	cytosol	AT5G23900	0,01	0,33	0,23	0,30	0,14	0,31	-0,06	0,31	-2	0
RPL14A	cytosol	AT2G20450	0,49	0,05	-0,35	0,12	0,07	0,38	0,13	0,11	0	-1
RPL14B	cytosol	At4g27090		0,27		0,16		0,53		0,15	1	0
RPL17A	cytosol	AT1G27400	0,17	0,02	-0,10	0,08	0,18	0,29	-0,06	0,26	2	1
RPL17B	cytosol	AT1G67430	0,32	0,22	0,01	0,30	0,20	0,39	0,13	0,36	1	0
RPL18aB	cytosol	AT2G34480	0,39	0,34	0,27	0,35	0,23	0,66	0,03	0,21	1	-1
RPL18aC	cytosol	AT3G14600	0,33	0,28	0,05	0,27	0,18	0,40	0,02	0,15	0	-1
RPL18B	cytosol	AT3G05590	0,72	0,55	0,32	0,58	0,03	0,52	0,22	0,32	-1	2
RPL18C	cytosol	AT5G27850	0,54	0,40	0,28	0,36	0,13	0,41	0,37	0,13	0	0
RPL19A	cytosol	AT1G02780	0,19	0,41	0,06	0,34	0,31	0,42	0,27	0,24	2	0
RPL19C	cytosol	AT4G02230	0,41	0,06	0,22	0,05	0,16	0,47	0,16	0,16	2	0
RPL26A	cytosol	At3g49910		0,03		0,05		0,10		0,11	-2	2
RPL27B	cytosol	At3g22230		0,39		0,18		0,74		0,20	1	2
RPL27C	cytosol	AT4G15000	0,24	0,28	0,43	0,28	-0,11	0,38	-0,04	0,25	1	0
RPL28A	cytosol	AT2G19730	0,39	0,18	0,21	0,17	0,02	0,46	0,14	0,22	2	0
RPL28C	cytosol	AT4G29410	0,40	0,14	0,01	0,34	0,28	0,73	0,00	0,52	0	1
RPL30B	cytosol	AT1G77940	0,54	0,33	0,33	0,25	0,03	0,43	0,28	0,30	-1	2
RPL32A	cytosol	AT4G18100	0,05	0,03	-0,09	0,04	-0,11	0,06	-0,02	-0,07	-1	1
RPL32A	cytosol	AT4G18100		0,22		0,29		0,46		0,23	-1	1
RPL32A	cytosol	At4g18100		0,29		0,30		0,36		0,29	-1	1
RPL32B	cytosol	At5g46430		0,24		0,25		0,05		0,03	1	-1
RPL34A	cytosol	AT1G26880	0,63	-0,23	0,22	0,05	-0,05	0,04	0,47	-0,04	0	1
RPL34B	cytosol	At1g69620		0,27		0,24		0,24		0,10	0	1
RPL35A	cytosol	AT3G09500	0,16	0,07	0,01	0,31	-0,07	0,57	0,17	0,43	0	-1
RPL3A	cytosol	AT1G43170	0,19	0,57	0,28	0,46	0,44	0,44	0,13	0,28	0	2
RPL3B	cytosol	AT1G61580	-0,08	0,05	0,29	0,05	0,07	0,00	0,23	-0,01	0	-2
RPL4A	cytosol	AT3G09630	-0,22	0,51	0,25	0,55	0,34	0,37	0,03	0,32	1	0
RPL4D	cytosol	AT5G02870	0,09	0,57	0,42	0,48	0,34	0,28	0,01	0,39	1	-1
RPL5A	cytosol	At3g25520		0,23		0,17		0,29		0,06	-1	0
RPL5B	cytosol	At5g39740		0,38		0,25		0,39		0,41	0	2
RPL6A	cytosol	At1g18540		0,25		0,37		0,36		0,44	-1	-2
RPL7aA	cytosol	AT2G47610	0,27	0,35	0,36	0,36	0,22	0,31	0,01	-0,04	-1	-2
RPL7aB	cytosol	AT3G62870	0,12	0,21	0,14	0,31	0,08	0,47	-0,04	0,36	0	2
RPL7B	cytosol	AT2G01250	0,21	0,24	0,21	0,22	0,00	0,31	0,19	0,22	0	0
RPL7C	cytosol	AT2G44120	-0,03	0,59	0,18	0,49	0,09	0,46	-0,04	0,34	0	1
RPL7D	cytosol	AT3G13580	0,37	0,18	0,43	0,16	0,15	0,43	-0,05	0,41	1	1
RPL7D	cytosol	At3g13580		0,18		0,11		0,44		0,36	1	1
RPL8A	cytosol	At2g18020		0,34		0,21		0,33		0,20	1	1
RPL8C	cytosol	AT4G36130	0,13	0,44	0,21	0,36	-0,02	0,04	-0,05	0,22	0	0
RPP0B	cytosol	AT3G09200	0,28	0,63	0,42	0,55	0,24	0,37	0,16	0,23	1	0
RPP0C	cytosol	AT3G11250	-0,03	0,05	0,20	0,27	-0,08	0,17	0,23	0,22	0	1
RPP1A	cytosol	AT1G01100	0,61		0,56		-0,07		0,20		-1	2
RPP1B	cytosol	AT4G00810	0,48	0,56	0,16	0,47	0,03	0,52	0,27	0,15	1	1

RPP1C	cytosol	AT5G47700	0,49	0,56	0,25	0,37	-0,01	0,32	0,27	-0,09	0	2
RPP2A	cytosol	At2g27720		0,60		0,51		0,61		0,60	2	2
RPP2B	cytosol	At2g27710		0,50		0,65		0,42		0,40	0	0
RPP3A	cytosol	AT4G25890	0,27	0,42	0,22	0,48	-0,06	0,55	0,26	0,10	0	0
RPP3B	cytosol	At5g57290		0,32		0,23		0,40		-0,19	1	1
RPS10A	cytosol	AT4G25740	0,08	0,30	0,35	0,26	0,10	0,46	0,04	0,11	1	-1
RPS10B	cytosol	AT5G41520	0,18	0,22	0,15	0,28	0,34	0,42		0,28	2	2
RPS10C	cytosol	AT5G52650	0,10	0,58	0,11	0,63	0,26	0,51	0,17	0,41	0	1
RPS11A	cytosol	AT3G48930	0,33	0,49	0,49	0,41	0,00	0,38	0,11	0,26	0	0
RPS11B	cytosol	AT4G30800	0,26	0,14	0,34	0,20	-0,11	0,20	0,04	0,12	0	0
RPS11C	cytosol	AT5G23740	0,37	0,17	0,13	0,25	0,19	0,44	0,14	0,02	-1	0
RPS12A	cytosol	AT1G15930	0,11	0,55	0,22	0,46	0,08	0,36	0,03	0,14	-1	0
RPS12C	cytosol	AT2G32060	0,31	0,58	0,32	0,54	-0,06	0,44	0,12	0,31	-1	0
RPS13A	cytosol	AT3G60770	0,30	0,34	0,08	0,23	0,20	0,51	0,25	0,50	1	0
RPS13B	cytosol	AT4G00100	0,31	0,37	0,20	0,48	0,28	0,62	0,23	0,33	2	2
RPS14A	cytosol	AT2G36160	0,43	0,07	0,01	0,11	0,13	0,64	0,17	0,19	0	2
RPS14B	cytosol	AT3G11510	0,45	0,39	-0,02	0,41	0,06	0,59	0,23	0,23	-2	2
RPS14C	cytosol	AT3G52580	0,57	0,20	0,07	0,29	0,25	0,55	0,16	0,33	0	1
RPS15A	cytosol	AT1G04270	0,42	0,40	0,13	0,19	0,21	0,46	0,11	0,21	0	-1
RPS15AD	cytosol	AT3G46040	0,46	0,29	0,31	0,21	-0,01	0,34	0,20	0,24	0	1
RPS15D	cytosol	AT5G09510	0,30	0,29	0,24	0,35	0,15	0,61	0,37	0,22	-2	1
RPS17A	cytosol	At2g04390		0,19		0,24		0,45		0,25	0	0
RPS19A	cytosol	AT3G02080	0,08	0,28	-0,01	0,29	0,01	0,61	0,21	0,38	0	0
RPS19C	cytosol	AT5G61170	0,24	0,47	0,27	0,38	0,15	0,51	0,10	0,27	-1	-1
RPS20B	cytosol	AT3G47370	0,56	0,38	0,30	0,54	0,09	0,70	0,10	0,56	0	0
RPS21B	cytosol	At3g53890		0,29		0,25		0,76		0,51	0	2
RPS21B	cytosol	At3g53890		-0,03		0,12		0,57		0,19	0	2
RPS21C	cytosol	AT5G27700	0,77	0,16	0,15	0,20	0,03	0,45	0,29	0,14	0	0
RPS24A	cytosol	At3g04920		0,19		0,19		0,41		0,38	2	-1
RPS24B	cytosol	AT5G28060	0,35	0,26	-0,05	0,13	-0,09	0,35	-0,04	0,34	2	1
RPS25B	cytosol	AT2G21580	0,19	0,40	0,13	0,44	0,41	0,41	0,03	0,43	0	2
RPS25E	cytosol	AT4G39200	0,06	0,11	0,01	0,03	0,03	0,05	0,03	0,03	1	0
RPS25E	cytosol	AT4G39200	0,53	0,19	-0,20	0,27	0,13	0,59	0,20		1	0
RPS26A	cytosol	At2g40510		0,39		0,38		0,79		0,78	0	0
RPS26B	cytosol	At2g40590		0,27		0,21		0,61		0,51	0	-1
RPS26C	cytosol	AT3G56340	0,17	0,26	0,02	0,04	0,10	0,63	0,14	0,10	0	-1
RPS2C	cytosol	AT2G41840	-0,19	0,56	0,08	0,33	0,28	0,34	0,23	0,07	0	1
RPS3A	cytosol	AT2G31610	-0,27	0,34	-0,53	0,21	-0,55	0,33	-0,12	0,23	0	1
RPS3aA	cytosol	AT3G04840	0,28	0,41	0,38	0,42	0,09	0,44	0,19	0,31	2	2
RPS3aB	cytosol	AT4G34670	0,15	0,34	0,16	0,31	0,27	0,33	0,10	0,03	2	2
RPS3B	cytosol	AT3G53870	0,04	0,67	0,33	0,65	0,18	0,59	0,25	0,70	0	0
RPS5A	cytosol	At3g11940		0,05		0,14		0,33		-0,01	1	0
RPS5B	cytosol	At2g37270		0,17		0,09		0,28		0,26	-1	0
RPS6A	cytosol	AT4G31700	0,22	0,63	0,28	0,46	0,35	0,55	0,21	0,51	0	-1
RPS6B	cytosol	AT5G10360	0,02	0,43	0,20	0,40	0,35	0,37	0,07	0,28	0	1
RPS7A	cytosol	AT1G48830	0,22	0,42	0,26	0,36	0,10	0,44	0,24	0,43	0	1
RPS7B	cytosol	AT3G02560	0,02	0,02	-0,04	0,05	0,04	-0,06	-0,04	-0,12	1	0
RPS7B	cytosol	AT3G02560		0,31		0,26		0,54		0,28	1	0
RPS7B	cytosol	At3g02560		0,33		0,20		0,48		0,30	1	0
RPS7C	cytosol	AT5G16130	0,20	0,30	0,28	0,22	0,03	0,55	-0,02	0,37	0	1
RPS9B	cytosol	At5g15200		0,39		0,18		0,00		-0,14	0	0
RPS9C	cytosol	At5g39850		0,78		0,61		0,59		0,60	0	1
RPSAa	cytosol	AT1G72370	-0,20	0,41	0,36	0,08	0,25	0,43	0,02	0,13	1	0
RPSAa	cytosol	AT1G72370	-0,18	0,52	0,22	0,47	0,51	0,55	0,07	0,45	1	0
RPSAb	cytosol	AT3G04770	0,21	0,21	0,30	0,03	0,06	0,22	0,02	-0,02	0	1
RPS17B	mitochondrion	AT2G05220	0,25	0,24	0,29	0,21	0,21	0,38	0,14	0,11	0	2
RPS3C	nucleus	AT5G35530	0,06	0,25	-0,13	0,10	0,40	0,30	0,06	0,15	0	1
RPS8A	nucleus	AT5G20290	0,32	0,53	0,21	0,46	0,37	0,37	-0,03	0,30	2	0
RPL1	plastid	AT3G63490	0,01	0,02	0,08	0,13	0,10	-0,11	0,03	-0,05	0	-2
RPL1	plastid	At3g63490		-0,20		-0,37		-0,20		-0,23	0	-2
RPL1	plastid	AT3G63490	-0,15	-0,28	-0,14	-0,15	-0,21	-0,15	-0,41	-0,05	0	-2
RPL10	plastid	AT5G13510	-0,26	-0,36	-0,01	-0,38	-0,28	-0,12	-0,56	-0,16	0	-1
RPL10	plastid	At5g13510		-0,35		-0,34		-0,24		-0,31	0	-1
RPL11	plastid	AT1G32990	-0,13	-0,58	0,00	-0,44	-0,53	-0,40	-0,40	-0,21	-2	-1
RPL13A	plastid	AT1G78630	-0,37	-0,55	-0,27	-0,55	-0,06	-0,32	-0,20	-0,21	-2	-2
RPL14/ HLL	plastid	ATCG00780		-0,12		-0,04		-0,14		0,15	0	-2
RPL14/ HLL	plastid	ATCG00780		0,08		0,12		-0,26		0,05	0	-2
RPL15	plastid	AT3G25920	-0,18	-0,44	0,15	-0,38	-0,29	-0,12	-0,30	-0,10	-1	-2
RPL16	plastid	ATCG00790		-0,15		-0,15		0,45		0,76	-1	-2
RPL16	plastid	ATCG00790		0,04		-0,23		-0,28		0,47	-1	-2
RPL16	plastid	ATCG00790		0,45		0,17		-0,22		0,17	-1	-2
RPL16	plastid	ATCG00790		0,53		0,21		0,27		0,44	-1	-2
RPL17	plastid	AT3G54210	-0,10	-0,19	0,22	-0,18	-0,31	-0,02	-0,09	-0,18	-1	0
RPL18N	plastid	AT1G48350	-0,16	-0,33	-0,02	-0,24	-0,15	-0,20	-0,09	-0,34	-1	1
RPL21/ CL21	plastid	AT1G35680	0,02	-0,10	0,12	-0,01	-0,03	-0,16	-0,15	0,08	-1	-1
RPL21/ CL21	plastid	AT1G35680	0,14	-0,01	0,08	0,02	-0,32	0,03	-0,26	-0,28	-1	-1
RPL22	plastid	ATCG00810		-0,46		-0,31		-0,40		0,40	-2	0
RPL24	plastid	AT5G54600	0,06	-0,01	0,05	0,00	-0,28	-0,14	-0,18	-0,08	-1	-2
RPL29	plastid	AT5G65220	-0,08	-0,07	0,04	-0,04	-0,29	0,08	0,10	0,11	0	-2
RPL31	plastid	AT1G75350	0,22	-0,35	0,02	-0,40	-0,45	-0,33	-0,17	-0,38	-1	0
RPL3related	plastid	AT2G43030	-0,20	-0,26	0,06	-0,27	-0,19	-0,53	-0,23	-0,56	-2	0
RPL4	plastid	AT1G07320	0,04	0,26	0,35	0,19	-0,12	-0,20	0,05	-0,09	0	-2

RPL5 family	plastid	AT4G01310	-0,19	-0,37	0,04	-0,29	-0,17	-0,10	-0,44	-0,12	-1	0
RPL6 /emb2394	plastid	AT1G05190	0,11	-0,69	-0,08	-0,62	-0,40	-0,36	-0,23	-0,45	-1	-2
RPL9/ CL9	plastid	AT3G44890	-0,01	-0,43	-0,04	-0,32	-0,17	-0,14	-0,26	-0,11	-1	-1
RPS1	plastid	AT5G30510	-0,16	-0,31	0,09	-0,16	-0,29	-0,17	-0,09	-0,10	-1	-1
RPS12	plastid	ATCG00160		-0,12		-0,43		0,19		0,48	0	-2
RPS12	plastid	ATCG00160		0,16		-0,04		0,84		1,24	0	-2
RPS12	plastid	ATCG00160		0,17		-0,11		1,17		1,66	0	-2
RPS13	plastid	AT5G14320	-0,11	-0,28	0,12	-0,38	-0,10	-0,16	-0,13	-0,27	-2	-2
RPS15	plastid	ATCG01120		0,27		0,26		-0,20		-0,11	-1	-1
RPS15	plastid	ATCG01120		0,38		0,38		-0,35		-0,25	-1	-1
RPS16	plastid	AT4G34620	0,36	-0,31	-0,12	-0,32	-0,26	0,04	0,13	-0,54	-1	-1
RPS17	plastid	AT1G79850	-0,18	-0,35	-0,20	-0,30	-0,15	-0,20	0,02	-0,35	-1	0
RPS18	plastid	ATCG00650		-1,29		-1,06		0,06		0,12	1	2
RPS18	plastid	ATCG00650		-0,94		-0,73		0,42		0,21	1	2
RPS20	plastid	AT3G15190	-0,23	-0,44	0,08	-0,41	-0,27	-0,24	-0,25	-0,30	0	-2
RPS20	plastid	At3g15190		0,02		0,14		0,05		-0,30	0	-2
RPS3aN	plastid	ATCG00800		-0,54		-0,25		-0,17		0,63	-2	-2
RPS3aN	plastid	ATCG00800		-0,50		-0,15		0,34		0,79	-2	-2
RPS4	plastid	ATCG00380		-0,57		0,14		-0,01		0,31	-1	-1
RPS4	plastid	ATCG00380		-0,53		0,04		-0,18		0,23	-1	-1
RPS5	plastid	AT2G33800	-0,33	-0,39	0,20	-0,44	-0,10	-0,36	-0,24	-0,53	-1	1
RPS8	plastid	ATCG00770		-0,25		-0,38		0,22		0,81	-2	0
RPS9	plastid	AT1G74970	-0,43	-0,45	-0,08	-0,31	-0,11	-0,53	-0,23	-0,53	-1	2
RPL26B	unclear	At5g67510		0,02		0,11		0,51		-0,18	0	2

Regulation of plant growth and metabolism by the TOR kinase

Thomas Dobrenel*, Chloé Marchive*, Rodnay Sormani*, Manon Moreau*, Milena Mozzo†, Marie-Hélène Montané†, Benoît Menand†, Christophe Robaglia† and Christian Meyer*¹

*Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), UMR 1318 INRA AgroParisTech, 78026 Versailles Cedex, France and †Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes, Faculté des Sciences de Luminy, 163 Avenue de Luminy, 13009 Marseille, France

Abstract

The TOR (target of rapamycin) kinase is present in nearly all eukaryotic organisms and regulates a wealth of biological processes collectively contributing to cell growth. The genome of the model plant *Arabidopsis* contains a single *TOR* gene and two *RAPTOR* (regulatory associated protein of TOR)/*KOG1* (Kontroller of growth 1) and *GβL/LST8* (G-protein β-subunit-like/lethal with Sec thirteen 8) genes but, in contrast with other organisms, plants appear to be resistant to rapamycin. Disruption of the *RAPTOR1* and *TOR* genes in *Arabidopsis* results in an early arrest of embryo development. Plants that overexpress the *TOR* mRNA accumulate more leaf and root biomass, produce more seeds and are more resistant to stress. Conversely, the down-regulation of TOR by constitutive or inducible RNAi (RNA interference) leads to a reduced organ growth, to an early senescence and to severe transcriptomic and metabolic perturbations, including accumulation of sugars and amino acids. It thus seems that plant growth is correlated to the level of TOR expression. We have also investigated the effect of reduced TOR expression on tissue organization and cell division. We suggest that, like in other eukaryotes, the plant TOR kinase could be one of the main contributors to the link between environmental cues and growth processes.

Specificity of plant development and metabolism

Plant life is profoundly shaped by variations in external conditions. Indeed, unlike animals, plants are autotrophic organisms that can use inorganic nutrient and light as food sources, but cannot move away from unfavourable environments. Therefore, to maintain cellular homeostasis, they have to adapt to a myriad of endogenous and exogenous cues originating from both biotic and abiotic stresses. Indeed plants have to cope with shortage of water, mineral nutrients in the soil and light by expressing and co-ordinating genetic programmes, which allow them to redirect energy resources and re-mobilize nutrients to specific metabolic processes or even organs. For instance, nitrogen starvation stimulates the production of new roots to forage N-rich soil patches, whereas phosphate deficiencies result in the appearance of new specialized roots capable of taking up this nutrient [1]. The rate of growth and development also has to be tightly adjusted to the availability of nutrients. Therefore growth and primary metabolism are highly connected in plants [2].

Whereas in animals the body plan is strictly determined during embryogenesis or larval development, plants have a

plastic and often undetermined growth pattern and start as simple organisms that develop new organs throughout their life. New roots, leaves and flowers all originate from unique structures called meristems that contain pluripotent stem cells [3]. The very flexible plant growth pattern allows them to adjust their development to variations in nutrition, light or temperature and implies a continuous production of new organs and a concomitant loss of older parts such as leaves through senescence and death. Therefore the way plants develop new organs during post-embryonic growth is quite different from animals, where most organs are determined during embryonic or larval life. Plant nutritional signalling is also specific since they have to cope with periods of carbon heterotrophy (in the dark or during germination) and autotrophy (in the light). Similarly, heterotrophic (sink, roots or new leaves) and autotrophic (source leaves) organs co-exist in the same organism. Furthermore, after a short period of heterotrophic growth supported by the use of starch or lipids and storage proteins deposited in seed endosperm or embryonic cotyledons, parts of the young seedlings switch to (photo)autotrophic growth. These profound metabolic changes depend on light signalling [4]. As in all other eukaryotic organisms, glucose plays a role as a central regulatory molecule in plants but, unlike heterotrophic cells, accumulation of glucose in actively photosynthesizing plant cells represses carbon accumulation, switching down many metabolic pathways [4].

Notwithstanding these profound differences in metabolism and growth mechanisms, plants such as *Arabidopsis* can also serve as model organisms for elucidating basic animal

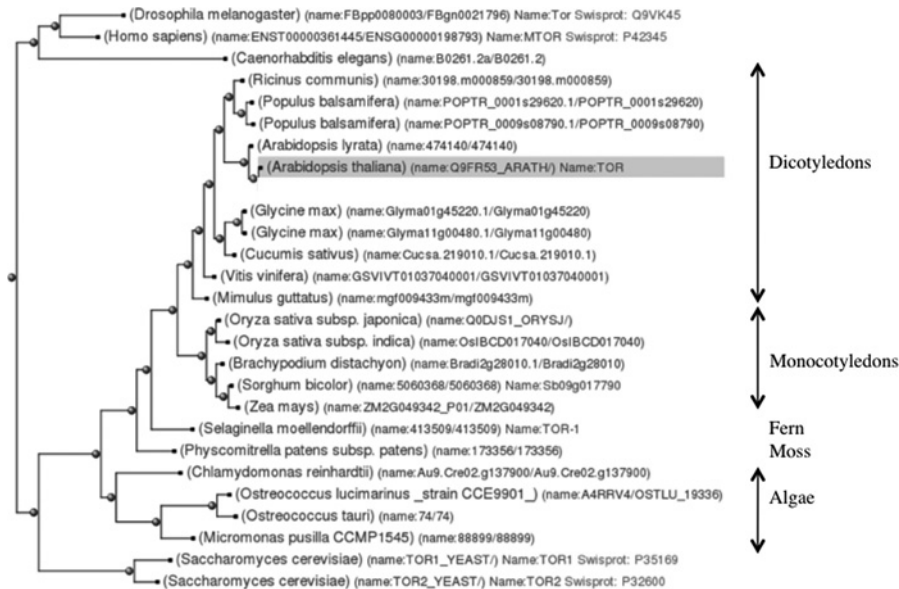
Key words: *Arabidopsis*, lethal with Sec thirteen 8 (LST8), rapamycin, regulatory associated protein of target of rapamycin (RAPTOR), sugar, target of rapamycin kinase (TOR kinase).

Abbreviations used: AMPK, AMP-activated protein kinase; FKBP12, FK506-binding protein 12; FRB, FKBP12-rapamycin-binding; HEAT, huntingtin, elongation factor 3, the PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and target of rapamycin; LST8, lethal with Sec thirteen 8; RAPTOR, regulatory associated protein of target of rapamycin; RNAi, RNA interference; S6K, S6 kinase; TAP, type 2A phosphatase-associated protein; TOR, target of rapamycin.

¹To whom correspondence should be addressed (email cmeyer@versailles.inra.fr).

Figure 1 | Phylogenetic tree showing the relationships between TOR protein sequences from photosynthetic organisms, yeast, human, *Drosophila* and *Caenorhabditis elegans*

Multiple sequence alignments were first performed on matching protein sequences and the resulting phylogenetic tree was obtained using Neighbour-joining methods and then by defining maximum likelihood (tree obtained from the Phylome database, <http://phylomedb.org> [31]).



cellular functions and even human diseases. Indeed approx. 70 % of genes implicated in cancers have clear orthologues in *Arabidopsis* which is about the same percentage than *Drosophila* or *Caenorhabditis* [5]. These basic life processes rely on signalling modules and basic cellular functions that are largely conserved among eukaryotes from yeasts or algae to multicellular animals and plants. It is therefore likely that these common bricks were used by plants during their evolution from unicellular green algae to multicellular land plants to suit their specific needs such as adaptation to light, drought or the development of specific reproductive mechanisms (flowers, seeds, etc.). One of the major and central controlling elements that is shared by all eukaryotes is the TOR (target of rapamycin) signalling pathway (see [6,7] for reviews). TOR is a large (approx. 280 kDa) protein kinase that is structurally and functionally conserved. In yeast and animal cells, the TOR kinase is engaged in at least two large protein complexes (molecular mass of approx. 2 MDa), which control a variety of processes contributing to cell growth. These complexes are probably central and conserved components of the eukaryotic cell linking the perception of nutrient availability and of favourable external conditions to cell anabolic metabolism, growth and division by recruiting and regulating the diverse TOR kinase substrates.

Plant TOR pathway

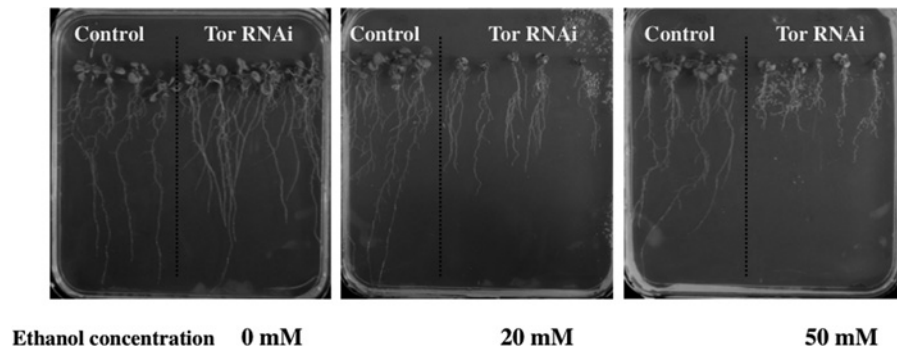
The TOR kinase has been found in nearly all eukaryotic genomes, except in some intracellular pathogens belonging

to microsporidian species [8]. Photosynthetic organisms such as the model plant *Arabidopsis* all contain at least one TOR gene (Figure 1). The *Arabidopsis* TOR protein sequence (At1g50030.1) is relatively well conserved with the sequence from yeast and animals (approx. 40 % of sequence identity; Figure 1). The kinase and FATC domains are well conserved (approx. 70 % identity), whereas the FRB [FKBP12 (FK506-binding protein 12)-rapamycin-binding] domain is less conserved. The TOR gene appeared to be expressed in all *Arabidopsis* tissues, whereas the TOR protein was mainly found in young growing tissues such as root tips or emerging leaves, suggesting a post-transcriptional regulation of TOR expression.

Surprisingly, the growth of most land plants, from mosses to angiosperms such as *Arabidopsis*, seems to be unaffected by the presence of rapamycin, even at high concentrations [9]. However, the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* is highly sensitive to rapamycin [9,10]. The lack of rapamycin effects in land plants could be due to the inability of plant FKBP12 homologues to bind rapamycin efficiently [11], since the TOR FRB domain was shown to be still capable of engaging in a ternary complex with rapamycin and either yeast [9] or human [12] FKBP12 protein. Therefore the plant TOR is clearly a rapamycin target. Accordingly it was shown that the expression of the yeast FKBP12 protein in *Arabidopsis* led to rapamycin sensitivity of root growth or polysome accumulation [13]. The molecular mechanisms by which the yeast FKBP12-rapamycin complex interferes with TOR signalling in plants remains to be elucidated.

Figure 2 | Effect on root and shoot growth of the *Arabidopsis* TOR gene inactivation by ethanol-inducible RNAi

Arabidopsis plantlets were first sown *in vitro* without ethanol, subsequently transferred to vertical agar plates and grown for 10 days with increasing ethanol concentrations.



The TOR kinase operates in at least two high molecular mass complexes named TORC1 and TORC2. Apart from the *TOR* genes, plant genomes contain genes coding for components of TORC1 such as RAPTOR (regulatory associated protein of TOR)/KOG1 (Kontroller of growth 1) and G β L/LST8 (G-protein β -subunit-like/lethal with Sec thirteen 8) [6]. An interaction between *Arabidopsis* RAPTOR and the TOR HEAT (huntingtin, elongation factor 3, the PR65/A subunit of protein phosphatase 2A and TOR) repeats was reported [12] and in *Chlamydomonas*, the LST8 protein was shown to interact with the TOR kinase domain [14]. Conversely, there is so far no evidence for the existence of a plant TORC2 complex since specific components of this complex, such as AVO1/hSIN1 or AVO3/RICTOR, seem to be absent from the genomes of photosynthetic organisms. Nevertheless, these proteins present a low degree of identity, which could make their identification in plants more difficult.

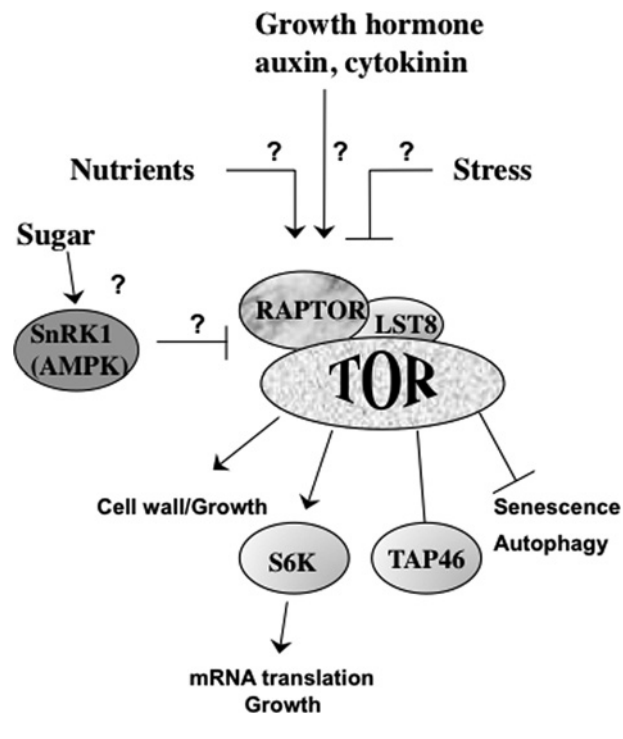
Many homologues of putative TOR regulators and substrates are detected in plant genomes. This includes TCTP (translationally controlled tumour protein [15]), RAG (Ras-related GTP-binding) proteins, PI3K (phosphoinositide 3-kinase), AMPK (AMP-activated protein kinase), LKB1 and PDK1 (phosphoinositide-dependent kinase 1). Conversely, there is so far no proof for the presence of TSC (tuberous sclerosis complex), Akt kinase or Rheb proteins (see [16] for a review). Concerning substrates, the *Arabidopsis* genome contains two S6K (S6 kinase) genes and two genes coding respectively for the PP2A phosphatase-interacting proteins TAP42 (type 2A phosphatase-associated protein 42; TAP46 in plants [17]) and TIP41 (TAP42-interacting protein 41). The S6K domain is highly conserved between plants and animals and the regulatory phosphorylation sites identified in human S6K are also present in the *Arabidopsis* sequence. *Arabidopsis* RAPTOR1 interacts with the HEAT repeats of TOR and with S6K1, activity of which is regulated in response to osmotic stress and by plant hormones [12,18]. The phosphorylation of human S6K Thr³⁸⁸/Thr³⁸⁹ is used as a marker for the TOR kinase activity. This site is conserved in plants and antibodies specific for phosphorylated human

Thr³⁸⁹ could therefore be used to follow TOR activity in plants [19].

Role of the plant TOR signalling pathway

In addition to rapamycin resistance, the mutation of the *Arabidopsis* *TOR* gene was shown to be embryo lethal [9]. This has probably hampered studies on the plant TOR signalling pathway. Nevertheless, we subsequently isolated *Arabidopsis* lines overexpressing the *TOR* gene as a consequence of insertion of T-DNA (transferred DNA) carrying strong promoters in the gene 5'-untranslated region [20]. In parallel, the ectopic expression of an RNAi (RNA interference) construct targeting the TOR FRB domain allowed the recovery of few independent *Arabidopsis* lines with a reduced TOR expression. In both cases, the level of TOR expression was found to be well correlated with the size of the plants and with resistance to osmotic or salt stress [20]. This represents one of the few studies investigating the impact of variations in TOR expression on the overall size of a multicellular organism. It was also recently reported that inactivation of TOR expression by constitutive RNAi activated autophagic processes, as described in other eukaryotes [21]. Furthermore, the use of conditional silencing of the *Arabidopsis* *TOR* gene led to much more severe phenotype with a halt in plant leaf and root growth (Figure 2) accompanied by yellowing of leaves linked to chlorophyll breakdown and premature senescence [20]. These plants also accumulated very high amounts of soluble sugars, amino acids and starch while showing induction of genes such as glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase involved in leaf senescence and nutrient remobilization. This suggests that TOR activity is needed to restrain senescence and nutrient recycling and that the TOR signalling pathway could play a central regulatory role in the control of these processes. *Arabidopsis* plants silenced for TOR expression also displayed a significant reduction in polysome abundance [20]. Inducible TOR RNAi lines were then subjected to transcriptome analysis.

Figure 3 | A tentative model of the plant TOR signalling pathway
SnRK1, Snf1-related kinase 1.



A strong induction of genes involved in stress responses was observed. Conversely, genes that were repressed upon TOR inactivation are related to the modification of the cell wall and to the signalling pathways of plant hormones like auxin and gibberellic acid. Interestingly, reduction in the TOR kinase activity was recently linked to modifications in the *Arabidopsis* root hair cell wall [22]. Indeed a screen for suppressors of the *Arabidopsis* *lrx1* mutation affecting the development of root hairs identified the *Rol5* gene that is homologous to yeast NCS6. This gene has been shown to be involved in uridine thiolation of some tRNAs and its mutation confers rapamycin hypersensitivity in yeast [23]. Accordingly, rapamycin treatment of *Arabidopsis* plants expressing the yeast FKBP12 protein also reverted the *lrx1* phenotype. Therefore both *rol5* mutations and reduction in TOR activity similarly impacted on cell wall composition and on plant responses to oxidative stress [22].

Mutations of the most expressed *RAPTOR* gene in *Arabidopsis* (At3g08850) resulted in early embryonic growth arrest or in slow growth depending on the culture conditions [24,25]. *RAPTOR* was shown to be phosphorylated by an AMPK activity in animal cells on two conserved serine residues [26]. One of them, Ser⁷⁹², is conserved in the *Arabidopsis* *RAPTOR* protein sequence. It remains to be determined whether this serine residue is also a target of the plant homologues of AMPK (called SnrKs, Snf1-related kinases), which are known to mediate a large part of stress responses in *Arabidopsis* [27].

As stated above, several well-documented TOR substrates such as the ribosomal S6K, the repressor of RNA polymerase

III transcription MAF1 or the TAP42/TAP46 proteins exist in higher plants. It was shown that the overexpression of lily S6K1 resulted in male sterility in transformed *Arabidopsis* [28]. Moreover, a decrease in *Arabidopsis* S6K expression led to an increase in ploidy, phenotypic instability and alterations in fertility. It was also found that S6K1 associates with the RBR1 (retinoblastoma-related 1)-E2FB regulating E2F-dependent expression of cell-cycle genes [29].

The TOR signalling pathway also seems to be important for interactions between plants and pathogenic fungi. Indeed in the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum*, inactivation of the TOR kinase by nitrogen deficiency appears to be linked with virulence and plant infection [30].

Conclusions

The existence of a TOR signalling pathway in all eukaryotic photosynthetic organisms, from unicellular green algae to land plants is now indubitable (Figure 3). Whereas the occurrence of a TORC2 complex in plants remains to be determined, the presence of a conserved TORC1 complex, with the TOR, *RAPTOR* and *LST8* proteins, has been clearly proven in both algae and higher plants such as *Arabidopsis*. This TOR complex has important roles in regulating growth, mRNA translation, autophagy, cell wall formation and metabolism but it can be expected that most of the biological outputs, substrates and regulators of the plant TOR signalling pathway are still to be discovered.

Acknowledgements

We thank Jean-Christophe Palauqui, Patrick Laufs, Jean-Denis Faure and Hoai-Nam Truong for helpful discussions.

Funding

This work was partly supported by Agence Nationale de la Recherche [grant numbers ANR Blanc06-3-135436 (to C. Meyer, R.S. and C.R.) and ANR-08-JCJC-0054-01 (to B.M. and M. Mozzo)]. C. Marchive was supported by a joint programme between Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), and M. Moreau was supported by INRA and Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA).

References

- Desnos, T. (2008) Root branching responses to phosphate and nitrate. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**, 82–87
- Sulpice, R., Trenkamp, S., Steinfath, M., Usadel, B., Gibon, Y., Witucka-Wall, H., Pyl, E., Tschoep, H., Steinhäuser, M., Guenther, M. et al. (2010) Network analysis of enzyme activities and metabolite levels and their relationship to biomass in a large panel of *Arabidopsis* accessions. *Plant Cell* **22**, 2872–2893
- Veit, B. (2006) Stem cell signalling networks in plants. *Plant Mol. Biol.* **60**, 793–810

- 4 Rook, F., Hadingham, S., Li, Y. and Bevan, M. (2006) Sugar and ABA response pathways and the control of gene expression. *Plant Cell Environ.* **29**, 426–434
- 5 Jones, A., Chory, J., Dangel, J., Estelle, M., Jacobsen, S., Meyerowitz, E., Nordborg, M. and Weigel, D. (2008) The impact of *Arabidopsis* on human health: diversifying our portfolio. *Cell* **133**, 939–943
- 6 Wullschlegel, S., Loewith, R. and Hall, M. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484
- 7 Soulard, A., Cohen, A. and Hall, M. (2009) TOR signaling in invertebrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**, 825–836
- 8 Shertz, C., Bastidas, R., Li, W., Heitman, J. and Cardenas, M. (2010) Conservation, duplication, and loss of the Tor signaling pathway in the fungal kingdom. *BMC Genomics* **11**, 510
- 9 Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C. and Robaglia, C. (2002) Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 6422–6427
- 10 Crespo, J., Díaz-Troya, S. and Florencio, F. (2005) Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **139**, 1736–1749
- 11 Xu, Q., Liang, S., Kudla, J. and Luan, S. (1998) Molecular characterization of a plant FKBP12 that does not mediate action of FK506 and rapamycin. *Plant J.* **15**, 511–519
- 12 Mahfouz, M., Kim, S., Delauney, A. and Verma, D. (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
- 13 Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C. and Robaglia, C. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* **7**, 26
- 14 Díaz-Troya, S., Florencio, F. and Crespo, J. (2008) Target of rapamycin and LST8 proteins associate with membranes from the endoplasmic reticulum in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* **7**, 212–222
- 15 Brioude, F., Thierry, A., Chambrier, P., Mollereau, B. and Bendahmane, M. (2010) Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**, 16384–16389
- 16 Moreau, M., Sormani, R., Menand, B., Veit, B., Robaglia, C. and Meyer, C. (2010) The TOR complex and signaling pathway in plants. *Enzymes* **27**, 285–302
- 17 Harris, D., Myrick, T. and Rundle, S. (1999) The *Arabidopsis* homolog of yeast TAP42 and mammalian $\alpha 4$ binds to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A and is induced by chilling. *Plant Physiol.* **121**, 609–617
- 18 Turck, F., Zilbermann, F., Kozma, S., Thomas, G. and Nagy, F. (2004) Phytohormones participate in an S6 kinase signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **134**, 1527–1535
- 19 Hong, Y., Pan, X., Welti, R. and Wang, X. (2008) Phospholipase D $\alpha 3$ is involved in the hyperosmotic response in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**, 803–816
- 20 Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C. and Meyer, C. (2007) The *Arabidopsis* TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* **8**, 864–870
- 21 Liu, Y. and Bassham, D. (2010) TOR is a negative regulator of autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **5**, e11883
- 22 Leiber, R., John, F., Verhertbruggen, Y., Diet, A., Knox, J. and Ringli, C. (2010) The TOR pathway modulates the structure of cell walls in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 1898–1908
- 23 Noma, A., Sakaguchi, Y. and Suzuki, T. (2009) Mechanistic characterization of the sulfur-relay system for eukaryotic 2-thiouridine biogenesis at tRNA wobble positions. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1335–1352
- 24 Deprost, D., Truong, H., Robaglia, C. and Meyer, C. (2005) An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**, 844–850
- 25 Anderson, G. and Hanson, M. (2005) The *Arabidopsis* Mei2 homologue AML1 binds AtRaptor1B, the plant homologue of a major regulator of eukaryotic cell growth. *BMC Plant Biol.* **5**, 2
- 26 Gwinn, D., Shackelford, D., Egan, D., Mihaylova, M., Mery, A., Vasquez, D., Turk, B. and Shaw, R. (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* **30**, 214–226
- 27 Baena-González, E. and Sheen, J. (2008) Convergent energy and stress signaling. *Trends Plant Sci.* **13**, 474–482
- 28 Tzeng, T., Kong, L., Chen, C., Shaw, C. and Yang, C. (2009) Overexpression of the lily p70^{SK} 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
- 29 Henriques, R., Magyar, Z., Monardes, A., Khan, S., Zaleski, C., Orellana, J., Szabados, L., de la Torre, C., Koncz, C. and Bögre, L. (2010) *Arabidopsis* S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1–E2F pathway activity. *EMBO J.* **29**, 2979–2993
- 30 López-Berges, M.S., Rispaill, N., Prados-Rosales, R.C. and Di Pietro, A. (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell* **22**, 2459–2475
- 31 Huerta-Cepas, J., Bueno, A., Dopazo, J. and Gabaldón, T. (2008) PhylomeDB: a database for genome-wide collections of gene phylogenies. *Nucleic Acids Res.* **36**, D491–D496

Received 8 November 2010
doi:10.1042/BST0390477

Etude de la voie de signalisation et du complexe TOR (Target Of Rapamycin) chez *Arabidopsis*

Résumé

La protéine kinase TOR (Target Of Rapamycin) a été identifiée chez la levure et les mammifères comme participant à deux complexes protéiques qui servent de carrefour entre la perception des facteurs endogènes et exogènes et la stimulation de la croissance cellulaire. Depuis la découverte de la kinase AtTOR chez *Arabidopsis thaliana*, des études ont été menées afin de mieux caractériser son rôle chez les plantes et l'influence de son niveau d'expression sur la régulation du métabolisme et du développement.

Au cours de ce travail, j'ai contribué à l'étude de cette kinase en étudiant l'influence de l'inactivation de TOR sur la composition du ribosome au niveau protéique et sur le niveau de phosphorylation de ces protéines, ainsi que sur l'organisation du méristème au niveau moléculaire et cytotologique.

Au cours de cette étude, j'ai montré que certaines protéines constitutives du ribosome pourraient être des cibles de l'activité TOR au niveau de leur abondance et/ou de leur état de phosphorylation. Ainsi, l'inactivation de TOR entraîne une diminution du niveau de phosphorylation des protéines RPS6 et pourrait influencer l'abondance des protéines acides constitutives du stalk ribosomal, une structure importante dans la régulation de la traduction. Les résultats obtenus suggèrent également que l'activité TOR est nécessaire au maintien du méristème à l'état fonctionnel en régulant les voies importantes contrôlant la division et la différenciation au sein de cette structure.

Study of the TOR (Target Of Rapamycin) complex and signaling pathway in *Arabidopsis*

Summary

The TOR (Target Of Rapamycin) kinase has first been identified in yeast and mammals as being part of two different protein complexes that are implicated in the stimulation of cell growth in response to endogenous and exogenous stimuli. Since the discovery of this kinase in *Arabidopsis*, many studies have been conducted to characterize its role in plants and the influence of its expression level on the regulation of metabolism and development.

In this study, I investigated the influence of TOR inactivation on the protein composition of the ribosome and on the phosphorylation status of these proteins. The role of TOR in the organisation of the meristem at molecular and cellular levels has also been addressed.

I thus showed that TOR might regulate the abundance and/or the phosphorylation status of some ribosomal proteins. Indeed TOR inactivation leads to a decrease in the phosphorylation level of RPS6 proteins and could regulate the abundance of the acidic proteins involved in the ribosomal stalk, an important structure for the regulation of mRNA translation. The results obtained during this work also suggest that TOR activity may be necessary to maintain the functions of the meristem by the regulation of the main pathways controlling division and differentiation in this structure.