



HAL
open science

Caractérisation d'un rôle inédit de la glycolyse : contrôle du senseur du glucose et de la voie de la signalisation du glucose chez la levure *Kluyveromyces lactis*

Amélie Cairey-Remonnay

► To cite this version:

Amélie Cairey-Remonnay. Caractérisation d'un rôle inédit de la glycolyse : contrôle du senseur du glucose et de la voie de la signalisation du glucose chez la levure *Kluyveromyces lactis*. Microbiologie et Parasitologie. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10253 . tel-01128204

HAL Id: tel-01128204

<https://theses.hal.science/tel-01128204>

Submitted on 9 Mar 2015

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.

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

ÉCOLE DOCTORALE E2M2

Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité: Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

DIPLÔME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 28 novembre 2014 par

Amélie Cairey-Remonnay

Caractérisation d'un rôle inédit de la glycolyse : contrôle du senseur du glucose et de la voie de la signalisation du glucose chez la levure *Kluyveromyces lactis*

Jury:

Rapporteurs : M. Michele BIANCHI, *Professeur Sapienza Università di Roma*
Mme. Anne DEVIN, *Directeur de Recherche Université Bordeaux Segalen*
M. Sébastien LEON, *Chargé de Recherche Université Paris Diderot*

Examineurs : M. Christophe BRUEL, *Professeur Université Lyon I*

Directeur de thèse : M. Marc LEMAIRE, *Professeur Université Lyon I*
M. Alexandre SOULARD, *Maître de Conférence Université Lyon I*

Président de l'Université
Vice-président du Conseil d'Administration
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire
Vice-président du Conseil Scientifique
Directeur Général des Services

M. François-Noël GILLY
M. le Professeur Hamda BEN HADID
M. le Professeur Philippe LALLE
M. le Professeur Germain GILLET
M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux
Faculté d'Odontologie
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies
Département Biologie
Département Chimie Biochimie
Département GEP
Département Informatique
Département Mathématiques
Département Mécanique
Département Physique
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon
Polytech Lyon
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education
Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI
Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Directeur : Mme Caroline FELIX
Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Directeur : M. Georges TOMANOV
Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Directeur : M. Jean-Claude PLENET
Directeur : M. Y. VANPOULLE
Directeur : M. B. GUIDERDONI
Directeur : M. P. FOURNIER
Directeur : M. G. PIGNAULT
Directeur : M. C. VITON
Directeur : M. A. MOUGNIOTTE
Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les rapporteurs, Anne Devin, Michele Bianchi et Sébastien Leon, qui ont accepté d'évaluer ce travail de doctorat. Merci également à Christophe Bruel qui a accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Merci à Marc qui m'a donné la chance de pouvoir réaliser cette thèse au sein de son équipe. Merci de m'avoir fait confiance dès le départ. Merci aussi pour les conseils toujours avisés et les petites astuces de laboratoire.

Un grand merci à Alexandre qui m'a encadrée tout au long de cette thèse. J'ai apprécié pendant ces trois ans ta grande disponibilité, ta passion et ta curiosité scientifique ainsi que ton expertise en Western blot ! Les nombreuses réunions que nous avons pu faire étaient toujours fructueuses et motivantes. (et puis sur un plan moins professionnel, tu contribues toi aussi à la bonne ambiance au 2^{ème} étage, c'est quand même toi qui a instauré le café croissant du jeudi !)

Je souhaiterais remercier tous les membres de l'équipe « levures » ; tout d'abord Julien D. pour l'aide précieuse que tu m'as apportée à la paillasse, entre construction de souches et Western en séries. Un grand merci à Claire pour tous les milieux que tu as pu me préparer et ta gentillesse au quotidien. Merci également à Pascale, j'ai beaucoup apprécié échanger avec toi, que ce soit scientifique ou pas du tout. Merci à Cécile, qui nous a rejoints il y a maintenant un peu plus d'un an, pour sa présence agréable. Merci à Micheline, qui profite maintenant de sa retraite. Merci à Paul Chameroy que j'ai encadré pour un stage de M1 et qui a fait avancer mon projet à la paillasse.

Merci à tous les membres du MAP qui ont pu m'aider de près ou de loin au cours de ces trois années de thèse. Un merci particulier pour l'équipe de secrétaires et leur aide lors des démarches administratives.

Je tiens à remercier Jean Marie François du LISBP à Toulouse pour la collaboration pour l'analyse métabolomique. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire pendant 15 jours en octobre 2013. Un grand merci également à Amélie Vax qui a terminé la préparation des échantillons et qui a réalisé toute l'analyse de mes centaines d'échantillon en HPLC ainsi que le traitement des données. Merci à Marjorie Petitjean et Marie-Ange Teste qui m'ont accueilli dans le laboratoire à Toulouse et m'ont aidé dans mon installation les premiers jours.

Je souhaiterais également remercier les membres de mon comité de pilotage, Cécile Fairhead de l'université Paris Sud, Gaël Yvert de l'ENS-Lyon et Jean Marie François de l'INSA de Toulouse qui ont accepté de suivre l'évolution de cette thèse et m'ont donné des conseils pertinents pour son bon déroulement. Merci également à Karen Moreau, ma tutrice de l'école doctorale, qui a assisté aux comités de pilotage et a suivi le déroulement de cette thèse.

Je souhaiterais remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées au cours de ces trois années :

Tout d'abord, un grand merci aux nombreux occupants du bureau qui sont restés ou se sont succédés, et ont contribué à la bonne ambiance qui y règne. Je commence par ceux qui sont partis vers d'autres horizons : Sana, c'était vraiment très agréable de travailler avec toi, mais aussi de partager de bons moments en dehors du labo. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite. Géraldine, j'ai beaucoup apprécié discuter avec toi. L'horizon du 4^{ème} étage n'est pas si loin, j'espère te revoir avant mon départ du laboratoire et je te souhaite également le meilleur pour la suite. J'ai également beaucoup apprécié travaillé avec Daniela et Elsa, même si elles n'ont pas été présentes très longtemps. Pour ceux qui sont encore là, il y a Kevin et Julien C., alias Bobby et Billy, ou Billy et

Bobby, je m'y perds un peu ! Vous avez largement contribué à la bonne ambiance dans ce bureau. Kévin, tu commences quand je finis, bon courage pour les 3 années qui t'attendent. Julien, j'espère que tu trouveras rapidement un poste au moins aussi bien ! Et puis il y a Manon, qui était là quand je suis arrivée et qui sera encore un peu là quand je partirai (dit comme ça, on dirait presque un vieux meuble...) Heureusement que tu étais là pour partager toutes les étapes d'une thèse avec moi, et surtout pendant les mois de rédaction. Ta soutenance suit la mienne, je suis sûre que tu t'en sortiras très bien. J'espère aussi que tu trouveras un post-doc dans la montagne de tes rêves !

Merci à tous les occupants du 2^{ème} étage que j'ai apprécié de côtoyer tous les jours, pour une pause croissant du jeudi ou un repas du midi, et notamment à tous les membres de l'équipe bactéries et métaux : Marie-Andrée, Agnès et Erwan en plus de ceux qui ont partagé mon bureau.

Merci aux MAPIens pour les discussions de couloir : Magali, Camille P., Elodie, Natasha, Camille V., Benjamin, Florence, et j'en oublie certainement.

En dehors du labo, je souhaite d'abord remercier ma famille. D'abord mes parents, qui m'ont donné le goût du travail et m'ont soutenu au long de ces 3 années. Ensuite, mes frères, Augustin, Emmanuel et Antoine. Promis, maintenant j'arrête de bosser quand je viens à la maison. Merci également à mes grands-parents, mes oncles et mes tantes, mes cousins qui m'ont toujours entouré.

Merci à la famille de Thomas, qui m'a toujours très bien accueilli. J'ai beaucoup apprécié les journées de marche en montagne suivies par des repas à parler de recherche avec vous.

Merci à mes amis, qui m'ont soutenu et changé les idées pendant ces années.

Lucile, un jour on devrait compter le nombre de mots (toujours très recherchés !) échangés par chat ou mail depuis qu'on sait se servir d'internet... Toi aussi t'as jugé que faire une thèse était une excellente idée, je te souhaite bien du courage pour la terminer ! Et puis maintenant j'aurai peut-être un peu plus de temps pour venir voir les aurores boréales chez toi !

Merci à la meute, Anaïs, Aurore, Caro, Claire, Clara, Héloïse, Manue et Morgane. Vivement le prochain week-end avec vous ! Bon, je vous souhaite de nombreux gâteaux au chocolat pour les années à venir, des virées à droite à gauche (à l'autre bout du monde, qui sait ?), et peut-être même des petits louvetaux.

Merci aux G-stars, même si on s'est trop peu vu pendant ces trois ans (heureusement qu'il y avait le mariage de Julie !) J'espère bien qu'on va se rattraper par la suite ! Bon courage à Clémence et Seb qui finissent leur thèse, et bonne chance pour la suite aux autres.

Enfin, merci à Thomas pour son soutien pendant ces années. C'est trop gentil à toi d'avoir absolument tenu à m'attendre pour finir à ton tour ;) Et vivement l'après-thèse, et de nouveaux projets tous les deux.

Résumé

Chez les levures, organismes eucaryotes unicellulaires, le glucose est la source d'énergie préférée. La levure modèle *Kluyveromyces lactis* possède deux perméases au glucose. L'expression d'une de ces deux perméases, codée par le gène *RAG1*, est induite par la présence de glucose extracellulaire et cette régulation transcriptionnelle dépend de la détection du glucose par un senseur membranaire spécifique, Rag4. Cependant, la régulation de l'expression de *RAG1* dépend également de la capacité des cellules à métaboliser le glucose via la glycolyse. En effet, l'expression de *RAG1* est fortement affectée dans des mutants glycolytiques malgré la présence de glucose extracellulaire. Au cours de cette thèse, nous nous sommes attachés à déterminer les mécanismes via lesquels la glycolyse contrôle l'expression de *RAG1*.

Grâce à l'utilisation de mutants glycolytiques ou d'inhibiteurs chimiques de la glycolyse chez *K. lactis*, nous avons démontré que la glycolyse régule la stabilité du senseur Rag4 à la membrane plasmique et contrôle ainsi la voie de signalisation du glucose et l'expression de *RAG1*. De plus, ce mécanisme de contrôle est conservé chez la levure modèle *Saccharomyces cerevisiae*.

L'étude plus approfondie de Rag4 nous a permis de déterminer que la transmission du signal glucose requiert la queue C-terminale cytoplasmique de Rag4, qui sert de plateforme d'interaction protéique. La caractérisation fonctionnelle de Rag4 nous a permis de mettre en évidence que la protéine contient plusieurs domaines impliqués dans le contrôle de sa stabilité en fonction du type de signal induisant la déstabilisation: signal glycolytique ou changement de source de carbone.

Enfin, la nature du signal issu de la glycolyse qui cible le senseur membranaire Rag4 a été étudiée en testant deux hypothèses : le signal est protéique (enzyme de la glycolyse) ou métabolique (métabolite intermédiaire de la glycolyse).

Ces travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un rôle inédit de la glycolyse dans le contrôle de la stabilité des senseurs membranaires du glucose chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae*.

Mots-clés :

glucose, glycolyse, levure, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, senseur du glucose, signalisation du glucose

Summary

Yeasts are unicellular eukaryotic organisms which prefer glucose as energy source. The yeast model *Kluyveromyces lactis* has two glucose permeases. The expression of one of its permeases, *RAG1*, is induced by extracellular glucose. The glucose signaling pathway responsible for *RAG1* expression regulation is dependent upon glucose sensing through a specific membrane glucose sensor, Rag4. However, *RAG1* expression is also dependent upon glucose metabolism by glycolysis. Indeed, in glycolytic mutants *RAG1* expression is strongly affected even when glucose is present. During these doctoral studies, we characterized mechanisms involved in glycolytic control on glucose signaling.

Using glycolytic mutant or glycolysis chemical inhibitors, we have demonstrated that, in *K. lactis*, glycolysis targets the stability of the glucose sensor Rag4, controlling glucose signaling and *RAG1* expression. This glycolytic control appears to be conserved in the yeast model *Saccharomyces cerevisiae*.

We have shown that the C-terminal cytoplasmic tail of glucose sensor Rag4 is necessary for glucose signaling and forms a protein interaction platform. Rag4 protein contains several domains controlling Rag4 stability in response to different destabilization signals: glycolytic signal or carbon source signal.

Finally, the nature of the glycolytic signal was studied considering two hypotheses: protein nature (e.g. glycolytic enzyme) or metabolic nature (e.g. glycolysis metabolic intermediate).

This doctoral thesis underlines a new role of glycolysis in controlling membrane glucose sensor stability in *K. lactis* and *S. cerevisiae*.

Keywords:

glucose, glycolysis, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae*, glucose sensor, glucose signaling

Abbreviations

2DG	2-déoxyglucose
3BrPA	3-bromopyruvate
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AMP	adénosine monophosphate
AMPC	adénosine monophosphate cyclique
ATP	adénosine triphosphate
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
DTT	dithiothréitol
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
HPLC	chromatographie à haute performance en phase liquide
IA	iodoacétate
IP	immunoprécipitation
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
KCl	chlorure de potassium
MOPS	acide 3-(N-morpholino) propane sulfonique
NaCl	chlorure de sodium
NAD	nicotinamide adénine dinucléotide
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NaF	fluorure de sodium
NP-40	nonyl phénoxy polyéthoxyléthanol
PCR	réaction de polymérase en chaîne
PMSF	fluorure de phénylméthylsulfonyle
qRT-PCR	réaction quantitative de polymérase en chaîne après transcription réverse
SDS	dodécylsulfate de sodium = laurylsulfate de sodium
SG	milieu minimum synthétique glucose
SGal	milieu minimum synthétique galactose
Sgly	milieu minimum synthétique glycérol
Slactate	milieu minimum synthétique lactate
TCA	acide trichloroacétique
TEMED	tétraméthyléthylènediamine
UV	rayonnement ultra-violet
v/v	pourcentage volume/volume
w/v	pourcentage poids/volume
WB	Western blot
YPG	milieu riche glucose
YPGal	milieu riche galactose
YPgly	milieu riche glycérol
YPlactate	milieu riche lactate

Sommaire

I. Contexte bibliographique	13
1. Le glucose, source d'énergie favorite des organismes vivants.....	15
2. Le transport du glucose.....	17
2. a. Les différents types de transporteurs du glucose	17
2. b. Deux modèles levures pour l'étude de la régulation du transport du glucose : <i>Kluyveromyces lactis</i> et <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	19
2. c. Les perméases au glucose chez les levures	23
2. d. La régulation transcriptionnelle des gènes des perméases au glucose de faible affinité	25
2. e. La régulation de la stabilité membranaire des perméases au glucose	35
3. Les voies de signalisation du glucose et de contrôle de l'expression des gènes des perméases au glucose chez les levures.....	38
3. a. La voie de signalisation du glucose dépendante des senseurs Rgt2/Snf3/Rag4 ..	38
3. b. Les autres voies de signalisation du glucose	49
3. c. Les autres voies de signalisation qui affectent l'expression des perméases au glucose chez les levures	57
4. La glycolyse chez les levures	59
4. a. Le métabolisme du glucose par la glycolyse et sa régulation chez les levures.....	59
4. b. Quelques différences concernant le métabolisme du glucose chez <i>S. cerevisiae</i> et <i>K. lactis</i>	62
4. c. Le contrôle de la glycolyse chez les levures	64
4. d. Les inhibiteurs chimiques de la glycolyse chez les levures	71
4. e. La glycolyse comme régulateur de voies de signalisation.....	75
4. f. Contrôle de la signalisation du glucose par la glycolyse chez les levures.....	79
II. Objectifs des travaux de thèse	81
III. Résultats.....	85
Chapitre 1 : Analyse fonctionnelle des mécanismes de régulation de la voie de signalisation du glucose par la glycolyse chez les levures.....	87
1. Introduction et résumé de la publication	87
2. Publication Cairey-Remonnay et al., 2014.....	89
3. Résultats complémentaires	112

3. a. Etude de la signalisation du glucose dans des mutants glycolytiques chez <i>K. lactis</i>	112
3. b. Utilisation d'inhibiteurs chimiques de la glycolyse chez <i>K. lactis</i>	121
3. c. Contrôle de la signalisation du glucose par la glycolyse chez <i>S. cerevisiae</i>	131
4. Contrôle de la glycolyse sur la signalisation et les senseurs du glucose chez les levures <i>K. lactis</i> et <i>S. cerevisiae</i> : discussion, conclusions et perspectives	137
Chapitre 2 : Etude du senseur du glucose Rag4 chez <i>K. lactis</i> : la queue cytoplasmique C-terminale est impliquée à la fois dans la signalisation du glucose et le contrôle de la stabilité de la protéine	
1. Etude de la séquence de Rag4 : prédiction bioinformatique des domaines transmembranaires et cytoplasmiques	142
2. Rôle et fonctionnement de la queue C-terminale du senseur du glucose Rag4 dans la signalisation du glucose	143
2. a. Importance de la queue C-terminale cytoplasmique du senseur du glucose Rag4 dans la signalisation du glucose	144
2. b. Interaction physique et fonctionnelle de la queue C-terminale du senseur du glucose Rag4 avec la caséine kinase de type I Rag8	148
2. c. Rôle de la queue C-terminale cytoplasmique du senseur du glucose Rag4 dans la signalisation du glucose - Conclusions	151
3. Contrôle de la stabilité du senseur du glucose Rag4 : conditions, domaines requis et mécanismes mis en jeu	152
3. a. Stabilité du senseur du glucose en fonction de la source de carbone.....	153
3. b. Stabilité de mutants de la queue C-terminale	156
3. c. Mécanismes et domaines protéiques impliqués dans la déstabilisation de Rag4	158
3. d. Conditions et domaines impliqués dans la régulation de la stabilité de Rag4 – Conclusions.....	168
4. Stabilité, dégradation et fonctionnalité du senseur du glucose Rag4. Conclusions, discussions et perspectives.....	169
Chapitre 3 : Nature du signal glycolytique qui contrôle la voie de signalisation du glucose	
1. Hypothèse protéique du signal issu de la glycolyse et contrôlant la signalisation du glucose	178
1. a. Observation de la localisation cellulaire de l'hexokinase <i>K/Hxk</i>	178
1. b. Implication de <i>K/Hxk</i> dans la signalisation du glucose : interaction avec <i>K/Rgt1</i>	179

2. Hypothèse métabolique du signal issu de la glycolyse qui contrôle la signalisation du glucose	180
2. a. Mesure de l'ATP dans différents mutants glycolytiques en présence de glucose	180
2. b. Analyse métabolomique des dérivés de la glycolyse par chromatographie liquide	182
3. Nature du signal glycolytique qui régule la stabilité du senseur du glucose Rag4 chez <i>K. lactis</i> : discussion, conclusions et perspectives	194
IV. Conclusion, discussion et perspectives générales	199
V. Matériels et Méthodes.....	211
1. Souches et conditions de culture.....	213
1. a. Les levures	213
1. b. Les bactéries.....	214
2. Méthodes de génétique et de biologie moléculaire.....	214
2. a. Construction de souches de levures.....	214
2. b. Construction de plasmides.....	215
2. c. Transformation	216
2. d. Manipulation des acides nucléiques	217
2. e. qRT-PCR : PCR quantitative après transcription réverse.....	218
2. f. Mesure de l'activité d'un promoteur grâce à une construction reportrice	220
3. Méthodes biochimiques	220
3. a. Extractions protéiques.....	220
3. b. Analyse de protéines par Western blot	225
3. c. Essai kinase	227
4. Méthodes cellulaires : microscopie à fluorescence.....	228
5. Méthodes d'analyse métabolomique	228
5. a. Détermination de la corrélation $DO_{600\text{ nm}}$ /nombre de cellules et $DO_{600\text{ nm}}$ /masse sèche pour les souches de levure <i>K. lactis</i>	229
5. b. Mesure de la quantité d'ATP cellulaire	229
5. c. Analyse des métabolites issus de la glycolyse par HPLC	230
VI. Annexes	231
VII. Communications	257
VIII. Références	263

I. Contexte bibliographique

1. Le glucose, source d'énergie favorite des organismes vivants

Le glucose (Figure 1) est la source d'énergie préférée pour les cellules de la majorité des organismes vivants. Dans les plantes, le glucose est produit par photosynthèse. Chez les animaux, le glucose provient des glucides (mono- et di-saccharides, amidon) digérés dans l'intestin, ou de l'hydrolyse du glycogène dans le foie. Chez les microorganismes, le glucose est soit prélevé directement dans l'environnement, soit issu de l'hydrolyse de sucres plus complexes (lactose, maltose, saccharose). Il peut aussi provenir de l'hydrolyse de di- ou polysaccharides de réserve (tréhalose, glycogène) ou être synthétisé par néoglucogenèse grâce à d'autres sources de carbone (acides aminés par exemple).

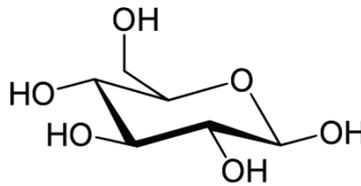
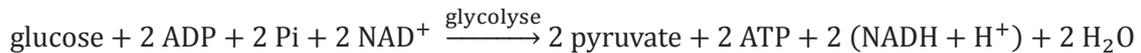


Figure 1: La molécule de glucose, $C_6H_{12}O_6$.

Le glucose est métabolisé par les cellules vivantes grâce à la glycolyse pour générer de l'ATP et de la biomasse. Le fructose est un autre hexose qui est métabolisé par la glycolyse et, comme le glucose, il se trouve naturellement dans les fruits. La glycolyse a lieu dans le cytoplasme des cellules et permet de transformer une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate. La glycolyse permet de convertir deux molécules d'ADP en ATP, et deux molécules de NAD^+ en NADH, selon la formule suivante :



Après la glycolyse, le pyruvate est transformé soit en CO_2 en condition d'aérobie par la respiration, soit en acide lactique ou en éthanol en condition d'anaérobie par la fermentation (Figure 2). La respiration et la fermentation permettent de régénérer le NAD^+ utilisé par la glycolyse. La respiration cellulaire a lieu dans la mitochondrie et comprend plusieurs étapes :

- La synthèse d'acétyl-CoA à partir de pyruvate, qui a lieu dans la matrice mitochondriale.
- Le cycle de l'acide citrique ou cycle de Krebs, dans lequel l'acétyl-CoA est dégradé en CO_2 .
- La phosphorylation oxydative, qui est un ensemble de réactions constituée de la chaîne respiratoire et de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Les enzymes de la chaîne respiratoire sont retrouvées dans la membrane interne des mitochondries (crêtes mitochondriales). Le rôle de la phosphorylation oxydative est d'oxyder le NADH produit par la glycolyse et le cycle de Krebs, et de générer de l'ATP.

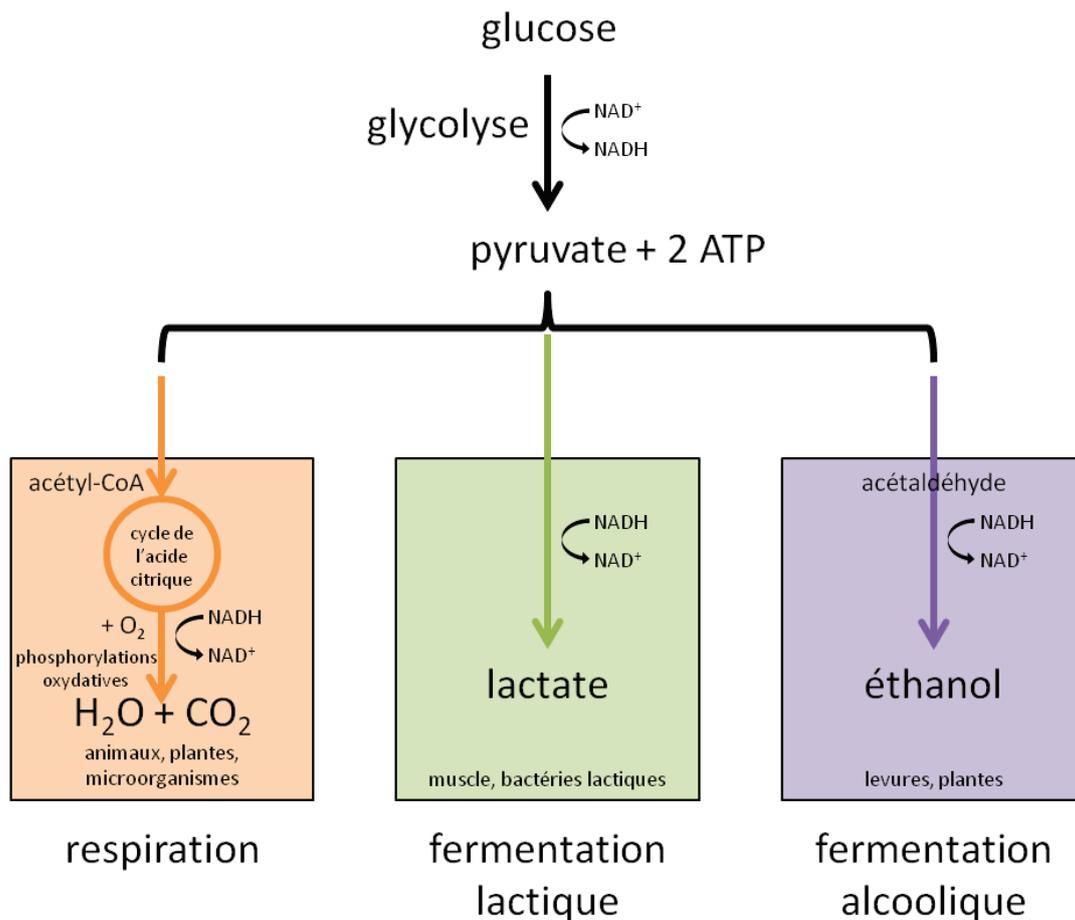


Figure 2: Devenir du glucose dans la cellule

Lorsqu'il est présent dans le milieu extérieur, le glucose doit être détecté et transporté à l'intérieur de la cellule avant d'être métabolisé par la glycolyse. La détection extracellulaire et la transmission du signal glucose dans la cellule sont appelées signalisation du glucose et celle-ci aboutit, entre autre, à l'activation de l'expression des gènes codant pour des transporteurs du glucose. La signalisation du glucose permet aux cellules d'adapter le transport du glucose extracellulaire à la concentration de ce dernier dans l'environnement et d'optimiser ainsi leur métabolisme et leur croissance.

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes intéressés à la régulation du transport du glucose chez les levures, qui constituent des modèles expérimentaux particulièrement adaptés. Cette partie bibliographique sera partagée en trois grandes sous-parties : tout d'abord le transport du glucose chez les levures sera présenté. Ensuite, nous nous intéresserons à la signalisation du glucose qui vise à réguler l'expression des transporteurs du glucose. Enfin, le métabolisme du glucose, et plus particulièrement la glycolyse, seront exposés.

2. Le transport du glucose

2. a. Les différents types de transporteurs du glucose

Pour traverser la membrane plasmique hydrophobe et imperméable, le glucose doit être transporté à l'intérieur des cellules par des transporteurs membranaires spécifiques. Il en existe plusieurs types, répartis en plusieurs familles, dont :

- la famille PTS (« phosphotransferase system »). Ces transporteurs présents chez les bactéries utilisent le phosphoénolpyruvate comme source d'énergie pour le transport actif du glucose (Jahreis et al., 2008).
- la famille ABC (« ATP-binding cassette »). Les transporteurs de cette famille, présents chez tous les organismes (procaryotes et eucaryotes), nécessitent de l'ATP comme source d'énergie pour un transport actif. Cependant, les transporteurs de glucose appartenant à cette famille sont présents uniquement chez les eucaryotes (Jahreis et al., 2008).
- la famille des transporteurs SGLT (« sodium-glucose linked transporter »). Ces transporteurs sont présents au niveau de la muqueuse intestinale et des reins des mammifères, mais aussi chez les procaryotes (Wright et al., 2011; Jahreis et al., 2008). Le transport actif du glucose se fait grâce à l'énergie fournie par le gradient de sodium.
- la superfamille MFS (« Major Facilitator Superfamily ») permet le transport de petits solutés à travers la membrane plasmique grâce au gradient osmotique. Cette superfamille compte plus de 10000 transporteurs, répartis chez tous les organismes vivants (procaryotes et eucaryotes) (Yan, 2013). Elle comprend des transporteurs de sucre, de phosphates, de nitrates, de nucléosides, d'ions ou encore des pompes à efflux pour certaines drogues. Les transporteurs MFS fonctionnent en uniport (transport d'un seul substrat), symport (transport simultané de deux substrats dans la même direction) ou antiport (transport simultané de deux substrats dans des directions opposées).

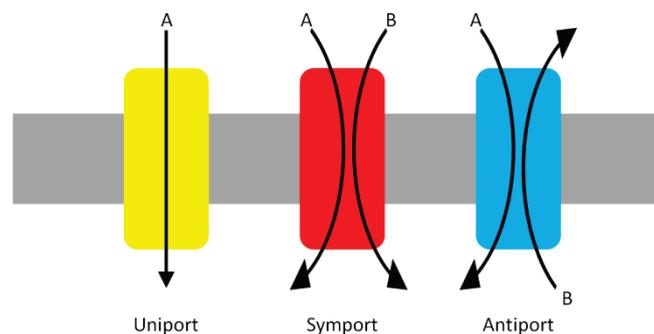


Figure 3: Les transporteurs uniport, symport et antiport sont trois types de transporteurs MFS différents, transportant un substrat A soit seul soit simultanément à un deuxième substrat B, transporté dans la même direction ou dans la direction inverse.

Les membres de cette superfamille ont une séquence en acides aminés généralement peu conservée, sauf pour certains motifs transmembranaires (Pao et al., 1998). Par contre, la topologie tridimensionnelle est conservée dans l'espace : les transporteurs sont ordinairement constitués de douze domaines transmembranaires, reliés entre le sixième et

le septième domaine par une boucle cytoplasmique. Ces transporteurs membranaires seraient issus de la duplication intragénique d'un transporteur ancestral possédant six domaines transmembranaires.

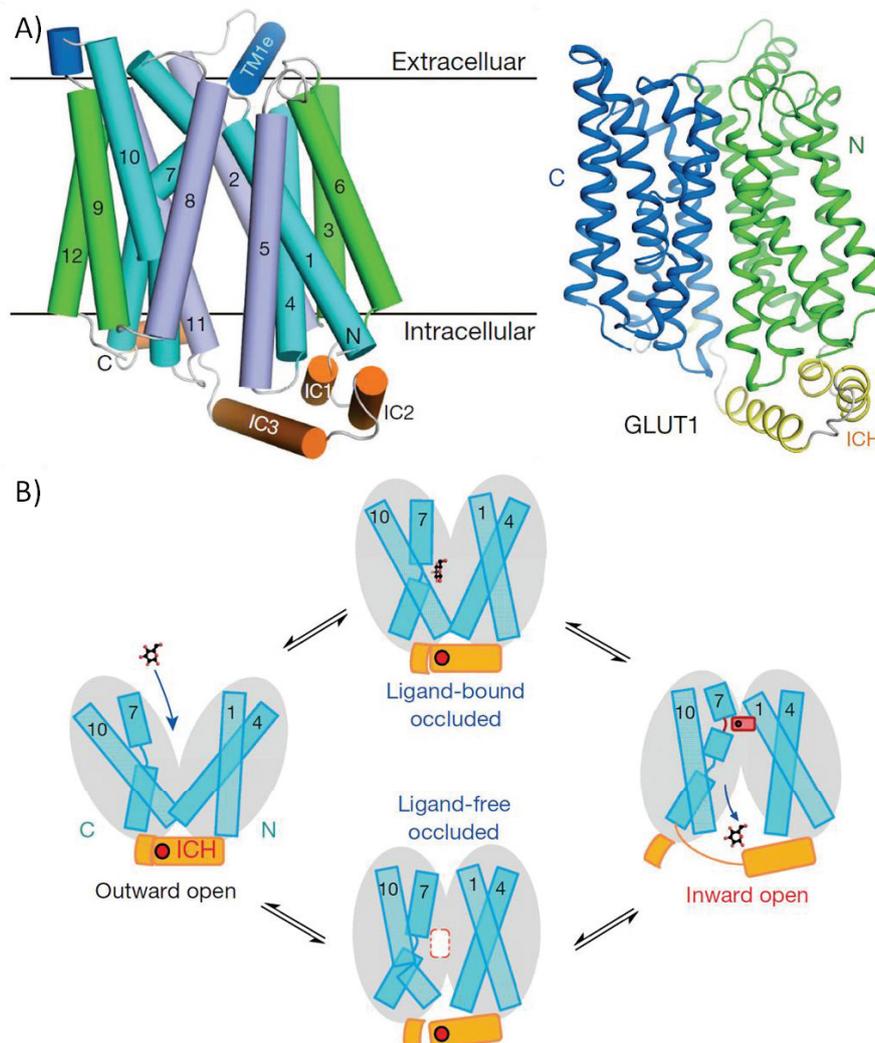


Figure 4: Structure tri-dimensionnelle de GLUT1 (Deng et al., 2014). A) La structure « tournée vers l'intérieur » de GLUT1 a été résolue avec une résolution de 3,2 Å. Deux représentations différentes sont montrées. La boucle ICH (intracellular helix) est représentée à gauche en orange (IC1, IC2, IC3 et IC4 derrière) et à droite en jaune (ICH). B) Le fonctionnement de GLUT1 a été modélisé à partir de la résolution de la structure de GLUT1 ouvert vers l'intérieur (inward open) et des données obtenues pour le symporteur H⁺/xylose XylE de *E. coli* pour les conformations fermées avec et sans ligand (ligand-bound occluded et ligand-free occluded) (Sun et al., 2012; Quistgaard et al., 2013). La configuration « tournée vers l'extérieur » (outward open) n'a pas été résolue et le modèle présenté est une extrapolation à partir des autres configurations. La brique rouge dans la configuration « inward open » désigne une zone d'interaction entre plusieurs acides aminés de domaines transmembranaires différents qui forme une porte extracellulaire.

Chez l'homme, quatorze membres de la famille GLUT (GLUcose Transporter) ont été identifiés (Mueckler and Thorens, 2013). Ce sont des uniports répartis en trois classes selon la similarité de leur séquence : la classe I contient GLUT1 à 4 et GLUT14, la classe II est constituée de GLUT5, 7, 9 et 11 et la classe III comprend GLUT6, 8, 10 et 12. Les transporteurs GLUT ont des spécificités différentes de tissus : ainsi, au moins un type de transporteurs GLUT est présent dans chaque cellule du corps humain. Tout type confondu, la structure d'un seul transporteur eucaryote de la superfamille MFS a été résolue, contre sept

transporteurs MFS procaryotes (Henderson and Baldwin, 2013). Il s'agit de la structure de GLUT1 (Deng et al., 2014), un des premiers transporteurs du glucose identifiés chez l'homme (Mueckler and Thorens, 2013). Une représentation de sa structure tridimensionnelle ainsi qu'un modèle de son fonctionnement sont montrés dans la Figure 4 (Deng et al., 2014). La boucle intracellulaire interagit avec les domaines transmembranaires en absence de glucose de manière à maintenir le transporteur en configuration ouverte vers l'extérieur. La fixation du glucose dans la poche membranaire ainsi formée entraîne un changement de conformation dont un relâchement de la boucle intracellulaire, ce qui permet la mise en place d'une configuration ouverte vers l'intérieur. Grâce au gradient de concentration, le glucose est libéré dans le cytoplasme et le transporteur reprend sa conformation ouverte vers l'extérieur, qui semble être la conformation la plus stable en absence de ligand.

2. b. Deux modèles levures pour l'étude de la régulation du transport du glucose : *Kluyveromyces lactis* et *Saccharomyces cerevisiae*

Pour étudier la régulation du transport du glucose, deux modèles levures appartenant à la classe des Saccharomycetes, également nommés Hémiascomycètes, ont été utilisés. Ils présentent l'avantage d'être des eucaryotes unicellulaires, avec une croissance rapide et pour lesquels de nombreux outils génétiques, moléculaires et génomiques sont disponibles, ce qui facilite la création et l'étude de mutants.

2. b. i. *Saccharomyces cerevisiae*

Le modèle levure le plus étudiée est la levure *S. cerevisiae*, également nommée levure du boulanger ou levure bourgeonnante. Elle appartient à la famille des Saccharomycetaceae, elle-même dans l'ordre des Saccharomycetales. Son génome a été le premier génome eucaryote séquencé (Goffeau et al., 1996). Dans la nature, *S. cerevisiae* est présente sur des fruits mûrs tels que les grains de raisin : son environnement riche en sucre explique sans doute pourquoi elle possède 17 gènes potentiels de transporteurs d'hexoses de la famille MFS qui sont nommés HXT (hexose transporters) (Özcan and Johnston, 1999), tous homologues aux transporteurs mammifères de la famille GLUT. Ces différents transporteurs permettent l'adaptation rapide et efficace à toute variation de la disponibilité en sucre dans l'environnement. Ce grand nombre de gènes codant pour des transporteurs potentiels d'hexoses est expliqué par l'évènement de duplication complète du génome de la levure *S. cerevisiae* (Figure 5A) suivi de multiples duplications géniques. Ainsi 13 % du total des protéines de *S. cerevisiae* est constituée de paires de protéines issues de la duplication complète du génome (WGD, Whole Genome Duplication) (Wolfe et al., 1997).

Physiologiquement, la levure *S. cerevisiae* a été caractérisée comme étant Crabtree-positive (Crabtree, 1935). Une levure Crabtree-positive produit de l'ATP par fermentation alcoolique en présence de glucose, qu'elle soit ou non en anaérobie. A l'inverse, une levure Crabtree-

négative produit de l'éthanol par fermentation seulement en condition anaérobie et utilise la respiration en condition aérobie pour générer de la biomasse (Figure 5B). Cette particularité fait de *S. cerevisiae* une levure relativement éloignée du reste des eucaryotes.

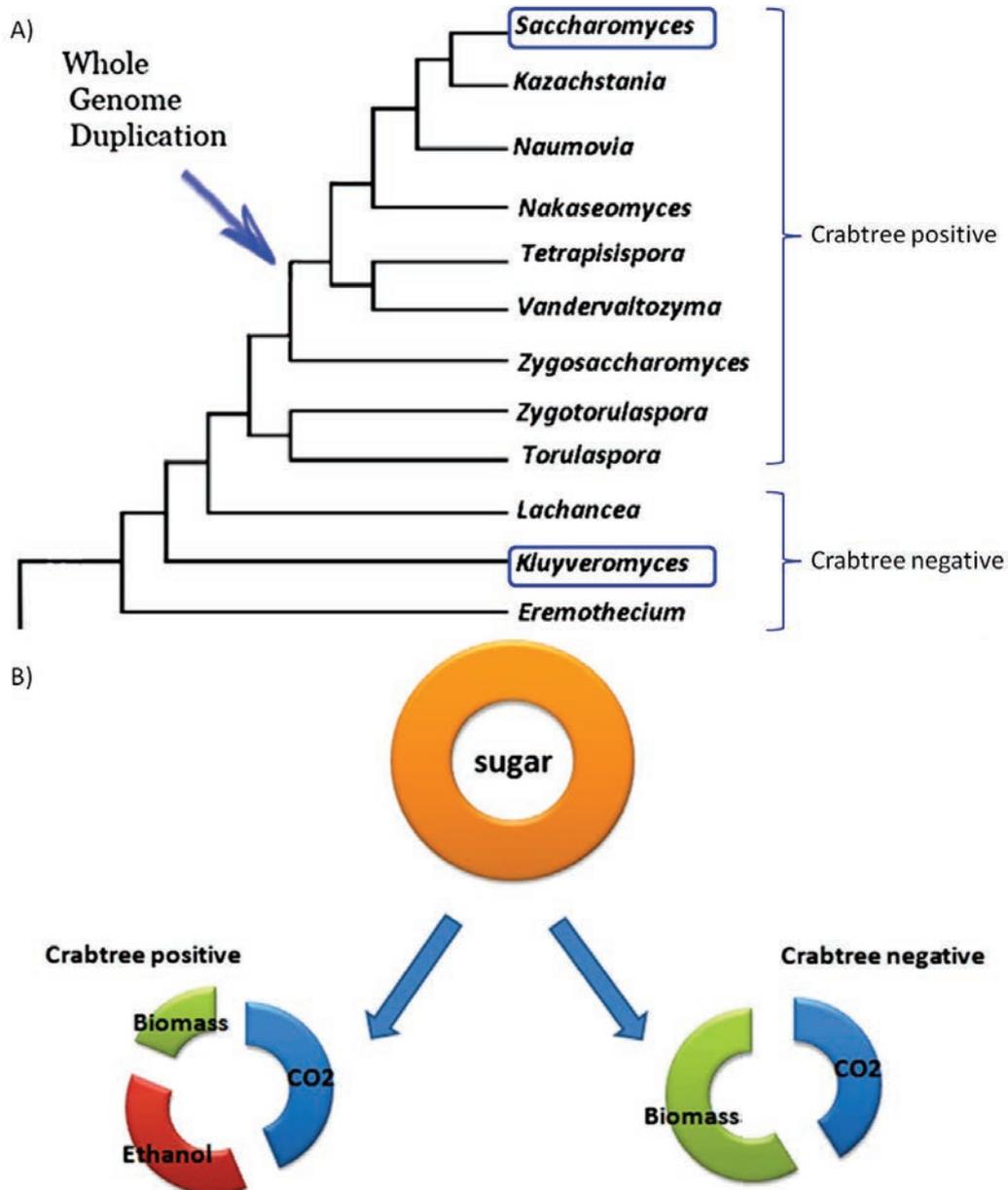


Figure 5: Différences génomique et physiologique entre *S. cerevisiae* et *K. lactis*: *S. cerevisiae* a subi la duplication complète du génome (WGD) et est Crabtree positive, contrairement à *K. lactis*. A) Phylogénie de la famille des Saccharomycetaceae, avec représentation de l'évènement de duplication complète du génome, et de la répartition du phénotype Crabtree des genres des levures. B) Représentation schématique du phénotype Crabtree. Les deux figures sont adaptées de Dashko et al., 2014.

La levure *S. cerevisiae* partage des caractéristiques métaboliques similaires à celles des cellules cancéreuses : dans les deux cas, en aérobie, les cellules préfèrent utiliser la fermentation pour métaboliser le glucose (Diaz-Ruiz et al., 2009, 2011). Chez les levures, l'effet Crabtree est responsable de la suppression de la respiration et des phosphorylations oxydatives induite par le glucose. Il s'agit d'un effet adaptatif à court-terme et réversible. L'effet Warburg est caractérisé par une reprogrammation métabolique des cellules

cancéreuses qui entraîne la répression du métabolisme oxydatif en présence d'oxygène, au profit du métabolisme fermentatif lactique. Ainsi, dans certains types de tumeurs cancéreuses, les cellules produisent de l'ATP par la glycolyse, qui est stimulée, et pas par la respiration cellulaire, pourtant génératrice de beaucoup plus d'ATP. Ce métabolisme particulier présente l'avantage de fabriquer des métabolites intermédiaires pour les voies de synthèse, ce qui permet de soutenir une forte croissance. Il représente aussi des cibles potentielles pour des traitements anti-cancéreux (Elf and Chen, 2013).

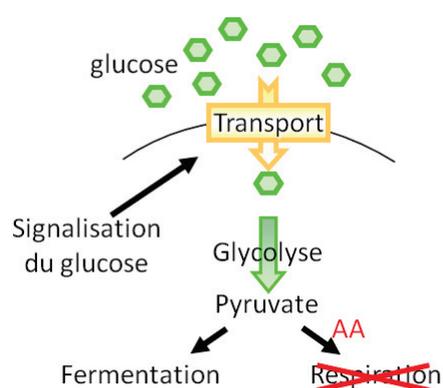
2. b. ii. *Kluyveromyces lactis*

Pour l'étude de la régulation du transport du glucose, *K. lactis*, une autre levure modèle de la famille des Saccharomycetaceae qui est Crabtree-négative comme la plupart des eucaryotes, a été choisi. En effet, le métabolisme de *K. lactis* est préférentiellement respiratoire (Figure 5, A et B).

La levure *K. lactis*, qui appartient elle-aussi à la famille des Saccharomycetaceae, a été isolée à partir de produits laitiers. Elle est utilisée comme ensemencement volontaire au cours de la fabrication de certains fromages (croûtage et aromatisation des fromages à pâte molle). Son environnement naturellement pauvre en glucose et le fait que son génome n'ait pas subi de duplication complète explique que son système de transport du glucose soit simplifié par rapport à celui de *S. cerevisiae* (seulement deux transporteurs identifiés chez *K. lactis*).

Ainsi, son mode de vie respiratoire, son système de transport du glucose simplifié, son génome séquencé et annoté (Dujon et al., 2004), et le fait que la plupart des outils disponibles pour *S. cerevisiae* soient également utilisables chez *K. lactis*, sont autant d'arguments en faveur de *K. lactis* pour l'étude de la régulation du transport du glucose.

Rag⁺ : croissance 5% glucose + AA



Rag⁻ : inhibition de la croissance 5% glucose + AA

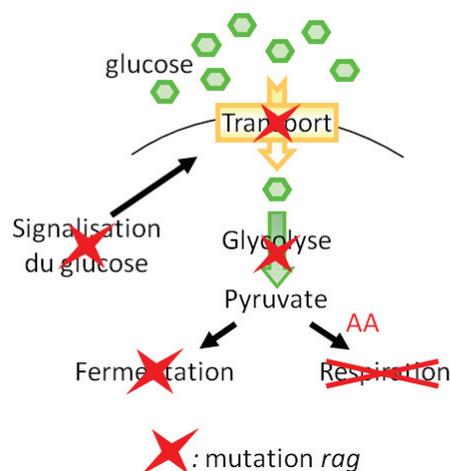


Figure 6: Phénotype Rag chez la levure *K. lactis* : observation de la croissance en présence d'antimycine A (AA, inhibiteur de la respiration qui se fixe à la cytochrome c-réductase, enzyme du complexe III de la chaîne respiratoire) et de concentration élevée de glucose (5 %). Lorsque la signalisation du glucose, son transport, son métabolisme par la glycolyse et la fermentation sont fonctionnels, la levure peut se diviser en présence de glucose même si la respiration est inhibée par l'antimycine A. Au contraire, lorsqu'au moins un de ces processus est affecté, la levure ne pourra pas utiliser le glucose comme source d'ATP lorsque la respiration est inhibée et ne pourra pas croître en présence d'antimycine A.

Chez la levure respiratoire *K. lactis*, l'inhibition de la respiration mitochondriale détourne le métabolisme du glucose vers la fermentation (Wésolowski-Louvel et al., 1992b). Pour soutenir un métabolisme fermentaire fonctionnel, le glucose doit être abondamment présent dans le milieu et son transport dans la cellule doit être efficace. Un crible génétique en présence d'inhibiteur de la respiration (antimycine A : inhibiteur de la cytochrome c-réductase, enzyme du complexe III de la chaîne respiratoire) a permis d'isoler un certain nombre de mutants dont la croissance est dépendante de la respiration. Ces mutants sont appelés Rag⁻, le phénotype Rag⁺ étant la Résistance à l'Antimycine A en présence de Glucose (Goffrini et al., 1989). L'étude de ces différents mutants a montré qu'ils sont affectés au niveau des mécanismes de la signalisation du glucose, du transport du glucose, de la glycolyse, ou encore de la fermentation (Figure 6). De nombreux gènes impliqués dans un de ces mécanismes ont ainsi été mis en évidence et sont listés dans le Tableau 1.

Mutant	Protéine codée par le gène	Mise en évidence
<i>rag1</i>	Rag1 perméase au glucose	(Goffrini et al., 1990)
<i>rag2</i>	<i>K/Pgi1</i> phosphoglucoisomérase	(Goffrini et al., 1991)
<i>rag3</i>	<i>Pdc2</i> facteur de transcription régulé par la thiamine	(Tizzani et al., 1998)
<i>rag4</i>	Rag4 senseur du glucose	(Betina et al., 2001)
<i>rag5</i>	<i>K/Hxk</i> hexokinase	(Prior et al., 1993)
<i>rag6</i>	<i>K/Pdc</i> pyruvate décarboxylase	(Bianchi et al., 1996)
<i>rag7</i>	en cours de caractérisation	
<i>rag8</i>	Rag8 caséine kinase de type I	(Blaisonneau et al., 1997)
<i>rag9</i>	non caractérisé	
<i>rag10</i>	non caractérisé	
<i>rag11</i>	non caractérisé	
<i>rag12</i>	Rag12 DL-glycérol-3-phosphatase	non publié
<i>rag13</i>	<i>K/Gcr1</i> activateur transcriptionnel de la glycolyse	(Haw et al., 2001)
<i>rag14</i>	<i>K/Pfk2</i> sous-unité β de la phosphofructokinase	(Wésolowski-Louvel et al.,
<i>rag15</i>	<i>K/Adh</i> alcool déshydrogénase	(Mazzoni et al., 1992)
<i>rag16/rag21</i>	<i>Sck1</i> activateur transcriptionnel à domaine bHLH	(Lemaire et al., 2002)(Neil et al., 2007)
<i>rag17</i>	<i>K/Eno</i> énalase	(Lemaire and Wésolowski-
<i>rag18</i>	non caractérisé	
<i>rag19</i>	<i>Grr1</i> protéine à F-box appartenant au complexe SCF d'ubiquitine ligase	(Hnatova et al., 2008)
<i>rag20</i>	<i>K/Snf2</i> sous-unité du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine	(Cotton et al., 2012)
<i>Klacs2</i>	<i>K/Acs2</i> acétyl-coenzyme A synthétase 2	(Lodi et al., 2001)
<i>Klgcr2</i>	<i>K/Gcr2</i> activateur transcriptionnel de la glycolyse	(Neil et al., 2004)
<i>Klhs1</i>	sérine/thréonine kinase impliquée dans le métabolisme du glycérol, l'utilisation du glucose et la réponse au stress	(Cialfi et al., 2011)
<i>Klmga2</i>	protéine membranaire du réticulum endoplasmique impliquée dans l'hypoxie	(Micolonghi et al., 2012)
<i>Klnot4</i>	sous-unité du complexe CCR4-NOT, ligase ubiquitine-protéine	(Mazzoni et al., 2005)
<i>Klzwf1</i>	glucose-6-phosphate déshydrogénase	(Saliola et al., 2006)

Tableau 1: Les différents mutants *rag* identifiés sont impliqués dans la signalisation du glucose, le transport du glucose, la glycolyse ou la fermentation. Les mutants *rag* dans lesquels le gène muté n'a pas encore été identifié sont grisés. Les mutants qui ne sont pas nommés « *rag* » n'ont pas été identifiés par criblage de mutants sensibles à l'antimycine A mais présente une inhibition de la croissance en présence de glucose et d'antimycine A. Cette liste n'est pas exhaustive.

Le rôle et le fonctionnement de certains des gènes affectés dans ces mutants *rag* sont décrits par la suite : il s'agit des gènes impliqués dans le transport du glucose (partie 2. c, page 23), la signalisation du glucose (partie 3, page 38) et la glycolyse (partie 4, page 59).

2. c. Les perméases au glucose chez les levures

Chez les levures, les transporteurs du glucose sont homologues aux transporteurs de la famille GLUT. Ils appartiennent donc à la superfamille des MFS et sont constitués de douze domaines transmembranaires et une boucle cytoplasmique entre les domaines transmembranaires 6 et 7. Comme la topologie membranaire proposée pour ces transporteurs est semblable à celles des transporteurs de la famille GLUT, il est raisonnable de considérer que la structure tridimensionnelle décrite pour GLUT1 (Deng et al., 2014) est conservée chez les transporteurs du glucose des levures. Le transport du glucose se faisant par diffusion facilitée (pas de source d'énergie hormis le gradient osmotique), les transporteurs du glucose des levures seront nommés perméases au glucose par la suite. Les perméases au glucose des levures sont classées selon l'affinité pour leur substrat. On distingue ainsi les perméases de faible affinité qui transportent le glucose lorsqu'il est en forte concentration dans le milieu extracellulaire (supérieur à 2 %), et les perméases de haute affinité qui transportent le glucose faiblement concentré. Enfin, certaines perméases sont capables de transporter le glucose quelle que soit sa concentration. Dans la présentation qui suit, les perméases sont classées en deux catégories, faible ou haute affinité, même si certaines de celles classées en haute affinité ont plutôt une affinité intermédiaire pour le glucose

2. c. i. Les perméases au glucose de faible affinité

Chez *K. lactis*, l'étude des mutants *rag* a permis de mettre en évidence le gène de la perméase au glucose *RAG1* (Goffrini et al., 1990), qui transporte le glucose hautement concentré (concentration supérieure à 2 %), avec une constante de Michaelis $K_m = 20$ à 50 mM pour le glucose (Wésolowski-Louvel et al., 1992a). L'expression de *RAG1* est induite par 2 % de glucose extracellulaire (Wésolowski-Louvel et al., 1992a), mais elle est aussi induite par le galactose, le fructose, le mannose et le lactose. Dans certaines souches de *K. lactis*, le gène *RAG1* n'est pas présent mais remplacé au même locus par deux autres gènes : *KHT1* et *KHT2* (Weirich et al., 1997). Ainsi, *RAG1* est un gène chimérique issu de la recombinaison des deux gènes. *RAG1* est composé principalement de la séquence de *KHT1* sauf pour l'extrémité 3' identique à *KHT2* : les deux derniers acides aminés de Kht1 auraient été remplacés par les trois derniers de Kht2. *KHT1* possède la même séquence promotrice que *RAG1*, et *KHT2* est régulé différemment au niveau transcriptionnel mais possède la même séquence

terminatrice que *RAG1*. L'expression de *KHT2* est régulée comme le gène d'une perméase de haute affinité (*HXT6* chez *S. cerevisiae*, voir Tableau 3). Les souches *K. lactis* utilisées dans cette étude possèdent toutes le gène *RAG1* et les gènes *KHT1/KHT2* sont absents de leur génome.

La protéine Rag1 présente 72,9 % d'identité avec la perméase au glucose Hxt1 de *S. cerevisiae*, qui est également une perméase de faible affinité ($K_m = 100$ mM) (Reifenberger et al., 1997). L'expression de *HXT1* est induite par le glucose hautement concentrée (Lewis and Bisson, 1991; Özcan and Johnston, 1995) et conduit à la présence de plus de 23000 protéines Hxt1 par cellule (Ghaemmaghami et al., 2003). Sa topologie putative est montrée dans la Figure 7.

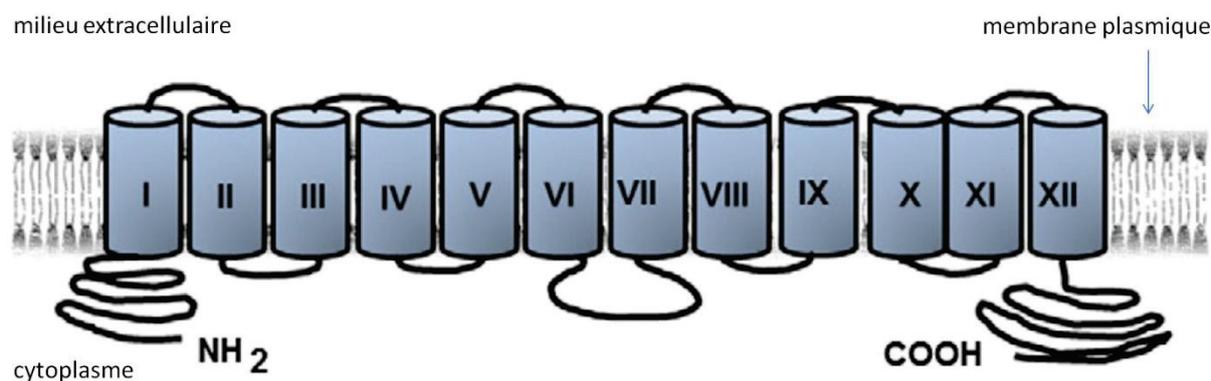


Figure 7: Topologie transmembranaire de la perméase au glucose Hxt1 de *S. cerevisiae* (Roy et al., 2014b). Les douze domaines transmembranaires sont représentés par des cylindres (I à XII), et les domaines cytoplasmiques N-terminal, central et C-terminal par des traits. Les topologies prédites pour les autres perméases Hxt et pour Rag1 sont similaires.

S. cerevisiae possède une autre perméase de faible affinité, Hxt3, avec un K_m intermédiaire de 60 mM (Reifenberger et al., 1997). Hxt3 est identique à 86 % à Hxt1 et à 74 % à Rag1. L'expression de *HXT3* est induite par le glucose 0,1 % et 2 %, ainsi que par le raffinose.

Les caractéristiques principales des perméases de faible affinité pour le glucose sont reprises dans le Tableau 2.

Perméase	K_m , mM	Acides aminés	Autres substrats	Expression du gène
Rag1/Kht1	20-50	567	fructose	induite par glucose 2 %
Hxt1	100	570	fructose, mannose	maximale avec glucose 4 %
Hxt3	60	567	fructose, mannose	induite par glucose 0,1 % à 2 %

Tableau 2: Caractéristiques des perméases au glucose de faible affinité chez les levures *K. lactis* (violet) et *S. cerevisiae* (orange) (Leandro et al., 2009; Horák, 2013).

2. c. ii. Les perméases au glucose de haute affinité

En plus de Rag1, *K. lactis* possède une perméase au glucose de haute affinité codée par le gène *HGT1*. La protéine partage seulement 25 à 30 % d'identité avec Rag1 et les autres perméases Hxt (Billard et al., 1996). Son K_m pour le glucose est de 1 mM et cette perméase est également capable de transporter le galactose (Baruffini et al., 2006). L'expression de *HGT1* n'est pas dépendante de la concentration extracellulaire en glucose mais semble néanmoins contrôlée par certains des régulateurs de l'expression de *RAG1* (Betina et al.,

2001). Les souches de *K. lactis* possédant les gènes *KHT1/KHT2* n'ont pas le gène de la perméase de haute affinité *HGT1* (Breunig et al., 2000). Enfin, les mutants $\Delta rag1 \Delta hgt1$ et $\Delta kht1 \Delta kht2$ sont toujours capables de croître faiblement en présence de glucose, ce qui suppose l'existence d'autres transporteurs du glucose qui n'ont pas encore été mis en évidence (Billard et al., 1996).

Chez *S. cerevisiae*, Hxt4, Hxt5, Hxt6 et Hxt7 sont des perméases au glucose de haute affinité. Leurs caractéristiques sont listées dans le Tableau 3. Les perméases Hxt6 et Hxt7 sont très semblables avec 99,8 % d'identité (seuls deux acides aminés varient). Hxt5 est la perméase de *S. cerevisiae* qui est la plus identique à Rag1 de *K. lactis* : 74,5 %. Les caractéristiques des perméases Hxt8 à Hxt17 sont mal connues (Horák, 2013). Le gène *HXT12* ne code pas pour une perméase fonctionnelle (Wieczorke et al., 1999). Enfin, Hxt2 a été initialement caractérisé comme une perméase d'affinité modérée pour le glucose, mais semble capable de transporter le glucose quelle que soit sa concentration (Reifenberger et al., 1997; Maier et al., 2002). *HXT2, 4, 6 et 7* ont leur expression induite par du glucose faiblement concentré (0,1 %).

Perméase	K_m , mM	Acides aminés	Autres substrats	Expression du gène
Hgt1	1	551	galactose, fructose	non régulée par le glucose
Kht2	3,7	566		induction par absence ou faible concentration glucose
Hxt2	10	541	fructose, mannose	induction par glucose 0,1 %
Hxt4	10	560	fructose, mannose	induction par glucose 0,1 %
Hxt5	10	592	fructose, mannose	non régulée par le glucose
Hxt6/7	1 - 2	570	fructose, mannose	induction par absence ou faible concentration glucose

Tableau 3: Caractéristiques des perméases au glucose de haute affinité chez les levures *K. lactis* (violet) et *S. cerevisiae* (orange) (Leandro et al., 2009; Horák, 2013).

2. d. La régulation transcriptionnelle des gènes des perméases au glucose de faible affinité

L'expression de la plupart des gènes des perméases au glucose est régulée par la concentration extracellulaire en glucose. Ici nous nous intéresserons à différents régulateurs transcriptionnels des gènes des perméases de faible affinité (principalement *HXT1* pour *S. cerevisiae* et son homologue chez *K. lactis* *RAG1*). Le répresseur transcriptionnel Rgt1, avec ses corépresseurs Std1 et Mth1 (*S. cerevisiae*) ou Sms1 (*K. lactis*), sont les principaux régulateurs de l'expression de *HXT1/RAG1*. Cependant, quelques activateurs de la transcription ont également été mis en évidence et seront présentés.

Les gènes des perméases de haute affinité sont eux aussi régulés par la concentration extracellulaire de glucose (Tableau 3). La plupart d'entre eux est réprimée en présence de glucose hautement concentré par une voie de signalisation appelée répression glucose (voir page 52). La répression des perméases de haute affinité ne sera pas traitée ici, car nous nous

sommes intéressés exclusivement à la régulation des perméases de faible affinité dans ces travaux de thèse.

2. d. i. Les répresseurs transcriptionnels des gènes des perméases au glucose de faible affinité

- Le répresseur transcriptionnel Rgt1

ScRgt1 a été identifié au cours d'un crible génétique de mutants capables de restaurer la croissance d'une souche $\Delta snf3$ incapable de croître en milieu glucose (Snf3 est un senseur du glucose de *S. cerevisiae*, voir page 38) (Marshall-Carlson et al., 1991). ScRgt1 appartient à la famille des facteurs transcriptionnels à doigts de zinc (Cys_6Zn_2), qui contient notamment le facteur de transcription Gal4 (Özcan et al., 1996b). Une structure en doigts de zinc de type Cys_6Zn_2 comprend six cystéines qui interagissent avec deux atomes de zinc pour stabiliser la structure de ce domaine d'interaction avec l'ADN. La séquence consensus de fixation de ScRgt1 à l'ADN est la suivante : 5'-CGGANNA-3' (Kim et al., 2003). Cette séquence consensus est retrouvée plusieurs fois dans le promoteur de *HXT1*, mais aussi dans les promoteurs d'autres perméases au glucose : *HXT3*, *HXT2*, *HXT4*, *HXT5* (Kim et al., 2003; Kaniak et al., 2004). L'effet du répresseur ScRgt1 sur l'expression du gène est fonction du nombre de séquences consensus présentes dans le promoteur : *in vitro*, 2 à 3 sites de fixation de ScRgt1 entraînent une répression de l'expression de 2 à 3 fois, alors que 4 à 6 sites de fixation entraînent une répression de 30 à 90 fois (Kim et al., 2003). Les cibles de ScRgt1 qui ont un rôle dans le transport et le métabolisme du glucose chez *S. cerevisiae* sont listées dans le Tableau 4.

Gène	Sites consensus dans le promoteur	Protéine	Références
<i>HXT1</i>	11	perméase au glucose de faible affinité	(Özcan et al., 1996b; Kaniak et al., 2004)
<i>HXT2</i>	3	perméase au glucose de forte affinité	(Özcan and Johnston, 1996; Kaniak et al., 2004)
<i>HXT3</i>	11	perméase au glucose de faible affinité	(Özcan and Johnston, 1996; Kaniak et al., 2004)
<i>HXT4</i>	5	perméase au glucose de forte affinité	(Özcan and Johnston, 1996; Kaniak et al., 2004)
<i>HXT5</i>	4	perméase au glucose de forte affinité	(Kaniak et al., 2004)
<i>HXT8</i>	6	perméase au glucose	(Kaniak et al., 2004)
<i>STD1</i>	2	corépresseur transcriptionnel avec ScRgt1	(Kaniak et al., 2004)
<i>MTH1</i>	4	corépresseur transcriptionnel avec ScRgt1	(Kaniak et al., 2004)
<i>MIG2</i>	9	répresseur transcriptionnel à doigts de zinc, dépendant du glucose	(Kim et al., 2003; Kaniak et al., 2004)
<i>HXK2</i>	2	hexokinase	(Palomino et al., 2005)
<i>PFK2</i>	1	phosphofructokinase	(Kaniak et al., 2004)
<i>SKS1</i>	5	sérine/thréonine protéine kinase	(Kaniak et al., 2004)
<i>SUC2</i>	2	invertase	(Hazbun and Fields, 2002)

Tableau 4: Liste des principales cibles potentielles ou démontrées des promoteurs ciblés par ScRgt1 et dont les gènes codent pour un acteur du métabolisme du glucose. Les cibles potentielles sont grisées lorsque la capacité de ScRgt1 à se lier à leur promoteur n'a pas été démontrée.

L'activité de ScRgt1 n'est pas régulée au niveau transcriptionnel : *ScRGT1* est un gène faiblement exprimé, non-régulé par la présence de carbone (Özcan et al., 1996b), et la protéine est présente en seulement 195 exemplaires par cellule (Ghaemmaghami et al., 2003). La quantité de la protéine ne semble pas régulée par la source de carbone et sa localisation est toujours nucléaire (Kim et al., 2003; Mosley et al., 2003). Par contre, l'activité de ScRgt1 est régulée par des modifications post-traductionnelles, et particulièrement sa phosphorylation en plusieurs sites : des criblages haut-débits et des mutations ponctuelles ont permis de mettre en évidence 22 sites potentiels de phosphorylation (Holt et al., 2009; Kim and Johnston, 2006; Gruhler et al., 2005). Parmi les sites phosphorylés se trouvent des sites consensus de la kinase cycline-dépendante Cdc28 et des caséine kinases de type I. Au moins quatre sérines (Tableau 5) sont phosphorylées en réponse au signal glucose par les sous-unités catalytiques de la protéine kinase A (PKA) Tpk1, Tpk2 et Tpk3 (Kim and Johnston, 2006; Palomino et al., 2006). Lorsque ScRgt1 est phosphorylé par la PKA, il se détache du promoteur de ces gènes-cibles, ce qui stoppe la répression de leur expression (Kim and Johnston, 2006; Palomino et al., 2006). Enfin, la fixation de ScRgt1 au promoteur-cible nécessite également sa phosphorylation, mais cette fois par la sérine/thréonine kinase Snf1, ou par une autre kinase Snf1-dépendante (Palomino et al., 2006). Aucune phosphatase de ScRgt1 n'a été identifiée à ce jour. Les différents états de phosphorylation de ScRgt1 régulent l'activité de régulation de la transcription selon le nombre et la position des sites phosphorylés (Jouandot et al., 2011). Ainsi, la nature de la régulation par ScRgt1 varie, car ce répresseur a également été caractérisé comme un activateur transcriptionnel dans certaines conditions (voir page 33).

Une étude dans laquelle des séquences de 30 paires de bases ont été successivement délétées dans *ScRGT1* (Polish et al., 2005) a permis de mettre en évidence plusieurs domaines fonctionnels et d'interaction avec ses partenaires (voir page 29) :

- Un domaine est nécessaire à la répression transcriptionnelle (acides aminés 210 à 250, représentés en rouge dans la Figure 8), mais est également impliqué dans l'interaction avec son partenaire Ssn6 (voir page 30).
- La séquence comprise entre les acides aminés 320 et 390 (en jaune dans la Figure 8) est nécessaire à la fonction d'activateur transcriptionnel de ScRgt1 (voir page 33).
- La fonction activatrice est régulée par des séquences qui lui sont adjacentes : acides aminés 310-320 et 400-410 (en jaune avec la séquence d'activation dans la Figure 8). Les acides aminés 310 à 320 sont également requis pour l'interaction avec Std1 (voir page 30).
- Deux séquences sont impliquées dans l'inhibition de la répression transcriptionnelle en présence de glucose : acides aminés 80-90 et 520-830 (les deux domaines sont en marron dans la Figure 8).

Enfin, cette étude a permis de mettre en évidence que le domaine central de ScRgt1 (450-850) interagit avec la partie N-terminale (1-392) de ScRgt1 portant le domaine de fixation à l'ADN. Cette interaction intramoléculaire aurait lieu lorsque la sérine 758 est phosphorylée et nécessite également la sérine 88. Cependant les preuves de la phosphorylation de ces

deux sérines n'ont jamais été rapportées. L'interaction intramoléculaire empêche la protéine de se fixer au promoteur-cible en occultant le site de fixation à l'ADN (Polish et al., 2005).

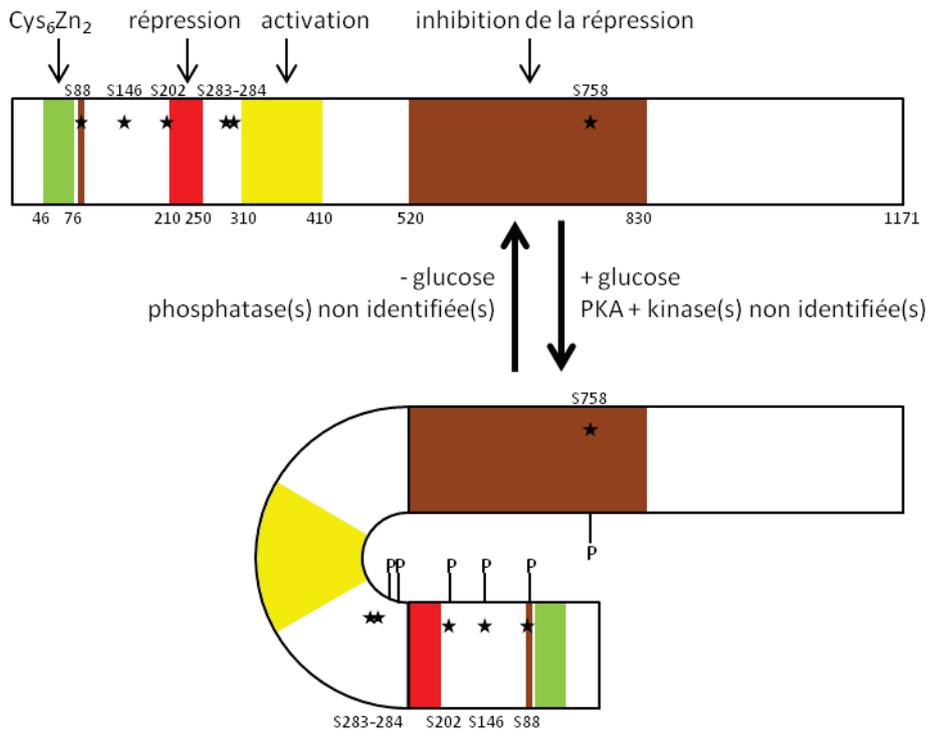


Figure 8: Domaines fonctionnels et modèle du repliement de ScRgt1 en présence de glucose (Polish et al., 2005). Les étoiles représentent des sites de phosphorylation : S146, S202, S283 et S284 sont phosphorylés par la PKA. Les sérines S88 et S758 sont potentiellement ubiquitinées mais cela n'a pas été confirmé par d'autres études et les kinases responsables de leur phosphorylation ne sont pas identifiées.

Le gène *ScRGT1* de *S. cerevisiae* a un homologue chez *K. lactis*, *KIRGT1*. Les deux protéines sont identiques à 31 % (Rolland et al., 2006). Chez *K. lactis*, *KIRgt1* a été identifié suite à l'étude d'un révertant d'un mutant *rag4* (*Rag4* est un senseur du glucose) (Rolland et al., 2006). Il s'est avéré que le révertant portait une version de *KIRgt1* tronquée de sept acides aminés à l'extrémité C-terminale, et que la délétion de ces acides aminés, assez conservés avec *ScRgt1*, était suffisante pour modifier la fonction de la protéine (Rolland et al., 2006). La conservation des domaines entre *ScRgt1* et *KIRgt1* est montrée dans la Figure 9.

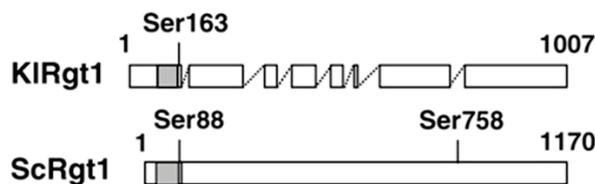


Figure 9: Domaines conservés entre *KIRgt1* et *ScRgt1*, selon (Rolland et al., 2006). Les gaps de plus de 20 bases sont montrés par des pointillés, et le domaine en doigts de zinc est grisé. La localisation et conservation des deux sérines identifiées comme phosphorylées et importantes pour le repliement (Polish et al., 2005) sont indiquées.

KIRgt1 réprime l'expression du gène de la perméase au glucose *RAG1* en absence de glucose. Le promoteur de *RAG1* compte six sites consensus de fixation de Rgt1. Comme pour *S. cerevisiae*, la fonction répressive de *KIRgt1* est inhibée par sa phosphorylation en réponse au glucose (Rolland et al., 2006). Mais contrairement à *S. cerevisiae*, une fois phosphorylé

K/Rgt1 ne se détache pas du promoteur de *RAG1*, même si son affinité pour le promoteur change en présence de glucose (Rolland et al., 2006). Ainsi, la répression induite par *K/Rgt1* est levée sans nécessiter le détachement du répresseur lorsque *K/Rgt1* est phosphorylé en présence de glucose (Figure 12). A l'heure actuelle les kinases et phosphatases de *K/Rgt1* ne sont pas connues, mais les quatre sérines phosphorylées par la PKA chez *S. cerevisiae* sont conservées chez *K. lactis* (Tableau 5).

	Conservation des lysines phosphorylées par la PKA			
<i>ScRgt1</i>	S146	S202	S283	S284
<i>K/Rgt1</i>	S223	S271	S346	S347

Tableau 5: Conservation chez *K/Rgt1* des lysines phosphorylées par la PKA chez *ScRgt1* (Kim and Johnston, 2006; Palomino et al., 2006).

Les cibles identifiées de *K/Rgt1* sont sensiblement les mêmes que chez *S. cerevisiae* : les gènes de la perméase *RAG1* et de deux de ses régulateurs transcriptionnels, *SMS1* (Hnatova et al., 2008) et *SCK1* (Neil et al., 2007). L'expression de certains gènes glycolytiques est réprimée par *K/Rgt1* en absence de glucose : le gène de l'hexokinase *KHXK* et dans une moindre mesure celui de l'énolase *KENO* (Rolland et al., 2006). Enfin, chez *K. lactis* il a été montré que *K/Rgt1* interagit physiquement avec son corépresseur *Sms1*, l'homologue de *Mth1* et *Std1* (Hnatova et al., 2008) (voir page 30).

- Les partenaires du répresseur transcriptionnel *Rgt1* :

Plusieurs partenaires cellulaires de *ScRgt1* ont été identifiés, notamment le complexe général de répression *Ssn6-Tup1* et les corépresseurs *Std1* et *Mth1* (Özcan et al., 1996b; Kim et al., 2003; Lakshmanan et al., 2003). Ceci a permis de caractériser un complexe de répression formé par *ScRgt1*, *Ssn6-Tup1* et *Mth1/Std1* (Roy et al., 2013a, 2014a). Ce n'est pas *ScRgt1* qui recrute directement *Ssn6-Tup1*, mais *Mth1*, qui est nécessaire également pour la stabilisation de ce complexe (Figure 10).

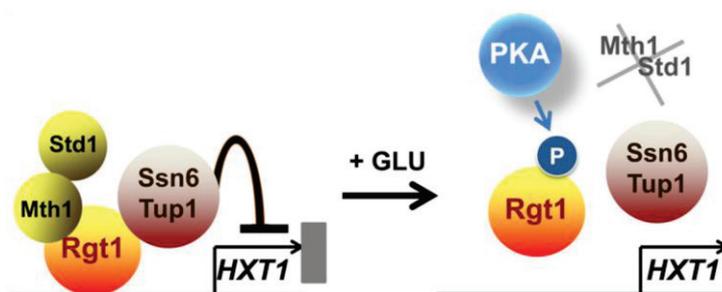


Figure 10: Modèle de fonctionnement du complexe de répression *ScRgt1/Ssn6-Tup1/Std1-Mth1* (Roy et al., 2014a).

La levée de la répression des gènes-cibles ne nécessite pas forcément le détachement de *ScRgt1* du promoteur, mais seulement la dissociation du complexe *Ssn6-Tup1/ScRgt1* qui a lieu lorsque *ScRgt1* est phosphorylé par la PKA (Roy et al., 2014a, 2013a). Une étude menée sur des levures diploïdes a montré une haplo-insuffisance combinée entre *ScRgt1* et *Mth1* et suggère que le ratio du nombre de copies des répresseurs *ScRgt1* et *Mth1* l'un par rapport à l'autre module l'activité du complexe (Dietzel et al., 2012).

Le modèle de régulation de la répression présenté ici n'est probablement pas complet et comprend certainement d'autres partenaires.

– Le complexe général de répression Ssn6-Tup1

Le complexe général de répression transcriptionnelle Ssn6-Tup1 est constitué d'une sous-unité Ssn6 (=Cyc8) et 4 sous-unités Tup1 (Varanasi et al., 1996). Il ne possède pas de domaine de fixation à l'ADN mais réprime l'expression de ses gènes-cibles après avoir été recruté par des répresseurs se fixant à l'ADN. Ainsi, le complexe Ssn6-Tup1 interagit avec les répresseurs transcriptionnels ScRgt1 (Figure 10) et ScMig1, qui possèdent des domaines de fixation à l'ADN (Keleher et al., 1992). Le complexe Ssn6-Tup1 inhibe l'expression des gènes-cibles en masquant le domaine d'activation des protéines qui le recrute sur le promoteur (Wong and Struhl, 2011). Il peut également s'associer avec des histones et des histones déacétylases pour modifier la chromatine et changer l'accessibilité des polymérase au promoteur (Edmondson et al., 1996; Davie et al., 2003), et constitue donc un complexe de remodelage de la chromatine.

Le complexe Ssn6-Tup1 est impliqué dans la régulation de gènes de nombreuses voies de signalisation : la signalisation et la répression du glucose, l'hypoxie, la réparation de l'ADN, la détermination du type sexuel, la régulation de gènes spécifiques aux haploïdes (Smith and Johnson, 2000).

Chez *K. lactis*, *KITup1* partage 83 % de similarité avec *ScTup1*. Quand *KITUP1* est exprimé chez *S. cerevisiae*, le niveau de répression induit pour les gènes-cibles est plus faible qu'avec *ScTup1* (Lamas-Maceiras et al., 2011). *KISSN6* est également conservé mais n'a jamais été étudié à notre connaissance. Aucune étude n'a été réalisée sur l'interaction entre *KIRgt1* et *KISsn6-KITup1*.

– Les corépresseurs transcriptionnels Std1 et Mth1 chez *S. cerevisiae* et leur homologue Sms1 chez *K. lactis*

Chez *S. cerevisiae*, les gènes *STD1* et *MTH1* sont deux paralogues issus de la duplication complète du génome. Les deux protéines partagent 61 % d'identité (Hubbard et al., 1994). *STD1* a été initialement isolé comme un suppresseur de la mutation d'un facteur général de transcription, Spt15, appelé aussi « TATA-binding protein » pour protéine liée à la boîte TATA des promoteurs (Ganster et al., 1993). *MTH1* a ensuite été identifié par homologie avec *STD1* (Hubbard et al., 1994). Leurs rôles dans la régulation des gènes *HXT* sont partiellement redondants, puisque seule leur délétion conjointe permet de lever complètement la répression sur les gènes *HXT* (Schmidt et al., 1999). Ainsi leur délétion entraîne un phénotype similaire à celui du mutant Δ *Scrgt1* : dérépression des gènes *HXT* (Gamo et al., 1994; Özcan and Johnston, 1995). Des analyses d'épistasie les placent en amont de *ScRgt1* dans le contrôle de l'expression des gènes *HXT* (Flick, 2003; Lakshmanan et al., 2003). Les promoteurs des deux gènes possèdent des sites consensus de Rgt1 et l'expression des gènes *MTH1* et *STD1* est induite par la délétion de *ScRGT1* (Kaniak et al., 2004). Cependant, le

glucose a un effet différent sur la régulation transcriptionnelle de *MTH1* et *STD1* : il réprime l'expression de *MTH1* (via le répresseur Mig1) alors qu'il induit celle de *STD1* (Kaniak et al., 2004). Par contre, la régulation post-traductionnelle induite par le glucose est similaire pour les deux protéines, puisque le glucose induit la dégradation protéasomale des deux corépresseurs Mth1 et Std1. Toutefois, la dégradation de Std1 est masquée par l'augmentation de l'expression de son gène en présence de glucose (Flick, 2003; Kim and Johnston, 2006). Mth1 et Std1 sont retrouvés principalement dans le noyau (Schmidt et al., 1999) mais transitent probablement vers le cytoplasme car ils interagissent avec des protéines cytoplasmiques : les extrémités C-terminales cytoplasmiques des senseurs membranaires du glucose, Snf3 et Rgt2 (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000). Néanmoins, il a été montré que Mth1 est toujours localisé dans le noyau et que sa dégradation a lieu dans le noyau (Pasula et al., 2010).

Std1 et Mth1 interagissent avec ScRgt1 pour réprimer l'expression des gènes des perméases au glucose de faible affinité en absence de glucose (Tomás-Cobos and Sanz, 2002; Lakshmanan et al., 2003). En réponse au glucose extracellulaire, Mth1 et Std1 sont phosphorylés par les caséine kinases de type I (CKI) Yck1/2 (Mth1 compte huit sites consensus de phosphorylation par les CKI et Std1 en compte neuf) (Moriya and Johnston, 2004). La phosphorylation par la caséine kinase entraîne leur ubiquitination par le complexe SCF^{Grr1} (Flick, 2003; Spielwoy et al., 2004; Pasula et al., 2007). Il a été démontré que Mth1 interagit avec plusieurs protéines à F-box de complexes d'ubiquitination SCF (voir page 44) : Grr1 et Ufo1 (Mark et al., 2014). Après leur ubiquitination, Std1 et Mth1 sont dégradés par le protéasome. La dégradation de Mth1 et Std1 en réponse au glucose nécessite aussi l'inactivation de la sérine/thréonine kinase Snf1 par la voie de répression du glucose (Pasula et al., 2007). Par ailleurs, l'interaction de Snf1 et Std1 a été démontrée (Hubbard et al., 1994). Après la dégradation de Mth1 et Std1 en réponse au glucose extracellulaire, le répresseur ScRgt1 est phosphorylé par la PKA et le complexe de répression des gènes *HXT* est déstabilisé, ce qui permet leur expression (Figure 10). Ce modèle suggère que l'interaction de Mth1 et Std1 avec ScRgt1 masque les sites de phosphorylation par la PKA sur ScRgt1 (Roy et al., 2013a). Ainsi la dégradation des corépresseurs Mth1 et Std1 libérerait l'accessibilité à ces sites de phosphorylation.

En plus des CKI, Mth1 et Std1 sont également phosphorylés par la PKA : la phosphorylation de la sérine 112 de Mth1 a été montrée en réponse au glucose extracellulaire, et Std1 possède aussi un site consensus de la PKA (S20) (Ma et al., 2013). La sous-unité Psy2 de la phosphatase Pph3-Psy2 interagit par un site MPPP (séquence en acides aminés) avec Mth1 et Std1 et déphosphoryle Mth1 au niveau de la sérine 112 (Ma et al., 2013). Les auteurs suggèrent que la phosphorylation/déphosphorylation du site de la PKA a un rôle dans la modulation de l'activité des corépresseurs sans influencer leur stabilité.

Mth1 se trouve au croisement de trois voies de signalisation du glucose (Figure 11) :

- la voie de signalisation du glucose dépendante des senseurs du glucose Snf3 et Rgt2 (voir page 38)

- la voie de répression du glucose dépendante de Snf1 et Mig1 (voir page 52)
- la voie d'activation du glucose dépendante de la PKA (voir page 50).

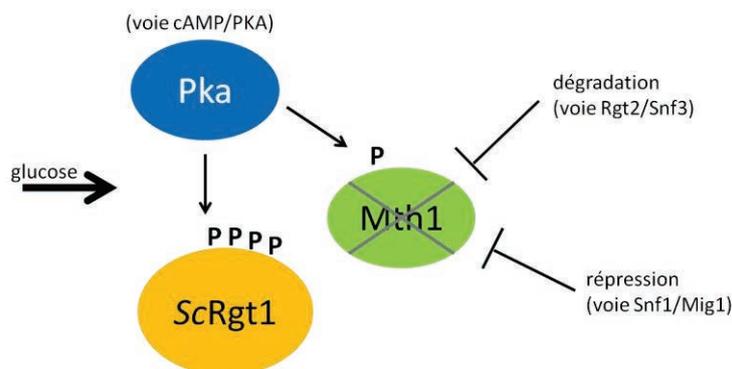


Figure 11: Mth1 est régulé conjointement par trois voies différentes de signalisation du glucose, d'après (Roy et al., 2013a; Ma et al., 2013). En présence de glucose, Mth1 est dégradé par la voie Snf3/Rgt2. L'expression de *MTH1* est contrôlée par la répression glucose dépendante de la voie Snf1/Mig1. Enfin la PKA phosphoryle Sms1, modulant son activité de répression en association avec ScRgt1.

En résumé, Mth1 sert d'abord à la répression des gènes *HXT* en absence de glucose alors que Std1 régule plutôt la répression des gènes *HXT* pendant la transition à l'état sans glucose (Sabina and Johnston, 2009). Puisque les rôles de Std1 et Mth1 ne sont pas complètement redondants, cela suggère des différences dans leur implication dans le complexe de répression ScRgt1/Ssn6-Tup1/Std1/Mth1. Toutefois, ces différences ne sont pas connues. Enfin, Std1 et Mth1 sont probablement des acteurs d'autres voies de régulation : en effet, Std1 interagit par exemple avec le facteur de transcription Cat8 (Ito et al., 2001) et une protéine de tri vacuolaire Mvp1 (Vollert and Uetz, 2004). Mth1 interagit entre autres avec Nhx1, une pompe Na^+/H^+ de la membrane des organelles (Mitsui et al., 2010), et Msk1, la lysine-ARNt synthétase mitochondriale (Brandina et al., 2007).

Chez *K. lactis*, l'homologue de *MTH1* et *STD1* est *SMS1*. La protéine est identique à 50 % à Std1 et Mth1, et pourtant, un mutant $\Delta sms1$ ne peut être complété ni par *MTH1*, ni par *STD1* (ensemble ou séparément) (Hnatova et al., 2008). Comme dans le mutant $\Delta Klrgt1$, l'expression de *RAG1* est déréprimée en absence de glucose dans un mutant $\Delta sms1$ (Rolland et al., 2006; Hnatova et al., 2008). Des études d'épistasie ont placé Sms1 dans la voie de signalisation du glucose dépendante de Rag4 (voir page 46), en aval de *RAG4*, *RAG8* et *KIGRR1* (Hnatova et al., 2008).

Similairement à ce qui est observé chez *S. cerevisiae* pour *MTH1*, *SMS1* est régulé au niveau transcriptionnel et protéique par le glucose : l'expression du gène *SMS1* est réprimée en absence de glucose par *K/Rgt1* qui se fixe au promoteur de *SMS1* (qui contient sept séquences consensus de Rgt1). De plus, Sms1 est rapidement dégradé en présence de glucose extracellulaire. Comme pour Mth1 chez *S. cerevisiae*, la dégradation de Sms1 nécessite la présence de la caséine kinase de type I Rag8 ainsi que du complexe d'ubiquitination SCF^{KlGrr1} (voir page 44). Ceci suggère qu'en présence de glucose, Sms1 est phosphorylé par Rag8 puis ubiquitiné par le complexe SCF^{KlGrr1} avant d'être dégradé par le

protéasome (Hnatova et al., 2008). Sms1 interagit à la fois avec *K/Rgt1* et *Rag4*, le senseur du glucose, ce qui suggère que le signal glucose issu de *Rag4* (voir page 42) passe par Sms1 (et sa dégradation) avant d'affecter la phosphorylation de *K/Rgt1* et de permettre l'expression de *RAG1* (Figure 12), comme cela a été montré chez *S. cerevisiae* (Hnatova et al., 2008). La sérine 112 de *Mth1* qui est phosphorylée par la PKA (Ma et al., 2013) n'est conservée ni pour *Std1* ni pour Sms1. Par contre, le site MPPP (acides aminés 347 à 350 de *Mth1*) d'interaction avec la phosphatase *Psy2* (Ma et al., 2013) est fidèlement conservé dans les trois protéines. Enfin, *PSY2* est conservé chez *K. lactis*. A ce jour, les liens entre Sms1 et la PKA ou Sms1 et *Snf1* n'ont pas été étudiés.

2. d. ii. Les activateurs transcriptionnels des gènes des perméases au glucose de faible affinité

Plusieurs activateurs transcriptionnels ont été mis en évidence dans la régulation de l'expression des gènes des perméases au glucose chez les levures. Chez *S. cerevisiae*, *ScRgt1* a été décrit comme un activateur transcriptionnel dans certains cas. Chez *K. lactis*, deux activateurs transcriptionnels de l'expression de *RAG1* ont été décrits. Il s'agit des protéines *Sck1* et *K/Snf2*, leur activité sur l'expression des gènes *HXT* n'est pas connue chez *S. cerevisiae*.

- *ScRgt1* comme activateur transcriptionnel

Chez *S. cerevisiae*, le répresseur *ScRgt1* a également été décrit comme un activateur de la transcription dans certains cas : sa délétion ne permet pas l'induction complète des gènes *HXT* en présence de glucose (Özcan et al., 1996b; Özcan and Johnston, 1995) et la phosphorylation par la PKA d'une des sérines S202, S283 ou S284, changerait *ScRgt1* en un activateur (Mosley et al., 2003; Jouandot et al., 2011). L'importance d'une séquence de *ScRgt1* (acides aminés 320 à 390, voir page 27) pour cette fonction activatrice a été montrée (Polish et al., 2005).

Le mécanisme d'activation par *ScRgt1* n'a pas été expliqué. Certaines des expériences montrant le rôle d'activateur transcriptionnel de *ScRgt1* ont été réalisées en utilisant une fusion *LexA-ScRgt1*, mais un papier récent a démontré que cette fusion se lie de manière constitutive au promoteur de *HXT1*, remettant en cause les résultats précédents (Roy et al., 2014a).

- L'activateur transcriptionnel *Sck1*

Le gène *SCK1* a été identifié chez *K. lactis* comme un suppresseur de mutation de la caséine kinase I *Rag8*, lorsqu'il est exprimé en multi-copies (Lemaire et al., 2002). Sa délétion entraîne un phénotype *Rag⁻*, et *SCK1* a été identifié comme étant muté dans les mutants *rag16* et *rag21*. *Sck1* est un facteur transcriptionnel de la famille Myc, ubiquitaire chez tous les eucaryotes. Il possède un domaine bHLH (basic-helix-loop-helix) qui est un domaine de fixation à l'ADN sur une séquence consensus CANNTG appelée E-box (Robinson and Lopes, 2000). La protéine comprend 281 acides aminés, le domaine bHLH se trouve entre les acides aminés 168 et 281, et un domaine activateur est situé à l'extrémité N-terminale de la

protéine (Lemaire et al., 2002). L'expression de *SCK1* est induite par le glucose et réprimée par *KIRgt1* (son promoteur possède des sites consensus de fixation de Rgt1) (Neil et al., 2007), et elle est également affectée dans un mutant $\Delta Kleno$ (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004). Sck1 est impliqué dans la régulation des gènes glycolytiques *KIPGI* et *KIHXX*, mais aussi des gènes de la pyruvate décarboxylase *KIPDC* et de la perméase au glucose *RAG1* (Lemaire et al., 2002). La fixation de Sck1 aux promoteurs de *RAG1* et de *KIHXX* a été démontrée *in vitro* et *in vivo* (Neil et al., 2007) (Figure 12).

Outre la régulation transcriptionnelle du gène *SCK1*, la protéine Sck1 est régulée au niveau post-traductionnel, indépendamment de la présence de glucose extracellulaire, et donc de la voie de signalisation du glucose par le senseur Rag4. La stabilisation de Sck1 nécessite la caséine kinase I Rag8, et probablement sa phosphorylation par Rag8 (Neil et al., 2007).

Sck1 partage 38 % d'identité avec la protéine Tye7 (=Sgc1) de *S. cerevisiae*. Un mutant $\Delta sck1$ est partiellement complété par l'expression de *TYE7* (Lemaire et al., 2002). Tye7 est également un facteur transcriptionnel à domaine bHLH, qui a été décrit comme un activateur de l'expression des gènes glycolytiques (phosphoglycérate mutase, énoïase et pyruvate kinase) (Sato et al., 1999; Chen and Lopes, 2007). Comme Sck1 chez *K. lactis*, la stabilité de Tye7 est finement régulée. Cependant, contrairement à Sck1, la quantité de Tye7 diminue rapidement après un changement vers un milieu sans glucose, et l'expression de *TYE7* ne change pas en fonction de la source de carbone (Benanti et al., 2007). Contrairement à Mth1/Std1, Tye7 est une cible du complexe d'ubiquitination SCF^{Grr1} en absence de glucose. Comme Sck1 chez *K. lactis*, Tye7 est phosphorylée *in vivo* et stabilisée sous cette forme, mais la kinase impliquée n'a pas été mise en évidence (Benanti et al., 2007).

Ainsi, Sck1 et Tye7 ont des rôles similaires dans la régulation de la glycolyse. Les deux protéines sont phosphorylées pour être stabilisées, par contre le glucose n'a pas le même effet sur leur stabilité et leur expression. Chez *S. cerevisiae*, il a été suggéré que l'activation des gènes *HXT* par *ScRgt1* pouvait résulter de la levée de la répression de l'expression d'un activateur transcriptionnel des gènes *HXT* (Mosley et al., 2003). Chez *S. cerevisiae* aucun activateur connu n'a le bon profil, mais chez *K. lactis*, Sck1 pourrait correspondre à cet activateur. Toutefois, chez *S. cerevisiae*, l'implication de Tye7 dans la régulation des gènes *HXT* n'a jamais été démontrée.

- Le facteur de remodelage de la chromatine *KISnf2*

KISNF2 a été identifié comme étant le gène muté dans le mutant *rag20* (Cotton et al., 2012). Il code pour une protéine homologue au facteur de remodelage de la chromatine de *S. cerevisiae*, *ScSnf2*, et il intervient dans l'activation de l'expression de *RAG1*. *KISnf2* ne possède pas de domaine de fixation à l'ADN mais il est présent sur le promoteur de *RAG1* et de *KIHXX*, indépendamment de la présence de glucose extracellulaire (Cotton et al., 2012). La présence sur le promoteur de *KISnf2* favorise le recrutement de l'activateur

transcriptionnel Sck1 (Figure 12). En plus de ce rôle transcriptionnel, *K/Snf2* semble également avoir un rôle dans la signalisation du glucose puisque les modifications post-traductionnelles des répresseurs *K/Rgt1* et *Sms1* sont affectées dans un mutant $\Delta K/snf2$ (Cotton et al., 2012).

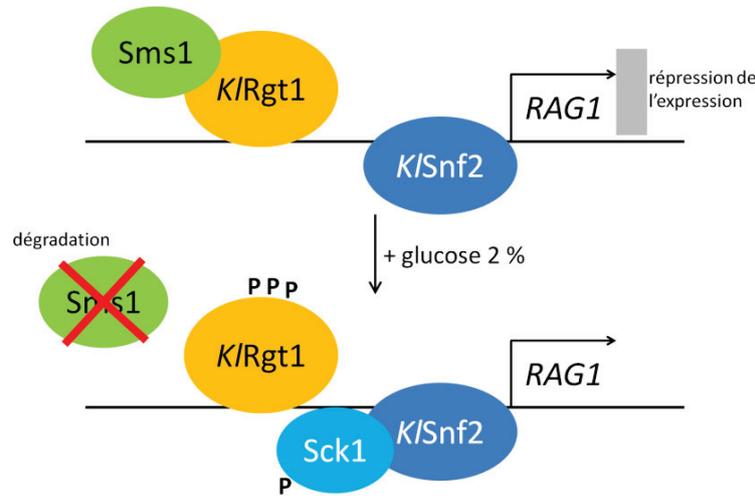


Figure 12: Chez la levure *K. lactis*, l'expression du gène de la perméase au glucose *RAG1* est régulée par deux répresseurs *K/Rgt1* et *Sms1* et deux activateurs transcriptionnels *K/Snf2* et *Sck1*. L'ensemble de ces régulateurs transcriptionnels régule aussi l'expression du gène glycolytique *K/HXK*.

K/Snf2 est identique à *ScSnf2* à 59 %. *ScSnf2* est la sous-unité catalytique principale du complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF dépendant de l'ATP. Ce complexe, bien que non essentiel, a un rôle prédominant puisqu'il intervient dans la transcription d'environ 5 % du génome de *S. cerevisiae* (Sudarsanam et al., 2000). La délétion de *SNF2* affecte notamment l'expression des gènes *HXT1*, 3, 6 et 7, mais seulement en milieu synthétique (Sudarsanam et al., 2000). Il régule la transcription en recrutant la polymérase d'ARN de type II ou en interagissant avec des facteurs de transcription spécifiques (Prochasson et al., 2003). Le rôle du complexe SWI/SNF dans la régulation de l'expression des gènes *HXT* n'a jamais été analysé. Un autre complexe de remodelage de la chromatine a été décrit dans la régulation des gènes *HXT*, il s'agit du complexe *Ssn6-Tup1*, mais son action est antagoniste à celle du complexe SWI/SNF (Fleming and Pennings, 2001).

2. e. La régulation de la stabilité membranaire des perméases au glucose

En plus d'être régulées au niveau transcriptionnel, les perméases au glucose sont régulées de manière post-traductionnelle : comme de nombreux transporteurs membranaires, leur stabilité et leur présence à la membrane plasmique sont régulées en fonction de la disponibilité de leur substrat (Horák, 2003; Haguenaer-Tsapis and André, 2004; Horák, 2013).

Selon leur affinité pour le glucose, les perméases de *S. cerevisiae* sont internalisées en absence ou en présence de glucose, et leur dégradation est observée entre trois et huit

heures après le changement de source de carbone dans le milieu de culture. Hxt2 (Kruckeberg et al., 1999), Hxt5 (van Suylekom et al., 2007), Hxt6 (Krampe et al., 1998) et Hxt7 (Krampe et al., 1998; Krampe and Boles, 2002; Snowdon et al., 2008) sont internalisées et dégradées par un processus appelé dégradation des catabolites qui vise à diminuer le nombre de perméases de forte affinité lorsque du glucose fortement concentré est disponible. Pour Hxt6 et Hxt7, l'ubiquitination, l'endocytose et la dégradation dans la vacuole des perméases ont été montrées. La voie de signalisation du glucose dépendante de Snf3 et Rgt2 n'est pas impliquée dans le signal de dégradation (Krampe et al., 1998). Pour Hxt7, sa queue cytoplasmique N-terminale est requise pour la dégradation de la protéine. Elle contient une séquence PEST, qui est une séquence signal potentielle pour la dégradation protéolytique, retrouvée dans les domaines cytoplasmiques de nombreuses protéines membranaires (Rogers et al., 1986; Rechsteiner and Rogers, 1996). Cependant, des mutations ponctuelles de cette séquence PEST ne perturbent pas la dégradation de Hxt7 (Krampe and Boles, 2002). Une séquence PEST est également prédite dans la boucle cytoplasmique interne de Hxt5 mais ne semble pas être impliquée dans l'internalisation et la dégradation de la protéine (van Suylekom et al., 2007). La dégradation de Hxt5 nécessite sa phosphorylation avant son internalisation dans des vésicules et corps multi-vésiculaires ainsi que dans la vacuole, mais ne semble pas requérir l'ubiquitination de la protéine (van Suylekom et al., 2007). En effet, les mécanismes d'internalisation et dégradation des protéines membranaires peuvent être dépendants ou indépendants de l'ubiquitination (Horák, 2013).

Les perméases de faible affinité Hxt1 (Roy et al., 2014b) et Hxt3 (Snowdon et al., 2009) sont également internalisées et dégradées en absence ou en présence de très faibles concentrations de glucose dans le milieu extracellulaire. Enfin, les perméases au glucose sont endocytosées et dégradées après l'exposition à certaines drogues : Hxt1 et Hxt7 sont dégradés dans la vacuole après traitement à la rapamycine, qui est un inhibiteur de TORC1 (Schmelzle et al., 2004; Snowdon et al., 2008) et la dégradation de Hxt1, Hxt2 et Hxt3 a également été montrée après traitement au méthylglyoxal, qui est un produit dérivé de la glycolyse entraînant la glycation des protéines (Yoshida et al., 2011).

Même si leur dégradation n'est pas induite par les mêmes conditions, les mécanismes impliqués dans la dégradation des différentes perméases au glucose présentent des similarités (Figure 13) : l'E3 ubiquitine ligase Rsp5, ainsi que l'inactivation de la voie de signalisation Ras/cAMP/PKA sont nécessaires à la dégradation de Hxt1, Hxt3 et Hxt7 (Schmelzle et al., 2004; Snowdon et al., 2008; Snowdon and van der Merwe, 2012; Roy et al., 2014b). Le complexe Vid30, qui est une autre E3 ubiquitine ligase, est impliqué dans la dégradation de Hxt3 et Hxt7 (Snowdon et al., 2008; Snowdon and van der Merwe, 2012).

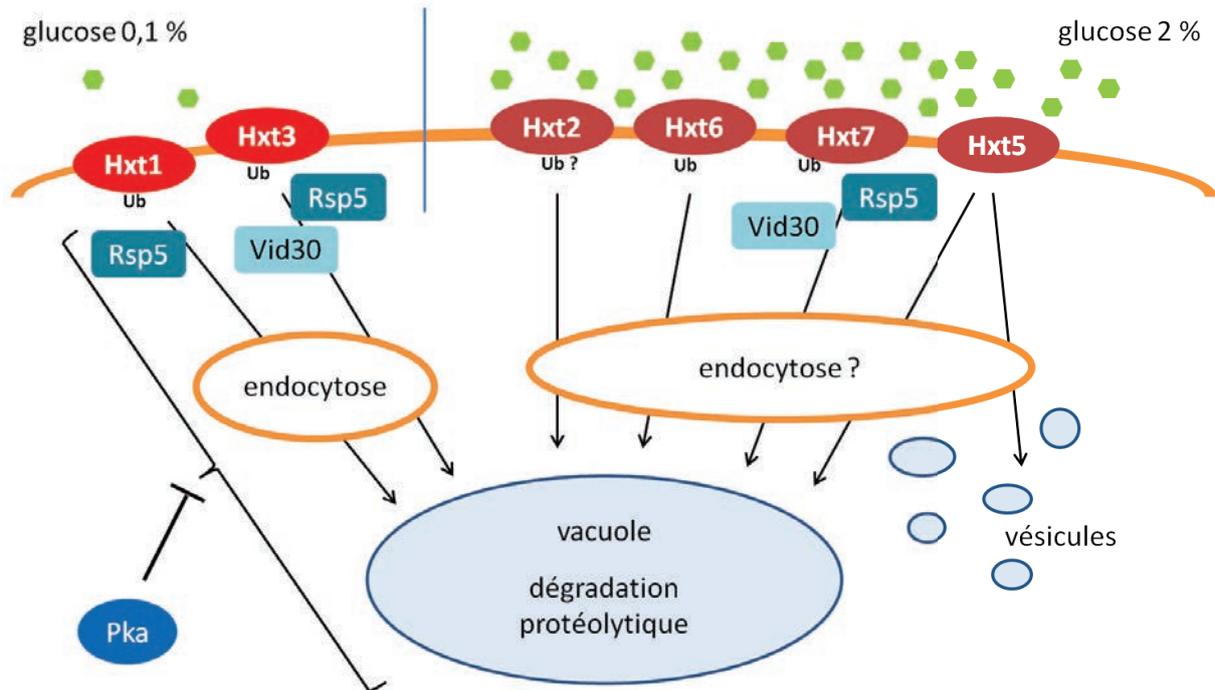


Figure 13: Représentation schématique de la dégradation des perméases du glucose et des processus impliqués. Ub : ubiquitine. L'ubiquitination des perméases est nécessaire pour la dégradation de Hxt1, 3, 6 et 7, et n'a pas été analysée pour Hxt2. L'inactivation de la PKA ainsi que l'ubiquitine ligase Rsp5 sont requises pour l'endocytose et la dégradation de Hxt1, 3 et 7. Une autre ubiquitine ligase, le complexe Vid30, est également requise pour l'endocytose de Hxt3 et 7.

3. Les voies de signalisation du glucose et de contrôle de l'expression des gènes des perméases au glucose chez les levures

La principale voie de régulation de l'expression des gènes des perméases au glucose chez les levures est la voie dépendante des senseurs du glucose Rgt2/Snf3, qui sera détaillée dans cette partie. D'autres voies de signalisation du glucose jouent aussi un rôle dans le contrôle de l'expression des gènes des perméases : il s'agit notamment de la voie dépendante de la PKA, et de la voie de la répression glucose. Enfin, certaines voies jouant un rôle soit dans la signalisation du glucose, soit dans l'expression des gènes des perméases seront rapidement présentées.

3. a. La voie de signalisation du glucose dépendante des senseurs Rgt2/Snf3/Rag4

La voie dépendante des senseurs Rgt2 et Snf3 chez *S. cerevisiae*, ou Rag4 chez *K. lactis* comprend les senseurs membranaires, des caséines kinase de type I et un complexe d'ubiquitination, qui sont décrits dans la suite de cette partie. Ces différents régulateurs contrôlent des répresseurs ou activateurs transcriptionnels décrits auparavant (la cible principale étant le répresseur Rgt1, voir pages 25 à 34), qui eux-mêmes contrôlent l'expression des gènes des perméases au glucose (voir page 23 et 24).

3. a. i. Les senseurs membranaires du glucose chez les levures

Comme les perméases au glucose, les senseurs membranaires du glucose appartiennent à la famille de transporteurs Major Facilitator Superfamily (MFS, voir page 23). En plus de présenter une structure en douze domaines transmembranaires avec une boucle interne cytoplasmique qui relie les domaines transmembranaires 6 et 7, les senseurs du glucose sont caractérisés par une queue C-terminale cytoplasmique (entre 200 et 350 résidus), qui contient une à deux séquences d'environ 25 acides aminés conservés parmi ces senseurs (Özcan et al., 1996a). Ils ne sont pas capables de transporter le glucose, mais ils sont nécessaires à l'activation de l'expression des gènes des perméases au glucose en transmettant le signal glucose (Özcan and Johnston, 1999).

- Les senseurs du glucose chez *S. cerevisiae* : Snf3 et Rgt2

S. cerevisiae possède deux senseurs du glucose paralogues, Snf3 et Rgt2, capable de détecter également le fructose et le mannose. Ils partagent environ 60 % d'identité, surtout pour les domaines transmembranaires et la boucle interne cytoplasmique (Özcan et al., 1996a). La structure de Rgt2 et Snf3 est montrée dans la Figure 14.

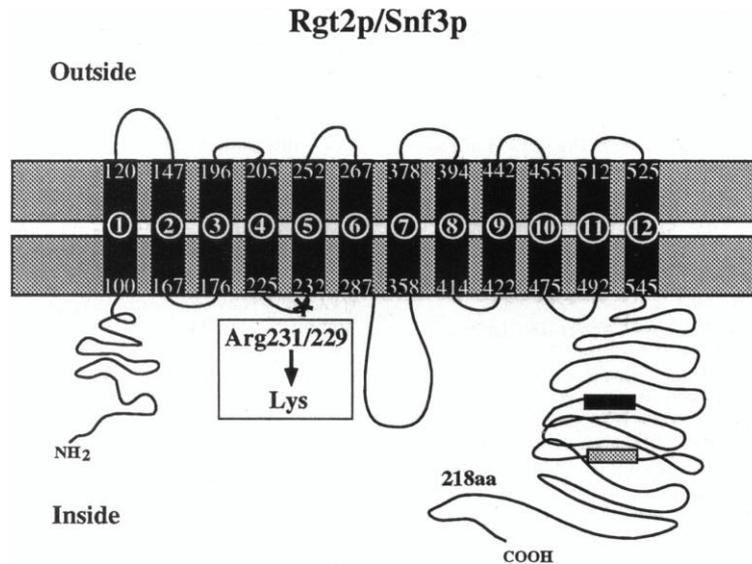


Figure 14: Structure des senseurs du glucose Rgt2 et Snf3 (Özcan et al., 1996a). Les domaines transmembranaires sont représentés par des rectangles numérotés de 1 à 12. Les mutations dominantes *RGT2-1* et *SNF3-1* sont indiquées par un astérisque pour l'arginine 231 (*RGT2-1*) et 229 (*SNF3-1*). Selon les prédictions, ce résidu se trouve ou non dans le cinquième domaine transmembranaire. Les rectangles noirs/gris de la queue C-terminale indiquent la séquence conservée entre Rgt2 et Snf3 ; Snf3 possède deux exemplaires de ce domaine (rectangle noir et gris hachuré).

En présence de faibles concentrations de glucose, Snf3 est un senseur qui régule l'expression des gènes des perméases au glucose de haute affinité *HXT2* et *HXT4*, alors qu'en présence de fortes concentrations de glucose, Rgt2 active l'expression des perméases de faible affinité *HXT1* et *HXT3*. L'expression de *RGT2* n'est pas régulée par le glucose alors que l'expression de *SNF3* est induite par de faibles concentrations de glucose extracellulaire (< 0,5 %) (Özcan et al., 1996a; Kaniak et al., 2004; Roy and Kim, 2014). A leur niveau d'expression maximale respectif, *RGT2* est exprimé 100 fois moins que *HXT1*, et *SNF3* est exprimé 2 à 3 fois plus que *RGT2* (Özcan et al., 1996a). La surexpression de *RGT2* ou de *SNF3* entraîne l'expression constitutive de *HXT1* et *HXT2* (Özcan et al., 1998).

Snf3 possède une queue C-terminale cytoplasmique caractéristique composée de 341 acides aminés, celle de Rgt2 comprend 218 acides aminés. Le rôle de cette queue C-terminale cytoplasmique dans la signalisation du glucose a été particulièrement étudié. De nombreuses études ont cherché à déterminer la fraction de la queue C-terminale nécessaire à la signalisation du glucose. Deux stratégies ont été adoptées : la troncation en C-terminale d'une partie de la protéine (les résultats obtenus sont listés dans le Tableau 6) et la surexpression de portions de la queue C-terminale.

Lorsqu'on considère les études de la protéine tronquée, l'importance pour la signalisation du glucose d'une séquence de 25 acides aminés conservés dans la queue C-terminale est soulignée. Cette séquence est présente une fois dans Rgt2 (acides aminés 666 à 692) et deux fois dans Snf3 (acides aminés 678 à 705 et 776 à 792). Cette séquence de 25 acides aminés est présentée dans le Tableau 6 et sa localisation est schématisée dans la Figure 14. Cependant, dans Snf3, il est suggéré qu'un seul des deux sites suffit pour que la protéine soit fonctionnelle (Vagnoli et al., 1998). Toutefois, le rôle précis de cette séquence dans la propagation du signal glucose n'est pas élucidé.

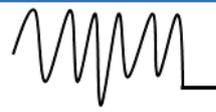
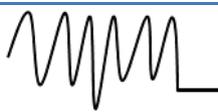
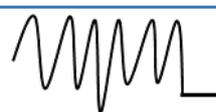
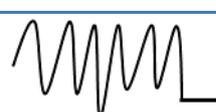
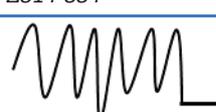
Mutations de la queue C-terminale des senseurs Rgt2 et Snf3			
Rgt2 (queue C-terminale : acides aminés 546 à 763)		Snf3 (queue C-terminale : acides aminés 544 à 884)	
			
 <i>Δ546-763</i>	protéine stabilisée, fonctionnalité non analysée (Roy and Kim, 2014)	 <i>Δ580-884</i>	non fonctionnel (Coons et al., 1997)
 <i>Δ579-763</i>	fusionné à queue C-ter de Hxt1 (547-570), fonctionnel seulement quand surexprimé (Moriya and Johnston, 2004)	 <i>Δ614-884</i>	non fonctionnel (Marshall-Carlson et al., 1990; Özcan et al., 1998)
 <i>Δ621-763</i>	protéine partiellement stabilisée, fonctionnalité non analysée (Roy and Kim, 2014)	 <i>Δ692-884</i>	non fonctionnel (Coons et al., 1997)
 <i>Δ666-763</i>	non fonctionnel (Özcan et al., 1998)	 <i>Δ706-884</i>	partiellement fonctionnel (Coons et al., 1997)
 <i>Δ696-763</i>	partiellement fonctionnel (Özcan et al., 1998)	 <i>Δ722-884</i>	partiellement fonctionnel (Coons et al., 1997)
 <i>Δ721-763</i>	dégradation normale, fonctionnalité non analysée (Roy and Kim, 2014)	 <i>Δ814-884</i>	partiellement fonctionnel (Özcan et al., 1998)
 <i>K637A, K657A, K637A K657A</i>	protéine partiellement stabilisée, fonctionnalité non analysée (Roy and Kim, 2014)	 <i>Δ694-716</i>	fonctionnel (Vagnoli et al., 1998)
Séquence conservée : (Y/L) (V/M) DLGNGL (G/A) LN (T/A) YNRGPPS (I/L) (I/S/L) (S/M) (D/N) S (S/T)			

Tableau 6: Liste des mutations étudiées dans les queues cytoplasmiques des senseurs du glucose de *S. cerevisiae* Rgt2 et Snf3, et des phénotypes observés. Une représentation schématique des senseurs est présentée, avec les douze domaines transmembranaires et la queue C-terminale tronquée à divers endroits. Les rectangles noirs représentent les séquences très conservées. Les étoiles rouges représentent des mutations ponctuelles. Le rectangle blanc montre une délétion interne.

Plusieurs études ont cherché à déterminer si l'expression de la queue C-terminale seule suffit à produire un signal glucose :

- La surexpression de la queue C-terminale de Snf3 suffit à compléter le défaut de croissance dans un milieu glucose faiblement concentré mais ne permet pas un transport de glucose fonctionnel (Coons et al., 1997).

- La surexpression de la queue cytoplasmique de Rgt2 ne permet pas l'induction de HXT1 (Moriya and Johnston, 2004).
- L'expression ou la surexpression de la queue C-terminale de Snf3 dans un mutant $\Delta snf3$ suffirait à induire l'expression de HXT7 et de HXT2 en présence de source de carbone non-fermentable (Dlugai et al., 2001; Vagnoli et al., 1998).
- L'induction des gènes HXTs est améliorée par l'ancrage à la membrane de la queue C-terminale de Snf3 ou de Rgt2 : dans ces conditions, Snf3 induit l'expression constitutive de HXT2 et Rgt2 celle de HXT1 (Vagnoli et al., 1998; Moriya and Johnston, 2004).
- Des chimères formées de transporteurs du glucose couplés à la queue C-terminale d'un des deux senseurs sont capables de rétablir une signalisation du glucose partielle (Özcan et al., 1998; Dlugai et al., 2001).

Ces différentes études suggèrent un rôle d'amplificateur du signal pour la queue C-terminale des senseurs. Elle est nécessaire à la propagation du signal glucose, et serait suffisante quand elle est surexprimée et ancrée à la membrane.

La queue cytoplasmique de Snf3 interagit avec la membrane plasmique, indépendamment de la présence de glucose (Dlugai et al., 2001). De plus, la queue C-terminale de Rgt2 et de Snf3 interagit avec les corépresseurs Mth1 et Std1 en double-hybride dans le cadre de la transmission du signal glucose (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000). La queue C-terminale de Snf3 est phosphorylée (Dlugai et al., 2001), ce qui a été confirmé par des études de phosphoprotéomique qui ont identifiés deux sites : T561 et S629 (motif caséine kinase II) (Ptacek et al., 2005; Bodenmiller et al., 2010).

Enfin, les domaines transmembranaires sont responsables de la topologie des senseurs et seraient impliqués dans la détection de la molécule glucose. Certaines mutations de ces domaines transmembranaires affectent la détection du glucose (Tableau 7).

Mutations ponctuelles dans les domaines transmembranaires des senseurs du glucose			
Rgt2		Snf3	
<i>R231K</i>	signal glucose constitutif (Özcan et al., 1996a), protéine stabilisée (Roy and Kim, 2014)	<i>G112D</i>	pas de localisation membranaire (Marshall-Carlson et al., 1990)
<i>V404I</i>	pas de signal glucose (Moriya and Johnston, 2004)	<i>G153R</i>	pas de localisation membranaire (Marshall-Carlson et al., 1990)
<i>W529Y</i> <i>W529F</i>	pas de signal glucose, protéine déstabilisée (Roy and Kim, 2014)	<i>R229K</i>	signal glucose constitutif (Özcan et al., 1996a), protéine stabilisée (Roy and Kim, 2014)
		<i>I374V</i>	détection du fructose et du mannose partiellement abolie (Dietvorst et al., 2010)
		<i>V402I</i>	protéine non-fonctionnelle mais localisation correcte (Marshall-Carlson et al., 1990)
		<i>F462Y</i>	détection du fructose abolie (Dietvorst et al., 2010)

Tableau 7: Liste des mutations étudiées pour les domaines transmembranaires des senseurs du glucose de *S. cerevisiae* Rgt2 et Snf3, et phénotypes associés, triées par numéro des acides aminés impliqués.

Ces différentes études suggèrent que les senseurs du glucose fonctionnent comme des perméases au glucose bloquées dans la conformation « tournée vers l'extérieur ». La fixation

du glucose dans le site de détection provoquerait un changement conformationnel qui entrainerait la propagation du signal glucose par la queue C-terminale cytoplasmique. Cependant, une étude suggère que le senseur Snf3 est inhibé par de fortes concentrations de glucose intracellulaire, ce qui signifierait qu'il est sensible au glucose intracellulaire, directement ou non (Karhumaa et al., 2010).

Enfin, la régulation de la stabilité des senseurs du glucose Snf3 et Rgt2 en fonction de la concentration en glucose extracellulaire a été récemment mise en évidence (Roy and Kim, 2014). Rgt2 est stabilisé par des concentrations en glucose supérieures à 0,25 %, et Snf3 par des concentrations inférieures à 0,25 %. Ainsi, les conditions dans lesquelles les senseurs ne sont pas actifs entraînent leur ubiquitination et leur endocytose suivies de leur dégradation dans la vacuole.

- Le senseur du glucose chez *K. lactis* : Rag4

La levure *K. lactis* possède un unique senseur du glucose codé par le gène *RAG4*, qui partage plus de 60 % d'identité avec les senseurs du glucose de *S. cerevisiae* Rgt2 et Snf3. Sa queue cytoplasmique C-terminale contient 252 acides aminés. Dans cette queue, la séquence conservée entre les senseurs Rgt2 et Snf3 est également présente dans Rag4, entre les acides aminés 646 et 670. Rag4 a été caractérisé comme un senseur du glucose pour des faible et haute concentrations, qui contrôle l'expression des gènes des perméases au glucose *HGT1* et *RAG1* (Betina et al., 2001). Dans un mutant *rag4-1*, l'expression de *RAG1* est affectée mais la croissance en milieu glucose (faible et forte concentrations) n'est pas complètement abolie, grâce à la perméase Hgt1. Dans les souches de *K. lactis* dans lesquelles la répression glucose est effective (voir page 55), la mutation *rag4-1* induit un relâchement de la répression glucose sur les gènes du métabolisme du lactose, du galactose, du lactate et de l'éthanol (Betina et al., 2001). Le mutant *rag4-1* peut être indifféremment complétement par les gènes de *S. cerevisiae* *SNF3* ou *RGT2* (Betina et al., 2001). Enfin, l'expression de *RAG4* n'est pas régulée par le glucose extracellulaire (Betina et al., 2001).

L'interaction du senseur Rag4 avec différents acteurs de la signalisation du glucose a été démontrée par double-hybride : avec la caséine kinase de type I Rag8 (Rolland et al., 2006), ainsi que avec le corépresseur transcriptionnel Sms1 (Hnatova et al., 2008).

3. a. ii. Les caséine kinases Yck1/Yck2 et Rag8

Les caséine kinases de type I Yck1 et Yck2 (*S. cerevisiae*) ou Rag8 (*K. lactis*) ont été caractérisées comme des intermédiaires dans la signalisation du glucose entre les senseurs Rgt2/Snf3 ou Rag4 et les corépresseurs transcriptionnels Mth1/Std1 ou Sms1 (Moriya and Johnston, 2004; Rolland et al., 2006).

Les caséine kinases sont des kinases ubiquitaires chez les eucaryotes. Les kinases de *S. cerevisiae*, Yck1/Yck2, sont homologues aux caséine kinases de type I γ chez les mammifères (Zhai et al., 1995). Yck1 et Yck2 sont des sérine/thréonine kinases, et la paire de gènes *YCK1* et *YCK2* est essentielle (Robinson et al., 1992). Yck1 et Yck2 portent un signal de

palmitoylation à l'extrémité C-terminale des protéines (Cys-Cys), qui est responsable de leur localisation membranaire (Feng and Davis, 2000; Babu et al., 2002; Pasula et al., 2010). Leur palmitoylation est dépendante de Akr1, une palmitoyl transférase (Feng and Davis, 2000; Roth et al., 2002) et la localisation membranaire de Yck1/2 est nécessaire à leur fonction (Vancura et al., 1994). Le signal complet de palmitoylation par Akr1 de Yck2 nécessite les deux cystéines à l'extrémité C-terminale, mais aussi l'ensemble des dix derniers acides aminés en C-terminal et une séquence de plus de cent acides aminés, faiblement conservée et riche en glutamine (Roth et al., 2011).

Le site consensus de phosphorylation par les caséine kinase de type I a été mis en évidence par plusieurs études avec certaines variations. Les sites suivants ont été proposés (Kennelly and Krebs, 1991) : $S^P X_{1-3}(S^*/T^*)$, S^P étant une sérine pré-phosphorylée, et X un acide aminé quelconque dont le nombre peut varier de 1 à 3, ou $(D/E_{2-4})X_{0-2}(S^*/T^*)$ avec un nombre de E entre 2 et 4 et un nombre de X entre 0 et 2. La phosphorylation par la caséine kinase a lieu sur la sérine ou thréonine marquée d'un astérisque. Dans une analyse de phosphoprotéomique, c'est le site $S^*XX(D/E)$ qui est retenu pour Yck2 (Ptacek et al., 2005), alors que le site $SXXS$ est également retenu pour les caséine kinases de type I chez les levures (Moriya and Johnston, 2004). Chez les mammifères, il est fréquent, mais pas toujours requis, que les sites consensus des caséine kinases soient préphosphorylés par d'autres kinases : site $(S/T)^P X_{1-2}(S^*/T^*)$ (Knippschild et al., 2005; Cheong and Virshup, 2011).

Yck1/2 interviennent chez *S. cerevisiae* dans la signalisation du glucose dépendante des senseurs Rgt2/Snf3. En effet, il a été suggéré puis montré que les corépresseurs transcriptionnels, Mth1 et Std1, sont phosphorylés par Yck1/2, ce qui entraîne leur dégradation (Moriya and Johnston, 2004). Les corépresseurs Mth1 et Std1 portent des sites $SXXS$ dont la mutation entraîne leur stabilisation et l'expression constitutive du gène de la perméase au glucose *HXT1*. Enfin, l'interaction de Yck1 avec le senseur membranaire Rgt2 a été montrée *in vivo* grâce à un système de « split-ubiquitine », et cette interaction est nécessaire pour la transmission du signal glucose. De plus, l'expression d'une protéine-chimère composée de Yck1 et de la queue C-terminale de Rgt2 entraîne l'expression constitutive de *HXT1* (Moriya and Johnston, 2004). Cependant, le modèle suggérant que la phosphorylation de Mth1 par Yck1 permet de transmettre le signal glucose de la membrane vers le noyau a été remis en cause par des résultats qui montrent que Mth1 est une protéine qui reste dans le noyau, en présence ou non de glucose, et ne peut donc pas être phosphorylé par la kinase Yck1 qui est ancrée à la membrane (Pasula et al., 2010).

Récemment, il a été montré que la quantité de Yck1/2 est régulée par la source de carbone : en effet, les caséine kinases seraient stabilisées seulement en présence de glucose dans le milieu. La superoxyde dismutase SOD1 interagit avec Yck1/2 et son activité enzymatique (production de H_2O_2) stabiliserait Yck1/2 (Reddi and Culotta, 2013). Ainsi, SOD1 régulerait l'activité des caséine kinases pour réprimer la respiration (voir page 52) en réponse à l'oxygène et au glucose.

Yck1 et Yck2 sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires en plus de la signalisation du glucose : l'internalisation de protéines membranaires (récepteurs,

perméases, transporteurs) (Horák, 2003), la voie de signalisation des acides aminés (Conrad et al., 2014), la morphogénèse (mise en place de la forme et de l'organisation d'une nouvelle cellule) (Robinson et al., 1993, 1999), le trafic vésiculaire (Panek et al., 1997), mais aussi la régulation de la traduction d'ARNm particuliers (Paquin et al., 2007) et l'activation de la pompe à proton/ATPase Pma1 (Estrada et al., 1996).

Chez la levure *K. lactis*, *RAG8*, l'orthologue de *YCK1/2* a été identifié et Rag8 partage 65-66 % d'identité avec Yck1/2 (Blaisonneau et al., 1997). *RAG8* est nécessaire à l'induction par le glucose de *RAG1*, le gène de la perméase au glucose. Rag8 intervient à plusieurs niveaux dans la signalisation du glucose : la caséine kinase interagit avec Rag4 pour promouvoir le signal glucose (Rolland et al., 2006), elle interagit également avec Sms1 et est nécessaire à sa dégradation (Hnatova et al., 2008). Enfin, Rag8 phosphoryle et stabilise l'activateur transcriptionnel de l'expression de *RAG1*, Sck1 (Neil et al., 2007).

3. a. iii. Le complexe ubiquitine-ligase E3 SCF^{Grr1}

L'ubiquitination est une étape nécessaire pour la dégradation de nombreuses protéines par le protéasome 26S (Willems et al., 2004). Le complexe SCF^{Grr1} est un complexe ubiquitine-ligase E3 dont la structure et les différents composants sont montrés dans la Figure 15. SCF est le sigle pour Skp1 + Cdc53/culline + protéine à E-box. La protéine à F-box est variable et est responsable de la reconnaissance spécifique du substrat. Une revue récente fait état de 22 protéines potentielles à F-box codées dans le génome de *S. cerevisiae* (Finley et al., 2012), dont Cdc4 et Grr1.

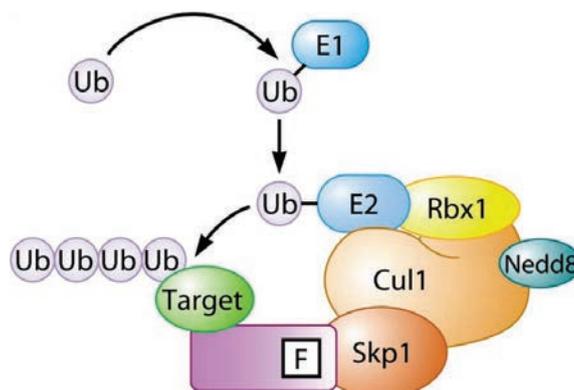


Figure 15: Le complexe d'ubiquitination SCF^{Grr1} (Jonkers and Rep, 2009). L'ubiquitination des protéines nécessite les complexes E1, E2 et E3. E1 est un complexe d'activation de l'ubiquitine, qui agit en amont de E2, le complexe de conjugaison de l'ubiquitine. E3 est le complexe ubiquitine-ligase, ici SCF^{Grr1}. Chez *S. cerevisiae*, le complexe comprend la culline Cdc53 (l'homologue de la culline humaine, Cul1) qui est la protéine de structure, avec laquelle interagissent d'autres protéines par l'extrémité C-terminale : Rbx1, qui est une protéine RING (= Hrt1), et Rub1, une protéine similaire à l'ubiquitine (homologue de Nedd8 chez l'homme) ; ou en N-terminal : une protéine adaptatrice Skp1, et la protéine à F-box (en violet), ici Grr1, qui est responsable de la spécificité du substrat reconnu (target, en vert). Ub : ubiquitine.

Dans la voie de signalisation du glucose dépendante de Snf3/Rgt2, nous nous intéresserons uniquement au complexe SCF avec Grr1 comme protéine à F-box. En effet, son implication dans la voie de signalisation du glucose a été démontrée (Özcan and Johnston, 1995). La protéine Grr1 contient un domaine F-box d'environ 40 acides aminés, qui sert à l'interaction

avec Skp1 (la protéine adaptatrice), et un domaine répété riche en leucine (LRR) qui intervient dans la reconnaissance du substrat (Bai et al., 1996; Skowyra et al., 1997). Le glucose hautement concentré renforce l'interaction entre Grr1 et Skp1 au sein du complexe SCF^{Grr1} (Li and Johnston, 1997). Grr1 est une protéine à la fois nucléaire et cytosolique (Blondel et al., 2005). La protéine Grr1 est elle-même une cible du complexe SCF^{Grr1} et est peu stable (Deshaies, 1999). Dans certains cas, le site de fixation de Grr1 sur le substrat est une séquence PEST (Blondel et al., 2005; Purnapatre et al., 2005), et le substrat doit être phosphorylé pour être reconnu (Hsiung et al., 2001).

La protéine à F-box Grr1 est nécessaire à l'induction par le glucose des gènes *HXT1* à 4 et *HXT6* (Özcan and Johnston, 1995; Liang and Gaber, 1996). Le niveau de phosphorylation du répresseur transcriptionnel ScRgt1 est dépendant de la dégradation par le protéasome 26S des corépresseurs Mth1 et Std1, après leur ubiquitination par le complexe SCF^{Grr1}, en réponse au glucose extracellulaire (Flick, 2003; Mosley et al., 2003; Kim et al., 2006). L'interaction de Mth1 avec Grr1 a été mise en évidence *in vivo* (Spielewoy et al., 2004), ainsi que l'ubiquitination de Mth1 et Std1, dépendante de Grr1 (Spielewoy et al., 2004; Kim et al., 2006). La phosphorylation de Mth1 et Std1 par les caséines kinase de type I Yck1/2 est requise pour leur dégradation en réponse au glucose extracellulaire (Moriya and Johnston, 2004). L'ubiquitination de Mth1 par le complexe SCF^{Grr1} a lieu dans le noyau (Pasula et al., 2010). Par ailleurs, l'activateur transcriptionnel des gènes glycolytiques Tye7 (voir pages 33 et 66) est dégradé suite à son interaction avec Grr1, ainsi que Pfk27, qui synthétise le fructose-2,6-bisphosphate (Benanti et al., 2007).

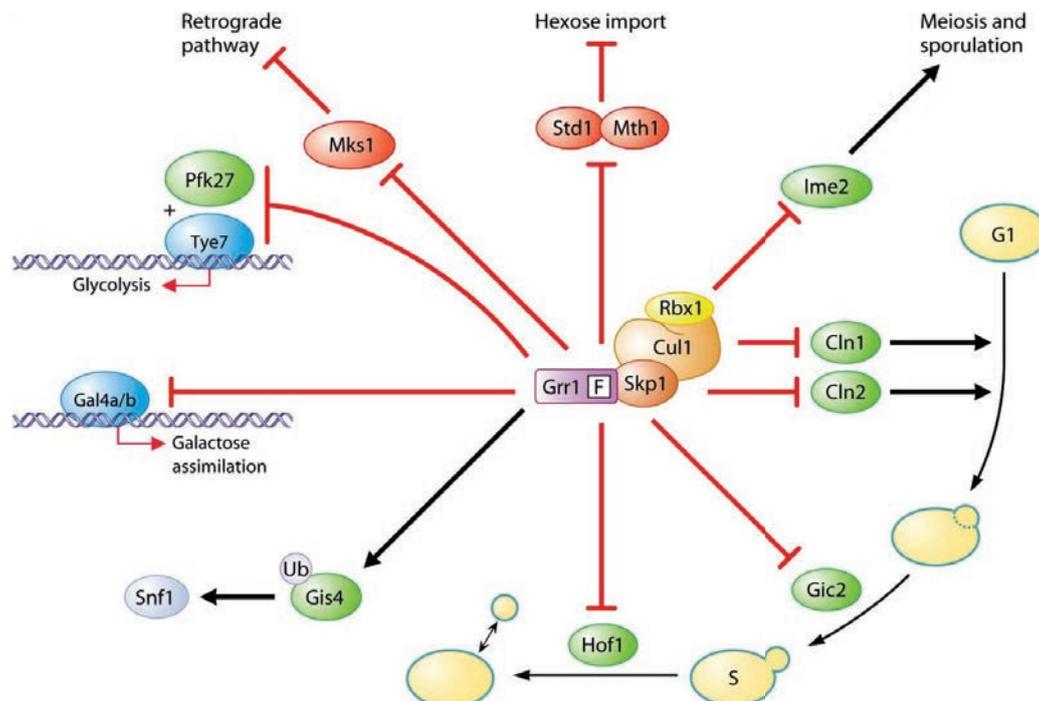


Figure 16: Les différents substrats et processus cellulaires ciblés par le complexe d'ubiquitination SCF^{Grr1} chez la levure *S. cerevisiae* (Jonkers and Rep, 2009). Les cibles qui sont des régulateurs négatifs sont en rouge, les régulateurs positifs sont en vert et les facteurs de transcription sont en bleu. Gis4 est impliqué dans la voie de la répression glucose, Mks1 est un répresseur transcriptionnel intervenant dans la voie Ras/cAMP, Ime1 est un régulateur de la méiose, Gic2 est une GTPase impliquée dans le bourgeonnement et Hof1 est requis pour la cytokinèse. Aux substrats déjà présents dans ce schéma, on

peut rajouter la protéine 14-3-3 Bmh2 qui est nécessaire à l'induction de *HXT1* par le glucose (Tomás-Cobos et al., 2005), ainsi que les protéines She3 et Med3 présentées ci-dessous.

En plus de son rôle dans la signalisation du glucose, Grr1 est un régulateur de la signalisation des acides aminés et de l'azote (Conrad et al., 2014), mais aussi de divers processus cellulaires (Figure 16). Plusieurs études ont analysées le transcriptome dans un mutant $\Delta grr1$: selon la stringence du test statistique retenu, l'expression de 68 et 232 gènes est altérée de manière spécifique (Westergaard et al., 2004), ce qui fait de Grr1 un régulateur transcriptionnel général. Parmi ces gènes, un grand nombre est sous le contrôle transcriptionnel des régulateurs ScRgt1 et Mig1, un répresseur transcriptionnel de la voie de répression glucose (voir pages 52 et suivantes) (Westergaard et al., 2004; Eckert-Boulet et al., 2005). En effet, Grr1 joue un rôle dans la voie de répression du glucose en régulant la répression des gènes *GAL* et la dégradation de la perméase au galactose Gal2, ainsi que dans la voie Ras/cAMP en contrôlant la stabilité de certains composants (Erickson and Johnston, 1994; Horak et al., 2002; Horak and Wolf, 2005). Grr1 joue un rôle dans le cycle cellulaire et la morphogenèse, en contrôlant notamment la stabilité des cyclines Cln1 et Cln2, et dans la méiose et la sporulation (Skowyra et al., 1999; Blondel et al., 2005; Purnapatre et al., 2005). Enfin, il a été montré plus récemment que Grr1 a un rôle dans la régulation des mécanismes transcriptionnels, en ciblant She3, impliqué dans le transport des ARNm, et Med3, qui intervient dans la régulation des gènes transcrits par la polymérase d'ARN de type II (Wang and Solomon, 2012; Gonzalez et al., 2014).

Chez la levure *K. lactis*, certains composants du complexe SCF^{Grr1} ont été mis en évidence : *KISKP1*, dont la délétion est létale, comme chez *S. cerevisiae* (Winkler et al., 2000), et *KIGRR1*, dont la mutation et la délétion provoquent un phénotype Rag⁻ (*rag19*) et un défaut d'induction des gènes *RAG1* et *KIHXX* par le glucose (Hnatova et al., 2008). *KIGrr1* partage 43 % d'identité avec *ScGrr1*, et est nécessaire à la dégradation du corépresseur Sms1 induite par le glucose.

3. a. iv. Comparaison de la voie de signalisation du glucose dépendante des senseurs Rag4 et Rgt2/Snf3 chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae*

La Figure 17 montre la comparaison des voies de signalisation du glucose chez les deux levures. La voie de signalisation du glucose est conservée entre *S. cerevisiae* et *K. lactis*, malgré quelques différences comme la duplication de certains composants chez *S. cerevisiae*. Un point qui diffère entre les deux organismes est le rôle d'activateur transcriptionnel de ScRgt1, jamais mis en évidence chez *K. lactis*. Toutefois, des résultats récents semblent remettre en question cette fonction activatrice (voir page 33) (Roy et al., 2014a). Chez *S. cerevisiae*, l'implication des homologues des activateurs transcriptionnels Sck1 et *KISnf2* n'a pas été étudiée dans la régulation de la voie de signalisation du glucose.

La manière dont le signal glucose est transmis entre les senseurs membranaires du glucose et les corépresseurs transcriptionnels nucléaires n'est pas bien comprise. Les interactions de Sms1 avec, d'une part, le répresseur nucléaire *KIRgt1*, et, d'autre part, le senseur membranaire Rag4 ont été démontrées (Hnatova et al., 2008), tout comme l'interaction de

Mth1 et Std1 avec ScRgt1 (Tomás-Cobos and Sanz, 2002; Lakshmanan et al., 2003) et avec Rgt2 et Snf3 (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000). Cependant, Mth1 ne transite pas entre le noyau et le cytoplasme en réponse au glucose, et au contraire, il se trouve toujours dans le noyau où sa dégradation a lieu après son ubiquitination par le complexe SCF^{Grr1} (Pasula et al., 2010). Ceci suggère qu'un intermédiaire serait capable de transiter entre la membrane plasmique et le noyau, mais également que la caséine kinase Yck1/2 n'est pas directement responsable de la phosphorylation de Mth1 et Std1.

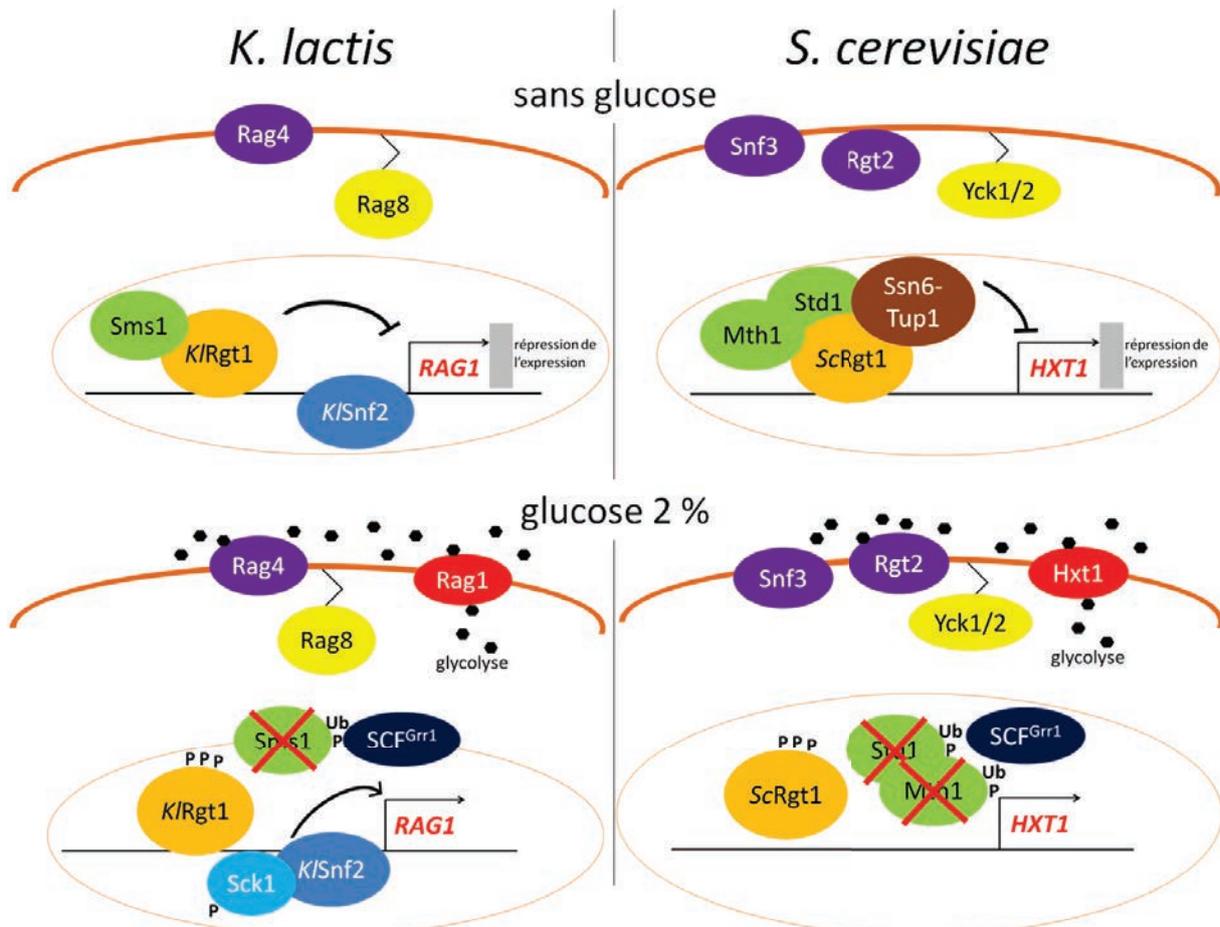


Figure 17: Comparaison des voies de signalisation du glucose dépendantes des senseurs Rag4 et Snf3/Rgt2 chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae*. Les mécanismes visant à exprimer les perméases de faible affinité sont représentés. Le noyau est représenté par un oval orange clair. Dans le quart « *K. lactis* en présence de glucose », Sms1 et SCF^{Grr1} sont représentés à cheval sur la membrane plasmique car leur localisation cellulaire n'a pas été déterminée dans ces conditions. P : phosphorylation. Ub : ubiquitination.

3. a. v. Voies de signalisation du glucose homologues à la voie Rgt2/Snf3 chez d'autres levures

La levure modèle *S. cerevisiae* est la levure la mieux étudiée. La voie de signalisation du glucose dans cet organisme est bien connue par rapport à d'autres levures. Dans les paragraphes précédents, les données connues sur la voie de signalisation du glucose chez la levure *K. lactis* ont été présentées. Cependant, d'autres levures ont été étudiées, permettant de mettre en évidence certains des composants de leurs voies de signalisation du glucose.

Ces composants ainsi que leurs orthologues sont présentés dans le Tableau 8. Les levures *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *Candida albicans*, *Pichia stipitis*, *Hansenula polymorpha* et *Schizosaccharomyces pombe* appartiennent au phylum des ascomycètes, *S. pombe* étant l'espèce la plus éloignée des autres. *Cryptococcus neoformans* appartient au phylum des basidiomycètes.

<i>S. cerevisiae</i>	<i>K. lactis</i>	<i>C. albicans</i>	Autres levures
Hxts	Rag1	Hgt1-3 et Hgt5-20 Hgt1 et Hgt12 = transporteurs effectifs	<i>S. pombe</i> : Ght1, 2, 5 et 6 <i>H. polymorpha</i> : HpHxt1 <i>P. stipitis</i> : Sut1-3 <i>C. neoformans</i> : CnHxs1
Snf3/Rgt2	Rag4	Hgt4	<i>P. pastoris</i> : Gss1 <i>H. polymorpha</i> : Gcr1, HpHxs1
Yck1/2	Rag8	CaYck2	<i>S. pombe</i> : Cki1 <i>C. neoformans</i> : Cck1
ScGrr1	KlGrr1	CaGrr1	<i>C. neoformans</i> : Fbp1
Mth1/Std1	Sms1	CaStd1	
ScRgt1	KlRgt1	CaRgt1	
ScTye7	Sck1	CaTye7	

Tableau 8: Composants de la voie de signalisation du glucose connus chez différentes levures (Leandro et al., 2009; Horák, 2013). Les protéines en gris sont des homologues dont l'implication dans la signalisation du glucose est inconnue.

La signalisation du glucose a été étudiée chez *C. albicans* : tous les composants de la signalisation du glucose connu chez *S. cerevisiae* ont été identifiés. Cette levure contient 20 homologues à la famille des perméases au glucose Hxts, nommés Hgt1 à 20. Leurs gènes répondent de différentes manières à la concentration de glucose : induction ou répression. La plupart d'entre eux sont également inductibles par le galactose. La capacité à transporter du glucose a été démontrée pour seulement deux : Hgt1 et Hgt12 (Varma et al., 2000; Luo et al., 2007). Un de ces gènes code en fait pour un senseur du glucose, Hgt4, homologue à Snf3 et Rgt2 avec une longue queue C-terminale cytoplasmique caractéristique (Brown et al., 2006), mais sans la séquence conservée parmi les senseurs. Il est capable de détecter le glucose à partir de 0,01 %, ce qui en fait un senseur de haute affinité environ dix fois plus sensible que Snf3. Il détecte également le galactose, contrairement à Snf3 et Rgt2 (Brown et al., 2009). Les composants de la voie de signalisation du glucose en aval ont été identifiés : CaYck2 qui est l'homologue de Yck1/2, CaGrr1, CaStd1 qui est l'homologue de Mth1 et Std1 et CaRgt1 (Horák, 2013). CaRgt1 a une séquence assez différente de ScRgt1, mais CaRGT1 est capable de compléter une mutation Scrgt1 (Sexton et al., 2007). Son inactivation par le glucose entraîne la dérégulation de HGT1, 2, 6, 7, 10, 12 et 13 par la voie dépendante de Hgt4. Comme chez *S. cerevisiae*, CaRgt1 est aussi un activateur transcriptionnel : il active l'expression de HGT8 et 17 en absence de glucose. Enfin, la voie de signalisation du glucose dépendante de Hgt4 est importante pour la formation d'hyphes lors de la filamentation (Brown et al., 2006; Butler et al., 2006; Sexton et al., 2007; Brown et al., 2009), et le senseur Hgt4 joue un rôle dans la virulence de ce pathogène opportuniste (Brown et al., 2006).

Pour les autres levures, la caractérisation de la voie de signalisation du glucose est incomplète. Chez *S. pombe*, Ght1, 2, 5 et 6 sont des transporteurs du glucose, peut-être des symporteurs glucose/H⁺ (Heiland et al., 2000). *H. polymorpha* possède un transporteur du glucose, HpHxt1, et deux senseurs HpHxs1 et HpGcr1 (Stasyk et al., 2004, 2008). HpGcr1 est impliqué dans la répression glucose, au contraire de HpHxs1. HpGcr1 présente plusieurs résidus et motifs caractéristiques des senseurs du glucose, cependant il ne possède pas de longue queue cytoplasmique C-terminale, même si sa courte queue comprend la séquence très conservée caractéristique des senseurs chez les levures (Stasyk et al., 2004). HpHxs1 possède une queue C-terminale longue, dépourvue de la séquence conservée caractéristique des senseurs des levures, mais nécessaire à la signalisation du glucose. Une simple mutation modifiant un acide aminé dans un domaine transmembranaire de HpHxs1 peut entraîner la signalisation constitutive du glucose (Stasyk et al., 2008). *P. pastoris* possède un homologue des senseurs du glucose, Gss1, qui a une longue queue C-terminale cytoplasmique d'environ 200 acides aminés, dans laquelle la séquence caractéristique des senseurs est relativement conservée. Gss1 est nécessaire à la signalisation du glucose, la répression du glucose, mais aussi à la mise en place de la péxophagie (Polupanov et al., 2012). La péxophagie est un type d'autophagie sélective qui entraîne la dégradation des péroxysomes (des organites de détoxification de la cellule). Cette dégradation est induite par le passage de l'éthanol au glucose comme source de carbone. La délétion de 150 acides aminés en C-terminal de la queue cytoplasmique de Gss1 ne perturbe pas la signalisation du glucose, mais affecte légèrement la répression glucose et la péxophagie (Polupanov and Sibirny, 2013). Chez la levure *S. cerevisiae*, les senseurs du glucose Snf3 et Rgt2 sont également impliqués dans la mise en place de la péxophagie (Nazarko et al., 2008).

3. b. Les autres voies de signalisation du glucose

En plus de la voie de signalisation du glucose dépendante des senseurs du glucose Snf3 et Rgt2, d'autres voies de signalisation interviennent pour former un réseau de régulation qui cible finement l'expression des gènes des perméases au glucose *HXTs* de *S. cerevisiae*. Parmi ces autres voies de signalisation se trouvent la voie dépendante de la PKA et de l'AMP cyclique ainsi que la voie de répression du glucose, dépendante de Snf1.

Ici nous nous intéressons particulièrement à la régulation des gènes *HXTs* par le complexe ScRgt1/Ssn6-Tup1/Mth1-Std1, dans laquelle les trois voies dépendantes de Snf3/Rgt2, la PKA et Snf1 interviennent conjointement, comme montré dans la Figure 18, et comme expliqué précédemment (voir pages 26 à 30). La voie de signalisation du glucose dépendante de Snf3/Rgt2 a été décrite précédemment (voir pages 38 à 46). Les voies de signalisation dépendantes de la PKA et de l'AMPc d'une part, et de Snf1-Mig1 d'autre part, sont présentées plus en détail dans les pages qui suivent. Ces différentes voies sont présentées ici de manière indépendante les unes des autres, mais elles s'entrecroisent à plusieurs niveaux, comme montré dans la Figure 18.

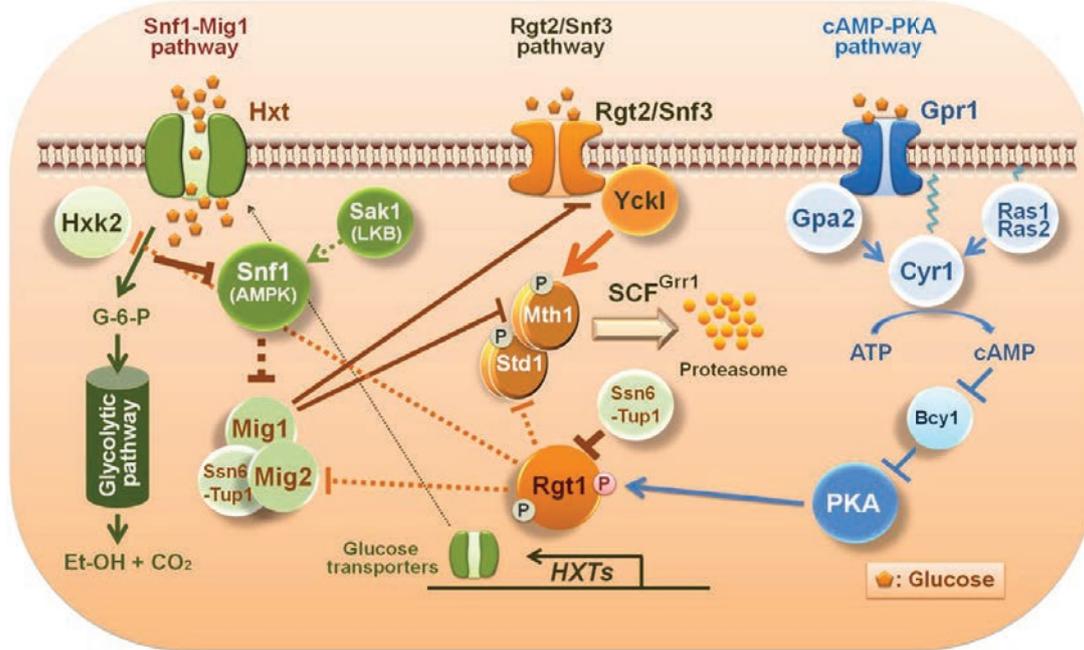


Figure 18: Les voies de signalisation dépendantes du glucose (Kim et al., 2013). Les trois voies de signalisation du glucose dépendantes de Rgt2/Snf3, cAMP-PKA et Snf1-Mig1 interviennent dans la régulation de l'expression des gènes *HXTs* chez *S. cerevisiae*. Les interconnexions entre ces trois voies sont montrées par des flèches pour les activations et des traits pour les inhibitions, dont la couleur dépend de la voie dont font partie les protéines impliquées. Yck1 : Yck1 et Yck2, P : phosphorylation.

3. b. i. La voie dépendante de l'AMP cyclique et de la PKA

Le rôle de la PKA dans la phosphorylation du répresseur transcriptionnel ScRgt1 a été décrit en page 27. En présence de glucose, la protéine kinase A (PKA) est activée et phosphoryle ScRgt1 sur différentes sérines, ce qui provoque son détachement du promoteur des gènes-cibles du répresseur (*HXT1* et *HXX2* notamment) (Kim and Johnston, 2006; Palomino et al., 2006).

La PKA est une protéine hétéro-tétramérique, composée de deux sous-unités régulatrices identiques Bcy1 et deux sous-unités catalytiques identiques parmi Tpk1, Tpk2 et Tpk3. Les sous-unités catalytiques sont des sérine/thréonine kinases, dont le site consensus de phosphorylation est RRX(T*/S*) ou KKX(T*/S*), X étant un acide aminé non défini et l'astérisque indiquant le résidu phosphorylé par la PKA (Vandamme et al., 2012). Les trois sous-unités catalytiques semblent avoir un rôle redondant, puisque seule la délétion des trois gènes est létale, le maintien d'une seule des trois sous-unités permettant de rétablir un phénotype viable. Cependant, Tpk1, 2 et 3 ont certains substrats en commun mais présentent aussi des spécificités (Ptacek et al., 2005). La PKA est contrôlée par l'AMP cyclique : l'AMPc se fixe aux sous-unités régulatrices Bcy1, et empêche l'inhibition des sous-unités catalytiques par Bcy1. La fixation de l'AMPc à Bcy1 entraîne la dissociation de la PKA et permet aux sous-unités Tpk de phosphoryler leurs substrats (Figure 19). Le niveau d'AMPc est finement régulé au sein de la cellule. Une stimulation glucose extracellulaire provoque un pic intracellulaire d'AMPc (Williamson et al., 2009). L'AMPc est synthétisé à

partir d'ATP par l'adénylyl cyclase Cyr1, qui est une protéine membranaire. L'AMPc est dégradé en AMP par les phosphodiesterases Pde1 et Pde2. La phosphorylation de Pde1 par la PKA entraîne un rétro-contrôle négatif des phosphodiesterases qui régule finement le niveau d'activité de la PKA dans la cellule (Nikawa et al., 1987; Ma et al., 1999).

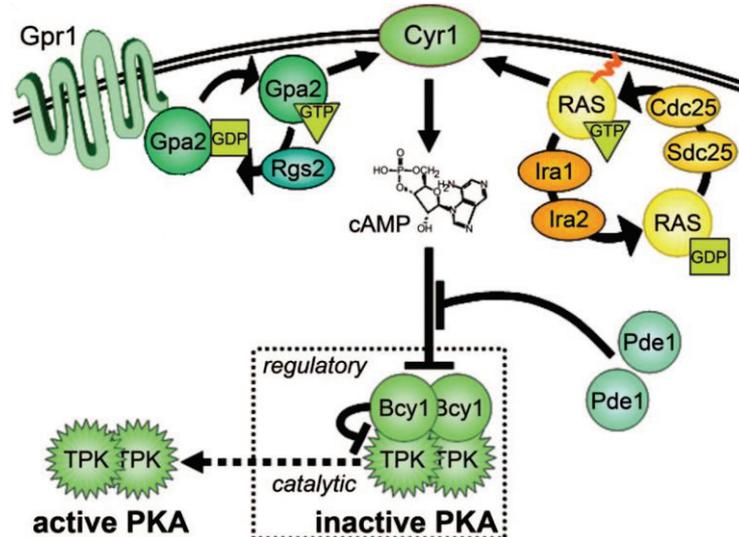


Figure 19: La voie d'activation de la PKA dépendante de l'AMP cyclique (Santangelo, 2006). Rgs2 est une protéine GAP (activatrice de GTPase) hétérotrimérique régulatrice des GPCR, qui stimule l'activité de Gpa2. TPK représente une des sous-unités catalytiques de la PKA : Tpk1, Tpk2 ou Tpk3. RAS représente Ras1 ou Ras2.

D'une part, l'activité adénylyl cyclase de Cyr1 (Figure 19) est stimulée par l'interaction directe avec Ras1 et Ras2, deux GTPases de type RAS lorsque ces dernières sont liées au GTP. Ras1 et Ras2 subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles : farnésylation, palmitoylation et carboxyméthylation, qui sont responsables de leur ancrage à la membrane plasmique. L'activité GTPase des protéines RAS est stimulée par Ira1 et Ira2, des protéines activatrices de GTPase (ou GAP) qui contribuent à inhiber Cyr1. Cdc25 et Sdc25 sont deux protéines échangeuses de guanine (ou GEF), qui catalysent le remplacement du GDP lié aux protéines RAS par le GTP. Le glucose augmente la quantité de RAS-GTP par rapport à RAS-GDP, par un mécanisme mal connu (Broach, 2012).

D'autre part, Cyr1 est également stimulé par Gpa2 (Figure 19), qui ressemble à la sous-unité α d'une protéine G hétérotrimérique. Gpa2 stimule Cyr1 dans sa forme liée au GTP, et interagit avec Gpr1 dans sa forme liée au GDP. Gpr1 est un récepteur du glucose à sept domaines transmembranaires de type GPCR (récepteur couplé à une protéine G), qui possède une extrémité C-terminale cytoplasmique assez longue, ainsi qu'une longue boucle interne cytoplasmique caractéristique des GPCRs (Kraakman et al., 1999). Les sous-unités β et γ interagissant avec Gpa2 n'ont pas pu être mises en évidence avec certitude à ce jour, même si plusieurs candidats ont été proposés (Broach, 2012). Il est suggéré que Gpr1 active Gpa2 après avoir détecté le glucose extracellulaire. Cependant, le ligand qui active Gpr1 n'a jamais été défini proprement (Broach, 2012) : Gpr1 a seulement une faible affinité pour le glucose, aucune pour le fructose et le galactose, mais une plus forte pour le sucrose (Lemaire et al., 2004). D'autres éléments remettant en cause ce modèle sont l'absence d'effet de la délétion de *GPA2* ou *GPR1* sur la transcription des gènes contrôlés par la PKA ou

l'inactivation d'enzyme dépendante de la PKA (fructose-1,6-bisphosphatase Fbp1) (Zaman et al., 2008; Belinchón and Gancedo, 2007a).

La stimulation glucose entraîne un pic d'AMPc mais aussi une chute du pH ; cette chute du pH joue probablement un rôle dans l'activation de la PKA (Dechant et al., 2010). De plus, la phosphorylation des hexoses semble être nécessaire à l'activation des protéines RAS, par un processus d'action non déterminé (Colombo et al., 2004). Ainsi, l'activité de la PKA serait régulée par un signal glucose extracellulaire détecté par Gpr1, et un signal intracellulaire provenant de la phosphorylation des hexoses et activant les protéines RAS (Rolland et al., 2000).

La voie de régulation par la PKA est inactive pendant la croissance non-fermentaire et elle est responsable de 90 % des changements transcriptionnels qui surviennent après la stimulation glucose de cellules cultivées en milieu glycérol (Wang et al., 2004). La PKA régule la croissance ou la quiescence en fonction de la quantité et de la qualité de la source de carbone disponible. La PKA est impliquée dans la régulation des ribosomes, la transcription, l'élongation, mais aussi la glycolyse (voir page 68) (Broach, 2012).

Chez la levure *K. lactis*, la voie de signalisation qui active la PKA n'a pas été étudiée. Les sous-unités de la PKA sont conservées : *KITpk2* et *KITpk3* partagent plus d'identité avec leurs orthologues de *S. cerevisiae* que *KITpk1* et *K/Bcy1* (González Siso and Cerdán, 2012). La plupart des composants de cette voie est conservée, mais sans qu'on connaisse leur activité : c'est le cas par exemple pour Gpr1 et Gpa2 (Horák, 2013). Cependant, une étude assez récente a décrit chez *K. lactis* le rôle de l'AMPc, de *KIRas2* et *KIPde2* dans la régulation du type sexuel (mating type) (Barsoum et al., 2011).

3. b. ii. La voie de répression du glucose dépendante de Snf1-Mig1

(Dans cette partie, Snf1 désigne la kinase du complexe SNF1.)

- La répression du glucose chez *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, plusieurs liens existent entre la voie de répression du glucose et la voie Rgt2/Snf3, dont les régulations s'entrecroisent comme montré dans la Figure 18. Tout d'abord, la kinase Snf1, ou une kinase dépendante de Snf1, phosphoryle le répresseur transcriptionnel ScRgt1 pour lui permettre de se fixer à l'ADN en présence de glucose faiblement concentré (Palomino et al., 2006). Ensuite, l'activation du complexe SNF1 inhibe l'expression du gène de la perméase au glucose *HXT1* et stabilise le corépresseur Std1 (Gadura et al., 2005; Pasula et al., 2007). De plus, Std1 interagit physiquement avec Snf1 en faible concentration de glucose (Tomás-Cobos and Sanz, 2002) et améliore l'activité kinase de Snf1 (Hubbard et al., 1994; Kuchin et al., 2003). Snf1 agit sur la signalisation du glucose dépendante de Snf3/Rgt2 en régulant l'expression de *SNF3* et *MTH1* (Kaniak et al., 2004).

Snf1 est une sérine/thréonine kinase homologue à l'AMPK des mammifères, une kinase régulée par l'AMP. Le site consensus de Snf1 est le suivant : $\phi X(R/K)XX(S^*/T^*)XX(X)\phi$ (ϕ pour

un acide aminé hydrophobique, X pour un acide aminé quelconque, l'astérisque montre le site de phosphorylation) (Dale et al., 1995). Snf1 a été caractérisé au cours de l'analyse de la voie de la répression du glucose, aussi appelée répression catabolique. Cette voie de répression est activée en présence de glucose et diminue l'activité d'enzymes nécessaires à l'utilisation de sources de carbone alternatives, non-fermentables (galactose, saccharose, maltose), et inhibe aussi l'activité des cytochromes dans la chaîne respiratoire et des enzymes du cycle TCA. Snf1 est un régulateur général de la transcription en réponse à un stress carbone car dans un mutant $\Delta snf1$, environ 400 gènes sont moins induits par l'absence de glucose que dans une souche sauvage (Young et al., 2003). Il régule la transcription de gènes en régulant des répresseurs transcriptionnels (Mig1) et des activateurs transcriptionnels (Cat8 et Sip4, impliqués dans la néoglucogenèse). La répression glucose a été essentiellement étudiée pour son effet sur la transcription des gènes ; cependant, certaines protéines ainsi que la durée de renouvellement des ARNm sont aussi régulées par la répression glucose (Horak et al., 2002; Scheffler et al., 1998). Même si Snf1 a été initialement isolé pour son rôle dans la répression glucose, le complexe SNF1 est activé par de nombreux autres stress : pH alcalin, forte salinité, présence d'agents oxydants et stress thermique (Hong and Carlson, 2007). La privation d'azote et l'inactivation de TORC1 active aussi le complexe SNF1 (Orlova et al., 2006).

La kinase Snf1 constitue la sous-unité α d'un complexe hétérotrimérique nommé SNF1, qui compte aussi des sous-unités β et γ (Jiang and Carlson, 1997). La sous-unité γ du complexe SNF1 est la protéine Snf4, caractérisée comme activatrice de l'activité kinase de Snf1, bien qu'elle semble plutôt empêcher l'auto-inhibition de Snf1 (Jiang and Carlson, 1997; Amodeo et al., 2010). Le complexe SNF1 accepte trois sous-unités β différentes: Sip1, Sip2 et Gal83. La sous-unité β est responsable du maintien de l'association entre Snf1 et Snf4, ainsi que de la reconnaissance spécifique des substrats du complexe SNF1 et de la localisation cellulaire de SNF1 (Vincent et al., 2001).

Le complexe SNF1 est inhibé en présence de glucose : le domaine de régulation négative de Snf1 masque son domaine catalytique. En absence ou en faible concentration de glucose, Snf1 est activé par la phosphorylation de sa thréonine 210 dans le domaine catalytique. Trois kinases différentes sont responsables de la phosphorylation en T210 : Tos3, Sak1 et Elm1 ; Sak1 étant la principale kinase d'activation de Snf1 (Hong et al., 2003).

Snf1 est déphosphorylé sur la thréonine 210 par le complexe phosphatase de type I Glc7-Reg1 (Ludin et al., 1998; Sanz et al., 2000). *GLC7* est un gène essentiel qui code pour la sous-unité catalytique du complexe. Reg1 est la sous-unité régulatrice qui cible le complexe vers ses substrats. L'activité du complexe Glc7-Reg1 ne varie pas en fonction de la concentration en glucose (Rubenstein et al., 2008), mais son interaction avec le complexe SNF1 pourrait être régulée. Deux autres phosphatases sont capables de déphosphoryler la thréonine 210 de Snf1 : il s'agit de Sit4 et Ptc1, dont le rôle dans la régulation de SNF1 recoupe celui de Glc7-Reg1 (Ruiz et al., 2011, 2013). Le complexe phosphatase Glc7-Reg1 est responsable d'un autre lien entre la voie de répression glucose et la voie de signalisation du glucose par

Rgt2/Snf3 : en effet, l'activité des caséine kinases Yck1 et Yck2 nécessite Glc7-Reg1 (Gadura et al., 2005).

La manière dont le complexe SNF1 est régulé par le glucose est l'objet de discussions. Plusieurs pistes sont avancées : par exemple, l'accessibilité de la thréonine 210 pourrait changer dans le complexe SNF1 en fonction de la présence de glucose (Mayer et al., 2011). De plus, le domaine catalytique de Snf1 est inhibé après SUMOylation en présence de glucose qui induit son ubiquitination et sa dégradation (Simpson-Lavy and Johnston, 2013). La SUMOylation est une modification post-traductionnelle dans laquelle une protéine semblable à l'ubiquitine, Smt3, est conjuguée à la protéine sur un résidu lysine par une SUMO (E3) ligase, ici Mms21. Enfin, l'activité de SNF1 est corrélée au ratio AMP/ATP, comme chez l'homologue mammifère de Snf1, l'AMPK. Cependant, contrairement à la kinase mammifère, il n'a pas été démontré que le complexe SNF1 interagit avec l'AMP. Par contre, la sous-unité β du complexe, Snf4, se lie à l'ADP et protège la thréonine 210 de la déphosphorylation par Glc7, ce qui active la kinase en absence de glucose (Mayer et al., 2011).

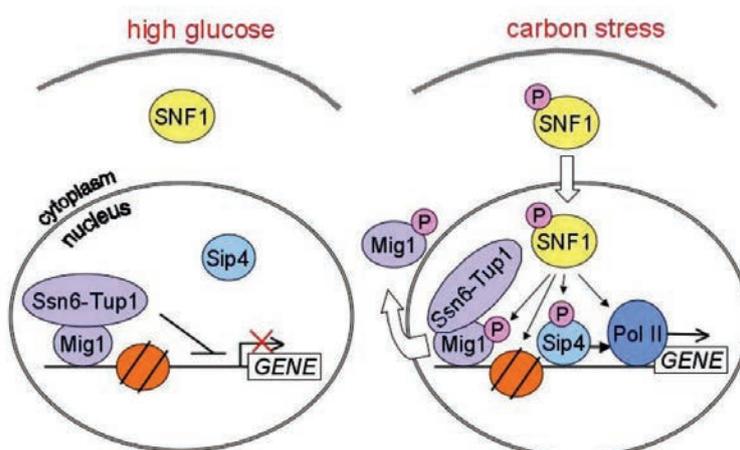


Figure 20: Modèle simplifié de la répression glucose des gènes par Mig1 (à gauche, en présence de glucose) et de l'activation de gènes par le complexe SNF1 en situation de stress carbone (à droite) (Hedbacker and Carlson, 2008). Sip4 est un activateur transcriptionnel contrôlé par SNF1 et utilisé ici en exemple.

Mig1 est un répresseur transcriptionnel de la répression glucose, qui réprime par exemple l'expression des gènes des perméases de haute affinité *HXT2* et *HXT4*, mais aussi les gènes *SUC2* et *GAL4* en présence de forte concentration de glucose (Özcan and Johnston, 1996; van Oevelen et al., 2006). Mig1 est une protéine à doigts de zinc de type C_2H_2 qui se fixe à l'ADN sur une séquence consensus riche en GC (Schüller, 2003). En présence de glucose, Mig1 est nucléaire et interagit avec le complexe de répression Ssn6-Tup1 (Papamichos-Chronakis et al., 2004) (Figure 20). Pour réprimer certains gènes, Mig1 collabore avec Mig2, qui est un répresseur transcriptionnel plus modeste, qui n'est pas régulé par Snf1 (Lutfiyya and Johnston, 1996; Lutfiyya et al., 1998) mais dont l'expression est régulée par ScRgt1 (Kaniak et al., 2004).

Un autre composant de la voie de répression du glucose dépendante de Snf1-Mig1 est l'hexokinase Hxk2. En effet, en dehors de son rôle de catalyse de la phosphorylation du glucose dans la première étape de la glycolyse, Hxk2 joue aussi un rôle de régulateur

transcriptionnel. Il a d'abord été envisagé que Hxk2 intervienne dans la répression glucose par son activité enzymatique, puisque la phosphorylation du glucose est nécessaire à la localisation nucléaire du complexe SNF1. Cependant, des mutants ont été créés dans lesquels les fonctions enzymatiques et transcriptionnels de Hxk2 sont dissociés (Peláez et al., 2010). Dans le noyau, Hxk2 et Mig1 interagissent physiquement pour former un complexe de répression sur leurs gènes-cibles, notamment au niveau du promoteur de *SUC2* (Ahuatzi et al., 2004; Moreno et al., 2005). Hxk2 affecte la phosphorylation de Reg1 (Sanz et al., 2000) et de Mig1 (Ahuatzi et al., 2006). La localisation nucléaire de Hxk2 a été particulièrement étudiée : 14 % des protéines Hxk2 sont retrouvés dans le noyau en présence de glucose (Randez-Gil et al., 1998a). La localisation nucléaire de Hxk2 est liée à sa phosphorylation sur la sérine 15 par Snf1 (Fernandez-Garcia et al., 2012). La sérine 15 de Hxk2 est aussi phosphorylée par la kinase Tda1 (Kettner et al., 2012), et déphosphorylée par le complexe phosphatase Glc7-Reg1 (Randez-Gil et al., 1998a). Cette sérine appartient à un site consensus de phosphorylation par la PKA, mais cette phosphorylation n'a pas été démontrée à ce jour. La localisation de Hxk2 dans le noyau nécessite la présence nucléaire de Mig1 et elle est réalisée par une importine, Kap60 (Fernandez-Garcia et al., 2012), alors que son export nécessite l'exportine Xpo1 (Peláez et al., 2009).

- La répression du glucose chez *K. lactis*

Chez la levure *K. lactis*, plusieurs composants homologues à la voie Snf1-Mig1 de *S. cerevisiae* ont été identifiés. *KISnf1* est dénommé Fog2 et est à 75 % identique à *ScSnf1*. L'expression de *FOG2* est capable de compléter un mutant $\Delta Scsnf1$ (Goffrini et al., 1996; Dong and Dickson, 1997). Fog2 a un rôle dans la signalisation du glucose et l'adaptation à différentes sources de carbone. Son rôle est également important dans le tri intracellulaire des protéines adressées à la membrane, comme Lac12, un transporteur de lactose et galactose (Wiedemuth and Breunig, 2005). Un homologue à la sous-unité β du complexe SNF1 de *S. cerevisiae*, *KIGal83* (ou Fog1), a été mis en évidence. Chez *K. lactis*, il semble que le complexe SNF1 ne comporte qu'un seul type de sous-unité β , qui est requis pour l'activation transcriptionnel des gènes réprimés par le glucose (Goffrini et al., 1996). Les mutants $\Delta fog1$ et $\Delta fog2$ ont un phénotype Rag⁺ : ils ne sont nécessaires ni pour la signalisation, ni le transport, ni le métabolisme fermentaire du glucose. Le répresseur transcriptionnel *KIMig1* partage 55 % d'identité avec *ScMig1*, avec surtout le domaine en doigts de zinc bien conservé (Cassart et al., 1995). L'expression de *KIMIG1* complète la délétion de $\Delta Scmig1$ chez *S. cerevisiae*. *KIMig1* intervient dans la répression glucose en aval de *KISnf1* (Fog2), il est nécessaire à la répression complète de *KIGAL1* et *KIGAL4* en présence de glucose, et se fixe au promoteur de *KIGAL1* (Dong and Dickson, 1997).

Bien que certains composants de la voie de régulation de la répression glucose aient été identifiés chez *K. lactis*, et que leur expression soit capable de compléter les mutants correspondants de *S. cerevisiae*, la voie de la répression glucose diffère entre les deux levures. Tout d'abord, les gènes ciblés par le répresseur *KIMig1* ne sont pas les mêmes que ceux ciblés par leurs homologues chez *S. cerevisiae*. A l'inverse de ce qui se passe chez *S.*

cerevisiae, *KlMig1* n'est pas nécessaire à la répression glucose du gène de l'invertase (Georis et al., 1999). Ensuite, la répression du glucose est plus faible chez la levure Crabtree-négative *K. lactis* que chez la Crabtree-positive *S. cerevisiae* (Breunig et al., 2000). Enfin, chez *K. lactis*, l'ampleur de la répression glucose est extrêmement variable selon les souches (Goffrini et al., 1995; Breunig et al., 2000) : la souche JA6 est sensible à la répression glucose, alors que la souche PM4-4B ne l'est guère. Les souches dotées de répression glucose possèdent les perméases au glucose *Kht1* et *Kht2*, alors que les souches dans lesquelles le glucose réprime peu ou faiblement les gènes d'utilisation d'autres sources de carbone possèdent les perméases *Rag1* et *Hgt1* (Weirich et al., 1997). Cependant, la différence de répression glucose entre les souches ne tient pas uniquement aux perméases au glucose présentes, mais provient aussi de mutations dans les promoteurs des gènes réprimés par le glucose (Kuzhandaivelu et al., 1992; Zachariae et al., 1993). Toutes les souches utilisées au cours de ce travail de thèse possèdent les perméases *Rag1* et *Hgt1* et ont un faible niveau de répression glucose.

3. b. iii. Un réseau de régulation signale le glucose extracellulaire pour réguler l'expression des gènes des perméases au glucose

Une étude de transcriptomique a permis de comparer l'importance des différentes voies de signalisation régularées par le glucose (Figure 21).

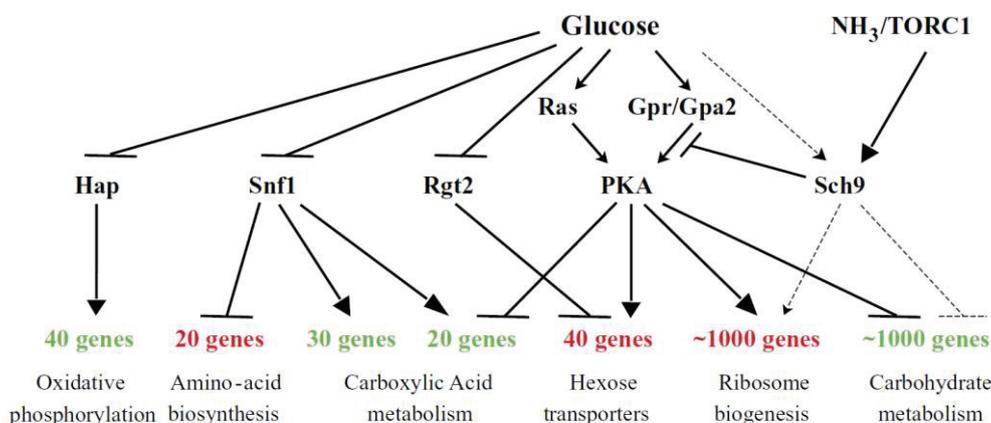


Figure 21: Une étude transcriptionnelle à grande échelle a été réalisée chez la levure *S. cerevisiae* pour déterminer un modèle des voies de régulation impliquées dans la réponse transcriptionnelle de la cellule à l'ajout de glucose (Zaman et al., 2009). Les pointillés indiquent une connexion limitée ou indirecte.

Dans cette étude, cinq voies de signalisation ressortent comme étant capables d'envoyer un signal glucose pour la régulation de l'expression génique. Parmi ces voies de signalisation, la voie dépendante de la PKA est la plus importante en nombre de gènes régulés. Les voies dépendantes de *Rgt2/Snf3* et *Snf1* ont été décrites auparavant. Ces trois voies sont responsables des signaux croisés qui régulent l'expression des gènes des perméases au glucose, comme décrit précédemment. Les deux dernières voies sont celles dépendantes de *Hap* et de *Sch9*. Toutefois, ces deux voies ne semblent pas réguler de manière significative l'expression des gènes de perméase au glucose et ne seront pas présentées ici.

3. c. Les autres voies de signalisation qui affectent l'expression des perméases au glucose chez les levures

En plus des voies principales de signalisation du glucose, d'autres voies de signalisation semblent avoir un effet sur l'expression des gènes des perméases chez les levures. C'est le cas par exemple de la voie de réponse au stress osmotique HOG (High Osmolarity Glycerol response) et de la voie de réponse à l'hypoxie.

3. c. i. La voie de réponse au stress osmotique dépendante de Hog1

La voie HOG est caractérisée par l'activation de la MAP-kinase (MAPK) Hog1 en réponse à une augmentation de l'osmolarité extracellulaire. Cette voie régule notamment l'expression génique du métabolisme des glucides et des voies de protection générale au stress. La voie HOG a été particulièrement étudiée (Miermont et al., 2011).

Chez la levure *S. cerevisiae*, il a été mis en évidence que l'expression du gène de la perméase au glucose *HXT1* en présence de 2 % de glucose nécessite l'activation de la voie HOG (Tomás-Cobos et al., 2004). En effet, le glucose active la voie Snf3/Rgt2 en tant qu'hexose, et il active aussi la voie HOG en tant qu'osmolyte. Cette activation de la voie HOG entraîne le relâchement du répresseur transcriptionnel Sko1, qui inhibe l'expression de gènes induits par le stress. Sko1 se fixe au promoteur de *HXT1* en absence de glucose et interagit avec le complexe général de répression Ssn6-Tup1. En réponse au stress, Sko1 est phosphorylé par la MAP kinase Hog1, ce qui le change en un activateur transcriptionnel.

Chez *K. lactis*, un composant de cette voie de réponse au stress osmotique dépendante de Hog1, *K/Hsl1*, a été décrit ; sa délétion entraîne un phénotype Rag⁻ (Cialfi et al., 2011).

3. c. ii. La voie de réponse à l'hypoxie

La voie de réponse à l'hypoxie a été largement étudiée chez la levure *S. cerevisiae*. La réponse hypoxique est caractérisée par la régulation de plus de cent gènes (González Siso and Cerdán, 2012). Les biosynthèses de l'hème et des ergostérols sont particulièrement ciblées, ils constituent par ailleurs les principaux senseurs de l'oxygène dans la cellule. Les gènes régulant la composition de la paroi cellulaire, les gènes glycolytiques, ceux de la chaîne respiratoire, de la synthèse d'ATP et du cycle TCA sont également contrôlés par l'hypoxie. Hap1, un facteur de transcription à doigts de zinc, est un des régulateurs transcriptionnels dont le rôle est relié à la réponse hypoxique, puisqu'il régule l'expression de ses gènes-cibles en fonction de l'hème et de l'oxygène. Les cibles de Hap1 sont les gènes de la respiration, de la réponse aux dommages oxydatifs et des répresseurs de l'aérobie (González Siso and Cerdán, 2012).

Chez *K. lactis*, organisme qui ne peut pas croître en anaérobie stricte (Kiers et al., 1998), plusieurs composants de la voie de l'hypoxie ont été caractérisés (González Siso and Cerdán, 2012). *K/Hap1*, l'homologue de *ScHap1*, est capable de compléter la délétion de *ΔSchap1*, mais chez *K. lactis* il ne régule pas les mêmes cibles (il n'a pas d'effet sur les gènes

de la respiration). L'expression de *KIHAP1* est induite en réponse à l'hypoxie (Bao et al., 2008). *KIHap1* est un répresseur du gène de la perméase au glucose *RAG1* en présence de 2 % de glucose (Bao et al., 2008).

Par ailleurs, il a été montré récemment que le senseur du glucose Rag4 serait nécessaire à l'induction de gènes de l'hypoxie, en tant que senseur de l'oxygène qui régule la fermentation (Micolonghi et al., 2011, 2012). L'expression de *RAG4* n'est cependant pas contrôlée par l'hypoxie (Micolonghi et al., 2011).

Dans cette partie, la voie de signalisation du glucose dépendante des senseurs Snf3/Rgt2 chez *S. cerevisiae* et Rag4 chez *K. lactis* a été décrite. Il s'agit d'une des voies qui contrôle les régulateurs transcriptionnels des gènes des perméases au glucose, le répresseur Rgt1 étant sans doute l'un des plus importants. Cependant, la voie Snf3/Rgt2 n'est pas la seule voie de signalisation du glucose à influencer sur l'expression des gènes des perméases au glucose : la voie de l'AMPc/PKA et celle de la répression glucose interviennent également. Enfin, d'autres signaux extracellulaires régulent l'expression des gènes des perméases au glucose, tels que l'oxygène ou la pression osmolytique.

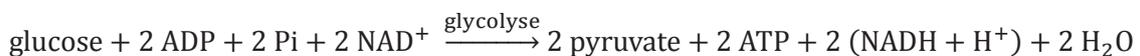
La régulation transcriptionnelle du transport du glucose a été largement présentée, la partie suivante est consacrée au métabolisme du glucose après son transport à l'intérieur de la cellule.

4. La glycolyse chez les levures

Par sa détection dans le milieu extracellulaire, le glucose régule l'expression des gènes de transporteurs spécifiques, nommés perméases chez les levures, par le concours de différentes voies de signalisation qui ont été présentées auparavant. Ainsi, la cellule va adapter ses capacités de transport du glucose selon la quantité de glucose présent à l'extérieur de la cellule. Les perméases spécifiquement synthétisées après la mise en place de ce signal glucose vont transporter le glucose à l'intérieur de la cellule. Quand le glucose est présent dans le milieu intracellulaire, il est métabolisé par la glycolyse. Cette dernière partie de l'introduction bibliographique traite du métabolisme du glucose par la glycolyse chez les levures *S. cerevisiae* et *K. lactis*, de la régulation de la glycolyse, mais aussi des moyens de l'inhiber et enfin de son rôle dans la régulation de voies de signalisation et de son effet sur l'expression des gènes des perméases au glucose.

4. a. Le métabolisme du glucose par la glycolyse et sa régulation chez les levures

Nous avons vu dans la première partie de cette introduction bibliographique (page 15) que le glucose est métabolisé dans la cellule par la glycolyse, pour obtenir du pyruvate et de l'ATP selon la réaction suivante :



Ensuite, le pyruvate est lui-même utilisé pour la respiration (en aérobie) ou la fermentation (en anaérobie) (Figure 2 et Figure 22).

La respiration et la fermentation permettent de régénérer le stock de NAD^+ nécessaire au fonctionnement de la glycolyse pour l'étape catalysée par la GAPDH (glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase), qui est NAD-dépendante. La respiration est beaucoup plus productrice d'énergie car l'ensemble glycolyse et respiration permet de synthétiser en théorie 36 molécules d'ATP, grâce au cycle TCA (ou cycle de l'acide citrique) et à la phosphorylation oxydative (Figure 22), alors que la glycolyse couplée à la fermentation alcoolique ne permet d'en synthétiser que 2. Quand la cellule a accès à des nutriments, elle peut stocker du carbone sous forme de glucides de stockage : le tréhalose et le glycogène, qui sont synthétisés à partir de glucose-6-phosphate, le premier intermédiaire de la glycolyse. En cas de besoin, le tréhalose peut être clivé en glucose-6-phosphate et glucose. Le tréhalose-6-phosphate est un disaccharide synthétisé à partir du glucose-6-phosphate, intermédiaire dans la biosynthèse du tréhalose et utilisé comme source d'énergie ou protection contre le stress (Gancedo and Flores, 2004) par les champignons et les plantes. Le glycogène peut être transformé à nouveau en glucose-6-phosphate pour réintégrer la glycolyse, ou la néoglucogenèse, qui est la régénération de glucose à partir de sources de carbone alternatives telles que le pyruvate, le lactate, le glycérol, le malate ou encore des acides aminés.

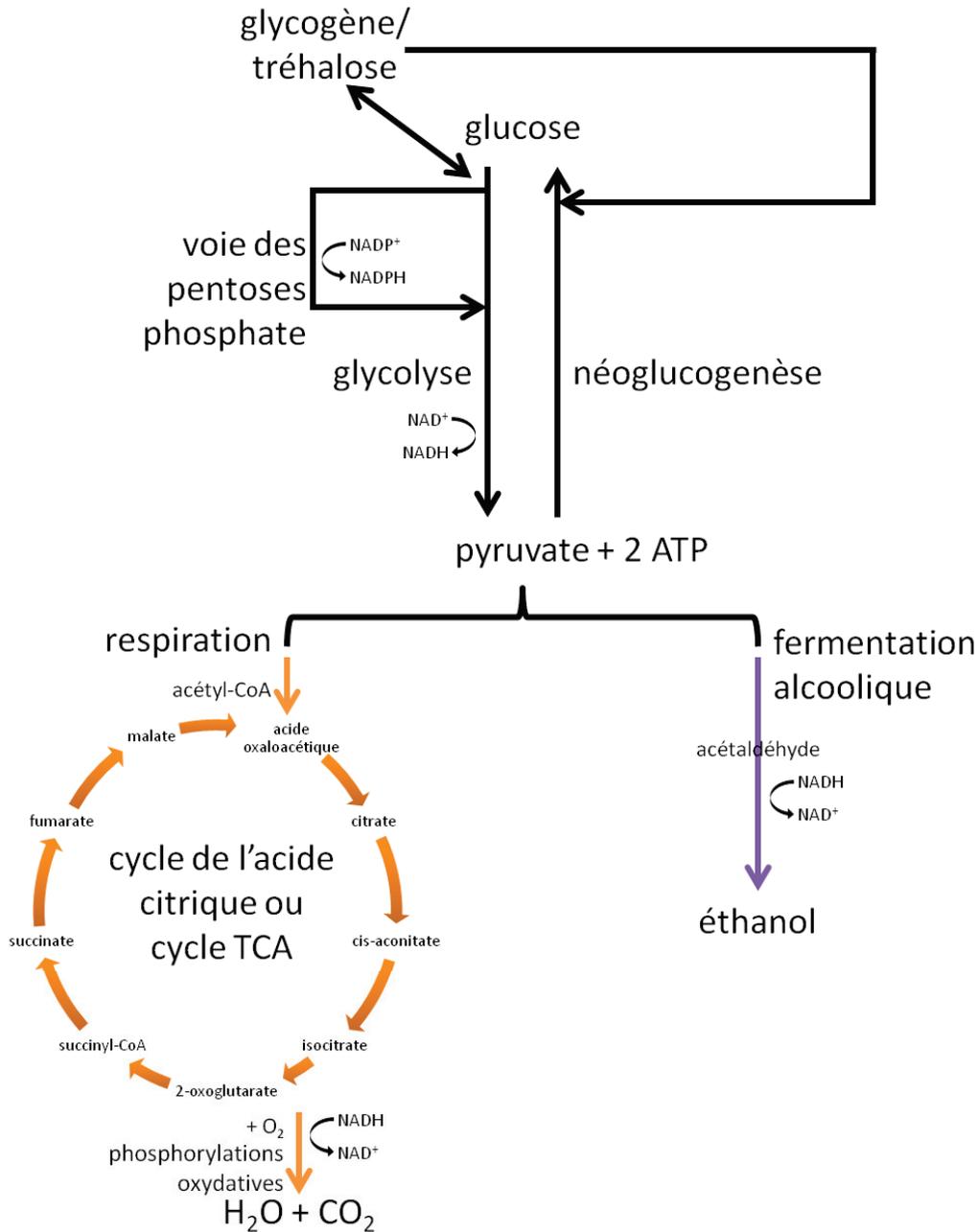


Figure 22: Métabolisme du glucose chez les levures. Le glucose est métabolisé par la glycolyse pour donner du pyruvate. Le pyruvate est utilisé soit par la respiration (cycle du TCA et phosphorylations oxydatives), soit par la fermentation alcoolique. Dans la glycolyse, le glucose peut suivre la voie alternative des pentoses phosphate. Il peut aussi être transformé en glucides de stockage tel que le tréhalose ou le glycogène. Enfin, le glucose peut être synthétisé *de novo* dans la cellule par la néoglucogenèse, à partir de sources de carbone alternatives comme le glycérol, le lactate et le pyruvate, ou à partir d'acides aminés.

La réaction de la glycolyse, qui a lieu dans le cytoplasme, est détaillée dans la Figure 23. Le glucose peut emprunter la voie alternative des pentoses phosphate, à partir de glucose-6-phosphate pour réintégrer la glycolyse sous forme de fructose-6-phosphate ou glycéraldéhyde-3-phosphate (Figure 22). La voie des pentoses phosphate est décrite plus en détail en page 62. La néoglucogenèse utilise les réactions réversibles catalysées par de nombreuses enzymes de la glycolyse, ainsi que des enzymes spécifiques pour les réactions non réversibles : la phosphoénolpyruvate carboxykinase et la fructose-1,6-bisphosphatase

(dans la glycolyse, les réactions inverses sont catalysées par la pyruvate kinase et la phosphofructokinase, Figure 23). Toutes les autres étapes de la glycolyse sont catalysées par des enzymes capables d'effectuer la réaction dans les deux sens. Toutefois, chez *S. cerevisiae*, de nombreuses étapes sont catalysées par des enzymes multiples (voir Tableau 9), lesquelles sont spécialisées soit dans la glycolyse soit dans la néoglucogenèse. Par exemple, la réaction qui transforme le 2-phosphoglycérate en phosphoénolpyruvate est catalysée par l'énolase, codée par les gènes *ENO1* et *ENO2*. *ENO2* est exprimée principalement en présence de glucose, alors que *ENO1* est exprimée en condition de néoglucogenèse. Chez *S. cerevisiae*, certains gènes codant pour des enzymes ont des paralogues suite à la duplication complète du génome. C'est le cas pour *HXK1* et *HXK2*, *TDH2* et *TDH3*, *ENO1* et *ENO2*, et encore *PYK1* et *PYK2*. La phosphorylation du glucose est réalisée principalement par l'hexokinase, capable de phosphoryler plusieurs types d'hexoses (glucose, fructose, mannose), mais aussi par une glucokinase spécialisée dans la phosphorylation du glucose et dont le rôle catalytique est moindre.

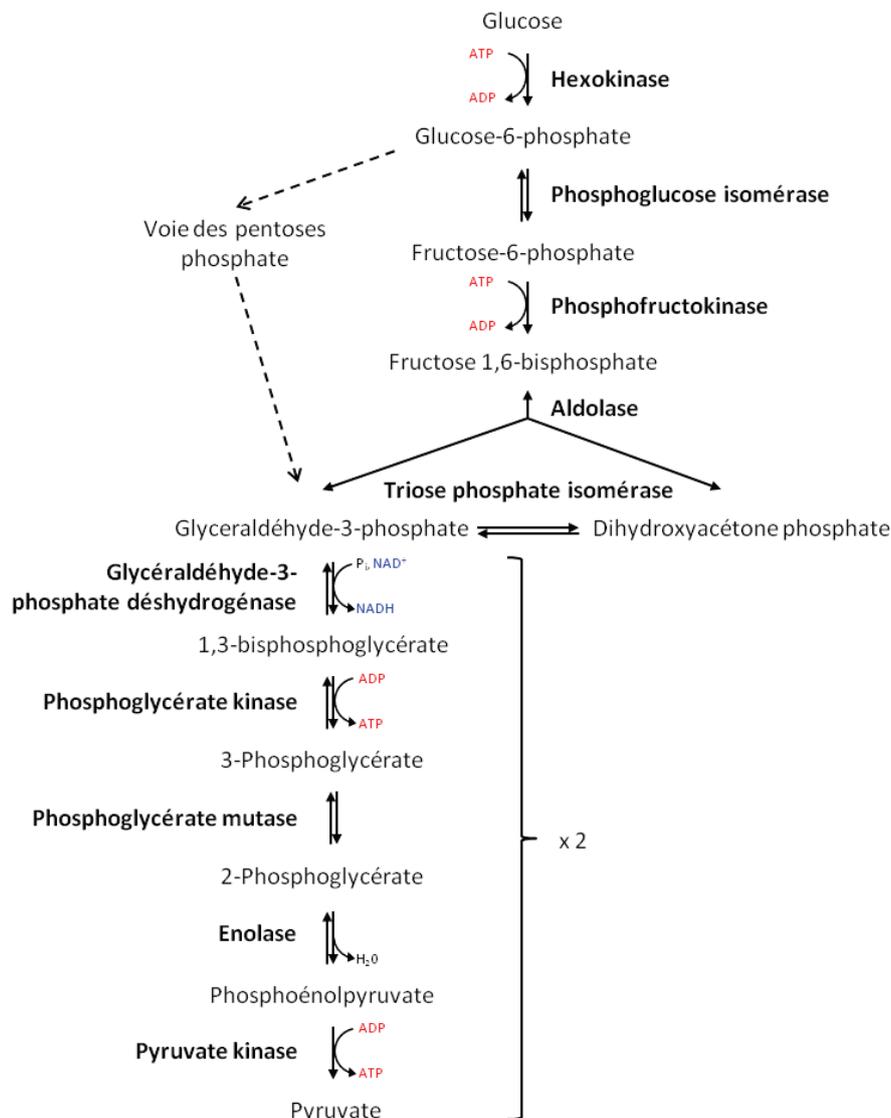


Figure 23: Réaction de la glycolyse. Les enzymes qui catalysent la réaction seulement dans le sens de la glycolyse ne sont pas impliquées dans la néoglucogenèse.

Enzyme	Gène(s) de <i>S. cerevisiae</i>	Forme oligomérique décrite pour <i>S. cerevisiae</i>	Gène(s) de <i>K. lactis</i>
Hexokinase Glucokinase	<i>HXK1, HXK2</i> <i>GLK1</i>	homo-dimère	<i>KIHXX (=RAG5)</i> <i>KIGLK1</i>
Phosphoglucose isomérase	<i>PGI1</i>	tétramère	<i>KIPGI1 (=RAG2)</i>
Phosphofructokinase	<i>PFK1</i> et <i>PFK2</i>	codent pour les sous-unités α et β , présentes 4 fois chacune dans l'enzyme hétéro-oligomérique	<i>KIPFK1</i> et <i>KIPFK2 (=RAG14)</i>
Aldolase	<i>FBA1</i>	homo-dimère	<i>KIFBA1</i>
Triose phosphate isomérase	<i>TPI1</i>	homo-dimère	<i>KITPI1</i>
Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase	<i>TDH1, TDH2</i> et <i>TDH3</i>	homo-tétramère	<i>G3P1</i> (NAD-dépendant) et <i>GDP1</i> (NAD ou NADP-dépendant)
Phosphoglycérate kinase	<i>PGK1</i>	monomère ?	<i>KIPGK1</i>
Phosphoglycérate mutase	<i>GPM1</i>	tétramère	<i>KIGPM1</i>
Enolase	<i>ENO1</i> et <i>ENO2</i>	dimère	<i>KIENO (=RAG17)</i>
Pyruvate kinase	<i>PYK1 (=CDC19)</i> et <i>PYK2</i>	homo-tétramère	<i>KIPYK1</i>

Tableau 9: Gènes codant pour les enzymes de la glycolyse chez *S. cerevisiae* (orange) et chez *K. lactis* (violet).

La réaction et les enzymes de la glycolyse ont été très conservées au cours de l'évolution. Par exemple, *KIHxk* est identique à 73 % avec *SchXk2*. Les structures cristallines des deux hexokinases ont été résolues et mettent en relief la très bonne conservation des enzymes au cours de l'évolution, et au sein de ces deux espèces en particulier (Kuser et al., 2001; Kuettner et al., 2010). Chez *K. lactis*, la mutation de plusieurs gènes de la glycolyse (Tableau 9) produit des mutants *rag*: c'est le cas de *KIHXX*, *KIPGI*, *KIPFK2* et *KIENO* (voir aussi Tableau 1 page 23) dont la délétion ne permet pas de soutenir une fermentation fonctionnelle.

4. b. Quelques différences concernant le métabolisme du glucose chez *S. cerevisiae* et *K. lactis*

Dans la glycolyse, les intermédiaires métaboliques produits et les enzymes nécessaires sont les mêmes chez *S. cerevisiae* et *K. lactis*. Toutefois il existe quelques différences dans le métabolisme du glucose entre ces deux levures. La différence principale vient du fait que *K. lactis* a un métabolisme plutôt respiratoire, alors que *S. cerevisiae* transforme le glucose en alcool par fermentation, même en présence d'oxygène. Une autre différence dans le métabolisme du glucose entre *K. lactis* et *S. cerevisiae* est le nombre d'enzymes impliquées (Tableau 9), plus faible chez *K. lactis* qui n'a pas subi la duplication complète du génome. Une enzyme a été identifiée chez *K. lactis* alors qu'elle est inconnue chez *S. cerevisiae*: il s'agit d'une GAPDH NADP-dépendante, *Gdp1*, alors que les GAPDH de *S. cerevisiae* ainsi que *G3p1* chez *K. lactis* sont NAD-dépendantes (Verho et al., 2002). En dehors des plantes, il s'agit de la première GAPDH NADP-dépendante décrite chez les eucaryotes. Chez *K. lactis*, son rôle est probablement lié au métabolisme du xylose, mais aussi à la réoxydation du NADPH produit par la voie des pentoses phosphate.

Une différence majeure dans le métabolisme du glucose entre *S. cerevisiae* et *K. lactis* est l'activité de la voie des pentoses phosphates, qui est environ cinq fois plus active chez *K. lactis* (Jacoby et al., 1993; Tarrío et al., 2006a). La voie des pentoses phosphate est divisée en deux parties (Figure 24) : une première partie oxydative et irréversible produit deux NADPH qui sont ensuite réoxydés via la respiration. La deuxième partie, appelée « non-oxydative », ne comprend que des réactions réversibles. Chez *S. cerevisiae*, la voie des pentoses phosphate a été récemment décrite comme un senseur métabolique du niveau d'oxydo-réduction des cellules, capable d'adapter le transcriptome en réponse à un stress oxydant (Krüger et al., 2011).

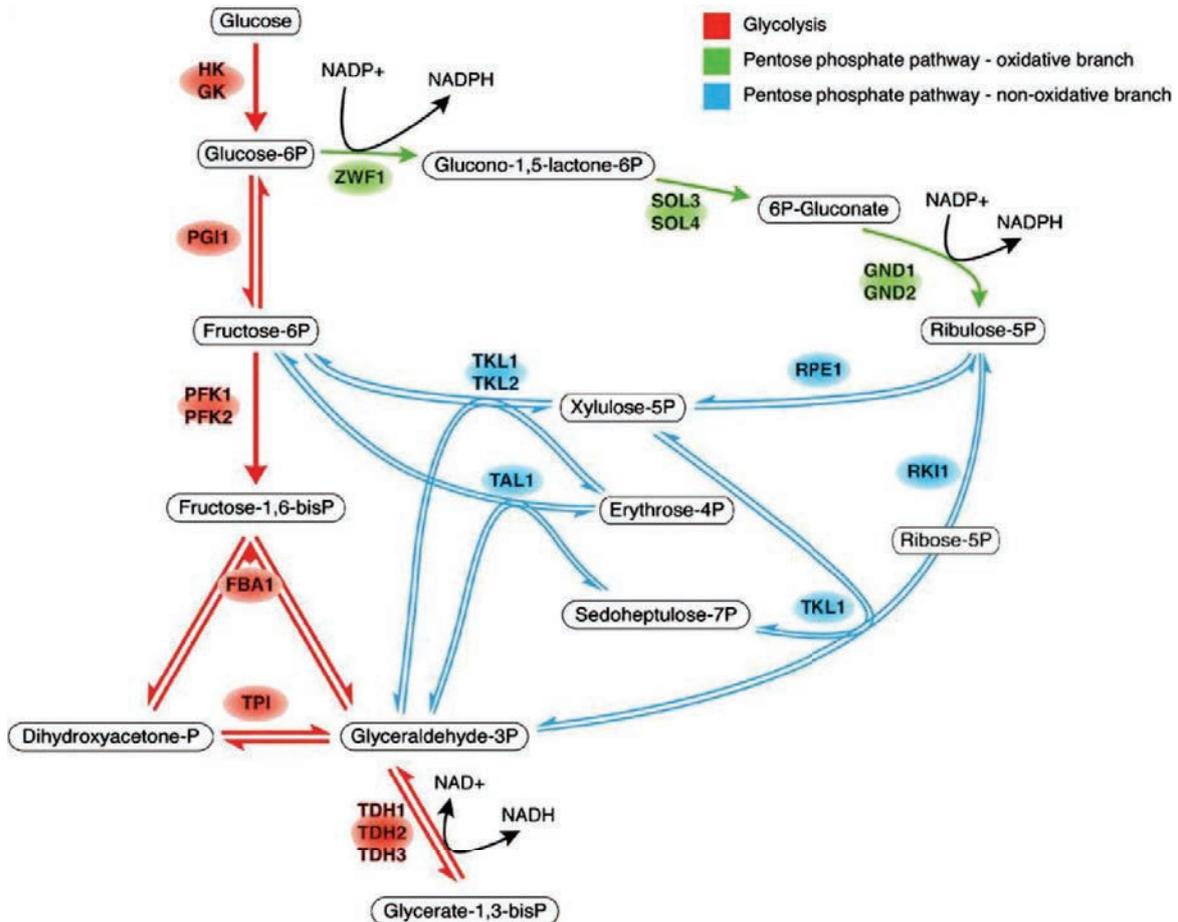


Figure 24: La voie des pentoses phosphate chez *S. cerevisiae* (Krüger et al., 2011). La branche oxydative de la voie des pentoses phosphate est irréversible et représentée en vert. La branche non-oxydative et réversible est représentée en bleu, et la glycolyse est en rouge.

Chez *K. lactis*, quelques enzymes de la voie des pentoses phosphate ont été isolées et caractérisées: *KIZwf1* catalyse une réaction irréversible responsable de la formation de NADPH, et la transkétolase, *KITlk1*, catalyse une réaction réversible (Jacoby and Heinisch, 1997; Saliola et al., 2006) (Figure 24). Un gène codant pour chacune des autres enzymes est conservé chez *K. lactis*. La réoxydation des NADPH produits par la voie des pentoses phosphate nécessiterait une NAD(P)H-déshydrogénase cytoplasmique (González Siso et al., 1996). De telles enzymes ont été mises en évidence chez *K. lactis* : *KINde1* et *KINde2* sont des protéines de la membrane externe des mitochondries (Tarrío et al., 2005, 2006b). Chez

K. lactis, le glucose est d'avantage transformé par la voie des pentoses phosphate que chez *S. cerevisiae*, ce qui produit plus de NADPH à réoxyder par la suite. C'est une des différences qui pourrait justifier le mode de vie préférentiellement respiratoire de *K. lactis*, qui lui permet de réoxyder plus facilement le NADPH produit, notamment via les déshydrogénases externes à la mitochondrie décrites ci-dessus (Tarrío et al., 2006a).

Une autre différence entre *K. lactis* et *S. cerevisiae* est le niveau de régulation du métabolisme du glucose par la voie de la répression glucose : chez *S. cerevisiae*, les gènes impliqués dans la respiration sont réprimés en présence de glucose, alors que ce n'est pas ou très faiblement le cas pour *K. lactis* (voir page 55).

4. c. Le contrôle de la glycolyse chez les levures

La cinétique de la glycolyse a été particulièrement étudiée et le développement de la biologie des systèmes a permis de mettre en place des modèles mathématiques de la glycolyse (Herrgård et al., 2008; Smallbone et al., 2013), qui combinent des données génomiques, transcriptomiques, protéiques et métabolomiques. La métabolomique est l'étude des variations des quantités de métabolites intermédiaires de la glycolyse et constitue une « photographie » de la quantité de métabolites à un instant donné. Cette technique permet de mesurer les variations du flux glycolytique qui répondent à un stimulus extérieur, tel qu'un changement de source de carbone. Ces variations de métabolites sont le résultat d'une régulation fine à plusieurs niveaux dans le cas d'une situation stable ; elles précèdent et entraînent les régulations de la glycolyse dans une situation changeante. Tout d'abord, les enzymes glycolytiques sont régulées au niveau protéique, soit par des modifications post-traductionnelles, soit par des interactions avec des effecteurs allostériques. Ensuite, les régulations de la glycolyse ont lieu au niveau transcriptionnel, car cela ne permet pas un changement rapide du flux mais plutôt une adaptation à long terme.

4. c. i. La régulation du flux métabolique : analyses métabolomiques chez les levures

La glycolyse est un phénomène oscillant : la concentration en métabolites oscille autour de la phosphofructokinase, avec une fréquence allant de une minute à plusieurs jours selon les conditions (Richard, 2003). L'état du flux métabolique peut être évalué en mesurant la quantité des métabolites intermédiaires. Ici, nous nous intéresserons aux changements de quantité de métabolites intermédiaires en réponse à une stimulation par du glucose, tels que mesurés par plusieurs études de métabolomique chez *S. cerevisiae*, dans des souches sauvages mais aussi dans des mutants du métabolisme du glucose. Après stimulation par le glucose, la variation des quantités de métabolites dans un contexte sauvage est présentée dans la Figure 25.

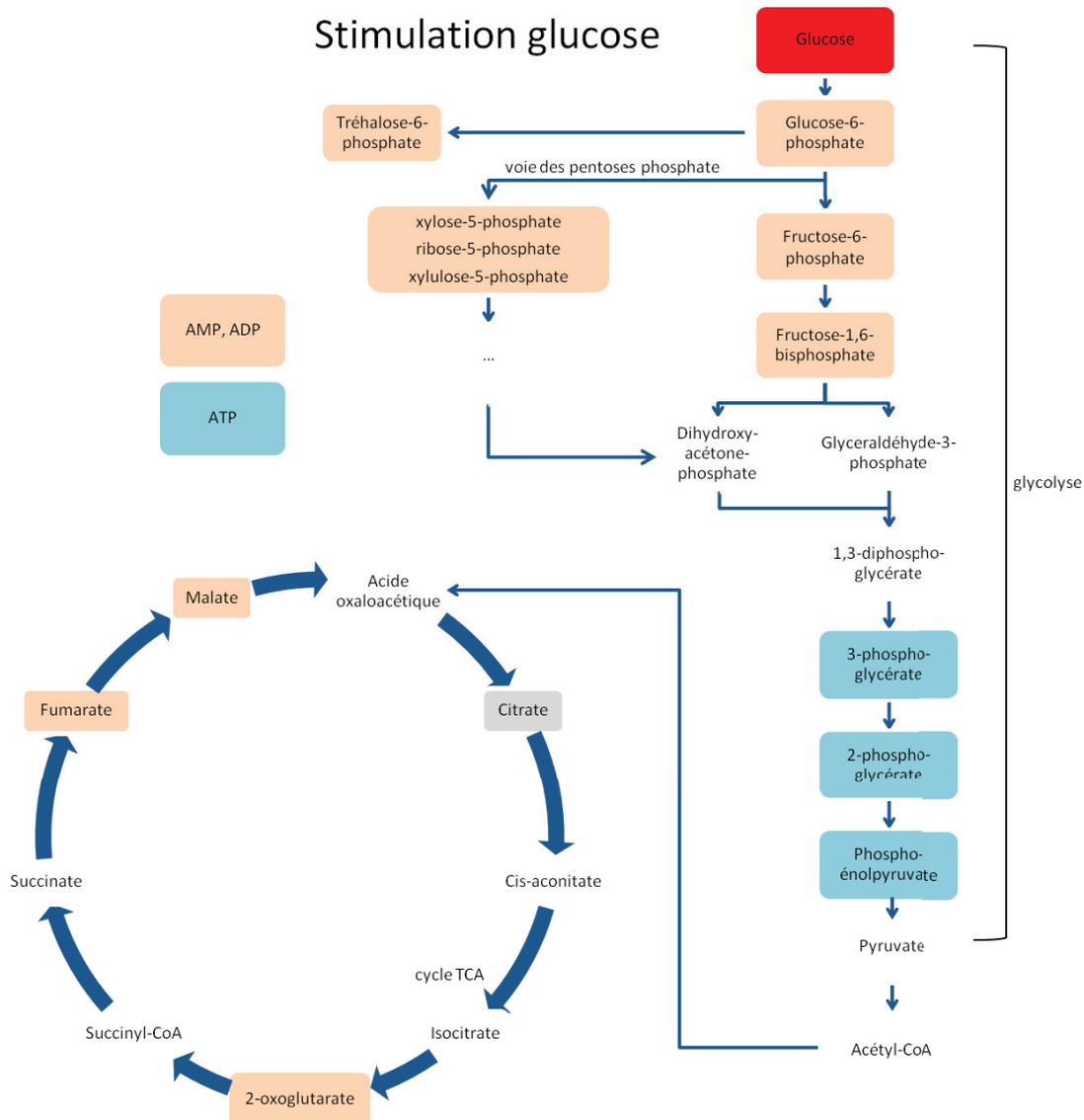


Figure 25: Fluctuation des quantités de métabolites après stimulation glucose. La quantité des métabolites en orange clair augmente rapidement après stimulation glucose (montré en rouge), alors que les métabolites en bleu diminuent. Les pentoses phosphate : xylose-5-phosphate, ribose-5-phosphate et xylulose-5-phosphate sont mesurés conjointement et ne sont pas dissociés (Walther et al., 2013).

Après ajout de glucose dans le milieu, les métabolites de la partie supérieure de la glycolyse augmentent rapidement (30 secondes après ajout de glucose) : le glucose-6-phosphate et le fructose-6-phosphate s'accumulent (Theobald et al., 1997; Visser et al., 2004). L'ajout de glucose dans le milieu et l'augmentation des métabolites de la partie supérieure de la glycolyse entraînent rapidement une diminution du niveau énergétique de la cellule et du niveau total d'AXP (AXP=AMP+ADP+ATP) ; la quantité d'ATP diminue alors que l'AMP et l'ADP, mais aussi l'AMP cyclique, augmente (Theobald et al., 1997; Kresnowati et al., 2006). Cette diminution du niveau global d'AXPs peut s'expliquer par la transformation des AXP en IMP et inosine, qui remplissent le rôle de « stockage » des AXP (Walther et al., 2010). Ensuite, après 120 secondes, une augmentation persistante de fructose-1,6-bisphosphate et de pentoses phosphate est observée (Walther et al., 2013). A l'inverse, les métabolites de la partie inférieure de la glycolyse diminuent : les 2- et 3-phosphoglycérates

ainsi que le phosphoénolpyruvate (Theobald et al., 1997; Visser et al., 2004). Une augmentation de tréhalose-6-phosphate, un intermédiaire de la biosynthèse du tréhalose, est également observée 180 secondes après ajout de glucose (Kresnowati et al., 2006). Les métabolites du cycle TCA, producteur de cofacteurs réduits sont également régulés par l'ajout de glucose : le malate, le fumarate et le 2-oxoglutarate (= α -kétoglutarate) augmentent alors que la quantité de citrate reste stable (Kresnowati et al., 2006).

Chez *S. cerevisiae*, des analyses métabolomiques ont été réalisées sur plusieurs mutants impliqués dans la glycolyse et sa régulation : *pfk1*, *zwf1* et *gcr2*, entre autres (Shirai et al., 2013). Ainsi, dans un mutant *pfk1*, l'accumulation des métabolites supérieures de la glycolyse est observée : glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate, glucose-1-phosphate et pentoses phosphate. Ces métabolites sont tous reliés par des réactions réversibles et leurs quantités tendent à s'équilibrer. Par contre, la quantité de certains métabolites de la partie inférieure de la glycolyse est fortement diminuée : 2- et 3-phosphoglycérates, phosphoénolpyruvate et acétyl-CoA (Shirai et al., 2013). Ces observations suggèrent que la délétion de la phosphofructokinase affecte la glycolyse en bloquant le métabolisme du glucose. Chez *K. lactis*, une étude métabolomique a été réalisée sur un mutant *rag8* de la caséine kinase I, impliquée dans la signalisation du glucose (Goriatti et al., 2013). La glycolyse est indirectement affectée dans ce mutant, car les régulateurs transcriptionnels *K/Rgt1* et *Sck1*, impliqués dans la régulation des gènes glycolytiques, sont affectés dans un mutant *rag8* (Neil et al., 2007). Le transport du glucose par la perméase de faible affinité *Rag1* est également déficient. La fluctuation des métabolites dans ce mutant suggère que les réactions visant à rééquilibrer le ratio $\text{NAD(P)}^+/\text{NAD(P)H}$ sont favorisées, au détriment de celles qui entraînent la réduction de ces cofacteurs. En effet, la synthèse *de novo* de NAD est observée, les métabolites du cycle TCA s'accumulent moins et l'acétyl-CoA est distribué de manière asymétrique dans les différents compartiments subcellulaires.

Les analyses métabolomiques constituent des « photographies » du flux glycolytique permettant de mieux comprendre les régulations de la glycolyse. Ces régulations glycolytiques sont effectuées à différents niveaux, qui sont présentés ensuite : régulations transcriptionnelle et post-traductionnelle.

4. c. ii. La régulation transcriptionnelle des enzymes de la glycolyse chez les levures

Plusieurs régulateurs transcriptionnels de l'expression des gènes glycolytiques ont été caractérisés chez *S. cerevisiae*. Notamment, *Gcr1* est un activateur transcriptionnel régulant potentiellement tous les gènes de la glycolyse, car tous portent des séquences consensus de *Gcr1* (CTTCC). Son activation n'a pas été reliée à la présence de glucose dans le milieu extracellulaire. La mutation de *GCR1* affecte fortement la croissance cellulaire et provoque une diminution importante de la quantité protéique de presque toutes les enzymes glycolytiques (López and Baker, 2000). *Gcr2* ne contient pas de séquence de fixation à l'ADN et interagit avec *Gcr1* pour contrôler les gènes glycolytiques (Uemura and Jigami, 1992;

Chambers et al., 1995). Rap1 est un autre facteur transcriptionnel dont les séquences consensus sont présentes dans les promoteurs de tous les gènes glycolytiques, et agit de concert avec Gcr1 et Gcr2 pour permettre l'expression maximale des gènes glycolytiques (Chambers et al., 1995; Menon et al., 2005). Les activateurs transcriptionnels Reb1, Abf1 et Tye7 ont également été caractérisés dans l'activation de certains gènes glycolytiques (Chambers et al., 1995; Chen and Lopes, 2007). *TYE7* a été initialement caractérisé comme un suppresseur de mutation *gcr1* (Nishi et al., 1995). Enfin, les répresseurs transcriptionnels Mig1 et ScRgt1 sont également impliqués dans le contrôle de l'expression de certains gènes glycolytiques (Chambers et al., 1995; Palomino et al., 2005). L'expression des différents gènes glycolytiques est induite ou réprimée par le glucose : *HXK2*, *PFK1*, *PFK2*, *PGK1*, *ENO2* et *PYK1* sont plus fortement exprimés en présence de glucose, alors que *HXK1*, *GLK1*, *ENO1* et *PYK2* ont leur expression réprimée en présence de glucose (Moore et al., 1991; Chambers et al., 1995; Özcan and Johnston, 1995).

Chez *K. lactis*, certains régulateurs des gènes glycolytiques ont déjà été présentés précédemment : *KIRgt1* réprime l'expression de *KIHXX* et *KIENO* (Rolland et al., 2006) (page 26), *Sck1* active l'expression de *KIHXX* et *KIPGI* (Neil et al., 2007) (page 33) et *KISnf2* active l'expression de *KIHXX* (Cotton et al., 2012) (page 34). En plus de ces régulateurs, les gènes *KIGCR1* et *KIGCR2* ont été étudiés chez *K. lactis* et sont des orthologues des gènes des régulateurs transcriptionnels de la glycolyse *GCR1* et *GCR2* chez *S. cerevisiae* (Haw et al., 2001; Neil et al., 2004). *KIGCR1* complémente le défaut de croissance d'un mutant $\Delta gcr1$ chez *S. cerevisiae* (Haw et al., 2001), et vice versa (Neil et al., 2004). Les mutants $\Delta Klgcr1$ et $\Delta Klgcr2$ ont un phénotype Rag⁻ qui montre leur incapacité à maintenir une glycolyse fonctionnelle : en effet l'expression des gènes glycolytiques *KIHXX*, *KIPGI* et *KIENO* est affectée dans ces mutants, ainsi que l'expression de la pyruvate décarboxylase *KIPDC* et des gènes des transporteurs du glucose *RAG1* et *HGT1*. L'effet sur *RAG1* et *HGT1* semble indirect puisque *KIGcr1* se fixe aux promoteurs de *KIHXX*, *KIENO* et *KIPDC* mais pas à celui de *RAG1* (Neil et al., 2004).

Cependant, des études récentes ont montré que, en réponse à un changement de source de carbone, la régulation transcriptionnelle des gènes a peu d'impact sur le flux glycolytique, comparée aux modifications post-transcriptionnelles (Daran-Lapujade et al., 2004, 2007). Ces régulations post-transcriptionnelles incluent la régulation de la demi-vie des ARNm (Kresnowati et al., 2006) ainsi que des modifications post-traductionnelles des enzymes.

4. c. iii. La régulation des enzymes de la glycolyse par leur association et localisation

Dans de nombreuses espèces l'activité des enzymes glycolytiques est régulée par leur association en un complexe appelé métabolon ou glycosome. C'est le cas par exemple chez les plantes (Graham et al., 2007). Chez *S. cerevisiae*, l'association de certaines enzymes glycolytiques entre elles a été observée, et les métabolons formés sont associés au cytosquelette d'actine (Araiza-Olivera et al., 2013). L'association des enzymes glycolytiques

entre elles permet leur protection contre des inhibiteurs : l'hexokinase et la GAPDH sont protégées de leur inhibition par le tréhalose quand elles sont associées à d'autres enzymes glycolytiques (Araiza-Olivera et al., 2010, 2013). L'association de certaines enzymes glycolytiques entre elles a également été observée en réponse à l'hypoxie, en particulier pour l'énolase, et joue un rôle dans la régulation du métabolisme du carbone (Miura et al., 2013).

En dehors de leur association, la localisation spatiale des enzymes joue un rôle dans la modulation de leur activité chez *S. cerevisiae* : des enzymes de la glycolyse (GAPDH) et de la néoglucogenèse (fructose-1,6-bisphosphate, phosphoénolpyruvate carboxykinase) sont sécrétées dans le périplasme quand les cellules manquent de glucose, et ré-intériorisées quand la concentration en glucose augmente (Giardina and Chiang, 2013a, 2013b).

4. c. iv. La régulation post-traductionnelle des enzymes de la glycolyse chez les levures

Chez *S. cerevisiae*, les enzymes de la glycolyse subissent des régulations post-traductionnelles telles que la phosphorylation, l'acétylation, la méthylation et la thiolation, en un ou plusieurs résidus (Oliveira and Sauer, 2012). Ainsi, toutes les enzymes de la glycolyse contiennent des sites potentiels de phosphorylation. Cependant, la phosphorylation et son effet sur l'activité enzymatique n'ont été testés que pour peu d'enzymes glycolytiques : par exemple, la phosphorylation de la sérine 15 de Hxk2 (parfois nommée sérine 14, car la première méthionine est clivée) en présence de glucose par Snf1 régule sa localisation cellulaire ainsi que sa forme oligomérique: seule la forme monomère est phosphorylée (Fernandez-Garcia et al., 2012; Behlke et al., 1998; Randez-Gil et al., 1998b; Ahuatzi et al., 2004). La phosphorylation de cette sérine 15 est dépendante d'une autre kinase, Tda1, ce qui affecterait la dimérisation de Hxk2 mais pas sa répartition cellulaire (Kettner et al., 2012; Fernandez-Garcia et al., 2012). La sérine 15 fait partie d'un site consensus de phosphorylation par la PKA mais cette kinase n'a pas été impliquée dans la régulation de la localisation cellulaire de Hxk2 (Fernandez-Garcia et al., 2012). La déphosphorylation de la sérine 15 se fait par la phosphatase Glc7-Reg1 (Randez-Gil et al., 1998b). La sérine 158 est également phosphorylée : elle est responsable de l'inactivation de Hxk2 par autophosphorylation (Heidrich et al., 1997).

Chez *K. lactis*, la sérine 15 de K/Hxk est également phosphorylée et impliquée dans la dimérisation de l'enzyme. Comme pour ScHxk2, l'autophosphorylation de la sérine 157 inactive l'activité enzymatique de K/Hxk (Bär et al., 2003; Kettner et al., 2013).

La pyruvate kinase Pyk1 est phosphorylée par la PKA (sous-unité Tpk1) en réponse au glucose chez *S. cerevisiae* (Portela et al., 2006). Une étude de phosphoprotéomique a permis de mettre en évidence la phosphorylation différentielle selon les conditions de culture des enzymes Hxk1, Pfk1, Pfk2, Fba1, Tdh1/2/3 et Gpm1 (Oliveira et al., 2012). Une des isoenzymes de la GAPDH, Tdh3, est thiolatée (ajout d'un atome de soufre S) au niveau d'une sérine suite à un stress oxydatif (Grant et al., 1999). L'acétylation de Pgc1 a été

récemment mise en évidence (Weinert et al., 2014), mais l'effet sur sa fonction n'a pas été analysé. La glycation des protéines (modification post-traductionnelle irréversible due au glucose ou à un de ses dérivés : glyoxal et méthylglyoxal) touche plusieurs enzymes glycolytiques : l'aldolase, la phosphoglycérate mutase et particulièrement l'énolase Eno2, entraînant sa perte d'activité (Gomes et al., 2006). Enfin, le clivage protéolytique d'un fragment d'environ 80 acides aminés de Pfk1 active la phosphofructokinase (Kopperschläger et al., 1993).

4. c. v. La régulation allostérique des principales enzymes de la glycolyse

Les enzymes qui catalysent des réactions irréversibles génèrent des points de contrôle de la glycolyse : il s'agit de l'hexokinase, la phosphofructokinase et la pyruvate kinase, qui sont régulées par des effecteurs allostériques ou des modifications covalentes. La phosphofructokinase est considérée comme la première étape-clé de la glycolyse, car il s'agit de la première étape irréversible qui est proprement spécifique à la glycolyse. En effet, le glucose-6-phosphate formé par la réaction catalysée par l'hexokinase peut aussi être métabolisé par la voie des pentoses phosphate. Chez *S. cerevisiae*, l'ATP inhibe l'activité de la phosphofructokinase, alors que l'AMP et le fructose-2,6-bisphosphate (synthétisé en dehors de la glycolyse par Pfk26 et 27) reverse cette inhibition (Reibstein et al., 1986). Les phénomènes d'oscillation de la glycolyse sont contrôlés en partie par l'allostérie de la phosphofructokinase (Richard, 2003; Sträter et al., 2011; Gustavsson et al., 2014).

L'activité de la pyruvate kinase est contrôlée par le fructose-1,6-bisphosphate (Jurica et al., 1998; Xu et al., 2012). Pendant la respiration, le substrat de la pyruvate kinase, le phosphoénolpyruvate, s'accumule et va inhiber la triose phosphate isomérase pour favoriser la voie des pentoses phosphate et stimuler le métabolisme antioxydant, ce qui constitue un rétro-contrôle de la glycolyse (Grüning et al., 2011).

Plusieurs composés sont capables d'activer l'hexokinase *in vitro* : le citrate, le phosphate et le 3-phosphoglycérate (Kosow and Rose, 1971). Le tréhalose-6-phosphate et l'ATP sont des inhibiteurs *in vivo* des hexokinases de levure (Blázquez et al., 1993). Le tréhalose inhibe l'hexokinase et la GAPDH (Araiza-Olivera et al., 2010). Chez la levure *K. lactis*, l'ATP ne semble pas inhiber K/Hxk, alors qu'il inhibe ScHxk2 (Bär et al., 2003).

Dans la voie des pentoses phosphate, l'oligomérisation de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, Zwf1, et donc son activité, sont régulées par le NADPH chez *K. lactis* et *S. cerevisiae*, et aussi probablement chez les eucaryotes supérieurs (Saliola et al., 2012). Chez *S. cerevisiae*, Zwf1 est inhibé par le tréhalose, et n'est pas protégé de cette inhibition par l'association avec certaines enzymes glycolytiques (Araiza-Olivera et al., 2010).

L'ensemble des régulations transcriptionnelles, post-traductionnelles et allostériques forme un réseau complexe de contrôle de la glycolyse. Les différentes régulations présentées dans les pages ci-dessus sont reprises dans la Figure 26. Les enzymes-clés qui catalysent les

réactions irréversibles (hexokinase, phosphofructokinase et pyruvate kinase) constituent des points de contrôle de la glycolyse et sont régulées de plusieurs manières :

- les gènes qui codent pour ces enzymes sont régulés par le glucose extracellulaire
- les enzymes sont régulées par des modifications post-traductionnelles : phosphorylation, clivage protéolytique
- les enzymes sont activées ou inhibées par des régulateurs allostériques issus ou dérivés de la glycolyse.

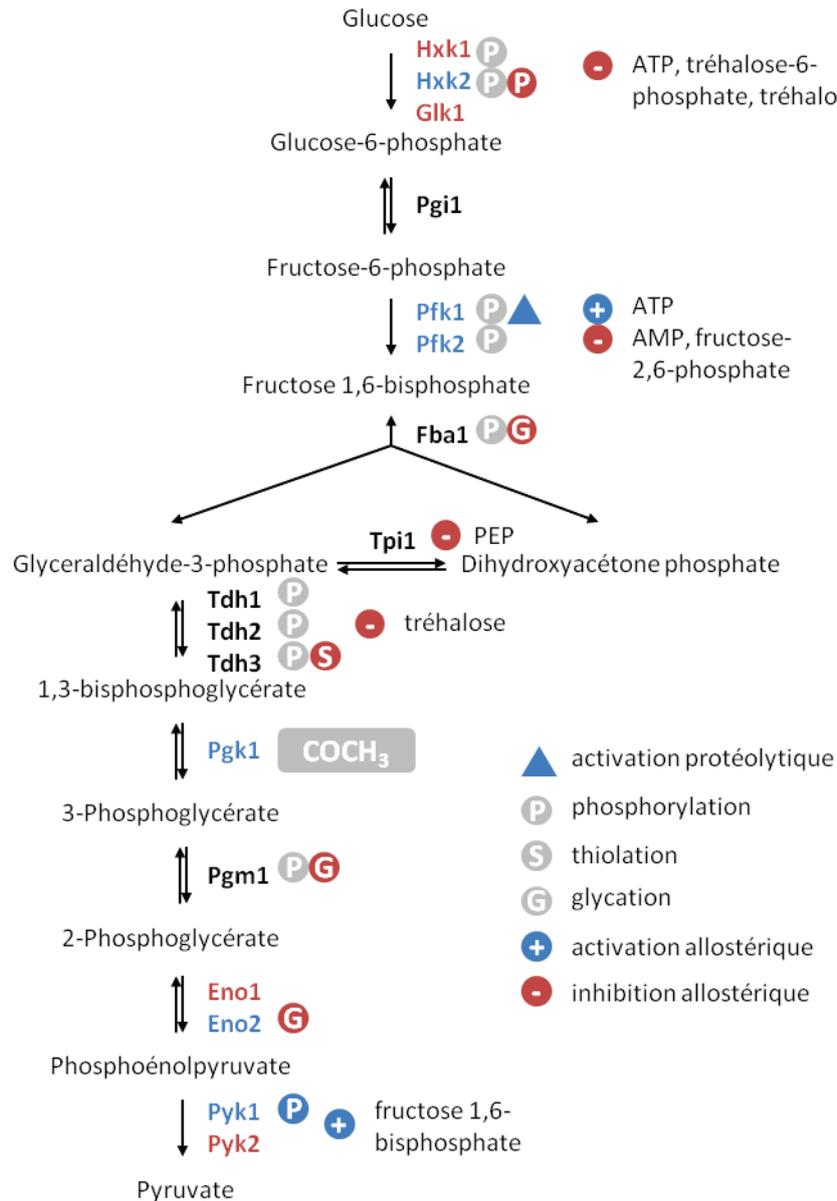


Figure 26: La régulation transcriptionnelle, post-traductionnelle et allostérique de la glycolyse chez la levure *S. cerevisiae*. Les enzymes apparaissant en bleu sont codées par un gène activé par le glucose, celles en rouge sont codées par un gène réprimé par le glucose. Différentes modifications post-traductionnelles sont présentées : acétylation (COCH₃), protéolyse (triangle), phosphorylation (P), thiolation (S) et glycation (G). La couleur dans laquelle elles sont représentées indique leur effet sur l'activité enzymatique : gris pour effet inconnu, bleu pour activation et rouge pour inhibition. Les métabolites responsables de régulation allostérique sont indiqués après un + bleu pour montrer les activateurs ou un - rouge pour les inhibiteurs.

4. d. Les inhibiteurs chimiques de la glycolyse chez les levures

Chez les levures, les enzymes glycolytiques sont redondantes, les gènes qui les codent sont parfois essentiels et leurs activités sont finement régulées. Pour pouvoir étudier leurs fonctions dans la cellule, des mutants ont été créés lorsque les gènes ne sont pas essentiels. Cependant, l'étude de la fonction des enzymes glycolytiques via des mutants de la glycolyse n'est pas toujours optimale, car ces mutants sont souvent incapables de croître en utilisant le glucose comme source de carbone et ils peuvent mettre en place des processus d'adaptation pour compenser le gène délété. Pour éviter les phénomènes d'adaptation, il est nécessaire d'inhiber la glycolyse de manière aiguë, par opposition à l'inhibition chronique de la glycolyse dans des mutants. Pour cela, des inhibiteurs chimiques de la glycolyse ont été utilisés. De nombreux inhibiteurs chimiques de la glycolyse sont couramment utilisés en recherche, *in vitro* en enzymologie ou *in vivo* en biologie du vivant, notamment chez les levures et en cancérologie (Pelicano et al., 2006; Pathania et al., 2009). Dans les paragraphes qui suivent, les propriétés de certains de ces inhibiteurs sont présentées : 3-bromopyruvate, fluorure de sodium, 2-déoxyglucose et iodoacétate. Parmi les inhibiteurs de la glycolyse non cités dans cette présentation, on peut mentionner l'arséniate qui remplace le phosphate inorganique dans la réaction catalysée par la GAPDH. Le produit de cette réaction est très instable et ne permet pas de maintenir le flux glycolytique.

4. d. i. Le 3-bromopyruvate

Le 3-bromopyruvate (3BrPA) est un analogue du pyruvate qui inhibe l'hexokinase et a aussi été décrit comme un inhibiteur de la glyceraldéhyde 3-phosphate déhydrogénase (Barnard et al., 1993), de la 3-phosphoglycérate kinase (Jones et al., 1995) et des enzymes du cycle de Krebs (Ko et al., 2001). C'est un agent alkylant qui réagit avec les groupements SH libres des cystéines, donc son action cytotoxique peut être attribuée à d'autres mécanismes que l'inhibition de l'hexokinase. Sa structure est montrée dans le Tableau 10.

Son utilisation sur des cellules mammifères à une concentration de 5 mM conduit à la déplétion en ATP des cellules (Ko et al., 2001) par inhibition de l'hexokinase à la fois mitochondriale et cytosolique, cela a des effets cytotoxiques et conduit à l'apoptose ou la nécrose. Sa cytotoxicité a été étudiée chez la levure *S. cerevisiae* et a permis d'établir que la levure est sensible à la drogue et que son transport à l'intérieur de la cellule s'effectue par le symporteur de lactate/pyruvate H⁺ Jen1 (Lis et al., 2012). Le 3BrPA n'est pas efflué par le réseau pléiotropique de résistance aux drogues, et sa cytotoxicité est modulée par le niveau de glutathione réduite (GSH) (Lis et al., 2012).

4. d. ii. Le fluorure de sodium

Le fluorure de sodium (NaF) est utilisé comme source d'ions fluorures pour inhiber le transport du glucose et la glycolyse (énolase), sur des cellules humaines (Feig et al., 1971) et des microorganismes : bactéries formatrices de biofilm du genre *Streptococcus* (Kanapka and

Hamilton, 1971; Mickelson, 1977; Scheie et al., 1988; Pandit et al., 2011) et levures (Silveira et al., 1996; Jules et al., 2004). Sur des cellules mammifères, en plus de l'énolase, le NaF inhibe aussi la glucose 6-phosphate déshydrogénase (G6PD) (Bergandi et al., 2010) et la pyruvate kinase PKM2 (Moellering and Cravatt, 2013). Chez *S. cerevisiae*, il a aussi été décrit comme un inhibiteur des caséines kinase de type I *in vitro* (Robinson et al., 1993). Enfin il est couramment utilisé en laboratoire comme inhibiteur de phosphatase *in vitro* pour la préparation d'extraits protéiques.

4. d. iii. Le 2-déoxyglucose

Le 2-déoxyglucose (2DG) est un analogue du glucose qui peut être phosphorylé sur le carbone 6 mais pas métabolisé par la glycolyse après cette phosphorylation (Figure 27). C'est un inhibiteur non-compétitif de l'hexokinase et un inhibiteur compétitif de la phosphoglucose isomérase (PGI) (Ralser et al., 2008), qui entraîne la déplétion en ATP de la cellule.

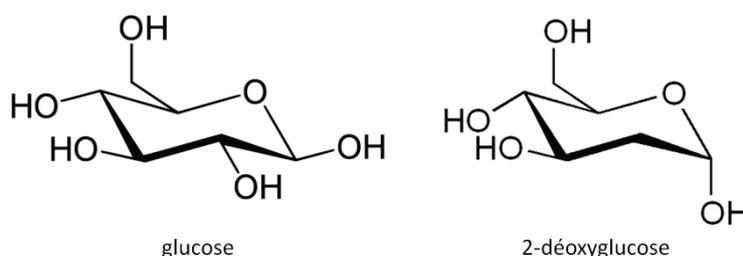


Figure 27: Comparaison des molécules de glucose et de 2-déoxyglucose

Chez *S. cerevisiae*, plusieurs études ont permis de mettre en évidence des mutants des gènes *HXK2*, *GLC7*, *REG1* ou encore *GRR1*, qui sont insensibles à l'effet toxique du 2DG (Zimmermann and Scheel, 1977; Entian and Zimmermann, 1980; Neigeborn and Carlson, 1987). Comme ces différents mutants ont une répression glucose affectée, il a été suggéré que le 2DG inhibe la croissance en activant la voie de répression glucose, mais cela n'explique pas pourquoi le 2DG inhibe la croissance dans un milieu contenant du glucose. Par contre, dans les mutants identifiés, la kinase Snf1 est activée et nécessaire à la résistance au 2DG (McCartney et al., 2014). La résistance au 2DG conférée par la délétion de ces gènes est fonction de la source de carbone utilisée : les mutants $\Delta hxk2$ et $\Delta reg1$ sont résistants au 2DG en présence de glucose ou de sucrose, mais pas dans un milieu contenant de l'éthanol et du glycérol, et le mutant $\Delta grr1$ est résistant au 2DG seulement avec du sucrose comme source de carbone (McCartney et al., 2014). Dans un mutant $\Delta hxk2$, il semble que ce soit la délétion de l'activité catalytique plutôt que l'activité régulatrice qui confère la résistance au 2DG (McCartney et al., 2014). La surexpression de gènes codants pour des 2-déoxyglucose-6-phosphate phosphatases (*DOG1* et *DOG2*) permet la résistance au 2DG (Sanz et al., 1994; Randez-Gil et al., 1995a, 1995b). Le 2-déoxyglucose-6-phosphate pourrait être métabolisé en déoxygluconolactone-6-phosphate par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (Zwf1) via la voie des pentoses phosphate, mais à un taux mille fois plus bas que le glucose-6-phosphate (Chi et al., 1987). Un mutant $\Delta zwf1$ (première enzyme catalysant la voie des pentoses

phosphate) semblerait être résistant au 2DG (Ralser et al., 2008) mais cela est contesté (McCartney et al., 2014).

Le 2DG est transporté à l'intérieur de la cellule par les transporteurs du glucose (Brown, 1962; Gould and Holman, 1993; Arbuckle et al., 1996). Chez *S. cerevisiae*, sur un milieu glucose, le 2DG inhibe l'activation de *HXT1*, *HXT2* et *HXT3* (Roy et al., 2013b), alors que dans un milieu sans glucose, le senseur du glucose Snf3 détecte le 2DG, ce qui entraîne l'activation partielle et non physiologique de la voie de signalisation du glucose (dégradation de Mth1) (Dietvorst et al., 2010; Jouandot et al., 2011). Le 2DG inhibe également l'activité de la pompe à protons Pma1 chez *S. cerevisiae* (Özalp et al., 2010).

Bien que le sujet ait été étudié, l'effet cytotoxique du 2DG est encore mal compris mais probablement lié à l'accumulation d'un intermédiaire toxique : 2-déoxyglucose-6-phosphate ou autre (McCartney et al., 2014). Le 2DG entraîne aussi la formation de protéines glycosylées aberrantes ce qui provoque l'accumulation de protéines mal repliées dans le réticulum endoplasmique (Kang and Hwang, 2006). Le 2DG provoque une restriction de l'apport calorique et prolonge ainsi la vie du ver *Caenorhabditis elegans* (Schulz et al., 2007).

4. d. iv. L'iodoacétate

L'iodoacétate (IA) est un agent alkylant qui est utilisé comme inhibiteur chimique de la glycolyse pour sa capacité à inhiber la GAPDH. L'IA inhibe la GAPDH par carboxyméthylation d'un ou plusieurs groupements thiol (-SH) de son site catalytique (Webb, 1966). L'IA a été utilisé par Warburg et d'autres pour permettre la caractérisation de la glycolyse (Webb, 1966). Il a été largement utilisé comme inhibiteur chimique de la glycolyse chez la levure *S. cerevisiae* (Tableau 10), mais à notre connaissance, son utilisation chez *K. lactis* n'a jamais été rapportée.

Plusieurs paramètres sont à prendre en compte pour l'utilisation de l'iodoacétate comme inhibiteur de la GAPDH (Webb, 1966) :

- L'effet de l'IA est dépendant du pH : il est rapporté chez *S. cerevisiae* que 1 mM d'IA inhibe complètement la croissance à pH 3,9, mais pas du tout lorsque le pH est supérieur à 5, et à 50 % lorsque le pH est égal à 4,6. Ainsi il est compliqué de comparer les travaux de différents laboratoires lorsque le pH du milieu utilisé n'a pas été précisément mesuré.

- Même si la GAPDH semble être l'enzyme dont l'action est la plus fortement inhibée par l'IA, de nombreuses autres enzymes sont sensibles à l'IA, qu'elles portent ou non des groupements thiol au sein de leur site catalytique. C'est le cas par exemple de l'hexokinase qui possède quatre groupements SH dans son site actif (Webb, 1966; Jones et al., 1975), et aussi de nombreuses déshydrogénases, dont certaines impliquées dans la glycolyse (pyruvate kinase et carboxylase), et de peptidases. Selon Webb, en utilisant une concentration d'IA relativement faible (inférieure à 1 mM), il est possible d'inhiber assez spécifiquement la GAPDH. Au delà de cette concentration, l'IA peut provoquer l'alkylation d'autres protéines et perdre de sa spécificité.

- Le traitement à l'IA est généralement considéré comme irréversible (Webb, 1966; Pirolo and Allen, 1986).

En plus de son utilisation comme inhibiteur glycolytique, l'IA a également été utilisé dans le séquençage de protéines pour alkyler les cystéines et éviter la formation de ponts disulfides (Gambée et al., 1995). Enfin, l'IA a été utilisé comme un inhibiteur de protéases (1 mM *in vitro*) lors de la préparation d'extraits protéiques (Yasuhara and Ohashi, 1987).

4. d. v. Utilisation des inhibiteurs de la glycolyse en recherche et en médecine

Quelques utilisations recensées dans la littérature sont présentées dans le Tableau 10 pour les inhibiteurs chimiques présentés auparavant.

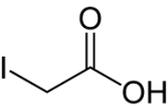
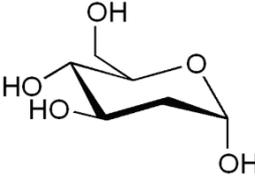
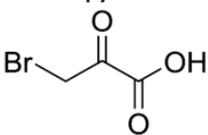
Drogues	Processus ciblés	Concentrations utilisées
Iodoacétate 	GAPDH	<i>S. cerevisiae</i> : 15 µM (Senac and Hahn-Hägerdal, 1990), 0,5 mM (Busturia and Lagunas, 1986), 1 mM (Newcomb et al., 2003; Lushchak et al., 2008), 4 mM (Dong and Xu, 2003), 20 mM (Olsen et al., 2009; Özalp et al., 2010) cellules mammifères : 0,1 à 1 mM (Schmidt, 2009)
2-déoxyglucose 	hexokinase	cellules mammifères : 50 mM (Ko et al., 2001) cellules humaines : 1,83 à 21,9 mM (Maher et al., 2004) <i>S. cerevisiae</i> : 5 à 20 mM (Özalp et al., 2010), 10 mM (Neary and Pastorino, 2010)
	analogue du glucose	cellules mammifères : 20 mM (Stoltzman et al., 2008) <i>S. cerevisiae</i> : 122 mM (2 %) (Jouandot et al., 2011), 100 mM (Dietvorst et al., 2010) <i>K. lactis</i> : 122 mM (2 %) (Royt, 1983; Weirich et al., 1997; Betina et al., 2001; Rigamonte et al., 2011)
Fluorure de sodium	transport du glucose, glycolyse	<i>Streptococcus agalactiae</i> : 2,5 à 10 mM (Mickelson, 1977)
	énolase	<i>S. cerevisiae</i> : 50 mM 30 min (Silveira et al., 1996; Jules et al., 2004)
	énolase, glucose-6-phosphate déshydrogénase, pyruvate kinase	cellules humaines : 80 à 250 µM (Bergandi et al., 2010) cellules mammifères : 3 mM (Moellering and Cravatt, 2013)
3-bromopyruvate 	GAPDH	<i>Trypanosoma brucei</i> : 100 µM (Barnard et al., 1993) <i>S. cerevisiae</i> : 1 à 2 mM (Lis et al., 2012) (cytotoxicité)
	hexokinase	cellules humaines : 100 µM (Xu et al., 2005; Chen et al., 2009) tumeurs de lapin : 1,2 à 15 mM (Ko et al., 2001) cellules mammifères : 2 à 20 µM (Stoltzman et al., 2008)

Tableau 10: Table récapitulative des principaux inhibiteurs chimiques de la glycolyse, leur structure et leurs utilisations.

Certains de ces inhibiteurs sont utilisés en recherche clinique, notamment comme inhibiteur de croissance tumorale. En effet, les cellules cancéreuses sont souvent caractérisées par une glycolyse soutenue qui permet de fournir du pyruvate pour la fermentation, même en aérobic, afin de fabriquer des précurseurs pour la biosynthèse protéique et la croissance tumorale. Ce phénotype est appelé effet Warburg et représente une cible thérapeutique intéressante (Elf and Chen, 2013). Des inhibiteurs de l'hexokinase sont testés comme drogue

anti-tumorale : le 3BrPA a été testé en étude pré-clinique (Ko et al., 2004) et l'utilisation du 2DG a été validée *in vitro* pour freiner le développement des cellules cancéreuses (Maher et al., 2004), et des essais cliniques ont eu lieu (phases I et II) pour traiter certains cas de tumeurs (Singh et al., 2005; Raez et al., 2013). L'IA, inhibiteur de la GAPDH, est en cours d'expérimentation en tant qu'inhibiteur de croissance des cellules tumorales (Pathania et al., 2009).

Les inhibiteurs de la glycolyse sont aussi des traitements potentiels dans d'autres cadres en recherche médicale : le 2DG est envisagé comme traitement antiviral car il provoque la N-glycosylation des domaines externes des protéines de l'enveloppe virale (Parris, 2008), et le 3BrPA a été récemment identifié comme un agent antifongique intéressant contre *C. neoformans*, avec une concentration minimale inhibitrice comprise entre 120 et 150 μM (Dyląg et al., 2013). Enfin, le NaF est utilisé comme conservateur du glucose dans le sang avant analyse des prélèvements (Chan et al., 1989), grâce à son action inhibitrice de la glycolyse. Le blocage de l'énolase est rapide (moins de 5 minutes) mais le glucose est encore consommé après 30 minutes et jusqu'à 4 heures (Mikesh and Bruns, 2008).

4. e. La glycolyse comme régulateur de voies de signalisation

La régulation de la glycolyse a été décrite précédemment. En plus de son rôle énergétique, il apparaît que la glycolyse a un effet régulateur direct sur de nombreux processus cellulaires, soit par l'activité de certaines protéines enzymatiques, soit via l'action de certains métabolites issus de la glycolyse.

4. e. i. Le rôle non-glycolytique de certaines enzymes chez les levures

Les enzymes glycolytiques ont souvent une double fonction: en plus de leur activité enzymatique, certaines jouent un rôle de régulateur, notamment transcriptionnel (Kim and Dang, 2005).

- Régulation transcriptionnelle par les enzymes de la glycolyse et interaction avec les acides nucléiques

Plusieurs enzymes glycolytiques ont un rôle transcriptionnel chez les levures. Chez *S. cerevisiae*, le rôle de l'hexokinase comme régulateur transcriptionnel dans la voie de la répression glucose a été décrit auparavant (voir page 52). Des mutants *hvk2* ont été créés dans lesquels les fonctions transcriptionnelles et enzymatiques sont dissociées (Peláez et al., 2010). Chez *K. lactis*, aucune fonction transcriptionnelle directe n'a été identifiée à ce jour pour *K/Hxk*. Toutefois, le domaine de *ScHvk2* responsable de la régulation transcriptionnelle (Peláez et al., 2010) est bien conservé (quinze premiers acides aminés à l'extrémité N-terminale). Cependant, *K/Hxk* est impliqué dans des processus autres que la phosphorylation du glucose, comme la modulation de la durée de la vie chez *K. lactis* (Rizzetto et al., 2012). Une étude de protéomique a mis en évidence 45 protéines dont la quantité est régulée par

K/Hxk (Mates et al., 2014) : il s'agit notamment de protéines impliquées dans le métabolisme du glucose, le recyclage des protéines, la réponse générale au stress et le remodelage de la chromatine. Des protéines du cycle du méthylcitrate (cycle permettant la synthèse de pyruvate à partir de propionyl-CoA, un dérivé de la dégradation de la valine et de l'isoleucine) sont surreprésentées dans un mutant *Klhxk*, ce qui suggère la formation de pyruvate par la dégradation d'acides aminés ou gras (Mates et al., 2014).

L'hexokinase a aussi des rôles transcriptionnels dans d'autres organismes, notamment les plantes (Cho et al., 2006). Dans les cellules cancéreuses, sa localisation cellulaire a été récemment mise en évidence (Neary and Pastorino, 2010) mais aucun rôle transcriptionnel n'est connu à ce jour. Chez les mammifères, d'autres enzymes de la glycolyse ont des rôles de régulateurs transcriptionnels, parfois par liaison directe au promoteur des gènes-cible. C'est le cas de la GAPDH, mais aussi de l'énolase et de la pyruvate kinase (Zheng et al., 2003; Feo et al., 2000; Gao et al., 2012).

Chez la levure, certaines enzymes interagissent avec des acides nucléiques : la GAPDH a une fonction de déstabilisation des acides nucléiques (Karpel and Burchard, 1981), et l'isozyme Tdh3 régule le « silencing » de la transcription par fixation à la chromatine en association avec l'histone déacétylase Sir2 (Ringel et al., 2013). La fructose bisphosphate aldolase interagit avec le complexe de polymérase d'ARN de type III et régule la transcription des ARNt de transfert (Cieśła et al., 2014).

- Implication des enzymes de la glycolyse dans d'autres voies de régulation

En plus de leur rôle en tant que régulateur transcriptionnel, les enzymes de la glycolyse sont impliquées dans des voies de régulation chez la levure. Par exemple, l'hexokinase, mais aussi la GAPDH, sont impliquées dans l'apoptose (Amigoni et al., 2013; Silva et al., 2011). De plus, l'hexokinase ou la glucokinase remplissent des fonctions de senseurs du glucose chez les plantes, ou encore dans les cellules β du pancréas (Cho et al., 2009; Thorens, 2004). Des polypeptides codés par *TDH1*, *TDH2*, *TDH3*, les différentes isozymes de la GAPDH chez *S. cerevisiae*, sont retrouvés dans la paroi cellulaire où ils conservent une activité catalytique (Delgado et al., 2001). Cette localisation dans la paroi cellulaire est induite par une augmentation de la température et un manque de nutriments (Delgado et al., 2003). Récemment des peptides dérivés de Tdh1, Tdh2 et Tdh3 ont été retrouvés dans le vin, après avoir été sécrétés par *S. cerevisiae* comme peptides antimicrobiens (Branco et al., 2014). Chez les mammifères, la GAPDH est impliquée dans de nombreux processus, tels que le raccourcissement des télomères, l'export des ARN, la phosphorylation, la fusion des membranes, la mise en place du cytosquelette (Sirover, 1999). L' α -énolase des mammifères est une autre enzyme glycolytique aux rôles très divers : elle interagit avec des protéines de la glycolyse, des microtubules, des protéines membranaires et le plasminogène (précurseur de la plasmine). Elle est impliquée dans la régénération des muscles, l'apoptose et certaines pathologies (Díaz-Ramos et al., 2012). L'énolase a été initialement isolée chez la levure

comme une protéine de choc thermique (HSP) (Iida and Yahara, 1985). Chez la levure pathogène *Candida albicans*, l'énolase est impliquée dans la virulence et la filamentation (Ko et al., 2013). Enfin, la phosphofructokinase est nécessaire à l'homéostasie du pH et à l'assemblage des pompes ATPases vacuolaires (Chan and Parra, 2014), cependant les résultats ne permettent pas d'impliquer directement la Pfk plutôt que la glycolyse dans son ensemble.

4. e. ii. Le rôle de certains métabolites dans diverses voies de signalisation

Certains métabolites issus de la glycolyse sont capables d'influer sur des mécanismes de régulation transcriptionnelle. Par exemple, dans les cellules mammifères, les facteurs de transcription ChREBP et MondoA agissent en complexe pour réguler l'expression de gènes de la glycolyse et de la lipogenèse. Ils modulent l'expression de leurs gènes-cibles en fonction de la concentration en glucose-6-phosphate (Havula and Hietakangas, 2012). Chez la levure *S. cerevisiae*, Mcm1, un facteur de transcription également impliqué dans l'initiation de la réplication de l'ADN, est régulé par la glycolyse : le phénotype d'un mutant *mcm1* est supprimé par une mutation du gène glycolytique *PGM1* (Chen and Tye, 1995). A notre connaissance, le signal glycolytique impliqué n'a pas été décrit.

Ensuite, chez la levure *S. cerevisiae*, des petits métabolites ou effecteurs ont été considérés comme des messagers ou des régulateurs de voies de signalisation. Ainsi, le pH, qui chute momentanément après l'addition de glucose (Walther et al., 2013), apparaît comme un second messenger du glucose et intervient dans la régulation de la voie de signalisation dépendante de la PKA et dans l'assemblage des pompes vacuolaires V-ATPases (Dechant et al., 2010). De manière intéressante, l'assemblage des pompes vacuolaires V-ATPases est régulé par le flux glycolytique et la Pfk2 (Chan and Parra, 2014). Chez les mammifères, le niveau énergétique régule l'activité de l'AMPK (l'homologue de Snf1) via le ratio AMP/ATP : la fixation d'AMP active l'AMPK en situation de stress énergétique (Xiao et al., 2007). Chez les levures, le complexe SNF1 est régulé par l'ADP (Mayer et al., 2011). Un cofacteur dinucléotidique, le NADP, qui reflète le niveau d'oxydoréduction de la cellule, est rapporté comme un activateur du système d'expression Gal, en servant de médiateur dans l'interaction entre le répresseur Gal80 et l'activateur Gal4 (Kumar et al., 2008). Des intermédiaires du métabolisme du glucose par la glycolyse ont aussi des rôles régulateurs, comme le fructose-1,6-bisphosphate qui contribue à l'effet Crabtree chez *S. cerevisiae* en régulant l'ouverture des canaux non-spécifiques mitochondriaux et la respiration, mais pas chez *K. lactis* (Díaz-Ruiz et al., 2008; Rosas-Lemus et al., 2014). Enfin, chez les mammifères, l'association et l'activité des enzymes de la voie de synthèse *de novo* des purines sont régulées par la concentration en purine (An et al., 2008). Mais surtout, un intermédiaire de cette voie de synthèse, le SAICAR, régule la glycolyse en interagissant avec l'isoforme M2 de la pyruvate kinase et régule son activité selon la concentration de glucose, dans le but d'aiguiller le métabolisme vers les voies les plus appropriées : la glycolyse quand le glucose

est faiblement concentré, ou les voies de biosynthèse telles que la voie des pentoses phosphate quand il est plus concentré (Keller et al., 2012).

Plusieurs études récentes font ressortir la glycolyse et les voies métaboliques comme un moyen de fournir des substrats pour les modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité de nombreuses protéines dans la cellule (Metallo and Vander Heiden, 2010). Certaines de ces modifications post-traductionnelles constitueraient des points de contrôle métabolique nécessaires à la croissance cellulaire et à la modulation de voies de signalisation. Parmi les modifications post-traductionnelles dont le substrat est relié à une voie métabolique, on peut citer la phosphorylation (ATP), l'acétylation (acétyl-CoA), la succinylation (succinyl-CoA), la méthylation, la palmitoylation, la prénylation, la glycosylation et la glycation (méthylglyoxal) (Figure 28). Quelques exemples de régulation par ces modifications post-traductionnelles sont donnés ci-dessous.

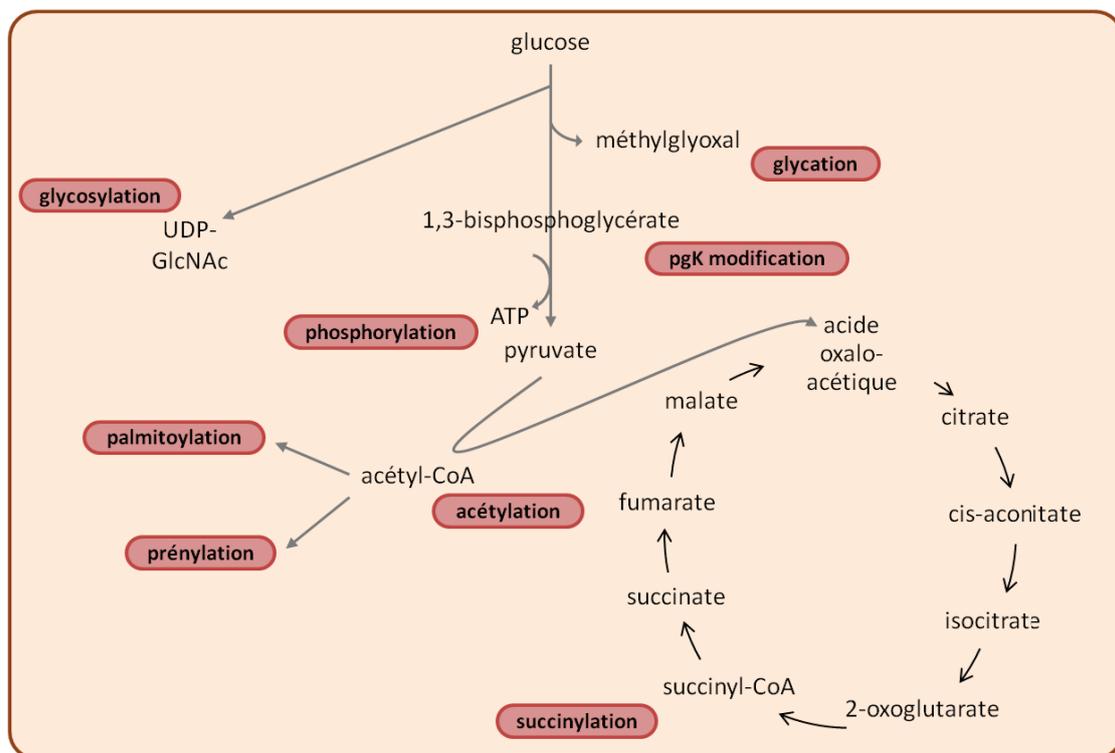


Figure 28: Les substrats des modifications post-traductionnelles qui régulent l'activité des protéines sont produits par le métabolisme du glucose (Metallo and Vander Heiden, 2010). Les modifications post-traductionnelles sont notées dans les cadres rouges à côté des voies métaboliques par lesquelles leurs substrats sont formés dans une cellule mammifère.

Chez les mammifères, le métabolisme du glucose et de la glutamine sont conjointement régulés par la glycosylation d'un récepteur (Wellen et al., 2010) qui sert de point de contrôle. L'acétylation des histones, qui joue un rôle régulateur important dans l'architecture de la chromatine et la transcription des gènes, est dépendante de l'acétyl-CoA synthétase chez les eucaryotes unicellulaires et de l'ATP-citrate lyase chez les mammifères, reliant le métabolisme respiratoire à la régulation de la transcription (Wellen et al., 2009). La succinylation est une modification post-traductionnelle courante, qui concerne potentiellement 474 protéines chez *S. cerevisiae*, et qui régule notamment l'activité du cycle TCA (Weinert et al., 2013). La glycation induite par le méthylglyoxal, un produit dérivé de la

glycolyse, est une modification post-traductionnelle qui inactive et induit la dégradation des protéines. Sa cible principale est Eno2 chez *S. cerevisiae* (Gomes et al., 2006, 2008), mais les perméases au glucose sont également régulées par la glycation (Yoshida et al., 2011). Enfin, une modification post-traductionnelle récemment mise en évidence chez les mammifères, et potentiellement conservée chez tous les organismes vivants, a comme substrat un intermédiaire de la glycolyse, le 1,3-bisphosphoglycérate (produit de la réaction catalysée par la GAPDH) (Moellering and Cravatt, 2013). Sa fixation électrophile sur des lysines est retrouvée notamment autour ou dans le site actif des enzymes de la glycolyse en présence de fortes concentrations de glucose ou d'inhibition chimique de la glycolyse. Cette modification diminue l'activité des enzymes et constituerait un rétro-contrôle intrinsèque à la glycolyse.

4. f. Contrôle de la signalisation du glucose par la glycolyse chez les levures

Plusieurs observations ont montré que le maintien du flux glycolytique est nécessaire à la signalisation fonctionnelle du glucose, chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae*.

4. f. i. Contrôle de la signalisation du glucose par la glycolyse chez *K. lactis*

Chez *K. lactis*, le gène de l'hexokinase a été identifié comme étant déficient dans le mutant *rag5*, qui est incapable de croître en présence de glucose et d'antimycine A (Prior et al., 1993). Dans ce mutant, l'expression du gène de la perméase au glucose *RAG1* est affectée (Prior et al., 1993). Des résultats ultérieurs du laboratoire ont montré que l'expression de *RAG1* est également affectée dans un mutant de l'énoïase (*rag17*) (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004). L'expression de *RAG1* a été analysée dans d'autres mutants de la glycolyse, et est réprimée dans un mutant de la phosphoglycérate kinase (ΔKlp_{gk}) (Figure 29). Par contre, l'expression de *RAG1* n'est pas affectée dans un mutant de la phosphoglucoisomérase ΔKlp_{gi} , ni dans un mutant de la pyruvate décarboxylase (ΔKlp_{dc} , non montré).

Ces résultats suggèrent que c'est le flux glycolytique qui contrôle l'expression de *RAG1* : en effet, dans un mutant ΔKlp_{gi} , le flux glycolytique peut être maintenu par la voie des pentoses phosphate en présence de glucose dans le milieu de culture (Goffrini et al., 1991). Le mutant ΔKlp_{dc} n'est pas un mutant glycolytique puisque la pyruvate décarboxylase catalyse la première réaction permettant de métaboliser le pyruvate en éthanol.

Ces résultats sont à l'origine du sujet de cette thèse, qui a consisté à déterminer la cible de la glycolyse dans la signalisation du glucose ainsi que la nature du signal glycolytique.

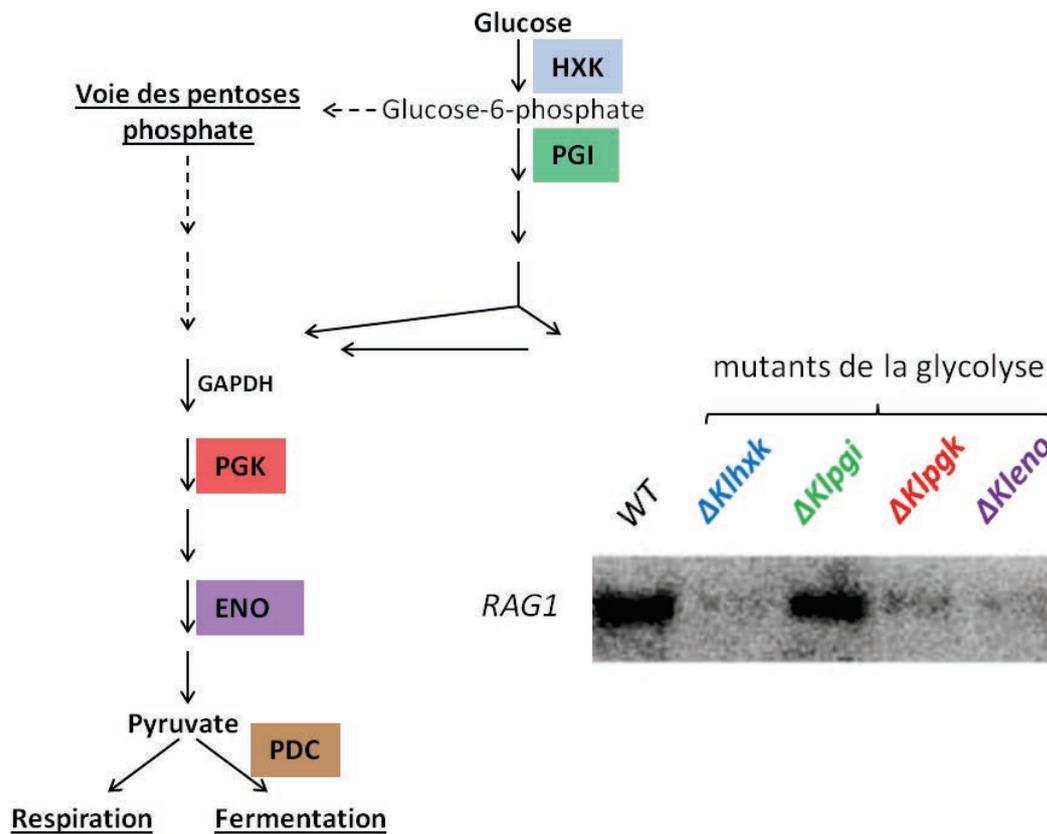


Figure 29: La glycolyse contrôle la transcription du gène de la perméase au glucose *RAG1* chez *K. lactis* (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004). A gauche, la voie de la glycolyse est schématisée. A droite, la transcription de *RAG1* est analysée par Northern blot dans différents mutants glycolytiques en présence de glucose dans le milieu de culture.

4. f. ii. Contrôle de la signalisation du glucose par la glycolyse dans d'autres organismes

Chez *S. cerevisiae*, l'observation a été faite plusieurs fois que *ScHXK2* est nécessaire à l'expression des gènes des perméases au glucose *HXT*. Ainsi, *ScHxk2*, en tant que composant de la voie de la répression glucose avec *Reg1*, est nécessaire à l'induction maximale des gènes *HXT1*, 2, 3 et 4 (Özcan and Johnston, 1995). Dans un mutant *Schxk2* dans lequel la sérine 15 a été mutée (elle est phosphorylée pour réguler la dimérisation et la localisation de *ScHxk2*, voir page 68), l'induction des gènes *HXT1* et 4 est affectée (Randez-Gil et al., 1998b). Dans un triple mutant *hvk1 hvk2 glk1*, *HXT1* et *HXT3* ne sont pas exprimés en présence de glucose alors que *HXT2* et *HXT7* sont dérprimés, et leur expression est rétablie par le gène *HXK2* (Petit et al., 2000; Belinchón and Gancedo, 2007b).

Dans d'autres organismes, la dépendance de transporteurs du glucose à une glycolyse fonctionnelle a déjà été rapportée : dans la bactérie *E. coli*, les ARNm du gène *ptsG*, qui code pour un transporteur du glucose, sont régulés par le flux glycolytique (Kimata, 2001). Dans des cellules cancéreuses humaines, la localisation nucléaire de l'hexokinase *HK2* a été reliée à une augmentation de l'assimilation du glucose (Neary and Pastorino, 2013).

II. Objectifs des travaux de thèse

Chez la levure *K. lactis*, la régulation de la transcription du gène de la perméase au glucose *RAG1* par la glycolyse a été mise en évidence (Figure 29) (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004). Puisque la transcription de *RAG1* est affectée dans plusieurs mutants glycolytiques dans lesquels le flux glycolytique est rompu, alors qu'elle ne l'est pas dans un mutant $\Delta Klp1$ dans lequel le flux glycolytique est maintenu par la voie des pentoses phosphate, les auteurs ont suggéré que la transcription de *RAG1* est contrôlée par le flux glycolytique plutôt que par une enzyme en particulier.

Ces observations ont fait naître un certain nombre de questions :

- A quel niveau la transcription de *RAG1* est-elle régulée ?

La baisse du niveau de transcription du gène *RAG1* observée dans la Figure 29 peut s'expliquer de différentes manières : soit les ARN messagers sont dégradés dans les mutants glycolytiques, soit les facteurs de transcription de *RAG1* sont directement contrôlés par la glycolyse, soit la glycolyse intervient en amont des facteurs de transcription, dans une voie de signalisation qui contrôle l'expression de *RAG1*.

- Ce contrôle de la glycolyse sur l'expression du gène de la perméase au glucose est-il conservé chez la levure modèle *S. cerevisiae* ?

Chez la levure *S. cerevisiae*, plusieurs études (présentées page 80) montrent que le gène de l'hexokinase *HXK2* est nécessaire à l'expression des gènes des perméases au glucose *HXTs*. Ces résultats suggèrent que la glycolyse régule effectivement l'expression des gènes *HXTs* par l'une de ses enzymes, mais ne permettent pas d'extrapoler sur le rôle dans la régulation des gènes *HXTs* du flux glycolytique dans son ensemble.

- Quel est le signal issu de la glycolyse qui contrôle l'expression du gène *RAG1* ?

Le signal émis par la glycolyse en direction de la machinerie de contrôle de l'expression des gènes de perméase peut être de deux natures : soit il est de nature protéique, ce qui veut dire qu'une des enzymes de la glycolyse intervient directement dans la régulation de l'expression des gènes des perméases, soit le signal est de nature métabolique, ce qui signifie que le glucose ou un des métabolites issus de la glycolyse est capable d'influer sur la régulation de l'expression des gènes des perméases. D'une part, les enzymes glycolytiques peuvent intervenir dans la régulation de l'expression génique, comme exposé précédemment dans la partie sur le rôle transcriptionnel de ces enzymes (voir page 75). D'autre part, des exemples de métabolites régulant des voies de signalisation ou l'activité de certaines protéines sont donnés en page 77 et supportent l'hypothèse métabolique du signal glycolytique.

Pour répondre à la première question, nous avons d'abord confirmé les résultats concernant l'expression de *RAG1* dans des mutants glycolytiques, puis nous avons analysé les facteurs transcriptionnels connus de *RAG1* dans des mutants glycolytiques. Ces facteurs transcriptionnels sont régulés par la voie de signalisation du glucose dépendante du senseur Rag4, ce qui nous a amené à examiner la régulation par la glycolyse des autres composants

de cette voie, en amont des répresseurs. Pour renforcer nos résultats, nous n'avons pas seulement travaillé en utilisant des mutants glycolytiques, mais nous avons également utilisé des inhibiteurs chimiques de la glycolyse pour étudier l'effet du blocage aigu de la glycolyse. L'ensemble de ces résultats fait l'objet du Chapitre 1 de la partie Résultats de ce manuscrit. Un composant de la voie de signalisation du glucose est particulièrement régulé par la glycolyse : il s'agit du senseur membranaire du glucose, Rag4, dont la stabilité est contrôlée par la glycolyse.

Ce résultat a fait naître de nouvelles questions : en effet, le senseur du glucose Rag4 a été décrit chez *K. lactis* il y a une dizaine d'années (Betina et al., 2001), mais a été peu étudié depuis. Quand nous avons obtenu ce résultat sur le contrôle de la stabilité de Rag4, la déstabilisation des senseurs membranaires du glucose n'avait jamais été décrite chez les levures. Nous avons donc tenté de caractériser plus en détail le senseur Rag4, en nous intéressant d'abord à son mode de fonctionnement dans la signalisation du glucose, puis aux processus de déstabilisation qui le ciblent. Pour cela, nous avons construit et étudié divers mutants de *RAG4*. Les résultats obtenus sont présentés dans le Chapitre 2.

Pour répondre à la deuxième question, nous nous sommes intéressés à la levure *S. cerevisiae* et nous avons étudié l'effet de l'inhibition de la glycolyse et de la rupture du flux glycolytique, d'abord sur les facteurs transcriptionnels régulant l'expression de *HXT1*, puis sur les senseurs du glucose Rgt2 et Snf3 dont dépend la voie de signalisation du glucose. Chez *S. cerevisiae*, nous avons utilisé à la fois des mutants glycolytiques et l'inhibition chimique de la glycolyse pour rompre le flux glycolytique. Ces résultats sont présentés conjointement à ceux obtenus avec *K. lactis*, dans le Chapitre 1.

Enfin, pour répondre à la troisième question et déterminer la nature du signal glycolytique, nous avons testé les deux hypothèses, protéique et métabolique, chez la levure *K. lactis*. L'hypothèse protéique a été brièvement explorée en se focalisant sur une seule enzyme, l'hexokinase. L'hypothèse métabolique a été étudiée plus longuement, notamment en réalisant une analyse métabolomique pour différents mutants glycolytiques en présence de glucose. L'ensemble de ces résultats est traité dans le Chapitre 3.

III. Résultats

Chapitre 1 : Analyse fonctionnelle des mécanismes de régulation de la voie de signalisation du glucose par la glycolyse chez les levures

1. Introduction et résumé de la publication

Chez la levure *K. lactis*, l'expression du gène de la perméase au glucose, *RAG1*, est induite en réponse à la présence de glucose extracellulaire (Goffrini et al., 1990). Cependant, il a été montré que l'expression de *RAG1* est également dépendante de la métabolisation du glucose intracellulaire via la glycolyse (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004). En effet, chez divers mutants glycolytiques, l'expression de *RAG1* est fortement diminuée malgré la présence de glucose extracellulaire (voir Figure 29 page 80). Ces données suggèrent qu'une glycolyse fonctionnelle est nécessaire pour maintenir l'expression de *RAG1*, plutôt que certaines enzymes particulières. En accord avec cette hypothèse, un mutant $\Delta Klpgi$ ne présente pas de défaut d'expression de *RAG1* en présence de glucose car le défaut glycolytique de ce mutant est contourné par la voie des pentoses phosphate, connue pour être efficace chez *K. lactis* (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004).

Des travaux préliminaires réalisés au laboratoire ont suggéré que la glycolyse contrôle l'expression de *RAG1* via la voie de signalisation du glucose Rag4-Rag8-*K/Rgt1*. Le premier objectif de mes travaux de doctorat a été de répondre à la question suivante : quels sont les acteurs de la voie de signalisation du glucose qui sont contrôlés par la glycolyse ?

La première étape a été de confirmer les résultats de 2004 sur l'expression de *RAG1* en Northern blot par qRT-PCR, et d'inclure à cette étude l'analyse de l'expression des principaux gènes codant pour les protéines impliquées dans la voie de signalisation du glucose. Ces résultats ont confirmé que l'expression de plusieurs acteurs de la voie de signalisation du glucose est contrôlée par la glycolyse, en particulier les gènes connus pour être régulés par le répresseur transcriptionnel *K/Rgt1* (Hnatova et al., 2008; Rolland et al., 2006; Neil et al., 2007).

L'activité du répresseur *K/Rgt1* a ensuite été déterminée par l'analyse de son état post-traductionnel dans des mutants glycolytiques en présence de glucose. Nos travaux ont montré que, dans des mutants glycolytiques, *K/Rgt1* n'est pas hyperphosphorylé en réponse au glucose extracellulaire, et réprime en permanence l'expression de ses gènes-cibles (dont *RAG1*). Ensuite, l'étude de l'état post-traductionnel des différents régulateurs de la voie de signalisation du glucose en amont de *K/Rgt1* a montré que le corépresseur Sms1 est stabilisé dans un mutant glycolytique même en présence de glucose. Ces résultats correspondent à un défaut de signalisation du glucose car nous avons montré que le senseur du glucose Rag4 est déstabilisé dans un mutant glycolytique en présence de glucose. En revanche, la caséine kinase I Rag8 n'est pas affectée dans les mutants glycolytiques testés.

En parallèle de ce travail sur les mutants glycolytiques de *K. lactis*, l'effet de l'inhibition chimique de la glycolyse sur la signalisation du glucose a également été étudié. Les résultats obtenus montrent que l'inhibition aigue de la glycolyse provoque des effets similaires à ceux observés avec les mutants glycolytiques (inhibition chronique).

Enfin, une analyse chez la levure *S. cerevisiae* a permis de mettre en évidence que ces mécanismes de contrôle de la signalisation du glucose par la glycolyse sont conservés chez cette levure.

Ainsi, ce travail a permis de mettre en évidence un mécanisme de régulation de la signalisation du glucose par la glycolyse chez les levures, qui cible les senseurs membranaires de glucose (Rag4 chez *K. lactis* et Rgt2 chez *S. cerevisiae*). Ce mécanisme constituerait un rétro-contrôle de la glycolyse sur la signalisation du glucose, assurant ainsi le transport du glucose dans la cellule seulement si ce sucre peut être métabolisé correctement.

L'ensemble de ces résultats a fait l'objet d'une publication intitulée « Glycolysis Controls Plasma-Membrane Glucose Sensors to Control Glucose Signaling in Yeasts » qui est en cours de révision dans « Molecular and Cellular Biology », dont le manuscrit soumis est présenté en page 89.

Des résultats complémentaires non présentés dans la publication sont décrits dans la partie 3 de ce chapitre, débutant en page 112.

J'ai pris part à l'ensemble des travaux présentés dans ce chapitre. La majorité des observations microscopiques ont été réalisées avec l'aide d'Alexandre. Certaines expériences ont été réalisées grâce à l'aide technique de Julien Deffaud.

2. Publication Cairey-Remonnay et al., 2014

Glycolysis Controls Plasma Membrane Glucose Sensors to Promote Glucose Signaling in Yeasts.

Amélie Cairey-Remonnay¹, Julien Deffaud¹, Micheline Wésolowski-Louvel¹, Marc Lemaire¹, Alexandre Soulard¹#

1 : Université de Lyon, Lyon France ; Université Lyon 1 F-69622 Villeurbanne ; CNRS UMR5240 Microbiologie, Adaptation et Pathogénie ; Génétique Moléculaire des Levures

Running title: Glycolysis targets glucose sensors in yeasts

#Address correspondence to Alexandre Soulard, alexandre.soulard@univ-lyon1.fr

Introduction + Results + Discussion: 22088 characters / 3875 words (+ Abstract and legends: 34344 characters / 6050 words)

Materials and Methods: 944 words

Abstract

Sensing of extracellular glucose is necessary for cells to adapt to glucose variation in their environment. In the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*, extracellular glucose controls the expression of the major glucose permease gene *RAG1* through a cascade similar to the *Saccharomyces cerevisiae* Snf3/Rgt2/Rgt1 glucose signaling pathway. This regulation depends also on intracellular glucose metabolism since we previously showed that glucose induction of *RAG1* gene is abolished in glycolytic mutants. Here we show that glycolysis regulates *RAG1* expression through the *KIRgt1* glucose signaling pathway by targeting the localization and probably the stability of Rag4, the single Snf3/Rgt2-type glucose sensor of *K. lactis*. Additionally, the control exerted by glycolysis on glucose signaling seems to be conserved in *S. cerevisiae*. This retro-control might prevent yeasts from unnecessary glucose transport and intracellular glucose accumulation.

Introduction

Sensing and adaption to environmental variations and stresses is fundamental for any cell to live and to grow properly. Among the environmental signals that cells have to consider, nutrients and especially glucose are of particular importance. Indeed, glucose is the principal carbon and energy source for most living organism. Glucose signaling is a key pathway allowing cells to adapt their sugar transport system and metabolism to the quality and quantity of carbon source present in their environment.

Glucose transport and the glucose signaling network have been widely studied in the fermentative yeast model *Saccharomyces cerevisiae* (1). The yeast *Kluyveromyces lactis* is an excellent alternate and complementary model organism to investigate glucose signaling (2). Indeed, the pathway is simpler with only two glucose permeases and little if any gene redundancy. Moreover, unlike *S. cerevisiae*, *K. lactis* living style is preferably respiratory making it closer to superior eukaryotes. In *K. lactis* the fermentative growth on medium containing 5% glucose plus antimycin A (respiration inhibitor) defines the Rag⁺ phenotype and is informative about the functionality of glucose signaling, glucose transport and glucose metabolism.

In *K. lactis* two glucose permeases are known: Rag1 with a low affinity for glucose and Hgt1 having a high affinity for glucose (3, 4). Only *RAG1* expression is regulated by extracellular glucose concentration (5). In absence of extracellular glucose, the transcriptional repressor *K/Rgt1*, bound to the co-repressor *Sms1*, represses *RAG1* expression (6, 7). Extracellular glucose is sensed by the plasma membrane glucose sensor Rag4, a glucose permease homolog unable to transport glucose (8) and exhibiting a characteristic long cytoplasmic C-terminal tail thought to have a role in glucose signaling. Glucose binding to Rag4 probably leads to a conformational change allowing interaction with the casein kinase I Rag8 (6, 9). When activated by glucose, Rag8 is supposed to phosphorylate the co-repressor *Sms1*, leading to *Sms1* ubiquitination by the SCF^{Grr1} complex followed by its proteasomal degradation (7). Once *Sms1* is degraded, *K/Rgt1* gets highly phosphorylated by a so far unknown kinase (6). This phosphorylation lowers *K/Rgt1* affinity for target promoters and then releases the repression of *RAG1* transcription (6). In presence of glucose, *RAG1* maximal expression also requires the action of two transcriptional activators: *Sck1*, a myc-like basic helix-loop-helix activator (10) and *K/Snf2*, a subunit of the *SWI/SNF* chromatin remodeling complex, required for *Sck1* recruitment to its target promoters (11). In addition to *RAG1*, the *K/Rgt1-Sms1* complex acts as a direct transcriptional repressor for *SMS1* and *SCK1* genes as well as for the glycolytic enzymes genes coding for the hexokinase *K/HXK/RAG5* and for the enolase *K/ENO/RAG17* (6, 7, 10). This later observation indicates that glucose signaling controls not only glucose transport but also its metabolism via glycolysis (for a model see (11)).

The glucose signaling pathway is globally conserved between *K. lactis* and *S. cerevisiae* (1, 12). At least 17 hexose transporter homologs (Hxts) exist in *S. cerevisiae* with Hxt1 being the Rag1 functional homolog (13). The function of the main transcriptional repressor *ScRgt1* is partly comparable to that of *K/Rgt1* (14, 15). The co-repressor *Std1* and *Mth1* are

homologous to Sms1 (16). Yck1/2 are casein kinases I homologs for Rag8 (17, 18). Snf3 and Rgt2 are the glucose sensors similar to Rag4 (19). So far, no *HXT1* transcriptional activator has been clearly identified in *S. cerevisiae* (for a model see (12)).

Extracellular glucose is not the unique signal regulating *RAG1* expression and glucose transport in *K. lactis*. Mutations of the glycolytic genes encoding for the hexokinase (*KIHXX*), the 3-phosphoglycerate kinase (*KIPGK*) and the enolase (*KIENO*) provoke a *RAG1* expression defect in the presence of glucose (20). Moreover, *RAG1* expression is not affected in a phosphoglucose isomerase ($\Delta K\textit{ipgi}$) mutant in which the glycolytic flux can be maintained through the pentose phosphate pathway (20). All together, these data suggest that a functional glycolysis controls *RAG1* expression additionally to the presence of extracellular glucose. At least two signals control *RAG1* transcription: one extracellular mediated by glucose via the glucose-signaling pathway Rag4-Rag8-K/Rgt1 and one intracellular mediated by glycolysis via an unknown mechanism.

We focused on elucidating the mechanism by which glycolysis controls *RAG1* expression with a special attention on a possible impact of glycolysis on glucose signaling. Here we demonstrated that glycolysis controls *RAG1* expression by promoting Rag4 stabilization at the plasma membrane which stimulates the downstream glucose signaling. Moreover, this mechanism appears to be conserved in *S. cerevisiae*.

Material and methods

Yeast strains and growth conditions

All the yeast strains used in this study are listed in Table 1. Yeast cells were grown at 28°C in rich media (complete Yeast extract - Peptone (YP) medium containing 1% Bacto yeast extract, 1% Bacto peptone (Difco) supplemented with 2% glucose (YPD) or minimal medium (0.7% yeast nitrogen base without amino acids (Difco) supplemented with auxotrophic requirements) supplemented with either 2% glucose, 2% glycerol, 2% galactose or 2% lactate plus 0.1% glucose as carbon source, as mentioned. The Rag phenotype was tested on GAA medium (YP containing 5% glucose and 5 µM antimycin A). For G418 medium, YPD plates were supplemented with Geneticin (200 µg/ml; Life Technologies). For CloNat medium, YPD plates were supplemented with nourseothricin (100 µg/ml; Werner Bioagents, Jena, Germany). Glucose shift was performed by the addition of 2% glucose in the glycerol- or lactate-based growth medium 30 min before cells were collected. Iodoacetate (Sigma-Aldrich) treatment was performed by addition of 0.25 mM to 2 mM iodoacetate to the growth medium for variable times. All deletion and genomically tagged *K. lactis* strains were constructed by PCR-based gene targeting (21–23). Every epitope-tagged protein created in this study was functional since their expression in a *K. lactis* wild type (*WT*) strain led to a Rag⁺ phenotype or a correct *RAG1* transcriptional regulation by glucose. The *P_{ScGAL1}* promoter from *S. cerevisiae* was used to constitutively express genes in *K. lactis* because this promoter is not glucose-repressed in *K. lactis* strains (our unpublished data).

Escherichia coli strain XL10 was used as cloning host and for plasmid DNA propagation. *E. coli* strain BL21 (DE3) was used for the production of the recombinant proteins (His)₆-Sck1 and GST-K/Rgt1³³⁸⁻⁷³⁰.

Plasmid constructions

The pACR1 plasmid is a centromeric pCXJ18 derivative plasmid (24) expressing a functional *LEXA-RAG8* fusion from the *RAG8* promoter. The plasmid pACR3 expressing an inactive kinase form of LexA-Rag8 (mutation K106R) was created by a one step PCR based mutagenesis using pACR1 as a template. The pML155 plasmid expressing (His)₆-*SCK1* in *E. coli*, as well as the centromeric plasmid pHN15, expressing a functional *LEXA-SCK1*, were described previously (10). The pML319 plasmid is a derivative of pGEX-6P-3 plasmid (GE Healthcare) expressing a N-terminal GST fusion in frame with a *K/Rgt1* protein internal domain (amino acids 338 to 730). Cloning details are available upon request.

RNA extraction and RT-qPCR analysis

Cells were grown to mid-log phase in YPD medium before harvesting. RNA extraction and RT-qPCR analysis were performed as described before (11). Oligonucleotides pairs were designed with Beacon Designer software (version 7.92) as following for *RAG1*: P548 (5'-TTTCTGGTTTAGGTGTTGGT-3') / P549 (5'-CTTAAATGTTTAGGAGCGGTTT-3'), for *K/HXK*: P550

(5'-GTGCTTACTACGATGTTG-3') / P551 (5'-AGGAACCATATTCACAGT-3'), for *KIENO*: P852 (5'-CTATCCGAATCCATCAAG-3') / P853 (5'-AAAGTGTCTTCAGTTTCA-3'), for *RAG4*: P854 (5'-ATGACTACTGATTCTGTTCCA-3') / P855 (5'-GTTACGCTCTTGTGCTTTC-3'), for *RAG8*: P856 (5'-CGGATTATGAAGTTACC-3') / P857 (5'-CTTATTCTATGTCTCTTACTC-3'), for *SMS1*: P858 (5'-TTAATGATATAAGGTCGTTACTC-3') / P859 (5'-GTTGATTGAATGCTATGGT-3'), for *SCK1*: P860 (5'-TTCTTCCTCCGTTTATTC-3') / P861 (5'-GATTAGTAGCGTTCATTAAG-3') and for *KIACT1*: P547 (5'-ACATCAACATCACACTTC-3') / P546 (5'-AACTGCTTCTCAATCATC-3'). The data presented are the results of at least 3 biological replicates and two technical replicates. The statistical significance of the results was assessed by performing a Student's t-test to calculate the p-value.

Protein extraction and Western blotting

Total-protein extraction was performed as described before (25). The primary antibodies used for Western blotting were mouse monoclonal anti-HA (12CA5, Roche 1:10000), rabbit polyclonal anti-HA (Sigma-Aldrich 1:5000), mouse monoclonal anti-c-Myc (9E10, Roche, 1:5000), rabbit polyclonal anti-LexA (Millipore, 1:5000), rabbit polyclonal anti-protein A (Sigma, 1:10000), rabbit polyclonal anti-Pma1/2 (γ -300) (Santa Cruz Biotech, 1:1000) and mouse monoclonal anti-actin (mAbGEa, Novus Biologicals, 1:10000). Anti-*K/Rgt1* antibodies were raised in rabbits (Covalab) against a recombinant GST-*K/Rgt1*³³⁸⁻⁷³⁰ fusion protein expressed from plasmid pML319 and purified from *E. coli*. These anti-*K/Rgt1* antibodies were then affinity-purified and used to detect untagged *K/Rgt1* by Western blot (1:4000) in *K. lactis* cells extract. Densitometric analyses of Western blot were performed using Image J software.

Preparation of heavy and light membranes by ultracentrifugation was performed as follow: *K. lactis* cells were pelleted and washed before resuspension in cold lysis buffer (30 mM MOPS pH 7, 1 mM EDTA, proteases inhibitors cocktail, 1 mM EGTA and 1 mM PMSF). Cells were broken by bead beating using the FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals) at max speed for 5 runs of 30 seconds. Cell lysate was clarified from unbroken cells and debris by 5 minutes centrifugation at 1000g and the resulting supernatant was centrifuged 10 minutes at 13000g to pellet the heavy membranes fraction. The supernatant was centrifuged 30 minutes at 100000g to pellet the light membranes fraction. Proteins present in the last supernatant were TCA-precipitated and correspond to the soluble fraction. All the different pellets were resuspended in storage buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 2 mM DTT and 25% glycerol).

Halo assays

A 10 μ l aliquot from an overnight culture of MWL9S1 strain grown in YPD medium was spread onto YPD or GAA plates. Sterile 6-mm filter disk (Dutscher), previously soaked with 20 μ l of either serial dilutions of iodoacetate or sterile dH₂O, were placed onto the plates before incubation at 28°C for 48-72h.

Kinase assay

MWL9S1 (*WT*) and MWK11/F1 ($\Delta K/hxk$) strains were transformed with pACR1 and pACR3 plasmids and kinase assays were performed as previously reported (10). Type 1 casein kinase inhibition with zinc chloride was performed as previously described (26). Densitometric analysis was achieved using Image J software.

Fluorescence microscopy

Cells expressing GFP-tagged proteins were grown to log phase in synthetic medium containing different carbon sources. The drug treatment was achieved by adding the indicated concentration of iodoacetate to the culture. Cells were collected periodically and protein localization was analyzed using a Zeiss AxioSkop2 fluorescence microscope set with a GFP filter. The images presented were processed by Photoshop (Adobe) and are representative of all cells observed.

Results

The expression of several glucose-regulated genes depends on a functional glycolysis.

Our former observation that glycolysis controls *RAG1* expression in *K. lactis* (20) prompted us to analyze the expression of other known glucose-regulated genes in three different glycolytic mutants: $\Delta Klhxk$, $\Delta Klno$ and $\Delta Klpgi$. The $\Delta Klhxk$ and $\Delta Klno$ mutants are affected in the upper and lower part of the glycolysis, respectively, and are deficient for *RAG1* gene expression (20). In the $\Delta Klpgi$ mutant, *RAG1* gene regulation is not impaired possibly because the glycolytic flux is maintained through the pentose phosphate pathway (20). We first analyzed by RT-qPCR the expression of *KIH XK* and *KIENO* genes in glucose-grown cells. Similarly to what observed for *RAG1*, *KIH XK* and *KIENO* genes were down regulated in $\Delta Klno$ and $\Delta Klhxk$ mutants respectively, even in presence of glucose (Figure 1A). *SMS1* and *SCK1*, two glucose-induced genes coding for *RAG1* transcriptional regulators, were also down regulated in $\Delta Klhxk$ and $\Delta Klno$ (Figure 1B). In contrast, this transcriptional defect was absent or less pronounced in the $\Delta Klpgi$ mutant, except for *KIH XK* and *SCK1* for which the expression is also reduced (circa. 50% of *WT*). All together, these findings demonstrate that, as observed for *RAG1*, a functional glycolysis is essential to maintain an optimal regulation of *KIH XK*, *KIENO*, *SMS1* and *SCK1* genes by glucose. Interestingly, these five genes are known to be regulated by the *K/Rgt1* transcriptional repressor (6, 7, 10). As *K/Rgt1* is controlled by the Rag4-Rag8 glucose signaling pathway, we investigated the expression level of *RAG4*, *RAG8*, and *KIRGT1* genes in the glycolytic mutants. While *RAG4* expression was only slightly affected (circa. 70% of *WT* expression), neither *RAG8* nor *KIRGT1* gene expression was significantly affected in the glycolytic mutants as compared to the wild type (*WT*) (Figure 1B and data not shown). This result shows that the glycolytic control on *RAG1*, *KIH XK*, *KIENO*, *SMS1* and *SCK1* genes is not mediated via transcriptional control of *RAG4*, *RAG8* and *KIRGT1* genes.

Glycolysis controls *K/Rgt1* phosphorylation and *Sms1* degradation

Regarding the impact of *K/Rgt1* posttranslational modifications on *RAG1* gene regulation, we tested whether glycolysis could influence these *K/Rgt1* modifications. *K/Rgt1* is hyperphosphorylated in glucose-grown *WT* cells, which leads to its inactivation and derepression of its targeted genes (6). Because this hyperphosphorylation is informative about *K/Rgt1* activity, we analyzed the phosphorylation level of *K/Rgt1* in response to glucose in $\Delta Klhxk$ and $\Delta Klno$ glycolytic mutants. In the glycolytic mutants, *K/Rgt1* was not phosphorylated after glucose stimulation as demonstrated by the absence of an electrophoretic mobility shift compared to what observed in *WT* cells after glucose addition (Figure 2A). This result shows that a defect in glycolysis inhibits the glucose induced hyperphosphorylation of *K/Rgt1* that might be in a constitutive repressing form when glycolysis is not functional.

The hyperphosphorylation of *K/Rgt1* in glucose-grown *WT* cells depends on the proteasomal degradation of its partner, *Sms1*, a process controlled by the Rag4 glucose-signaling pathway

(6, 7). To test if Sms1 mediates the effects of glycolysis on *K/Rgt1* phosphorylation, we constructed a $\Delta K/hxk \Delta sms1$ mutant and checked the phosphorylation status of *K/Rgt1* in response to glucose availability (Figure 2B). *K/Rgt1* was found to be hyperphosphorylated in the $\Delta sms1$ mutant without glucose, confirming the protective role of Sms1 against *K/Rgt1* phosphorylation described previously (7). Interestingly, *K/Rgt1* was also hyperphosphorylated in the double mutant $\Delta K/hxk \Delta sms1$ irrespective to the carbon source. This suggests first that glycolysis controls *K/Rgt1* phosphorylation through Sms1 and second that *K/Rgt1*-phosphorylating activities are still efficient even if glycolysis is defective, at least when Sms1 is absent.

Since *K/Rgt1* was not hyperphosphorylated in a $\Delta K/hxk$ or $\Delta K/leno$ mutant (Figure 2A), we investigated whether a glycolysis defect ($\Delta K/hxk$ mutant) could prevent Sms1 degradation in glucose-grown cells. In absence of glucose, Sms1 steady-state protein level was increased (almost 3 fold) in the hexokinase mutant compared to *WT* cells (Figure 2C). Furthermore, Sms1 degradation induced by glucose was much less effective in the hexokinase mutant than in the *WT* cells (glucose provoked a 4 fold decrease of Sms1 in *WT* compared to a 1.5 fold decrease in $\Delta K/hxk$: Figure 2C). Given that *SMS1* gene expression was down-regulated in the glycolytic mutants (Figure 1B), the high level of Sms1 protein in the hexokinase mutant might be representative of a partial defect in its glucose-induced degradation.

Taken together, these data demonstrate that a functional glycolysis is required to promote the optimal Sms1 degradation in the presence of glucose, and thus subsequent *K/Rgt1* hyperphosphorylation, promoting the expression of *RAG1* and other glucose-regulated genes. Furthermore, the “glycolysis signal” may acts upstream of Sms1 without affecting kinase activities regulating *K/Rgt1* repressor function.

Glycolysis chemical inhibition affects glucose signaling

We cannot exclude that the phenotypes observed in the glycolytic mutants (*RAG1* down-regulation, *K/Rgt1* hypophosphorylation and Sms1 stabilization) are rather due to cell adaptation to the mutations than to a defective glycolysis. In order to untangle these two possibilities we assessed the effect of an acute chemical inhibition of glycolysis on glucose signaling by using iodoacetate, a drug already known to inhibit glycolytic GAPDH activity in *S. cerevisiae* (27, 28) We first performed a Rag phenotype assay (fermentative growth upon respiration inhibition by antimycin A) to test if iodoacetate was effective to inhibit glycolysis in *WT K. lactis* strain. As shown in Figure 3A, iodoacetate gave rise to a Rag⁻ phenotype (fermentative growth defect upon GAA medium) suggesting that this drug is able to block glycolysis in *K. lactis*. Interestingly, the hyperphosphorylated *K/Rgt1* form observed in glucose-grown cells disappeared 5 minutes after iodoacetate addition (Figure 3B). Moreover, the iodoacetate-induced *K/Rgt1* dephosphorylation was still present but not as effective in $\Delta sms1$ cells grown in glucose (Figure 3C). This suggests that iodoacetate treatment might influence the *K/Rgt1* phosphorylation state in two ways: one independent of Sms1 and the other not. This latter hypothesis is supported by our observation that iodoacetate addition

to glucose-grown *WT* cells led to the partial re-accumulation of Sms1 into the cells (Figure 3D), similarly to what observed in $\Delta Klhxk$ cells (Figure 2C). These results show that inhibiting glycolysis by an acute chemical inhibition weakens glucose signaling, an effect comparable (but not identical) to what observed in glycolysis mutants.

Glycolysis controls the glucose sensor Rag4, not the casein kinase Rag8

In *K. lactis*, casein kinase I (CKI) Rag8 cooperates with Rag4 glucose sensor to initiate the signalization cascade leading to Sms1 degradation when cells are grown on glucose (7). CKI Rag8 also phosphorylates the Sck1 transcriptional activator *in vitro* and is required for Sck1 stability *in vivo* (7). Since glucose-induced Sms1 degradation is impaired both in $\Delta Klhxk$ (Figure 2C) and $\Delta rag8$ (7) mutants, we wondered whether Sms1 stabilization occurring upon glycolysis inhibition could be due to CKI Rag8 deficiency under these conditions. In all conditions tested neither the *RAG8* gene expression level (Figure 1B), nor the Rag8 steady state protein level or localization (Figure 4A and 4B), nor the Rag8 *in vivo* and *in vitro* kinase activity (Figure 4C and 4D) were altered in the $\Delta Klhxk$ mutant compared to *WT*. Taken together, these data indicates that glycolysis is probably not targeting the CKI Rag8 to control glucose signaling in *K. lactis*.

The extracellular glucose signal is propagated by the plasma membrane glucose sensor Rag4 via its direct interaction with CKI Rag8 (6). As Rag8 activity is not influenced by glycolysis (see above), Sms1 stabilization and *K/Rgt1* hypophosphorylation observed in the glycolytic mutants might rather be explained by a defect in Rag4 function. Western blot analysis showed that the Rag4-TAP protein level (expressed from its own promoter) was decreased in the $\Delta Klhxk$ mutant grown in presence of glucose compared to *WT* (Figure 5A). Furthermore, Rag4-TAP quantity was also diminished in *WT* cells grown in absence of glucose, but in this case deletion of *KIHXX* did not further affect Rag4-TAP protein level (Figure 5A). As shown in Figure 5B, an identical effect was also observed when 3HA-Rag4 was expressed under the control of a strong non-regulated promoter (*S. cerevisiae GAL1* promoter was used as it is functional and not subjected to glucose repression in *K. lactis*: our unpublished data). All together, these data suggest that glycolysis and the nature of the carbon source control Rag4 protein stability rather than *RAG4* gene expression.

To investigate more precisely the Rag4 protein level and its localization in $\Delta Klhxk$ mutant, we performed membrane fractionation to separate heavy membranes (containing plasma membrane, organelles membranes and cytoskeleton) from light membranes (containing Golgi and transport vesicles) and cytosol (29). The $[H^+]$ ATPase Pma1 and actin were used as controls for membrane and cytosolic fractions, respectively (30). In glucose-grown wild type cells, Rag4-TAP (expressed from its own promoter) was detected in both the heavy and light membranes fractions but not in the cytosol (Figure 5C). In glucose-grown $\Delta Klhxk$ cells Rag4-TAP heavy membrane location was reduced compared to *WT* whereas it was still present (but reduced) into the light membranes fraction (Figure 5C). Thus, additionally to its effect on Rag4 protein stability, glycolysis seems to control Rag4 membrane distribution into the

cells. This observation was strengthened by fluorescence microscopy analysis using a GFP-Rag4 fusion (P_{ScGAL1} promoter driven expression). In presence of glucose, GFP-Rag4 was localized at the plasma membrane in the *WT* cells while this plasma membrane localization was almost completely vanished in the $\Delta Klhxk$ mutant and a strong GFP signal accumulated into what looks like the vacuole (Figure 5D). Similarly to what observed for Rag4 expressed from its own promoter upon membrane fractionation, there was no substantial difference of GFP-Rag4 localization between the *WT* and $\Delta Klhxk$ strains when cells were grown in the presence of glycerol (Figure 5D). Under this condition, GFP-Rag4 showed faint plasma membrane localization together with a vacuolar signal in both strains. Interestingly, the acute glycolysis inhibition with iodoacetate of glucose-grown GFP-Rag4 cells favored the vacuolar accumulation of the GFP signal compared to untreated cells (Figure 5E). All together, these data demonstrate that a functional glycolysis is essential to maintain Rag4 at the plasma membrane in presence of glucose. Alteration of the glycolytic flux would lead to a mislocalization and probably vacuolar degradation of Rag4, abolishing the downstream glucose signaling.

Glycolysis control of glucose signaling is conserved in *S. cerevisiae*

The glucose signaling pathway is highly conserved between *K. lactis* and *S. cerevisiae* (1). Similarly to *RAG1* in *K. lactis*, the expression of the *S. cerevisiae* glucose transporter gene *HXT1* was previously shown to be impaired in a hexokinase mutant grown in presence of glucose (31). To assess whether glycolysis controls glucose signaling upstream of *HXT1* in *S. cerevisiae* we analyzed the functionality of glucose signaling in a $\Delta hxk1 \Delta hxk2$ hexokinases mutant. Similarly to what observed in *K. lactis*, the glucose-induced phosphorylation of ScRgt1-6HA was impaired in the hexokinases mutant (Figure 6A). Furthermore, the glucose-dependent degradation of the ScRgt1 co-repressor Mth1 (*Sms1* homolog) was much less effective in the hexokinases mutant than in the *WT* cells (glucose induced a 1000 fold decrease of Mth1-9myc in *WT* compared to a 1.8 fold decrease in $\Delta hxk1/2$: Figure 6B). In this glycolytic mutant, the protein level of the glucose sensor Rgt2 (Rag4 homolog) was also diminished upon growth in glucose (Figure 6C) and its localization at the plasma membrane was almost completely abolished (Figure 6D). The Rgt2 protein level and localization were also affected by the carbon source but in these growth conditions the absence of the hexokinases had no additive effect (Figures 6C and 6D). These results were confirmed and strengthened by our observations that, in glucose-grown cells, the acute chemical inhibition of glycolysis by iodoacetate provoked the dephosphorylation of ScRgt1 (Figure 7A), the partial stabilization of Mth1 (Figure 7B), and the delocalization of Rgt2 from the plasma membrane (Figure 7C). These results plus those obtained in *K. lactis* suggest that the glycolytic control exerted on glucose sensors and subsequently through glucose signaling is conserved between *K. lactis* and *S. cerevisiae*.

Discussion

The effect of extracellular glucose concentration on glucose signaling has been widely studied both in *K. lactis* (11) and *S. cerevisiae* (1, 12). However, intracellular glucose and particularly its metabolism through glycolysis appear to exert a regulation on glucose transport independently to the presence of extracellular hexose. Indeed in *K. lactis* when glucose is not correctly metabolized due to an impaired glycolysis, the expression of the main target of glucose signaling, *RAG1* glucose permease gene, is impaired (20). In this study we further characterized the molecular basis of *RAG1* control by glycolysis. We have demonstrated that not only *RAG1* expression was reduced in glycolytic mutants, but also the expression of various glycolysis genes and genes involved in glucose signaling. Strikingly, all these down regulated genes are known to be controlled by the transcriptional repressor *K/Rgt1* (6, 7, 10). This suggests that *K/Rgt1* might be the target of glycolytic control. Similarly to what observed in *K. lactis*, the *S. cerevisiae* hexokinase *Hxk2* was shown to be required for the optimal expression of the glucose permease gene *HXT1* in response to extracellular glucose (31). This effect seems to be mediated via the direct interaction of *Hxk2* with *ScRgt1* modulating then its repressor function (32). It is tempting to hypothesize that in *K. lactis* the regulation of *RAG1* expression by glycolysis is mediated via the interaction of *K/Hxk* with *K/Rgt1*. Despite the interaction between *K/Hxk* and *K/Rgt1*, which seems to be conserved in *K. lactis* (our unpublished data), here we provided several evidences showing the existence of a more global effect originating from glycolysis and controlling *K/Rgt1* function. First, inhibition of glycolysis either at the top ($\Delta K/hxk$ mutant) or at the bottom ($\Delta K/leno$ mutant) of the pathway similarly reduced the expression of *K/Rgt1*-dependent genes in presence of glucose. Second the chronic (mutants) or acute (chemical) inhibition of glycolysis provokes the dephosphorylation of *K/Rgt1* (repressive state) and the partial stabilization of its co-repressor *Sms1* in glucose-containing medium. These observations favor a model in which *K/Rgt1* repressor activity is primarily regulated by the flux of glycolysis rather than through its direct interaction with the hexokinase. Moreover, in this model glycolysis would exert its control upstream of *Sms1* by tightly regulating *Sms1* stability and consequently *K/Rgt1* phosphorylation. Thus, inhibition of glycolysis would conduct to a reduced turnover of *Sms1* and a more stable *K/Rgt1/Sms1* complex bound to DNA in the promoter region of *RAG1* and other target genes. This regulation seems to be conserved in *S. cerevisiae* as glycolysis inhibition (chronic or acute) of glucose-grown cells also lead to *ScRgt1* dephosphorylation and *Mth1* stabilization. This latter observation implies that in *S. cerevisiae*, glycolysis controls *HXT1* gene expression not only via the direct interaction between the hexokinase *Hxk2* and *ScRgt1* (32) but also by regulating glucose signaling upstream of *ScRgt1*.

Our data strongly suggest that the glucose sensors are the target of a “glycolytic signal” controlling glucose signaling in both *K. lactis* and *S. cerevisiae*. The glucose dependent plasma membrane localization of *Rag4* in *K. lactis* and *Rgt2* in *S. cerevisiae* is altered in the presence of an alternate carbon source, or upon glycolysis inhibition (acute or chronic) of glucose-grown cells. However, inhibition of glycolysis did not further affect *Rag4* or *Rgt2*

localization when cells are grown in presence of glycerol or galactose. Our finding showing that Rag4 and Rgt2 localizations are controlled by the carbon source is in agreement with a recent report showing that the stability of Snf3 and Rgt2 glucose sensors in *S. cerevisiae* is regulated by the concentration of extracellular glucose (33). Hence, Snf3 and Rgt2 are stabilized at the plasma membrane when extracellular glucose concentration is in the range of their respective affinity. In absence of glucose Rgt2 gets rapidly internalized and degraded in the vacuole. The authors further conclude that the *S. cerevisiae* glucose sensors are more stable in their glucose bound conformation, favoring the transmission of the glucose signal into the cell. Our results about Rag4 and Rgt2 stability fit partly with this model. Indeed, our observations that both Rag4 and Rgt2 are not stable in glucose-grown cells when glycolysis is down suggest that the intracellular “glycolytic signal” may overcome the effect of extracellular glucose binding to the glucose sensors. Finally, Roy and Kim further suggest that Rgt2 stability is controlled via Rsp5 dependent ubiquitination of two lysine residues located in the Rgt2 C-terminal cytosolic extension, a region characteristic of yeasts glucose sensors (8, 19, 33–35). Sequences alignment and computational analysis of these C-terminal extensions revealed that the two lysines important for Rgt2 stability are not conserved in Rag4 (our unpublished data).

Interestingly, while the regulation of the glucose sensors stability by the carbon source is similar in *K. lactis* and *S. cerevisiae* (see above), the mechanisms of regulation of the type I casein kinases seem to be different in these two yeast species. Indeed, it was recently reported that the stability of the *S. cerevisiae* type I casein kinases Yck1 and Yck2 is tightly regulated by the carbon source (36). These findings differ from our observations showing that Rag8 kinase activity, localization and stability are neither affected by glycolysis nor by the carbon source. Even if the glucose signaling pathway is globally well conserved between *K. lactis* and *S. cerevisiae*, the way casein kinases are regulated might be one point in which it significantly diverges.

The main function of glycolysis is to generate pyruvate out of glucose through a multi-step pathway that produces part of the energy necessary for cells. However, an increasing number of evidences demonstrate that glycolysis, and particularly its intermediate metabolites, have multiple regulatory functions into the cells. For example, the highly cytotoxic side product of glycolysis, methylglyoxal, was shown to covalently modify several glycolytic enzymes and to affect glucose transport by enhancing the endocytosis of the glucose permease Hxt1 in *S. cerevisiae* (37, 38). In mammals and yeast, several metabolites such as 1,3-biphosphoglycerate, phosphoenolpyruvate and fructose-1,6-biphosphate, were shown to exert feedback control on glycolysis by affecting the activity of different glycolytic enzymes (39–41). Thus it is reasonable to hypothesize that one of the intermediate metabolite of glycolysis might serve as a signal controlling glucose sensors stability in yeasts. The identification of this “glycolytic signal” will be particularly important to better

understand the molecular mechanism underlying the regulatory function exerted by glycolysis on glucose sensors and glucose signaling in yeast.

Our findings point out the crucial role played by glucose catabolism to control glucose signaling in both *K. lactis* and *S. cerevisiae*. In our model, glycolysis promotes the stabilization of the glucose sensors at the plasma membrane through an intracellular signal whose molecular nature remains to be characterized. Stabilized glucose sensors can then efficiently bind extracellular glucose and propagate the signal into the cell by inducing Sms1/Mth1 degradation and then inactivating phosphorylation of the transcriptional repressor *K/Rgt1/ScRgt1*. Thus the low affinity glucose permease genes and other Rgt1-dependent genes get derepressed to promote glucose entry and metabolism into the cell. In the absence of glucose and/or when glycolysis is affected, the glucose sensors get internalized and degraded, which inhibits downstream signaling. This mechanism might then define a virtuous circle in which cells could signal extracellular glucose only when they can efficiently metabolize it via glycolysis.

Acknowledgements

We are grateful to Claire Bärtschi for technical assistance, Pascale Cotton and Cécile Ribot for fruitful discussion and critical reading of the manuscript. We would like to thank Michael Hall (Biozentrum, Basel) and Joris Winderickx (KU Leuven, Leuven) who provided some *S. cerevisiae* strains. The RT-qPCR experiments were performed thanks to the DTAMB (Développement de Techniques et Analyse Moléculaire de la Biodiversité, Université Lyon 1). Cairey-Remonnay was the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche of France.

References

1. **Horák J.** 2013. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Curr. Genet.* **59**:1–31.
2. **Rodicio R, Heinisch JJ.** 2013. Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* **30**:165–177.
3. **Goffrini P, Wesolowski-Louvel M, Ferrero I, Fukuhara H.** 1990. *RAG1* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a sugar transporter. *Nucleic Acids Res.* **18**:5294.
4. **Billard P, Ménart S, Blaisonneau J, Bolotin-Fukuhara M, Fukuhara H, Wésolowski-Louvel M.** 1996. Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J. Bacteriol.* **178**:5860–5866.
5. **Wésolowski-Louvel M, Goffrini P, Ferrero I, Fukuhara H.** 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. *Mol. Gen. Genet.* **233**:89–96.
6. **Rolland S, Hnatova M, Lemaire M, Leal-Sanchez J, Wesolowski-Louvel M.** 2006. Connection between the Rag4 glucose sensor and the *KIRgt1* repressor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **174**:617–626.
7. **Hnatova M, Wésolowski-Louvel M, Dieppois G, Deffaud J, Lemaire M.** 2008. Characterization of *KIGRR1* and *SMS1* genes, two new elements of the glucose signaling pathway of *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* **7**:1299–1308.
8. **Betina S, Goffrini P, Ferrero I, Wésolowski-Louvel M.** 2001. *RAG4* gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **158**:541–548.
9. **Blaisonneau J, Fukuhara H, Wésolowski-Louvel M.** 1997. The *Kluyveromyces lactis* equivalent of casein kinase I is required for the transcription of the gene encoding the low-affinity glucose permease. *Mol. Gen. Genet.* **253**:469–477.
10. **Neil H, Hnatova M, Wésolowski-Louvel M, Rycovska A, Lemaire M.** 2007. Sck1 activator coordinates glucose transport and glycolysis and is controlled by Rag8 casein kinase I in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.* **63**:1537–1548.
11. **Cotton P, Soulard A, Wésolowski-Louvel M, Lemaire M.** 2012. The SWI/SNF *K/Snf2* subunit controls the glucose signaling pathway to coordinate glycolysis and glucose transport in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* **11**:1382–1390.
12. **Kim J-H, Roy A, Jouandot D, Cho KH.** 2013. The glucose signaling network in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* **1830**:5204–5210.
13. **Özcan S, Johnston M.** 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**:554–569.
14. **Özcan S, Leong T, Johnston M.** 1996. Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. *Mol. Cell. Biol.* **16**:6419–6426.
15. **Jouandot D, Roy A, Kim J-H.** 2011. Functional dissection of the glucose signaling pathways that regulate the yeast glucose transporter gene (*HXT*) repressor Rgt1. *J. Cell. Biochem.* **112**:3268–3275.
16. **Schmidt MC, McCartney RR, Zhang X, Tillman TS, Solimeo H, Wöfl S, Almonte C, Watkins SC.** 1999. Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **19**:4561–4571.
17. **Moriya H, Johnston M.** 2004. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:1572–1577.
18. **Pasula S, Chakraborty S, Choi JH, Kim J-H.** 2010. Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signaling pathway in yeast. *BMC Cell Biol.* **11**:17.
19. **Özcan S, Dover J, Johnston M.** 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **17**:2566–2573.
20. **Lemaire M, Wésolowski-Louvel M.** 2004. Enolase and glycolytic flux play a role in the regulation of the glucose permease gene *RAG1* of *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **168**:723–731.
21. **Wach A, Brachat A, Pöhlmann R, Philippsen P.** 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**:1793–1808.
22. **Longtine MS, McKenzie III A, Demarini DJ, Shah NG, Wach A, Brachat A, Philippsen P, Pringle JR.** 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:953–961.
23. **Janke C, Magiera MM, Rathfelder N, Taxis C, Reber S, Maekawa H, Moreno-Borchart A, Doenges G, Schwob E, Schiebel E, Knop M.** 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* **21**:947–962.
24. **Chen XJ.** 1996. Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Gene* **172**:131–136.
25. **Kushnirov VV.** 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**:857–860.
26. **Souza AA, Miranda MN, da Silva SF, Bozaquel-Morais B, Masuda CA, Ghislain M, Montero-Lomelí M.** 2012. Expression of the glucose transporter *HXT1* involves the Ser-Thr protein phosphatase Sit4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **12**:907–917.
27. **Dong L, Xu CW.** 2003. Carbohydrates induce mono-ubiquitination of H2B in yeast. *J. Biol. Chem.* **279**:1577–1580.

28. **Newcomb LL, Diderich JA, Slattery MG, Heideman W.** 2003. Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryot. Cell* **2**:143–149.
29. **Chesneau L, Dupré S, Burdina A, Roger J, Panse SL, Jacquet M, Cuif M-H.** 2004. Gyp5p and Gyl1p are involved in the control of polarized exocytosis in budding yeast. *J. Cell Sci.* **117**:4757–4767.
30. **Domitrovic T, Kozlov G, Freire JCG, Masuda CA, da Silva Almeida M, Montero-Lomeli M, Atella GC, Matta-Camacho E, Gehring K, Kurtenbach E.** 2010. Structural and functional study of Yer067w, a new protein involved in yeast metabolism control and drug resistance. *PLoS ONE* **5**:e11163. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0011163>
31. **Belinchón MM, Gancedo JM.** 2007. Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast. *FEMS Yeast Res.* **7**:40–47.
32. **Palomino A, Herrero P, Moreno F.** 2006. Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* *HXX2* promoter. *Nucleic Acids Res.* **34**:1427–1438.
33. **Roy A, Kim J-H.** 2014. Endocytosis and Vacuolar Degradation of the Yeast Cell Surface Glucose Sensors Rgt2 and Snf3. *J. Biol. Chem.* **289**:7247–7256.
34. **Özcan S, Dover J, Rosenwald AG, Wölfel S, Johnston M.** 1996. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**:12428–12432.
35. **Coons DM, Vagnoli P, Bisson LF.** 1997. The C-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of *snf3* null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: *SNF3* functions in glucose recognition. *Yeast* **13**:9–20.
36. **Reddi AR, Culotta VC.** 2013. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* **152**:224–235.
37. **Gomes RA, Vicente Miranda H, Silva MS, Graça G, Coelho AV, Ferreira AE, Cordeiro C, Freire AP.** 2006. Yeast protein glycation *in vivo* by methylglyoxal. Molecular modification of glycolytic enzymes and heat shock proteins. *FEBS J.* **273**:5273–5287.
38. **Yoshida A, Wei D, Nomura W, Izawa S, Inoue Y.** 2012. Reduction of glucose uptake through inhibition of hexose transporters and enhancement of their endocytosis by methylglyoxal in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **287**:701–711.
39. **Moellering RE, Cravatt BF.** 2013. Functional lysine modification by an intrinsically reactive primary glycolytic metabolite. *Science* **341**:549–553.
40. **Grüning N-M, Rinnerthaler M, Bluemlein K, Mülleider M, Wamelink MMC, Lehrach H, Jakobs C, Breitenbach M, Ralser M.** 2011. Pyruvate kinase triggers a metabolic feedback loop that controls redox metabolism in respiring cells. *Cell Metab.* **14**:415–427.
41. **Xu Y-F, Zhao X, Glass DS, Absalan F, Perlman DH, Broach JR, Rabinowitz JD.** 2012. Regulation of Yeast Pyruvate Kinase by Ultrasensitive Allosteric Independent of Phosphorylation. *Mol. Cell* **48**:52–62.
42. **Goffrini P, Wésolowski-Louvel M, Ferrero I.** 1991. A phosphoglucose isomerase gene is involved in the Rag phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* **228**:401–409.
43. **Wésolowski-Louvel M.** 2011. An efficient method to optimize *Kluyveromyces lactis* gene targeting. *FEMS Yeast Res.* **11**:509–513.

Figures

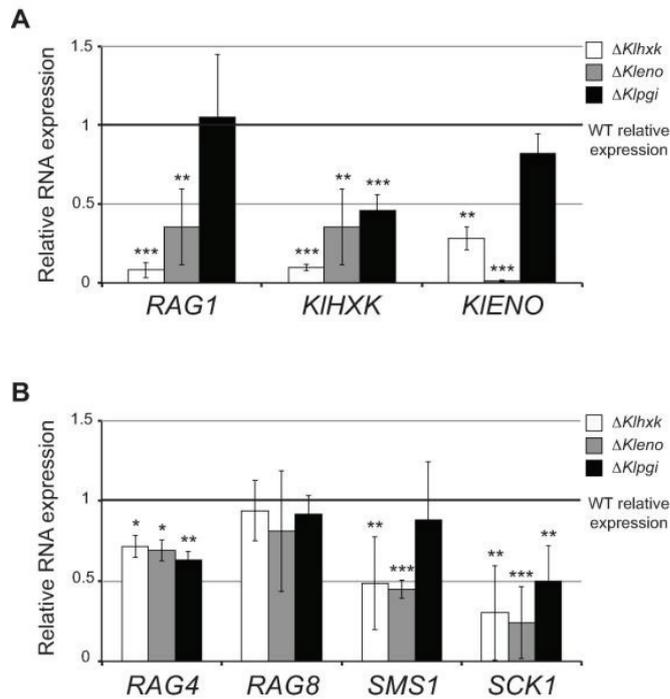


Figure 1: Expression of glucose-regulated genes is down regulated in glycolytic mutants. The mRNA transcript levels of glucose permease gene *RAG1*, glycolysis genes *KIH XK* and *KIENO* (A), and of glucose signaling genes *RAG4*, *RAG8*, *SMS1* and *SCK1* (B) were determined by RT-qPCR in wild type (WT: MW270-7B), $\Delta Klhxk$ (MWK11/F1), $\Delta Klno$ (MWK3) and $\Delta Klpgi$ (MWK12) mutants grown in YPD. Expression levels were normalized to the *KI ACT1* transcript level. For each gene the mRNA expression in $\Delta Klhxk$ (white bars), $\Delta Klno$ (grey bars) and $\Delta Klpgi$ (black bars) is presented relative to their level in the WT strain, which was set to 1 and represented as a thick line on the graph (WT relative expression). The relative expression means of three biological replicates with standard deviation (error bars) are represented. Significance level was determined by calculating the p-value for each data set with a Student's t-test and was represented as asterisks: * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$. It should be noted that the $\Delta Klhxk$ mutant used in this figure (MWK11/F1) correspond to a partial deletion of *KIH XK* coding for a nonfunctional truncated version of *KIHxk*. It is why *KIH XK* expression was still slightly observed by RT-qPCR in the $\Delta Klhxk$ strain.

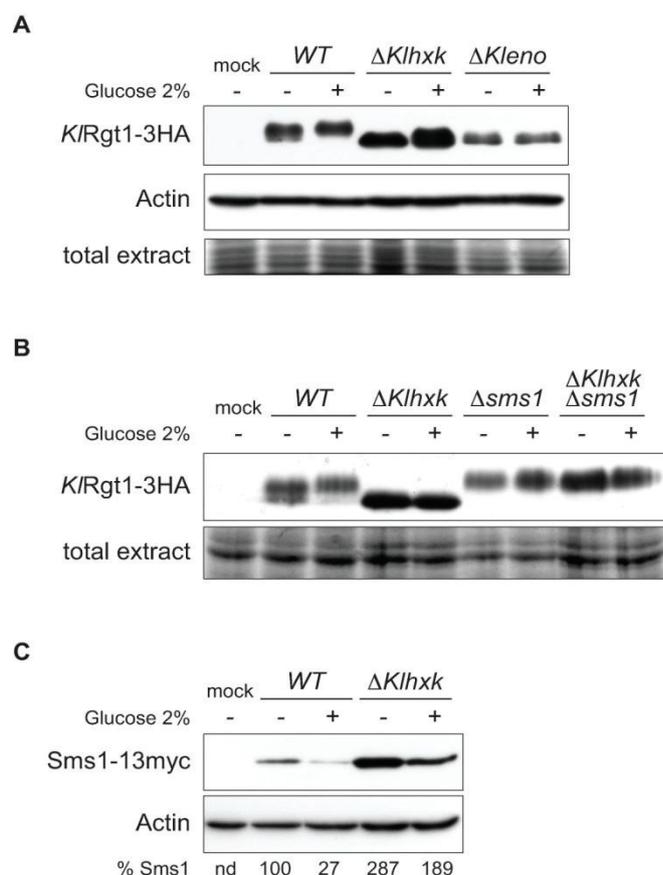


Figure 2: *K/Rgt1* phosphorylation and *Sms1* stability are affected in glycolytic mutants. (A) *K/Rgt1* phosphorylation in glycolytic mutants. *WT* (MWL1099), $\Delta Klhxk$ (MWL1118) and $\Delta Kleno$ (MWL1121) strains expressing C-terminally 3HA-tagged *K/Rgt1* (*K/Rgt1*-3HA) from the genome were grown in synthetic lactate medium to exponential phase. One half of each culture was incubated with 2% glucose (+) and the other not (-) for 30 minutes before cell collection and total protein extraction. Whole cell lysate were analyzed for *K/Rgt1*-HA by Western blot (*K/Rgt1*-3HA). (B) *SMS1* is required for glycolytic control of *K/Rgt1* phosphorylation. *K/Rgt1*-3HA expressed in *WT* (MWL1099), $\Delta Klhxk$ (MWL1118), $\Delta sms1$ (KIAS041) and $\Delta Klhxk \Delta sms1$ (KIAS040) was analyzed by Western blotting after cells were stimulated or not with 2% glucose as in panel A. (C) *Sms1* protein level in glycolytic mutants. *WT* (KIAS029), $\Delta Klhxk$ (KIAS026) strains expressing C-terminally 13myc-tagged *Sms1* from the genome (*Sms1*-13myc) were grown and glucose stimulated as in panels A and B. *Sms1* protein level was analyzed by Western blotting of whole cell lysate. Percentage of *Sms1* (% *Sms1*) was determined by densitometric analysis of the *Sms1*-13myc WB signal normalized to the actin signal (nd = not determined). The values are representative of the tendency observed in replica experiments. In all panels, a wild type strain expressing untagged proteins (MWL9S1 or derivative) was used as negative control (mock) and in-gel Coomassie staining of total protein extract and/or *K/Act1* (Actin) immunodetection were used as loading control (total extract).

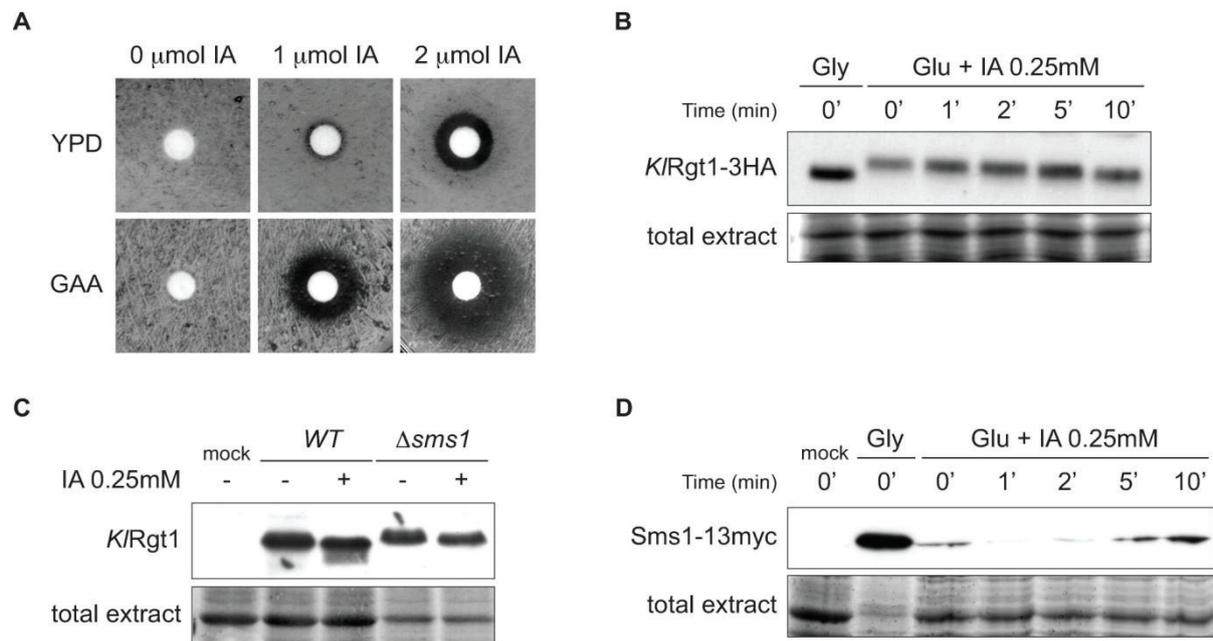


Figure 3: Chemical glycolysis inhibition with iodoacetate affects *K/Rgt1* phosphorylation and *Sms1* stability. (A) Iodoacetate confers a Rag^- phenotype. Representative examples of iodoacetate halo assays of WT cells (MWL9S1) on YPD and GAA (containing the respiratory inhibitor antimycin A) plates. 20 μ l of water (0 μ mol IA), iodoacetate 50 mM (1 μ mol IA) and iodoacetate 100 mM (2 μ mol IA) were dropped on filter papers. (B) *K/Rgt1* is rapidly dephosphorylated upon iodoacetate treatment. Cells expressing *K/Rgt1*-3HA (MWL1099) were grown to exponential phase in complete synthetic medium with glycerol (Gly) or glucose (Glu) as carbon sources. Glycerol-grown cells were harvested and glucose-grown cells were incubated with 0.25 mM iodoacetate and collected after 0, 1, 2, 5 and 10 minutes treatment. Whole cell lysates were prepared and analyzed for *K/Rgt1*-3HA by Western blot. (C) *SMS1* deletion partially prevents iodoacetate-induced *K/Rgt1* dephosphorylation. WT (MWL9S1) and Δ *sms1* (MLK54) strains grown in glucose-containing medium were treated (+) or not (-) with 0.25 mM iodoacetate for 30 minutes before harvest. Whole cell lysate were prepared and analyzed for native *K/Rgt1* by Western blot using an anti-*K/Rgt1* antibody. A strain deleted for *KIRGT1* (MWK7) was used as a specificity control (mock). (D) Iodoacetate stabilizes *Sms1* in glucose-grown cells. *Sms1*-13myc expressing cells (KIAS029) were grown and treated as in panel A. Total protein extract were analyzed for *Sms1*-13myc by Western blot. Detection of total proteins by in-gel Coomassie staining (panels B and D) or membrane Ponceau staining (panel C) was used as loading control (total extract).

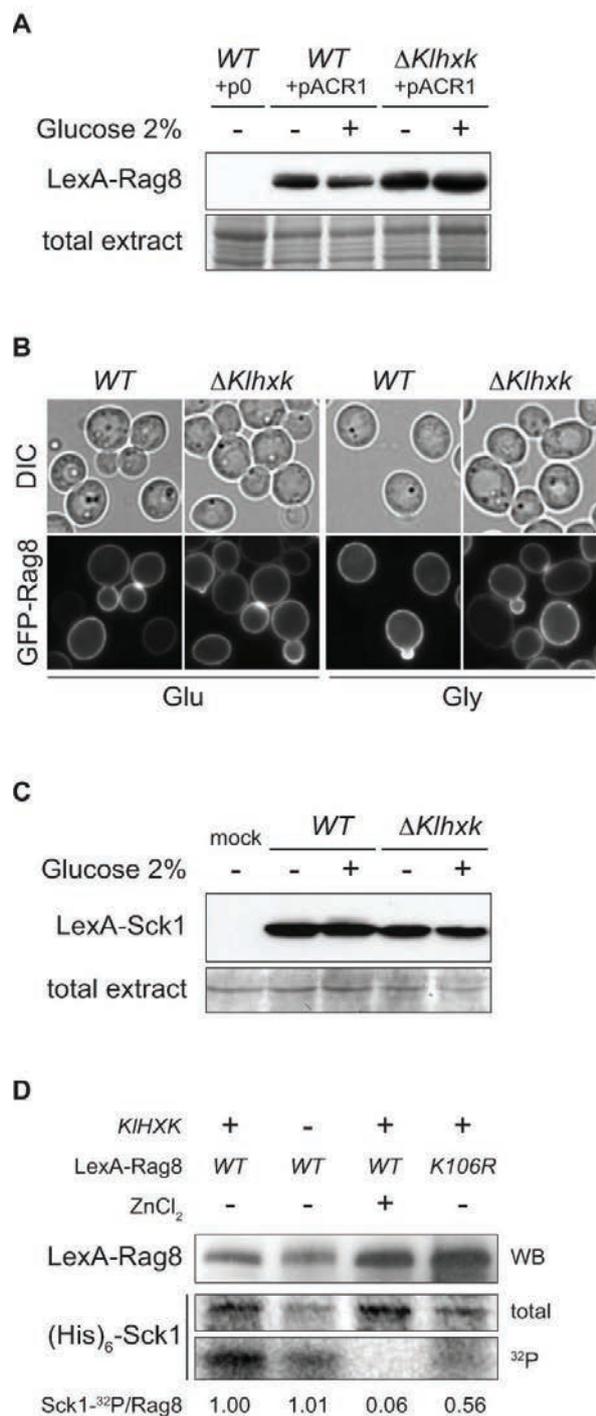


Figure 4: Casein kinase 1 Rag8 protein level, localization and kinase activity in a hexokinase mutant. (A) Rag8 protein level is stable in a glycolytic mutant. *WT* (MWL9S1) and $\Delta Klhxk$ (MWK11/F1) strains transformed with the pACR1 plasmid encoding for a N-terminally LexA-tagged Rag8 (*RAG8* promoter) were grown in lactate minimal media without uracil. Cells were then shifted (+) or not (-) to 2% glucose and incubated 30 minutes before cell collection. Whole cell lysate were prepared and analyzed for LexA-Rag8 by Western blot. MWL9S1 transformed with an empty plasmid was used as mock control. For loading control total proteins were analyzed by in-gel Coomassie staining (total extract). (B) GFP-Rag8 localization is not affected by the carbon source and by a glycolysis defect. *WT* (KIAS093) and $\Delta Klhxk$ (KIAS113) strains expressing a N-terminally GFP-tagged Rag8 (*P_{ScGAL1}* promoter) from the genome were grown in glucose (Glu) or glycerol (Gly) based minimal medium to log phase and then observed with a fluorescence microscope. Cells were imaged using a GFP filter (GFP-Rag8) or Nomarski optics (DIC). The acquisition time is equal for each GFP image. (C) Sck1 protein is stable in the hexokinase mutant. *WT* (MWL9S1) and $\Delta Klhxk$ (MWL1118) cells transformed with the plasmid pHN15 encoding for LexA-Sck1 were grown in glycerol synthetic medium without uracil. Glucose was then added (+) or not (-) to the cells for 30 minutes before being collected. LexA-Sck1 protein level was then assessed by Western blot of total protein extract. The mock control corresponds to *WT* (MWL9S1) cells transformed with an empty plasmid. Total extract were analyzed by Ponceau staining for loading control (total extract). (D) Rag8 *in vitro* kinase activity is not affected in a glycolysis mutant. A wild type (*WT*) and a “kinase deficient” form (K106R) of LexA-Rag8 were immunoprecipitated from *WT* (MWL9S1 + pACR1 or MWL9S1 + pACR3) and $\Delta Klhxk$ (MWK11/F1 + pACR1) strains grown in synthetic -ura glucose-containing medium. Kinase activity was assayed against 1 μ g of recombinant (His)₆-Sck1 expressed and purified from *E. coli*. Total and phosphorylated proteins were visualized by Coomassie staining (Coomassie) and autoradiography (³²P), respectively. An aliquot of immunoprecipitated LexA-Rag8 was conserved for analysis of total LexA-Rag8 by Western blot (Western blot). The level of Sck1 phosphorylation relative to Rag8 quantity was quantified by densitometric analysis and normalized to the *WT* strain. The specificity of the kinase activity was controlled by pre-treating purified LexA-Rag8 with 1 mM ZnCl₂ before performing the kinase reaction against (His)₆-Sck1 (+ZnCl₂).

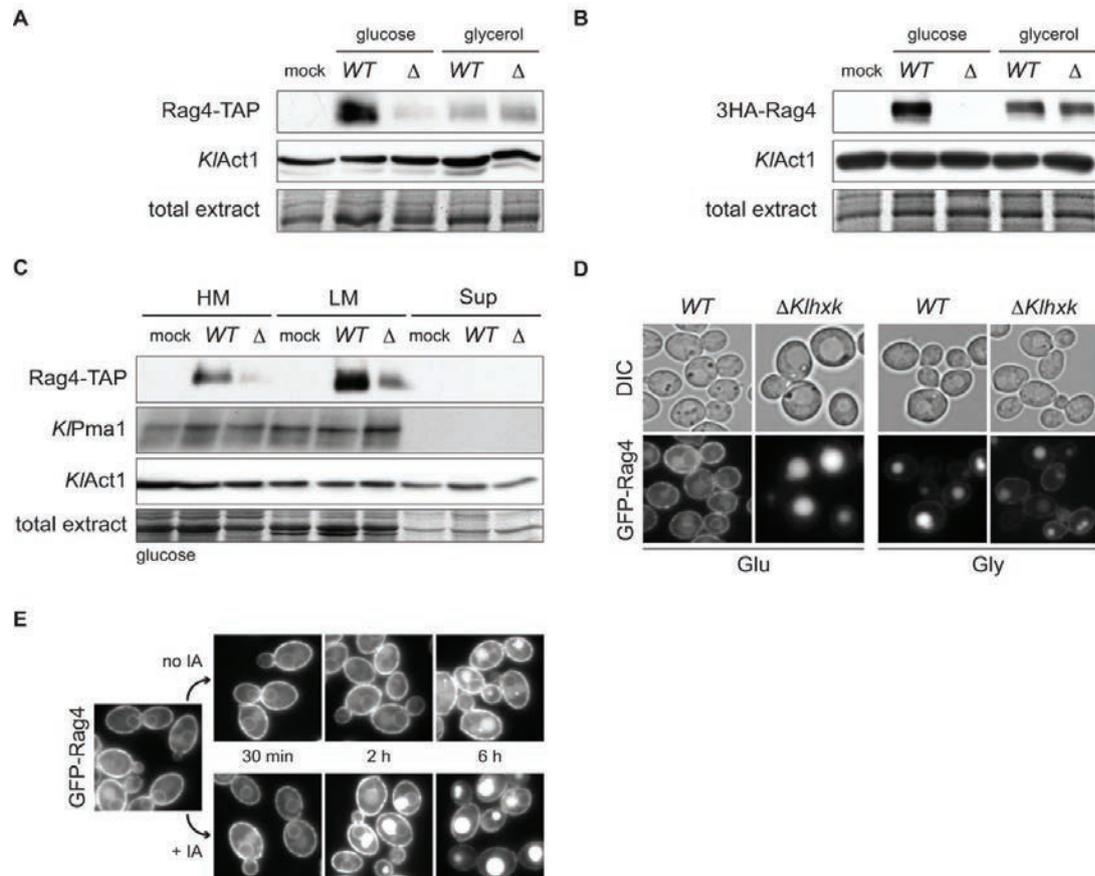


Figure 5: The glucose sensor Rag4 is a target of glycolysis. (A) and (B) Rag4 protein stability is affected in a glycolysis mutant in a carbon source dependent manner. (A) *WT* (MLK239) and $\Delta Klhxk$ (Δ) (ACRK101) strains expressing Rag4-TAP from its own promoter were grown in synthetic medium containing glucose (glucose) or glycerol (glycerol) as carbon source. Whole cell lysate were prepared and analyzed for Rag4-TAP by Western blot. A wild type strain expressing untagged proteins (MWL9S1 or derivative) was used as negative control (mock), and in-gel Coomassie staining of total protein extract (total extract) and *K/Act1* (*K/Act1*) immunodetection were used as loading control. (B) *WT* (MLK191) and $\Delta Klhxk$ (ACRK106) strains expressing N-terminally 3HA-tagged Rag4 from the P_{ScGal1} promoter were grown and analyzed as in (A). (C) The Rag4 membrane distribution is impaired in a hexokinase mutant. Cell-free lysates from isogenic *WT* (MLK239) and $\Delta Klhxk$ (Δ) (ACRK101) strains expressing Rag4-TAP and grown in synthetic glucose-containing medium (glucose) were subjected to differential centrifugation to separate heavy membranes (HM), light membranes (LM) and cytosolic supernatant (S). For each fraction an equal protein quantity was examined by Western blot to detect Rag4-TAP, *K/Pma1* and *K/Act1*. MWL9S1 (mock) was similarly processed to get a mock control. Each fraction was analyzed by Ponceau staining for loading control (total extract). (D) The *in vivo* Rag4 localization is impaired in the hexokinase mutant. *WT* (KIAS107) and $\Delta Klhxk$ (KIAS109) strains expressing N-terminally GFP-tagged Rag4 (P_{ScGal1} promoter) from the genome were grown to exponential phase in synthetic minimal medium containing either glucose (Glu) or glycerol (Gly). Cells were observed with a fluorescence microscope and imaged using a GFP filter (GFP-Rag4) or Nomarski optics (DIC). The acquisition time is equal for each GFP image. (E) Acute chemical inhibition of glycolysis by iodoacetate affects *in vivo* Rag4 localization. The strain KIAS107 used in panel C was grown to log-phase in YPD medium and then treated (+ IA) or not (no IA) with 0.25 mM iodoacetate. A fraction of the cells was collected periodically (0, 30 minutes, 2 and 6 hours post treatment) and observed under the microscope for the GFP signal (GFP-Rag4). The acquisition time is equal for each GFP image.

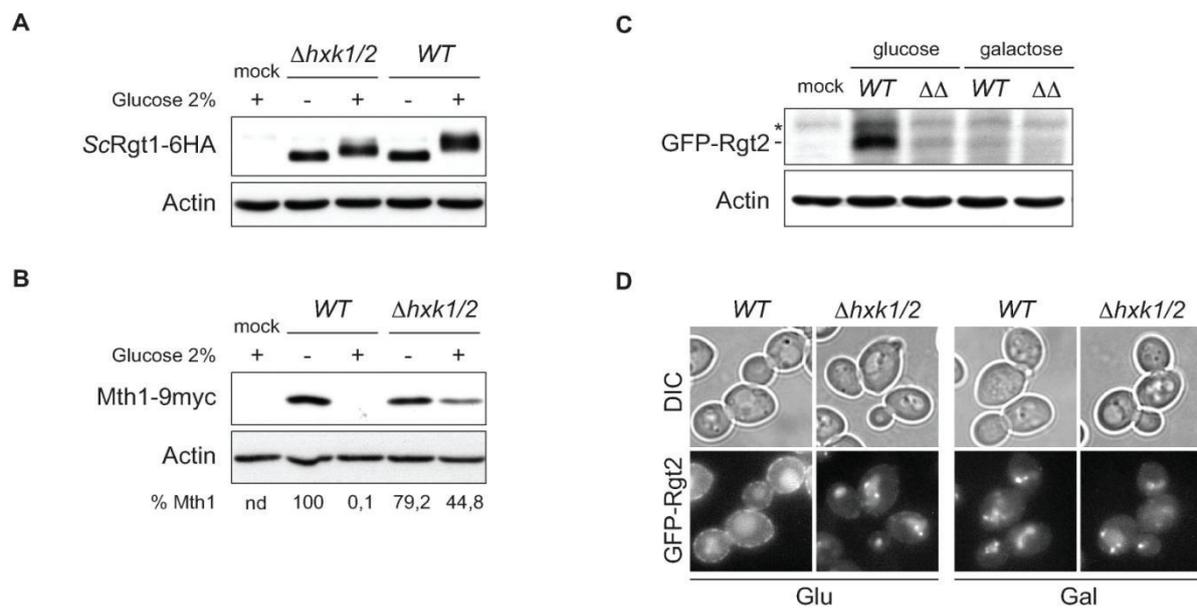


Figure 6: *S. cerevisiae* glucose signaling pathway is inhibited in a hexokinases mutant. (A) The glucose dependent phosphorylation of ScRgt1 is affected in hexokinases mutant. WT (yAS279) and *Δhxxk1/2* (yAS280) *S. cerevisiae* strains expressing C-terminally 6HA-tagged ScRgt1 (ScRgt1-6HA) from the genome were grown in synthetic galactose medium to exponential phase. One half of each culture was incubated with 2% glucose (+) and the other not (-) for 30 minutes before cell collection and total protein extraction. Whole cell lysate were analyzed for ScRgt1-HA (ScRgt1-6HA) and Actin (loading control) by Western blot. (B) Mth1 protein level in hexokinases mutant. WT (yAS273) and *Δhxxk1/2* (yAS280) *S. cerevisiae* strains expressing C-terminally 9myc-tagged Mth1 from the genome (Mth1-9myc) were grown and treated as in (A). Whole cell lysate were prepared and analyzed for Mth1-9myc and Actin (loading control) by Western blot. The percentage of Mth1-9myc in each lane (% Mth1) was determined by densitometric analysis of the myc signal normalized to the actin signal (nd = not determined). The values are representative of the tendency observed in replica experiments. (C) The Rgt2 protein level is impaired in a hexokinases mutant in a carbon source dependent manner. WT (yAS275) and *Δhxxk1/2* (yAS276) *S. cerevisiae* strains expressing GFP-Rgt2 (P_{CUP1} promoter) from the genome were grown to exponential phase in synthetic medium containing 0.02 mM CuSO_4 (promoter induction) and glucose or galactose as carbon sources. Whole cell lysate were prepared and analyzed for GFP-Rgt2 and Actin (loading control) by Western blot. A wild type strain expressing untagged proteins (W303-1A) was used as negative control (mock). (D) The Rgt2 *in vivo* plasma membrane localization is impaired in the hexokinases mutant. *S. cerevisiae* strains and growth conditions (Glu and Gal) were as in (C). Living cells were then observed with a fluorescence microscope and imaged using a GFP filter (GFP) or Nomarski optics (DIC). The acquisition time is equal for each GFP image.

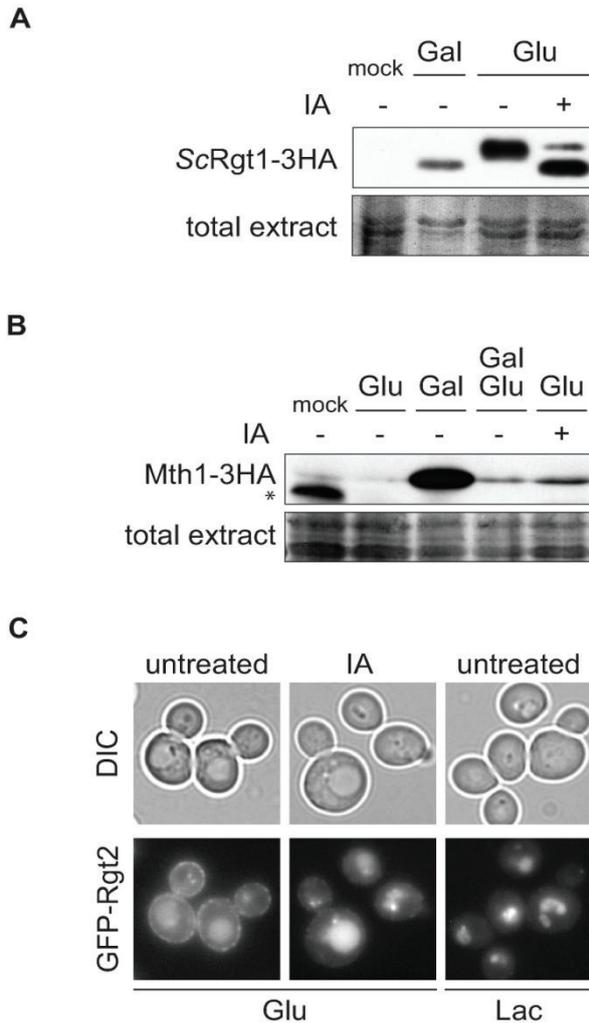


Figure 7: Chemical glycolysis inhibition with iodoacetate affects *S. cerevisiae* glucose signaling pathway. (A) ScRgt1 is dephosphorylated upon iodoacetate treatment. Cells expressing ScRgt1-3HA (yAS223) were grown to exponential phase in complete synthetic medium with glucose (Glu) or galactose (Gal) as carbon sources. Galactose-grown cells were harvested and glucose-grown cells were incubated for 30 minutes with drug vehicle (-) or 0.25 mM iodoacetate (+ IA). Cells were then collected and whole cell lysates were prepared and analyzed for ScRgt1-3HA by Western blot. TB50a/α was used as mock control. Total proteins were analyzed by in-gel Coomassie staining for loading control (total extract). (B) Iodoacetate stabilizes Mth1 in glucose-grown cells. Mth1-3HA expressing cells (MLY788) were grown to exponential phase in complete synthetic medium with glucose (Glu) or galactose (Gal) as a carbon source. Glucose-grown cells were then treated with 0.25 mM iodoacetate (+) or drug vehicle (-) for 30 minutes. Glucose (2% final) was added to galactose-grown cells for 30 min (Gal Glu). After cell collection, total protein extract were prepared and analyzed for Mth1-3HA by Western blot. Mock and loading controls were done as in panel B. Asterisks (*) = non specific signal.

(C) Iodoacetate treatment affects Rgt2 localization at the plasma membrane. A *S. cerevisiae* strain expressing GFP-Rgt2 (P_{CUP1} promoter) from the genome (yAS233) was grown to exponential phase in synthetic medium containing 0.1mM $CuSO_4$ (promoter induction) and glucose 2% (Glu) or lactate 2% + glucose 0,1% (Lac). Cells were then treated with 0.25 mM iodoacetate (IA) or with water (untreated) and collected after 60 minutes. Cells were then observed with a fluorescence microscope and imaged using a GFP filter (GFP) or Nomarski optics (DIC).

Table 1: yeast strains used in this study

Strain	Genotype	Source
<i>K. lactis</i>		
MW270-7B	<i>MATa leu2 metA1-1 uraA1-1</i>	(4)
MWK11/F1	Isogenic to MW270-7B except <i>KlhxkΔ2::ura3</i>	Lab collection
MWK3	Isogenic to MW270-7B except <i>KlenoΔ1::KanMX4</i>	(20)
MWK12	<i>MATa ade2-1 uraA1-1 rag2Δ1::URA3 (ΔKlpgi)</i>	(42)
MWL9S1	<i>MATa leu2 lys A1-1 metA1-1 trp1 uraA1-1 ΔKlnej1::loxp</i>	(43)
MWL1099	Isogenic to MWL9S1 except <i>RGT1-3HA::KanMX4</i>	This study
MWL1118	<i>MATa lysA1 trp1 uraA1 RGT1-3HA::KanMX4 KlhxkΔ2::ura3</i>	This study
MWL1121	<i>MATa leu2 trp1 uraA1 RGT1-3HA::KanMX4 KlenoΔ1::KanMX4</i>	This study
IAS041	<i>MATa sms1::KanMX4 KIRGT1-3HA::KanMX4 ade2-1 uraA1-1</i>	This study
IAS040	<i>MATa KlhxkΔ2::URA3 sms1::KanMX4 KIRGT1-3HA::KanMX4 metA1-1 trp1 uraA1-1</i>	This study
IAS029	<i>MATa SMS1-13MYC::KanMX4 uraA1-1</i>	This study
IAS026	<i>MATa SMS1-13MYC::KanMX4 KlhxkΔ2::URA3 uraA1-1 leu2 trp1 lysA1</i>	This study
MLK54	Isogenic to MW270-7B except <i>sms1Δ1::KanMX4</i>	(7)
MWK7	Isogenic to MW270-7B except <i>Klrgt1Δ1::URA3</i>	(6)
IAS093	Isogenic to MWL9S1 except <i>KanMX4::P_{ScGAL1}GFP-RAG8</i>	This study
IAS113	Isogenic to IAS093 except <i>ΔKlhxk::NatNT2</i>	This study
MLK239	Isogenic to MWL9S1 except <i>RAG4-TAP::KanMX4</i>	This study
ACRK101	Isogenic to MLK239 except <i>ΔKlhxk::NatNT2</i>	This study
IAS107	Isogenic to MWL9S1 except <i>KanMX4::P_{ScGAL1}GFP-RAG4</i>	This study
IAS109	Isogenic to IAS107 except <i>ΔKlhxk::NatNT2</i>	This study
MLK191	Isogenic to MWL9S1 except <i>KanMX4::P_{ScGAL1}3HA-RAG4</i>	This study
ACRK106	Isogenic to MLK191 except <i>ΔKlhxk::NatNT2</i>	This study
<i>S. cerevisiae</i>		
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
MLY788	Isogenic to BY4742 except <i>MTH1-3HA::KanMX6</i>	This study
yAS233	Isogenic to BY4742 except <i>NatNT2::P_{CUP1}GFP-RGT2</i>	This study
TB50a/α	<i>MATα/a leu2/leu2 ura3/ura3 rme1/rme1 trp1/trp1 his3-/his3- GAL+/GAL+ HMLa/HMLa</i>	M. Hall collection
yAS223	Isogenic to TB50a/α except <i>ScRGT1/ScRGT1-3HA::KanMX4</i>	This study
W303-1A	<i>MATa leu2-3,112 ura3-1 trp1-; ade2-, his3-11, 1 can1-100</i>	R. Rothstein
yAS273	Isogenic to W303-1A except <i>MTH1-9MYC::KanMX4</i>	This study
yAS275	Isogenic to W303-1A except <i>NatNT2::P_{CUP1}GFP-RGT2</i>	This study
yAS279	Isogenic to W303-1A except <i>ScRGT1-6HA::NatNT2</i>	This study
JW02870	Isogenic to W303-1A except <i>Δhvk1::HIS3 Δhvk2::TRP1</i>	J. Winderickx
yAS276	Isogenic to JW02870 except <i>NatNT2::P_{CUP1}GFP-RGT2</i>	This study
yAS277	Isogenic to JW02870 except <i>MTH1-9MYC::NatNT2</i>	This study
yAS280	Isogenic to JW02870 except <i>ScRGT1-6HA::NatNT2</i>	This study

3. Résultats complémentaires

Au cours de cette étude plusieurs hypothèses de travail ont été testées et tous les résultats obtenus n'ont pas été inclus dans la publication. Ces résultats supplémentaires sont présentés ici car ils permettent une compréhension plus approfondie des mécanismes de régulation de la voie de signalisation du glucose par la glycolyse. Une première partie traite des résultats complémentaires obtenus avec des mutants glycolytiques chez *K. lactis*. Une deuxième partie concerne l'utilisation d'inhibiteurs chimiques de la glycolyse chez *K. lactis* pour étudier l'effet sur la signalisation du glucose. Enfin la dernière partie aborde certains travaux réalisés chez *S. cerevisiae* pour déterminer si le contrôle de la glycolyse sur la signalisation du glucose est conservé chez cette levure.

3. a. Etude de la signalisation du glucose dans des mutants glycolytiques chez *K. lactis*

Dans cette partie sont présentés des résultats considérés comme secondaires pour la publication, notamment à propos des effets de la surexpression de *RAG4* avec le promoteur P_{ScGAL1} .

3. a. i. Analyse de la localisation de la perméase au glucose Rag1 en réponse au glucose dans un mutant de l'hexokinase

Pour confirmer les résultats obtenus précédemment (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004), l'expression du gène de la perméase au glucose *RAG1* a été analysée par qRT-PCR, en présence de glucose dans une souche sauvage et dans un mutant de l'hexokinase (Publication, Figure 1). Puisque l'expression de *RAG1* en présence de glucose présente une répression de 90 % dans le mutant de l'hexokinase par rapport à une souche sauvage, nous avons testé si cet effet transcriptionnel se répercutait sur la perméase Rag1 en termes de quantité et de localisation cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé une fusion *RAG1-GFP* exprimée dans le génome de souches *WT* ou *KlhxkΔ2* sous le contrôle du promoteur endogène P_{RAG1} , puis nous avons observé la protéine Rag1-GFP en microscopie à fluorescence dans des cellules cultivées en présence ou en absence de glucose (Figure 30).

Dans la souche sauvage cultivée en absence de glucose (Sgly *WT*), Rag1-GFP est détecté à la membrane plasmique dans la majorité des cellules, bien que le niveau de fluorescence soit variable en fonction des cellules (Figure 30). L'addition de glucose dans le milieu de culture entraîne une augmentation de l'intensité du signal fluorescent de Rag1-GFP qui s'accumule à la membrane plasmique à partir de 2 h dans toutes les cellules. Après 2 h, la quantité de Rag1-GFP augmente et elle est maximale entre 4 et 8 h après stimulation par le glucose (données non présentées). Dans le mutant de l'hexokinase cultivé en absence de glucose, les cellules présentent un signal fluorescent différent de celui observé pour la souche sauvage : le signal GFP s'accumule dans certaines cellules dans un organelle, vraisemblablement la vacuole (Figure 30). Toutefois, le signal membranaire est globalement de même intensité

dans les deux souches. L'addition de glucose entraîne l'atténuation du signal GFP dans la vacuole mais aucune augmentation du signal au niveau de la membrane plasmique.

Ces résultats montrent que la quantité (ou stabilité) et la localisation cellulaire de la perméase Rag1 sont régulées par la présence de glucose extracellulaire lorsque que la glycolyse est fonctionnelle : en absence de glucose, Rag1 est présent dans la vacuole alors que la présence de glucose induit son adressage à la membrane plasmique des cellules en quantité abondante. En revanche, une glycolyse non fonctionnelle accentue la localisation vacuolaire de Rag1 en absence de glucose et inhibe la synthèse massive de Rag1 (et la localisation à la membrane plasmique) en présence de glucose.

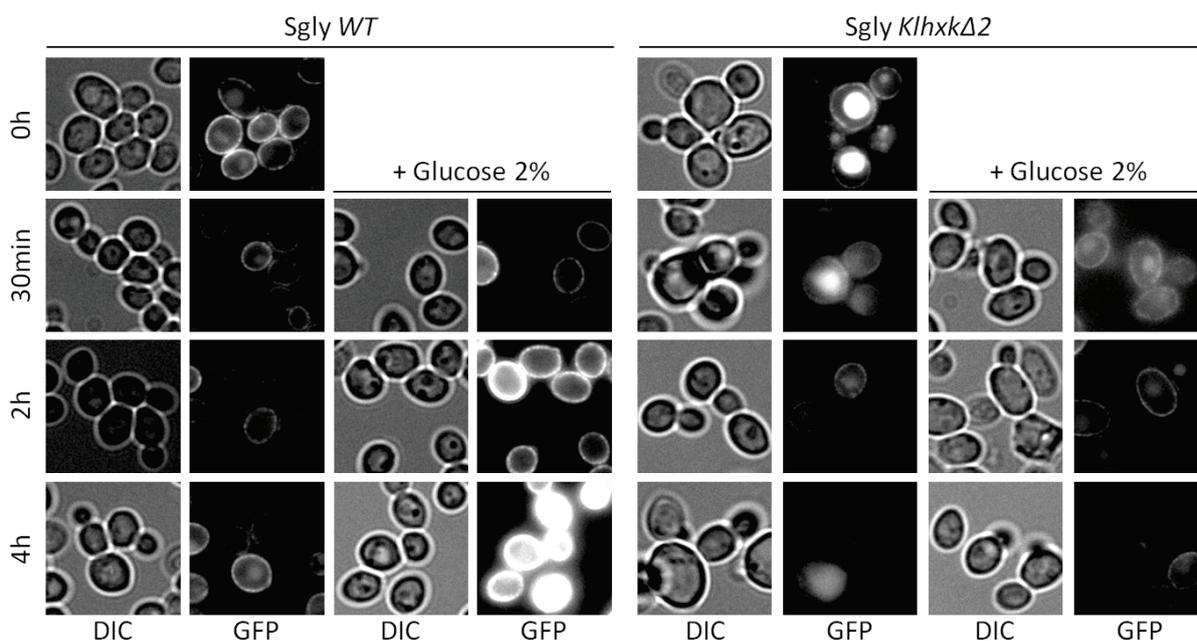


Figure 30: L'expression et la localisation de Rag1-GFP sont affectées dans un mutant de l'hexokinase en présence de glucose. Observations au microscope à fluorescence de Rag1-GFP dans une souche *WT* (KIAS61) et une souche *KlhxkΔ2* (KIAS90) cultivées en milieu synthétique *Sgly* et observées en début de phase exponentielle de croissance. A $t = 0$, les cultures ont été séparées en deux et 2 % de glucose ont été ajoutés dans l'une de ces cultures (+ Glucose 2%), pour chaque souche. Les observations ont été effectuées avec un filtre GFP (GFP) et un optique Nomarski (DIC) montés sur le microscope. Le temps d'exposition est le même pour chaque image. Les images présentées ont été traitées par ImageJ et sont représentatives de l'ensemble des cellules observées.

Ces résultats sont en accord avec les données d'expression de *RAG1* en présence de glucose (Publication, Figure 1) : ici la différence de quantité de signal fluorescent à la membrane est d'au moins dix fois entre les souches sauvage et *KlhxkΔ2*, quatre heures après addition du glucose. De plus, ils confortent des résultats du laboratoire qui montrent que l'expression de *RAG1* après stimulation par le glucose est optimale après au moins 4 heures dans une souche sauvage (Chen et al., 1992).

Les résultats présentés dans la Figure 1 de la Publication ont permis d'orienter nos recherches vers le répresseur transcriptionnel *K/Rgt1* puis son corépresseur *Sms1* (Publication, Figure 2), qui se sont révélés régulés par la glycolyse. Ensuite, l'état de la caséine kinase I a été analysé (Publication, Figure 4) sans montrer de contrôle par la glycolyse. Notre attention s'est alors tournée vers le senseur du glucose Rag4, en amont de

la voie de signalisation du glucose, et plus particulièrement son interaction avec Rag8 dans un mutant de l'hexokinase.

3. a. ii. Interaction du senseur au glucose Rag4 et de la caséine kinase de type I Rag8 dans un mutant glycolytique

L'interaction entre Rag4 et Rag8 a été démontrée par double-hybride chez *K. lactis* (Rolland et al., 2006). Lorsque nous nous sommes intéressés à la fonctionnalité de Rag8 dans un mutant glycolytique, nous avons observé que la quantité et l'activité de la caséine kinase I ne sont pas contrôlées par la glycolyse. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'interaction entre Rag4 et Rag8 pouvait être affectée dans un mutant glycolytique, ce qui expliquerait le défaut de signalisation du glucose dans ce mutant. Pour étudier cette hypothèse, nous avons analysé l'interaction entre LexA-Rag8 et 3HA-Rag4 (surexprimé par la construction $P_{ScGAL1}3HA-RAG4$) par co-immunoprécipitation, dans une souche *WT* et une souche *KlhxkΔ2* (Figure 31). La surexpression de *RAG4* a été utilisée car dans la souche exprimant *RAG4-3HA* sous son propre promoteur, Rag4-3HA est plus difficilement détectée par Western blot.

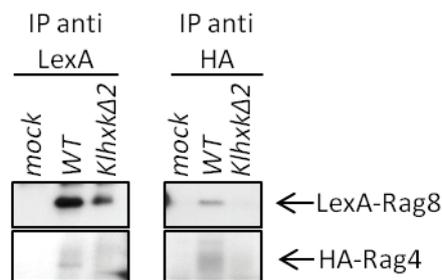


Figure 31: Les protéines 3HA-Rag4 et LexA-Rag8 interagissent dans une souche sauvage, mais l'interaction n'est pas visualisée dans un mutant de l'hexokinase. La co-immunoprécipitation entre 3HA-Rag4 et LexA-Rag8 dans des souches *WT* et *KlhxkΔ2* dans lesquelles *3HA-RAG4* est surexprimé ($P_{ScGAL1}3HA-RAG4$) est visualisée par Western blot et immunodétection. Les souches MWL9S1 (mock), MLK268 (*WT*) et MLK265 (*KlhxkΔ2*) exprimant LexA-Rag8 à partir du plasmide pACR1 ont été cultivées en milieu SG ou SG -ura. Les $DO_{600\text{ nm}}$ étaient équivalentes au moment de la collecte des cellules. Après extraction protéique (tampon RIPA modifié), une même quantité de chaque extrait protéique total a été utilisée afin d'immunoprécipiter soit LexA-Rag8 avec un anticorps anti-LexA (IP anti-LexA), soit 3HA-Rag4 avec un anticorps anti-HA (IP anti-HA). Les complexes immuns purifiés ont été analysés par SDS-PAGE et Western blot afin de détecter 3HA-Rag4 (anti-HA) puis LexA-Rag8 (anti-LexA) après « stripping » de la membrane.

Pour la première fois, l'interaction entre LexA-Rag8 et 3HA-Rag4 a été visualisée par co-immunoprécipitation chez *K. lactis*, dans la souche *WT* en présence de glucose. Cette interaction n'a pas été observée dans la souche *KlhxkΔ2*. Or, dans cette souche, la quantité de 3HA-Rag4 immunoprécipitée est très faible malgré sa surexpression (Figure 31, IP anti-HA). Les résultats ne permettent pas de déterminer si l'absence de co-immunoprécipitation observée dans le mutant *KlhxkΔ2* est due au très faible niveau de protéine 3HA-Rag4 ou à un réel défaut d'interaction Rag4-Rag8. Ce sont ces résultats qui nous ont mis sur la voie de l'étude de la stabilité de Rag4 dans un mutant glycolytique. Avant de s'intéresser à l'état post-traductionnel de la protéine Rag4, nous avons d'abord analysé les effets de la surexpression de *RAG4*, dont les résultats sont présentés ci-dessous.

3. a. iii. Effet de la surexpression du senseur au glucose *RAG4* sur la voie de signalisation du glucose

- Effet de la surexpression de *RAG4* sur l'expression et les répresseurs de *RAG1*

L'analyse par qRT-PCR de l'expression de *RAG4* a montré qu'elle était légèrement diminuée dans les mutants glycolytiques cultivés en présence de glucose (Publication, Figure 1B). Suite à ce résultat, nous avons voulu déterminer si ce défaut d'expression est responsable du faible niveau de protéine Rag4 observée, et donc de l'effet sur la voie de signalisation du glucose. Pour cela, nous avons surexprimé *RAG4* de manière constitutive avec le promoteur *P_{ScGAL1}*, dans une souche sauvage ou mutée pour l'hexokinase. Le test du phénotype Rag a montré que les souches construites pour surexprimer *RAG4* dans un contexte sauvage sont Rag⁺ et celles construites dans un contexte *KlhxkΔ2* sont Rag⁻. La surexpression de *RAG4* a été vérifiée par qRT-PCR (Figure 32). Au cours de cette expérience, nous avons aussi analysé le niveau d'expression de plusieurs gènes impliqués dans la signalisation du glucose pour déterminer leur potentielle réponse à la surexpression de *RAG4* (Figure 32).

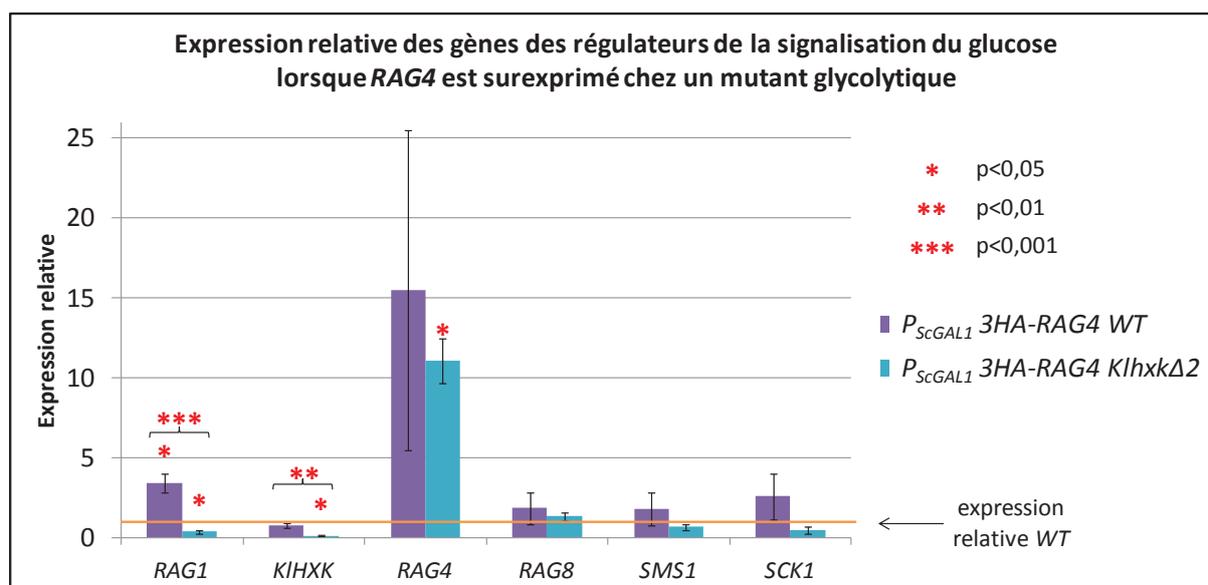


Figure 32: La surexpression de *RAG4* par le promoteur *ScGAL1* est fonctionnelle et n'est pas régulée par la glycolyse chez *K. lactis*. L'expression relative de *RAG1*, *KIH XK*, *RAG4*, *RAG8*, *SMS1* et *SCK1* lorsque *RAG4* est surexprimé par la construction *P_{ScGAL1}3HA-RAG4* a été mesurée par qRT-PCR dans les souches MW270-7B (WT), MLK203 (*P_{ScGAL1}3HA-RAG4*) et MLK227 (*KlhxkΔ2 P_{ScGAL1}3HA-RAG4*) cultivées en milieu YPG. Les niveaux d'expression relative ont été normalisés par rapport au transcrite *KIACT1*. Les expressions sont exprimées relativement à la souche sauvage dont le niveau d'expression est fixé à 1 et est représenté par la ligne orange. Les expressions relatives sont les moyennes de trois réplicats biologiques indépendants, les déviations standards sont représentées pour chaque échantillon. La signification statistique a été déterminée en calculant les p-values avec un test t de Student et elle est représentée par des astérisques. Les astérisques au-dessus des accolades décrivent la différence statistiquement significative entre les moyennes des deux échantillons désignés, ceux au-dessus des barres décrivent la différence statistiquement significative entre la moyenne de l'échantillon et la moyenne théorique (=1) correspondant à la souche sauvage.

Le niveau de transcrite *RAG4* est environ dix fois supérieur avec la construction *P_{ScGAL1}3HA-RAG4* par rapport à la souche sauvage : la surexpression de *RAG4* grâce à cette construction est effective. L'expression de *RAG4* avec la construction *P_{ScGAL1}3HA-RAG4* n'est pas statistiquement différente entre les souches WT et *KlhxkΔ2* : le promoteur de *ScGAL1* n'est

pas régulé par la glycolyse chez *K. lactis*. Cependant la barre d'erreur pour la souche *P_{ScGAL1}3HA-RAG4 WT* montre une grande variabilité des résultats, ce qui nécessiterait de refaire les mesures pour vérifier s'il s'agit d'un problème technique.

Dans la souche *WT* et la souche *KlhxkΔ2*, la surexpression de *RAG4* entraîne la surexpression de *RAG1* (Publication, Figure 1A et Figure 32, résultat du calcul de la significativité statistique : $p < 0,01$). Ainsi la surexpression de *RAG4* semble accroître l'induction de *RAG1* en amplifiant de 3,5 fois environ son expression, que la glycolyse soit fonctionnelle ou non. Cependant, la surexpression de *RAG4* dans le mutant de l'hexokinase ne rétablit pas l'expression de *RAG1* à un niveau sauvage. Le gène *RAG1* est dix fois plus exprimé dans la souche *P_{ScGAL1}3HA-RAG4 WT* que dans la souche *P_{ScGAL1}3HA-RAG4 KlhxkΔ2*. Cette différence d'expression de dix fois est la même que pour les souches *WT* et *KlhxkΔ2* dans lesquelles *RAG4* est exprimé de manière endogène (Publication, Figure 1A) : la surexpression de *RAG4* ne change pas la manière dont *RAG1* est réprimé dans un mutant glycolytique, mais change le niveau d'expression basale de *RAG1*.

Pour comprendre comment l'expression de *RAG1* est amplifiée lorsque *RAG4* est surexprimé, l'état post-traductionnel des répresseurs transcriptionnels *KIRgt1* et *Sms1* a été analysé dans ces mêmes conditions. Pour cela, des souches *P_{ScGAL1}3HA-RAG4 WT* et *P_{ScGAL1}3HA-RAG4 KlhxkΔ2* exprimant les protéines de fusion *Sms1-13myc* ou *KIRgt1-3HA* ont été construites. L'analyse de la stabilité de *Sms1-13myc* dans ces souches est montrée dans la Figure 33.

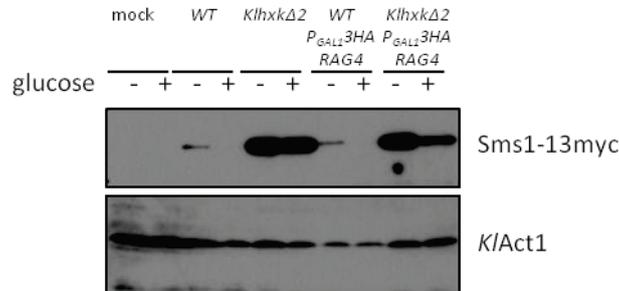


Figure 33: La surexpression de *RAG4* dans un mutant de l'hexokinase restaure partiellement la dégradation de *Sms1* induite par le glucose. La stabilité de *Sms1-13myc* est observée par Western blot et immunodétection lorsque *3HA-RAG4* est exprimé sous le contrôle du promoteur *P_{ScGAL1}*, dans une souche sauvage et dans un mutant de l'hexokinase *KlhxkΔ2*. Les cellules ont été cultivées en milieu YPgly avant de subir une stimulation glucose de 30 min. Les souches utilisées sont les suivantes : mock : MWL9S1, *WT* : KIAS29, *KlhxkΔ2* : KIAS26, *WT P_{ScGAL1}3HA-RAG4* : MLK268, *KlhxkΔ2 P_{ScGAL1}3HA-RAG4* : MLK266. Les protéines ont été extraites selon le protocole de Kushnirov. Après séparation des extraits sur gel SDS-PAGE, *Sms1-13myc* a été détecté par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-c myc. L'immunodétection de l'actine est utilisée comme contrôle de charge.

La surexpression de *RAG4* ne modifie pas la stabilité de *Sms1-13myc* en absence de glucose, en contexte sauvage et dans un mutant glycolytique. Dans le mutant *KlhxkΔ2*, la surexpression de *RAG4* permet de restaurer partiellement la dégradation de *Sms1-13myc* en réponse au glucose. Cependant, la quantité de *Sms1-13myc* observée dans cette condition est toujours supérieure à celle qui est observée pour la souche sauvage en absence de glucose et qui suffit à empêcher la phosphorylation de *KIRgt1*. L'analyse de la phosphorylation de *KIRgt1-3HA* lorsque *RAG4* est surexprimé dans ces souches est montrée dans la Figure 34.

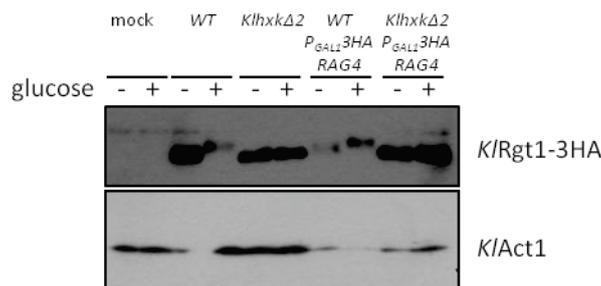


Figure 34: La surexpression de *RAG4* dans un mutant de l'hexokinase ne permet pas de rétablir l'hyperphosphorylation de *K/Rgt1* induite par le glucose. La phosphorylation de *K/Rgt1*-3HA est observée par Western blot et immunodétection lorsque *3HA-RAG4* est exprimé sous le contrôle du promoteur P_{ScGAL1} , dans une souche sauvage et dans un mutant de l'hexokinase *KlhxkΔ2*. Les cellules ont été cultivées en milieu YPgly avant de subir une stimulation glucose de 30 min. Les souches utilisées sont les suivantes : mock : MWL9S1, WT : MWL1099, *KlhxkΔ2* : MWL1118, WT P_{ScGAL1} -3HA-*RAG4* : MLK276, *KlhxkΔ2* P_{ScGAL1} -3HA-*RAG4* : MLK274. Les protéines ont été extraites selon le protocole de Kushnirov. Après séparation des extraits sur gel SDS-PAGE, *K/Rgt1*-3HA a été détecté par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-HA. L'immunodétection de l'actine est utilisée comme contrôle de charge.

La surexpression de *RAG4* entraîne une phosphorylation partielle de *K/Rgt1*-3HA en absence de glucose en contexte sauvage. Dans le mutant *KlhxkΔ2*, la surexpression de *RAG4* ne permet pas de restaurer la phosphorylation de *K/Rgt1*-3HA en présence de glucose. La quantité restante de *Sms1*-13myc (Figure 32) est probablement suffisante pour masquer *K/Rgt1*, empêcher sa phosphorylation et réprimer l'expression de *RAG1*.

L'expression constitutive de *RAG4* ne permet pas de rétablir une signalisation du glucose fonctionnelle dans un mutant de la glycolyse (Figure 32, Figure 33 et Figure 34). Cependant, la surexpression de *RAG4* mime en partie la présence de glucose extracellulaire en stimulant la dégradation de *Sms1*-13myc (Figure 33) et en stimulant partiellement la phosphorylation de *K/Rgt1*-3HA (Figure 34). Cette inhibition partielle des facteurs de transcription se traduit par une augmentation de l'expression de *RAG1* en présence de glucose dans les souches P_{ScGAL1} -3HA-*RAG4* (Figure 32). Dans un mutant de l'hexokinase, ces résultats suggèrent l'existence d'un mécanisme dépendant de *Rag4*, actif dans un mutant *KlhxkΔ2* et capable de diminuer le niveau global de protéine *Sms1*-13myc en présence de glucose. Comme le modèle actuel suggère que la dégradation de *Sms1* en présence de glucose nécessite sa phosphorylation par *Rag8* (fonctionnel dans un mutant de l'hexokinase, Publication, Figure 4), et que *Rag8* est activé par *Rag4*, nous nous sommes ensuite intéressés à la stabilité de *Rag4*. Les résultats de la co-immunoprécipitation présentés ci-dessus suggèrent que la stabilité de *Rag4* est affectée dans un mutant glycolytique même lorsque *RAG4* est surexprimé (Figure 31).

L'analyse de la stabilité de *Rag4* dans un mutant de l'hexokinase nous a confrontés à des problèmes de reproductibilité des résultats. Le mutant de l'hexokinase *KlhxkΔ2* utilisé jusqu'à présent est une souche du laboratoire qui ne correspond pas à une délétion complète de *KHXK* (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004). Un fragment du gène est présent et probablement transcrit en ARNm (Publication, Figure 1A). Pour résoudre ces problèmes, nous avons construit un mutant de délétion complète $\Delta K/hxk$, utilisé pour le reste de l'étude.

- Etude de la stabilité du senseur du glucose Rag4 dans un mutant glycolytique lorsque son gène est surexprimé

Les résultats présentés ci-dessus nous ont amené à nous intéresser à la stabilité de Rag4. La dégradation de Rag4 dans un mutant de l'hexokinase est présentée dans la Figure 5 de la Publication. Après avoir observé la dégradation de Rag4 dans un mutant de l'hexokinase en présence de glucose, nous avons examiné la stabilité de la protéine lorsque *RAG4* est surexprimé. La Figure 5B de la Publication montre que malgré la surexpression du gène *RAG4*, la protéine Rag4 n'est pas détectée par Western blot dans les extraits totaux d'une souche $\Delta Klhxk$. Pour renforcer ces résultats, nous avons analysé l'effet de la surexpression de *RAG4* sur la répartition membranaire de Rag4 dans une souche sauvage et $\Delta Klhxk$. Pour cela, la technique de fractionnement membranaire par ultracentrifugation a été utilisée, ce qui a l'avantage de concentrer les fractions membranaires et de permettre l'observation de la répartition de la protéine entre « membranes lourdes » (membranes plasmique et des organelles) et « membranes légères » (membranes des vésicules de transport). Les résultats sont présentés dans la Figure 35.

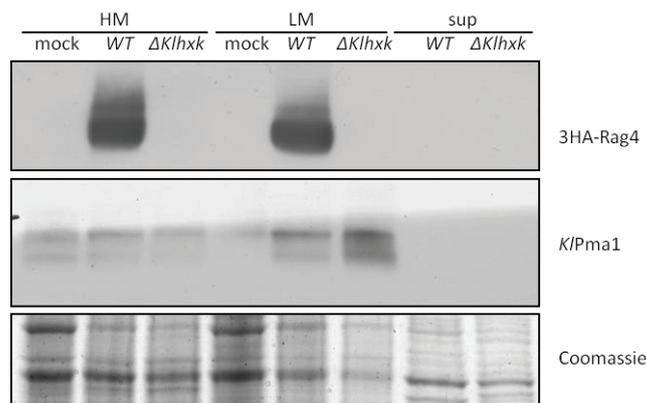


Figure 35: La protéine 3HA-Rag4 est déstabilisée dans un mutant de l'hexokinase en présence de glucose. L'immunodétection de 3HA-Rag4 est observée par Western blot dans des souches *WT* et $\Delta Klhxk$ en milieu glucose lorsque *RAG4* est surexprimé. Les souches MWL9S1 (mock), MLK191 (*WT P_{SCGAL1}3HA-RAG4*) et ACRK106 ($\Delta Klhxk P_{SCGAL1}3HA-RAG4$) ont été cultivées en milieu SG et le tampon MOPS a été utilisé pour la lyse cellulaire. La fraction « HM » correspond aux membranes lourdes, la fraction « LM » aux membranes légères et la fraction « sup » contient les protéines solubles qui ont été précipitées. Pour chaque fraction, une quantité égale de protéines a été analysée par Western blot avec des anticorps anti-HA pour détecter 3HA-Rag4 et anti-Pma1/2 pour *K/Pma1*. Un gel chargé avec les mêmes échantillons a été coloré au bleu de Coomassie comme contrôle de la charge protéique.

En concentrant les fractions membranaires et en observant la répartition entre les fractions membranaires « lourdes » et « légères », la protéine 3HA-Rag4 n'est pas détectée dans la souche $\Delta Klhxk P_{SCGAL1}3HA-RAG4$ alors qu'elle est bien visible dans la souche *WT P_{SCGAL1}3HA-RAG4* (Figure 35). Ces résultats ont confirmé ceux de la publication (Publication, Figure 5B) montrant que la protéine 3HA-Rag4 n'est pas détectable dans des extraits totaux de la souche $\Delta Klhxk P_{SCGAL1}3HA-RAG4$. Ainsi, même quand *RAG4* est surexprimé, la protéine n'est pas stable et est dégradée dans un mutant de l'hexokinase, en présence de glucose dans le milieu de culture.

3. a. iv. Quantité et répartition membranaire du senseur au glucose Rag4 dans un mutant glycolytique en absence de glucose extracellulaire

Les résultats présentés dans les Figures 5A et 5B de la Publication montrent la différence de quantité de Rag4 entre les souches *WT* et $\Delta Klhxk$, pour un milieu glucose et un milieu glycérol. Rag4 est très faiblement détecté dans la souche $\Delta Klhxk$ en glucose par rapport à la souche *WT*, mais aucune différence de quantité entre *WT* et $\Delta Klhxk$ n'est observée en milieu glycérol. Dans la Figure 5C de la Publication, la répartition de Rag4 dans des fractions membranaires obtenues par ultracentrifugation est analysée dans une souche *WT* et une souche $\Delta Klhxk$. En présence de glucose extracellulaire, la répartition membranaire de Rag4 est différente pour la souche sauvage et le mutant de l'hexokinase. Comme la quantité de Rag4 ne varie pas entre les deux souches en milieu glycérol (Publication, Figure 5A), nous avons voulu vérifier si la répartition membranaire est modifiée entre les deux souches en absence de glucose. Pour cela, nous avons réalisé une séparation des fractions membranaires par ultracentrifugation, puis nous avons immunodétecté Rag4-TAP (exprimé sous le contrôle du promoteur endogène) après Western blot (Figure 36).

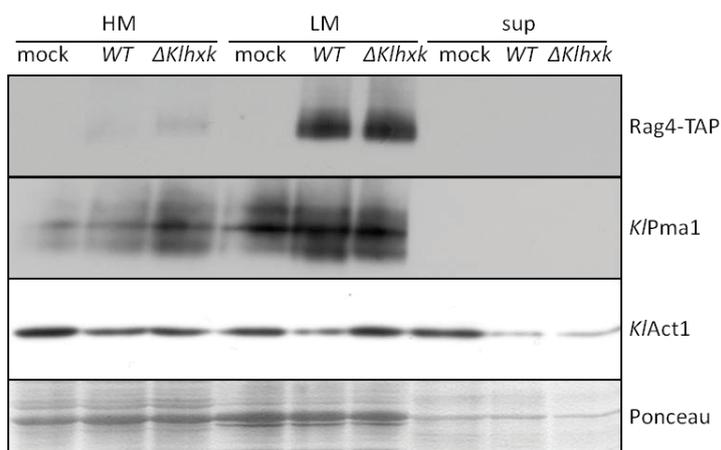


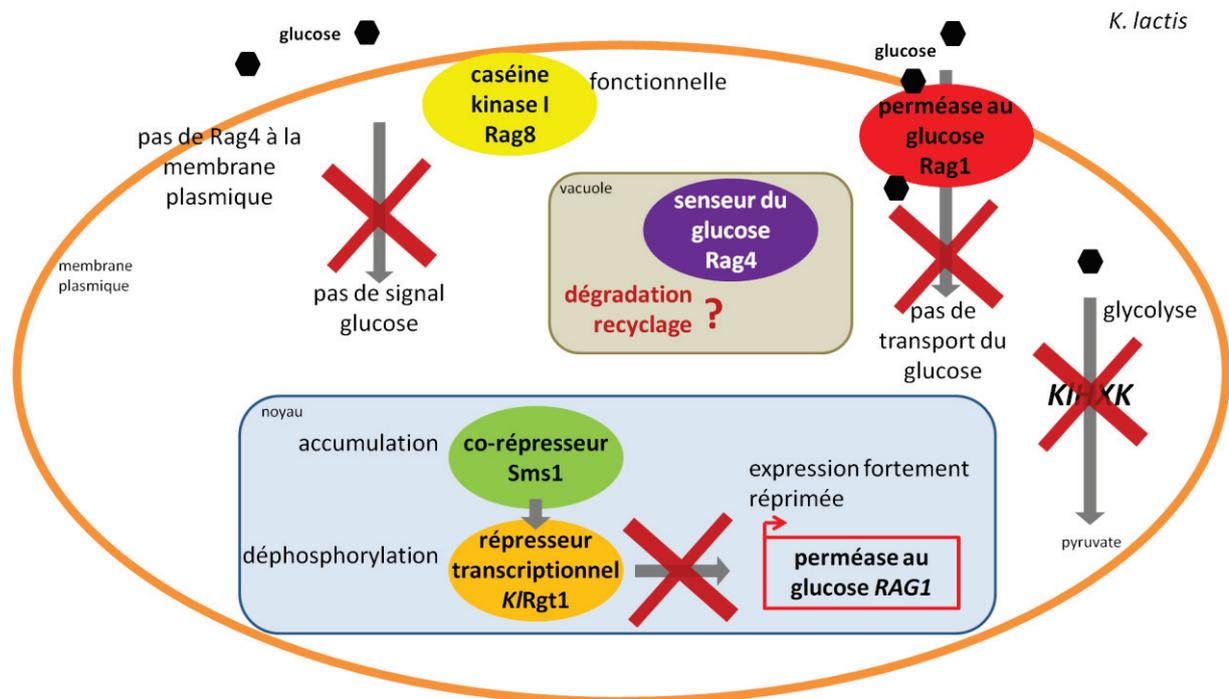
Figure 36: La quantité et la répartition membranaire de Rag4-TAP ne varient pas entre une souche sauvage et un mutant de l'hexokinase dans un milieu sans glucose. Les souches MWL9S1 (mock), MLK239 (*WT*) et ACRK101 ($\Delta Klhxk$) exprimant Rag4-TAP ont été cultivées dans un milieu synthétique glycérol. Les échantillons ont été préparés dans le tampon MOPS par séparation des fractions membranaires par ultracentrifugation. La fraction « HM » correspond aux membranes lourdes, la fraction « LM » aux membranes légères et la fraction « sup » contient les protéines solubles qui ont été précipitées. Pour chaque fraction, une quantité égale de protéines a été analysée par Western blot afin d'immunodétecter Rag4-TAP (anti-protéine A), *K/Pma1* (anti-Pma1/2) et *K/Act1* (anti-actine). La membrane a été colorée au rouge Ponceau comme contrôle de la charge protéique.

Dans une souche sauvage en absence de glucose dans le milieu, Rag4-TAP est principalement présent dans la fraction « membranes légères » (vésicules de transport). Ces résultats, en complément des résultats précédents (Publication, Figure 5C), suggèrent que Rag4 est faiblement présent à la membrane plasmique en absence de glucose et est massivement mobilisé et relocalisé en présence de glucose pour amplifier le signal « glucose ». La quantité de Rag4-TAP observée et sa répartition dans les fractions « membranes lourdes » (membrane plasmique + membranes des organelles) et « membranes légères » sont similaires entre la souche *WT* et la souche $\Delta Klhxk$. La même expérience a été réalisée dans des souches où *RAG4* est surexprimé et a donné des résultats similaires (non présentés). Ces résultats et ceux de la Figure 5C de la Publication montrent

que la présence de glucose est nécessaire à la déstabilisation de Rag4 dans un mutant glycolytique. Ceci nous a conduits à émettre l’hypothèse que le signal qui provient de la glycolyse et qui contrôle la stabilité de Rag4 est constitué par le glucose ou un produit dérivé de son métabolisme. Ce point sera discuté par la suite.

3. a. v. Conclusion - Effet de la délétion de l’hexokinase sur la signalisation du glucose chez *K. lactis*

Les résultats présentés dans la publication et ceux ajoutés ici ont permis l’élaboration d’un modèle pour comprendre comment la signalisation du glucose est régulée lorsque l’hexokinase est délétée chez *K. lactis*. Ce modèle est schématisé dans la Figure 37.



phénotype Rag⁻ : incapacité de croître par fermentation en présence de glucose

Figure 37: Chez *K. lactis*, la glycolyse contrôle la stabilité du capteur de glucose Rag4 afin de réguler la signalisation du glucose. Représentation schématisée de l’état de la signalisation du glucose dans un mutant $\Delta Klhxk$ en présence de glucose chez la levure *K. lactis*.

Lorsque la glycolyse n’est pas fonctionnelle, comme dans un mutant de l’hexokinase, en présence de glucose, le capteur de glucose Rag4 est délocalisé et probablement dégradé dans la vacuole (Publication, Figure 5). Il n’est plus ou très faiblement présent à la membrane plasmique. Comme il a été souligné précédemment, la présence de glucose et l’absence de *Klhxk* sont nécessaires à la déstabilisation de Rag4, puisque en absence de glucose il n’y a pas de différence de quantité et de répartition de Rag4 entre un mutant $\Delta Klhxk$ et la souche sauvage (voir Publication, Figure 5A, 5B et 5D, et Figure 36).

Chez *K. lactis*, la surexpression de *RAG4* grâce au promoteur *P_{SCGAL1}* entraîne une augmentation de l’expression de *RAG1* par un facteur 3,5 dans une souche sauvage et dans un mutant de l’hexokinase (Figure 32). Chez *S. cerevisiae*, la surexpression des gènes des capteurs de glucose *RGT2* et *SNF3* entraîne l’expression constitutive des gènes des

perméases au glucose *HXT1* et *HXT2* (Özcan et al., 1998). Cependant, l'induction de *HXT1* reste sensible au glucose qui augmente d'environ 10 fois son expression. Chez *K. lactis*, l'expression de *RAG1* quand *RAG4* est surexprimé n'a pas été mesurée en absence de glucose dans le milieu. Toutefois l'observation de l'état post-traductionnel des répresseurs Sms1 et *K/Rgt1* indique que la voie de signalisation du glucose n'est pas complètement activée par la surexpression de *RAG4* lorsque les cellules sont cultivées en présence de glycérol comme source de carbone (Figure 33 et Figure 34). Un effet est principalement observé sur la dégradation de Sms1 dans un mutant de l'hexokinase après ajout de glucose (Figure 33). Pour être dégradé, Sms1 doit être phosphorylé suite à l'activation de Rag8 par Rag4. Or, très peu de Rag4 est présent à la membrane plasmique dans un mutant de l'hexokinase cultivé en présence de glucose (Publication, Figures 5B et 5D et Figure 35). Ces résultats suggèrent que le signal glucose responsable de la dégradation de Sms1 pourrait être généré même lorsque Rag4 est très peu présent à la membrane plasmique. La surexpression de *RAG4* conduirait à une quantité de Rag4 membranaire suffisante pour transmettre un signal glucose de faible intensité, ceci malgré les processus de dégradation de Rag4 mis en place lorsque la glycolyse n'est pas fonctionnelle. Lorsque *RAG4* est exprimé sous le contrôle de son promoteur endogène dans un mutant $\Delta K/hxk$, le corépresseur Sms1 est également légèrement dégradé après ajout de glucose au milieu (Publication, Figure 2C). Ainsi, dans un mutant glycolytique, toute la machinerie de signalisation du glucose serait fonctionnelle excepté le senseur du glucose Rag4. La régulation de la stabilité de Rag4 constituerait un moyen de réguler finement la signalisation du glucose selon les capacités de la cellule à métaboliser le glucose via la glycolyse.

3. b. Utilisation d'inhibiteurs chimiques de la glycolyse chez *K. lactis*

Pour définir si l'effet de la glycolyse sur la signalisation du glucose est dû à l'absence de l'hexokinase, à un effet adaptatif des souches utilisées ou réellement à la rupture du flux glycolytique, nous avons utilisé des inhibiteurs chimiques de la glycolyse pour confirmer et renforcer nos résultats.

L'effet de l'iodoacétate sur la signalisation du glucose a été décrit dans la publication. Certains résultats mentionnés mais non montrés dans la publication sont exposés ici, notamment les expériences de mise en place de l'utilisation d'inhibiteur de la glycolyse chez *K. lactis*.

3. b. i. Choix des différentes drogues : test du phénotype Rag en halo

Nous avons sélectionné dans la littérature plusieurs drogues inhibitrices de la glycolyse chez la levure *S. cerevisiae* et nous avons testées leurs effets sur *K. lactis*. Ces drogues sont l'iodoacétate (IA), inhibiteur de la GAPDH (Webb, 1966), le fluorure de sodium (NaF), inhibiteur de l'énolase (Silveira et al., 1996), et deux inhibiteurs de l'hexokinase : le 2-déoxyglucose (2DG) (Ralser et al., 2008) et le 3-bromopyruvate (3BrPA) (Lis et al., 2012). A

notre connaissance, aucune d'entre elles n'avait été utilisée chez *K. lactis* comme inhibiteurs de la glycolyse. Cependant, le 2DG avait été utilisé auparavant comme analogue du glucose chez *K. lactis* (Royt, 1983; Weirich et al., 1997; Betina et al., 2001; Rigamonte et al., 2011), et le NaF est couramment utilisé en laboratoire comme inhibiteur de phosphatases pour la préparation d'extraits protéiques.

La capacité de ces drogues à inhiber la glycolyse a été analysée par un test en halo du phénotype Rag, en utilisant différentes concentrations de drogues. Le test Rag en halo pour l'iodoacétate (IA) est montré dans la Figure 3 de la publication. Le test pour les autres drogues est présenté dans la Figure 38 ci-dessous.

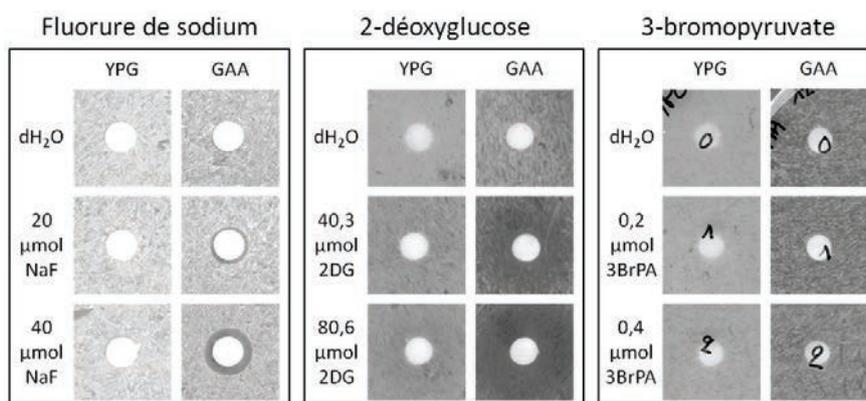


Figure 38: Aux concentrations testées, le fluorure de sodium provoque un phénotype Rag⁻ plus important que le 2-déoxyglucose chez *K. lactis*, au contraire du 3-bromopyruvate. Un test Rag en halo a été réalisé pour ces trois drogues. La souche MWL9S1 a été étalée sur boîte YPG ou GAA avant ajout des disques et des différentes drogues à tester. Les boîtes ont été incubées 48 h à 28°C puis photographiées.

L'ajout de 20 μmol de fluorure de sodium (NaF) entraîne un phénotype Rag⁻. Le 2-déoxyglucose (2DG) provoque également une inhibition de croissance sur milieu GAA mais la réponse n'est pas aussi nette : on observe seulement une zone de ralentissement de la croissance avec 40 et 80 μmol. Le 3-bromopyruvate (3BrPA) ne produit pas de phénotype Rag⁻ avec 0,2 à 0,4 μmol. Il n'a pas été utilisé par la suite.

L'effet de l'inhibition de la glycolyse par le NaF sur la signalisation du glucose a été testé via l'analyse de l'état de phosphorylation de *K/Rgt1* et la stabilité de *Sms1*. Les résultats se sont révélés peu reproductibles et le NaF n'a pas été retenu pour des études plus approfondies. L'utilisation du 2DG comme inhibiteur de la glycolyse ne s'est pas révélée être un bon outil pour notre étude : son effet varie selon la concentration de glucose présent dans le milieu. En absence de glucose, il semble même être capable d'activer la voie de signalisation du glucose dans certains cas. Seul l'IA a été utilisé pour la suite de l'étude comme inhibiteur chimique de la glycolyse.

3. b. ii. Détermination des conditions optimales d'utilisation de l'inhibition de la glycolyse par l'iodoacétate

Avant de réaliser les différentes expériences avec inhibition de la glycolyse par l'iodoacétate, les conditions optimales d'utilisation de la drogue ont été déterminées. Différents tests non présentés ici ont permis de déterminer que la concentration optimale de l'iodoacétate pour

inhiber la glycolyse sans affecter notablement la croissance cellulaire est de 0,25 mM. Des courbes de croissance ont été réalisées en milieu YPG + IA, dans des tubes de culture contenant 5 ml de milieu. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 39).

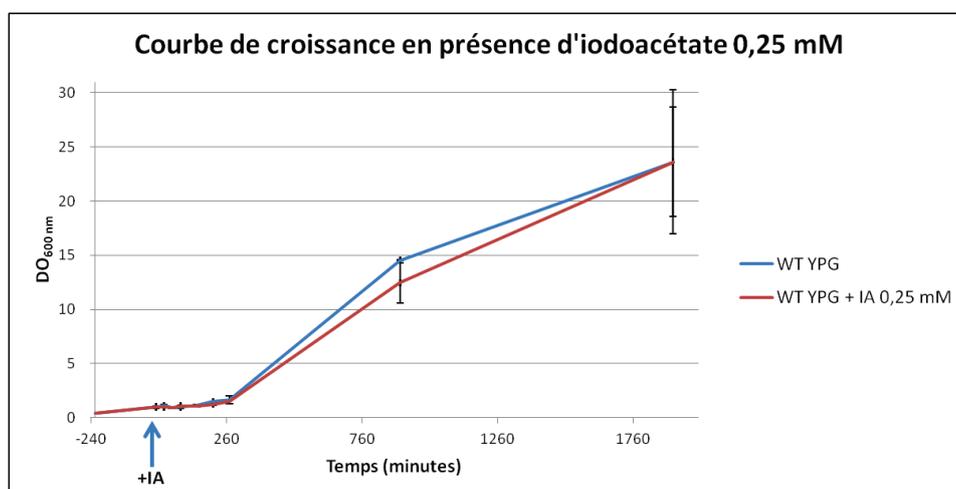


Figure 39: L'iodoacétate 0,25 mM a peu d'effet sur la croissance de la levure *K. lactis* en milieu riche. Les courbes de croissance de deux souches sauvages (MWL9S1 : WT et MWL1099 : *KIRGT1-3HA*) en présence d'IA 0,25 mM ont été réalisées en mesurant la DO_{600 nm}. Les souches ont été ensemencées à DO_{600 nm}=0,4 dans 5 ml de milieu YPG. Après 4 h de croissance, 0,25 mM d'IA ont été ajoutés au milieu (t=0). La moyenne de la DO_{600 nm} des deux souches est représentée sur le graphique, ainsi que les écarts-type correspondant.

L'ajout de 0,25 mM d'IA ne provoque pas de retard de croissance pour la souche sauvage. La toxicité de l'IA varie énormément en fonction du pH : une variation de 0,5 unité de pH du milieu de culture peut faire changer la sensibilité de la drogue (Webb, 1966).

Pour la suite de l'étude, la concentration 0,25 mM a été utilisée : elle ne provoque pas d'inhibition de la croissance dans les conditions utilisées pour les cultures, elle semble suffisante pour induire un phénotype Rag⁻ et le traitement à l'IA 0,25 mM donnent des résultats intéressants sur l'état post-traductionnel de *K/Rgt1* et *Sms1* (Publication, Figure 3). Cependant, une courbe de croissance en milieu synthétique (plus acide que le milieu YPG) en présence d'iodoacétate n'a pas été réalisée et aurait pu être informative pour la suite de l'étude, car certaines des expériences ont été réalisées en milieu synthétique.

Pour mieux comprendre et ajuster les conditions d'utilisation de l'IA, nous avons voulu déterminer la réversibilité du traitement. Chez les mammifères il est connu que le traitement à l'IA est irréversible (Pirolo and Allen, 1986). Nous avons voulu déterminer si c'est aussi le cas chez la levure *K. lactis*. Pour cela, les cellules ont été exposées à la drogue pour 30 ou 120 minutes avant de changer leur milieu de culture pour les resuspendre dans du milieu de culture frais sans drogue. L'état post-traductionnel de *Sms1-13myc* et *K/Rgt1* a été analysé par Western blot et immunodétection (Figure 40).

L'accumulation de *Sms1-13myc* est observée en milieu SG après 30 ou 120 minutes de traitement par 0,25 mM IA, comme dans la Figure 3 de la Publication. Pour *K/Rgt1*, l'anticorps dirigé directement contre la protéine a été utilisé (pas d'étiquette). Le motif détecté varie un peu de celui obtenu avec *K/Rgt1-3HA* et l'anticorps anti-HA : ici un doublet

est visible (Figure 40). La répartition de l'intensité du signal varie entre les deux bandes selon l'état de phosphorylation de *K/Rgt1*. Dans les résultats présentés, on observe toujours les deux bandes après 30 minutes de traitement, mais avec une intensité accrue pour la bande inférieure qui correspond à l'état faiblement phosphorylé de *K/Rgt1*. Après 120 minutes de traitement, on observe plus clairement une déphosphorylation (disparition de la bande supérieure, Figure 40).

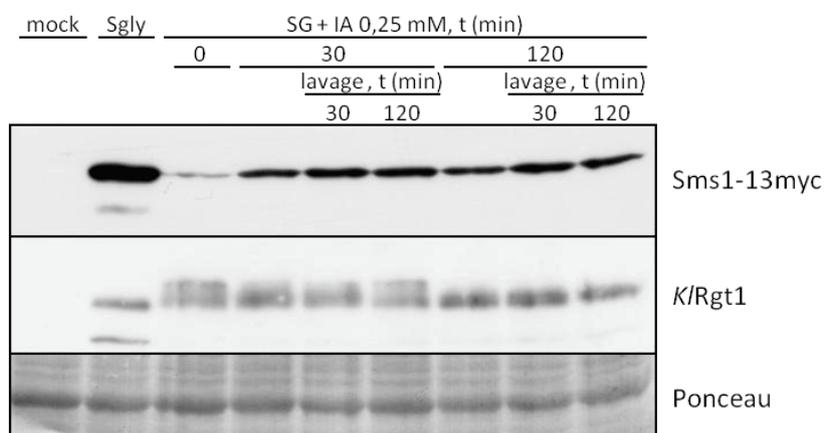


Figure 40: Le traitement à l'iodoacétate 0,25 mM n'est pas réversible chez *K. lactis*. Les souches MWK7 ($\Delta Klrp1$, mock) et MLK199 (*SMS1-13myc*) ont été cultivées en milieu Sgly ou SG jusqu'à la phase exponentielle de croissance. La culture en milieu SG a été séparée en 1/7 et deux fois 3/7. Les deux fractions de 3/7 ont été traitées avec de l'IA 0,25 mM pour 30 ou 120 minutes. Après traitement à l'IA, la culture a été stoppée pour un tiers de chaque culture et les 2/3 restants ont été lavées, séparés en deux et resuspendues dans du milieu SG frais sans IA pour 30 ou 120 minutes. Les cellules ont été collectées et lysées selon le protocole de Kushnirov et les protéines ont été analysées par Western blot et immunodétection de Sms1-13myc (anti-c myc) et *K/Rgt1* (anti-*K/Rgt1*). La membrane a été colorée au rouge Ponceau pour constituer un témoin de charge protéique.

Dans la Figure 40, l'accumulation de Sms1-13myc est observée avec la même intensité après traitement à l'IA et resuspension dans du milieu frais pour tester la réversibilité. De la même manière, le niveau de phosphorylation de *K/Rgt1* ne change pas après lavage de l'échantillon traité à l'IA. Ces résultats montrent que dans les conditions testées, le traitement avec 0,25 mM IA n'est pas réversible, conformément à ce qui a été décrit dans la littérature chez les mammifères.

3. b. iii. Effet de l'iodoacétate sur l'expression du gène de la perméase au glucose *RAG1* et des autres gènes impliqués dans la signalisation du glucose

Les résultats présentés dans la Figure 3 de la Publication ont montré que l'IA a un effet rapide sur la signalisation du glucose. Après l'ajout d'IA dans un milieu contenant du glucose, les répresseurs transcriptionnels retrouvent un état post-traductionnel proche de celui observé en absence de glucose : stabilisation partielle de Sms1 en 5 minutes et déphosphorylation de *K/Rgt1* en 10 minutes. Cela correspond à un état dans lequel la répression de leurs gènes-cibles est active et devrait se traduire par une diminution de l'expression de *RAG1*. Pour confirmer ceci, l'effet de l'IA sur l'expression du gène *RAG1* a été analysé par qRT-PCR. Au cours de cette analyse, l'expression des autres gènes codant pour des régulateurs de la signalisation du glucose a également été analysée (Figure 41).

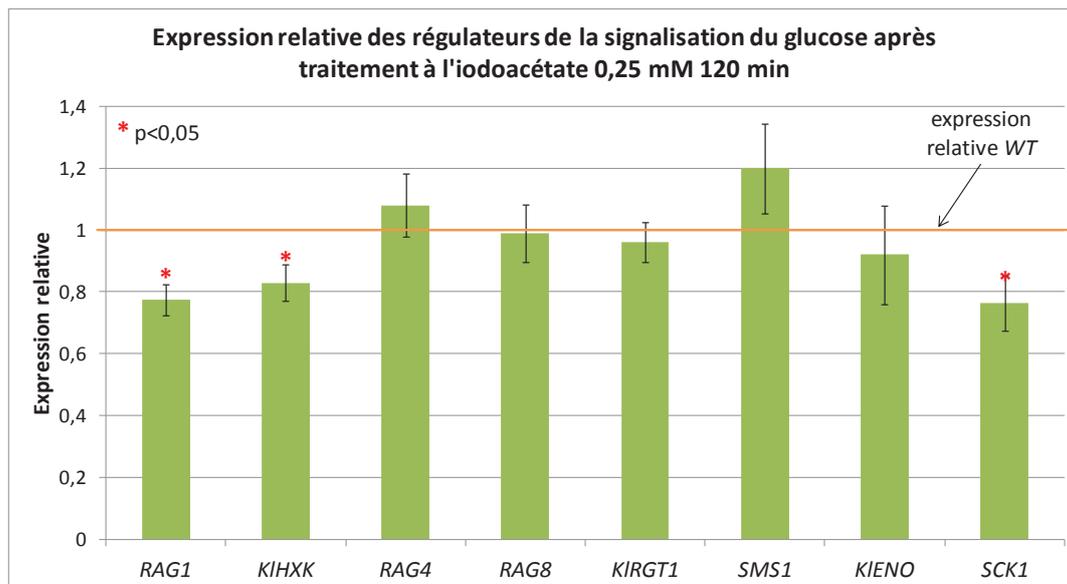


Figure 41: Le traitement à l'iodoacétate n'affecte pas l'expression relative des régulateurs de la signalisation du glucose. Les résultats ont été obtenus par qRT-PCR à partir de la souche MW270-7B (WT) cultivée en milieu YPG, avec ou sans traitement à l'IA 0,25 mM pendant 120 minutes. Les niveaux d'expression relative ont été normalisés par rapport au transcrite *KIAC1*. Les expressions sont exprimées relativement à la souche sauvage non traitée dont le niveau d'expression est fixé à 1 et représenté par la ligne orange. Les expressions relatives sont les moyennes de trois réplicats biologiques indépendants et les déviations standards sont représentées pour chaque échantillon. La signification statistique a été déterminée en calculant les p-values avec un test t de Student et est représentée par des astérisques.

L'expression de *RAG1* est diminuée de 20 % après 2 h de traitement à l'IA. Bien que cette diminution soit statistiquement significative, son amplitude n'est pas forcément biologiquement significative. L'expression des différents régulateurs de la signalisation du glucose ne varie pas après traitement à l'IA, sauf celle de *KIHXX* et *SCK1*, qui sont aussi sous-exprimés de 20 % environ (avec $p < 0,05$). Globalement, l'inhibition de la glycolyse par l'IA ne semble pas affecter l'expression des gènes glycolytiques ni celle des régulateurs de la signalisation du glucose. Malgré l'effet observé sur les répresseurs *KIRgt1* et *Sms1*, ce résultat ne confirme pas l'hypothèse d'une répression des gènes régulés par *KIRgt1* en présence d'IA. On peut envisager plusieurs possibilités pour expliquer ce résultat :

- Le traitement à l'IA était trop court ou trop peu concentré pour induire un changement de l'expression génique, mais ne coïncident pas avec les résultats obtenus pour les répresseurs *KIRgt1* et *Sms1*.
- Les ARNs mesurés correspondent en fait aux ARNs synthétisés avant traitement à l'IA, si leur stabilité est supérieure à 2 h.
- La légère baisse du niveau d'expression de *RAG1*, *KIHXX* et *SCK1* est biologiquement significative : l'IA a un effet transcriptionnel en activant les répresseurs *KIRgt1* et *Sms1* mais la répression de *RAG1* est de seulement 20 %.

Pour tenter de répondre à ces questions et analyser plus en détail l'effet de l'IA sur la perméase au glucose, nous nous sommes ensuite intéressés à la protéine Rag1.

3. b. iv. Effet de l'iodoacétate sur la quantité et la localisation de la perméase au glucose Rag1

Pour déterminer si l'IA a un effet sur Rag1 au niveau protéique, nous avons utilisé des souches dans lesquelles *RAG1* est fusionné à la *GFP* pour observer en microscopie à fluorescence la quantité et la localisation de Rag1-GFP en présence d'IA (Figure 42).

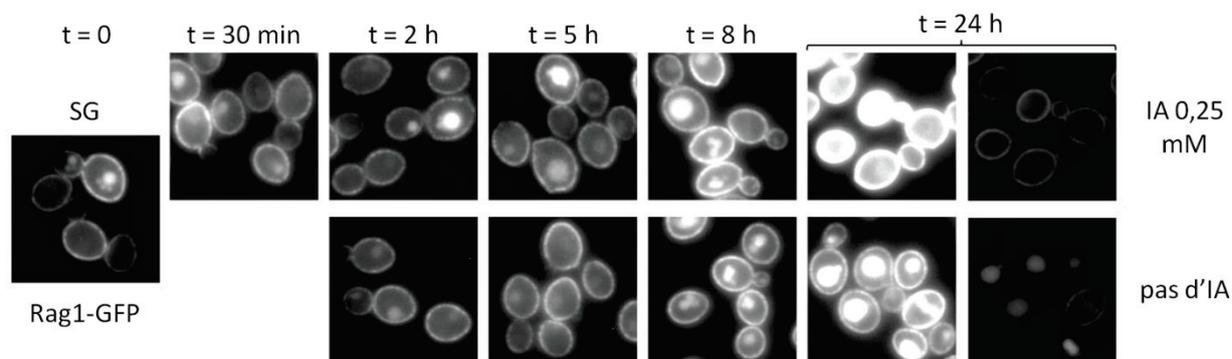


Figure 42: Le traitement à l'iodoacétate 0,25 mM entraîne l'internalisation précoce de Rag1-GFP. La souche KIAS61 (*RAG1-GFP*) a été cultivée dans du milieu SG jusqu'en phase exponentielle puis séparée en deux à t = 0, une moitié a été traitée à l'IA (IA 0,25 mM), l'autre non (pas d'IA). Rag1-GFP a été observé aux différents temps indiqués à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'un filtre GFP. Le temps d'exposition est le même pour chaque image, sauf pour t = 24 h où la deuxième photo a un temps d'exposition inférieure. Les images présentées ont été traitées par Photoshop. Pour chaque temps, les images sont représentatives de l'ensemble de l'échantillon.

En absence d'IA, on observe progressivement une internalisation de Rag1-GFP avec une augmentation du signal fluorescent dans la vacuole. L'internalisation de Rag1-GFP est probablement une conséquence de la diminution de la concentration en glucose dans le milieu : lorsque Rag1 n'est plus nécessaire, il est internalisé. Le traitement avec 0,25 mM IA ne semble pas diminuer la quantité de Rag1-GFP mais plutôt activer légèrement son internalisation dans certaines cellules (t = 2 et 5 h). Cependant, à t = 8 h, la localisation de Rag1-GFP est similaire avec et sans traitement, alors qu'après 24 h de traitement, la quantité de Rag1-GFP est plus importante avec traitement à l'iodoacétate et une relocalisation membranaire de la protéine est observée. Ces observations sont difficiles à interpréter et à mettre en relation avec les autres résultats concernant l'effet de l'iodoacétate sur la signalisation du glucose. Toutefois, on peut imaginer que l'IA inhibe la signalisation du glucose grâce à un faible effet transcriptionnel sur *RAG1* et une internalisation de la perméase Rag1. Le glucose présent dans le milieu ne serait plus transporté par Rag1 et sa concentration décroîtrait moins vite que dans la culture sans traitement. Après 24 h de traitement, l'IA restant dans le milieu pourrait être dégradé (Webb, 1966) et permettre à la cellule d'utiliser à nouveau Rag1 pour transporter puis métaboliser le glucose restant dans le milieu. Mais cette explication ne prend pas en compte l'observation précédente selon laquelle le traitement à l'IA est irréversible (Figure 40). Toutefois, l'irréversibilité a été montrée après seulement 2 heures sans IA : on ne sait pas ce qu'il advient après 24 heures.

Les observations de Rag1 qui ont été réalisées d'une part avec un mutant de l'hexokinase (Figure 30), et d'autre part avec inhibition chimique de la glycolyse par l'IA (Figure 42) sont difficilement comparables. En effet, on observe soit l'effet de l'ajout de 2 % de glucose à un milieu dont la source de carbone est le glycérol (Figure 30), soit l'effet du traitement à l'IA

0,25 mM dans un milieu dont la source de carbone est le glucose (Figure 42). Dans un cas on observe un effet transcriptionnel : l'induction (ou l'absence d'induction) de l'expression de *RAG1-GFP* (Figure 30), et dans l'autre on observe un effet post-traductionnel : la localisation membranaire ou l'internalisation de Rag1-GFP (Figure 42). Cependant, à partir de situations de départ différentes, ces deux processus de régulation ont une fin similaire : stopper le transport du glucose quand la glycolyse n'est pas fonctionnelle.

Pour mieux comprendre les mécanismes d'action de l'IA sur la signalisation du glucose, l'étude de son effet sur les autres régulateurs de la signalisation du glucose (Rag8, Rag4) a été approfondie.

3. b. v. Effet de l'iodoacétate sur la quantité et la localisation de la caséine kinase de type I Rag8

Dans la publication, l'effet de l'inhibition de la glycolyse par l'IA a été analysé sur les répresseurs transcriptionnels *K/Rgt1* et *Sms1* et sur Rag4 (Publication, Figure 3 et Figure 5E). Les résultats concernant la caséine kinase de type I Rag8 après traitement à l'iodoacétate sont montrés ci-dessous (Figure 43).

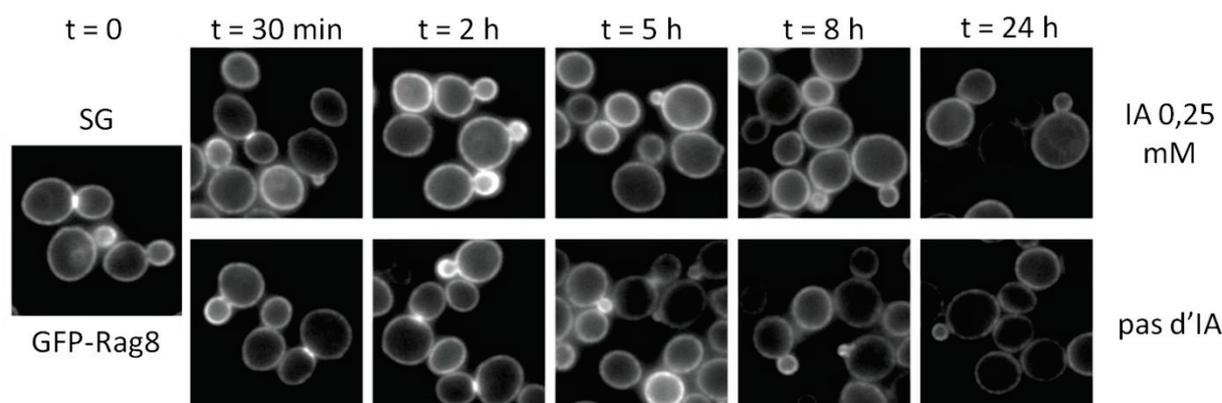


Figure 43: Le traitement à l'iodoacétate n'affecte ni la localisation ni la quantité de GFP-Rag8. La souche KIAS93 a été cultivée dans du milieu SG jusqu'en phase exponentielle puis séparée en deux à t = 0, une moitié a été traitée à l'IA (IA 0,25 mM), l'autre non (pas d'IA). Les observations de GFP-Rag8 à différents temps après ajout d'IA ont été réalisées au microscope à fluorescence avec le filtre GFP. Le temps d'exposition est le même pour chaque image. Les images ont été traitées par Photoshop. Pour chaque temps, les images sont représentatives de l'ensemble de l'échantillon.

La localisation cellulaire et la quantité de GFP-Rag8 observées au cours du temps ne varient pas, que ce soit en présence d'IA 0,25 mM ou non. Ainsi, l'inhibition de la glycolyse par l'IA ne semble pas affecter Rag8, tout comme la protéine Rag8 n'est pas affectée dans un mutant de l'hexokinase (Publication, Figure 4). Cependant, ni l'activité kinase intrinsèque de Rag8 (essai kinase), ni sa capacité à interagir avec le senseur Rag4 (co-immunoprécipitation) n'ont été analysées après traitement à l'IA.

3. b. vi. Effet de l'inhibition de la glycolyse par l'iodoacétate sur la stabilité du senseur au glucose Rag4

Comme montré précédemment, l'inhibition aigue de la glycolyse par l'IA provoque l'internalisation de GFP-Rag4 dans la cellule (Publication, Figure 5E). Afin de confirmer ces résultats, des expériences de séparation de membranes par ultracentrifugation pour observer la répartition de Rag4-TAP entre les fractions « membranes lourdes » et « membranes légères » après traitement à l'iodoacétate ont été réalisées (Figure 44). Ici *RAG4-TAP* est exprimé sous le contrôle de son propre promoteur, alors que dans les souches utilisées pour la microscopie *GFP-RAG4* est exprimé sous le contrôle du promoteur *ScGAL1*.

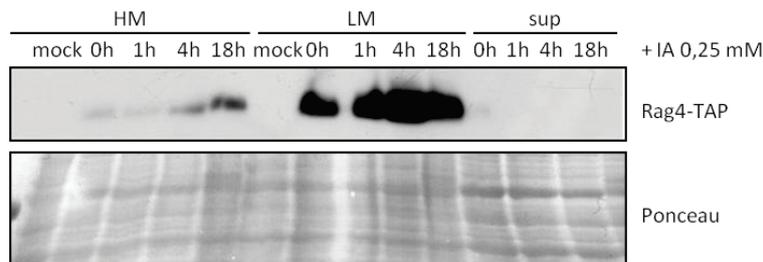


Figure 44: La répartition membranaire de Rag4-TAP ne varie pas après traitement à l'iodoacétate. Les souches MWL9S1 (mock) et MLK239 (*RAG4-TAP*) ont été cultivées dans un milieu SG jusqu'en phase exponentielle de croissance avant addition d'IA 0,25 mM à t = 0. Les cellules ont été prélevées avant traitement, puis après 1 h, 4 h ou 18 h. Les cellules ont été lysées dans du tampon MOPS, et les fractions membranaires « membranes lourdes » (HM) et « membranes légères » (LM) ont été séparées par ultracentrifugation. Les protéines solubles ont été précipitées pour constituer la fraction « sup ». Rag4-TAP a été immunodéecté (anti-protéine A) après séparation des protéines par SDS-PAGE et Western blot. La membrane a été colorée au rouge Ponceau pour constituer un témoin de la charge protéique.

La quantité de Rag4-TAP et sa distribution entre les fractions « membranes lourdes » et « membranes légères » ne changent pas au cours du temps après traitement à l'IA 0,25 mM (la plus forte quantité de Rag4-TAP dans la fraction HM à t = 18 h est due à une plus forte charge protéique montrée par la coloration au rouge Ponceau). Une diminution de la mobilité électrophorétique de Rag4-TAP est observée après 18 h de traitement ; la raison de ce changement de mobilité électrophorétique n'est pas connue. Cependant, cette expérience a été réalisée une seule fois dans ces conditions et aucun contrôle parallèle sans traitement n'a été réalisé après 18 h de croissance : ce changement pourrait être une modification post-traductionnelle due soit à l'appauvrissement du milieu après 18 h de croissance, soit un effet de l'IA.

La même expérience que celle présentée en Figure 44 a été reproduite avec une souche exprimant *3HA-RAG4* sous le contrôle de *P_{ScGAL1}* (MLK191). Les résultats obtenus ne sont pas présentés car ils sont similaires à ceux obtenus avec Rag4-TAP : pas de modification de la répartition entre membranes « lourdes » et « légères » mais changement de la mobilité électrophorétique après 18 h de traitement.

3. b. vii. Conclusion - Utilisation de l'iodoacétate comme inhibiteur chimique de la glycolyse chez *K. lactis*

Suite au peu d'effet ou de reproductibilité des résultats obtenus avec le fluorure de sodium, le 2-déoxyglucose et le 3-bromopyruvate, nous avons choisi de continuer notre étude seulement avec l'iodoacétate comme inhibiteur de la glycolyse. Pour le fluorure de sodium, le manque de reproductibilité des résultats s'explique peut-être par l'inhibition croisée des phosphatases et de l'énolase, sans que l'on sache quelle est l'inhibition prédominante. Le 2-déoxyglucose étant à la fois un analogue du glucose et un inhibiteur de l'hexokinase, son effet est dépendant de la concentration en glucose extracellulaire : il semble avoir la capacité d'activer ou d'inhiber la signalisation du glucose selon la quantité de glucose disponible (résultats non présentés). Enfin, concernant le 3-bromopyruvate, l'absence de phénotype Rag^- sur *K. lactis* est assez surprenante. En effet, le 3BrPA inhibe l'hexokinase chez *S. cerevisiae*. La drogue est transportée par la perméase de lactate/pyruvate Jen1 chez *S. cerevisiae* (Lis et al., 2012) et ce gène est conservé en deux exemplaires chez *K. lactis* (Lodi et al., 2004). Cependant chez *S. cerevisiae*, le 3BrPA a été utilisé à des concentrations plus élevées que dans notre test : entre 1 et 2 mM avec une concentration minimale inhibitrice de croissance à 1,95 mM (Lis et al., 2012), contre 0,2 à 1 mM pour *K. lactis* dans nos tests. Le manque d'inhibition est peut-être simplement dû à une concentration trop faible de 3BrPA.

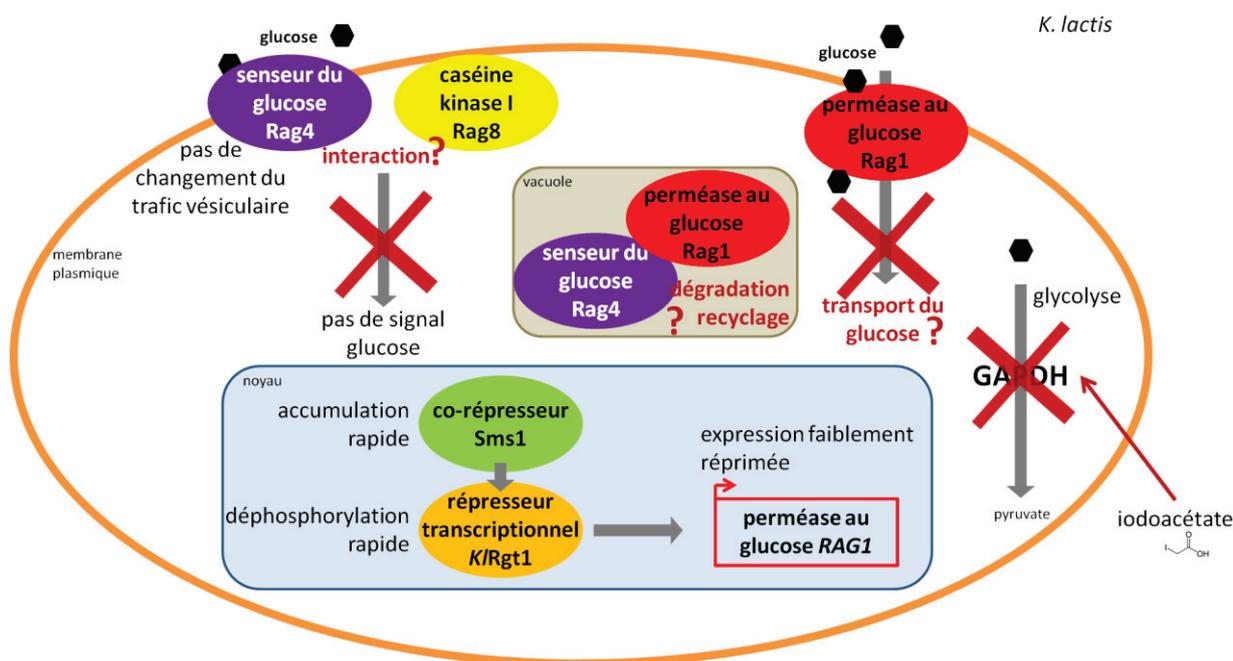


Figure 45: L'iodoacétate inhibe la glycolyse chez *K. lactis* et affecte la signalisation du glucose au niveau des répresseurs transcriptionnels Sms1 et K/Rgt1. Représentation schématique de l'effet de l'IA sur la signalisation du glucose chez la levure *K. lactis*.

Nous avons affiné les conditions d'utilisation de l'iodoacétate : l'ajout d'IA 0,25 mM dans un milieu contenant du glucose a été retenu. L'IA a déjà été utilisé chez *S. cerevisiae* à des concentrations supérieures (1 mM) (Newcomb et al., 2003), mais nous avons préféré utilisé une concentration plus basse pour obtenir un effet sur la glycolyse plus spécifique (Webb,

1966). Cependant, le choix d'autres conditions d'utilisation de l'IA aurait pu faciliter la comparaison entre IA et délétion $\Delta Klhxk$. Par exemple, les conditions de culture suivantes : milieu dépourvu de glucose (Sgly par exemple) puis ajout d'IA 0, 25 mM pour 30 minutes et stimulation des cellules avec du glucose 2 % pour encore 30 minutes auraient été plus proches de celles utilisées pour étudier le mutant $\Delta Klhxk$. Le phénotype provoqué par l'IA sur *K. lactis* a été déterminé : phénotype Rag⁻ et irréversibilité des effets. Enfin des informations ont été générées sur l'effet de l'inhibition chimique de la GAPDH par l'IA sur la signalisation du glucose (Figure 45). L'IA entraîne un effet rapide sur les répresseurs transcriptionnels de *RAG1* : accumulation de Sms1 et déphosphorylation de *K/Rgt1* (Publication, Figure 3). Cependant, l'IA ne provoque ni une forte répression de l'expression de *RAG1* (Figure 41) ni une forte dégradation de Rag4 (Publication, Figure 5E et Figure 44), contrairement à ce qui a été observé dans un mutant $\Delta Klhxk$.

Des zones d'ombre subsistent dans la compréhension des effets de l'inhibition de la glycolyse par l'IA sur la signalisation du glucose. Tout d'abord, il n'a pas été déterminé de manière directe si le transport du glucose est actif lorsque la GAPDH est inhibé par l'IA. L'effet transcriptionnel sur *RAG1* est encore mal compris, puisque les répresseurs transcriptionnels (*K/Rgt1*, Sms1) sont activés en présence d'IA, mais cela semble avoir un effet modéré sur l'expression des gènes qu'ils régulent (notamment *KIHXX*, *KIENO*, *RAG1*, *SMS1*, *SCK1*) (Figure 41). Ensuite, nous n'avons pas réussi à déterminer si l'interaction entre Rag4 et Rag8 est maintenue en présence d'IA (résultats non présentés). Enfin, l'effet sur les protéines membranaires Rag4 et Rag1 reste à éclaircir : pour les deux protéines, une augmentation du signal GFP vacuolaire en microscopie a été observée. Mais, pour Rag1, cela s'accompagne d'une présence continue à la membrane plasmique au cours du traitement, qui est mal expliquée (Figure 42). Pour Rag4, l'augmentation du signal fluorescent vacuolaire en microscopie est reliée à une baisse du signal à la membrane plasmique (Publication, Figure 5E) mais n'est pas reliée à un changement de la répartition de la protéine dans les différentes fractions membranaires (Figure 44) ce qui suggère que le trafic vésiculaire de Rag4 est stable. L'augmentation du signal fluorescent dans la vacuole peut être interprétée de plusieurs façons : soit les protéines Rag1 et Rag4 s'accumulent dans la vacuole sans être dégradées (défaut de recyclage ou de dégradation par le protéasome), soit au contraire le signal correspond à l'étiquette GFP après dégradation des protéines. Il a été montré chez *S. cerevisiae* que le transport du glucose peut être inhibé par la dégradation protéique des perméases Hxts sans que l'expression des gènes *HXTs* soit régulée : dans un mutant de la phospholipase C $\Delta plc1$ (Plc1 est requis pour le contrôle du niveau d'acétyl-CoA), la localisation des perméases au glucose Hxt1, 2 et 3 est perturbée (internalisation) alors que leur expression ne semble pas être affectée (Yoshida et al., 2011).

Ces mécanismes semblent partager certaines caractéristiques avec ceux qui contrôlent la signalisation du glucose chez un mutant glycolytique, mais des particularités diffèrent entre l'inhibition chimique et génétique. D'une part, *KIHXX* intervient probablement dans des voies différentes de la signalisation du glucose et la glycolyse, comme c'est le cas chez *S. cerevisiae* (régulation transcriptionnelle de la répression glucose). D'autre part, l'IA a d'autres cibles

que la GAPDH (lactate déshydrogénase, succinate déshydrogénase) et une activité réductrice des groupements thiols (Webb, 1966). Ainsi, il n'est pas étonnant que les effets sur la signalisation du glucose dus à la délétion $\Delta K/hxk$ ou à l'inhibition de la GAPDH par l'IA ne se recoupent pas complètement, mais ils restent comparables à certains niveaux (activation des répresseurs transcriptionnels, déstabilisation de Rag4).

3. c. Contrôle de la signalisation du glucose par la glycolyse chez *S. cerevisiae*

Nous avons démontré dans la publication et dans les résultats présentés ci-dessus que la glycolyse contrôle la signalisation du glucose chez la levure *K. lactis* en ciblant la stabilité du senseur du glucose Rag4. Nous avons également mis en évidence la conservation de ce mode de régulation chez la levure *S. cerevisiae*. Des résultats complémentaires à la publication sont présentés ci-dessous pour *S. cerevisiae*, d'une part en utilisant d'autres mutants glycolytiques, et d'autre part en utilisant l'inhibition chimique comme moyen de rompre le flux glycolytique.

3. c. i. Etude de la signalisation du glucose dans des mutants glycolytiques chez *S. cerevisiae*

Nous avons montré que la glycolyse affecte la signalisation du glucose chez *S. cerevisiae*. En effet, dans un double mutant $\Delta hxk1 \Delta hxk2$, la phosphorylation du répresseur ScRgt1 en réponse au glucose extracellulaire est affectée (même si elle n'est pas nulle) et son corépresseur Mth1 est partiellement stabilisé en présence de glucose (Publication, Figures 6A et 6B). Ainsi, la signalisation du glucose est affectée dans un mutant glycolytique chez *S. cerevisiae* comme chez *K. lactis*, même si le phénotype observé semble moins fort que chez *K. lactis* (notamment pour la phosphorylation de Rgt1). De plus, chez *S. cerevisiae*, la stabilité du senseur du glucose Rgt2 est également contrôlée par la glycolyse : en présence de glucose, sa quantité diminue fortement dans des extraits protéiques et sa localisation membranaire observée en microscopie à fluorescence est fortement affectée (Publication, Figures 6C et 6D).

Nous nous sommes intéressés à un autre mutant glycolytique pour vérifier que le contrôle de la glycolyse sur la signalisation du glucose n'est pas spécifique à l'hexokinase chez *S. cerevisiae*. Comme chez *K. lactis*, nous avons choisi un mutant d'une enzyme à l'autre bout de la voie glycolytique, l'énolase. Le double mutant $\Delta eno1 \Delta eno2$ a été utilisé, complété ou non par un plasmide qui porte le gène *ENO2*. La version complétée a une croissance normale en milieu glucose et est considérée comme une souche sauvage. Nous nous sommes d'abord intéressés à la phosphorylation de ScRgt1 en réponse au glucose extracellulaire dans un tel mutant (Figure 46).

Dans le mutant $\Delta eno1 \Delta eno2$ complété par le plasmide codant pour *ENO2*, la phosphorylation de ScRgt1-6HA en présence de glucose est observée, ce qui confirme que ce

mutant se comporte comme une souche sauvage. Lorsque le plasmide exprimant *ENO2* n'est pas présent, cette souche se comporte différemment : la phosphorylation induite par le glucose est moins importante et le niveau global de protéine ScRgt1-6HA est affecté, indépendamment de la présence de glucose dans le milieu extracellulaire. Ainsi, lorsque l'énolase n'est pas fonctionnelle, le niveau de protéine ScRgt1 et sa phosphorylation en réponse au glucose sont affectés, suggérant que la quantité de ScRgt1 est régulée soit au niveau protéique, soit au niveau transcriptionnel dans ce mutant $\Delta eno1 \Delta eno2$. La régulation de la quantité de ScRgt1 n'a jamais été décrite dans la littérature à notre connaissance. Des expériences de quantification de l'expression génique (qRT-PCR) seraient nécessaires pour déterminer si la transcription de *ScRGT1* est affectée, mais aussi et surtout si la transcription de *HXT1* est réprimée en présence de glucose dans ce mutant.

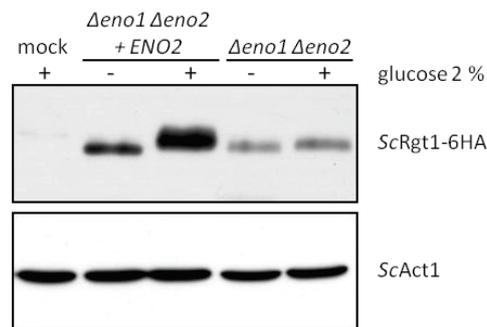


Figure 46: La phosphorylation de ScRgt1 est affectée dans un mutant de l'énolase chez *S. cerevisiae*. Les souches BY4742 (mock, WT) et $\gamma AS248$ ($\Delta eno1 \Delta eno2$, *RGT1-6HA::NatNT2* $\Delta eno1::KanMX4$ $\Delta eno2::HIS3$) transformée ou non avec le plasmide pRS416-ENO2 (+ *ENO2*) ont été cultivées dans un milieu riche YPGal, puis les cultures ont été séparées en deux et une moitié a subi une stimulation glucose (+ glucose 2 %) pendant 30 minutes. Ensuite, les extraits protéiques ont été préparés selon le protocole de Kushnirov et les protéines ont été séparées par SDS-PAGE. Après Western blot, ScRgt1-6HA a été immunodéecté avec des anticorps anti-HA et ScAct1 avec des anticorps anti-actine, pour constituer un contrôle de la charge protéique.

L'étude de la signalisation du glucose n'a pas été poursuivie dans ce mutant, bien qu'elle apporterait sans doute des éléments de réponse concernant les différents processus mis en place pour contrôler la signalisation du glucose lorsque la glycolyse n'est pas fonctionnelle chez *S. cerevisiae*.

3. c. ii. Inhibition chimique de la glycolyse chez *S. cerevisiae* par traitement à l'IA

Des résultats concernant la phosphorylation de ScRgt1, la stabilité de Mth1 et la localisation de Rgt2 après traitement à l'IA ont été montrés dans la publication. Les résultats concernant notamment l'expression du gène codant pour la perméase au glucose *HXT1* ainsi que la localisation de cette même perméase Hxt1 n'ont pas été montrés dans un souci de lisibilité et sont présentés ici.

- Test en halo du phénotype Rag pour l'iodoacétate chez *S. cerevisiae*

L'IA est couramment utilisé comme inhibiteur de la glycolyse chez *S. cerevisiae* (Webb, 1966; Dong and Xu, 2003; Newcomb et al., 2003). Nous avons testé sa capacité à inhiber la glycolyse chez *S. cerevisiae* dans nos conditions en réalisant un test en halo du phénotype

Rag en présence d'IA. Ce test nous a permis de comparer la sensibilité à l'IA de *K. lactis* et *S. cerevisiae* (Figure 47).

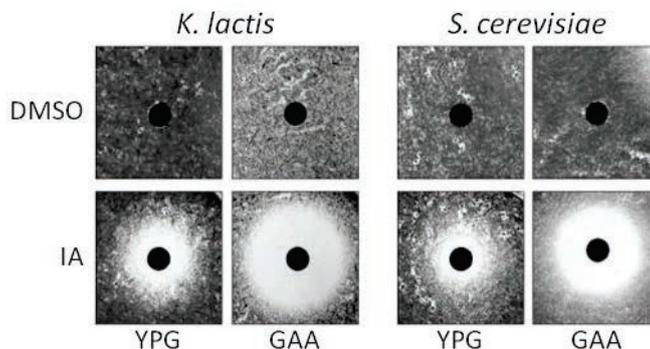


Figure 47: L'iodoacétate provoque un phénotype Rag⁻ chez *S. cerevisiae*. Un test en halo du phénotype Rag a été réalisé pour comparer la sensibilité de *K. lactis* et *S. cerevisiae* à l'IA. Des cultures à saturation de *K. lactis* (KIAS61, *RAG1-GFP*) et de *S. cerevisiae* (γ AS233, *HXT1-GFP*) ont été diluées au dixième et 100 μ l de chaque dilution ont été étalés sur milieu YPG ou GAA. 10 μ l d'IA 100 mM ou de DMSO (témoin négatif) ont été déposés sur les filtres. Les boîtes ont été photographiées après 48 h de croissance à 28°C.

S. cerevisiae montre une sensibilité moindre à l'IA par rapport à *K. lactis*. Toutefois, l'ajout d'IA sur un milieu GAA provoque un phénotype Rag⁻. Par la suite, l'IA a été utilisé comme inhibiteur de la GAPDH pour rompre le flux glycolytique chez *S. cerevisiae*, dans les mêmes conditions que celles utilisées pour *K. lactis*.

- Analyse de l'expression du gène de la perméase au glucose *HXT1* après traitement par l'IA

Une construction reportrice de l'expression de *HXT1* a été utilisée : le promoteur de *HXT1* a été cloné dans un plasmide en amont du gène *lacZ* codant pour la β -galactosidase. Ce plasmide (plasmide pBM3212) ou un plasmide vide (pRS415) ont été transformés dans une souche de levure WT. Les clones obtenus ont été utilisés pour réaliser un test d'activité de la β -galactosidase (Figure 48).

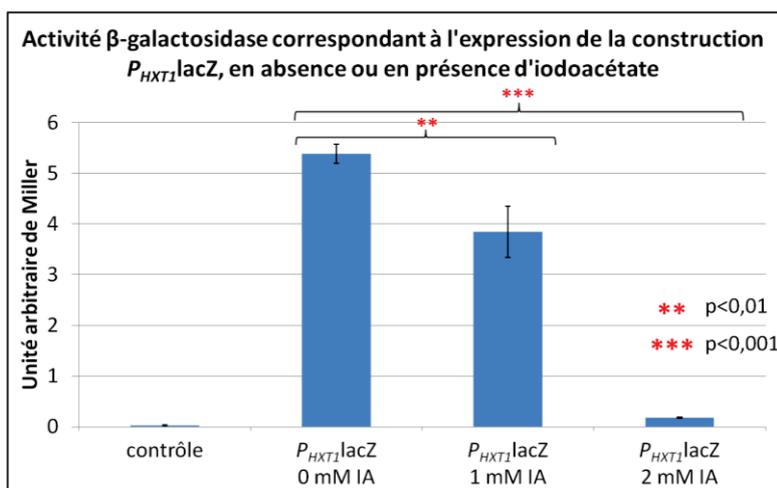


Figure 48: L'iodoacétate 1 mM entraîne une diminution de l'expression du gène de la perméase au glucose *HXT1*. Activité β -galactosidase correspondant à l'expression de la construction $P_{HXT1}lacZ$ (plasmide pBM3212) en absence ou en présence d'IA. Pour chaque condition, 4 clones indépendants de BY4742 + pRS415 ou BY4742 + pBM3212 ont été cultivés en milieu SG jusqu'en phase exponentielle. Les cultures ont été traitées avec 0, 1 ou 2 mM d'IA pendant 1 heure avant collecte des

cellules et réalisation d'un test de l'activité β -galactosidase sur cellules perméabilisées. Pour le traitement avec 2 mM IA, seulement 2 clones ont été utilisés. La signification statistique a été déterminée en calculant les p-values avec un test t de Student. Les astérisques au-dessus des accolades décrivent la différence statistiquement significative (p-value) entre les moyennes des deux échantillons désignés.

Les mesures de l'activité β -galactosidase montrent une répression du promoteur P_{HXT1} en présence d'IA : un traitement d'une heure avec 1 mM d'IA entraîne une répression de 30 %, le même traitement avec 2 mM d'IA provoque une répression de 97 %. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution, car 1) la concentration la plus faible qui a été testée est 1 mM : l'effet mesuré pourrait correspondre à la toxicité de l'IA plutôt qu'à l'inhibition de la GAPDH, mais cette concentration a déjà été utilisée chez *S. cerevisiae* et son effet semblait spécifique de la glycolyse (Newcomb et al., 2003), et 2) un contrôle utilisant un autre promoteur indépendant de la signalisation du glucose et des cibles potentielles de l'IA n'a pas été réalisé.

- Effet de l'iodoacétate sur la quantité et la localisation de la perméase au glucose Hxt1

Puisque l'inhibition de la glycolyse par l'IA entraîne une diminution de l'expression du gène de la perméase au glucose *HXT1* (Figure 48), mais aussi l'internalisation précoce de la perméase au glucose Rag1 chez *K. lactis* (Figure 42), nous avons analysé l'effet de l'IA sur la localisation de Hxt1. Pour cela, nous avons observé Hxt1-GFP par microscopie à fluorescence après ajout d'IA 0,25 mM dans un milieu de culture dont la source de carbone est le glucose (Figure 49).

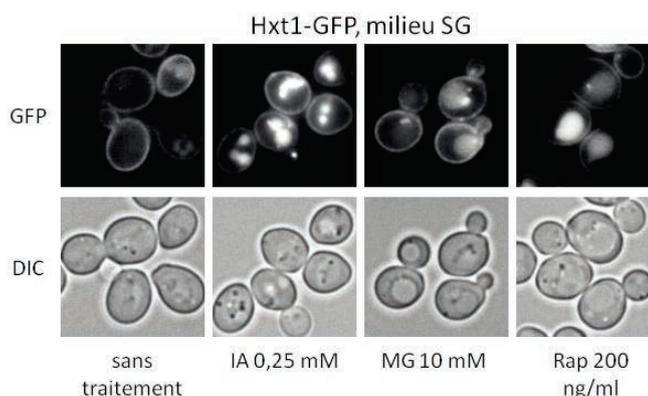


Figure 49: L'iodoacétate provoque l'internalisation de la perméase au glucose Hxt1-GFP. Une souche de levure *S. cerevisiae* *HXT1-GFP* (γ AS233) a été cultivée en milieu SG jusqu'à la phase exponentielle de croissance. Les cellules ont été traitées avec 0,25 mM d'IA, 10 mM de méthylglyoxal (MG), 200 ng/ml de rapamycine (Rap) ou avec de l'eau (sans traitement) pendant 2 h. Après traitement, Hxt1-GFP a été observé au microscope à fluorescence équipé d'un filtre GFP (GFP) et d'un optique Nomarski (DIC). Les images ont été traitées par Photoshop et sont représentatives de l'ensemble de l'échantillon observé. Le temps d'exposition est le même pour chaque image.

En présence de glucose, Hxt1-GFP est localisé principalement à la membrane plasmique. Après traitement à l'IA 0,25 mM, une forte accumulation dans des compartiments intracellulaires est observée. Le même type de phénotype est obtenu après traitement au méthylglyoxal (produit dérivé de la glycolyse) ou avec l'inhibiteur de TORC1, la rapamycine, tous deux connus pour provoquer l'endocytose de Hxt1 (Yoshida et al., 2011; Schmelzle et al., 2004). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus chez *K. lactis* pour Rag1, l'homologue

de Hxt1 (Figure 42). Ces observations indiquent que la glycolyse joue un rôle important dans le maintien de la localisation à la membrane plasmique des perméases au glucose de faible affinité Hxt1 et Rag1 chez les levures *S. cerevisiae* et *K. lactis*.

- Effet de l'iodoacétate sur la quantité de caséine kinase de type I Yck1

Chez *K. lactis*, nous avons vu que la stabilité et la quantité de la caséine kinase de type I Rag8 ne varient pas en fonction de la source de carbone, ni en fonction de l'activité de la glycolyse (Publication, Figure 4A). Cependant, une publication récente a montré que, chez *S. cerevisiae*, la quantité de la caséine kinase de type I Yck1 est régulée par la source de carbone (Reddi and Culotta, 2013), et qu'une fusion GFP-Yck1 est stable uniquement en présence de glucose. Nous avons voulu vérifier la quantité et la stabilité de Yck1 chez *S. cerevisiae*, en présence de glucose ou non, et lorsque la glycolyse est inhibée. Pour cela nous avons réalisé des cultures en présence de glucose (avec inhibition ou non de la glycolyse par traitement à l'IA) ou de galactose comme source de carbone, et nous avons détecté Yck1-YFP par Western blot (Figure 50).

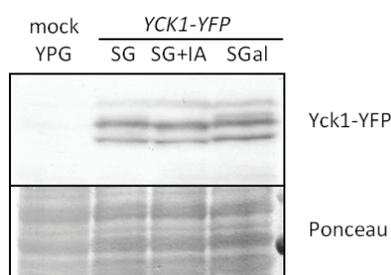


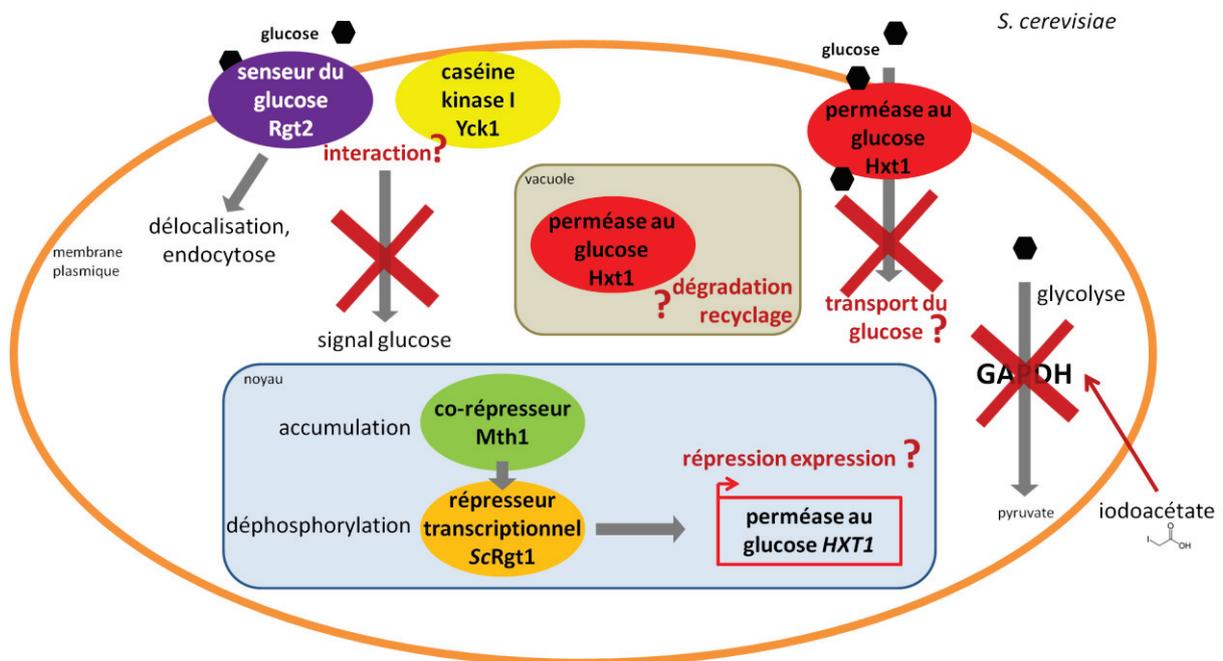
Figure 50: La stabilité de Yck1-YFP n'est pas affectée par la source de carbone ou l'inhibition de la glycolyse par l'iodoacétate. La souche BY4742 (*WT*) a été transformée avec pRS316 (mock) ou pRS316-YCK1-vYFP (*YCK1-YFP* exprimé sous son propre promoteur) et a été cultivée en milieu synthétique -ura contenant du glucose (SG) ou du galactose (SGal). Une fraction des cellules cultivées en milieu SG a été traitée à l'IA 0,25 mM 30 min. Les protéines totales ont été extraites selon le protocole de Kushnirov. Après séparation d'une même quantité d'extrait protéique par gel SDS-PAGE, l'abondance de Yck1-GFP a été analysée par Western Blot (anticorps anti-GFP). La membrane a été colorée au rouge Ponceau pour constituer un témoin de charge protéique. Les trois bandes immunodétectées correspondent vraisemblablement à un triplet Yck1-YFP.

La quantité de Yck1-YFP ne varie ni selon la source de carbone (glucose ou galactose), ni selon l'activité de la glycolyse (inhibition chimique par l'IA en présence de glucose), contrairement à ce qui a été décrit précédemment (Reddi and Culotta, 2013). En effet, selon les auteurs, un changement vers un milieu pauvre en glucose entraîne une dégradation de GFP-Yck1 en quelques heures : GFP-Yck1 est visible en présence de glucose et pas en galactose. Ici nous n'avons pas pu reproduire ces résultats avec Yck1-YFP en milieu SG et SGal. Cette différence de résultats pourrait être expliquée par l'utilisation d'un plasmide codant pour *YCK1-YFP* alors que la séquence sauvage de *YCK1* est présente dans le génome (Figure 50). Le contexte génétique n'est pas à mettre en cause puisque les deux laboratoires ont utilisé le même type de souche (BY4741 (Reddi and Culotta, 2013) et BY4742 pour nous).

Les résultats obtenus ici pour Yck1 concordent avec ceux obtenus pour Rag8 chez *K. lactis* (Publication, Figure 4, et Figure 43) et ne montrent pas de régulation de la stabilité des caséines kinases de type I par la glycolyse.

- Conclusion : l'IA affecte la signalisation du glucose chez *S. cerevisiae*

Les expériences réalisées montrent un effet similaire de l'IA sur la signalisation du glucose entre *S. cerevisiae* et *K. lactis*. Les résultats obtenus pour *S. cerevisiae* sont schématisés dans la Figure 51.



phénotype Rag^- : incapacité de croître par fermentation en présence de glucose

Figure 51: Chez *S. cerevisiae*, l'inhibition chimique de la glycolyse par l'iodoacétate affecte la signalisation du glucose et plus particulièrement le senser du glucose Rgt2 et les répresseurs transcriptionnels Mth1 et ScRgt1. Représentation schématique de l'effet de l'inhibition de la glycolyse par l'IA en présence de glucose chez *S. cerevisiae*. Pour les gènes qui ont un paralogue, seule la protéine sur laquelle l'effet de l'IA a été validé est représentée.

Comme chez *K. lactis*, le senser du glucose Rgt2 est délocalisé et probablement internalisé par endocytose après traitement à l'IA et ceci malgré la présence de glucose extracellulaire. L'effet sur le produit de son paralogue *SNF3* n'a pas été étudié. Des observations au microscope à fluorescence ont permis de détecter une accumulation dans la vacuole (Publication, Figure 7C), comme ce qui a été vu précédemment pour Rag4 chez *K. lactis* (Publication, Figure 5E).

Chez les deux espèces de levures, le traitement à l'IA ne semble pas perturber les caséines kinase de type I (pour *S. cerevisiae* : Yck1, Figure 50 ; Yck2 n'a pas été étudiée. Pour *K. lactis* : Figure 43). L'interaction entre les senseurs du glucose et les caséines kinase de type I n'a pas été analysée en présence d'IA chez *S. cerevisiae* et aucun résultat valable n'a été obtenu chez *K. lactis*.

Par contre, les répresseurs transcriptionnels sont activés chez les deux levures étudiées. Chez *S. cerevisiae*, Mth1 et ScRgt1 sont respectivement dégradé et déphosphorylé (Publication, Figure 7A et 7B). La stabilité du paralogue à Mth1, Std1, n'est pas affectée par l'IA 0,25 mM (résultats non présentés). En effet, en réponse au glucose, la stabilité de Std1 varie différemment de celle de Mth1 et Sms1 car son activation transcriptionnelle prime sur la dégradation de la protéine (Kim et al., 2006). L'IA entraîne l'accumulation de Mth1, qui

interagit avec ScRgt1 en masquant probablement ses sites de phosphorylation. ScRgt1 n'est donc pas phosphorylé. Les deux répresseurs restent probablement fixés au promoteur du gène cible en formant un complexe qui réprime l'expression de *HXT1*. Cependant, la répression de *HXT1* a été observée après traitement avec 1 mM IA, ce qui ne permet pas d'extrapoler sur le niveau d'expression de *HXT1* à 0,25 mM IA (Figure 48). Chez *K. lactis*, la répression de *RAG1* après traitement avec 0,25 mM IA en présence de glucose est de seulement 20 % (Figure 41). Le niveau d'expression de *HXT1* après traitement avec 0,25 mM IA reste à évaluer.

Hxt1 s'accumule dans la vacuole après traitement à l'IA, mais un signal est toujours détecté à la membrane plasmique en microscopie à fluorescence (Figure 49). Le devenir de Hxt1 dans la vacuole n'a pas été étudié. Enfin, nous n'avons pas d'élément sur le transport du glucose par Hxt1 en présence d'IA, ni sur l'activité de transport des autres perméases au glucose. En effet, nous avons analysé l'effet de l'inhibition chimique de la glycolyse uniquement sur Hxt1, qui est l'homologue de Rag1, alors que chez *S. cerevisiae*, il existe au moins six perméases au glucose dont l'expression est régulée par le glucose extracellulaire. Il aurait été intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition chimique de la glycolyse sur une autre perméase de faible affinité telle que Hxt3.

4. Contrôle de la glycolyse sur la signalisation et les senseurs du glucose chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae* : discussion, conclusions et perspectives

Les résultats présentés dans ce chapitre montrent comment la signalisation du glucose est contrôlée par la glycolyse chez les levures. Nous avons démontré que, en amont de la voie de signalisation du glucose, la stabilité des senseurs du glucose Rag4 et Rgt2 est ciblée par la glycolyse chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae*. Le modèle proposé pour le contrôle de la glycolyse sur la signalisation du glucose est représenté dans la Figure 52.

La nouveauté mise en évidence par ce travail de thèse est synthétisée par les flèches noires qui représentent un cercle vertueux visant au maintien de la signalisation et au transport du glucose lorsque la glycolyse est fonctionnelle. Ainsi, lorsque la glycolyse est active, elle envoie un signal vers le senseur du glucose mais aussi vers la perméase au glucose (Figure 30, Figure 42 et Figure 49) afin de stabiliser ces protéines membranaires. Lorsque le senseur est stabilisé en présence de glucose, il active la voie de signalisation du glucose en réprimant les répresseurs transcriptionnels du gène de la perméase au glucose. Le gène de la perméase au glucose est exprimé en réponse au glucose extracellulaire. Comme la protéine est également stabilisée grâce au signal issu de la glycolyse (signal non identifié à ce jour), le glucose peut être transporté à l'intérieur de la cellule et métabolisé via la glycolyse. Enfin, la boucle est bouclée et, la glycolyse étant fonctionnelle, elle va stabiliser les protéines membranaires que sont les senseurs et perméases au glucose.

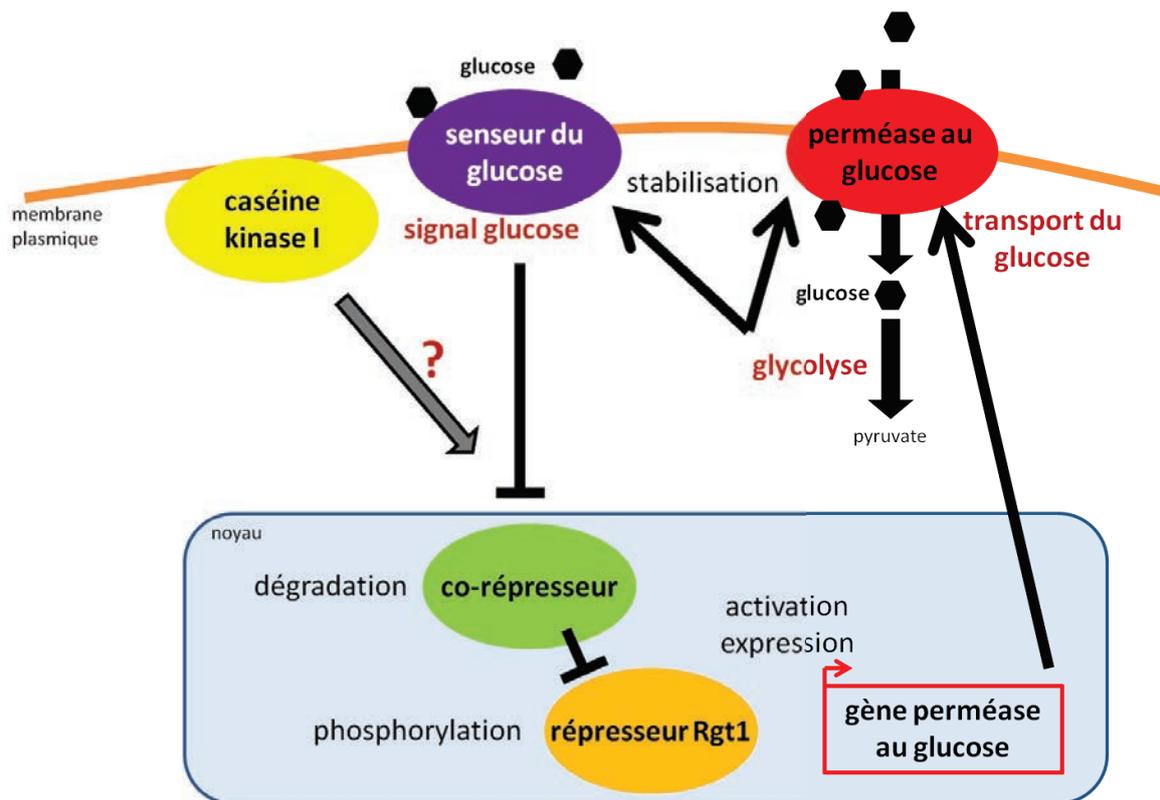


Figure 52: Un cycle vertueux permet de maintenir la signalisation et le transport du glucose lorsque la glycolyse est fonctionnelle. Représentation schématique du contrôle de la glycolyse sur la signalisation du glucose chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae*. Les flèches noires indiquent une activation et les traits barrés représentent une inhibition.

L'implication de la caséine kinase de type I dans ce cercle vertueux est mal déterminée. Nous avons montré que la glycolyse n'a pas d'effet sur sa fonctionnalité, mais nous n'avons pas pu démontrer que la caséine kinase de type I Rag8 phosphoryle le corépresseur transcriptionnel Sms1 chez *K. lactis* (Publication, Figure 4D), comme certains modèles le présument chez *S. cerevisiae* (Moriya and Johnston, 2004). L'absence de phosphorylation *in vitro* de Sms1 par Rag8, alors que des sites consensus des caséine kinases de type I sont présents, pourrait s'expliquer par la nécessité que ces sites de phosphorylation soient pré-phosphorylés par une autre kinase, comme c'est souvent le cas pour les caséine kinases (Cheong and Virshup, 2011). Toutefois, l'observation chez *S. cerevisiae* que Mth1 est toujours nucléaire (Pasula et al., 2010) contredit les modèles qui présument la navette de Mth1 entre le noyau et le cytoplasme. Si Mth1 est effectivement toujours nucléaire, il est difficile d'imaginer comment il peut être phosphorylé par les kinases Yck1/2, qui sont ancrées à la membrane plasmique. Une autre hypothèse pour expliquer pourquoi Sms1 n'est pas phosphorylé *in vitro* par Rag8 chez *K. lactis* est que Rag8 soit une kinase intermédiaire dans la propagation du signal, qui ne phosphoryle pas directement Sms1. Cette hypothèse serait favorisée si Sms1 s'avérait être toujours dans le noyau, comme Mth1 chez *S. cerevisiae*, ce qui n'a pas été étudié jusqu'à présent. Nous avons également essayé de déterminer si l'interaction senseur-kinase Rag4-Rag8 est maintenue lorsque la glycolyse est affectée chez *K. lactis*, mais nous n'avons pas pu obtenir des résultats concluants (Figure 31). Enfin, nous n'avons pas vérifié la fonctionnalité de la protéine à F-box Grr1 dans des mutants glycolytiques, en nous basant sur le fait que, chez *S. cerevisiae*, les mutants *grr1* ont des phénotypes particuliers (Flick and Johnston,

1991) qui ne sont pas observés chez les mutants glycolytiques. Cependant, comme l'origine du défaut de phosphorylation du corépresseur (Sms1 ou Mth1) n'a pas été identifiée, nous ne pouvons pas écarter complètement l'implication de Grr1 dans le mécanisme de contrôle de la signalisation du glucose par la glycolyse.

Chez ces levures, la stabilité du senseur au glucose est contrôlée par la capacité de la cellule à assimiler le glucose extracellulaire. Ce mécanisme de contrôle par la glycolyse présente plusieurs avantages par rapport à un contrôle direct de la stabilité de la perméase au glucose :

- Ceci permet à la cellule de faire des économies d'énergie. En effet, chez *S. cerevisiae*, l'expression et la synthèse de Hxt1 (≈ 23000 molécules par cellule (Ghaemmaghami et al., 2003)) est beaucoup plus coûteuse que celle de Rgt2/Snf3 (le nombre de molécules par cellule n'a pas été déterminé mais des mesures de la quantité d'ARNm synthétisés montrent que le gène de la perméase est environ 100 fois plus transcrit que celui de *RGT2* (Özcan et al., 1996a)). La cellule a un intérêt énergétique à ne pas fabriquer en masse une protéine qui va être régulée par dégradation.

- Ce mécanisme permet également de réguler les autres gènes dont l'expression est réprimée par Rgt1 (gènes de la glycolyse par exemple). On peut également imaginer la régulation d'autres cibles pas encore identifiées. Il permet aussi probablement de rediriger la cellule vers l'utilisation d'autres sources de carbone non fermentables.

- La régulation au niveau du senseur permet une régulation plus fine lorsque différentes voies interviennent pour réguler l'expression du gène de la perméase au glucose, comme c'est le cas ici (signal glucose extracellulaire et signal issu de la glycolyse).

La mise en évidence du contrôle des senseurs du glucose par la glycolyse n'exclue pas que ce contrôle intervienne à d'autres niveaux de la voie de signalisation du glucose (par exemple en régulant la capacité de phosphorylation de la caséine kinase sur le corépresseur). On peut imaginer que le contrôle de la glycolyse agisse aussi de manière directe sur la régulation de la transcription des gènes des perméases. Chez *K. lactis*, il serait intéressant de regarder si l'activation transcriptionnelle liée à Sck1 et K/Snf2 est maintenue dans un mutant glycolytique. Cependant, les résultats présentés dans ce chapitre peuvent être au moins en partie expliqués par le contrôle direct de la stabilité du senseur.

Dans cette étude, le principal mutant glycolytique utilisé chez la levure *K. lactis* est le mutant de l'hexokinase. Ce mutant croît dans un milieu contenant du glucose comme source de carbone, à faible vitesse si le milieu est synthétique et à vitesse normale dans un milieu riche. Une question récurrente est de comprendre les stratégies utilisées par ce mutant pour croître en présence de glucose. En effet, ce mutant est dépourvu de la seule hexokinase de *K. lactis*, et l'expression de la perméase de basse affinité est fortement réprimée : le glucose est à la fois peu transporté à l'intérieur de la cellule et difficilement métabolisé. Cependant, *K. lactis* possède une glucokinase, K/Glk1, qui a une faible capacité à phosphoryler le glucose

(*KlGlc1* phosphoryle 2,5 % de la quantité de glucose phosphorylé par *KlHxk*) (Kettner et al., 2007). Dans un double mutant $\Delta Klhxc \Delta Klglk1$, la croissance en présence de glucose comme source de carbone devrait être encore plus affectée que dans le simple mutant $\Delta Klhxc$. Enfin, *K. lactis* possède aussi une perméase au glucose de haute affinité, Hgt1, dont l'expression n'est pas régulée par le glucose. Cependant, l'expression de *HGT1* est fortement affectée dans un mutant de l'hexokinase et cette diminution de l'expression est liée à Rag4 : *HGT1* est fortement exprimée dans un mutant *rag4* et dans un mutant *rag4 Klhxc* (Billard et al., 1996). Ainsi, il semble peu probable que le glucose soit transporté par Hgt1 dans un mutant de l'hexokinase, mais plutôt par un ou des transporteurs qui n'ont pas encore été identifiés.

Le contrôle par la glycolyse de la signalisation du glucose, et plus particulièrement de la stabilité des senseurs du glucose, est conservé chez *K. lactis* et *S. cerevisiae*. Cela suggère que ce contrôle était déjà présent chez leur dernier ancêtre commun, qui est l'espèce dont descendent la plupart des représentants de la famille des Saccharomycetaceae. Cette hypothèse pourrait être testée en s'intéressant à la signalisation du glucose dans une levure relativement bien connue et proche dans l'arbre phylogénétique de *S. cerevisiae*, comme par exemple *Hansenula polymorpha* ou *Pichia stipitis*, dont certains composants de la voie de signalisation du glucose sont déjà connus (voir Tableau 8 page 48). Enfin, il serait intéressant de tester la conservation de ce mécanisme dans d'autres espèces parmi l'ordre des Saccharomycétales (par exemple *Pichia stipitis*, *Candida albicans* et *Yarrowia lipolytica*).

Chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae*, la stabilité des senseurs du glucose représente la cible de la glycolyse afin de contrôler la signalisation du glucose et l'expression des gènes des perméases au glucose. Chez ces levures, les senseurs du glucose sont des homologues aux perméases au glucose, et leur fonctionnement pour générer un signal glucose à l'intérieur de la cellule est encore mal compris. Chez *S. cerevisiae*, un premier rapport a été récemment publié qui met en évidence la dégradation des senseurs du glucose en fonction de la source de carbone disponible (Roy and Kim, 2014). Nous avons choisi d'étudier plus en détail le senseur du glucose Rag4 chez *K. lactis*, d'une part pour éclaircir le processus qui aboutit à la génération du signal glucose, et d'autre part pour améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'internalisation et la dégradation de Rag4. Ces résultats sont présentés dans le deuxième chapitre de ce manuscrit.

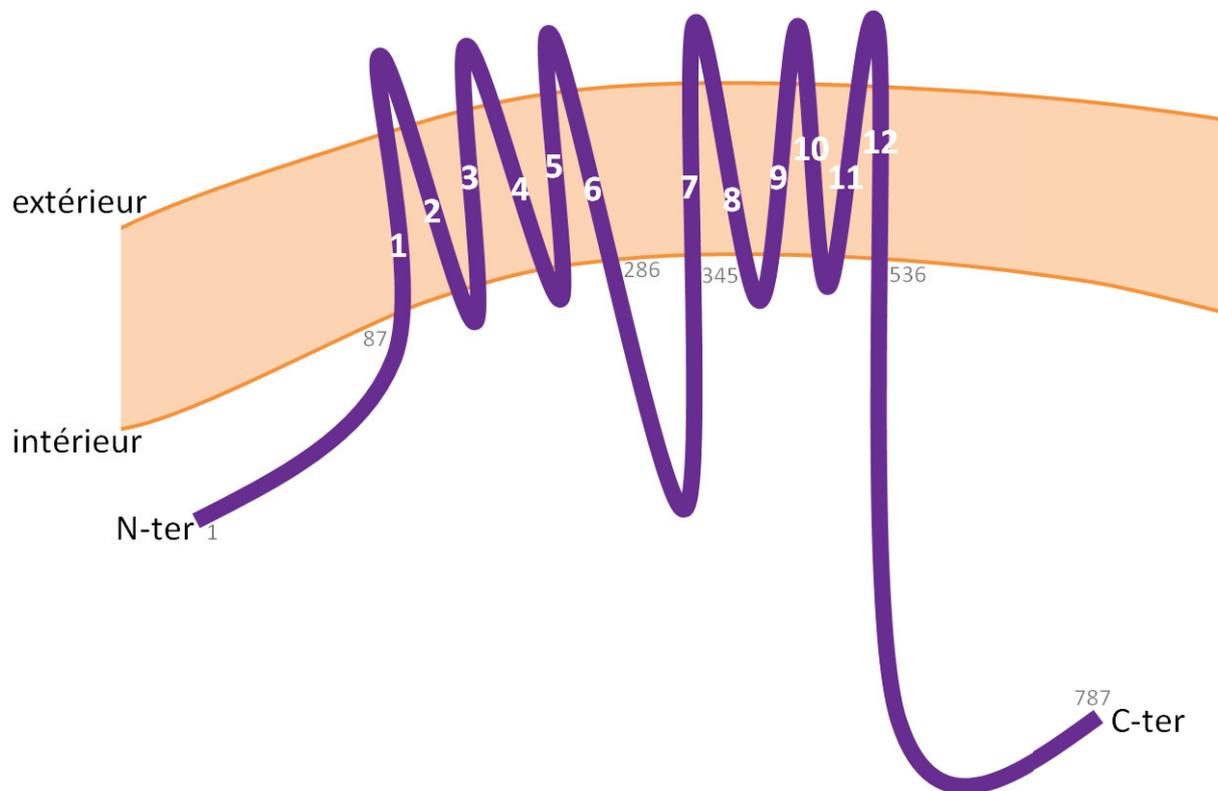
Chapitre 2 : Etude du senseur du glucose Rag4 chez *K. lactis* : la queue cytoplasmique C-terminale est impliquée à la fois dans la signalisation du glucose et le contrôle de la stabilité de la protéine

Nous avons mis en évidence dans le chapitre précédent que, chez les levures *S. cerevisiae* et *K. lactis*, les senseurs du glucose Rag4 et Rgt2 sont régulés par la glycolyse. En effet, la glycolyse contrôle la stabilité de ces deux protéines. Chez *K. lactis*, une légère régulation transcriptionnelle de *RAG4* a été observée dans des mutants glycolytiques mais le contrôle de la stabilité de la protéine prime sur le niveau d'expression du gène. La régulation post-traductionnelle du senseur du glucose Rag4 n'avait jamais été mise en évidence auparavant. Cependant, chez *S. cerevisiae*, une publication récente a montré que la stabilité des senseurs du glucose Snf3 et Rgt2, homologues de Rag4, est régulée par ubiquitination, endocytose et dégradation (Roy and Kim, 2014). Ces senseurs sont régulés par la source de carbone disponible dans le milieu : Rgt2 (senseur de faible affinité) est stabilisé par des concentrations en glucose supérieures à 0,25 %, et Snf3 (senseur de haute affinité) est stabilisé par des concentrations en glucose inférieures à 0,25 %. Leur observation microscopique montre un signal fluorescent à la membrane plasmique dans les conditions où les senseurs sont stabilisés, et une accumulation dans la vacuole lorsqu'ils ne le sont pas.

Ces différentes observations chez ces deux levures nous ont poussés à étudier plus en détail le senseur du glucose Rag4 de *K. lactis*. Comme les autres senseurs du glucose chez les levures, Rag4 est une protéine membranaire possédant douze domaines transmembranaires et une queue C-terminale cytoplasmique caractéristique. Chez *S. cerevisiae*, cette queue cytoplasmique est nécessaire à l'amplification du signal glucose (Moriya and Johnston, 2004). Chez *K. lactis*, son rôle n'avait jamais été étudié auparavant. Nous avons analysé l'implication de la queue C-terminale de Rag4 dans la signalisation du glucose pour cet organisme. Ensuite, nous nous sommes intéressés au contrôle de la stabilité du senseur Rag4. Pour cela, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux différentes conditions dans lesquelles Rag4 pourrait être déstabilisées : dans les mutants de la glycolyse en présence de glucose, mais encore en présence de certaines drogues ou selon la source de carbone disponible. Ensuite, nous avons déterminé si la queue C-terminale de Rag4 est impliquée dans le contrôle de la stabilité de la protéine. Nous avons recherché dans la séquence de Rag4 des domaines potentiels de contrôle de la stabilité de la protéine, et nous avons construit et étudié des mutants de ces domaines, principalement dans la queue C-terminale cytoplasmique de Rag4. Les sites mutés sont potentiellement impliqués dans l'ubiquitination, l'endocytose et la dégradation de la protéine. L'étude de leur mutation a permis de confirmer le rôle de certains de ces sites dans la déstabilisation de la protéine. Les résultats de ces analyses sont présentés dans ce chapitre.

1. Etude de la séquence de Rag4 : prédiction bioinformatique des domaines transmembranaires et cytoplasmiques

Avant de rechercher des domaines de Rag4 impliqués dans la signalisation du glucose ou le contrôle de sa stabilité, nous avons d'abord affiné les prédictions transmembranaires pour nous intéresser principalement aux domaines cytoplasmiques. La prédiction de la structure transmembranaire avait déjà été effectuée précédemment et avait établie la présence de douze domaines transmembranaires et une queue C-terminale cytoplasmique (Betina et al., 2001). Les prédictions ont été affinées grâce aux logiciels TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh et al., 2001) et TMpred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) (Hofmann and Stoffel, 1993). Les deux programmes ne donnent pas exactement les mêmes résultats : les deux domaines N-terminal et C-terminal sont prédits de la même manière mais la prédiction des hélices transmembranaires varie de quelques acides aminés entre les deux logiciels (Figure 53).



inside	outside	inside	outside	inside	TMHMM								
1-87	111-129	153-164	185-188	212-223	244-262	286-345	369-382	406-411	435-443	467-478	502-515	536-787	
TMhelix1	TMhelix2	TMhelix3	TMhelix4	TMhelix5	TMhelix6	TMhelix7	TMhelix8	TMhelix9	TMhelix10	TMhelix11	TMhelix12		
88-110	130-152	165-184	189-211	224-243	263-285	346-368	383-405	412-434	444-466	479-501	516-535		TMHMM
88-105	137-156	164-185	187-211	222-242	257-277	348-371	384-404	412-432	442-460	481-503	516-535		TMpred

Figure 53: Représentation schématique du senseur de glucose Rag4 selon les prédictions de domaines transmembranaires. Une topologie hypothétique est donnée en haut, avec les numéros des domaines transmembranaires en blanc et les limites en acides aminés des trois principaux domaines cytoplasmiques (en gris). Les valeurs des domaines non membranaires sont donnés tels que prédits par le logiciel TMHMM dans le premier tableau, avec, en jaune, les principaux domaines cytoplasmiques (N-terminal, boucle interne et C-terminal) et, en bleu, tous les domaines à l'extérieur de la membrane plasmique. Le deuxième tableau donne les valeurs des acides aminés impliqués dans les hélices transmembranaires, selon les programmes TMHMM ou TMpred.

Trois principaux domaines cytoplasmiques (de plus d'une dizaine d'acides aminés) ont été prédits : un domaine N-terminal de 87 acides aminés, une boucle interne de 60 acides aminés et enfin la queue C-terminale déjà décrite, qui contient 252 acides aminés et forme le domaine cytoplasmique le plus important. Chez *S. cerevisiae*, les deux senseurs du glucose Rgt2 et Snf3 possèdent la même topologie. Il a été montré que la queue C-terminale de ces senseurs est nécessaire à la propagation du signal glucose, mais aussi au contrôle de la stabilité des senseurs (Moriya and Johnston, 2004; Roy and Kim, 2014). Dans la queue C-terminale de Rgt2 et Snf3, une séquence très conservée d'environ 25 acides aminés est importante pour la signalisation du glucose (voir Tableau 6 page 40 et alignement de séquences Figure 76 page 175). Chez *K. lactis*, cette séquence très conservée est également présente dans la queue C-terminale de Rag4. Pour ces différentes raisons, nous nous sommes d'abord intéressés au rôle de cette queue cytoplasmique dans la signalisation du glucose, puis dans la régulation de la stabilité de la protéine.

2. Rôle et fonctionnement de la queue C-terminale du senseur du glucose Rag4 dans la signalisation du glucose

La queue C-terminale cytoplasmique des senseurs du glucose chez les levures est caractéristique, puisqu'elle n'est pas retrouvée chez les perméases au glucose alors qu'elles partagent avec les senseurs la même topologie membranaire. Lorsque les séquences de Rag4, Rgt2 et Snf3 sont alignées (Figure 76), on observe une faible conservation au sein de cette queue cytoplasmique, excepté pour deux séquences. La première, qui comprend environ 10 acides aminés, se trouve juste après le douzième domaine transmembranaire. La deuxième, d'environ 25 acides aminés très conservés, est présente une fois chez Rag4 et Rgt2 et deux fois chez Snf3 (Figure 76). Le rôle de cette séquence dans la signalisation du glucose a déjà été souligné chez *S. cerevisiae* pour Rgt2 et Snf3 (Özcan et al., 1998; Vagnoli et al., 1998). De plus, les senseurs du glucose Snf3 et Rgt2 privés de tout ou partie de leur queue C-terminale cytoplasmique ne sont plus fonctionnels (Coons et al., 1997; Özcan et al., 1998), tandis que l'expression de cette queue cytoplasmique dans des mutants $\Delta snf3$ ou $\Delta rgt2$ rétablit la signalisation du glucose dans certaines conditions (Coons et al., 1997; Vagnoli et al., 1998; Dlugai et al., 2001). Enfin, la queue C-terminale des senseurs de glucose Rgt2 et Snf3 interagit avec certains composants de la signalisation du glucose tels que les corépresseurs transcriptionnels Mth1 et Std1 (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000).

Nous nous sommes donc intéressés au rôle de la queue C-terminale du senseur Rag4 dans la signalisation du glucose chez *K. lactis*. Pour ceci, nous avons construit différents mutants dans lesquels le senseur Rag4 est tronqué en partie ou totalement de la queue C-terminale et nous avons testé le phénotype Rag de ces souches. Parallèlement, nous avons analysé les effets de la surexpression de la queue C-terminale de Rag4 sur la signalisation glucose. Finalement, l'interaction de Rag4 avec ses partenaires cellulaires, notamment Rag8, a également été étudiée afin de déterminer le rôle de la queue C-terminale dans la transmission du signal glucose.

2. a. Importance de la queue C-terminale cytoplasmique du senseur du glucose Rag4 dans la signalisation du glucose

Chez *S. cerevisiae*, il a été mis en évidence que le senseur de glucose Rgt2 (homologue à Rag4) n'est pas fonctionnel sans sa queue cytoplasmique ($\Delta 579-763$; la queue cytoplasmique commence au niveau de l'acide aminé 546), sauf s'il est surexprimé (Moriya and Johnston, 2004).

2. a. i. La queue C-terminale du senseur Rag4 est nécessaire à la signalisation du glucose

Pour analyser l'importance de la queue C-terminale de Rag4 dans la signalisation du glucose, nous avons construit un mutant délété de la queue C-terminale de Rag4 (acides aminés 539 à 787) et portant une étiquette TAP. Trois acides aminés, situés après le douzième segment transmembranaire, ont été conservés pour assurer une bonne liaison avec l'étiquette TAP remplaçant la queue cytoplasmique. La construction *rag4*¹⁻⁵³⁸-TAP::KanMX6 est intégrée dans le génome au locus *RAG4* sous le contrôle du promoteur *RAG4*, dans une souche sauvage et dans une souche $\Delta Klhxk$. Le phénotype Rag de ces mutants a été vérifié et est montré dans la Figure 54.

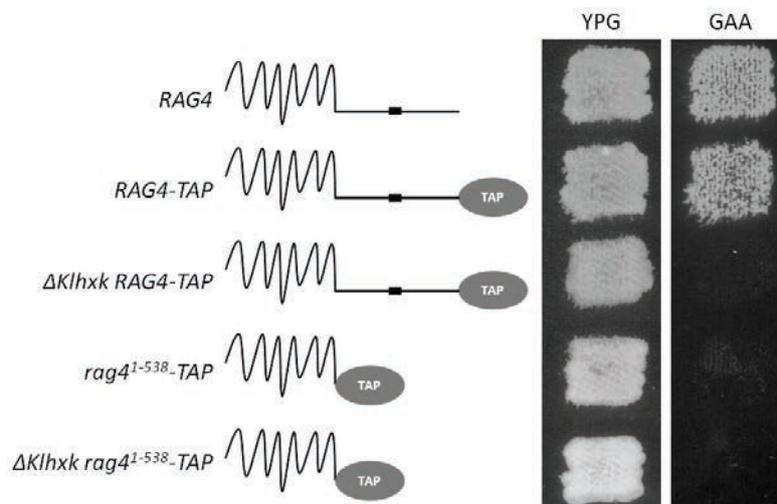


Figure 54: Les mutants *rag4*¹⁻⁵³⁸-TAP WT et $\Delta Klhxk$ ont un phénotype Rag⁻. Le phénotype Rag des souches MWL9S1 (WT), MLK239 (*RAG4-TAP*) (témoins positifs), ACRK101 ($\Delta Klhxk$ *RAG4-TAP*, témoin négatif), ACRK162 (*rag4*¹⁻⁵³⁸-TAP) et ACRK164 ($\Delta Klhxk$ *rag4*¹⁻⁵³⁸-TAP) a été déterminé sur milieu YPG et GAA. Les boîtes ont été photographiées après 48 h de croissance à 28°C.

La délétion de la queue cytoplasmique de Rag4 entraîne un phénotype Rag⁻. La queue C-terminale permet au senseur Rag4 de transmettre efficacement le signal glucose, soit elle est directement nécessaire à la transmission du signal glucose, soit elle est nécessaire à la stabilité de la protéine.

Nous avons ensuite testé le phénotype Rag de plusieurs mutants délétés partiellement de la queue C-terminale de Rag4. Une cassette portant un codon STOP suivi du gène rapporteur *URA3* a été insérée dans la séquence codante de *RAG4*, à différents endroits. Cette cassette a été insérée dans des souches portant des constructions différentes : dans l'une Rag4 porte

une étiquette 3HA en C-terminal, dans l'autre l'étiquette 3HA est en N-terminal et la construction est surexprimée par le promoteur P_{ScGAL1} . Pour chacun de ces mutants, le phénotype Rag a été testé. La construction exacte et le résultat du test Rag sont donnés dans le Tableau 11.

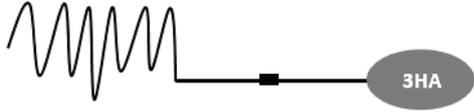
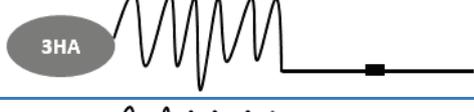
Nom	Construction portée	Phénotype
MLK190 <i>RAG4-3HA</i>		Rag ⁺
ACRK118 <i>rag4¹⁻⁶⁸⁶</i>		Rag ⁺
MLK191 <i>P_{ScGAL1}3HA-RAG4</i>		Rag ⁺
ACRK123 <i>P_{ScGAL1}3HA-<i>rag4</i>¹⁻⁶⁸⁶</i>		Rag ⁺
ACRK125 <i>P_{ScGAL1}3HA-<i>rag4</i>¹⁻⁷²⁶</i>		Rag ⁺

Tableau 11: Les mutants tronqués de seulement une partie de la queue C-terminale de Rag4 (après l'acide aminé 686) ont un phénotype Rag⁺. La partie de la queue cytoplasmique comprise entre les acides aminés 686 et 787 n'est pas nécessaire à la signalisation du glucose. Rag⁻ = pas de croissance sur milieu GAA ; Rag⁺ = croissance similaire au WT sur milieu GAA.

Les souches dans lesquelles *RAG4* est tronqué après l'acide aminé 686 ou 726 sont Rag⁺ : le signal glucose est correctement transmis. Puisqu'un mutant *rag4¹⁻⁵³⁸-TAP* dépourvu de sa queue C-terminale est Rag⁻ (Figure 54), cela signifie que la partie de la queue C-terminale comprise entre les acides aminés 539 et 686 est nécessaire à la signalisation du glucose (par stabilisation du senseur ou par interaction directe avec d'autres protéines pour transmettre le signal). La séquence conservée entre les senseurs du glucose Rgt2, Snf3 et Rag4 est notamment présente dans cette séquence (acides aminés 646 à 663 de Rag4) (Figure 76). Chez *S. cerevisiae*, cette séquence est essentielle à la signalisation du glucose pour Snf3 et pour Rgt2 (Özcan et al., 1998; Vagnoli et al., 1998) mais la fonction précise de cette séquence n'est pas connue. Les résultats obtenus avec *K. lactis* suggèrent que cette séquence de Rag4 est également nécessaire à la transduction du signal glucose.

2. a. ii. La queue C-terminale cytoplasmique du senseur du glucose Rag4 ne suffit pas à transmettre correctement le signal glucose

Chez *S. cerevisiae*, la surexpression de la queue cytoplasmique de Snf3 complète le défaut de croissance d'un mutant *snf3* en milieu glucose, mais ne suffit pas à rétablir un transport du glucose fonctionnel (Coons et al., 1997). Dans certains cas, l'expression ou la surexpression de la queue C-terminale de Snf3 dans un mutant $\Delta snf3$ induit l'expression de *HXT2* et *HXT7* (Vagnoli et al., 1998; Dlugai et al., 2001). Pour déterminer si la queue C-terminale cytoplasmique du senseur Rag4 est capable à elle seule de produire un signal

glucose, nous avons transformé le mutant *rag4Δ1* (phénotype Rag^-) avec le plasmide pACR4 qui permet la surexpression de la protéine de fusion GST-Rag4⁵⁴⁴⁻⁷⁸⁷ à partir du promoteur P_{ScGAL1} . Pour simplification, on nommera la protéine exprimée GST-Rag4C. Toute la partie C-terminale de Rag4 n'est pas strictement présente dans cette construction : il manque huit acides aminés adjacents au dernier domaine transmembranaire. Ces huit acides aminés sont assez conservés entre les senseurs Rgt2, Snf3 et Rag4 (voir Figure 76), ce qui laisse suggérer un rôle fonctionnel pour ce domaine. Leur absence dans la construction GST-Rag4⁵⁴⁴⁻⁷⁸⁷ peut donc représenter un biais dans l'analyse de la fonctionnalité de la queue C-terminale.

Le phénotype Rag des transformants a ensuite été testé (Figure 55). Ce phénotype est utilisé ici comme un indicateur de l'activation de la signalisation du glucose. La surexpression de GST-Rag4C dans le mutant *rag4Δ1* (Rag^-) ne permet pas de restaurer un phénotype Rag^+ et une signalisation glucose efficace. Ce résultat peut être expliqué par le fait que la protéine de fusion est cytoplasmique et pas associée à la membrane plasmique. Chez *S. cerevisiae*, la surexpression d'une forme ancrée à la membrane plasmique de la queue cytoplasmique de Snf3 ou de Rgt2 permet d'établir un signal glucose constitutif (Vagnoli et al., 1998; Moriya and Johnston, 2004). Nous avons donc construit un plasmide pACR6 qui contient la même construction GST-Rag4C avec en plus la séquence codante pour les dix derniers acides aminés de la caséine kinase Rag8. En effet, les extrémités C-terminales de Rag8 et des caséine kinases Yck1/Yck2 de *S. cerevisiae* contiennent une séquence de palmitoylation permettant l'ancrage de la protéine dans la membrane plasmique (Roth et al., 2002, 2011). La construction obtenue $P_{\text{ScGAL1}}\text{GST-}rag4^{544-787}\text{-}rag8^{526-535}$ permet l'expression d'une protéine qui sera nommée GST-Rag4C-A (pour Rag4C Ancré à la membrane). Ce plasmide a ensuite été transformé dans le mutant *rag4Δ1* et le phénotype Rag a été déterminé (Figure 55, dernière ligne).

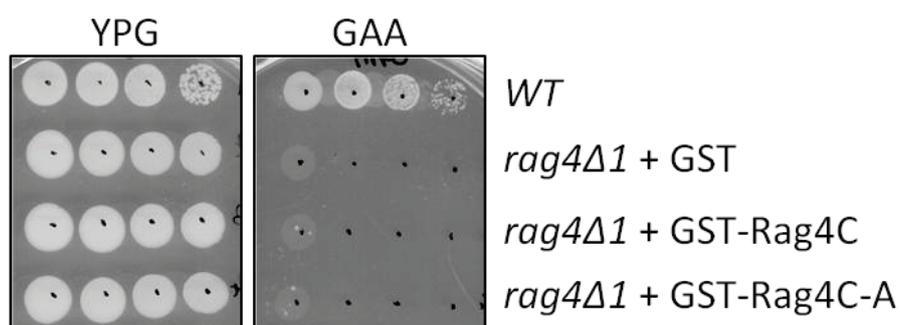


Figure 55: La surexpression de la queue cytoplasmique de Rag4 dans un mutant *rag4Δ1* ne modifie pas son phénotype Rag^- . Un test en gouttes du phénotype Rag a été réalisé pour une souche sauvage (MWL9S1) et un mutant *rag4Δ1* (MWK8) transformé avec pACR5 ($P_{\text{ScGAL1}}\text{GST}$) exprimant GST, pACR4 ($P_{\text{ScGAL1}}\text{GST-}rag4^{\Delta1-543}$) exprimant GST-Rag4C ou pACR6 ($P_{\text{ScGAL1}}\text{GST-}rag4^{\Delta1-543}\text{-}rag8^{\Delta1-525}$) exprimant GST-Rag4C-A (ancré à la membrane). Des pré-cultures ont été diluées pour obtenir une $\text{DO}_{600\text{ nm}}$ égale, puis diluées en série par 10. Pour chaque dilution une goutte de 10 μl a été déposée sur milieu solide YPG et GAA. Les boîtes ont été photographiées après 48 h de croissance à 28°C.

Le mutant *rag4Δ1* + pACR6 (GST-Rag4C-A) a un phénotype Rag^- indiquant que la surexpression de GST-Rag4C-A ne permet pas de rétablir une signalisation et un transport du glucose fonctionnel. Afin de vérifier que la palmitoylation de GST-Rag4C-A est effective et permet l'ancrage de la protéine à la membrane, nous avons analysé par Western blot la répartition après fractionnement membranaire de GST-Rag4C et GST-Rag4C-A dans une

souche *WT*. Pour cela, la fraction membranaire dite « lourde » a été séparée du reste de l'extrait protéique par centrifugation (Figure 56).

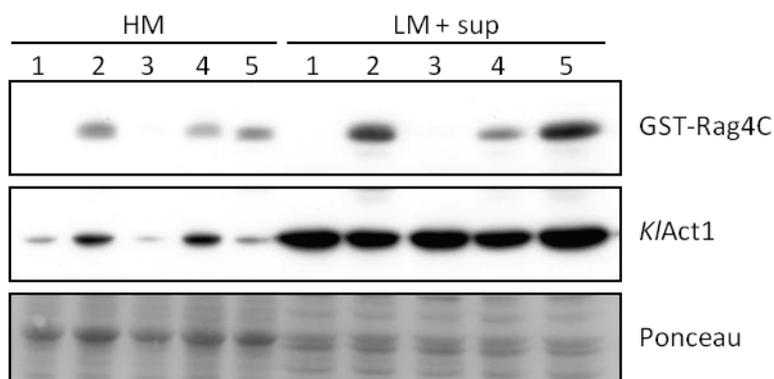


Figure 56: La protéine de fusion GST-Rag4C est partiellement membranaire. Les souches MWL9S1 (*WT*), MWK8 (*rag4Δ1*) et ACRK162 (*rag4¹⁻⁵³⁸-TAP*) ont été transformées avec les plasmides pACR4 (GST-Rag4C) ou pACR6 (GST-Rag4C-A). 1 : *WT*, 2 : *WT* + GST-Rag4C, 3 : *WT* + GST-Rag4C-A, 4 : *rag4Δ1* + GST-Rag4C et 5 : *rag4¹⁻⁵³⁸-TAP* + GST-Rag4C. Ces souches ont été cultivées en milieu SG -leu jusqu'en phase exponentielle de croissance. Les extraits protéiques ont été préparés dans du tampon MOPS. La fraction HM a été obtenue par centrifugation et correspond aux « membranes lourdes », qui comprennent la membrane plasmique. La fraction LM + sup correspond à toutes les fractions cellulaires restantes (« membranes légères » + protéines solubles). Après séparation des protéines par SDS-PAGE puis Western blot, GST-Rag4C a été observée par immunodétection (anti-GST). *K/Act1* a été immunodéTECTÉE (anti-actine) et la membrane a été colorée au rouge Ponceau pour constituer un témoin de la charge protéique.

De manière surprenante, la protéine GST-Rag4C (puits n°2) se trouve en partie localisée à la membrane plasmique (fraction HM) dans la souche sauvage. En revanche, la protéine GST-Rag4C-A dans la souche sauvage (puits n°3) n'a pas été détectée, ce qui suggère que la construction exprime une protéine instable. En effet, l'exposition prolongée du film permet d'observer un léger signal dans les puits n°3 (HM et LM + sup), indiquant que la construction plasmidique est correcte. Toutefois, le choix d'ancrer GST-Rag4C à la membrane en ajoutant les dix derniers acides aminés de Rag8 n'était peut-être pas judicieux. En effet, une publication récente montre que chez *S. cerevisiae*, le signal de palmitoylation de la caséine kinase Yck2 est composite : en plus des dix derniers acides aminés, une longue séquence faiblement conservée et riche en glutamine, ainsi que le domaine kinase semblent être également nécessaires (Roth et al., 2011). Ainsi, il est possible que les dix derniers acides aminés de Rag8 ne suffisent pas à constituer un signal de palmitoylation fonctionnel.

La présence de GST-Rag4C à la membrane plasmique suggère son interaction avec une ou des protéines membranaires. Ces protéines peuvent être la caséine kinase Rag8 (Rolland et al., 2006) (Figure 17 page 47), d'autres protéines membranaires encore non-identifiées capables d'interagir avec Rag4, ou encore le senseur Rag4 lui-même. Pour tester cette dernière hypothèse, nous avons étudié la répartition cellulaire de GST-Rag4C dans un mutant *rag4Δ1* (Figure 56 puits n°4) ainsi que dans un mutant *rag4¹⁻⁵³⁸-TAP* dans lequel Rag4 est tronqué de sa queue C-terminale (puits n°5). Dans les deux cas, GST-Rag4C est en partie membranaire, malgré l'absence de la protéine Rag4 entière ou de sa queue C-terminale seulement (ces résultats sont préliminaires et nécessitent d'être répétés avec une quantification rigoureuse pour exclure totalement la possibilité d'une interaction avec le senseur Rag4). Ces résultats indiquent que la queue C-terminale de Rag4 interagit avec

d'autres partenaires membranaires qu'elle-même. Un de ces partenaires membranaires est sans doute Rag8, qui est ancré à la membrane (voir page 149 et Figure 58 pour plus de détails).

Pour tester la capacité de la queue C-terminale de Rag4 à délivrer un signal glucose fonctionnel lorsque le reste de la protéine est présente, nous avons transformé le mutant sans queue C-terminale *rag4*¹⁻⁵³⁸-TAP avec les plasmides surexprimant la queue C-terminale de Rag4, pACR4 (GST-Rag4C) et pACR6 (GST-Rag4C-A), ainsi qu'avec le plasmide contrôle pACR5 (GST). Le plasmide pACR7 (*P*_{ScGAL1}GST-*rag4*^{544-787 F569A-F573A}) décrit plus loin (page 149) a également été utilisé. La croissance en glucose sur boîte et le phénotype Rag ont été analysés (Figure 57).

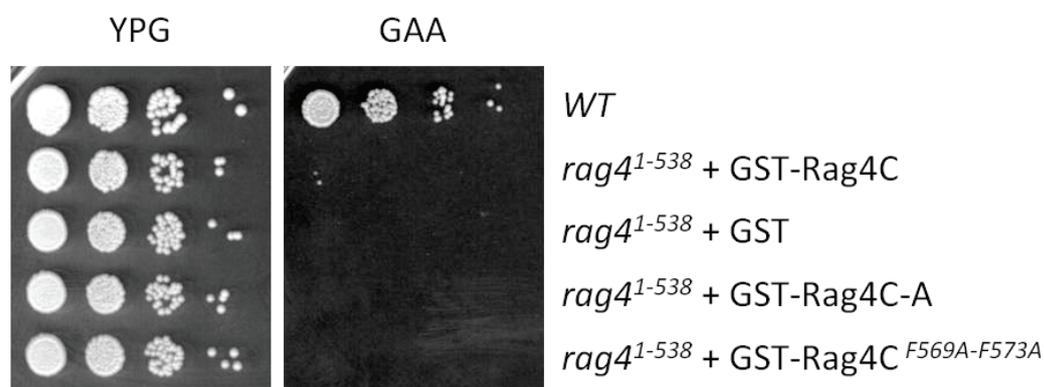


Figure 57: La surexpression de la queue cytoplasmique GST-Rag4C n'améliore pas le phénotype Rag et la croissance en glucose du mutant *rag4*¹⁻⁵³⁸. La souche ACRK162 (*rag4*¹⁻⁵³⁸-TAP) a été transformée avec pACR4 (GST-Rag4C), pACR5 (GST), pACR6 (GST-Rag4C-A) ou pACR7 (GST-Rag4C^{F569A-F573A}). Des pré-cultures, soit de MWL9S1 (WT) soit des différents transformants, ont été diluées une première fois pour obtenir une DO_{600 nm} égale, puis diluées en série par 10. Pour chaque dilution une goutte de 10 µl a été déposée sur milieu solide SG -leu et GAA. Les boîtes ont été photographiées après 72 h de croissance à 28°C.

La croissance de chacun des transformants est similaire à celle de la souche sauvage (WT) en milieu riche glucose (YPG). Le phénotype de *rag4*¹⁻⁵³⁸ en milieu GAA est toujours Rag⁻, malgré la surexpression de GST-Rag4C avec pACR4, pACR6 ou pACR7. Ainsi la queue cytoplasmique de Rag4 n'est pas capable de promouvoir le signal glucose lorsqu'elle est surexprimée et que le reste de la protéine Rag4 est normalement exprimée. Ce résultat est en accord avec le résultat précédent (Figure 56) suggérant l'absence d'interaction entre la protéine GST-Rag4C et le senseur Rag4. Cependant, dans d'autres répétitions de ces résultats, non présentées ici, la surexpression de GST-Rag4C (pACR4, pACR6 et pACR7) améliorait légèrement le phénotype Rag sur milieu GAA. Les résultats obtenus avec pACR7 (GST-Rag4C^{F569A-F573A}) seront discutés plus loin.

2. b. Interaction physique et fonctionnelle de la queue C-terminale du senseur du glucose Rag4 avec la caséine kinase de type I Rag8

L'interaction entre le senseur Rag4 et la caséine kinase Rag8 a été montrée par double-hybride (Rolland et al., 2006) et par co-immunoprécipitation dans le Chapitre 1 (Figure 31

page 114). Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que la caséine kinase Yck1 interagit avec le senseur du glucose Rgt2, mais les domaines impliqués dans cette interaction n'ont pas été recherchés (Moriya and Johnston, 2004). Dans les paragraphes qui suivent, nous nous sommes intéressés à la possibilité que l'interaction de Rag4 avec Rag8 ait lieu via la queue cytoplasmique de Rag4, et que Rag8 soit capable de phosphoryler la queue C-terminale de Rag4.

2. b. i. Interaction physique de la queue C-terminale du senseur du glucose Rag4 avec la caséine kinase de type I Rag8

Nous savons que le senseur du glucose Rag4 et la caséine kinase de type I Rag8 interagissent *in vivo*. Comme la queue C-terminale est le domaine cytoplasmique le plus conséquent de Rag4 et qu'elle est nécessaire à la signalisation du glucose, nous avons analysé l'interaction potentielle entre Rag8 et la queue C-terminale de Rag4 par une expérience de co-purification. Nous avons utilisé les plasmides pACR1 (codant pour LexA-Rag8 exprimé sous son promoteur endogène) et pACR4 (portant la construction $P_{ScGal1}GST-rag4^{544-787}$) que nous avons transformés conjointement dans une souche sauvage. GST-Rag4C a été purifié, puis LexA-Rag8 a été immunodétecté. Les résultats sont présentés dans la Figure 58.

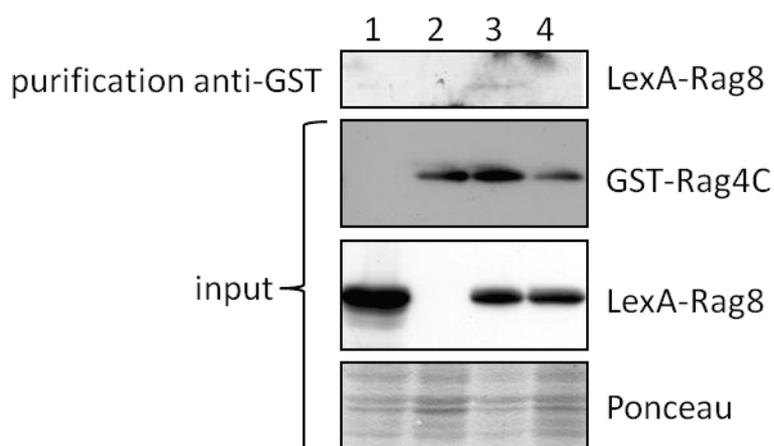


Figure 58: La queue C-terminale de Rag4 GST-Rag4C interagit avec LexA-Rag8 en co-purification. La souche *WT* MWL9S1 a été transformée avec soit pACR1 (LexA-Rag8) seul (puits n°1), soit pACR4 (GST-Rag4C) seul (puits n°2), soit pACR1 (LexA-Rag8) et pACR4 (GST-Rag4C) (puits n°3) ou encore pACR1 (LexA-Rag8) et pACR7 (GST-Rag4C^{F569A-F573A}) (puits n°4). pACR1 porte la construction $P_{Rag8}LexA-RAG8$, pACR4 : $P_{ScGal1}GST-rag4^{544-787}$ et pACR7 : $P_{ScGal1}GST-rag4^{544-787 F569A-F573A}$. Les transformants ont été cultivés en milieu SG -ura, -leu ou -ura -leu. Les cellules ont été lysées dans le tampon RIPA modifié et la concentration des extraits protéiques a été mesurée et normalisée. GST-Rag4C a été purifié en utilisant de la résine protino-glutathione-agarose. La fraction « input » a été prélevée avant purification des extraits. Après séparation des protéines par SDS-PAGE puis Western blot, les protéines GST-Rag4C et LexA-Rag8 ont été immunodétectées (avec respectivement un anticorps anti-GST et un anticorps anti-LexA). La membrane correspondant à l'input a été colorée au rouge Ponceau pour constituer un contrôle de la charge protéique.

Après purification anti-GST, l'immunodétection anti-LexA (panneau supérieur) montre un signal faible mais spécifique dans le puits n°3, correspondant à la souche sauvage portant les plasmides LexA-Rag8 et GST-Rag4C. Ce résultat suggère une interaction (co-purification) entre LexA-Rag8 et GST-Rag4C dans une souche sauvage cultivée en présence de glucose. L'immunoprécipitation anti-LexA suivie d'une immunodétection de GST a été réalisée mais n'a pas confirmé ce résultat dans cette expérience. De plus, l'interaction observée ici entre LexA-Rag8 et GST-Rag4C n'est pas forcément le signe d'une interaction directe des deux

protéines. En effet, la queue cytoplasmique de Rag4 pourrait interagir avec une protéine d'un complexe comprenant au moins Rag4 et Rag8, mais sans pour autant interagir directement avec Rag8.

Les caséines kinases de type I ont parfois des sites d'interaction avec leurs substrats (ou « docking site ») qui sont différents des sites de phosphorylation. Chez les mammifères, pour les caséines kinases de type I α et ϵ , un site de fixation au substrat FXXXF a été décrit (Cheong and Virshup, 2011). Ce site consensus peut intervenir dans la formation d'un complexe dans lequel soit la protéine d'interaction soit une protéine tierce est phosphorylée. Un site FXXXF est présent dans la queue C-terminale de Rag4 (Figure 60). Cependant, Rag8 est un homologue des caséines kinases mammifères de type I γ et ce site n'a pas été décrit pour cet isoforme. De plus, ce site FXXXF n'est pas conservé dans les senseurs du glucose de *S. cerevisiae*, Snf3 et Rgt2 (Figure 76).

Nous avons toutefois muté ce site de fixation potentiel dans la queue C-terminale de Rag4 (plasmide pACR7 *P_{ScGAL1}GST-rag4*^{544-787 F569A-F573A}) et l'interaction GST-Rag4C avec LexA-Rag8 a été analysée dans ce mutant comme précédemment (Figure 58 ci-dessus, puits n°4). Aucune co-immunoprécipitation n'a été observée. Cependant, ce résultat, obtenu une seule fois, ne permet pas de conclure sur l'absence d'interaction de ce mutant de la queue cytoplasmique de Rag4 avec Rag8, mais il encourage à poursuivre cette expérience.

2. b. ii. Phosphorylation potentielle de la queue cytoplasmique du senseur du glucose Rag4 par la caséine kinase de type I Rag8

Puisque la caséine kinase Rag8 et la queue C-terminale cytoplasmique de Rag4 semblent interagir physiquement, nous avons recherché si cette interaction pouvait servir à phosphoryler la queue C-terminale de Rag4. D'une part, cette queue C-terminale contient deux sites consensus SXXS (voir page 42) de phosphorylation par les caséines kinases de type I (Figure 60). D'autre part, l'utilisation du logiciel ScanSite 3 (Obenauer et al., 2003) prédit une zone riche en sites potentiels de phosphorylation des caséine kinases. Nous avons voulu tester la capacité de Rag8 à phosphoryler la queue C-terminale de Rag4. Un essai kinase a été réalisé, comme décrit dans la Figure 4 de la Publication (Chapitre 1). LexA-Rag8 est exprimé à partir de pACR1 transformé dans une souche sauvage de *K. lactis*. GST-Rag4C a été purifié dans une souche bactérienne *E. coli* transformée par le plasmide pGEX-6P-3_RAG4_Clast. La phosphorylation de Sck1 par LexA-Rag8 issu de la même construction et de la même souche a constitué un témoin positif. Les résultats sont présentés dans la Figure 59.

Tandis que Rag8 est capable de phosphoryler Sck1 comme attendu, nous n'avons pas observé de phosphorylation de GST-Rag4C par Rag8 dans cet essai kinase. L'autophosphorylation de LexA-Rag8 est fonctionnelle dans les deux puits. Ainsi, malgré la présence de deux sites consensus de phosphorylation par Rag8 dans la queue C-terminale de Rag4, nous n'avons pas pu confirmer que la queue C-terminale de Rag4 est un substrat de la caséine kinase Rag8 *in vitro*. Comme pour le corépresseur Sms1 qui porte lui aussi des sites

consensus de phosphorylation par Rag8 mais dont la phosphorylation par Rag8 n'a pas pu être démontrée *in vitro* (Publication, Figure 4), on peut faire l'hypothèse que des facteurs extérieurs sont nécessaires à la phosphorylation par Rag8 de certains de ses substrats, comme par exemple la pré-phosphorylation du substrat par une autre kinase (Cheong and Virshup, 2011). Une autre hypothèse est que Rag8 ne phosphoryle pas Rag4 et que l'interaction Rag4-Rag8 sert de plateforme permettant à Rag8 de se rapprocher de son/ses substrats.

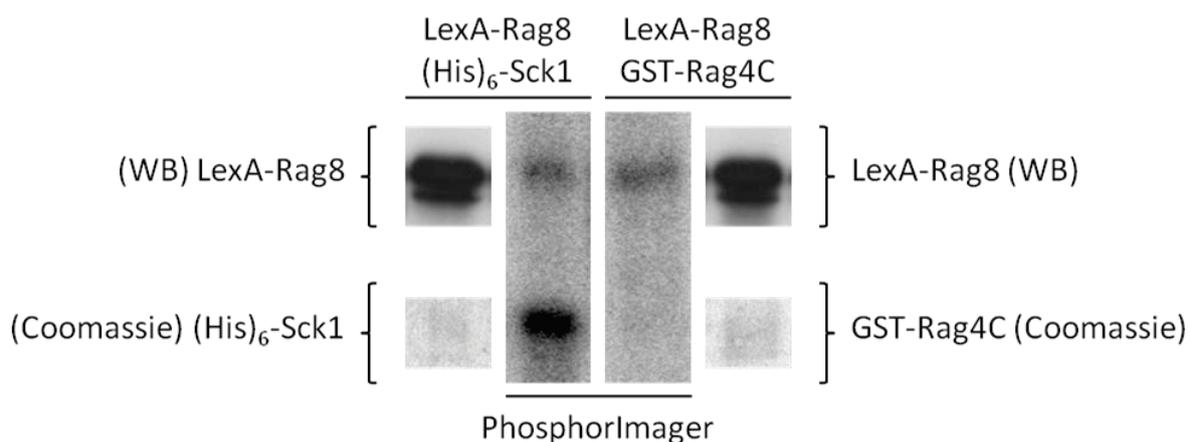


Figure 59: La caséine kinase I Rag8 ne phosphoryle par GST-Rag4C *in vitro*. Un essai kinase pour tester la phosphorylation de GST-Rag4C par la caséine kinase Rag8 a été réalisé. La souche sauvage MWL9S1 a été transformée par pACR1 qui exprime LexA-Rag8 sous son propre promoteur. Un transformant a été cultivé en milieu SG -ura. Les extraits protéiques pour l'immunoprécipitation de LexA-Rag8 ont été préparés en utilisant le tampon Neil. Une fraction de l'immunoprécipitation a été visualisée par Western blot (WB). (His)₆-Sck1 (pML155) et GST-Rag4C (pGEX-6P-3_RAG4_Clast) ont été purifiés à partir de cultures bactériennes. Après mise en contact de LexA-Rag8 et un des deux substrats dans le tampon kinase pendant 30 min à 30°C en présence de [γ -³²P]ATP, la réaction a été précipitée au TCA puis entièrement chargée dans un gel SDS-PAGE. Ce gel a été coloré au bleu de Coomassie pour observer la quantité de substrat, puis un écran sensible au phosphore a été exposé pendant 72 h avant lecture au PhosphorImager. (His)₆-Sck1 et GST-Rag4C ont une taille semblable (environ 60 kDa). L'expérience a été répétée deux fois.

2. c. Rôle de la queue C-terminale cytoplasmique du senseur du glucose Rag4 dans la signalisation du glucose - Conclusions

Ce travail a permis de définir les parties de la séquence de la queue C-terminale de Rag4 qui sont nécessaires à la signalisation du glucose, sans toutefois être suffisantes. Ces séquences sont annotées dans la Figure 60.

L'étude du phénotype Rag de différents mutants de Rag4 a permis de mettre en évidence une séquence d'acides aminés (539 à 686) qui est nécessaire à la signalisation du glucose, mais pas suffisante (Figure 54, Tableau 11, Figure 55 et Figure 60). Cette séquence contient notamment un motif très conservé chez les senseurs du glucose de *S. cerevisiae*, dont la présence est essentielle pour la signalisation du glucose mais dont le rôle n'est pas défini. Elle contient aussi un site consensus SXXS de phosphorylation par Rag8 et un site potentiel de fixation de Rag8. Cependant, la fonctionnalité de ces sites n'a pas pu être déterminée avec certitude : l'interaction potentielle avec Rag8 au site FXXXF n'a pas été confirmée (Figure 58) et la phosphorylation par Rag8 n'a pas été démontrée (Figure 59).

Le fait que la queue C-terminale, lorsqu'elle est surexprimée, se trouve être en partie membranaire suggère que cette queue C-terminale interagit avec une ou plusieurs protéines membranaires, comme nous l'avons montré avec la caséine kinase I Rag8 (Figure 58). De plus, il a été montré par double-hybride que Rag4 et Sms1 interagissent (Hnatova et al., 2008) mais la région de Rag4 impliquée n'a pas été déterminée. Chez *S. cerevisiae*, l'interaction de la queue C-terminale de Snf3 avec la membrane plasmique a été montrée (Dlugai et al., 2001) mais pas expliquée. Les corépresseurs Mth1 et Std1 interagissent en double-hybride avec Rgt2 et Snf3 via leur queue C-terminale (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000). Ainsi, l'ensemble de ces données suggère que la queue C-terminale de Rag4 pourrait interagir avec une ou des protéines formant un complexe dynamique nécessaire à la transmission du signal glucose.

```

536                                                                 YETNG 540
541 LSLEEIDELYKKSSSGINSIEWNKKIKAFFPDLFQTRTPNNEGDEADDNIHTDENYNHTI 600
601 SSYNGTQNNEKYPIQVQMPQFGVRNIEFLNNTGSSPQSDMTEPNFVDLGNGLGITTYQRG 660
661 PPSVLTDSSEEEEEGQQQETDETEEGKSFKHQYTDARNKNRGERGSFNSNSSTSGTTRSS 720
721 SHKASVQRMEEINLYMAQLMHRGGTDL SRNTTDNTHQPI SHDIMSQWNSSSQNKGPSTQ 780
781 TDINSNT 787

```

séquence conservée (Rag4, Rgt2, Snf3) (Özcan, Dover, and Johnston 1998)

sites **SXXS** de phosphorylation potentielle par Rag8 et **site de phosphorylation par les caséine kinase**
prédit par ScanSite 3

site de fixation potentiel des kinases CK1 α et e

séquence nécessaire mais non suffisante à la signalisation du glucose

Figure 60: Séquence en acides aminés de la queue C-terminale cytoplasmique du senseur du glucose Rag4. Les séquences potentiellement importantes pour la signalisation du glucose sont indiquées.

3. Contrôle de la stabilité du senseur du glucose Rag4 : conditions, domaines requis et mécanismes mis en jeu

La déstabilisation du senseur Rag4 a été mise en évidence dans un mutant de l'hexokinase en présence de glucose dans le Chapitre 1 (Publication, Figure 5A, 5B, 5C et 5D). Ces résultats mettent en évidence le contrôle de la stabilité de Rag4 par un signal issu de la glycolyse.

Nous avons voulu déterminer au mieux les conditions dans lesquelles le senseur du glucose Rag4 est déstabilisé. Nous avons testé l'effet de plusieurs drogues sur sa stabilité: l'iodoacétate a d'abord été utilisée comme inhibiteur de la GAPDH et a permis de montrer une déstabilisation du senseur du glucose lorsque la glycolyse est inhibée chimiquement (Publication, Figure 5E). Ensuite, le méthylglyoxal (MG) a été utilisé comme moyen chimique d'augmenter la glycation dans la cellule. En effet, la glycation induite par le MG déstabilise les perméases du glucose chez *S. cerevisiae* (Yoshida et al., 2011). Etant donné que les

enseurs du glucose sont des orthologues des perméases, nous avons voulu tester l'effet de la glycation sur Rag4. La stabilité de Rag4 après traitement au MG (10 mM, 30 min à 2 h) a été analysée par Western blot et en microscopie à fluorescence. Les résultats n'ont pas montré de sensibilité de Rag4 au traitement au MG (résultats non montrés).

Avant d'étudier le rôle de la queue C-terminale dans la régulation de la stabilité de Rag4 et de rechercher des domaines fonctionnels impliqués dans le contrôle de la stabilité de Rag4, nous nous sommes intéressés à l'effet de différentes sources de carbone sur la stabilité du senseur du glucose Rag4.

3. a. Stabilité du senseur du glucose en fonction de la source de carbone

Tout d'abord, nous avons vérifié l'expression relative du gène *RAG4* en fonction de la source de carbone. L'expression relative de *RAG4* avait déjà été mesurée par Northern blot (Betina et al., 2001) lorsque la source de carbone était du glucose ou du glycérol. Ici nous avons analysé l'effet du glucose ou du glycérol sur l'expression de *RAG4* dans une souche sauvage et dans un mutant de l'hexokinase par qRT-PCR (Figure 61).

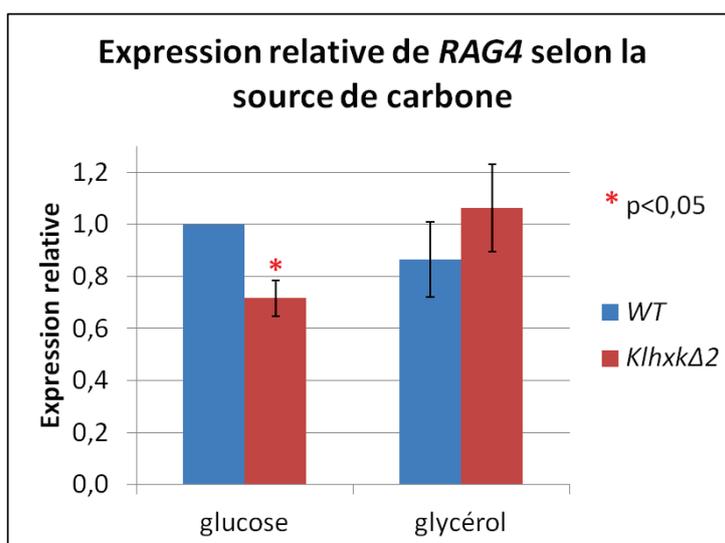


Figure 61: L'expression relative du gène du senseur du glucose *RAG4* ne varie pas en fonction de la source de carbone, dans une souche sauvage ou *KlhxkΔ2*. Les résultats ont été obtenus par qRT-PCR avec les souches MW270-7B (WT) et MWK11/F1 (*KlhxkΔ2*) cultivées en milieu YPG ou YPgly jusqu'en phase exponentielle de croissance. Les niveaux d'expression relative ont été normalisés par rapport au transcrite *KIAC1*. Les expressions sont exprimées relativement à la souche sauvage dont le niveau d'expression est fixé à 1. Les expressions relatives sont les moyennes de trois réplicats biologiques indépendants, les déviations standards sont représentées pour chaque échantillon. La signification statistique par rapport à la condition « sauvage, glucose » a été déterminée en calculant les p-values avec un test t de Student et elle est représentée par des astérisques.

L'expression de *RAG4* n'est pas régulée par la source de carbone dans la souche sauvage. Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment qui n'avaient pas montré de différence significative d'expression entre les deux sources de carbone (Betina et al., 2001). La seule différence d'expression significative de *RAG4* se trouve entre une souche sauvage et un mutant de l'hexokinase en présence de glucose, et a déjà été discuté dans le Chapitre 1 (Publication, Figure 1B).

Nous avons ensuite analysé l'effet de différentes sources de carbone sur la quantité et la répartition cellulaire de la protéine Rag4. Comme nous l'avons montré dans le Chapitre 1, la quantité de protéine Rag4-TAP est plus faible dans des cellules sauvages cultivées en présence de glycérol que dans des cellules sauvages cultivées en présence de glucose (Publication Figures 5A et 5B). Pour préciser l'effet de différentes sources de carbone sur la répartition de Rag4 dans les fractions membranaires, nous avons utilisé des expériences de séparation des membranes par ultracentrifugation. Les résultats présentés en Figure 62 montrent la détection de Rag4-TAP après séparation des membranes lourdes et légères à partir de cellules sauvages cultivées en présence de glucose ou de glycérol comme source de carbone.

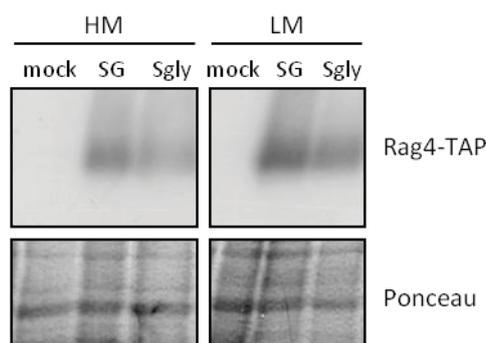


Figure 62: La répartition de Rag4-TAP dans les fractions membranaires varie en fonction de la source de carbone. La souche sauvage *RAG4-TAP* (MLK239) (ou MWL9S1, souche sans étiquette « mock ») a été cultivée en milieu synthétique glucose (SG) ou glycérol (Sgly). Les extraits protéiques ont été préparés dans le tampon MOPS, la concentration protéique a été mesurée et normalisée, puis les échantillons ont été soumis à centrifugation et ultracentrifugation pour séparer les fractions « membranes lourdes » (HM) et « légères » (LM). Rag4-TAP a été immunodéecté (anti-protéine A) après Western blot. La fraction contenant les protéines solubles n'est pas présentée ici, car elle ne contient pas de Rag4-TAP. La membrane a été colorée au rouge Ponceau pour constituer un contrôle de la charge protéique.

On peut ainsi observer que la quantité de Rag4-TAP présente dans les membranes lourdes (HM correspond entre autres à la membrane plasmique) est plus faible lorsque les cellules sont cultivées en présence de glycérol que lorsque la culture est réalisée en présence de glucose (Figure 62 : comparer SG et Sgly pour HM). Cette diminution est également observée dans la fraction correspondant aux membranes légères (LM) mais elle est moins importante que pour la fraction des membranes lourdes (HM). Ainsi, ces résultats confirment la diminution globale de la quantité de protéine Rag4 observée dans des cellules cultivées en absence de glucose. Ils indiquent également que cette diminution de quantité de Rag4 est plus importante dans les fractions membranaires lourdes correspondant à la membrane plasmique.

Les résultats précédant sont en adéquation avec les observations microscopiques de la localisation de GFP-Rag4 en absence de glucose (Publication, Figure 5D). En effet, les images montrent une accumulation du signal GFP dans la vacuole et un signal membranaire faible lorsque les cellules sont cultivées en présence de glycérol comme source de carbone. Afin de mieux comprendre la dynamique du système, la localisation de GFP-Rag4 a été analysée

après ajout de 2 % de glucose à des cellules cultivées dans un milieu pauvre en glucose, comme le milieu Sgly (Figure 63) ou le milieu Slactate (Figure 64).

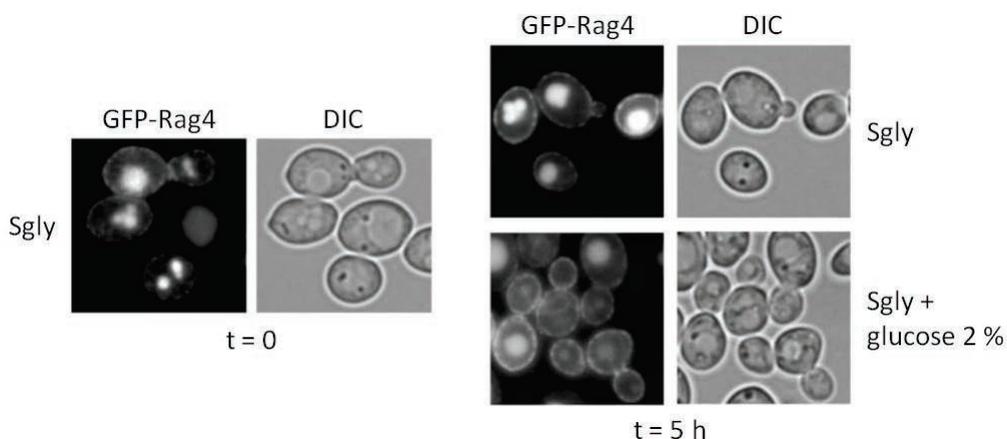


Figure 63: GFP-Rag4 s'accumule dans la vacuole en absence de glucose dans le milieu. Une souche *WT P_{SCGAL1}GFP-RAG4* (KIAS107) a été cultivée en milieu synthétique Sgly (source de carbone : glycérol) et observée au microscope à fluorescence en début de phase exponentielle de croissance. A $t = 0$, les cultures ont été séparées en deux et 2 % de glucose a été ajouté dans l'une des deux cultures (Sgly + glucose 2%) et rien dans l'autre (Sgly). Après 5 heures d'incubation les cellules ont été observées au microscope à fluorescence. Le microscope était équipé d'un filtre GFP (GFP) ou un optique Nomarski (DIC). Le temps d'exposition est le même pour chaque image. Les images présentées ont été traitées par Photoshop et sont représentatives de l'ensemble des cellules observées.

En présence de glycérol comme source de carbone, on observe un faible signal membranaire pour GFP-Rag4, et surtout une accumulation dans la vacuole pour la plupart des cellules sauvages. Ces résultats confortent ceux présentés dans la Publication (Figure 5D). Après ajout de glucose 2 % et incubation pendant cinq heures à 28°C, le signal fluorescent membranaire est renforcé alors que le signal vacuolaire tend à s'estomper. Ainsi, la localisation membranaire du senseur du glucose Rag4 est un processus dynamique qui répond à la présence de glucose extracellulaire, comme montré précédemment par la Figure 62. Cependant, des résultats non présentés ici ont montré que la relocalisation membranaire de GFP-Rag4 nécessite plusieurs heures après ajout de glucose au milieu de culture.

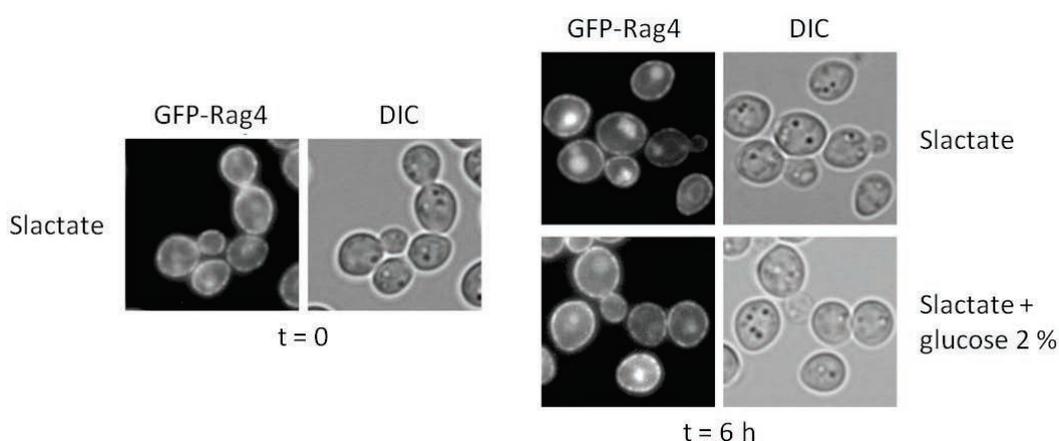


Figure 64: GFP-Rag4 est fortement présent à la membrane plasmique avec seulement 0,1 % de glucose dans le milieu. Une souche *WT P_{SCGAL1}GFP-RAG4* (KIAS107) a été cultivée en milieu synthétique Slactate (source de carbone : lactate 2 % et glucose 0,1 %) et observée au microscope à fluorescence en début de phase exponentielle de croissance. A $t = 0$, les cultures ont été séparées en deux et 2 % de glucose a été ajouté dans l'une des deux cultures (Slactate + glucose 2%) et rien dans l'autre (Slactate). Après 6 heures d'incubation les cellules ont été observées au microscope à fluorescence. Le temps d'exposition est le même pour

chaque image. Les images présentées ont été traitées par Photoshop et sont représentatives de l'ensemble des cellules observées.

Lorsqu'un mélange de lactate 2 % et de glucose 0,1 % est utilisé comme source de carbone, GFP-Rag4 est observé principalement à la membrane plasmique en microscopie à fluorescence, avec un léger signal dans certains compartiments cellulaires (Figure 64). La localisation de GFP-Rag4 est la même après six heures d'incubation en présence de 2 % de glucose (Slactate + glucose 2 %). Ainsi, le milieu synthétique lactate 2 % + glucose 0,1 % est un milieu pauvre en glucose, mais dont la concentration est suffisante pour entraîner une localisation membranaire de GFP-Rag4 semblable à celle obtenue avec 2 % de glucose. En revanche, à $t = 6$ h en milieu Slactate, le signal est plus intense dans la vacuole ce qui suggère que le glucose 0,1 % est épuisé.

Ainsi la quantité de Rag4 et surtout sa localisation cellulaire sont régulées par la source de carbone. Le glucose semble avoir le même effet sur la localisation de GFP-Rag4 à une concentration de 0,1 % ou de 2 %, ce qui confirme son rôle de senseur de haute et basse affinité au glucose décrit auparavant (Betina et al., 2001).

Au cours de ces travaux, nous avons montré que l'expression de *RAG4* n'est pas régulée par la source de carbone disponible. En revanche, la stabilité et la localisation cellulaire du senseur du glucose Rag4 sont contrôlées par la glycolyse (Chapitre 1), mais aussi par la source de carbone présente dans le milieu extracellulaire (Chapitres 1 et 2). Ces observations nous ont conduits à étudier les mécanismes et domaines protéiques impliqués dans le contrôle de la stabilité du senseur membranaire de glucose Rag4, en commençant par le rôle potentiel de la queue C-terminale cytoplasmique.

3. b. Stabilité de mutants de la queue C-terminale

Pour mieux comprendre comment la stabilité de Rag4 est régulée, nous avons étudié la stabilité de la protéine Rag4 lorsqu'elle est tronquée de toute sa queue C-terminale. En effet, chez *S. cerevisiae*, le senseur du glucose Rgt2 est stabilisé par la délétion de sa queue C-terminale cytoplasmique ($\Delta 546-763$), mais l'effet sur la fonctionnalité de la protéine n'a pas été déterminée dans cette étude (Roy and Kim, 2014). Nous avons voulu voir si ce mécanisme était conservé chez *K. lactis*, et nous avons aussi surexprimé de manière indépendante la queue C-terminale de Rag4 et analysé la stabilité de la protéine de fusion.

3. b. i. Stabilité de mutants tronqués de la queue C-terminale

Chez *K. lactis*, un mutant dans lequel Rag4 est tronqué de sa queue C-terminale présente un phénotype Rag⁻, révélateur d'une incapacité à transmettre correctement le signal glucose (Figure 54 page 144). Ce signal n'est pas propagé soit parce que la queue C-terminale est directement impliquée dans la signalisation du glucose, soit parce que la protéine tronquée n'est pas stable. Afin de répondre à cette dernière hypothèse, nous avons analysé la stabilité de la protéine Rag4¹⁻⁵³⁸-TAP (dépourvue de la queue C-terminale) par Western blot après

purification. Les résultats sont montrés dans la Figure 65. La délétion des 248 derniers acides aminés entraîne une réduction de 34 kDa de la masse moléculaire de la protéine.

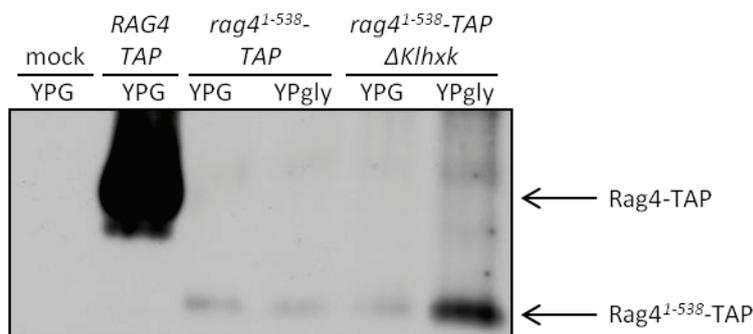


Figure 65: La protéine Rag4-TAP tronquée de sa queue C-terminale n'est pas stable. Les souches MWL9S1 (mock), MLK239 (*RAG4-TAP*), ACRK163 (*rag4¹⁻⁵³⁸⁻-TAP*) et ACRK165 ($\Delta Klhxk$ *rag4¹⁻⁵³⁸⁻-TAP*) ont été cultivées en milieu riche glucose (YPG) ou glycérol (YPgly) jusqu'en phase exponentielle de croissance. Les protéines sont extraites avec le tampon RIPA et une purification de la protéine A (comprise dans l'étiquette TAP) avec de la résine IgG sépharose a été réalisée. Après séparation par SDS-PAGE et Western blot, la protéine Rag4-TAP a été immunodéctées (anti-protéine A). Les quantités de cellules avant extraction étaient les mêmes pour les différentes conditions, et la concentration des échantillons a été normalisée après extraction protéique.

Comme le montre ces résultats, seule une très faible quantité de Rag4¹⁻⁵³⁸⁻-TAP a pu être purifiée et détectée, comparé à la protéine entière (Rag4-TAP). De plus, la source de carbone ne semble pas avoir un effet sur la quantité de Rag4¹⁻⁵³⁸⁻-TAP. La faible quantité de Rag4 observée dans ces mutants Rag4¹⁻⁵³⁸⁻-TAP explique peut-être leur phénotype Rag⁻ (Figure 54). Il peut y avoir plusieurs explications :

- L'étiquette TAP est mal repliée donc mal purifiée et détectée (il y a seulement trois acides aminés après le dernier domaine transmembranaire).
- L'étiquette TAP rend la protéine non-fonctionnelle, ce qui expliquerait le phénotype Rag⁻ observé. La protéine non-fonctionnelle serait activement dégradée.
- La protéine Rag4 sans sa queue cytoplasmique n'est pas stable.
- La construction n'est pas correctement exprimée.

De plus, la délétion de l'hexokinase n'entraîne pas de diminution supplémentaire de la quantité totale de Rag4¹⁻⁵³⁸⁻-TAP dans les cellules. Ceci suggère que le signal issu de la glycolyse cible la queue C-terminale de Rag4 afin de réguler la stabilité du senseur du glucose chez *K. lactis*. La différence de quantité détectée entre YPgly et YPG dans le mutant $\Delta Klhxk$ n'est pas reproductible.

3. b. ii. Stabilité d'une protéine de fusion surexprimant la queue C-terminale de Rag4

Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que la surexpression de la queue C-terminale de Rag4 (plasmide pACR4) dans un mutant *rag4-1* ne permet pas de restaurer un phénotype Rag⁺ (Figure 55). En analysant la stabilité de la protéine Rag4 tronquée de sa queue C-terminale, nous avons suggéré que la queue C-terminale pourrait avoir un rôle dans la stabilisation de la protéine entière (Figure 65). Nous nous sommes intéressés à la stabilité

de la queue C-terminale seule, en fonction de la source de carbone et de l'activité de la glycolyse. Dans un premier temps, la souche sauvage et le mutant de l'hexokinase portant le plasmide pACR4 (qui surexprime GST-Rag4C) ont été cultivés en présence de glycérol comme source de carbone avant de subir une stimulation glucose (Figure 66A). Ensuite, la stabilité de GST-Rag4C a été analysée dans les mêmes souches après culture avec soit du glycérol, soit du glucose comme source de carbone (Figure 66B).

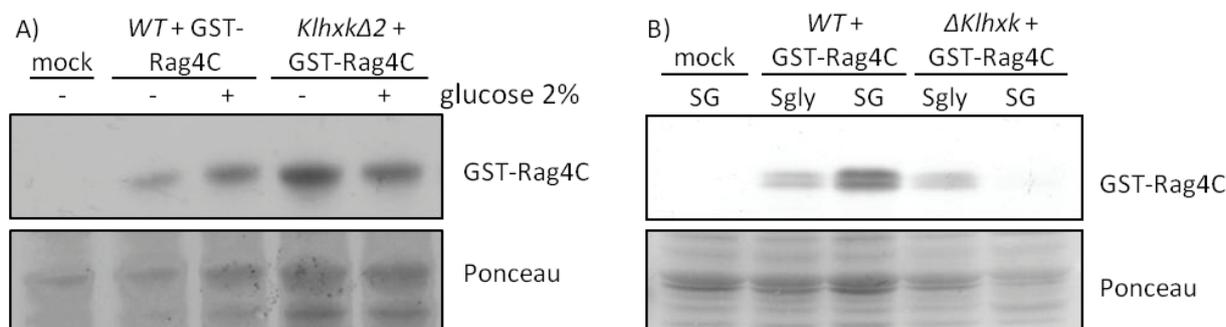


Figure 66: La stabilité de la queue C-terminale de Rag4 est régulée de la même manière que la protéine entière par la source de carbone extracellulaire et l'activité de la glycolyse. A) Les souches MW270-7B (mock), MW270-7B + pACR4 (WT + GST-Rag4C) et MWK11/F1 + pACR4 (*K1hxkΔ2* + GST-Rag4C) ont été cultivées en milieu synthétique glycérol complet ou -leu jusqu'en phase exponentielle. Les cultures ont été séparées en deux et la moitié a été supplémentée avec du glucose 2 % pendant 30 minutes. Les protéines ont été extraites selon le protocole de Kushnirov, puis les extraits ont été chargés dans un gel SDS-PAGE pour réaliser un Western blot et une immunodétection anti-GST. La membrane a été colorée au rouge Ponceau comme témoin de la charge protéique. B) Les souches MWL9S1 (WT, mock), MWL9S1 + pACR4 (WT + GST-Rag4C) et ACRK95 + pACR4 (*ΔK1hxk* + GST-Rag4C) ont été cultivées en milieu synthétique complet ou -leu, avec du glycérol (Sgly) ou du glucose (SG) comme source de carbone. Les extraits cellulaires ont ensuite été préparés et analysés comme en A).

En A), le Western blot ne montre pas de différence de quantité de GST-Rag4C avant et après stimulation glucose (30 minutes en présence de glucose 2 %) dans une souche sauvage. La quantité de GST-Rag4C est également similaire dans une souche WT et un mutant de l'hexokinase. Par contre, en B), la quantité de GST-Rag4C est plus importante après culture en présence de glucose qu'après culture en présence de glycérol pour une souche sauvage. Dans le mutant de l'hexokinase, GST-Rag4C est très peu visible en présence de glucose, alors qu'en présence de glycérol sa quantité est comparable à celle de la souche sauvage dans les mêmes conditions.

Ces résultats sont semblables à ceux qui ont été obtenus avec la protéine Rag4 entière (Publication, Figure 5A et 5B) : le senseur (entier ou seulement sa queue C-terminale) est plus stable en présence de glucose, sauf pour un mutant de l'hexokinase dans lequel le glucose entraîne la dégradation de la protéine. Ainsi, la stabilité de la protéine est régulée par la source de carbone et par l'activité de la glycolyse, mais l'adaptation à un changement de source de carbone prend plusieurs heures.

3. c. Mécanismes et domaines protéiques impliqués dans la déstabilisation de Rag4

Le senseur du glucose Rag4 est un homologue de la famille des perméases au glucose *HXT* de *S. cerevisiae* (Betina et al., 2001). Il est connu que, dans certaines conditions, ce type de transporteurs est endocytosé puis recyclé après ubiquitination (Haguenauer-Tsapis and

André, 2004; Lauwers and André, 2006; Finley et al., 2012; Horák, 2013). Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que la stabilité des senseurs du glucose Snf3 et Rgt2 est régulée par ubiquitination et dégradation dans la vacuole après endocytose (Roy and Kim, 2014). L'ubiquitination des protéines a lieu sur certaines lysines qui sont spécifiquement ciblées par des ubiquitine ligases.

Puisque, chez *K. lactis*, Rag4 est dégradé dans certaines conditions, comme ses homologues Snf3 et Rgt2 et de nombreuses autres protéines membranaires, nous avons émis l'hypothèse que les processus de contrôle de la stabilité soient les mêmes. Nous avons utilisé des programmes bioinformatiques pour rechercher dans Rag4 des domaines qui pourraient être impliqués dans les mécanismes de dégradation mis en œuvre pour altérer la stabilité de la protéine. Nous avons ensuite construit des mutants de ces séquences pour tester leur impact réel sur la stabilité de Rag4 dans différentes conditions.

3. c. i. Prédiction bioinformatique des domaines du senseur Rag4 impliqués dans le contrôle de la dégradation de la protéine

Chez *S. cerevisiae*, deux lysines dans la queue C-terminale cytoplasmique de Rgt2 ont été identifiées comme nécessaires à l'ubiquitination de la protéine (K637 et K657) (Roy and Kim, 2014). Cependant un alignement de séquences montre que ces deux lysines ne sont conservées ni chez Snf3 ni chez Rag4 (Figure 76). Chez *K. lactis*, nous avons analysé la séquence de Rag4 pour prédire bio-informatiquement des sites d'ubiquitination ou des domaines potentiellement impliqués dans le contrôle de la stabilité de Rag4, afin de construire des mutants de ces domaines et d'étudier la stabilité de la protéine mutée.

Pour rechercher des lysines potentiellement ubiquitinées dans la séquence de Rag4, nous avons utilisé le programme de prédiction Ubpred (<http://www.ubpred.org/>) (Radivojac et al., 2010). Nous avons également recherché la présence de domaines PEST : il s'agit de séquences riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine, qui constitueraient une séquence signal pour la dégradation protéique de certaines protéines (Rogers et al., 1986). Ces domaines PEST sont parfois identifiés comme important pour l'ubiquitination, l'endocytose et le recyclage ou la dégradation des protéines membranaires (Rechsteiner and Rogers, 1996; Roth and Davis, 2000). Le programme epestfind (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/epestfind>) a été utilisé pour prédire la présence de séquences PEST potentielles dans Rag4 (Schuster and Grabner, 1986). Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 67A et B.

Afin de déterminer le rôle de ces domaines ou acides aminés dans la stabilité de Rag4, des mutants ont été construits, dans un contexte sauvage et dans un mutant de l'hexokinase. Seuls les sites prédits avec une forte probabilité ont été mutés, afin de mettre en évidence un changement dans la stabilité du senseur Rag4 dans ces mutants. Leur étude est décrite dans la suite de ce chapitre.

A) Site ou séquence	Rôle présumé	Score de prédiction bioinformatique
K40	site d'ubiquitination	0,96 - fort
K611	site d'ubiquitination	0,73 - moyen
659 RGPPSVLTDSSSEEEEEEGQQQETDETEEGK 687	signal protéolytique	DEPST: 62,48 % score : 22,50
K687	site d'ubiquitination	0,95 - fort
K690	site d'ubiquitination	0,89 - fort
K723	site d'ubiquitination	0,91 - fort
K775	site d'ubiquitination	0,95 - fort

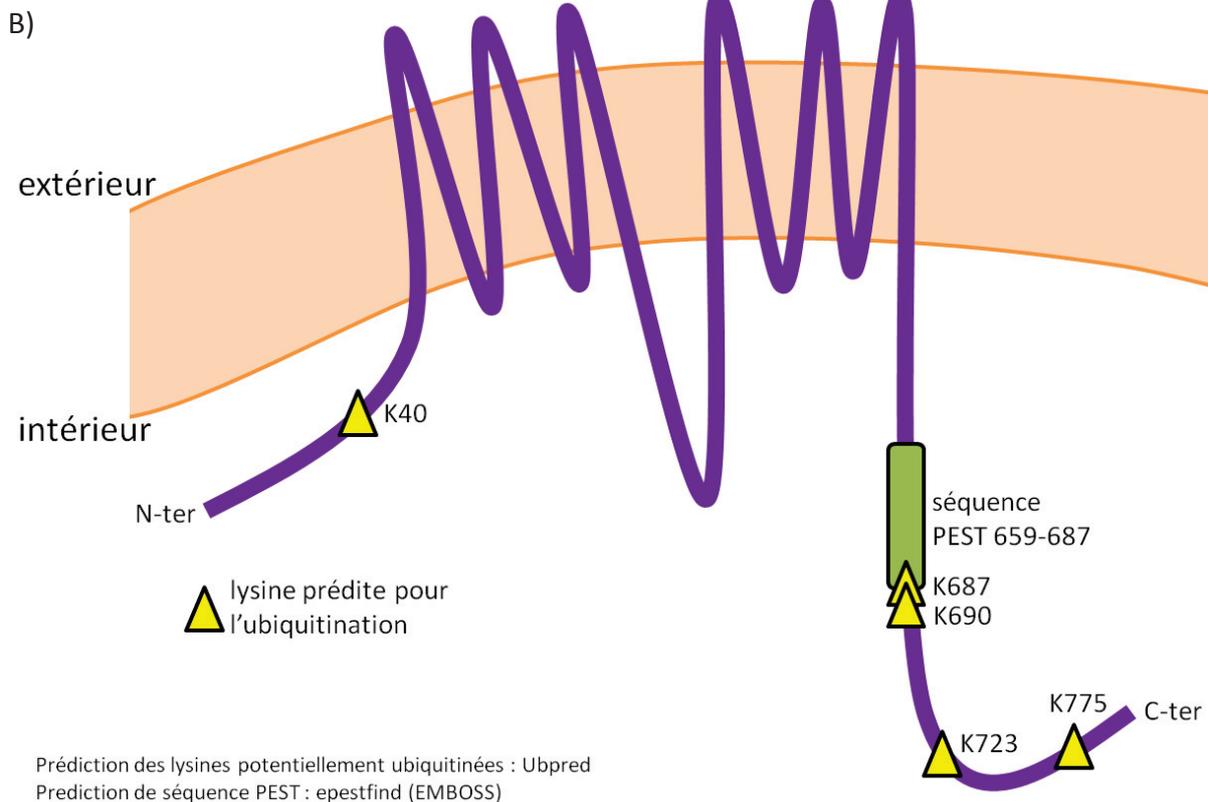


Figure 67: Les sites ou séquence potentiellement impliqués dans le contrôle de la stabilité sont indiqués, selon les prédictions bioinformatiques. A) Pour les prédictions de sites d'ubiquitination par le site Ubpred, un score s est attribué à chaque lysine et définit le degré de confiance de la prédiction selon les valeurs suivantes : faible confiance : $0,62 < s < 0,69$, confiance moyenne : $0,69 < s < 0,84$ et forte confiance : $0,84 < s < 1,00$. Pour le logiciel epestfind, une séquence PEST est considérée comme potentielle lorsque le score est supérieur à 5. La valeur DEPST indique le pourcentage de la masse de ces acides aminés par rapport à la masse de la séquence complète. B) Les domaines potentiellement impliqués dans le contrôle de la stabilité du senseur Rag4 sont représentés selon la topologie de la protéine. La séquence PEST est indiquée en vert et des lysines potentiellement ubiquitinées sont représentées par des triangles jaunes. Pour les lysines, seuls les sites prédits avec une forte probabilité sont indiqués.

3. c. ii. Construction de mutants *rag4* dont les séquences potentiellement impliquées dans la stabilité de la protéine ont été modifiées et détermination de leur fonctionnalité

Tout d'abord nous avons construit des mutants dans lesquels la séquence PEST de Rag4 a été déléetée. Ces mutants ont été construits par « Delitto-Perfetto » (Storici et al., 2001) dans

des souches sauvage et $\Delta Klhxk$ exprimant $3HA-RAG4$ sous le contrôle du promoteur P_{ScGAL1} . Le dernier acide aminé de la séquence PEST a été conservé : il s'agit d'une lysine potentiellement ubiquitinée et son maintien permet d'étudier de manière indépendante la fonction de la séquence PEST et celle de cette lysine. La construction obtenue est la suivante : $KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{\Delta 659-686}$ qui sera ensuite dénommée $rag4^{\Delta PEST}$ pour simplification. Toujours par « Delitto-Perfetto » et dans le même contexte génétique, des souches ont été construites dans lesquelles certaines des cinq lysines identifiées comme potentiellement ubiquitinées ont été mutées en arginines. Trois mutants différents ont été construits : le premier est un mutant de la lysine K40, le deuxième est un mutant des lysines K687 et K690 et le dernier est un mutant des lysines K723 et K775. Afin de déterminer si ces différentes mutations affectent la fonctionnalité de Rag4, le phénotype Rag de chacun de ces mutants a été analysé (Figure 68).

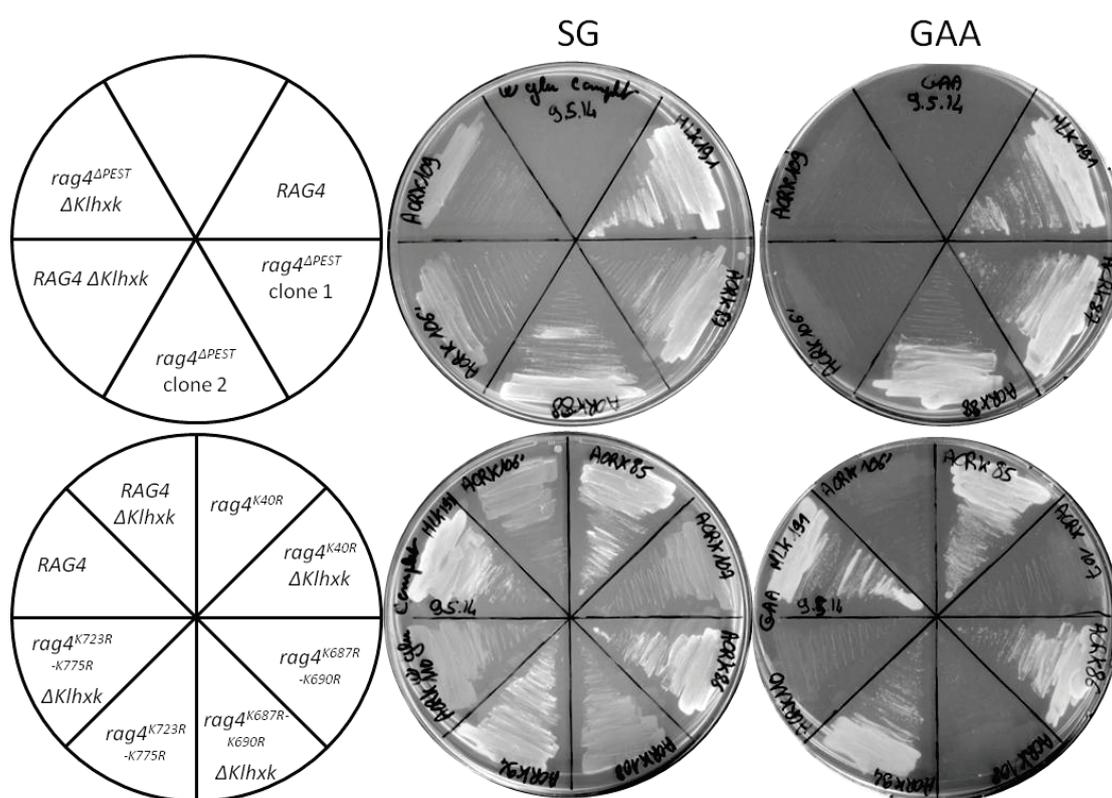


Figure 68: La délétion de la séquence PEST ou la mutation de lysines potentiellement ubiquitinées du senseur Rag4 ne modifie pas le phénotype Rag. Les souches suivantes : MLK191 ($P_{ScGAL1}3HA-RAG4$), ACRK87 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{\Delta PEST}$), ACRK88 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{\Delta PEST}$), ACRK106 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-RAG4$), ACRK109 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-rag4^{\Delta PEST}$), ACRK85 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K40R}$), ACRK107 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K40R}$), ACRK86 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K687R-K690R}$), ACRK108 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K687R-K690R}$), ACRK94 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K723R-K775R}$) et ACRK110 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K723R-K775R}$) ont été striées sur un milieu GAA (inhibition de la respiration par l'antimycine A) et un milieu synthétique SG. Les boîtes ont été photographiées après 48 h de croissance.

Les souches portant les différentes mutations dans un contexte sauvage pour l'hexokinase sont toutes Rag⁺ et poussent sur milieu GAA à la même vitesse que la souche parentale MLK191. Ainsi, les délétions de la séquence PEST ou les mutations des lysines potentiellement ubiquitinées ne perturbent pas la capacité du senseur Rag4 à transmettre le signal glucose vers l'intérieur de la cellule. Nous avons également strié les souches $\Delta Klhxk$ sur milieu SG et GAA pour vérifier leur phénotype Rag⁻.

Afin de déterminer de manière plus précise l'impact de ces mutations sur la capacité de Rag4 à transmettre le signal glucose, nous avons analysé dans chacun des mutants le niveau de phosphorylation de *K/Rgt1* comme un indicateur de l'activité de la voie de signalisation du glucose. Les différentes souches ont été cultivées dans un milieu synthétique glycérol puis du glucose 2 % a été ajouté au milieu de culture, 30 minutes avant la collecte des cellules. Après extraction protéique, le niveau de phosphorylation de *K/Rgt1* a été déterminé par Western blot et immunodétection (Figure 69). Seuls les résultats pour les souches construites dans un contexte sauvage pour l'hexokinase sont montrés, car on attend que dans les souches construites dans un contexte $\Delta K1hxk$, *K/Rgt1* ne soit pas phosphorylé en présence de glucose.

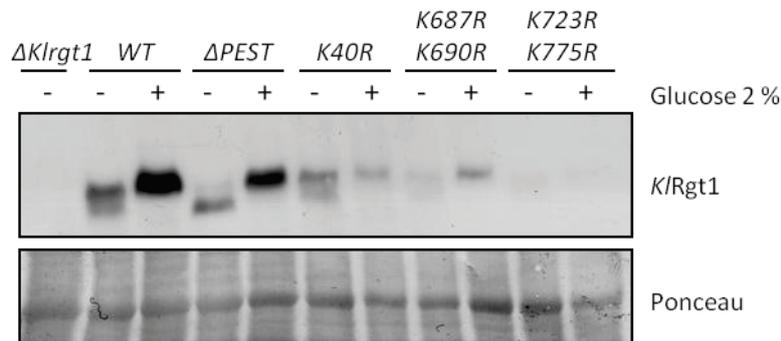


Figure 69: Le répresseur *K/Rgt1* est phosphorylé après stimulation glucose dans différents mutants *rag4*. Les souches suivantes ont été cultivées en milieu Sgly avant ajout de glucose 2 %, 30 minutes avant la collecte des cellules : $\Delta Klrgt1$: ACRK128 ; WT : MLK191 ($P_{ScGAL1}3HA-RAG4$) ; $\Delta PEST$: ACRK87 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{\Delta PEST}$) ; K40R : ACRK85 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K40R}$) ; K687R-K690R : ACRK86 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K687R-K690R}$) et K723R-K775R : ACRK94 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K723R-K775R}$). Les protéines ont été extraites selon le protocole de Kushnirov. Après Western blot, *K/Rgt1* a été immunodéTECTÉ directement par l'anticorps anti-*K/Rgt1*. La membrane a été colorée au rouge Ponceau pour constituer un contrôle de la charge protéique.

Dans toutes les souches, un changement de mobilité électrophorétique de *K/Rgt1* est observé en présence de glucose, ce qui correspond à la phosphorylation du répresseur transcriptionnel et indique que la voie de signalisation du glucose est correctement activée. Pour la souche portant une délétion de la séquence PEST de Rag4, le niveau de phosphorylation de *K/Rgt1* en absence de glucose semble plus faible que dans la souche sauvage. Pour les souches dans lesquelles des lysines potentiellement ubiquitinées ont été mutées, la détection de *K/Rgt1* est très faible, particulièrement pour la souche mutée pour les lysines 723 et 775. Cette faible détection de *K/Rgt1* est reproductible et n'est pas due à une plus faible quantité de protéines totales dans ces échantillons. Une explication est que dans ces mutants, *K/Rgt1* porte des modifications post-traductionnelles (phosphorylation ?) qui masquent le site de fixation de l'anticorps à la protéine. L'anticorps anti-*K/Rgt1* a été produit contre un domaine interne de *K/Rgt1* (acides aminés 338 à 730) et l'utilisation d'outil de prédiction de sites de phosphorylation (ScanSite 3.0 (Obenauer et al., 2003)) met en évidence de nombreux sites de phosphorylation potentiels dans cette zone. Cela signifierait que la mutation des lysines potentiellement ubiquitinées de Rag4 perturberait l'état post-traductionnel de *K/Rgt1*, bien que cela ne semble pas avoir d'effet sur la signalisation du glucose (Figure 68 : phénotype Rag⁺).

Chez *S. cerevisiae*, la quantité de ScRgt1 n'a jamais été décrite dans la littérature comme étant régulée au niveau protéique. La voie de signalisation du glucose n'est pas non plus

connue pour réguler l'expression du gène *ScRGT1*. Toutefois, nous ne pouvons pas écarter ces deux hypothèses de régulation de ScRgt1 au niveau génique ou protéique dans ces mutants.

3. c. iii. Etude de la stabilité de mutants *rag4*

Le but de la construction des différents mutant *rag4* est de vérifier l'implication des séquences mutées dans le contrôle de la stabilité de la protéine. Nous avons vu que les différentes mutations de *RAG4* n'affectent pas (ou peu) la capacité du senseur à transmettre un signal glucose fonctionnel. La stabilité de la protéine Rag4 portant ces séquences mutées a été analysée et les résultats sont présentés dans les points qui suivent.

• Mutants de la séquence PEST

Nous avons tout d'abord étudié l'effet de la délétion de la séquence PEST de Rag4 sur la stabilité du senseur du glucose, en présence de glucose et dans un contexte génétique sauvage ou mutant de l'hexokinase. Pour cela, les souches codant pour *3HA-RAG4* sauvage et celles codant pour *3HA-rag4^{ΔPEST}* ont été cultivées en milieu synthétique glucose. Après préparation des extraits protéiques, une ultracentrifugation a permis de récupérer toutes les protéines membranaires dans une seule fraction (Figure 70). La délétion de la séquence PEST conduit à une protéine Rag4 comportant 17 acides aminés en moins, ce qui entraîne une augmentation de la mobilité électrophorétique de la protéine et correspond à une diminution de la taille de la protéine de 3 kDa. Ce changement de taille est visible sur la Figure 70 dans le puits « *ΔPEST* ».

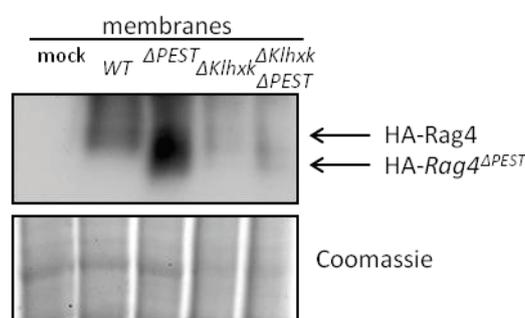


Figure 70: La délétion de la séquence PEST de Rag4 ne perturbe pas la stabilité du senseur en présence de glucose, en contexte sauvage ou hexokinase déléetée. Les souches suivantes : mock : MWL9S1 ; WT : MLK192 (*P_{SCGAL1}3HA-RAG4*) ; *ΔPEST* : ACRK88 (*P_{SCGAL1}3HA-rag4^{ΔPEST}*) ; *ΔKlhxk* : ACRK106 (*ΔKlhxk P_{SCGAL1}3HA-RAG4*) et *ΔKlhxk ΔPEST* : ACRK109 (*ΔKlhxk P_{SCGAL1}3HA-rag4^{ΔPEST}*) ont été cultivées en milieu synthétique glucose (SG). Les cellules ont été collectées en phase exponentielle de croissance et, après lyse cellulaire dans le tampon MOPS, une fraction protéique enrichie en membranes a été préparée par ultracentrifugation des extraits protéiques. La concentration protéique des extraits a été mesurée et normalisée. Après séparation par SDS-PAGE puis Western blot, les protéines 3HA-Rag4 et 3HA-Rag4^{ΔPEST} ont été immunodétectées (anti-HA). Un gel SDS-PAGE chargé avec les mêmes extraits a été coloré au bleu de Coomassie pour constituer un témoin de la charge protéique. Les extraits protéiques correspondant aux protéines solubles ont été préparés, chargés sur gel et soumis à immunodétection de HA, mais les résultats ne sont pas montrés car ces fractions ne contiennent pas de 3HA-Rag4.

Dans les souches *WT*, la quantité de 3HA-Rag4 est similaire avec ou sans la séquence PEST (la légère augmentation de protéine visible dans le puits *ΔPEST* n'est pas reproductible). Dans le mutant *ΔKlhxk*, la protéine 3HA-Rag4 est toujours difficilement détectable en présence de glucose, due à sa déstabilisation (voir Chapitre 1). La délétion de la séquence PEST de Rag4

dans le mutant de l'hexokinase n'a pas d'influence sur l'abondance du senseur à la membrane. On observe simplement une différence de mobilité électrophorétique. Dans l'ensemble, la délétion de la séquence PEST ne semble pas conduire à une modification de la stabilité de Rag4. Ainsi la séquence PEST de Rag4 ne semble ni réguler la stabilité de Rag4 en présence de glucose dans le milieu, ni être impliqué dans le contrôle de la stabilité de Rag4 par la glycolyse.

Cependant, comme la stabilité et la localisation cellulaire du senseur du glucose Rag4 sont également régulées selon la source de carbone disponible dans l'environnement, nous nous sommes intéressés à l'effet de la délétion de la séquence PEST sur la stabilité et la répartition membranaire de Rag4 en absence de glucose dans le milieu de culture. Les résultats de la séparation par ultracentrifugation des fractions membranaires « lourdes » et « légères » sont montrés dans la Figure 71.

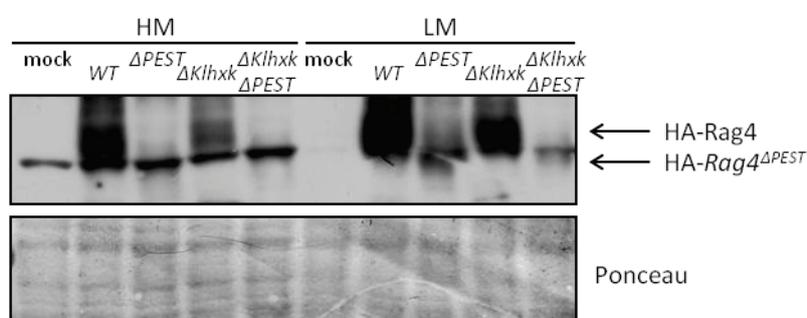


Figure 71: La délétion de la séquence PEST de Rag4 perturbe la stabilité et la répartition membranaire du senseur en absence de glucose. Les souches suivantes : mock : MWL9S1 ; WT : MLK191 ($P_{ScGAL1}3HA-RAG4$) ; $\Delta PEST$: ACRK87 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{\Delta PEST}$) ; $\Delta Klhxk$: ACRK106 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-RAG4$) et $\Delta Klhxk \Delta PEST$: ACRK109 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-rag4^{\Delta PEST}$) ont été cultivées dans un milieu sans glucose Sgly. Les extraits protéiques ont été préparés dans le tampon MOPS puis soumis à centrifugation et ultracentrifugation pour séparer les fractions membranaires « lourdes » (HM, membranes plasmique et des organelles) et « légères » (LM, membranes des vésicules de transport). La concentration protéique des extraits a été mesurée et normalisée. Après séparation par SDS-PAGE et Western blot, les protéines 3HA-Rag4 et 3HA-Rag4^{ΔPEST} ont été immunodétectées (anti-HA). La membrane a été colorée au rouge Ponceau pour constituer un témoin de charge protéique. Les extraits protéiques correspondant aux protéines solubles ont été analysés de la même manière mais les résultats ne sont pas présentés car 3HA-Rag4 n'est pas détecté dans ces fractions.

La quantité de 3HA-Rag4 immunodétectée est inférieure dans les souches portant la délétion de la séquence PEST de *RAG4* ($\Delta PEST$ et $\Delta Klhxk \Delta PEST$), à la fois dans la fraction « membranes lourdes » et dans la fraction « membranes légères ». Malheureusement une bande aspécifique dans la fraction HM de la même taille que Rag4^{ΔPEST} gêne partiellement sa détection. Il serait judicieux de tester un autre anticorps anti-HA sur ces extraits. Toutefois, il apparaît que la protéine 3HA-Rag4^{ΔPEST} est moins stable que 3HA-Rag4 en absence de glucose, dans un contexte sauvage comme dans un contexte $\Delta Klhxk$. La séquence PEST aurait un rôle dans la stabilisation de la protéine en absence de glucose extracellulaire, de manière indépendante du contrôle exercé par la glycolyse sur la stabilité de Rag4.

En conclusion, la séquence PEST prédite bio-informatiquement dans la queue C-terminale de Rag4 ne semble pas impliquée dans la signalisation du glucose car sa délétion n'affecte ni le phénotype Rag (Figure 68) ni le niveau de phosphorylation de *K/Rgt1* en présence de glucose (Figure 69). La stabilité de Rag4 n'est pas affectée en présence de glucose lorsque la séquence PEST est absente, que la glycolyse soit fonctionnelle ou non (Figure 70). Par contre,

dans un milieu dépourvu de glucose, Rag4^{ΔPEST} est déstabilisé (Figure 71) et K/Rgt1 est hypophosphorylé (Figure 69). D'après la littérature, nous nous attendions plutôt à ce que la délétion de la séquence PEST stabilise la protéine, puisque ce type de domaine est décrit comme nécessaire à la dégradation des protéines. Ainsi la séquence PEST aurait un rôle dans le maintien de la stabilité de Rag4 en réponse à la source de carbone extracellulaire.

- Mutants des lysines potentiellement ubiquitinées K->R

Comme pour les mutants de la séquence PEST, nous avons étudié les effets de la mutation des lysines potentiellement ubiquitinées sur la stabilité de Rag4, dans un contexte sauvage et dans un mutant $\Delta Klhxk$. La stabilité de Rag4 dans ces mutants a d'abord été analysée en présence de glucose. Les résultats sont présentés dans la Figure 72 : A) lysine 40 et B) lysines 687-690 et 723-775.

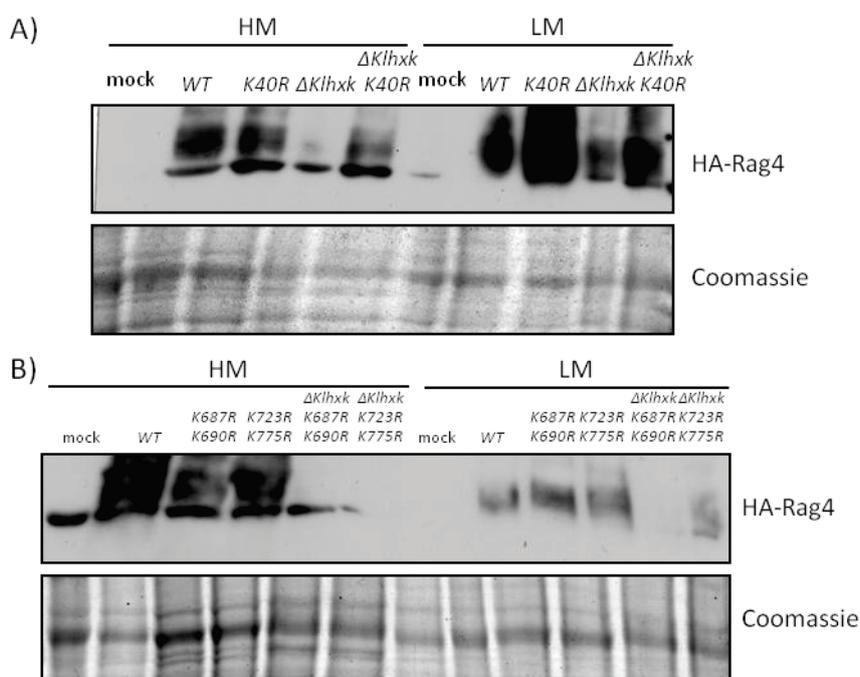


Figure 72: Seule la lysine 40 de Rag4 est impliquée dans le contrôle de la stabilité et de la répartition membranaire du senseur par la glycolyse, en présence de glucose. A) Les mutants de la lysine 40 ont été cultivées en milieu synthétique glucose SG. Les souches utilisées sont les suivantes : mock : MWL9S1 ; WT : MLK191 ($P_{ScGAL1}3HA-RAG4$) ; K40R : ACRK85 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K40R}$) ; $\Delta Klhxk$: ACRK106 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-RAG4$) et $\Delta Klhxk$ K40R : ACRK107 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K40R}$). Les extraits protéiques préparés dans le tampon MOPS ont été centrifugés pour récupérer la fraction « membranes lourdes » (HM, membranes plasmique et des organelles) puis ultracentrifugés pour récupérer la fraction « membranes légères » (LM, membranes des vésicules de transport). Après séparation par SDS-PAGE et Western blot, la protéine 3HA-Rag4 a été immunodéctée (anti-HA). Un autre gel SDS-PAGE a été chargé avec une quantité identique des mêmes extraits et colorés au bleu de Coomassie pour constituer un témoin de la charge protéique. La fraction correspondant aux protéines solubles a été également préparée et chargée dans le gel, mais les résultats ne sont pas montrés ici car cette fraction ne contient pas 3HA-Rag4. B) Les mutants des lysines 687-690 et 723-775 ont été cultivés en milieu SG puis préparés et analysés de la même manière que en A). Les souches utilisées sont les suivantes : mock : MWL9S1 ; WT : MLK191 ($P_{ScGAL1}3HA-RAG4$) ; K687R-K690R : ACRK86 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K687R-K690R}$) ; K723R-K775R : ACRK94 ($P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K723R-K775R}$) ; $\Delta Klhxk$ K687R-K690R : ACRK108 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K687R-K690R}$) et $\Delta Klhxk$ K723R-K775R : ACRK110 ($\Delta Klhxk P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K723R-K775R}$).

La mutation de la lysine 40 (Figure 72A) ne modifie pas la quantité de 3HA-Rag4 observée dans une souche au contexte sauvage en présence de glucose, dans les fractions

membranaires « lourdes » et « légères ». La quantité plus importante de 3HA-Rag4 dans la souche *K40R* par rapport à la souche sauvage dans la fraction « membranes légères » n'est pas reproductible. Par contre, dans un contexte $\Delta Klhxk$, la mutation *K40R* semble stabiliser le senseur présent à la membrane plasmique (« membranes lourdes ») en présence de glucose car on observe plus de 3HA-Rag4 dans cette condition que dans la souche $\Delta Klhxk$ avec *RAG4* sauvage.

Les mutations des lysines 687-690 et 723-775 (Figure 72B) ne modifient pas la stabilité observée de 3HA-Rag4 en présence de glucose, ni dans la fraction « membranes lourdes » ni dans la fraction « membranes légères » dans un contexte sauvage. Dans la fraction HM, la quantité légèrement plus importante de 3HA-Rag4 dans la souche *RAG4* sauvage n'est pas reproductible. Dans un contexte $\Delta Klhxk$, la protéine 3HA-Rag4 est dégradée dans les deux fractions membranaires pour les deux mutants (*K687R-K690R* et *K723R-K775R*). Toutefois, l'expérience présentée n'a pas été réalisée en présence d'un mutant $\Delta Klhxk$ possédant une version sauvage de *RAG4* et ne permet pas de conclure sur l'implication de ces lysines dans la déstabilisation de Rag4 induite par la glycolyse non fonctionnelle.

En conclusion, la lysine 40 semble être impliquée dans le contrôle de la stabilité de Rag4 par la glycolyse, en présence de glucose extracellulaire. Par contre, les lysines 687-690 et 723-775 ne semblent pas affecter la stabilité de Rag4 lorsque du glucose extracellulaire est présent.

Parallèlement, nous avons également étudié l'influence de ces différentes lysines potentiellement ubiquitinées sur la stabilité de Rag4 lorsque les cellules sont cultivées en absence de glucose (Figure 73).

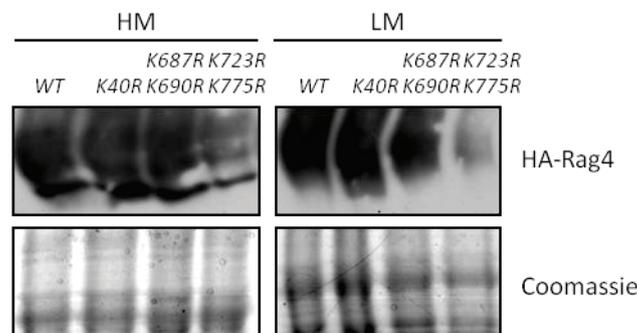


Figure 73: Au moins une des deux lysines 723 et 775 est impliquée dans le contrôle de la stabilité et de la répartition membranaire de Rag4 en absence de glucose. Les souches utilisées sont les suivantes : mock : MWL9S1 ; WT : MLK191 (P_{ScGAL1} -3HA-RAG4) ; *K40R* : ACRK85 (P_{ScGAL1} -3HA-*rag4*^{*K40R*}) ; *K687R-K690R* : ACRK86 (P_{ScGAL1} -3HA-*rag4*^{*K687R-K690R*}) et *K723R-K775R* : ACRK94 (P_{ScGAL1} -3HA-*rag4*^{*K723R-K775R*}) et ont été cultivées en milieu synthétique glycérol Sgly. Les extraits protéiques préparés dans le tampon MOPS ont été centrifugés pour récupérer la fraction « membranes lourdes » (HM, membranes plasmique et des organelles) puis ultracentrifugés pour récupérer la fraction « membranes légères » (LM, membranes des vésicules de transport). Après séparation par SDS-PAGE et Western blot, la protéine 3HA-Rag4 a été immunodéTECTÉE (anti-HA). Un autre gel SDS-PAGE a été chargé avec des quantités identiques des mêmes extraits et colorés au bleu de Coomassie pour constituer un témoin de la charge protéique.

Lorsque les mutants des lysines potentiellement ubiquitinées de Rag4 sont cultivés en milieu glycérol, la stabilité de Rag4 dans les mutants *rag4*^{*K40R*} et *rag4*^{*K687R-K690R*} ne semble pas affectée, que ce soit dans la fraction « membranes lourdes » ou « membranes légères ». Par contre, dans le mutant *rag4*^{*K723R-K775R*}, la quantité de 3HA-Rag4 observée est plus faible dans

les deux fractions, et a été observée de manière reproductible. Ainsi, au moins une des deux lysines potentiellement ubiquitinées K723 et K775 aurait un rôle dans le maintien de la stabilité de Rag4 en absence de glucose dans le milieu extracellulaire.

Au cours des travaux concernant l'étude des mutants des lysines potentiellement ubiquitinées, nous avons déterminé l'implication de certaines de ces lysines dans le contrôle de la stabilité de Rag4. Ces résultats suggèrent que la stabilité de la protéine Rag4 est probablement régulée par ubiquitination. Nous avons voulu vérifier l'ubiquitination de Rag4. Pour cela, nous avons donc immunoprécipité Rag4-TAP puis immunodéecté l'ubiquitine avec un anticorps anti-ubiquitine. Malheureusement, les résultats obtenus pour l'immunodétection de l'ubiquitine se sont révélés très peu reproductibles, et nous n'avons pas de résultats à présenter ici.

En conclusion, l'impact de la mutation des cinq lysines prédites comme potentiellement ubiquitinées a été étudié et a permis de déterminer ce qui suit :

- Ces mutations ne perturbent pas la signalisation du glucose car les mutants sont toujours Rag⁺ (Figure 68).
- *K/Rgt1* est toujours phosphorylé en présence de glucose dans ces mutants (Figure 69). Cependant, la mutation des lysines 723 et 775 semble avoir un effet sur la quantité de *K/Rgt1* détectée, mais nous n'avons pas d'élément pour expliquer cette observation. Il serait intéressant d'analyser l'expression de *RAG1* dans ce mutant afin d'étudier l'effet de la diminution de *K/Rgt1* sur sa capacité à réprimer l'expression de *RAG1*.
- La mutation de la lysine 40 rétablit partiellement la stabilité de Rag4 dans un mutant $\Delta K/hxk$: cette lysine est impliquée dans le contrôle de la stabilité de Rag4 par la glycolyse (Figure 72A). Si cette lysine est effectivement ubiquitinée, son ubiquitination est nécessaire à la déstabilisation de la protéine dans un mutant de la glycolyse.
- La mutation des lysines 723 et 775 déstabilise partiellement Rag4 en absence de glucose extracellulaire (Figure 73) : au moins une de ces lysines est impliquée dans le contrôle de la stabilité de Rag4 en réponse à la source de carbone extracellulaire. Si une ou deux de ces lysines sont effectivement ubiquitinées, leur ubiquitination stabiliserait la protéine en absence de glucose. Avec la séquence PEST, elles constituent un autre motif impliqué dans la stabilisation de la protéine en absence de glucose.

Toutefois, il a plusieurs biais dans l'étude des mutants des lysines potentiellement ubiquitinées :

- L'ubiquitination de ces lysines n'a pas été confirmée et un effet sur la stabilité de la protéine ne signifie pas forcément qu'il y a ubiquitination de ces résidus. Les mutations des lysines pourraient avoir un effet direct sur le repliement de Rag4 et sa stabilité, même si l'effet de ces mutations sur la stabilité de Rag4 est dépendant des conditions de culture.

- L'ubiquitination d'une lysine peut avoir différents effets selon le type d'ubiquitination (mono-, poly-ubiquitination, type de branchements de la polyubiquitination) (Finley et al., 2012). Nous nous attendions à ce que les mutations stabilisent la protéine mais une déstabilisation a aussi été observée pour Rag4^{K723R-K775R}.
- Des mutants simples ou doubles de lysines ont été construits. Toutefois, un effet sur la stabilité de la protéine est souvent plus visible quand l'ensemble des lysines ubiquitinées sont mutées. A l'inverse, on ne sait pas si l'ubiquitination des lysines qui ont été mutées deux par deux a un effet synergique ou antagoniste.
- La prédiction bioinformatique a prédit une sixième lysine K611 potentiellement ubiquitinée, sa mutation n'a pas été réalisée car le logiciel lui a attribué un moins bon score. Toutefois, il aurait peut-être été intéressant de l'étudier.

3.d. Conditions et domaines impliqués dans la régulation de la stabilité de Rag4 – Conclusions

La stabilité du senseur du glucose Rag4 est régulée dans différentes conditions : sa stabilité est affectée dans un mutant glycolytique (Publication, Figure 5A, B et C), mais aussi en fonction de la source de carbone disponible (Publication Figure 5A, B, D et Figure 62) : la quantité de Rag4 est moindre sans glucose extracellulaire. Certains sites et domaines impliqués dans le contrôle de la stabilité du senseur Rag4 ont été identifiés (Figure 74).

D'une part, la queue C-terminale est nécessaire à la stabilité de Rag4, et donc à la fonctionnalité de la protéine (Figure 65), alors qu'à l'inverse chez *S. cerevisiae* la délétion de la queue C-terminale de Rgt2 stabilise la protéine (Roy and Kim, 2014). La queue C-terminale de Rag4 exprimée seule est sujette à la dégradation en fonction de la source de carbone et en réponse à une glycolyse non fonctionnelle (Figure 66). Ainsi, la queue C-terminale semble être à la fois une cible de la régulation de la stabilité de Rag4, mais aussi une protection contre la déstabilisation du reste de la protéine.

D'autre part, l'analyse bioinformatique de la séquence protéique de Rag4 a permis d'identifier des séquences potentiellement impliquées dans le contrôle de la stabilité du senseur : une séquence PEST et plusieurs lysines potentiellement sujettes à ubiquitination (Figure 67). Des mutants de ces séquences ont été construits et ont permis de déterminer leur implication réelle dans le contrôle de la stabilité du senseur (Figure 74). Ainsi, la séquence PEST est impliquée dans le maintien de la stabilité de Rag4 en absence de glucose dans le milieu (Figure 71). Elle n'intervient ni dans la régulation de la stabilité de Rag4 par la glycolyse, ni dans la capacité intrinsèque du senseur Rag4 à transmettre un signal glucose vers le noyau de la cellule (Figure 68 et Figure 69). Cette observation permet de réduire la séquence nécessaire à la signalisation du glucose aux acides aminés 539 à 658 dans la queue C-terminale de Rag4 (Figure 60). La lysine 40 est impliquée dans la déstabilisation de Rag4 dans un mutant glycolytique en présence de glucose (Figure 72A). Ceci suggère que cette lysine K40 pourrait être une cible du signal glycolytique régulant la stabilité de Rag4. L'effet de la mutation des lysines 687 et 690 ne produit pas un effet marqué sur la stabilité de Rag4

dans les conditions que nous avons testées. Enfin, au moins une des deux lysines 723 et 775 joue un rôle dans la stabilisation de Rag4 en absence de glucose extracellulaire (Figure 73), de façon similaire à la séquence PEST. Cependant, la mutation de ces deux lysines affecte la quantité de *K/Rgt1* détectée en Western blot alors que la délétion de la séquence PEST semble entraîner l'hypo-phosphorylation de *K/Rgt1* en absence de glucose (Figure 69). Ainsi, les deux mutants dans lesquels la stabilité de Rag4 est affectée en absence de glucose sont associés à une phosphorylation ou une quantité déficiente de *K/Rgt1*, sans que nous puissions expliquer cette observation.

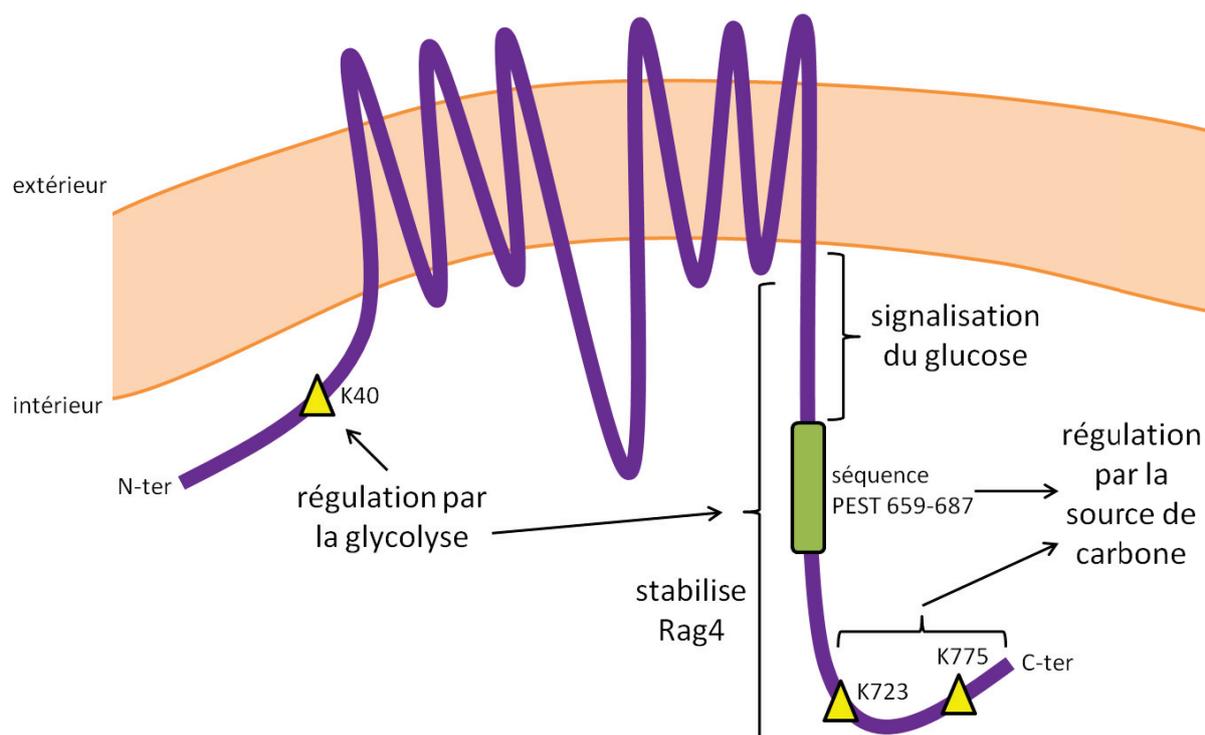


Figure 74: Sites et domaines régulant la stabilité du senseur du glucose Rag4 chez la levure *K. lactis*.

En résumé, la déstabilisation de Rag4 lorsque la glycolyse n'est pas fonctionnelle ou en absence de glucose dans le milieu de culture est contrôlée par deux mécanismes différents : le premier nécessite la présence de la lysine 40 (potentiellement ubiquitinée) et un élément de la queue C-terminale non-identifié (Figure 66), alors que le deuxième agit sur la séquence PEST et au moins une des lysines 723 et 775. La mutation de ces deux lysines dans deux souches séparées et l'étude des mutants obtenus permettraient de définir l'implication de chacune.

4. Stabilité, dégradation et fonctionnalité du senseur du glucose Rag4. Conclusions, discussions et perspectives

Dans le Chapitre 1, nous avons montré que la stabilité des senseurs du glucose Rag4 de *K. lactis* et Rgt2 de *S. cerevisiae* est contrôlée par la glycolyse. A partir de ce résultat, nous nous sommes intéressés au fonctionnement de Rag4 pour caractériser d'une part l'implication de

sa queue cytoplasmique C-terminale dans la signalisation du glucose, et d'autre part ses domaines impliqués dans les mécanismes de contrôle de la stabilité de Rag4.

Concernant la partie C-terminale de Rag4, nous avons déterminé ici que sa présence est nécessaire à la fonctionnalité de la protéine (particulièrement la séquence d'acides aminés 539 à 658, Figure 60 et Figure 74). La séquence de Rag4 comprise entre les acides aminés 646 à 670 est conservée entre les senseurs Rag4, Rgt2 et Snf3 (Figure 76), et est probablement impliquée dans la transmission du signal glucose. Chez *S. cerevisiae*, il a été démontré que cette séquence est nécessaire à la signalisation fonctionnelle du glucose par Rgt2 et Snf3 (Özcan et al., 1998; Vagnoli et al., 1998), mais son mécanisme d'action dans la signalisation n'est pas connu. La protéine Snf3 porte une duplication de cette séquence conservée dans la queue C-terminale (Celenza et al., 1988; Özcan et al., 1998), et un seul exemplaire de ces deux séquences semble être suffisant à la fonction de signalisation du glucose de Snf3 (Vagnoli et al., 1998). La conservation de cette séquence suggère que son rôle est le même pour les deux espèces, et il serait intéressant de construire des mutants de délétion de cette séquence de Rag4 chez *K. lactis* afin d'étudier la stabilité de la protéine et sa capacité à transmettre le signal glucose. Il existe une autre séquence conservée parmi les senseurs du glucose des levures, qui est la boucle cytoplasmique présente entre les domaines transmembranaires six et sept (Figure 53 pour Rag4 et Figure 76 pour Rgt2 et Snf3). Cette séquence n'est pas très conservée parmi les perméases au glucose. La littérature ne mentionne aucune étude de cette boucle cytoplasmique ; sa mutation pourrait apporter des informations sur son rôle. La queue N-terminale est une autre séquence cytoplasmique qui n'a pas été étudiée, mais elle est peu conservée entre les trois senseurs Rag4, Rgt2 et Snf3 (Figure 24).

Pour caractériser les mécanismes de signalisation du glucose utilisés par Rag4, une approche intéressante serait d'étudier divers mutants fonctionnels de la protéine. Nous possédons au laboratoire une collection d'une dizaine de mutants *rag4* dont le phénotype est Rag⁻. Il s'agit de mutants obtenus par mutagenèse aléatoire, dont les mutations ne sont pas connues. Le séquençage de l'ensemble de ces mutants permettrait sans doute d'identifier des sites essentiels pour la signalisation du glucose. La compilation de ces informations avec ce qui est connu chez *S. cerevisiae* serait intéressante : plusieurs mutations d'acides aminés situés dans des domaines transmembranaires de Rgt2 ou de Snf3 ont été identifiées et provoquent soit un signal constitutif, soit une incapacité à transmettre le signal glucose, soit une modification des sucres reconnus (Tableau 7 page 41). Toutefois, la séquence codant pour une partie de la queue C-terminale (acides aminés 538 à 710) des différents mutants *rag4* du laboratoire a déjà été déterminée et aucune mutation n'y a été identifiée.

Malgré la présence de nombreux sites consensus de phosphorylation par les caséine kinases de type I dans les queues C-terminales de Rag4, Rgt2 et Snf3 (Figure 76), la queue C-terminale de Rag4 n'est pas phosphorylée par Rag8 (Figure 59). Pourtant, nous avons mis en

évidence l'interaction de la queue C-terminale de Rag4 avec la caséine kinase de type I Rag8 (Figure 58). Ces travaux seront à poursuivre pour identifier le site d'interaction dans la queue C-terminale de Rag4 et l'implication de la séquence potentielle FXXXF d'interaction avec Rag8. Toutefois, le fait que cette séquence FXXXF n'existe pas chez Snf3 et Rgt2, alors que l'interaction entre Rgt2 et Yck1 a été démontrée (Moriya and Johnston, 2004), suggère que cette séquence n'est pas impliquée dans l'interaction. D'autres travaux montrent que la queue C-terminale cytoplasmique de Rag4 interagit avec des composants membranaires non identifiés (Figure 56). Afin d'identifier des partenaires de Rag4 encore inconnus, plusieurs tentatives d'expérience de « pull-down » ont été menées afin d'identifier des protéines interagissant avec Rag4. Malheureusement, aucun résultat exploitable n'a été obtenu, mais il pourrait être intéressant d'améliorer le protocole grâce à l'expertise obtenu dans l'étude de Rag4 lors de ce travail de thèse.

La queue cytoplasmique C-terminale des senseurs du glucose interagit avec plusieurs protéines : Std1 et Mth1 avec Snf3 et Rgt2 (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000), Rag8 avec Rag4 (Figure 58). Chez *S. cerevisiae* et chez *K. lactis*, des travaux montrent que la queue C-terminale interagit avec des composants membranaires non-identifiés ((Dlugai et al., 2001) et Figure 56). L'ensemble de ces résultats suggère un modèle de fonctionnement dans lequel la queue C-terminale des senseurs servirait au recrutement de plusieurs protéines formant un complexe requis pour la signalisation fonctionnelle du glucose (Figure 75). La fixation du glucose dans le site de détection entraînerait un changement de conformation, changeant l'exposition de la queue C-terminale à ses partenaires de signalisation, et nécessitant éventuellement des changements de phosphorylation des domaines cytoplasmiques des senseurs du glucose (Figure 75). Nous n'avons aucun élément permettant de discriminer la configuration dans laquelle est la protéine en présence de glucose (sites de fixation des interactants masqués ou non) : le modèle proposé (Figure 75) montre l'interaction des partenaires en présence de glucose, mais il est tout à fait possible qu'ils interagissent plutôt en absence de glucose, ou encore que le complexe existe dans les deux conditions, mais avec des composants différents.

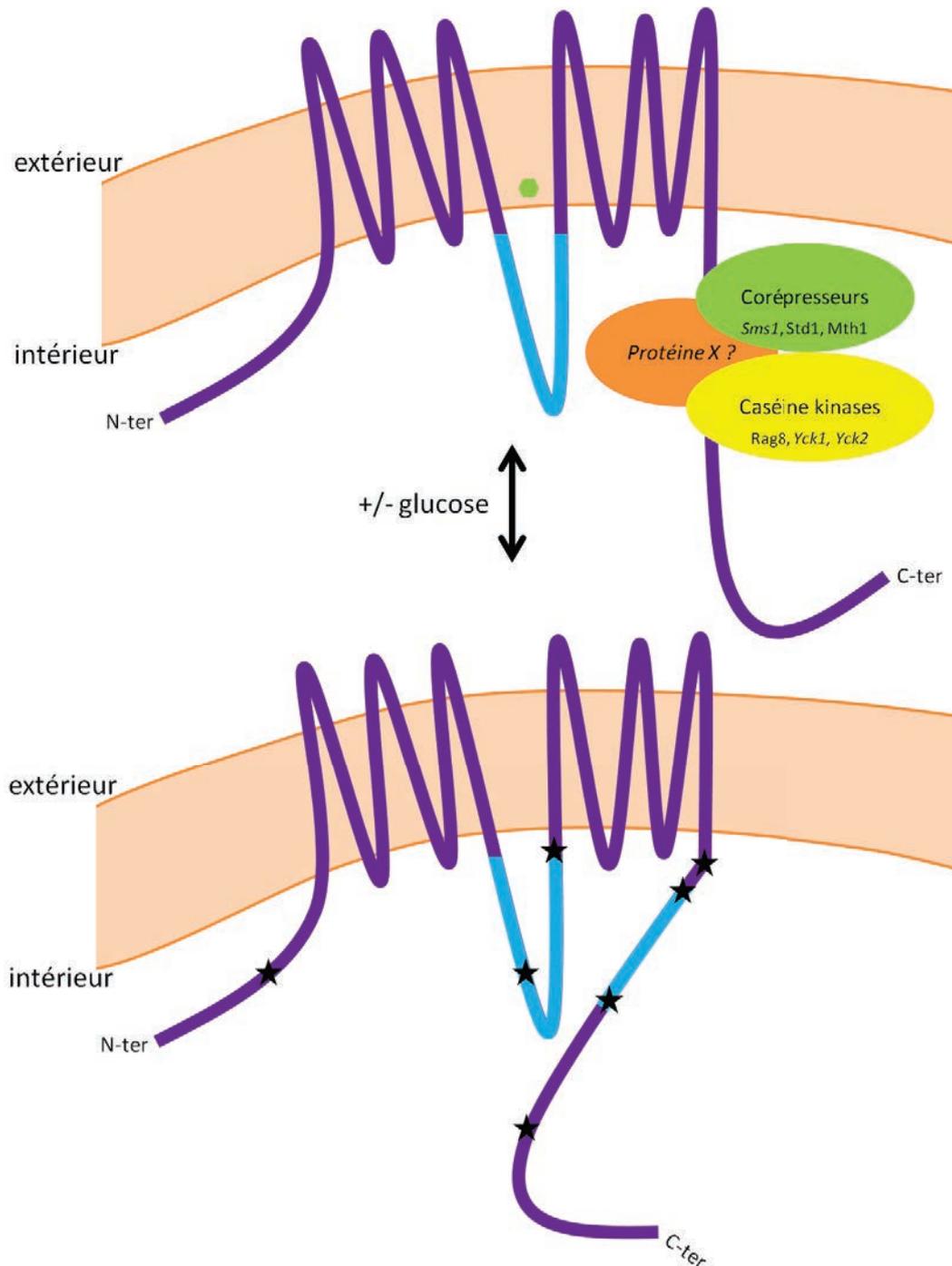


Figure 75: Modèle hypothétique d'interaction des senseurs du glucose avec leurs partenaires en réponse au glucose extracellulaire. Les domaines cytoplasmiques fortement conservés sont représentés schématiquement en bleu. Les sites potentiels de phosphorylation (Snf1, CKI) et les sites identifiés par des études de protéomique chez *S. cerevisiae* (Ptacek et al., 2005; Bodenmiller et al., 2010) sont indiqués par des étoiles noires. Le glucose détecté dans le site de fixation du senseur est représenté par un hexagone vert. Les sites de phosphorylation sont montrés seulement dans la configuration du bas par simplicité mais ne représentent pas la phosphorylation de ces sites.

Concernant le contrôle de la stabilité de Rag4, nous avons montré que la source de carbone a un effet sur la stabilité des senseurs de glucose des levures (Rag4 : Chapitres 1 et 2 et Rgt2 : Chapitre 1 (Roy and Kim, 2014)). Chez *K. lactis*, la queue C-terminale cytoplasmique de Rag4 est nécessaire à la stabilité de la protéine (Figure 65), et sa stabilité intrinsèque est elle-même régulée comme la protéine entière (Figure 66). Par analyse bioinformatique puis

analyse de la stabilité de Rag4 dans différents mutants, nous avons déterminé que la glycolyse et la source de carbone semblent contrôler la stabilité de Rag4 via deux régions distinctes : la lysine 40, prédite comme potentiellement ubiquitinée, ainsi qu'un motif non-déterminé de la queue C-terminale sont impliqués dans la stabilisation de Rag4 par la glycolyse, alors que la séquence PEST et au moins une des deux lysines 723 et 775 stabilisent Rag4 en absence de glucose (Figure 74). Dans différentes conditions de culture et différents contextes génétiques, la localisation cellulaire par microscopie à fluorescence de Rag4 muté apporterait des informations importantes concernant l'effet de ces mutations sur la présence de Rag4 à la membrane.

L'alignement des séquences des senseurs du glucose (Figure 76) montre que des séquences PEST sont présentes dans Rgt2 et Snf3 et qu'elles sont alignées dans chacune des trois protéines, en aval du domaine très conservé. De façon remarquable, Snf3 possède une séquence PEST potentielle supplémentaire en N-terminale (comprise entre les acides aminés 1 à 13). Toutefois, l'implication de ces séquences PEST dans le contrôle de la stabilité des senseurs Rgt2 et Snf3 n'a pas été démontrée. Chez *S. cerevisiae*, deux lysines probablement ubiquitinées (K637 et K657) de la queue C-terminale du senseur de glucose de basse affinité Rgt2 jouent un rôle important dans le contrôle de la stabilité de Rgt2 en réponse à la source de carbone (Roy and Kim, 2014). Cependant, l'alignement des séquences protéiques de Rag4, Rgt2 et Snf3 indique que les lysines importantes pour le contrôle de la stabilité des senseurs ne sont pas alignées entre les différentes protéines (Figure 76). Ceci suggère qu'il pourrait exister plusieurs mécanismes de régulation de la stabilité en fonction du senseur du glucose et/ou de l'espèce de levure.

Chez *S. cerevisiae* il a été suggéré que la stabilité des senseurs du glucose dépend de leur capacité à détecter le glucose (Roy and Kim, 2014) : Rgt2 est dégradé en absence de glucose (concentration inférieure à 0,25 %) et Snf3 est dégradé lorsque la concentration en glucose est supérieure à 0,25 % ou nulle. Les mutants Rgt2^{R231K} et Snf3^{R229K} dans lequel le signal glucose est constitutif ne sont jamais dégradés, alors que des mutants incapables de transmettre le signal glucose (Rgt2^{W529Y} ou Rgt2^{W529F}) sont dégradés de façon constitutive (Roy and Kim, 2014). Chez *K. lactis*, la dégradation de Rag4 observée dans les mutants de la glycolyse en présence de glucose (Chapitre 1 et Chapitre 2) est sans doute due à une incapacité (partielle) de la cellule à métaboliser le glucose plutôt qu'à l'incapacité du senseur à détecter le glucose.

Dans la queue c-terminale de Rag4, il existe un site consensus de phosphorylation par Snf1 (sérine/thréonine kinase activée en absence de glucose, voir page 52) (S554 : **LYKKS**S**SGIN**), présent aussi dans la queue C-terminale de Snf3 (T561 : **LYIKS**S**TGVVA**). Ce site n'est pas conservé chez Rgt2, mais il existe un autre site dans la queue C-terminale de cette protéine (Figure 76). Un autre site consensus conservé chez Rag4, Rgt2 et Snf3 est présent dans la boucle cytoplasmique interne. Chez *S. cerevisiae*, l'activité de Snf1 est régulé par l'ADP (Mayer et al., 2011) : cette kinase pourrait donc être un lien entre la glycolyse (régulation du ratio ADP/ATP) et la signalisation du glucose (stabilité du senseur du glucose). De plus, Snf1

est impliqué dans la signalisation du glucose en contrôlant la stabilité de Mth1 et Std1 (Gadura et al., 2005; Pasula et al., 2007), et ce contrôle pourrait être dépendant de celui du senseur du glucose (Rag4 ou Snf3). L'étude de la stabilité de Rag4 dans un mutant *Klsnf1* serait informative, ainsi que la réalisation d'un essai kinase Snf1/Rag4.

Dans ce chapitre, nous avons étudié la queue C-terminale caractéristique de Rag4 pour déterminer sa capacité à transmettre le glucose et son implication dans le contrôle de la stabilité de la protéine. Nous avons également mis en évidence des conditions de déstabilisation de Rag4 ainsi que des domaines de la protéine qui sont liés à ces déstabilisations. Plusieurs hypothèses sont proposées pour expliquer le lien entre la stabilité du senseur du glucose Rag4 et la glycolyse : la protéine pourrait être modifiée post-traductionnellement par des phosphorylations, ou le senseur pourrait interagir avec d'autres protéines, elles-mêmes ciblées par la glycolyse.

Ainsi, le chapitre suivant est consacré à l'identification du signal issu de la glycolyse qui cible le senseur du glucose Rag4 chez *K. lactis*, probablement en contrôlant à la fois l'ubiquitination de la lysine 40 et un autre élément dans la séquence de la queue C-terminale.

Chapitre 3 : Nature du signal glycolytique qui contrôle la voie de signalisation du glucose

Chez les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae*, l'expression des perméases au glucose de faible affinité *RAG1* et *HXT1* est contrôlée par la glycolyse (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004; Özcan and Johnston, 1995; Belinchón and Gancedo, 2007b). La cible de la glycolyse dans la signalisation du glucose a été mise en évidence au cours de ces travaux de thèse : la stabilité des senseurs du glucose Rag4 et Rgt2 de *K. lactis* et *S. cerevisiae* est régulée par la glycolyse (Chapitre 1).

Une des questions soulevées par ces observations est de comprendre comment la glycolyse contrôle la stabilité des senseurs du glucose, et d'identifier le signal issu de la glycolyse.

Deux possibilités ont été envisagées : soit le signal est de nature protéique, soit il est de nature métabolique. Une dernière possibilité consiste en un signal mixte, à la fois protéique et métabolique. L'hypothèse protéique du signal est supportée par le fait que plusieurs enzymes de la glycolyse sont bifonctionnelles et présentent un rôle transcriptionnel en plus de leur activité enzymatique propre à la glycolyse. C'est le cas dans les cellules mammifères pour l'énolase, la GAPDH et la pyruvate kinase par exemple (Zheng et al., 2003; Feo et al., 2000; Gao et al., 2012). Chez la levure *S. cerevisiae*, la localisation nucléaire et le rôle transcriptionnel de l'hexokinase ont été illustrés (Randez-Gil et al., 1998a; Rodríguez et al., 2001; de la Cera et al., 2002; Ahuatzí et al., 2006). D'une part, ScHxk2 est à la fois un composant et une cible de la répression glucose qui régule certains acteurs de la signalisation du glucose (Rodríguez et al., 2001) (voir page 54). D'autre part, ScHxk2 interagit directement avec certains composants de la voie de signalisation Snf3/Rgt2 : en effet, ScHxk2 et ScRgt1 interagissent en présence de glucose (Palomino et al., 2006).

La nature métabolique du signal issu de la glycolyse pour contrôler la signalisation du glucose représente aussi une hypothèse intéressante. On sait que certains intermédiaires de la glycolyse régulent l'activité d'enzymes glycolytiques. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, le fructose-1,6-bisphosphate régule la pyruvate kinase, et le méthylglyoxal (un produit dérivé de la glycolyse) régule ScEno2. Dans les cellules mammifères, le 1,3-bisphosphoglycérate modifie certaines enzymes glycolytiques au niveau post-traductionnel (Jurica et al., 1998; Gomes et al., 2006; Moellering and Cravatt, 2013). Certains métabolites ou produits dérivés de la glycolyse ont aussi un rôle régulateur en dehors de la glycolyse chez les levures : le NADP/NADPH régule l'induction des gènes Gal (Kumar et al., 2008) et l'activité de Zwf1 dans la voie des pentoses phosphate (Saliola et al., 2012) ; le méthylglyoxal module l'activité des perméases du glucose chez *S. cerevisiae*, (Yoshida et al., 2011).

Nous avons donc recherché chez *K. lactis* des signaux potentiels de la glycolyse dirigés vers la signalisation du glucose et le senseur du glucose Rag4 en particulier. Nous nous sommes intéressés à l'interaction de *K/Hxk* avec des protéines de la voie de signalisation du glucose,

et en particulier *K/Rgt1*. Malheureusement, le temps a manqué pour creuser en profondeur l'hypothèse protéique du signal. Nous avons également réalisé une analyse des métabolites issus de la glycolyse dans des souches sauvage ou affectées pour la glycolyse. Bien que préliminaires, certains de ces résultats sont présentés par la suite.

L'analyse métabolomique MS/UV en HPLC a été réalisée en collaboration avec le laboratoire de Jean Marie François (LISBP, Toulouse) et grâce à l'aide technique d'Amélie Vax (LISBP).

1. Hypothèse protéique du signal issu de la glycolyse et contrôlant la signalisation du glucose

Dans la recherche d'une enzyme de la glycolyse qui serait capable de transmettre le signal glycolytique vers le senseur du glucose Rag4, nous avons concentré notre intérêt uniquement sur l'hexokinase. En effet, c'est la protéine de la glycolyse dont le rôle de régulateur transcriptionnel a été le mieux étudié chez *S. cerevisiae* jusqu'à présent, principalement dans la voie de répression du glucose (voir page 54). Cependant, nous n'excluons pas les autres enzymes comme vecteur potentiel du signal issu de la glycolyse.

1. a. Observation de la localisation cellulaire de l'hexokinase *K/Hxk*

Chez *S. cerevisiae*, une fraction de l'hexokinase ScHxk2 a été localisée dans le noyau (Randez-Gil et al., 1998a) et cette localisation nucléaire est nécessaire à son activité de répresseur transcriptionnel. Puisque la localisation cytosolique et nucléaire de ScHxk2 est régulée par la source de carbone extracellulaire (Ahuatzi et al., 2004), nous avons observés au microscope à fluorescence chez *K. lactis* la localisation cellulaire de *K/Hxk* fusionné à la GFP, en présence et en absence de glucose (Figure 77).

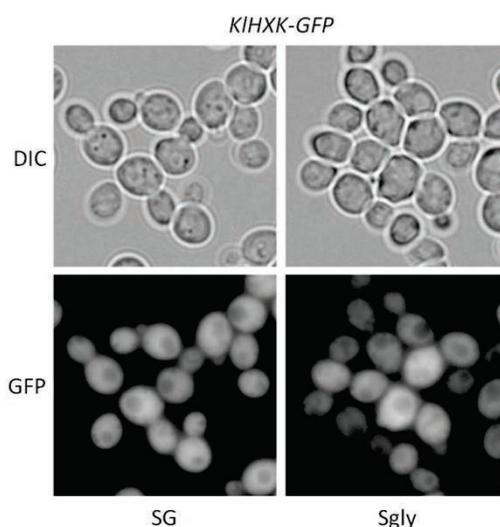


Figure 77: La localisation cellulaire de *K/Hxk*-GFP ne change pas avec la source de carbone. La souche KIAS1 (*KIHxK-GFP*) a été cultivée en milieu synthétique SG ou Sgly jusqu'en début de phase exponentielle de croissance. Les cellules ont été observées au microscope à fluorescence équipé d'un filtre GFP (GFP) et d'un optique Nomarski (DIC). Les images ont été traitées par Photoshop et sont représentatives de l'ensemble de l'échantillon observé. Le temps d'exposition est le même pour chaque image.

Ces observations préliminaires indiquent que *K/Hxk-GFP* présente une localisation cellulaire uniforme (à l'exception de ce qui semble être la vacuole) qui ne semble pas varier selon la présence ou non de glucose. Cependant, la localisation cellulaire de *K/Hxk-GFP* n'a pas été déterminée en utilisant un marqueur nucléaire fluorescent, comme le DAPI. Son utilisation permettrait de définir si *K/Hxk-GFP* a une localisation nucléaire, et éventuellement si cette localisation est modulée par la présence de glucose extracellulaire.

1. b. Implication de *K/Hxk* dans la signalisation du glucose : interaction avec *K/Rgt1*

Chez *S. cerevisiae*, l'hexokinase et le répresseur *ScRgt1* sont interconnectés pour s'autoréguler dans la signalisation du glucose : le gène *ScHXK2* est réprimé par *ScRgt1* (Palomino et al., 2005), et *ScRgt1* et *ScHxk2* interagissent en présence de glucose fortement concentré, probablement dans le but de séquestrer *ScRgt1* et d'empêcher son interaction avec les promoteurs de ses gènes-cible (Palomino et al., 2006). Il est envisageable que cette interaction participe à l'envoi d'un signal glycolytique vers la signalisation du glucose, en modulant l'expression des gènes des perméases. Par contre, *ScRgt1* se trouvant en aval des senseurs dans la signalisation du glucose, la stabilisation des senseurs par la glycolyse n'est probablement pas dépendante de cette interaction *ScRgt1-ScHxk2*.

Au vu des ces résultats chez *S. cerevisiae*, nous avons testé chez *K. lactis* une potentielle interaction entre *K/Hxk* et *K/Rgt1* par une approche de co-immunoprécipitation (Figure 78) :

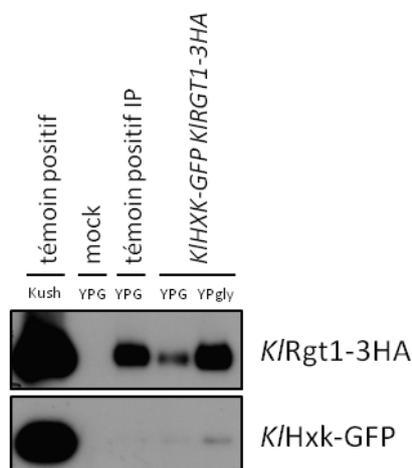


Figure 78: Chez *K. lactis*, le répresseur *K/Rgt1-3HA* et l'hexokinase *K/Hxk-GFP* interagissent en co-immunoprécipitation. Les souches suivantes ont été utilisées : témoin positif dans le panneau *K/Rgt1-3HA* (2 puits) : MWL1099 (*K/RGT1-3HA*) ; témoin positif dans le panneau *K/Hxk-GFP* (2 puits) : KIAS1 (*K/HXK-GFP*) ; mock : MWL9S1 (*WT*) ; co-immunoprécipitation : KIAS10 (*K/HXK-GFP K/RGT1-3HA*). Après croissance en milieu riche YPG ou YPgly, pour chaque échantillon une quantité égale de cellules a été lysée avec le tampon PGT. La concentration des extraits protéiques a été mesurée au Bradford et normalisée avant l'immunoprécipitation anti-HA. Ensuite, les échantillons ont été séparés par SDS-PAGE suivi d'un Western blot. Une des deux membranes a été utilisée pour la détection anti-HA (*K/Rgt1-3HA*) et l'autre pour la détection anti-GFP (*K/Hxk-GFP*). Dans chaque panneau, il y a deux puits « témoin positif » : le premier puits (Kush) contient un extrait protéique de la souche « témoin positif » (MWL1099 ou KIAS1) qui a été préparé selon le protocole de Kushnirov. Le deuxième puits « témoin positif IP » contient la même souche préparée comme pour la co-immunoprécipitation.

Les résultats de la co-immunoprécipitation montrent la détection de *K/Hxk-GFP* après immunoprécipitation de *K/Rgt1-3HA*. Bien que cette co-immunoprécipitation soit observée

plus fortement en absence de glucose qu'en sa présence, moins de *K/Rgt1-3HA* est immunoprécipité dans la souche *KIHxk-GFP KIRGT1-3HA* en milieu YPG. Ainsi, proportionnellement, la quantité de *K/Hxk-GFP* co-immunoprécipitant avec *K/Rgt1* ne semble pas varier selon la source de carbone. L'interaction entre le répresseur *Rgt1* et l'hexokinase semble conservée chez *K. lactis*, mais l'influence de la présence de glucose, comme observée chez *S. cerevisiae*, devra être confirmée par des expériences supplémentaires. De plus, pour tester l'implication de cette interaction dans un signal potentiel issu de la glycolyse, il faudrait reproduire cette expérience en affectant la glycolyse : inhibition chimique de la *GAPDH* par l'iodoacétate, utilisation de mutants glycolytiques (énolase).

Au cours de ces travaux, peu de temps a été consacré à l'étude de la nature du signal glycolytique, et l'hypothèse métabolique du signal a été d'avantage approfondie par rapport à l'hypothèse protéique. En effet, chez *K. lactis*, l'expression de *RAG1* est affectée quelque soit l'étape de la glycolyse affectée (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004). Nos résultats, présentés dans le Chapitre 1, mettent en évidence des effets semblables sur les répresseurs de *RAG1* lorsque l'hexokinase ou l'énolase sont délétées, mais aussi lorsque la *GAPDH* est inhibée chimiquement. De plus, l'hypothèse présentée ci-dessus à propos de l'interaction entre *Rgt1* et l'hexokinase ne permet pas d'expliquer comment la stabilité des senseurs du glucose est affectée par la glycolyse (voir page 179). Cependant, ces différentes observations ne permettent pas d'exclure complètement l'hypothèse protéique du signal, qui mériterait d'être explorée de manière plus approfondie.

2. Hypothèse métabolique du signal issu de la glycolyse qui contrôle la signalisation du glucose

Pour tester l'hypothèse métabolique du signal issu de la glycolyse chez *K. lactis*, nous avons utilisé plusieurs souches dans lesquelles le transport et l'assimilation du glucose sont fonctionnels ou non. Nous avons recherché un ou des métabolites dont la quantité varie de manière significative entre ces différentes souches en présence de glucose dans le milieu extracellulaire. Une première approche ciblée a été utilisée afin de mesurer le niveau d'ATP, qui représente le carburant énergétique de nombreuses réactions cellulaires. Ensuite, l'approche expérimentale principale a consisté en une analyse du métabolome de *K. lactis* par HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance) couplée à une détection UV et un spectromètre de masse, réalisée dans le laboratoire LISBP à Toulouse.

2. a. Mesure de l'ATP dans différents mutants glycolytiques en présence de glucose

Avant l'étude globale du métabolome, une première analyse rapide de la quantité d'ATP dans des mutants glycolytiques de *K. lactis* a été réalisée au laboratoire. En effet, certains mutants de la glycolyse, comme le mutant de l'énolase, présentent une très faible croissance

en présence de glucose. De plus, des défauts de phosphorylation semblent présents dans les mutants glycolytiques : dans le mutant de l'hexokinase, le répresseur *K/Rgt1* n'est pas hyperphosphorylé et l'accumulation du corépresseur *Sms1* pourrait correspondre à un défaut de sa phosphorylation. Nous avons émis l'hypothèse que le phénotype des mutants glycolytiques et le faible niveau de phosphorylation des répresseurs de la voie de signalisation du glucose pourraient s'expliquer par une déplétion globale du niveau d'ATP, qui représente le carburant de nombreuses réactions cellulaires nécessitant de l'énergie, et qui régule l'activité de voies de signalisation. En effet, si la baisse du niveau énergétique de la cellule ne suffit pas en elle-même à expliquer un défaut de phosphorylation, elle peut affecter la régulation de certaines voies de signalisation du fait que l'activité de certaines kinases est régulée par le niveau énergétique de la cellule (complexe SNF1 par exemple, voir page 52). Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré l'ATP dans différents mutants glycolytiques en utilisant le kit ATPlite (Perkin-Elmer), basé sur la mesure de la luminescence émise proportionnellement à la quantité d'ATP. Trois mutants glycolytiques différents ont été utilisés : les mutants de l'hexokinase et de l'énolase, dans lesquels l'expression du gène de la perméase au glucose *RAG1* est affectée, ainsi qu'un mutant de la phosphoglucose isomérase dans lequel l'expression de *RAG1* n'est pas affectée. Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 79.

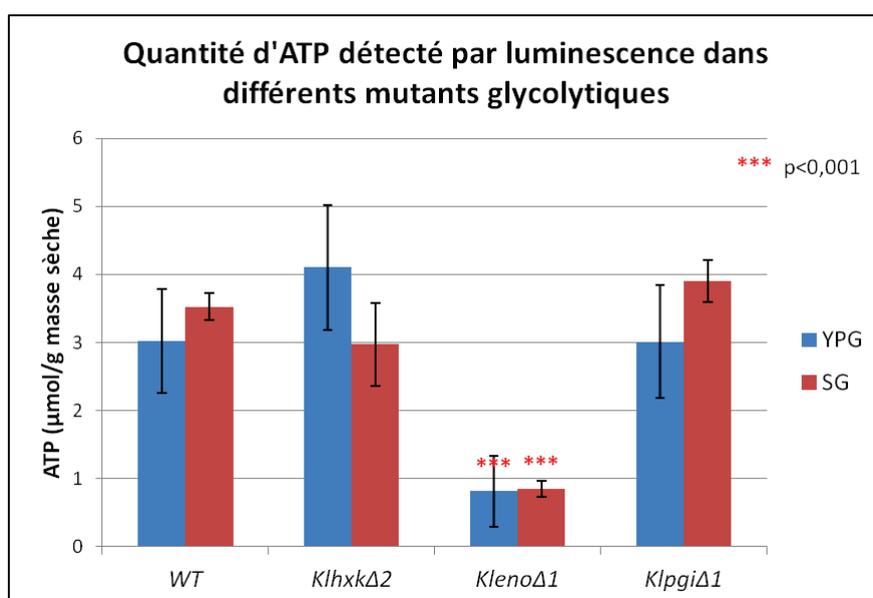


Figure 79: La quantité d'ATP par gramme de matière sèche ne varie pas entre une souche sauvage et divers mutants glycolytiques, sauf pour un mutant de l'énolase. Les souches MW270-7B (*WT*), MWK11/F1 (*KlhxkΔ2*), MWK3 (*KlenoΔ1*) et MWK12 (*rag2Δ1 = KlpgiΔ1*) ont été cultivées dans un milieu contenant du glucose comme source de carbone, riche (YPG) ou synthétique (SG), jusqu'en phase exponentielle de croissance. Après extraction des métabolites à l'éthanol chaud, le kit ATPlite a été adapté pour l'utilisation sur des levures, comme décrit dans la partie « Matériel & Méthodes ». La luminescence a été mesurée par un lecteur de plaques multi-puits et la quantité d'ATP a été calculée grâce à la réalisation d'une gamme-étalon. Les mesures ont été réalisées au minimum en triplicata. La quantité d'ATP est exprimée en fonction de la masse sèche des levures utilisées. Pour ce calcul, la masse sèche déterminée dans la partie qui suit (page 186) a été utilisée pour les souches *WT*, $\Delta Klhxk$ et $\Delta Kleno$. La valeur de la souche *WT* a été utilisée pour le mutant $\Delta Klpgi$. La p-value correspondant à la significativité statistique des résultats a été calculée grâce à un test t de Student, pour chaque mutant glycolytique par rapport à la souche sauvage, et pour chaque souche entre les valeurs en milieu YPG et milieu SG. Les différences statistiquement significatives entre la souche sauvage et *KlenoΔ1* sont indiquées par des astérisques rouges.

Les mesures de la quantité d'ATP ont été effectuées en milieu riche et en milieu synthétique, avec du glucose comme source de carbone. Dans la souche sauvage en milieu riche et synthétique, les quantités d'ATP mesurées correspondent à celles mentionnées dans la littérature pour les levures et qui sont généralement de l'ordre de 1 à 10 $\mu\text{mol/g}$ de masse sèche. Pour chaque souche, une différence statistiquement significative n'a pas été démontrée entre les cultures en milieu YPG et en milieu SG. Les mutants de l'hexokinase et de la phosphoglucose isomérase ne présentent pas de différence de quantité d'ATP avec la souche sauvage. Par contre, le mutant de l'énolase contient environ quatre fois moins d'ATP que le sauvage. Cette forte déplétion d'ATP pourrait expliquer le phénotype très « malade » de cette souche, dont la croissance est fortement affectée en présence de glucose. Par contre, les deux mutants glycolytiques dans lesquels l'expression du gène de la perméase *RAG1* est réprimée (*KlhxkΔ2* et *KlenoΔ1*) ne montrent pas la même tendance en termes de quantité d'ATP : la déplétion d'ATP ne peut pas expliquer le défaut de signalisation du glucose dans ces souches.

Toutefois, ces résultats sont à prendre avec précaution car la méthode d'extraction des métabolites utilisée n'a pas permis de séparer l'ATP intracellulaire de l'ATP extracellulaire : les cellules n'ont pas été séparées de leur milieu de culture avant extraction et les mesures peuvent être faussées en cas d'efflux d'ATP. Un contrôle a été réalisé en mesurant la quantité d'ATP dans du milieu seul, mais pas dans le surnageant des cultures (ce qui pourrait être fait pour améliorer la précision de ces mesures). Une autre manière d'améliorer les résultats serait de mesurer la quantité d'ATP à différents temps suivants l'ajout de glucose au milieu, ce qui permettrait d'observer des phénomènes dynamiques potentiellement plus informatifs que la situation statique qui a été mesurée.

2. b. Analyse métabolomique des dérivés de la glycolyse par chromatographie liquide

Parallèlement à l'approche ciblée de mesure de l'ATP, une analyse globale du métabolome a été réalisée afin de déterminer quels métabolites sont affectés dans différents mutants glycolytiques. L'hypothèse développée est la suivante : si un métabolite de la glycolyse (ou plusieurs) constitue un signal vers le senseur du glucose, sa concentration doit varier (déplétion ou accumulation) de manière similaire dans différents mutants glycolytiques par rapport à une souche sauvage, en présence de glucose. Cette variation similaire de métabolite dans différents mutants glycolytiques n'a pas été observée pour l'ATP (Figure 79). L'analyse métabolomique des produits issus ou dérivés de la glycolyse permet une approche plus globale et avec moins *d'a priori*.

En vue de cette analyse métabolomique, de nouvelles souches ont été construites pour étudier les métabolites produits lors d'un défaut de glycolyse afin de disposer d'une palette de variation dans le transport et le métabolisme du glucose. La stratégie utilisée pour choisir ces souches est expliquée dans une première partie. Ensuite, l'ensemble des souches choisies a fait l'objet de contrôle concernant l'état de la signalisation du glucose. Les

conditions de l'analyse ont été déterminées. Puis, la détermination de la masse sèche a été réalisée pour toutes les souches utilisées, afin d'exprimer les résultats de mesure des métabolites en fonction de la masse sèche. Enfin, les résultats de l'analyse métabolomique en elle-même, réalisée au cours de mon séjour dans le laboratoire de Jean Marie François à Toulouse (LISBP), seront présentés.

2. b. i. Création et vérification phénotypique des souches utilisées pour l'analyse métabolique

Le but de l'analyse métabolomique est d'observer des métabolites particuliers qui s'accumulent ou au contraire disparaissent lorsque la glycolyse est affectée. Pour cela, nous avons étudié l'effet de l'inhibition chimique de la GAPDH par l'iodoacétate, ainsi que deux mutants glycolytiques, $\Delta Klhxk$ et $\Delta Kleno$, qui catalysent respectivement la première et l'avant-dernière étapes de la voie glycolytique. Cependant, le transport du glucose par la perméase de basse affinité Rag1 est affecté dans ces mutants glycolytiques. Dans une souche sauvage cultivée en absence de glucose, l'expression et le transport maximal ont lieu quatre à cinq heures après ajout de glucose dans le milieu. Ainsi, pour observer plus facilement et plus rapidement les métabolites issus de la glycolyse après une stimulation glucose, nous avons construit des souches dans lesquelles le transport du glucose est constitutif. Cela permettra en outre de dissocier les effets dus à un défaut d'entrée du glucose dans la cellule (répression de *RAG1*) des effets propres à l'inhibition de la glycolyse dans les mutants testés. Nous avons sélectionné deux stratégies : la première consiste à exprimer *RAG1* sous un promoteur non-régulable. La deuxième consiste à utiliser un mutant du répresseur transcriptionnel $\Delta Klrqt1$, souche dans laquelle l'expression de *RAG1* est constitutive. De plus, la répression des gènes glycolytiques par *Klrqt1* est également levée. Pour exprimer *RAG1* de manière constitutive, nous avons remplacé par recombinaison homologue son promoteur par des promoteurs considérés comme constitutifs : P_{ScGAL1} , P_{ScGPD} et P_{ScTEF1} . Le promoteur de *ScGAL1* est couramment utilisé dans le laboratoire pour exprimer des gènes de manière constitutive chez *K. lactis* (voir page 214). Le promoteur de *ScGPD* est en fait le promoteur du gène *TDH3* (GAPDH), considéré comme constitutif. Le gène *ScTEF1* code pour un facteur d'élongation. Les promoteurs P_{ScGPD} et P_{ScTEF1} sont utilisés chez la levure comme promoteurs forts pour l'expression constitutive de protéines (Mumberg et al., 1995; Janke et al., 2004). Afin de déterminer si l'expression de *RAG1* via ces promoteurs est suffisante pour assurer correctement la signalisation et/ou l'entrée du glucose dans la cellule nous avons dans un premier temps déterminé le phénotype Rag des différentes souches portant ces constructions (Figure 80).

L'expression de *RAG1* avec les promoteurs P_{ScGPD} et P_{ScTEF1} conduit à un phénotype Rag⁺, alors que l'expression de *RAG1* par P_{ScGAL1} donne un phénotype Rag⁻. L'expression de *RAG1* avec P_{ScGAL1} semble inférieure à l'expression maximale de *RAG1* et ne permet pas de soutenir une glycolyse assez intense pour permettre la fermentation en présence d'antimycine A (phénotype Rag⁻). Cette construction n'a pas été utilisée par la suite. Le phénotype Rag⁻ des

mutants de l'hexokinase dans lesquels *RAG1* est exprimé constitutivement à partir de P_{ScGPD} et P_{ScTEF1} a été vérifié.

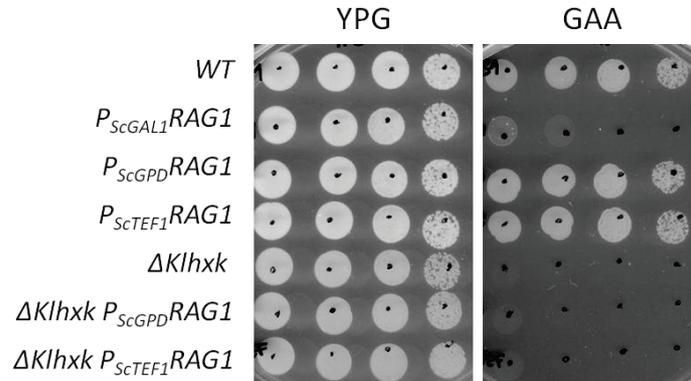


Figure 80: Les promoteurs P_{ScGPD} et P_{ScTEF1} permettent une expression de *RAG1* suffisante pour soutenir un phénotype Rag^+ . Des cultures des souches MWL9S1 (WT), ACRK132 ($P_{ScGAL1}RAG1$), ACRK133 ($P_{ScGPD}RAG1$), ACRK134 ($P_{ScTEF1}RAG1$), ACRK97 ($\Delta Klhxk$), ACRK135 ($\Delta Klhxk P_{ScGPD}RAG1$) et ACRK136 ($\Delta Klhxk P_{ScTEF1}RAG1$) ont été déposées en gouttes après dilutions en série au dixième sur des boîtes YPG et GAA pour tester leur phénotype Rag .

Afin de confirmer et renforcer ces résultats, l'expression de *RAG1* a été analysée par qRT-PCR dans chacune des constructions testées dans la Figure 80 (excepté pour $P_{ScGAL1}RAG1$) (Figure 81).

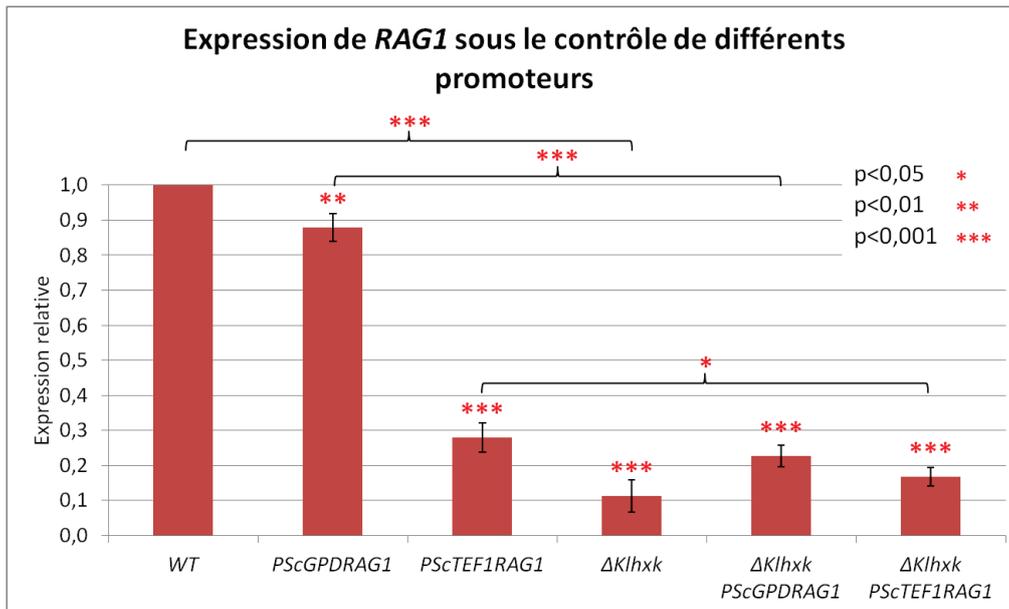


Figure 81: L'expression de *RAG1* sous le contrôle du promoteur P_{ScGPD} est régulée par la glycolyse, mais pas sous le contrôle du promoteur P_{ScTEF1} . Les souches MWL9S1 (WT), ACRK133 ($P_{ScGPD}RAG1$), ACRK134 ($P_{ScTEF1}RAG1$), ACRK97 ($\Delta Klhxk$), ACRK135 ($\Delta Klhxk P_{ScGPD}RAG1$) et ACRK136 ($\Delta Klhxk P_{ScTEF1}RAG1$) ont été cultivées en milieu YPG jusqu'en phase exponentielle de croissance. L'ARN a été extrait, traité à la DNase, les cDNA ont été synthétisés et une réaction de qRT-PCR a été réalisée pour analyser l'expression de *RAG1* dans différentes constructions, relativement à l'expression du gène de ménage *KIAC11*. Les mesures ont été réalisées en triplicata biologique. La significativité statistique a été calculée avec un test t de Student et est indiquée par les astérisques rouges : soit par rapport à la moyenne de la souche sauvage WT (au dessus des barres), soit par rapport à la moyenne d'une autre souche indiquée par une accolade.

L'expression de *RAG1* contrôlée par le promoteur P_{ScGPD} est légèrement inférieure à celle mesurée dans la souche sauvage. Cependant, ce promoteur semble régulé par la glycolyse car, dans un mutant de l'hexokinase, l'expression de *RAG1* est divisée par 4. Lorsque le promoteur P_{ScTEF1} est utilisé, le niveau d'expression de *RAG1* est 3 fois inférieur à celui de la

souche *WT*. Toutefois, dans un mutant de l'hexokinase, l'expression de *RAG1* est seulement légèrement diminuée. Comme le promoteur P_{ScTEF1} semble être moins régulé par la glycolyse que P_{ScGPD} , c'est celui qui a été choisi pour exprimer *RAG1* de manière constitutive pour l'analyse métabolomique, même s'il ne s'agit pas du promoteur optimal pour l'expression constitutive de *RAG1* puisque il induit un niveau d'expression plus faible que le promoteur endogène.

Les souches et conditions qui ont finalement été choisies pour l'analyse métabolomique et leur phénotype sont représentés dans la Figure 82.

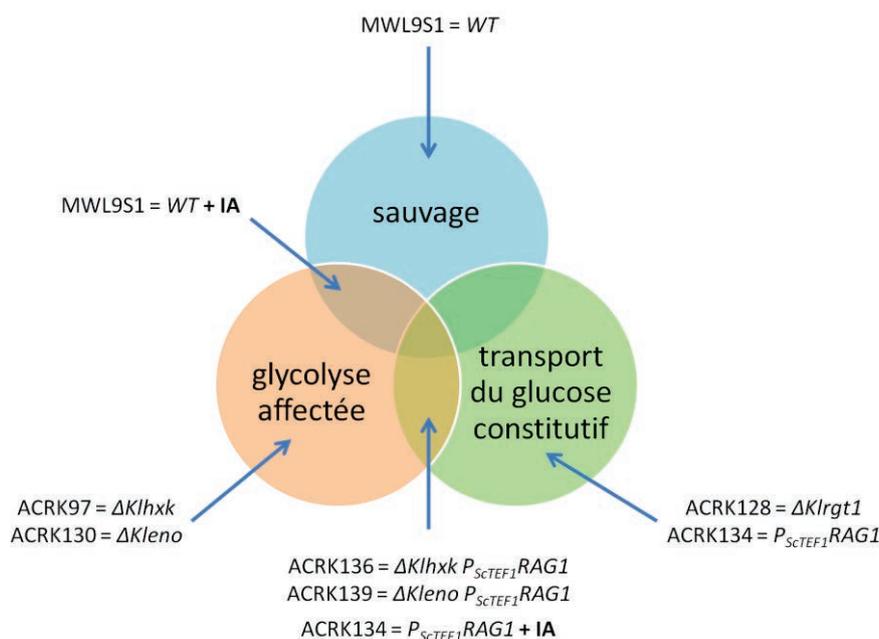


Figure 82: Les souches étudiées par analyse métabolomique présentent divers phénotypes quant à l'activité de la glycolyse et le transport du glucose. La glycolyse est affectée soit par des mutations des enzymes glycolytiques, soit par utilisation d'inhibiteur chimique comme l'iodoacétate à 0,25 mM (+ IA). L'expression du gène de la perméase au glucose *RAG1* est soit régulée par le glucose, soit constitutive ($\Delta Klrqt1$, $P_{ScTEF1}RAG1$).

Finalement, l'activation de la voie de signalisation du glucose par le glucose extracellulaire a été vérifiée dans les souches choisies pour l'analyse métabolomique. Pour cela, le niveau de phosphorylation du répresseur transcriptionnel *K/Rqt1* a été analysé après une stimulation glucose. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 83).

L'expression constitutive de *RAG1* grâce au promoteur P_{ScTEF1} ne perturbe pas la phosphorylation de *K/Rqt1* en réponse au glucose extracellulaire dans une souche où la glycolyse est fonctionnelle. Dans un mutant de l'hexokinase, *K/Rqt1* n'est jamais phosphorylé, que *RAG1* soit exprimé de manière constitutive ou non. Ainsi l'expression constitutive de *RAG1* ne semble pas perturber la signalisation du glucose. Ces résultats suggèrent également que ce n'est pas l'entrée du glucose dans la cellule qui assure le signal métabolique mais bien sa métabolisation via la glycolyse. Ils représentent une étape supplémentaire de validation de ces souches pour l'analyse métabolomique.

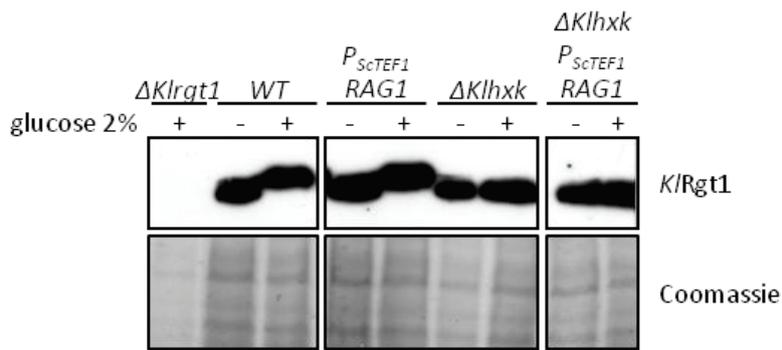


Figure 83: La phosphorylation du répresseur *K/Rgt1* en présence de glucose est normale quand *RAG1* est exprimé sous le contrôle du promoteur P_{ScTEF1} . Les souches ACRK128 ($\Delta Klrqt1$), MWL9S1 (WT), ACRK134 ($P_{ScTEF1}RAG1$), ACRK97 ($\Delta Klhxk$) et ACRK136 ($\Delta Klhxk P_{ScTEF1}RAG1$) ont été cultivées jusqu'en phase exponentielle de croissance en milieu synthétique Sgly avec du glycérol comme source de carbone. Ensuite, les cultures ont été séparées en deux et une moitié a reçu 2 % de glucose suivi de 30 minutes d'incubation à 28°C. Les protéines ont été extraites selon le protocole de Kushnirov, puis séparées par SDS-PAGE suivi d'un Western blot et d'une immunodétection anti-*K/Rgt1*. Un deuxième gel SDS-PAGE a été chargé avec les mêmes échantillons et coloré au bleu de Coomassie pour constituer un contrôle de la charge protéique. L'expérience n'a pas été répétée.

2. b. ii. Plan expérimental des analyses métabolomiques

Après avoir choisi les différentes souches à utiliser (Figure 82) et avant de présenter le plan expérimental, les techniques d'extraction et d'analyse utilisées sont rapidement présentées ci-dessous, ainsi que les différents métabolites mesurés.

L'extraction des métabolites a été réalisée dans l'éthanol chaud puis analysé par HPLC (voir page 230). Ils ont ensuite été identifiés soit par spectrométrie de masse, soit par UV, soit par les deux techniques. L'ensemble des métabolites analysés est représenté en orange dans la Figure 84, qui indique leur place dans les voies métaboliques. Le mode de détection est également indiqué.

Les métabolites de la partie supérieure de la glycolyse ont été analysés, car ce sont eux qui varient le plus rapidement après une stimulation glucose (voir page 64). Les nucléotides phosphate ont tous été analysés car ils sont représentatifs du niveau énergétique de la cellule, mais aussi parce qu'ils montrent l'état des voies de biosynthèse ribonucléotidiques de la cellule. L'IMP est considéré comme une « voie de stockage énergétique » des nucléotides phosphate. Certains intermédiaires du cycle TCA ont été mesurés : citrate, isocitrate, succinate, fumarate et malate, dont l'augmentation est observée dans la littérature après stimulation glucose (voir page 64). Le 6-phosphogluconate est un intermédiaire de la branche oxydative des pentoses phosphate, choisi pour mesurer l'activité de cette voie. Plusieurs métabolites mesurés sont des intermédiaires de voies de stockage : synthèse du tréhalose (tréhalose-6-phosphate) et synthèse du glycogène (glucose-1-phosphate et UDP-glucose). Le glycérol-3-phosphate est un intermédiaire de la voie de biosynthèse du glycérol, qui est stimulé par un stress osmotique. Enfin, plusieurs métabolites non-identifiés ont été mesurés car ils présentaient des profils intéressants : un hexose phosphate et trois composés dont les longueurs d'onde du pic d'absorption maximale sont 230, 245 et 284 nm.

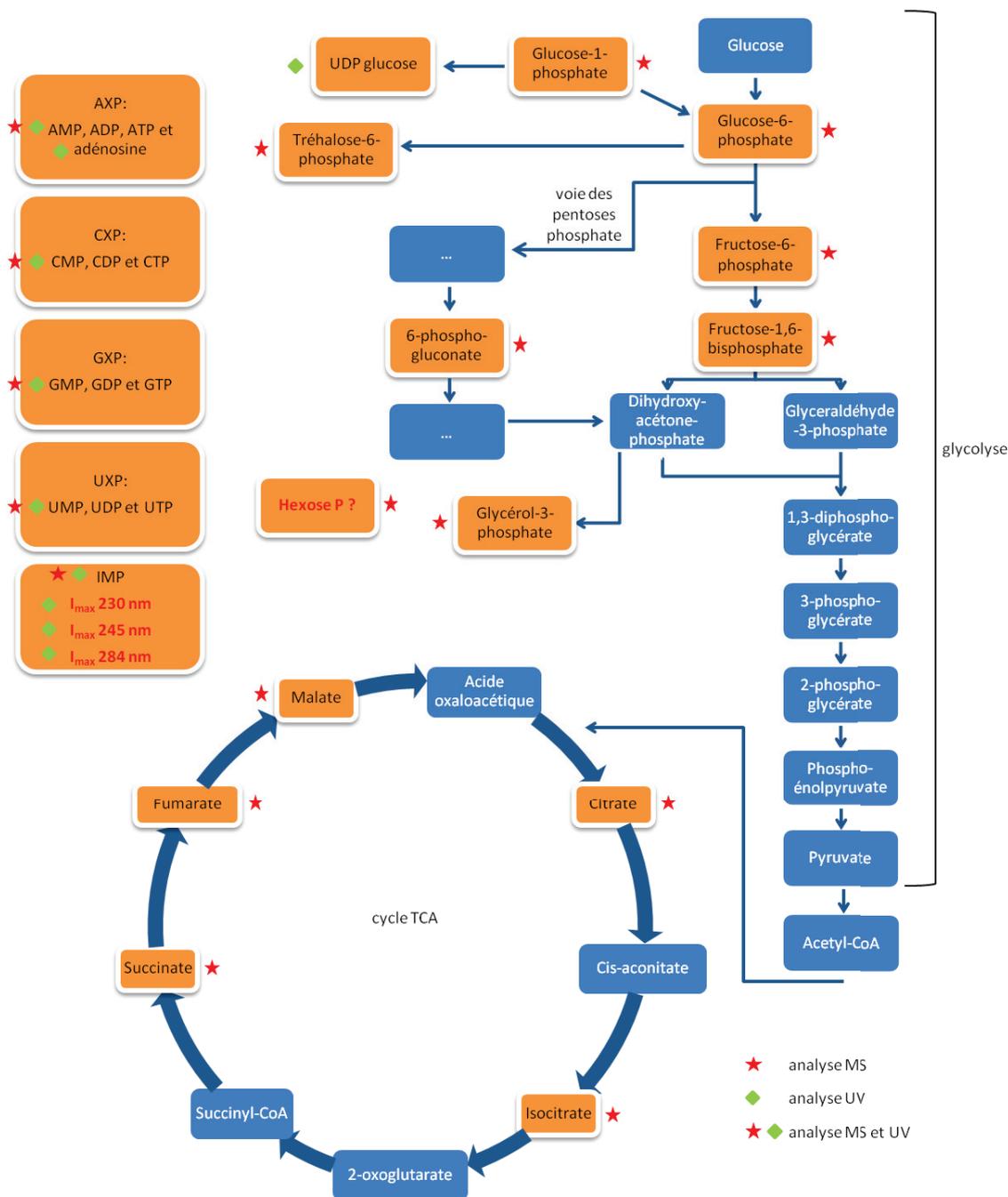


Figure 84: Les différents métabolites analysés en HPLC appartiennent à la partie supérieure de la glycolyse, au cycle TCA, à la voie des pentoses phosphate, de synthèse du tréhalose ou du glycérol ou sont des nucléotides. Les métabolites analysés sont représentés dans des cadres oranges. Il y a quatre métabolites dont la nature n'est pas définie précisément (en rouge) : un hexose phosphate et trois nucléotides dont la longueur d'onde du pic d'absorption maximale est indiquée. La ou les méthodes d'analyse utilisées sont indiquées.

Nous avons choisi d'analyser les métabolites après croissance dans un milieu de culture synthétique, afin de contrôler au maximum les sources de carbone disponible pour les cellules. Les métabolites issus de la glycolyse ont été mesurés au cours du temps après que les cellules aient subi une stimulation glucose, afin d'étudier un processus dynamique qui est plus informatif que des points de mesure isolés.

Nous avons inclus à l'analyse métabolomique des mutants de l'énolase qui, dans un milieu minimum, ont besoin d'une source de carbone qui peut être assimilée sans cette enzyme. Un mélange de lactate 2 % + glucose 0,1 % a été utilisé comme source de carbone pour toute l'étude, la faible concentration de glucose étant nécessaire à la mise en route de la néoglucogenèse dans les mutants de l'énolase. Pour le traitement à l'IA, dans certains cas, un milieu synthétique glucose SG a été directement utilisé.

Les temps de prélèvement, d'ajout du glucose ou de l'iodoacétate sont indiqués dans la Figure 85. Des temps de prélèvement très proches du temps d'addition du glucose (30 s, 1 min, 3 min, 10 min) ont été choisis pour observer des phénomènes dynamiques. Par ailleurs, comme l'expression de *RAG1* est maximale au moins 4 h après la stimulation glucose, un temps de prélèvement à 5 h a également été inclus, ainsi qu'un temps intermédiaire à 1 h. Toutes les cultures et tous les prélèvements ont été réalisés en double afin de constituer un duplicata biologique. Les cultures, les prélèvements puis l'extraction des métabolites et la détection par HPLC ont été réalisés dans le laboratoire de Jean Marie François, au LISPB à Toulouse lors de mon séjour là-bas.

Le choix du milieu de culture synthétique lactate 2 % + glucose 0,1 % a été remis en question par des résultats du laboratoire, postérieurs à la réalisation de l'analyse métabolomique et non-présentés ici. En effet, l'expression maximale de *RAG1* est atteinte avec seulement 0,1 % de glucose dans le milieu, ce qui correspond au milieu Slactate (lactate 2 % + glucose 0,1 %). Ainsi, selon la quantité de glucose du milieu de culture qui a été consommée avant le début des prélèvements par les cellules analysées en métabolomique, il est possible que l'expression de *RAG1* soit déjà fortement induite avant la stimulation glucose. Si c'est le cas, les souches dans lesquelles *RAG1* est exprimé de manière constitutive ($P_{SCTEF1}RAG1$) n'auront pas un meilleur transport du glucose par Rag1 que la souche sauvage après la stimulation glucose. Au contraire, il est possible que le transport du glucose soit moins efficace dans ces souches puisque l'expression de *RAG1* en présence de glucose est plus faible que dans une souche sauvage (Figure 81).

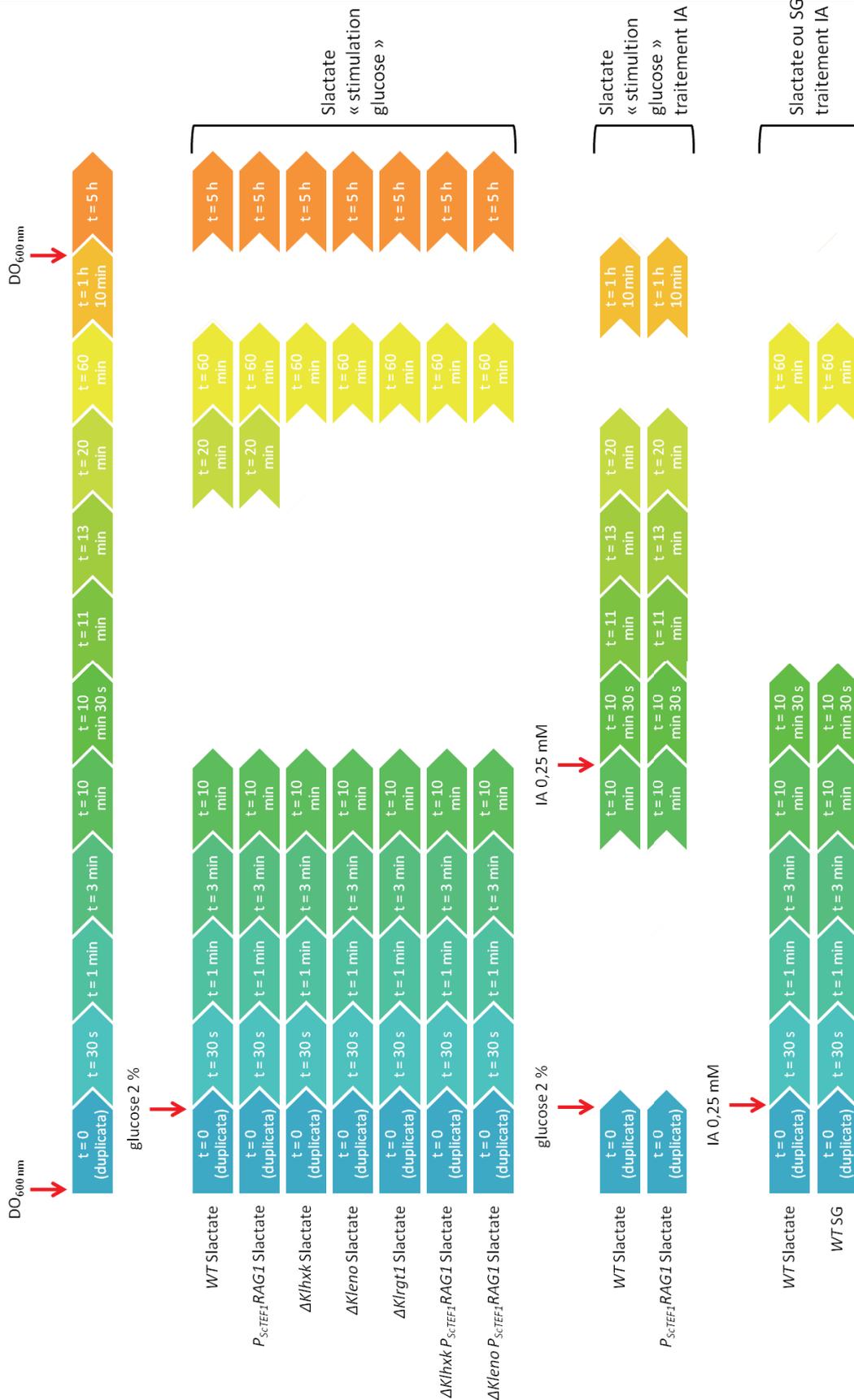


Figure 85: Plan expérimental pour l'analyse métabolomique. A chaque temps indiqué correspond un échantillonnage, c'est-à-dire le prélèvement dans la culture d'une quantité de cellules équivalente à 20 unités de $DO_{600\text{ nm}}$, soit 5 mg de matière sèche. Les souches utilisées sont les suivantes: MWL9S1 : WT, ACRK97 : $\Delta Klhxk$, ACRK128 : $\Delta Klrgt1$, ACRK130 : $\Delta Kleno$, ACRK134 : $P_{ScTEF1}\text{-RAG1}$, ACRK136 : $\Delta Klhxk P_{ScTEF1}\text{-RAG1}$ et ACRK139 : $\Delta Kleno P_{ScTEF1}\text{-RAG1}$. La $DO_{600\text{ nm}}$ a été mesurée avant de commencer les prélèvements à $t=0$ et avant le prélèvement à $t=5\text{ h}$.

2. b. iii. Détermination de la corrélation DO_{600 nm}/nombre de cellules et DO_{600 nm}/masse sèche pour les souches de levure *K. lactis* utilisées

Pour réaliser l'analyse métabolomique, il est nécessaire de déterminer la relation DO_{600 nm}/mg de masse sèche pour toutes les souches utilisées et pour les deux milieux utilisés : Slactate et SG. Ceci a pour but d'exprimer les résultats des mesures de la quantité de métabolites en µmol par gramme de masse sèche de matériel biologique.

Tout d'abord, la relation DO_{600 nm}/nombre des cellules a été déterminée. Après comptage des levures à l'aide d'une cellule de Thoma, les résultats exprimés en nombre de cellules par DO_{600 nm} sont présentés dans la Figure 86 (barres rouges). Les résultats correspondent à l'ordre de grandeur utilisé pour *K. lactis* dans le laboratoire : entre 2 et 3 x 10⁷ cellules dans une unité DO_{600 nm} (soit 1 ml de culture à DO_{600 nm} = 1).

Ensuite, la détermination DO_{600 nm}/mg de masse sèche a été réalisée pour les mêmes souches et conditions de culture. Les résultats obtenus pour la masse sèche ainsi que ceux corrélant la DO_{600 nm} au nombre de cellules ont permis de calculer le nombre de cellules par milligramme de matière sèche (Figure 86, barres bleues).

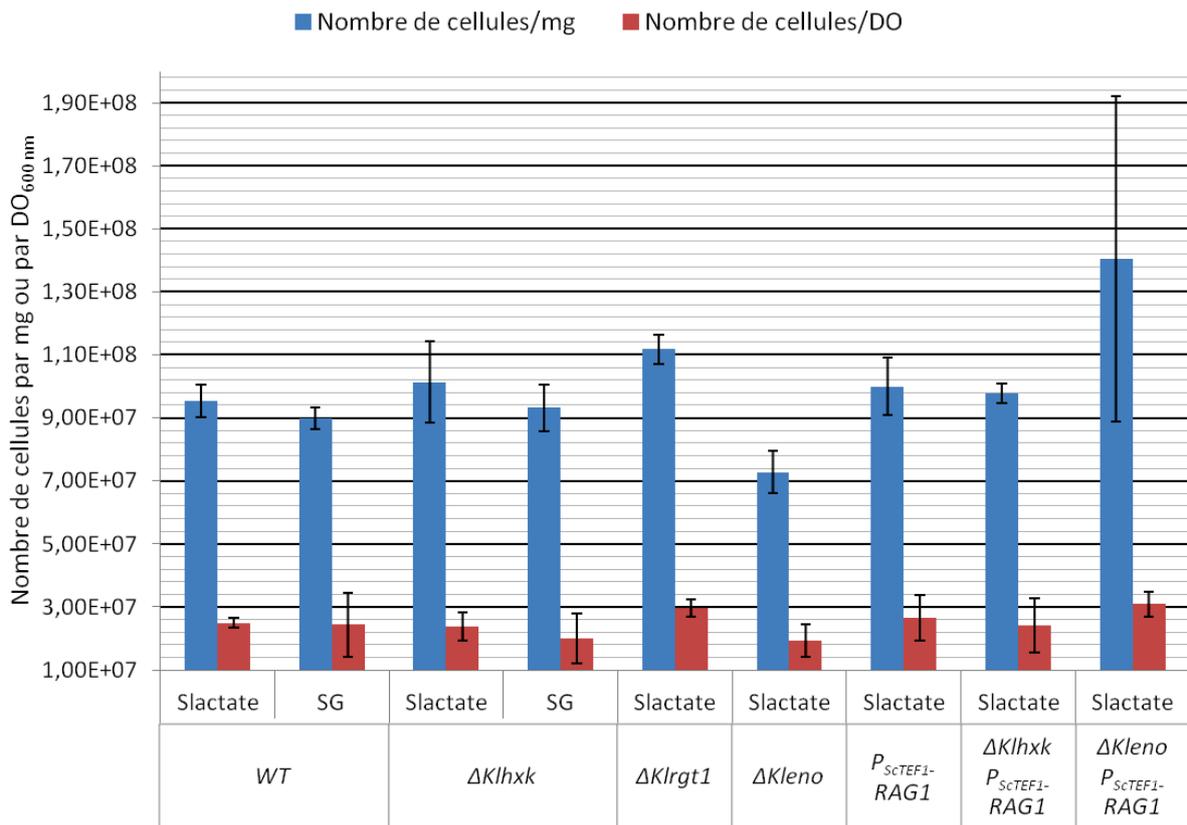


Figure 86: Les variations inter-souches du nombre de cellules par mg de poids sec et par DO_{600 nm} (DO) sont représentées pour les souches de levure *K. lactis* utilisées et cultivées en milieu Slactate ou SG. MWL9S1 : WT, ACRK97 : Δ*Klhk*, ACRK128 : Δ*Klrgt1*, ACRK130 : Δ*Kleno*, ACRK134 : P_{ScTEF1}RAG1, ACRK136 : Δ*Klhk* P_{ScTEF1}RAG1 et ACRK139 : Δ*Kleno* P_{ScTEF1}RAG1.

Pour *S. cerevisiae*, une estimation donne environ 1x10⁸ cellules/mg de masse sèche (communication de Jean Marie François). Les chiffres calculés ici pour les souches utilisées de *K. lactis* sont très proches.

2. b. iv. Résultats de l'analyse métabolomique

Les résultats obtenus pour la souche sauvage cultivée en milieu synthétique Slactate pour vingt minutes après une stimulation glucose sont présentés. La Figure 87 contient les résultats obtenus pour l'analyse des métabolites dérivés de la glycolyse en spectrométrie de masse alors que la Figure 88 montre les résultats obtenus pour les nucléotides, mesurés à la fois en spectrométrie de masse et par UV. Les résultats pour les autres souches et les autres conditions de culture sont inclus en Annexes (pages 233 à 253).

Malheureusement, l'étude des variations de quantité de métabolites après une stimulation glucose n'a pas pu être réalisée, à cause de variations trop importantes entre les duplicatas. En effet, toutes les variations observées au cours du temps sont statistiquement non significatives par rapport à l'écart entre les deux mesures.

Il est prévu qu'une partie des mesures soit répétée à nouveau pour valider ou invalider une des deux mesures précédemment réalisées.

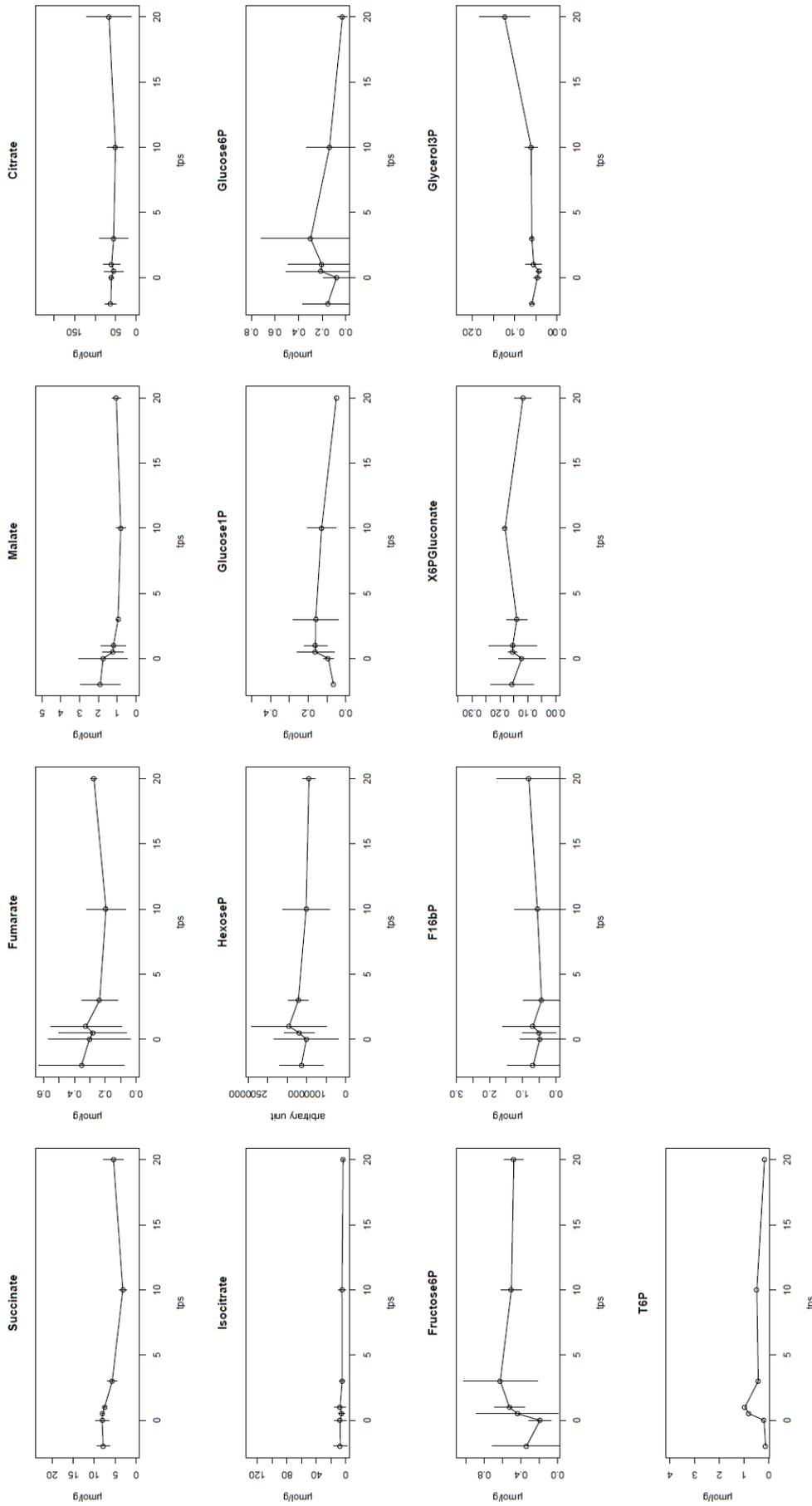


Figure 87: Analyse des métabolites dérivés de la glycolyse dans la souche sauvage MWL9S1 cultivée en milieu lactate et ayant subi une stimulation glucose. Les vingt premières minutes après l'ajout de glucose sont représentées. Les duplicatas réalisés à t = 0 sont représentés, l'un à t = -2 puis l'autre à t = 0. Les quantités de métabolites (mesurées par spectrométrie de masse) sont exprimées en μmol par g de matière sèche biologique, sauf pour « HexoseP » qui n'est pas identifié et ne peut pas être quantifié par rapport à des standards. Les valeurs indiquées sont la moyenne de duplicata. Les écarts-type sont représentés. HexoseP : hexose-phosphate, Glucose1P : glucose-1-phosphate, Glucose6P : glucose-6-phosphate, Fructose6P : fructose-6-phosphate, F16bP : fructose-1,6-bisphosphate, X6PGluconate : 6-phospho-gluconate, Glycerol3P : glycérol-3-phosphate et T6P : tréhalose-6-phosphate.

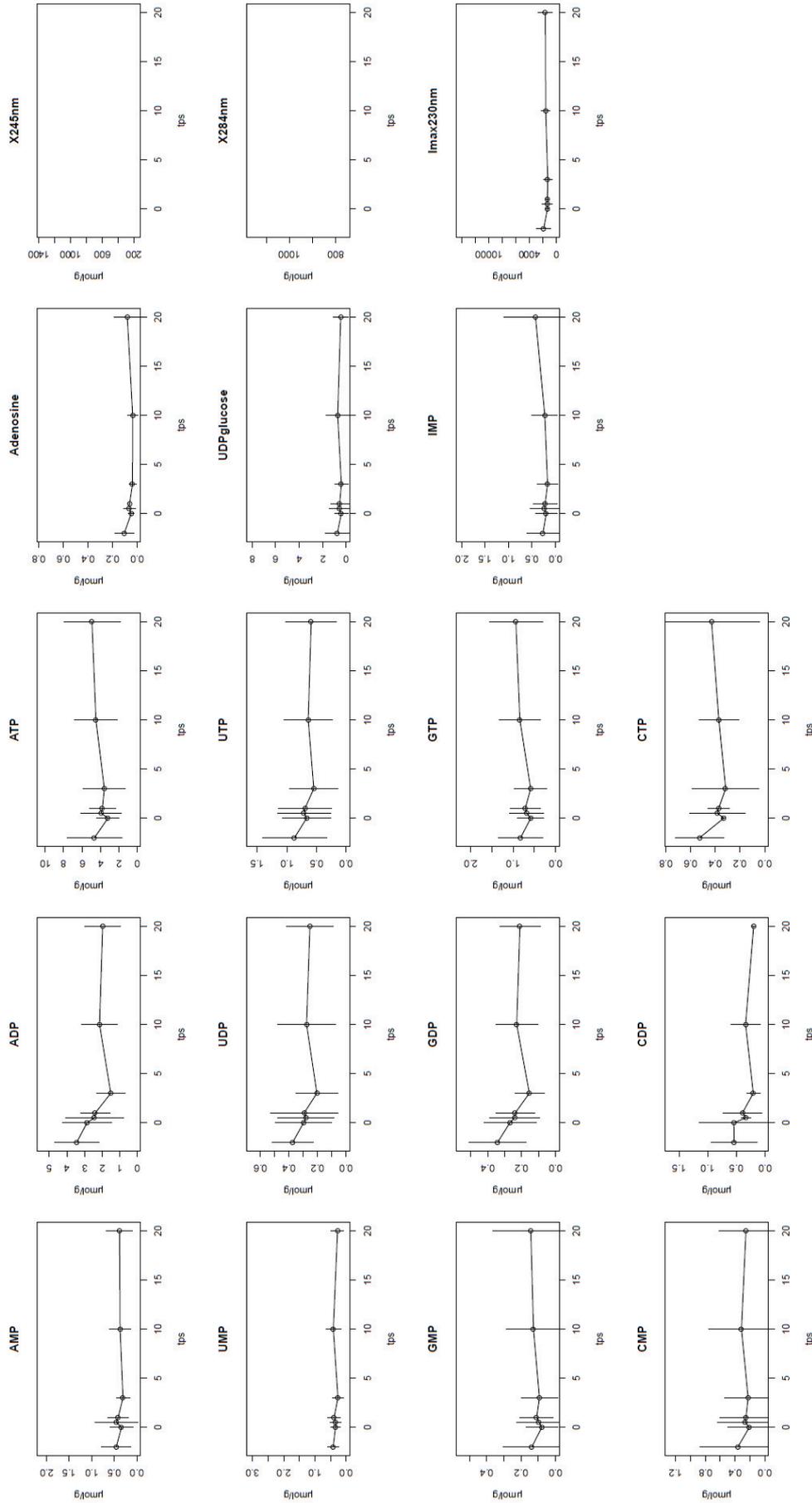


Figure 88: Analyse des nucléotides dans la souche sauvage MWL9S1 cultivée en Slactate et ayant subi une stimulation glucose. Les vingt premières minutes après l'ajout de glucose sont représentées. Les duplicatas réalisés à $t = 0$ sont représentés, l'un à $t = -2$ puis l'autre à $t = 0$. Les quantités de nucléotides (quantité mesurée à la fois par spectrométrie de masse et en UV pour la plupart, voir Figure 84) sont exprimés en $\mu\text{mol par g}$ de matière sèche biologique, sauf pour les nucléotides non-identifiés qui ne peuvent pas être quantifiés (X245nm, X284nm et Imax230nm). Les valeurs indiquées sont la moyenne des mesures de duplicata biologique par deux moyens de détection (MS et UV). Les écarts-type sont représentés.

3. Nature du signal glycolytique qui régule la stabilité du senseur du glucose Rag4 chez *K. lactis* : discussion, conclusions et perspectives

Concernant l'hypothèse protéique du signal issu de la glycolyse et contrôlant la stabilité de Rag4, peu de données ont été collectées. Nous avons observé l'interaction entre *K/Rgt1* et *K/Hxk* (Figure 78), mais les conditions de l'interaction n'ont pas été précisées et ne permettent pas d'extrapoler quant au rôle de cette interaction et son implication potentielle dans la signalisation issue de la glycolyse vers le senseur du glucose. De même, la localisation nucléaire potentielle de *K/Hxk* n'a pas pu être mise en évidence. Ces deux observations pourraient être approfondies pour obtenir des résultats plus définitifs sur le rôle nucléaire de *K/Hxk* et le rôle de son interaction avec *K/Rgt1* chez *K. lactis*. Une autre approche intéressante serait de tenter de construire des mutants dans lesquels l'activité enzymatique et l'activité transcriptionnelle potentielle seraient découplées, comme cela a été fait pour *ScHxk2* (Peláez et al., 2010). La stabilité de Rag4 pourrait alors être étudiée dans ces deux mutants. Une des questions sous-jacentes à l'identification de la nature du signal protéique est de déterminer si ce signal interagit directement avec Rag4 ou s'il passe par des intermédiaires. Ainsi, la détection des différents interactants de Rag4, déjà évoquée dans la discussion du Chapitre 2, permettrait d'identifier de potentiels régulateurs de la stabilité de Rag4, qui pourraient servir d'intermédiaires entre la glycolyse et Rag4.

Concernant l'hypothèse métabolique du signal, l'analyse métabolomique a été réalisée mais n'a malheureusement pas encore produit de résultats exploitables. Cependant, la mesure de la quantité d'ATP réalisée à la fois au laboratoire grâce à un kit (Figure 79), et à Toulouse par HPLC, sont du même ordre de grandeur. Toutefois, les résultats obtenus au laboratoire grâce à un kit de mesure ne montrent pas de déplétion d'ATP commune aux mutants glycolytiques dont l'expression de *RAG1* est affectée, mais ils sont issus de l'analyse d'une situation stable, et non pas d'une situation dynamique comme ce qui a été mesuré en HPLC à Toulouse. Ainsi, il est possible que les mesures dans une situation stable ne montrent pas de régulation commune des mutants glycolytiques, alors que les mesures dynamiques pourraient montrer des informations supplémentaires aboutissant à des résultats différents.

Pour illustrer plus précisément le manque de reproductibilité des résultats obtenus par l'analyse métabolomique, les mesures de la quantité d'ATP dans différentes souches et conditions de culture sont représentées dans la Figure 89, en tant qu'exemple de mesure d'un nucléotide.

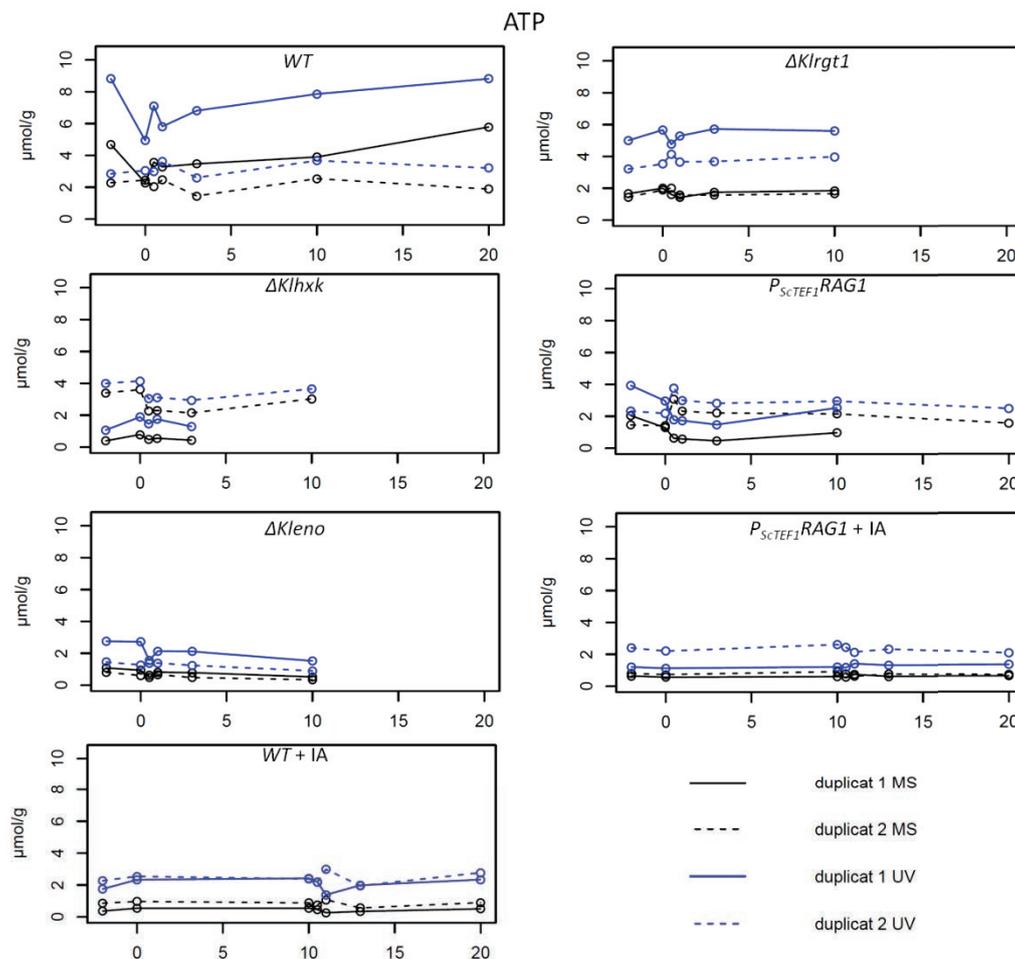


Figure 89: Exemple d'un nucléotide : la quantité d'ATP mesurée ne varie pas de manière reproductible dans différentes cultures. La quantité d'ATP est exprimée en $\mu\text{mol/g}$ de masse sèche, en fonction du temps en minute, et pour chacune des quatre mesures réalisées : duplicatas avec mesures en spectrométrie de masse (MS) et en UV (UV). Plusieurs souches et conditions sont représentées dans les différents panneaux : *WT* = MWL9S1, *ΔKlhxk* = ACRK97, *ΔKleno* = ACRK130, *WT + IA* = MWL9S1 avec traitement 0,25 mM IA à $t = 10$ min, *ΔKlrgt1* = ACRK128, *P_{ScTEF1}RAG1* = ACRK134 et *P_{ScTEF1}RAG1 + IA* = ACRK134 avec traitement 0,25 mM IA à $t = 10$ min. Toutes les souches ont été cultivées en milieu Slactate et ont subi une stimulation glucose à $t = 0$. Pour *ΔKlhxk*, il n'y a pas de valeurs à $t = 10$ pour le premier duplicat car l'échantillon n'était pas exploitable.

Non seulement les quantités mesurées pour un même échantillon par deux techniques de détection (spectrométrie de masse et UV) n'ont pas les mêmes valeurs, mais les variations mesurées n'ont pas toujours la même direction. Toutefois, plusieurs éléments positifs se détachent : la quantité d'ATP mesurée par HPLC est du même ordre de grandeur que celle mesurée par le kit ATPlite (Figure 79) et le mutant de l'énolase contient moins d'ATP que la souche sauvage ou le mutant de l'hexokinase dans les deux analyses. Des mesures réalisées chez *S. cerevisiae* montrent que, après la stimulation glucose des cellules, le niveau global d'ATP diminue très rapidement (en 30 secondes) (Kresnowati et al., 2006; Theobald et al., 1997). Ici, cette variation rapide du niveau d'ATP est observée dans toutes les souches. Les mêmes auteurs décrivent également une augmentation rapide des métabolites de la partie supérieure de la glycolyse : glucose-6-phosphate et fructose-6-phosphate. Les mesures pour le fructose-6-phosphate réalisées dans différentes souches de *K. lactis* sont montrées en exemple dans la Figure 90.

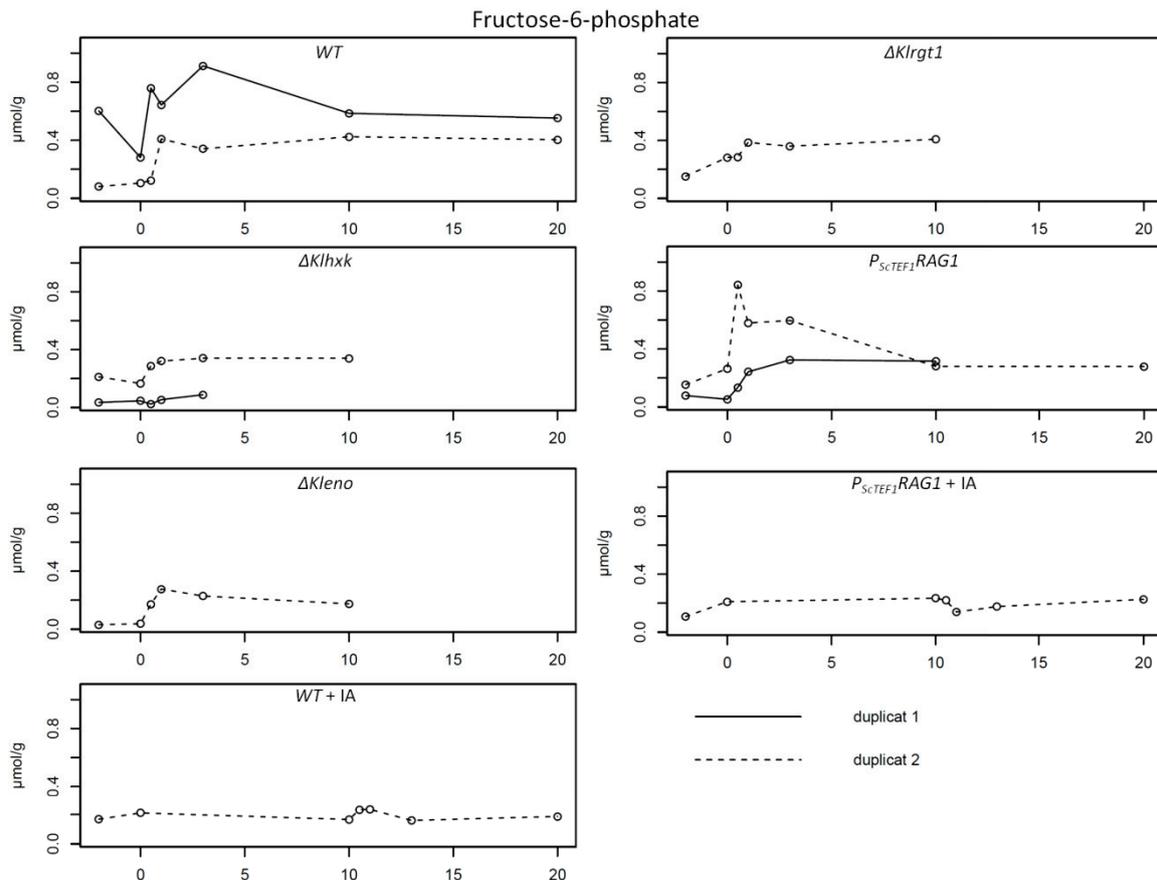


Figure 90: Exemple d'un métabolite: les variations de quantité de fructose-6-phosphate ne sont pas très reproductibles entre les deux duplicatas. La quantité de fructose-6-phosphate est exprimée en $\mu\text{mol/g}$ de masse sèche, en fonction du temps en minute, et pour chacun des duplicatas mesurés en spectrométrie de masse (MS). Plusieurs souches et conditions sont représentées dans les différents panneaux : *WT* = MWL9S1, $\Delta Klhxx$ = ACRK97, $\Delta Klno$ = ACRK130, *WT + IA* = MWL9S1 avec traitement 0,25 mM IA à $t = 10$ min, $\Delta Klrgt1$ = ACRK128, $P_{ScTEF1}RAG1$ = ACRK134 et $P_{ScTEF1}RAG1 + IA$ = ACRK134 avec traitement 0,25 mM IA à $t = 10$ min. Toutes les souches ont été cultivées en milieu Slactate et ont subi une stimulation glucose à $t = 0$. Pour les échantillons $\Delta Klno$, *WT + IA*, $\Delta Klrgt1$ et $P_{ScTEF1}RAG1 + IA$, il n'y a pas de valeur pour le duplicat 1 car le fructose-6-phosphate n'a pas été détecté dans ces échantillons. Pour la souche $\Delta Klhxx$, il n'y pas de valeurs à $t = 10$ pour le premier duplicat car l'échantillon n'était pas exploitable.

Pour la souche sauvage, on observe effectivement une augmentation rapide de la quantité de fructose-6-phosphate. Cette augmentation rapide est également observée pour les autres souches, mais avec une moins grande amplitude. Les mesures du glucose-6-phosphate, présentées en Annexes (pages 233 à 253), montrent également la même tendance. Cependant, les mesures de ce métabolite sont encore une fois peu reproductibles entre les deux duplicatas. Dans quatre des huit analyses présentées, le fructose-6-phosphate était même en dessous du seuil de détection lors de la mesure du premier duplicata.

Ces deux exemples d'un nucléotide (Figure 89) et d'un métabolite (Figure 90) mesurés dans différentes souches montrent le peu de reproductibilité et la difficulté d'exploiter correctement ces données. Cependant, les tendances observées précédemment chez *S. cerevisiae* et attendues ici ressortent : diminution rapide de la quantité d'ATP et augmentation des métabolites supérieurs de la glycolyse après ajout de glucose au milieu. Il ressort aussi que les différents mutants, glycolytiques ou exprimant de manière constitutive le gène de la perméase *RAG1*, sont moins réceptifs à la présence de glucose dans le milieu

extracellulaire et les variations de métabolites sont moins importantes que dans la souche sauvage. Enfin, le traitement à l'iodoacétate 10 minutes après stimulation au glucose ne perturbe le métabolisme que de manière très transitoire : la situation « avant traitement » est rétablie après seulement 3 minutes. Toutefois, le manque de reproductibilité des résultats ne permet pas d'identifier correctement des métabolites qui seraient spécialement régulés dans les mutants glycolytiques.

La répétition de certaines mesures devrait permettre de préciser la fiabilité des deux jeux de données et peut-être pouvoir les exploiter.

Le métabolisme peut être vu comme une source de substrats nécessaires à la modification post-traductionnelle des protéines et donc à la régulation de leur fonction (Metallo and Vander Heiden, 2010). Ainsi, on peut envisager que, si un métabolite de la glycolyse régule le senseur Rag4, il le fasse en modifiant la protéine par ajout d'un substrat de manière covalente, ce qui va ensuite modifier sa fonction et sa stabilité. Un métabolite pourrait aussi réguler la stabilité de Rag4 sans modifier directement la protéine mais en passant par un ou des intermédiaires.

Comme évoqué dans la discussion de l'hypothèse protéique du signal, la purification en grande quantité de Rag4 permettrait de répondre à quelques questions. En plus de permettre d'identifier des partenaires protéiques, une purification du senseur membranaire Rag4 à partir de *K. lactis* permettrait ensuite d'analyser les modifications post-traductionnelles de la protéine : par exemple, il existe des anticorps spécifiques de résidus phosphorylés (sérine phosphorylée, thréonine phosphorylée) qui pourraient être utilisés sur une préparation propre de protéine Rag4. Ce type d'analyse pourrait être réalisé sur des protéines purifiées à partir de cultures dans des conditions et des contextes génétiques différents (mutants glycolytiques dans un premier temps, puis mutants des kinases et des sites potentiels de phosphorylation de Rag4). Une autre solution plus coûteuse et difficile à mettre en place au sein du laboratoire serait de réaliser des analyses en spectrométrie de masse sur Rag4 pour déterminer les différentes modifications post-traductionnelles de ce senseur.

Enfin, si nous arrivons à déterminer un ou des métabolites dont la variation en réponse au glucose est similaire dans tous les mutants glycolytiques, et est spécifique à ces mutants, des analyses plus ciblées pourraient être développées, basées sur la littérature : les modifications post-traductionnelles ou les voies de signalisation impactées par ce métabolite pourraient être étudiées plus en détail, par exemple grâce à l'utilisation de logiciel de prédiction de modifications post-traductionnelles et à la construction de mutants.

IV. Conclusion, discussion et perspectives générales

Chez *K. lactis*, des travaux préalables à ce travail de thèse ont montré que le gène *RAG1* n'est pas exprimé en présence de glucose dans des mutants glycolytiques suggérant ainsi que la glycolyse contrôle l'expression du gène de la perméase au glucose *RAG1* (Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004).

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons démontré que la glycolyse contrôle l'expression de *RAG1* en ciblant la voie de signalisation du glucose dépendante du senseur Rag4. Tout d'abord, l'expression de plusieurs gènes codant pour des composants de cette voie de signalisation est régulée par la glycolyse. Cette régulation transcriptionnelle est due à la modulation de l'activité du répresseur transcriptionnel *K/Rgt1* et de son corépresseur *Sms1* par la glycolyse : en absence d'un flux glycolytique fonctionnel, *K/Rgt1* n'est pas phosphorylé et *Sms1* s'accumule, même en présence de glucose extracellulaire. Le contrôle exercé par la glycolyse sur *K/Rgt1* et *Sms1* ne se fait pas via la caséine kinase Rag8 mais via le senseur membranaire du glucose Rag4. En effet, le senseur Rag4 est déstabilisé et dégradé dans la vacuole quand la glycolyse n'est pas fonctionnelle et que les cellules sont cultivées en présence de glucose comme source de carbone.

Ce contrôle de la glycolyse sur l'expression des gènes de perméases au glucose est conservé chez *S. cerevisiae* : les activités répresseurs de *ScRgt1* et *Mth1*, les homologues de *K/Rgt1* et *Sms1*, sont maintenues en présence de glucose extracellulaire lorsque la glycolyse est affectée. De plus, le senseur *Rgt2* est déstabilisé et internalisé en présence de glucose lorsque la glycolyse n'est pas fonctionnelle.

Ces différentes observations sur la régulation de la signalisation glucose exercée par la glycolyse via les senseurs du glucose nous ont conduits à nous intéresser au rôle de Rag4 dans la transmission du signal glucose puis à la régulation de sa stabilité en fonction de l'état métabolique des cellules.

1. Le senseur du glucose Rag4 : une plateforme d'interaction pour permettre la propagation intracellulaire du signal glucose ?

Au cours de cette étude, nous avons déterminé que la queue C-terminale du senseur membranaire Rag4 est nécessaire à la transmission d'un signal glucose fonctionnel, comme chez *S. cerevisiae*. Par contre, sa seule présence, même surexprimée, ne suffit pas à assurer ce rôle de signalisation. Cette dernière observation semble contradictoire avec certains résultats rapportés pour *S. cerevisiae* dans lesquels la surexpression de la queue C-terminale de *Snf3* ou *Rgt2* produit un signal glucose constitutif (Vagnoli et al., 1998; Dlugai et al., 2001; Moriya and Johnston, 2004). L'interaction de la queue C-terminale de Rag4 avec une ou des protéines membranaires est suggérée par nos résultats : d'une part, l'interaction avec Rag8 a été démontrée, et d'autre part, la queue C-terminale de Rag4 exprimée à partir d'un plasmide est retrouvée en partie associée à la membrane. Chez *K. lactis*, il a également été

déterminé que le corépresseur Sms1 interagit avec le senseur Rag4, même si le domaine de Rag4 impliqué dans cette interaction n'a pas été identifié (Hnatova et al., 2008). Chez *S. cerevisiae*, les queues C-terminales des senseurs du glucose Snf3 et Rgt2 interagissent avec les corépresseurs Mth1 et Std1 (Schmidt et al., 1999; Lafuente et al., 2000). Ainsi, il est probable que Sms1 interagisse avec Rag4 via sa queue C-terminale. La queue C-terminale cytoplasmique de Rag4 constituerait une plateforme nécessaire à la promotion du signal glucose qui permettrait l'interaction de Rag4 avec Rag8 et Sms1 (Figure 91). Toutefois, chez *S. cerevisiae*, ce modèle est remis en question par l'observation que le corépresseur Mth1 est toujours nucléaire (Pasula et al., 2010).

Nos résultats suggèrent que Rag4 pourrait interagir avec d'autres protéines membranaires via sa queue C-terminale. Pour prouver que la queue C-terminale de Rag4 s'associe à d'autres partenaires membranaires en dehors de Rag8, la répartition membranaire de la portion C-terminale de Rag4 pourrait être analysée en parallèle dans une souche sauvage et dans un mutant *rag8*. Si la protéine est toujours membranaire dans ce mutant, cela démontrerait que la queue C-terminale de Rag4 interagit avec d'autres partenaires membranaires que Rag8. La mise en évidence de ces nouveaux partenaires potentiels de Rag4 pourrait être réalisée en employant une approche de co-immunoprécipitation (protéine Rag4 entière ou queue C-terminale seule) couplée à de la spectrométrie de masse. En faisant varier les conditions expérimentales (sources de carbone, mutants de la glycolyse), cela permettrait également de mettre en évidence la dynamique d'interaction au sein du complexe Rag4 nouvellement identifié.

Au cours de mes travaux de thèse, nous avons tenté de démontrer, sans succès, que la kinase Rag8 phosphoryle Sms1 *in vitro*, alors que la phosphorylation de Mth1 et Std1 par Yck1/2 avait été démontrée chez *S. cerevisiae* (Moriya and Johnston, 2004). De plus, sur la base de la présence dans la queue C-terminale de Rag4 de sites consensus de phosphorylation par les caséine kinases de type I, nous avons également testé la phosphorylation de la queue cytoplasmique de Rag4 par Rag8, mais cette phosphorylation n'a pas été observée. Cela suggère soit que Rag8 ne phosphoryle ni Sms1, remettant ainsi en question le modèle actuel, ni Rag4, soit que cette phosphorylation nécessite une pré-phosphorylation des sites consensus de Rag8, comme cela est couramment observé pour les caséine kinases (Cheong and Virshup, 2011). Dans ce cas, on pourrait envisager que le complexe de signalisation du glucose recruté par la queue C-terminale de Rag4 comprenne également une ou plusieurs kinases responsables de la pré-phosphorylation des substrats de Rag8. L'identité de cette ou ces kinases resterait à déterminer.

Chez les levures, les senseurs du glucose Rag4, Rgt2 et Snf3 portent de nombreux sites consensus de phosphorylation (voir Figure 76 Chapitre 2). Les queues C-terminales de ces trois senseurs portent notamment un site consensus de phosphorylation par la kinase Snf1, dont l'activité est régulée positivement par l'ADP (Mayer et al., 2011). Chez *K. lactis*, dans l'hypothèse que Rag4 soit phosphorylé par K/Snf1, la régulation de cette kinase par l'ADP pourrait constituer un lien entre niveau énergétique de la cellule et signalisation du glucose par les senseurs (Figure 91 et Figure 92). Pour vérifier cette hypothèse, il serait tout d'abord

intéressant de construire un mutant de *RAG4* dans lequel le site consensus de phosphorylation de Snf1 serait muté. Il serait alors possible d'analyser dans ce mutant, d'une part la fonctionnalité du signal glucose, et d'autre part la stabilité du senseur Rag4 quand la glycolyse n'est pas fonctionnelle. Cela permettrait de déterminer l'effet de cette mutation sur la fonction de la protéine. Une autre stratégie consisterait à construire des mutants où *K/Snf1* serait inactif ($\Delta K/snf1$) ou constitutionnellement actif ($\Delta K/reg1$) et d'étudier l'effet de ces mutations sur la régulation de la signalisation du glucose. Enfin, la capacité de Snf1 à phosphoryler Rag4 pourrait être analysée *in vitro* par un essai kinase. Cela permettrait d'établir les bases moléculaires du mécanisme de régulation des senseurs du glucose par le flux glycolytique via la kinase *K/Snf1*.

2. Comment la stabilité du senseur Rag4 est-elle ciblée par la glycolyse ?

A propos de la régulation de la stabilité de Rag4, l'étude de différents mutants a permis de mettre en évidence que la queue C-terminale de cette protéine a un rôle stabilisateur, contrairement à ce qui est décrit pour Rgt2 chez *S. cerevisiae* (Roy and Kim, 2014). Par contre, la queue cytoplasmique en elle-même n'est pas toujours stable ; au contraire, elle semble déstabilisée en présence de glycérol et dans un mutant glycolytique en présence de glucose, comme la protéine Rag4 entière. Ceci suggère d'une part que les domaines régulant la stabilité de Rag4 selon les conditions de croissance sont présents sur cette queue C-terminale, et d'autre part que le signal glycolytique cible cette queue C-terminale et active sa fonction stabilisatrice. Cette hypothèse est renforcée par l'identification de certains domaines particuliers de la queue C-terminale de Rag4 nécessaires à la régulation de la stabilité du senseur du glucose : la séquence PEST (signal protéolytique potentiel) et les lysines 723-775, potentiellement ubiquitinées, sont nécessaires à la régulation de la stabilité selon la source de carbone disponible. Ces lysines ne sont pas alignées avec celles qui sont ubiquitinées lors de la dégradation de Rgt2 selon la source de carbone (Roy and Kim, 2014). Par contre, concernant la stabilité de Rag4 contrôlée par la glycolyse, un seul site impliqué a été identifié, et il n'est pas situé sur la queue C-terminale : il s'agit de la lysine 40 dans la partie cytoplasmique N-terminale. A ce jour aucune étude n'avait mis en évidence un rôle de l'extrémité N-terminale soluble dans la fonction et la régulation des senseurs du glucose chez les levures.

Les travaux à poursuivre pour identifier des domaines nécessaires au contrôle de la stabilité de Rag4 ont déjà en partie été évoqués précédemment : la mutation du site consensus de phosphorylation par la kinase *K/Snf1* présent dans Rag4 permettrait de déterminer son implication dans le contrôle de la stabilité du senseur du glucose (Figure 91). L'ubiquitination de la protéine est également un point qui mérite d'être approfondi : un protocole permettant de visualiser de manière reproductible l'ubiquitination potentielle de Rag4 doit être mis en place. Cela permettra de comparer l'ubiquitination de Rag4 sauvage, dans

différentes conditions de croissance, dans un mutant de la glycolyse, mais aussi quand certains domaines de Rag4 sont mutés : séquence PEST et lysines potentiellement ubiquitinées (Figure 91). Chez *S. cerevisiae*, la dégradation des perméases au glucose et du senseur Rgt2 nécessite l'ubiquitination par l'ubiquitine ligase Rsp5 (Roy and Kim, 2014; Roy et al., 2014b). ScRsp5 et KlRsp5 sont identiques à 81 %, ce qui suggère une conservation fonctionnelle. Chez *K. lactis*, bien qu'aucune étude n'ait été publiée sur cette ubiquitine ligase en particulier, et sur l'ubiquitination en général, la création d'un mutant ponctuel *Klrs5* permettrait de définir l'implication de cette protéine dans la déstabilisation de Rag4 (Figure 91).

Il serait également intéressant de poursuivre la détermination des conditions dans lesquelles Rag4 est internalisé et dégradé : dans ces travaux de thèse, seule la concentration de glucose 2 % a été testée. Chez *S. cerevisiae*, les senseurs Rgt2 et Snf3 ont des affinités différentes pour le glucose, et ces senseurs sont dégradés lorsque la concentration de glucose extracellulaire est hors du champ de leurs affinités (Roy and Kim, 2014). Ainsi, la stabilité de Rag4 pourrait être étudiée en utilisant une gamme de concentrations en glucose plus étendue. Des travaux antérieurs du laboratoire montrent que Rag4 est un senseur du glucose de haute et de basse affinité (Betina et al., 2001), et des travaux préliminaires suggèrent que Rag4 est stable et membranaire avec 0,1 % de glucose dans le milieu (Figure 64).

Chez *K. lactis*, l'ensemble des mutants *rag* cultivés en présence de glucose comme source de carbone semble avoir une composition de la paroi et de la membrane plasmique altérée en acides gras (Cialfi et al., 2011) (Figure 92). Cette observation suggère une déstabilisation globale de la membrane plasmique dans un mutant glycolytique en présence de glucose, qui pourrait aussi affecter le senseur membranaire Rag4. Dans cette étude, il a été montré que l'ajout d'ergostérol au milieu de culture permet la croissance des mutants *rag* sur milieu GAA (contenant l'inhibiteur de la respiration antimycine A), car les mutants *rag* auraient un défaut de biosynthèse de l'ergostérol (à partir d'acétyl-CoA) qui serait responsable de la déstabilisation des membranes. Chez les levures, l'ergostérol est un composant important des micro-domaines lipidiques (« lipid raft »), qui sont notamment impliqués dans le trafic intracellulaire membranaire (Mollinedo, 2012). Chez *S. cerevisiae*, de nombreux récepteurs et perméases sont hébergés dans ces micro-domaines lipidiques, comme par exemple la pompe à proton Pma1, la perméase générale d'acides aminés Gap1 et la perméase au glucose Hxt1 (Lauwers and André, 2006). Ainsi, l'altération de la membrane plasmique observée chez les mutants *rag* pourrait être responsable d'une déstabilisation des micro-domaines lipidiques. Puisque la perméase au glucose Hxt1 est retrouvée dans ces micro-domaines, il est raisonnable de penser que chez *K. lactis*, le senseur Rag4, qui est un homologue des perméases Hxts, soit également retrouvé dans les micro-domaines lipidiques. Ainsi, puisque ces micro-domaines sont impliqués dans le trafic intracellulaire, leur déstabilisation chez *K. lactis* pourrait affecter Rag4 (Figure 91).

Dans tous les cas, même si la déstabilisation et l'internalisation de Rag4 pourrait être le résultat d'une déstabilisation plus massive de la membrane plasmique et notamment des

micro-domaines lipidiques, il s'agirait quand même d'un processus sélectif puisque la pompe à protons *KIPma1* n'est pas internalisée dans un mutant glycolytique (Publication, Figure 5). Chez *S. cerevisiae*, l'existence de micro-domaines lipidiques distincts au sein d'une même cellule est mise en évidence par l'observation de deux protéines qui ne co-localisent pas alors qu'elles sont retrouvées dans des micro-domaines (Mollinedo, 2012). Ainsi, il est possible d'imaginer que *KIPma1* et *Rag4* appartiennent à des micro-domaines différents, qui ne soient pas régulés de manière similaire.

Un test simple pour mettre en cause la déstabilisation globale des membranes comme responsable de l'internalisation de *Rag4* en présence de glucose serait de cultiver les cellules en présence de glucose et d'ergostérol, puis d'analyser la stabilité et la localisation cellulaire du senseur *Rag4*. Une autre possibilité serait d'analyser la stabilité du senseur *Rag4* dans d'autres mutants *rag*, dont la mutation ne touche pas un gène glycolytique. En effet, tous les mutants *rag* ont une membrane plasmique dont la composition en acides gras est altérée. Ce test permettrait de dissocier les effets sur *Rag4* de la déstabilisation de la membrane de ceux exercés par la glycolyse. En fonction des résultats, nous pourrions ensuite déterminer si *Rag4* appartient ou non à des micro-domaines lipidiques, et si ceux-ci sont déstabilisés lorsque la glycolyse n'est pas fonctionnelle.

Chez *S. cerevisiae*, il a récemment été démontré que lorsque la cellule est privée de glucose, l'hydrolyse de certaines protéines membranaires dans la vacuole après endocytose constituerait un moyen de survie (Lang et al., 2014). Cette hydrolyse serait sélective : par exemple, le transporteur général d'acides aminés *Gap1* mais aussi la perméase au glucose *Hxt3* sont dégradés, alors que la pompe à proton *Pma1* est peu affectée. Il est tentant de faire un parallèle avec la dégradation de *Rag4* lorsque la glycolyse n'est pas fonctionnelle chez *K. lactis* (et donc que la cellule se trouve dans l'incapacité de transporter efficacement le glucose et de l'assimiler). Pour vérifier si un tel processus pourrait être impliqué dans la déstabilisation de *Rag4*, une première étape intéressante serait d'observer la stabilité d'autres protéines membranaires dans un mutant glycolytique ou après traitement par l'iodoacétate. Cela a déjà été fait en utilisant la protéine *KIPma1* comme témoin dans les analyses de la répartition membranaire de *Rag4*, qui n'est pas affectée dans des mutants glycolytiques. Cependant, il serait intéressant de tester la stabilité d'autres protéines membranaires chez *K. lactis*.

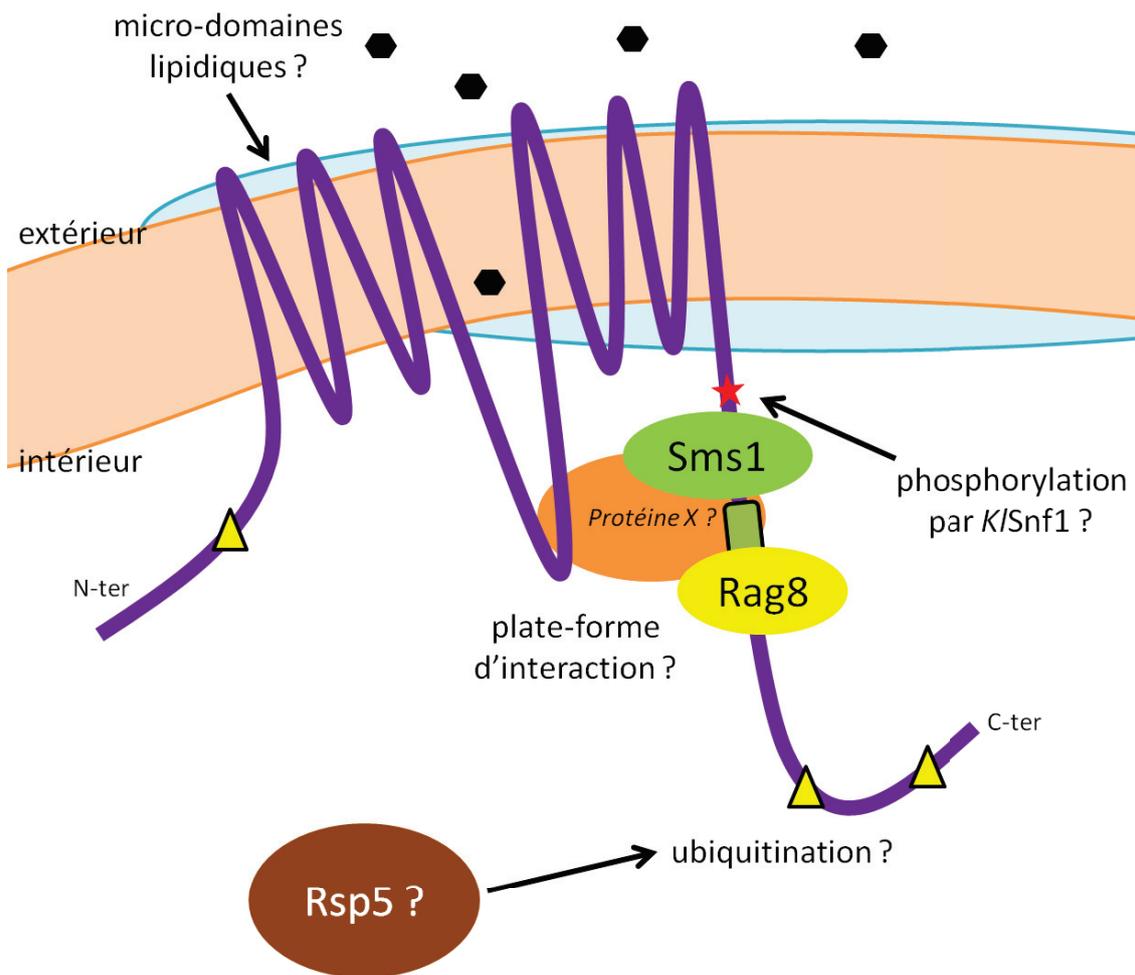


Figure 91: Pistes de recherche à poursuivre pour la caractérisation du senseur du glucose Rag4 : domaines impliqués dans la signalisation du glucose et contrôle de la stabilité de Rag4. Le rectangle vert représente la séquence PEST impliquée dans le contrôle de la stabilité de Rag4 selon la source de carbone. Les triangles jaunes représentent les lysines potentiellement ubiquitinées qui sont impliquées dans le contrôle de la stabilité de Rag4. L'étoile rouge montre le site potentiel de phosphorylation par la kinase *K/Snf1*. Les zones d'interaction des protéines *Sms1* et *Rag8* avec *Rag4* restent à déterminer. L'interaction d'autres protéines intervenant dans la signalisation du glucose (protéine X) est à analyser. L'appartenance potentielle de *Rag4* à des micro-domaines lipidiques est représentée (en bleu). Enfin, chez *S. cerevisiae* l'ubiquitine ligase *Rsp5* est impliquée dans l'ubiquitination du senseur *Rgt2*, et son implication dans la dégradation de *Rag4* chez *K. lactis* est à étudier.

3. La voie de signalisation du glucose est-elle régulée par la glycolyse à différents niveaux ?

Au cours de cette étude, une désynchronisation de la signalisation du glucose engendrée par la rupture du flux glycolytique en présence de glucose a été observée, particulièrement grâce à l'utilisation de l'iodoacétate comme inhibiteur chimique de la glycolyse :

1- Les répresseurs transcriptionnels *K/Rgt1* et *Sms1* chez *K. lactis*, ainsi que *ScRgt1* et *Mth1* chez *S. cerevisiae* sont rapidement affectés par la rupture du flux glycolytique (inhibition de la glycolyse par l'IA). Chez *K. lactis*, la déphosphorylation de *K/Rgt1* est observée après seulement cinq minutes d'inhibition chimique de la glycolyse (Figure 92, (1)). L'accumulation

de Sms1 est un peu plus longue à se mettre en place mais elle est observable à partir de dix minutes post-traitement (Figure 92, (2)). Chez *S. cerevisiae*, nous n'avons pas réalisé de cinétique après traitement par l'IA pour observer la déphosphorylation de ScRgt1 et l'accumulation de Mth1, mais les deux répresseurs sont activés après trente minutes de traitement.

2- La déstabilisation des senseurs du glucose Rag4 chez *K. lactis* et Rgt2 chez *S. cerevisiae* nécessite plus de temps : après traitement à l'IA, il faut attendre deux heures pour commencer à observer l'internalisation des senseurs (Figure 92, (3)).

3- L'utilisation de l'IA pour inhiber la glycolyse chimiquement n'a pas permis d'observer des effets importants sur l'expression du gène de la perméase *RAG1* chez *K. lactis*. Toutefois, un faible effet est observé après deux heures de traitement (Figure 92, (4)).

Or, comme les senseurs du glucose se trouvent en amont dans la voie de signalisation, l'activité des répresseurs *K/Rgt1/Sms1* et *ScRgt1/Mth1* dépend de l'activation ou non de la voie de signalisation du glucose. Ainsi, l'activation des répresseurs transcriptionnels ne peut pas être induite par la déstabilisation et l'internalisation des senseurs du glucose puisque plusieurs heures séparent les deux événements. Deux explications sont possibles :

- Soit les senseurs du glucose sont inactivés préalablement à leur internalisation : leur capacité à initier un signal glucose serait inhibée très rapidement (en moins de cinq minutes), ce qui entrainerait ensuite l'activation des répresseurs transcriptionnels (rapidement assurée par la déphosphorylation de Rgt1, et nécessitant aussi la synthèse de Mth1/Sms1), puis l'internalisation et la dégradation des senseurs (observée à partir de deux heures ; chez *S. cerevisiae* la dégradation de Rgt2 est décrite à partir de vingt minutes après un changement de source de carbone par (Roy and Kim, 2014)). L'inactivation des senseurs pourrait être assurée par une modification post-traductionnelle qui n'entraînerait pas directement leur internalisation. Par exemple, la phosphorylation par Snf1, déjà discutée plus haut, pourrait constituer un signal rapide provenant de la glycolyse (Figure 92). Cependant, cette hypothèse n'explique pas pourquoi l'expression de *RAG1* n'est pas affectée par l'iodoacétate.

- Soit l'activation des répresseurs et l'internalisation des senseurs sont tous deux ciblés par la glycolyse, via un signal différent. Le signal ciblant les senseurs du glucose serait un signal peu rapide, résultant de la rupture du flux glycolytique ou de l'absence de transport du glucose par les perméases. Il pourrait s'agir par exemple de l'effet de l'altération de la composition des membranes déjà discuté ci-dessus. Le signal ciblant les répresseurs Rgt1 et Mth1/Sms1 serait un signal rapide, responsable de leur activation. Chez *K. lactis*, l'accumulation de Sms1 est visible environ dix minutes après traitement à l'IA alors que la déphosphorylation de *K/Rgt1* prend seulement cinq minutes. Cela signifie soit que 1) une faible accumulation de Sms1 suffit à empêcher la phosphorylation de *K/Rgt1*, soit que 2) la déphosphorylation de *K/Rgt1* ne nécessite pas l'accumulation de Sms1 chez *K. lactis* et que *K/Rgt1* est ciblé par la glycolyse indépendamment de Sms1.

La première hypothèse est supportée par des études qui montrent que l'expression des gènes *HXTs* est régulée par le ratio de la quantité de Mth1 par rapport à ScRgt1 chez *S. cerevisiae* (Dietzel et al., 2012). La deuxième hypothèse est supportée par le fait chez *S. cerevisiae*, l'absence de phosphorylation de ScRgt1 n'est pas toujours liée à l'accumulation de Mth1, par exemple en présence de sucres comme le fructose ou le mannose. Ainsi, la phosphorylation de ScRgt1 par la PKA est régulée par le glucose, indépendamment de la voie de signalisation Rgt2/Snf3 (Jouandot et al., 2011). La PKA est activée par l'AMPc chez *S. cerevisiae* et pourrait constituer un lien entre glycolyse et signalisation du glucose chez *K. lactis*, si les phosphorylations de K/Rgt1 par la PKA sont conservées. Pourtant, K/Rgt1 est phosphorylé (probablement par la PKA) dans un double mutant $\Delta sms1 \Delta Klhxk$ (Publication Figure 2). En conséquence, la PKA est active dans un mutant glycolytique chez *K. lactis* et ne semble pas constituer un bon candidat pour faire le lien entre glycolyse et signalisation du glucose. Par contre, une des phosphorylations de ScRgt1 est dépendante de Snf1 et régule sa fixation à l'ADN (Palomino et al., 2006) : si cette phosphorylation dépendante de Snf1 est conservée chez *K. lactis* et si K/Snf1 est activé dans un mutant glycolytique, cette kinase pourrait réguler en parallèle Rag4 et K/Rgt1 (Figure 92).

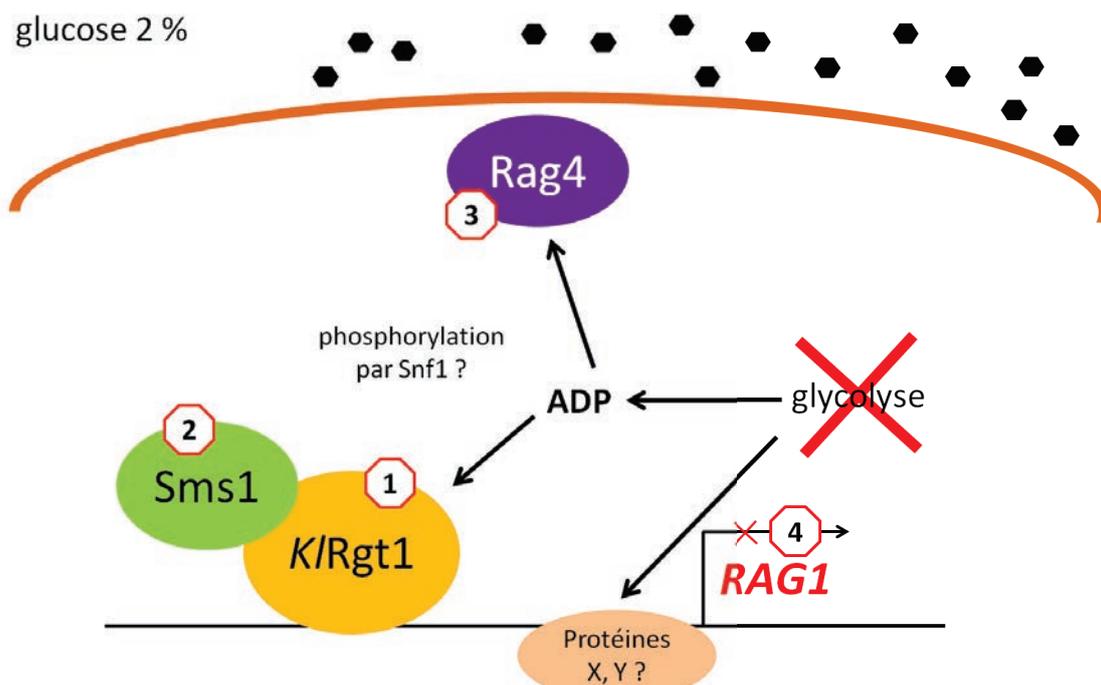


Figure 92: Lorsque la glycolyse n'est pas fonctionnelle (inhibition chimique), la phosphorylation de K/Rgt1 est la première à être touchée (1) et est observable en cinq minutes. La stabilisation de Sms1 vient ensuite et est observée en dix minutes (2). Ensuite, la stabilité du senseur Rag4 est affectée après deux heures (3). Enfin, l'expression de RAG1 est peu ou pas affectée par l'inhibition chimique de la glycolyse (4). L'effet sur l'expression de RAG1 suggère que d'autres régulateurs transcriptionnels X et Y sont ciblés par la glycolyse. Le signal issu de la glycolyse n'est pas identifié. L'ADP, en tant qu'activateur potentiel de la kinase K/Snf1, pourrait être un candidat si la phosphorylation de Rag4 et K/Rgt1 dépendante de K/Snf1 est avérée.

Une hypothèse vraisemblable pour expliquer pourquoi l'expression de RAG1 est affectée dans un mutant glycolytique, mais pas lors de l'inhibition chimique par l'IA, est qu'il pourrait exister d'autres facteurs de régulation transcriptionnelle de RAG1, inconnus ou mal appréciés, et eux-mêmes ciblés par la glycolyse. Le signal glycolytique délivré vers ces

facteurs transcriptionnels serait différent lors d'une délétion génétique (mutant glycolytique) ou chimique (iodoacétate). L'activité des activateurs transcriptionnels connus chez *K. lactis* (*Sck1*, *K/Snf2*) pourrait être régulée de manière différente par ces deux moyens de rompre le flux glycolytique, ou encore l'activité de facteurs non-caractérisés chez *K. lactis* pourrait intervenir (Figure 92).

4. Quelle est la nature du signal glycolytique qui cible la signalisation du glucose et la stabilité du senseur membranaire Rag4 ?

Au cours de ce travail de thèse, deux hypothèses ont été testées à propos de la nature du signal issu de la glycolyse et contrôlant les senseurs du glucose : signal propagé par une enzyme ou par un intermédiaire métabolique de la glycolyse.

La nature enzymatique n'a pas été privilégiée, notamment parce que l'affectation de la glycolyse à différents niveaux a le même effet sur l'expression du gène de la perméase *RAG1* et sur la phosphorylation de *K/Rgt1*. L'hexokinase, dont la délétion a été utilisée comme moyen de bloquer la glycolyse, a deux fonctions dissociées chez *S. cerevisiae* : une fonction enzymatique pour la phosphorylation du glucose et une fonction de régulateur transcriptionnel dans la voie de répression du glucose. Chez *K. lactis*, le rôle transcriptionnel de *K/Hxk* n'a jamais été analysé. En considérant que cette fonction régulatrice est conservée et pourrait être impliquée dans le contrôle de la signalisation du glucose, un moyen de dissocier l'effet de ces deux fonctions serait de surexprimer le gène de la glucokinase *KIGLK1* dans un mutant $\Delta K/hxk$. Ainsi, l'activité de phosphorylation du glucose serait améliorée, même si le taux de phosphorylation du glucose obtenu ne serait peut-être pas suffisant pour rétablir un flux glycolytique fonctionnel. Selon le phénotype Rag d'une telle souche, la stabilité de Rag4 pourra être étudiée pour déterminer l'effet des fonctions enzymatique et régulatrice de *K/Hxk* sur son contrôle.

La nature métabolique du signal a été explorée plus en profondeur, en utilisant principalement une analyse métabolomique comparative des intermédiaires glycolytiques d'une souche sauvage et de divers mutants glycolytiques. Malheureusement, aucun résultat exploitable n'est disponible à ce jour, mais nous espérons pouvoir améliorer ces résultats. Une autre approche plus ciblée a été utilisée pour mesurer la quantité d'ATP dans différents mutants glycolytiques et n'a pas permis d'observer une régulation de l'ATP similaire dans différents mutants glycolytiques. Cependant, ces mesures, réalisées en un seul point après croissance en présence de glucose, ne sont peut-être pas suffisantes pour exclure ce métabolite et les autres AXPs comme médiateur du signal glycolytique. En effet, même si les niveaux d'ATP ne sont pas similaires entre différents mutants glycolytiques, une mesure en un seul point pourrait cacher des informations obtenues par une mesure dynamique, comme ce qui a été réalisé en HPLC à Toulouse. Aussi, nous avons vu plus haut que l'ADP constitue un candidat pour la transmission du signal glycolytique vers Rag4, via la kinase *Snf1*

(Figure 92). En dehors de l'ADP, le signal glycolytique pourrait être un métabolite issu ou dérivé de la glycolyse qui modifie post-traductionnellement Rag4 comme cela a déjà été discuté précédemment (Chapitre 3). Il pourrait également s'agir d'un signal composite, constitué de plusieurs métabolites ou d'un métabolite et d'une enzyme. Par exemple, chez les mammifères, Rheb est une GTPase qui active le complexe mTORC1, lui-même étant un contrôleur central de la croissance et un intégrateur de divers signaux cellulaires et extracellulaires. L'activité de mTORC1 est régulée par l'interaction de Rheb avec l'enzyme glycolytique GAPDH, et cette interaction est elle-même régulée par son substrat, le glyceraldéhyde-3-phosphate (Lee et al., 2009). Chez *K. lactis*, l'existence d'un signal composite pourrait expliquer pourquoi il existe un découplage temporel entre l'effet de la glycolyse sur les répresseurs, sur Rag4 et sur l'expression de *RAG1*.

5. Quel est le rôle physiologique du contrôle de la glycolyse sur la signalisation du glucose ?

Enfin, il reste un point à discuter, qui est le rôle de ce mécanisme de contrôle de la glycolyse sur la signalisation du glucose. Un des rôles supposés est d'éviter des dépenses d'énergie et de carbone inutiles en synthétisant des perméases au glucose lorsqu'elles ne sont pas nécessaires parce que la glycolyse n'est pas fonctionnelle. Toutefois, l'inhibition de la glycolyse dans des conditions de développement naturel des levures ne doit pas être courante. Ainsi, ce rétro-contrôle de la glycolyse sur la signalisation du glucose servirait plutôt à moduler la synthèse des perméases au glucose selon l'intensité du flux glycolytique. En effet, celui-ci peut varier selon la nature et la qualité du carbone disponible, en fonction de l'ensemble des régulations allostériques, post-traductionnelles et transcriptionnelles qui affecte les enzymes glycolytiques.

Chez les levures, le contrôle de la glycolyse sur la stabilité des senseurs au glucose, sur la signalisation du glucose et sur l'expression des gènes des perméases au glucose constituerait plutôt un niveau supplémentaire de vérification, qui aurait pour but de confirmer que le sucre transporté dans la cellule peut être correctement métabolisé par la cellule. Ainsi, la voie de signalisation du glucose détecte certains sucres métabolisables par la cellule, et la glycolyse envoie un signal vers cette voie de signalisation pour confirmer qu'il s'agit bien d'un sucre utilisable, et pas d'un autre composé mal reconnu par la voie de signalisation du glucose et mal assimilable par la glycolyse.

V. Matériels et Méthodes

1. Souches et conditions de culture

1. a. Les levures

Les souches de levures utilisées sont répertoriées dans le Tableau 18 de l'annexe (page 254). Pour *K. lactis*, la majorité d'entre elles ont été créées par étiquetage direct des souches MW270-7B ou MWL9S1.

Les levures *K. lactis* et *S. cerevisiae* ont été cultivées à 28°C en milieu riche ou en milieu minimum. 28°C correspond à la température de croissance optimale de *K. lactis*. Les milieux riches YP contiennent de l'extrait de levures Bacto 1 %, de la peptone Bacto 1 % (Difco) et sont supplémentés par du glucose 2 % (YPG), du glycérol 2 % (YPgly), du galactose 2 % (YPGal) ou du lactate 2 % + 0,1 % glucose (YPlactate) comme sources de carbone. Le glycérol et le galactose sont utilisés comme sources de carbone non-fermentables, alternatives au glucose, et le lactate est utilisé pour les mutants de la glycolyse dont la capacité à croître avec du glucose comme source de carbone est fortement affectée, comme les mutants de l'énolase. L'ajout de 0,1 % de glucose à un milieu contenant 2 % de lactate aide ces mutants à initier la néoglucogénèse. Les milieux minimum synthétiques sont constitués d'un mélange de sels et de vitamines essentielles : 0,67 % Yeast Nitrogen Base without amino acids (Difco) et sont supplémentés par du glucose 2 % (SG), du glycérol 2 % (Sgly), du galactose 2 % (SGal) ou du lactate 2 % + 0,1 % glucose (Slactate) comme sources de carbone. Un milieu minimum complet est obtenu par addition d'un mélange de nutriments qui correspond aux différentes auxotrophies des souches du laboratoire. Un milieu sélectif est obtenu par omission d'un nutriment à ce mélange : milieu -uracile par exemple. Les levures cultivées en milieux liquides ont été agitées à 180 rpm. Leur croissance a été suivie par lecture de la $DO_{600\text{ nm}}$, $DO_{600\text{ nm}}$ correspondant à environ $2 \text{ à } 3 \times 10^7$ cellules par ml. Les milieux solides ont été obtenus par addition de 2 % Bacto agar (Difco) au milieu liquide.

Le milieu G418 correspond à du milieu YPG additionné de généticine (200 µg/ml ; Life Technologies). Le milieu CloNat est un milieu YPG additionné de nouséothricine (100 µg/ml ; Werner Bioagents, Jena, Germany). Le milieu 5-FOA est un milieu qui contient 1 g/l d'acide 5-fluoro-orotique (Formedium), utilisé pour contre-sélectionner les cellules ayant perdu le gène *URA3*. Le phénotype Rag est testé par croissance sur milieu YP contenant 5 % de glucose et 5 µM d'antimycine A (inhibiteur de la respiration, Sigma-Aldrich) : milieu GAA. Le croisement et l'induction de la sporulation de *K. lactis* sont réalisés sur un milieu solide contenant 5 % d'extrait de malt (ME).

Les stimulations glucose ont consisté à ajouter du glucose à un milieu liquide qui n'en contient pas (milieu glycérol ou lactate) pour atteindre une concentration finale de 2 %, généralement 30 minutes avant la collecte des cellules.

Les traitements avec des inhibiteurs chimiques ont consisté à ajouter la drogue directement dans le milieu de culture : 0,25 à 2 mM pour l'iodoacétate (IA, Sigma-Aldrich), 2 % (122 mM) pour le 2-déoxyglucose (2DG, Sigma-Aldrich), 5 à 100 mM pour le fluorure de sodium (NaF, Sigma-Aldrich), 10 mM pour le méthylglyoxal (MG, Sigma-Aldrich) et 0,2 à 1 mM pour le 3-bromopyruvate (3BrPA, Sigma-Aldrich). La solution de 3-bromopyruvate est neutralisée avec du Na_2CO_3 1M avant utilisation.

Les tests de croissance en halo ont été réalisés sur milieu YPG et milieu GAA en parallèle. Après étalement des levures (100 µl d'une pré-culture en phase stationnaire de croissance), des disques de papier buvard ont été posés sur la gélose. Des gouttes de 20 µl d'eau ou de drogues à des concentrations variables ont ensuite été déposées sur les disques de papier buvard. L'inhibition de croissance autour de ces disques a été observée après 24 à 48 h de croissance.

1. b. Les bactéries

Les souches de bactéries *Escherichia coli* utilisées sont les suivantes : pour la construction et l'amplification de plasmides, XL10 (endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ (mcrA)183 Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB lacI^qZ Δ M15 Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]]) et DH5 α (F⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -), et pour la production de protéines recombinantes BL21 (DE3) (F⁻ ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) pLysS(cm^R)).

Ces différentes souches ont été cultivées à 37°C (construction et amplification de plasmides) ou 20°C (production de protéines recombinantes (His)₆-Sms1), dans un milieu riche LB (0,5% NaCl, 0,5% Bacto™ yeast extract (Difco) et 1% Bacto™ tryptone (Difco), pH 7,2). Ce milieu peut également être rendu solide par l'ajout de 2% Bacto™ agar (Difco). Pour la sélection de cellules contenant un plasmide portant un gène de résistance, le milieu a été supplémenté de 100 µg/ml d'ampicilline ou 50 µg/ml de kanamycine.

2. Méthodes de génétique et de biologie moléculaire

2. a. Construction de souches de levures

La plupart des souches de levure portant un gène délété et/ou une protéine étiquetée dans le génome ont été construites par des techniques de ciblage de gène basé sur la recombinaison homologue dans le génome de cassette synthétisée par PCR (Longtine et al., 1998; Janke et al., 2004). Ces cassettes portent : un marqueur de sélection (*KanMX4* ou *KanMX6* pour la résistance à la généticine, *NatNT2* pour la résistance à la nouséothricine), la séquence codant pour l'étiquette d'intérêt le cas échéant, ainsi que des séquences flanquantes homologues à la zone d'insertion dans le génome. Pour introduire des mutations dans le génome sans conserver de marqueur de sélection, la technique du Delitto Perfetto a été utilisée pour obtenir des mutations spécifiques (Storici et al., 2001) et est expliquée dans la Figure 93.

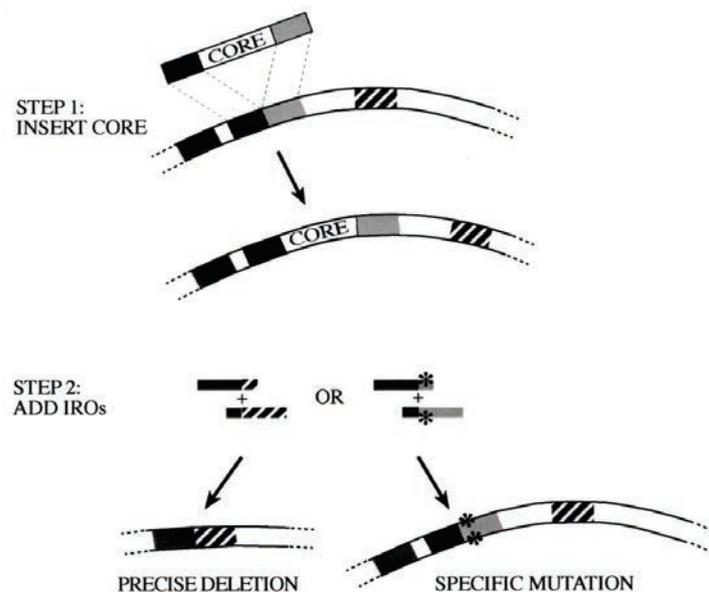


Figure 93: La technique du Delitto Perfetto comprend 2 étapes successives. La première étape consiste à insérer dans le génome par recombinaison homologue une cassette CORE (« countersélectable reporter ») à proximité de la mutation désirée. La cassette CORE contient un marqueur de contre-sélection tel que le gène *URA3*, dont on peut sélectionner la perte sur un milieu 5-FOA. Après sélection sur milieu -ura des cellules contenant cette cassette CORE, la deuxième étape

consiste à transformer les cellules avec une cassette synthétisée par auto-amplification de deux amorces qui contiennent les mutations désirées et des séquences homologues de part et d'autre du site de mutation (dans la figure, IRO pour « integrative recombinant oligonucleotides »). Les mutants désirés qui ont perdu la cassette CORE sont contre-sélectionnés sur milieu 5-FOA. La figure est tirée de (Storici et al., 2001).

Une partie des souches utilisées dans cette étude a été créée par croisement de deux souches de mating types opposés et d'auxotrophies différentes. Pour *K. lactis*, le croisement et la sporulation sont réalisés sur milieu ME. La dissection des tétrades est réalisée grâce à un microscope équipé d'un micromanipulateur.

Pour chaque souche créée, le phénotype Rag a été vérifié et la présence de l'étiquette a été testée par Western blot ou microscopie à fluorescence. Chez *K. lactis*, le promoteur de *ScGAL1* a été utilisé pour surexprimer des gènes initialement faiblement exprimés. En effet, des résultats non publiés du laboratoire ont montré que le promoteur P_{ScGAL1} n'est régulable ni par le glucose ni par la glycolyse chez *K. lactis*.

2. b. Construction de plasmides

Nom	Description	Source
pML155	vecteur d'expression bactérienne (<i>E. coli</i>) dérivé de pET15b exprimant (His) ₆ Sck1	(Neil et al., 2007)
pET28a(+)	vecteur d'expression bactérienne (<i>E. coli</i>) portant un gène de résistance à la kanamycine et une étiquette (His) ₆	Invitrogen
pGEX-6P-3_RAG4_Clast	vecteur d'expression bactérienne (<i>E. coli</i>) dérivé de pGEX-6P-3 exprimant GST- <i>rag4</i> ⁵⁴⁴⁻⁷⁸⁷	Ce travail
pACR2	dérivé de pET28a(+) exprimant (His) ₆ - <i>SMS1</i> après induction par IPTG	Ce travail
pCXJ18	vecteur navette (<i>K. lactis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>) centromérique <i>URA3</i>	(Chen, 1996)
pACR1	dérivé de pCXJ18 exprimant <i>LexA-RAG8</i> sous son propre promoteur et avec son propre terminateur	Ce travail
pACR3	dérivé de pCXJ18 exprimant <i>LexA-rag8</i> ^{K106R} sous son propre promoteur et avec son propre terminateur	Ce travail
pHN15	dérivé de pCXJ18 exprimant <i>lexA-SCK1</i> sous contrôle du promoteur <i>ScADH1</i>	(Neil et al., 2007)
pCXJ20	vecteur navette (<i>K. lactis</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>) centromérique <i>LEU2</i>	(Chen, 1996)
pACR4	dérivé de pCXJ20 exprimant GST- <i>rag4</i> ⁵⁴⁴⁻⁷⁸⁷ sous contrôle du promoteur <i>ScGAL1</i>	Ce travail
pACR5	dérivé de pCXJ20 exprimant GST sous contrôle du promoteur <i>ScGAL1</i>	Ce travail
pACR6	dérivé de pCXJ20 exprimant GST- <i>rag4</i> ⁵⁴⁴⁻⁷⁸⁷ - <i>rag8</i> ⁵²⁶⁻⁵³⁵ sous contrôle du promoteur <i>ScGAL1</i>	Ce travail
pACR7	dérivé de pCXJ20 exprimant GST- <i>rag4</i> ^{544-787 F569A-F573A} sous contrôle du promoteur <i>ScGAL1</i>	Ce travail
pRS316	vecteur navette (<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>) centromérique <i>URA3</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pRS316-YCK1-vYFP	vecteur navette (<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>) centromérique <i>URA3</i> dans lequel <i>YCK1-vYFP</i> est exprimé sous son propre promoteur	(Bharucha et al., 2008)
pRS415	vecteur navette (<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>) centromérique <i>LEU2</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pML180 = pRS416-ENO2	vecteur navette (<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i>) centromérique <i>URA3</i> exprimant le gène <i>ENO2</i> sous son propre promoteur	Ce travail
pBM3212	plasmide rapporteur de l'expression du promoteur de <i>HXT1</i> (P_{HXT1} / <i>lacZ</i>)	(Özcan et al., 1996a)

Tableau 12: Liste des plasmides utilisés

Les plasmides utilisés au cours de ces travaux sont répertoriés dans le Tableau 12.

Les plasmides créés au cours de cette étude sont des dérivés de plasmides déjà existants. La séquence d'ADN codant pour le gène d'intérêt a été insérée dans les plasmides, soit après digestion par des enzymes de restriction et ligation puis transformation dans *E. coli* pour amplification (pACR1, pACR2, pACR4, pACR5), soit par recombinaison homologue *in vivo* chez la levure *S. cerevisiae* (Lorenz et al., 1995) (pACR6), soit par mutagenèse dirigée en une étape (Zheng et al., 2004) (pACR3 et pACR7 sont issus de pACR1 et pACR4, respectivement).

2. c. Transformation

2. c. i. Transformation des levures par électroporation

La transformation des souches de *K. lactis* par de l'ADN plasmidique (transformation répllicative) ou par des « cassettes » d'ADN linéaire double brin (transformation intégrative : délétion ou étiquetage de gène par recombinaison homologue dans le génome) a été réalisée par électroporation.

Les cellules ont été cultivées en milieu liquide YPG (ou YPgly pour les souches présentant un défaut de transport ou assimilation du glucose) jusqu'à la phase exponentielle, puis lavées à l'eau froide avant d'être resuspendues dans 1/10^{ème} du volume initial de YPG (ou YPgly) additionné de 25 mM de DTT et 20 mM de tampon Hépès pH 8,0. Après incubation 30 minutes à 28°C, les cellules ont été lavées avec du tampon EP (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 270 mM saccharose et 1 mM MgCl₂). Le culot a ensuite été repris dans 1/200^{ème} du volume initial de tampon EP. 50 µl de cellules ont été mélangés à l'ADN transformant (plasmide ou cassette d'insertion génomique, 100-200 ng dans maximum 2 µl) et transférées dans une cuvette d'électroporation (2 mm) froide. Un courant de 1000 V a été appliqué grâce à l'électroporateur (Eppendorf). Les cellules ont rapidement été resuspendues dans du milieu riche (YPG ou YPgly), incubées 1 h à 28°C puis étalées sur des boîtes de milieu sélectif et incubées à 28°C pour au moins 48 h.

La transformation des souches de *S. cerevisiae* par de l'ADN plasmidique ou par des « cassettes » d'ADN linéaire double brin a été réalisée par traitement chimique à l'acétate de lithium. Les cellules ont été cultivées en milieu liquide YPG jusqu'à la phase exponentielle, puis resuspendues dans 1/5^{ème} du volume initial de tampon LiAcTE (0,1 M LiAc, 10 mM Tris-Cl pH 8,0 et 1 mM EDTA) et incubées 30 minutes à température ambiante. Ensuite, après centrifugation, les cellules sont reprises dans 1/50^{ème} du volume initial de tampon LiAcTE. 100 µl de cellules compétentes sont mélangées à 10 µl d'ADN dénaturé de sperme de saumon à 10 mg/ml et 2 µl d'ADN transformant (100 à 200 ng), puis incubées 5 minutes à température ambiante. 280 µl de LiTE-PEG40% (10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM EDTA, 0,1 M LiAc et 40 % de PEG-4000) sont ajoutés et les cellules sont incubées 1 h à 30°C. Après ajout de DMSO 10 % final, les cellules sont soumises à un choc thermique à 42°C pour 5 à 10 minutes. Puis, après centrifugation et lavage dans du milieu de culture sélectif, les cellules sont étalées sur du milieu de culture sélectif et incubées à 30°C pour au moins 48 h.

2. c. ii. Transformation bactérienne par choc thermique

La transformation bactérienne de plasmides a été utilisée pour amplifier des plasmides ou exprimer des protéines recombinantes.

Après culture exponentielle dans du milieu LB, les cellules de *E. coli* ont été rendues chimiquement compétentes par resuspension dans du tampon TSS (LB, 10% (w/v) PEG 8000, 5% DMSO, 50 mM MgCl₂). Les cellules compétentes sont soit utilisées immédiatement ou congelées et stockées à -70°C. L'ADN transformant (maximum 10 µl) est mélangé à un volume de tampon TCM froid (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂). Un volume de cellules compétentes est ensuite rajouté au mélange réactionnel et le tout est incubé 30 minutes sur la glace. Le mélange a été porté 1 minute à

42°C puis refroidi 2 minutes sur la glace avant d'être resuspendu dans 4,5 fois son volume de LB et incubé 45 minutes à 37°C. Les cellules ont ensuite été étalées sur milieu sélectif et incubées une nuit à 37°C.

2. d. Manipulation des acides nucléiques

2. d. i. Extraction et purification d'ADN

Les plasmides ont été amplifiés par transformation dans des bactéries *E. coli*, puis extraits et purifiés grâce à un kit miniprep Nucleospin plasmid (Macherey-Nägel) ou QIAprep (QIAGEN), selon les instructions du fabricant. L'utilisation d'un kit de miniprep bactérienne est adaptée pour la préparation d'ADN plasmidique de levure. Une culture de 5 ml de milieu sélectif de la souche transformée est incubée à 28°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire de croissance. Après collecte des cellules par centrifugation, le culot est resuspendu dans le tampon de resuspension du kit. Des billes de verre (diamètre 0,5 mm) sont ajoutées et le tout est vortexé à vitesse maximale pendant 5 minutes. Après centrifugation 5 minutes à vitesse maximale (16000 g), le surnageant est récupéré et traité selon le protocole du fabricant du kit de miniprep.

L'ADN chromosomique de levure a été préparé selon le protocole suivant : une culture de 2 ml de la souche est incubée à 28°C en milieu riche jusqu'à la phase de croissance stationnaire. Les cellules sont collectées par centrifugation 30 s à 16000 g, puis lavées dans 0,5 ml d'eau distillée et resuspendues dans 200 µl de tampon de lyse (2 % Triton X-100, 1 % SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0 et 1 mM EDTA pH 8,0). Après ajout de 200 µl de phénol/chloroforme/alcool isoamylique, le mélange est vortexé 5 min à vitesse maximale. 200 µl de TE pH 8,0 (10 mM Tris-HCl pH 8,0 et 1 mM EDTA pH 8,0) sont ajoutés et l'ensemble est vortexé brièvement puis centrifugé 10 min à 16000 g à température ambiante. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et l'ADN est précipité à l'éthanol : 1 ml d'éthanol 100 % est ajouté et le tube est incubé 10 min à -20°C, puis centrifugé 10 min à 16000 g à température ambiante. Tout le surnageant est éliminé et le culot est solubilisé dans 0,4 ml de tampon TE pH 8,0. Les ARNs présents sont digérés par traitement à la RNase : 3 µl de RNase A (10 mg/ml) sont ajoutés et le tout est incubé 10 min à 37°C. Ensuite l'ADN est précipité à nouveau par ajout de 40 µl d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et 1 ml d'éthanol 100 % puis incubation 10 min à -20°C. Après centrifugation 10 min à 16000 g à température ambiante, le culot est lavé avec de l'éthanol à 70 %, puis centrifugé à nouveau 5 min à 16000 g. Enfin, il est resuspendu dans 100 µl de tampon TE pH 8,0.

Après purification de l'ADN, sa concentration est mesurée par lecture de la densité optique à 260 nm au nanodrop. La pureté de la préparation est évaluée par calcul des ratios de $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$ et $DO_{260\text{ nm}}/DO_{230\text{ nm}}$, qui permettent de déterminer la contamination par des protéines, du phénol, de l'EDTA ou d'autres contaminants.

2. d. ii. Amplification d'ADN par PCR

L'amplification d'ADN par PCR a été utilisé pour :

- la construction de plasmides : l'amplification de fragment d'ADN à insérer dans un plasmide (clonage)
- la mutagénèse dirigée
- la synthèse de cassettes d'insertion dans le génome
- la vérification des constructions obtenues
- le cas particulier de la qRT-PCR traité plus loin.

Les ADN polymérases utilisées sont les suivantes :

- la Taq polymérase (NEB) pour les amplifications de vérification
- la Phusion polymérase (NEB) pour la synthèse de cassettes d'insertions (pour les délétions et étiquetages) et les constructions de plasmide car son taux d'erreur est plus faible que celui de la Taq polymérase
- la Pfu ultra-high fidelity polymérase (Stratagene) pour la mutagenèse dirigée en une étape.

Les cycles ont été adaptés aux conditions nécessaires à chaque enzyme. Le thermocycler utilisé est un modèle Biorad : Mycycler.

2. d. iii. Préparation d'ARN de levures, méthode du phénol chaud acide

Les cellules ont été cultivées jusqu'au milieu de la phase exponentielle ($DO_{600}=1$). Un volume de 10 ml de culture est suffisant pour préparer suffisamment d'ARN pour l'expérience de qRT-PCR. A partir de ce point tout le matériel utilisé a été traité contre les RNases. Les cellules ont été resuspendues dans un tampon TES (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM EDTA, 0,5% SDS), mélangées à un volume égal de phénol acide et incubées 60 minutes à 65°C. Après centrifugation, la phase aqueuse a été récupérée et mélangée à nouveau à un volume équivalent de phénol acide. Après centrifugation, la phase aqueuse a été mélangée à du chloroforme. Après une nouvelle centrifugation, la phase aqueuse a été récupérée et précipitée grâce à l'ajout de 1/10ème de solution d'acétate de sodium 3 M pH 5,3 et 2,5 fois son volume d'éthanol 100% froid. L'ARN se trouve dans le culot après centrifugation.

Après quantification, les ARN ont subi un traitement à la DNase pour éliminer toute trace d'ADN : utilisation du kit « DNA Free » (Ambion) en suivant les instructions du fournisseur.

2. e. qRT-PCR : PCR quantitative après transcription réverse

La qRT-PCR permet de quantifier les ARN messagers de gènes d'intérêt, relativement à une condition de référence et un gène de ménage. Elle est composée des étapes suivantes :

2. e. i. Transcription réverse : synthèse d'ADN complémentaire

A partir des ARN, les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés par une reverse transcriptase. Le kit « Super Script III Reverse Transcriptase » (Invitrogen) a été utilisé selon le protocole du fournisseur, après hybridation des ARN avec des oligonucléotides générés aléatoirement sous forme de décamères (« random decamers », Ambion). Un contrôle (-RT) a été généré à cette étape en réalisant la manipulation de la même manière mais sans ajouter l'enzyme reverse transcriptase, ce qui permet de juger de l'efficacité du traitement DNase : si il y a amplification pour ce contrôle lors de la qRT-PCR, le traitement DNase n'aura pas été efficace.

2. e. ii. Amplification spécifique des ADNc par qRT-PCR

Cette réaction fonctionne comme une réaction de PCR classique, mais elle permet de quantifier l'expression de gènes de manière relative par rapport à une condition de référence. La quantification est basée sur la mesure de la fluorescence émise par le SYBR Green, qui s'intercale entre les 2 brins d'ADN. Un minimum de 3 réplicats biologiques a été utilisé pour déterminer l'expression relative d'un gène. Pour chaque gène, un couple d'oligonucléotides spécifiques (répertoriés dans le Tableau 13) a été conçu grâce au logiciel Beacon Designer (version 7.92).

Le mélange réactionnel a été préparé en mélangeant le SYBR mix 2x (« Light Cycler 480 SYBR Green I master », Roche), de l'eau ultra-pure traitée anti-RNase, un couple d'oligonucléotides spécifique à un gène (0,2 μ M dans la réaction finale) et l'ADNc dilué dans des plaques 96 puits adaptées. Chaque

réaction est faite en duplicata (réplicats techniques): l'utilisation de la moyenne des résultats des 2 puits permet de limiter les erreurs de pipetage. Pour l'échantillon contrôle, une gamme de dilution d'ADNc a été réalisée (dilution par 4, de 1/4 à 1/256) afin de vérifier l'efficacité de l'amplification et de réaliser une gamme étalon pour la quantification. Enfin, pour chaque échantillon d'ADNc, l'expression d'un gène de ménage a été testée (ici, l'actine = *KIACT1*) pour réaliser une quantification relative de l'expression des gènes d'intérêt par rapport à l'expression de ce gène de ménage. La machine thermocycler utilisée est une CFX96 (Biorad), piloté par le logiciel Biorad CFX Manager qui permet aussi l'analyse des résultats.

Nom	Séquence	Amorce et gène cible
P548	5' -TTTCTGGTTTAGGTGTTGGT-3'	RAG1-F
P549	5' -CTTAAATGTTTAGGAGCGGTTT-3'	RAG1-R
P550	5' -GTGCTTACTACGATGTTG-3'	KIHXX-F
P551	5' -AGGAACCATATTCACAGT-3'	KIHXX-R
P852	5' -CTATCCGAATCCATCAAG-3'	KIENO-F
P853	5' -AAAGTGTCTTCAGTTTCA-3'	KIENO-R
P854	5' -ATGACTACTGATTCTGTTCCA-3'	RAG4-F
P855	5' -GTTACGCTCTTGCTTTC-3'	RAG4-R
P856	5' -CGGATTATGAAGGTTACC-3'	RAG8-F
P857	5' -CTTATTTCTATGTCTCTTACTC-3'	RAG8-R
P858	5' -TTAATGATATAAGGTCGTTACTC-3'	SMS1-F
P859	5' -GTTGATTGAATGCTATGGT-3'	SMS1-R
P860	5' -TTCTTCCTCCGTTTATTC-3'	SCK1-F
P861	5' -GATTAGTAGCGTTCATTAAG-3'	SCK1-R
P547	5' -ACATCAACATCACACTTC-3'	KIACT1-F
P546	5' -AACTGCTTCTCAATCATC-3'	KIACT1-R

Tableau 13: Liste des oligonucléotides utilisés pour la qRT-PCR. F = forward, R = reverse

2. e. iii. Traitement des résultats

Pour chaque réaction les résultats sont donnés sous la forme de Ct (Cycle threshold) : il s'agit du nombre de cycles de qPCR nécessaires pour atteindre une valeur-seuil de fluorescence, dépendant de la quantité de matrice initialement présent dans l'échantillon. Le logiciel calcule l'efficacité de la réaction (qui est proche de 100% si la réaction de qRT-PCR est optimale) et permet également de vérifier la spécificité des produits amplifiés en vérifiant la température de leur pic d'hybridation. Les expressions relatives des gènes ont été calculées grâce au coefficient de Pfaffl (Pfaffl, 2001) :

$$\text{Coefficient de Pfaffl} = \frac{\text{Efficacité}_{\text{gène x}}^{\text{Ct}_{\text{ref x}} - \text{Ct}_x}}{\text{Efficacité}_{\text{gène M}}^{\text{Ct}_{\text{ref M}} - \text{Ct}_M}}$$

Équation 1: Coefficient de Pfaffl, avec : x le gène d'intérêt, M le gène de ménage, ref la condition de référence (WT) et Ct la moyenne des Ct des répliquats techniques (2 répliquats sur une même plaque). Ici l'efficacité est comprise entre 1 et 2 (exemple : pour une efficacité de 80% on utilisera Efficacité = 1,8 dans l'équation).

Les résultats présentés correspondent à la moyenne des coefficients de Pfaffl obtenus à partir de trois expériences indépendantes. La significativité des résultats a été testée statistiquement avec le test de conformité de Student (test T). Il permet de comparer une moyenne observée à une moyenne théorique, c'est-à-dire ici que la moyenne des coefficients de Pfaffl pour les 3 répliquats biologiques est comparée au coefficient de Pfaffl pour la condition de référence (défini à 1 par l'Équation 1). Les p-values ont été calculées et représentées graphiquement sous forme d'astérisques

pour indiquer les résultats statistiquement différents de la moyenne théorique (condition de référence). Les tests statistiques ont été réalisés avec le logiciel R (R Core Team, 2012).

2. f. Mesure de l'activité d'un promoteur grâce à une construction reportrice

Après transformation de souche de *S. cerevisiae* BY4742 avec un plasmide contrôle pRS415 ou un plasmide portant une fusion d'un promoteur d'intérêt et du gène *lacZ*, l'activité β -galactosidase sur cellules perméabilisées a été mesurée pour quantifier l'activité du promoteur. Les transformants sont cultivés en milieu synthétique sélectif jusqu'en phase exponentielle de croissance. Après mesure de la $OD_{600\text{ nm}}$, les cellules sont collectées par centrifugation et resuspendues dans 1 ml de tampon Z pH 7,0 (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl et 1 mM MgSO_4). Ensuite 3 gouttes de chloroforme et 2 gouttes de SDS 0,1 % sont ajoutées, puis le tube est vortexé à vitesse maximale pendant 10 s. Les échantillons sont pré-incubés 5 min à 28°C et la réaction est débutée par l'ajout de 0,2 ml de ONPG (2-nitrophénol- β -galactopyranoside, 4 mg/ml dans du tampon Z). Quand l'échantillon devient jaune pâle, la réaction est stoppée en ajoutant 0,5 ml de 1 M Na_2CO_3 . Le temps de réaction est noté et les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation pendant 10 min. Au cours de la réaction, l'ONPG est hydrolysé en ONP (2-nitrophénol) qui absorbe fortement à 420 nm. La $OD_{420\text{ nm}}$ du surnageant est mesurée et correspond à la mesure de la concentration en ONP. Ensuite, l'activité de la β -galactosidase est calculée selon l'Équation 2 et exprimée en unité arbitraire de Miller.

$$\text{Activité } \beta - \text{galactosidase} = 1000 \times \frac{OD_{420\text{ nm}}}{OD_{600\text{ nm}} \times V \times t}$$

Équation 2: Calcul de l'activité β -galactosidase exprimée en unité arbitraire de Miller. V est le volume en ml et t le temps en minutes.

3. Méthodes biochimiques

3. a. Extractions protéiques

3. a. i. Purification de protéine recombinante chez *E. coli*

MLC66 est un dérivé de BL21 (DE3), utilisé pour la production de protéines recombinantes.

Cette souche a été transformée avec un dérivé de pET28A(+) (pACR2, plasmide inducible par l'IPTG pour l'expression de $(\text{His})_6$ -Sms1 ou pML155 pour $(\text{His})_6$ -Sck1), ou pGEX-6P-3_RAG4_Clast pour l'expression de GST-Rag4C. Elle a été cultivée dans 50 ml de LB + kanamycine ou ampicilline. Quand les bactéries ont atteint la phase exponentielle de croissance, l'expression de protéines recombinantes a été induite par ajout de 2 mM IPTG + 2 % glucose (pour soutenir la croissance). La culture a été poursuivie pour 1 h à 37°C pour GST-Rag4C ou 5 h à 19°C pour $(\text{His})_6$ -Sms1 (température favorisant le repliement correct des protéines). Après collection des cellules par centrifugation, les extraits protéiques ont été préparés en resuspendant les cellules dans le tampon de lyse (voir Tableau 14), puis en sonicant l'échantillon (3 cycles de 1 minute). Ensuite, du triton X-100 0,5 % a été ajouté à l'échantillon qui a été mis en rotation 30 minutes à 4°C. Finalement, les débris cellulaires et les protéines insolubles ont été récupérés par centrifugation 15 minutes à 15000 g à 4°C.

Les protéines recombinantes ont été purifiées soit sur une résine NiNTA (résine agarose Ni-nitrotriacétique) pour $(\text{His})_6$ -Sms1, soit sur de la résine glutathion sépharose pour GST-Rag4C : après lavage de la résine dans du tampon de lyse, elle a été incubée avec l'extrait protéique 1 h en

rotation à 4°C. Le tampon de lavage (voir Tableau 14) a été utilisé pour faire un lavage avec rotation 5 minutes à 4°C, après centrifugation 2 minutes à 1000 g. La protéine d'intérêt a été éluée en vortexant la résine avec du tampon d'éluion qui contient de l'imidazole pour décrocher (His)₆-Sms1 (voir Tableau 14) ou de la GST pour décrocher GST-Rag4C et en récupérant le tampon, ceci répété 3 fois. 20% de glycérol ont été ajoutés dans les fractions éluées pour assurer la conservation des protéines. La concentration protéique a été évaluée par lecture de la densité optique à 280 nm au NanoDrop.

	tampon de lyse	tampon de lavage	tampon d'éluion
Tris pH 8,0	50 mM	50 mM	
Tris pH 6,8			50 mM
lysozyme	1 mg/ml		
glycérol	10 %	10 %	
NaCl	300 mM	300 mM	100 mM
β-mercaptoéthanol	10 mM		
imidazole	20 mM	40 mM	250 mM
PMSF	1 mM		
cocktail d'inhibiteurs de protéases (Annexes page 256)	oui		
triton X-100	0,5 % (après sonication)	1 %	
DTT			1 mM

Tableau 14: Tampons utilisés pour l'extraction et la purification de protéines recombinantes

3. a. ii. Extraction de protéines de levure : protocole de Kushnirov

L'extraction de Kushnirov (Kushnirov, 2000) est une extraction protéique simple et rapide, en conditions dénaturantes, utilisée pour observer la quantité relative de protéines après gel SDS-PAGE, Western bot et immunodétection.

Les cellules ont été cultivées dans 5 ml de milieu adéquat jusqu'en phase exponentielle ($DO_{600\text{ nm}}=1$). Après centrifugation, les culots cellulaires ont été resuspendus dans 100 µl d'eau, auxquels 100 µl de NaOH 0,2 M ont été ajoutés. Après 5 minutes d'incubation à température ambiante, les tubes ont été centrifugés et le culot a été resuspendu dans du tampon de Laemmli (Laemmli, 1970) (voir Annexes page 256). Si l'utilisation n'a pas été immédiate, les échantillons ont été gardés à -20°C. Avant de séparer les protéines par SDS-PAGE, les échantillons ont été chauffés 5 minutes à 95°C. Cependant, lorsqu'on s'est intéressé à une protéine membranaire, les échantillons ont été portés 10 minutes à 65°C pour éviter la formation d'agrégats de protéines.

3. a. iii. Extraction de protéines de levure par cassage aux billes

Pour préparer des extraits protéiques pour une utilisation spécifique telle que l'immunoprécipitation, la préparation ou la séparation des fractions membranaires, un protocole plus complexe que l'extraction de Kushnirov a été utilisé.

Le volume de culture était de 50 ml. Les cellules ont été récupérées en phase exponentielle de croissance par centrifugation et gardées à 4°C pour éviter les dégradations et modifications protéiques. Après un lavage à l'eau froide, les cellules ont été resuspendues dans 1 ml de tampon de lyse froid. Le tampon de lyse utilisé varie selon la finalité de l'extrait protéique ; les différents tampons et leurs utilisations sont listés dans le Tableau 15.

	RIPA	RIPA modifié (sans SDS)	PGT (pH 7,5)	MOPS	Neil (Neil et al., 2007)
Tris-HCl pH 7,5	50 mM	50 mM			50 mM
KCl			2,7 mM		
NaCl	150 mM	150 mM	137 mM		100 mM
Na ₂ HPO ₄			100 mM		
KH ₂ PO ₄			2 mM		
triton X-100	1 %				
sodium déoxycholate	1 %	0,25 %			
SDS	0,1 %				
NP-40		1 %			1 %
MOPS pH 7				30 mM	
glycérol			10 %		
Tween-20			0,5 %		
PMSF	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
EDTA	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM	1 mM
EGTA				1 mM	
cocktail d'inhibiteurs de protéases (Annexes page 256)	oui	oui	oui	oui	oui
Utilisation	IP 3HA- Rag4, lexA- Rag8	IP 3HA-Rag4, lexA- Rag8, GST-Rag4C, Rag4-TAP	IP Rgt1- 3HA	extraits membranaires Rag4	IP lexA-Rag8

Tableau 15: Différents tampons de lyses et leurs utilisations respectives

Un volume de billes de verre suffisant pour que le niveau de liquide atteigne le haut du tube a été ajouté, afin d'éviter la formation de mousse lors de l'agitation. Les cellules ont été cassées par agitation des tubes dans le broyeur de cellules FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals) à vitesse maximale (6,5 m/s) pour 30 secondes. Cette étape est répétée 5 fois, entrecoupées d'un refroidissement de 5 minutes. Le lysat cellulaire a été collecté en perforant le tube et en le centrifugeant au dessus d'un deuxième tube à faible vitesse pendant 1 minute. Les débris cellulaires et les cellules entières ont ensuite été culotés par centrifugation douce (1000 g, 5 minutes, 4°C). Le surnageant est prélevé et correspond au lysat cellulaire. Les différents lysats cellulaires sont alors traités en fonction des besoins, selon l'une des méthodes suivantes :

- Immunoprécipitation et purification de protéines
 - Immunoprécipitation de protéines solubles

Le tampon de lyse utilisé est le RIPA modifié ou le PGT. Le lysat cellulaire a été centrifugé 10 minutes à 13000 g, puis le surnageant a été récupéré et centrifugé à nouveau 5 minutes à 13000 g. La concentration protéique a été déterminée grâce à la réaction de Bradford selon les recommandations du fabricant (Quick Start Bradford Dye reagent, Bio-Rad) par lecture de la DO_{595 nm}, puis la concentration de chaque tube a été normalisée. L'anticorps a été ajouté en deux fois : 0,5 à 1 µl d'anticorps ont été incubés avec le lysat cellulaire en agitation 1h à 4°C puis à nouveau de 0,5 à 1 µl d'anticorps ont été ajoutés pour incubation en rotation 1h à 4°C. Ensuite, entre 20 et 50 µl de résine d'agarose couplée à la protéine A (Sigma-Aldrich) sont ajoutées et incubées en rotation pour la nuit à

4°C. Après centrifugation douce (400 g 2 minutes), la résine a été lavée deux fois avec un volume équivalent de tampon de lyse. Enfin le tampon restant a été prélevé et la résine a été resuspendue dans du tampon de Laemmli, puis dénaturée (5 minutes à 95°C) avant dépôt sur gel SDS-PAGE.

– Immunoprécipitation de protéines membranaires solubilisées

Le protocole est semblable à celui utilisé pour les protéines solubles. Simplement, le tampon utilisé est le tampon Neil ou RIPA ou RIPA modifié. Les deux étapes de centrifugations initiales (10 min 13000 g puis 5 min 13000 g) ont été remplacées par une centrifugation à 1500 g pendant 5 minutes pour éliminer les fragments membranaires et les protéines non solubilisées. Ensuite le protocole est le même que précédemment.

– Purification d'une protéine fusionnée à l'étiquette TAP ou à l'étiquette GST

L'étiquette TAP (tandem affinity purification) contient divers domaines pouvant être utilisés pour la purification, dont la protéine A. Une protéine portant cette étiquette peut être purifiée par incubation du lysat cellulaire avec de la résine de sépharose couplée à des IgGs : la protéine A de l'étiquette TAP se lie spécifiquement à la chaîne lourde des IgGs via la région Fc (fragment cristallisable). La résine utilisée est la suivante : IgG Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare).

Les protéines fusionnées à une étiquette GST sont purifiées grâce à leur forte affinité pour le glutathion, qui est immobilisé sur une résine d'agarose : Protino Glutathione Agarose (Macherey-Nägel).

Les protéines Rag4-TAP et GST-Rag4C ont été purifiées avec le RIPA modifié comme tampon de lyse. Après s'être débarrassé des cellules entières et des débris, le lysat cellulaire a été centrifugé à 1500 g pendant 5 minutes pour éliminer les fragments membranaires et les protéines non solubilisées. La concentration protéique a été déterminée grâce à la réaction de Bradford selon les recommandations du fabricant par lecture de la $DO_{595\text{ nm}}$, puis normalisée. 20 μl de résine IgG sépharose ou Glutathione Agarose ont été lavés dans du tampon de lyse puis incubés avec le lysat cellulaire une nuit à 4°C en rotation. Après centrifugation douce (370 g 2 minutes), la résine a été lavée deux fois avec un volume équivalent de tampon de lyse. Enfin le tampon restant a été prélevé et la résine a été resuspendue dans du tampon de Laemmli puis dénaturée par chauffage.

- Préparation de fractions membranaires
 - Séparation de membranes par ultracentrifugation

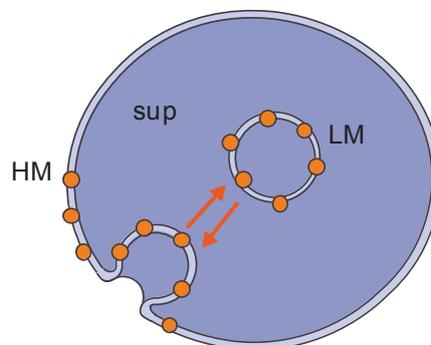


Figure 94: Représentation schématique des différentes fractions obtenues avec le protocole de séparation des membranes. La fraction « membranes lourdes » est symbolisée par « HM », la fraction « membranes légères » par « LM » et les protéines solubles par « sup ». Les flèches montrent le devenir d'une vésicule de transport.

La séparation des membranes par ultracentrifugation permet de séparer la fraction « membranes lourdes » (HM, la membrane plasmique, les membranes des différents organelles et le cytosquelette) de la fraction « membranes légères » (LM, appareil de Golgi et vésicules de transport) (Chesneau et al., 2004) et des protéines solubles (sup, surnageant). La localisation des protéines que contiennent les différentes fractions est schématisée dans la Figure 94.

Le tampon de lyse MOPS a été utilisé pour préparer le lysat cellulaire comme expliqué précédemment par cassage avec des billes de verre (étapes 1 et 2, Figure 95). Le lysat cellulaire a ensuite été centrifugé 10 minutes à 13000 g à 4°C. Le culot membranaire correspond à la fraction « membranes lourdes » (étape 3). Le surnageant a été prélevé et ultracentrifugé (Beckman CO-LE-80K Optima preparative ultracentrifuge) 30 minutes à 100000 g à 4°C. Le culot correspond à la fraction « membranes légères » (étape 4). Le surnageant a été précipité au TCA, lavé à l'acétone puis resuspendu dans du tampon de conservation (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 mM DTT et 25 % glycérol), comme les autres culots (étape 5). Les concentrations des différentes fractions ont été mesurées avec le kit Bradford et normalisées. Lorsque l'utilisation des extraits n'était pas immédiate, ils ont été conservés à -20°C avant ajout du tampon de Laemmli pour la séparation des protéines.

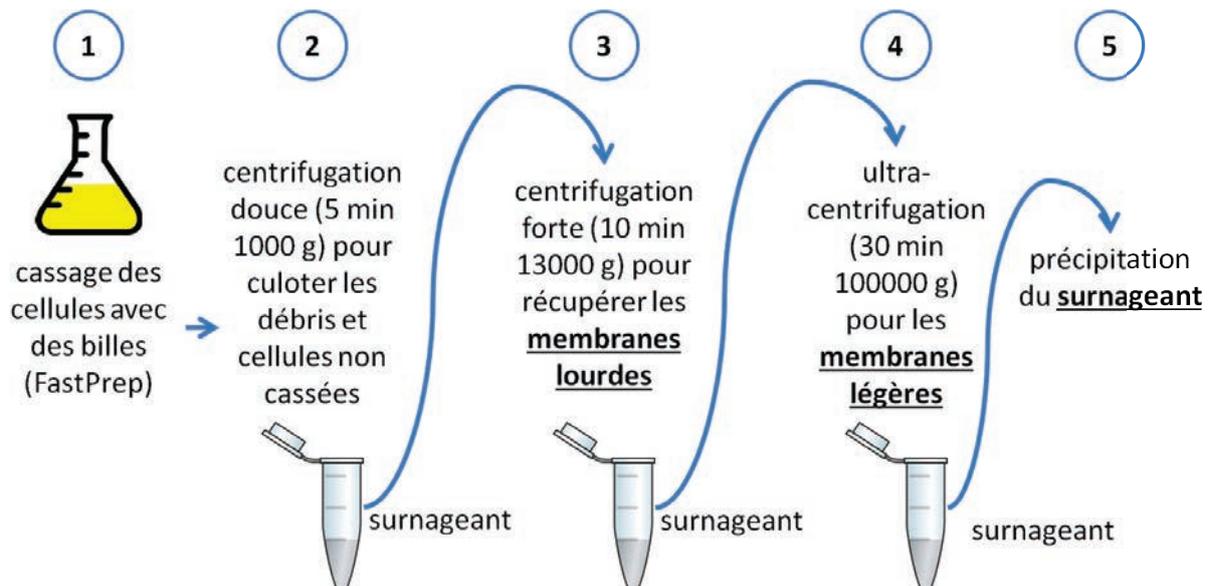


Figure 95: Représentation schématique du protocole de séparation des membranes par ultracentrifugation

– Préparation simple de fraction membranaire

Ce protocole permet de collecter dans une fraction une majorité des protéines de la membrane plasmique : la fraction « membranes lourdes » est récupérée, mais pas la fraction « membranes légères » (voir Figure 94). A l'étape 3 (Figure 95), le culot a été suspendu dans du tampon de Laemmli et correspond à la fraction membranaire. L'étape 4 n'a pas été réalisée, et le surnageant contient les protéines membranaires légères et les protéines solubles.

– Fraction membranaire totale

Ce protocole permet de collecter dans une seule fraction toutes les protéines membranaires présentes dans la cellule. Le tampon de lyse MOPS a été utilisé pour préparer le lysat cellulaire comme expliqué précédemment (étapes 1 et 2, Figure 95). Le lysat cellulaire a ensuite été ultracentrifugé (Beckman CO-LE-80K Optima preparative ultracentrifuge) 30 minutes à 100000 g à 4°C (étape 4, l'étape 3 est sautée). Le culot a été suspendu dans du tampon de conservation (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 2 mM DTT et 25 % glycérol) et correspond à la fraction membranaire

totale. Le surnageant contient les protéines solubles (étape 5). Les concentrations des différentes fractions ont été mesurées avec le kit Bradford et normalisées. Lorsque l'utilisation des extraits n'était pas immédiate, ils ont été conservés à -20°C avant ajout du tampon de Laemmli et chargement dans gel.

3. b. Analyse de protéines par Western blot

3. b. i. Séparation par SDS-PAGE (électrophorèse sur gel de poly-acrylamide)

La séparation des protéines par SDS-PAGE permet de séparer les protéines en fonction de leur masse moléculaire sur un gel d'acrylamide/bisacrylamide dénaturant contenant du SDS. Il est composé d'une partie supérieure qui permet de concentrer les protéines (gel de concentration) et d'une partie inférieure qui permet de séparer les protéines selon leur masse moléculaire (gel de séparation). La composition du gel est indiquée dans le Tableau 16.

Gel de concentration	Gel de séparation	Tampon d'électrophorèse	Tampon de transfert	TBS
125 mM Tris-HCl pH 6,8	375 mM Tris-HCl pH 8,8	25 mM Tris	25 mM Tris	0,15 mM Tris-OH pH 7,5
4% acrylamide/ bisacrylamide (37,5 :1)	6, 8 ou 10 % acrylamide/ bisacrylamide (37,5 :1)	192 mM glycine	192 mM glycine	0,2 M NaCl
0,1% SDS	0,1% SDS	0,1% SDS	0,1% SDS	
0,05% persulfate d'ammonium	0,05% persulfate d'ammonium		20 % EtOH	0,1 % Tween-20 (pour TBS+Tween)
0,05% TEMED	0,1% TEMED			

Tableau 16: Composition d'un gel SDS-PAGE et des différents tampons nécessaires à la réalisation d'un Western blot. La concentration en acrylamide/bisacrylamide varie dans le gel de séparation en fonction de la taille en kDa de la protéine à observer (6% : + de 90 kDa, 8% : entre 60 kDa et 90 kDa, 10% : en dessous de 60 kDa).

La migration a eu lieu à température ambiante dans le tampon d'électrophorèse (Tableau 16) à 80 V jusqu'à l'entrée des protéines dans le gel de séparation, puis 120 V.

3. b. ii. Transfert

Le transfert permet de transférer les protéines séparées dans le gel SDS-PAGE sur une membrane synthétique pour réaliser ensuite l'immunodétection des protéines.

Le transfert a été réalisé à 4°C en phase liquide dans du tampon de transfert (Tableau 16) sur une membrane de PVDF (polyfluorure de vinylidène) ou de nitrocellulose.

3. b. iii. Immunodétection

L'immunodétection permet de visualiser la présence et la quantité relative d'une protéine spécifique. Elle est basée sur la fixation d'un premier anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt (ou son étiquette), puis d'un deuxième anticorps couplé à une peroxydase et qui va reconnaître le premier anticorps. Ensuite, la révélation s'effectue par incubation de la membrane avec un substrat de la peroxydase. La réaction catalysée s'accompagne de luminescence qui peut être détectée par un film photographique.

Après le transfert, la membrane a été incubée avec une solution de TBS+Tween (Tableau 16) + lait 5 % (w/v) pendant 1 h à température ambiante : c'est l'étape de blocage qui permet de saturer la membrane avec les protéines du lait. La membrane a ensuite été incubée avec une solution de TBS+Tween + lait 5 % (w/v) contenant l'anticorps primaire (voir Tableau 17) pendant 1 h à

température ambiante ou une nuit à 4°C. Après 4 lavages de 5 minutes avec du TBS+Tween, la membrane a été incubée avec une solution de TBS+Tween + lait 5 % (w/v) contenant l'anticorps secondaire (chèvre anti-lapin ou anti-souris couplé à l'HRP – peroxydase du raifort – à une concentration de 1/10000 ou 1/20000) pendant 1 h à température ambiante. La membrane a ensuite été lavée 4 fois avec du TBS+Tween puis une dernière fois avec du TBS. L'incubation avec le réactif ECL (enhanced chemoluminescence) a été réalisée selon les recommandations du fabricant (SuperSignal West Pico (ou Femto) Maximum Sensitivity Substrate, ThermoScientific, ou Luminata Forte, Millipore). Le film photographique (CL-XPosure Film, ThermoScientific) a été exposé entre 1 seconde et 30 minutes selon l'intensité du signal puis révélé.

Anticorps	Fournisseur	Dilution	Utilisation
Anticorps monoclonal de souris anti-HA (12CA5)	Roche	1:10000	WB : Rgt1-3HA, 3HA-Rag4 IP : 3HA-Rag4
Anticorps polyclonal de lapin anti-HA	Sigma-Aldrich	1:5000	WB : Rgt1-3HA
Anticorps monoclonal de souris anti-c-Myc (9E10)	Roche	1:5000	WB : Sms1-13Myc
Anticorps polyclonal de lapin anti-LexA	Millipore	1:5000	WB : LexA-Rag8, LexA-Sck1 IP : LexA-Rag8
Anticorps polyclonal de lapin anti-protéine A	Sigma-Aldrich	1:10000	WB : Rag4-TAP
Anticorps polyclonal de lapin anti-ScPma1/2 (γ -300)	Santa Cruz Biotech	1:1000	WB : K/Pma1
Anticorps monoclonal de souris anti-Actin (mAbGEa)	Novus Biologicals	1:10000	WB : K/Act1
Anticorps polyclonal de lapin anti-K/Rgt1	Covalab	1:4000	WB : K/Rgt1
Anticorps monoclonal de souris anti-GST (GST-2)	Sigma-Aldrich	1:5000	WB : GST-Rag4C
Anticorps monoclonal de souris anti-Ubiquitin (bovine, P4D1)	Santa Cruz Biotech	1:1000	WB : K/Ub

Tableau 17: Liste des anticorps primaires utilisés

3. b. iv. Réutilisation d'une membrane pour une autre immunodétection : « stripping »

Pour utiliser à nouveau une membrane pour détecter une autre protéine, il est possible de la « stripper », c'est-à-dire la débarrasser des anticorps fixés. Pour cela, des solutions commerciales ont été utilisées: Restore Western blot stripping buffer (ThermoScientific) ou ReBlot Plus Mild Antibody Stripping Solution (Millipore). Une autre solution simple a consisté à incuber la membrane pour 5 minutes avec la solution de coloration au rouge Ponceau (voir ci-dessous), à la rincer à l'eau puis à l'incuber 5 minutes avec 0,2 M NaOH avant de rincer au TBS+Tween. Ensuite l'étape de blocage a duré 15 minutes et le reste de l'immunodétection s'est déroulée comme décrit ci-dessus.

3. b. v. Contrôle de charge protéique

Pour réaliser une quantification relative des protéines immunodétectées, il est important de vérifier que la charge protéique est la même dans tous les puits. Pour cela 3 méthodes ont été utilisées :

- coloration de la membrane au rouge Ponceau (voir Annexes page 256) : cette coloration est réversible à l'eau et permet une vérification rapide de la charge protéique. Elle a l'avantage de pouvoir être réalisée directement sur la membrane servant pour l'immunodétection.
- coloration du gel au bleu de Coomassie (voir Annexes page 256) : cette coloration réversible des protéines s'effectue sur un gel. Elle nécessite de charger un gel supplémentaire avec les échantillons

et a l'avantage d'être plus sensible que la coloration au rouge Ponceau, mais demande aussi plus de temps.

- immunodétection d'une protéine de ménage dont la quantité est indépendante des conditions expérimentales. La détection de l'actine est couramment utilisée comme contrôle de charge pour faire des quantifications relatives des protéines d'intérêt. Cela nécessite soit de stripper (voir page 225) la membrane initiale soit de réaliser un autre SDS-PAGE spécialement pour ça.

3. b. vi. Cas particulier de la co-immunoprécipitation

La co-immunoprécipitation consiste à observer des complexes de protéines qui ont été immunoprécipités. Il s'agit d'une méthode *in vivo* de recherche d'interaction protéique avec *a priori*. Pour cela, des souches de levure exprimant deux protéines d'intérêt A et B (immuno-déTECTABLES soit grâce à une étiquette soit grâce à un anticorps dirigé directement contre la protéine) sont utilisées. Les protéines A et B ont été immunoprécipitées séparément (voir page 222), ensuite les échantillons de protéines purifiées ont été analysés par SDS-PAGE puis Western blot et immunodétection. Pour les échantillons dans lesquels la protéine A a été immunoprécipitée, la protéine B a d'abord été recherchée par immunodétection, puis la membrane a été strippée (voir page 225) pour vérifier la purification de la protéine A. Le même processus a été suivi pour détecter la protéine A dans les échantillons dans lesquels la protéine B a été immunoprécipitée. La détection de la protéine B dans les échantillons dans lesquels la protéine A a été immunoprécipitée (et inversement) suggère que les protéines A et B interagissent dans les conditions de culture testées.

3. c. Essai kinase

Cette technique *in vitro* permet de tester la capacité d'une kinase à phosphoryler un substrat. Le protocole a été adapté de (Neil et al., 2007) et utilise du phosphate radioactif comme marqueur de la phosphorylation du substrat. Le protocole est schématisé dans la Figure 96.

La kinase LexA-Rag8 a été purifiée à partir de souches de levures *K. lactis*, sauvage ou mutant de l'hexokinase, cultivées en présence de glucose, pour tester l'activité intrinsèque de la kinase dans ces différentes conditions. 7,5 mg de protéines totales préparées avec le tampon Neil ont été utilisés pour l'immunoprécipitation comme décrit page 223. Les étapes de lavage ont été prolongées de 20 minutes, avec rotation à 4°C. 4/5 de la résine d'agarose couplé à la protéine A et portant la kinase immunoprécipitée ont été utilisés pour l'essai kinase et les 1/5 restants ont été réservés pour évaluer la quantité relative de la kinase immunoprécipitée (séparation des protéines par SDS-PAGE, Western blot et immunodétection). Les substrats ((His)₆-Sck1, (His)₆-Sms1 et GST-Rag4C) ont été purifiés à partir d'*E. coli* (voir page 220) : environ 1 µg de protéine a été utilisé par réaction.

La résine réservée pour l'essai kinase a été lavée dans le tampon kinase (50 mM Tris pH 6,8, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 µM ATP et 10 mM MgCl₂), et reprise dans 50 µl de tampon kinase puis la réaction a été lancée par ajout de 1,5 µCi [γ -³²P]ATP et du substrat, suivi de 30 minutes d'incubation à 30°C. Une réaction similaire contenant 2 mM de ZnCl₂ pour inhiber spécifiquement les caséines kinases de type I (Souza et al., 2012) a été réalisée comme contrôle négatif. La réaction a été stoppée en plaçant les tubes sur la glace pendant 5 minutes, puis les échantillons ont été portés 5 minutes à 95°C avec du tampon de Laemmli. Pour chaque échantillon, la totalité de la réaction a été chargée sur un gel SDS-PAGE qui a ensuite été coloré au bleu de Coomassie. Après décoloration, le gel a été photographié et un écran sensible au [γ -³²P] a été exposé sur le gel pendant 70 h. La lecture de l'écran a été réalisée par le Cyclone PhosphorImager (Packard).

Les analyses densitométriques ont été réalisées avec le logiciel Image J.

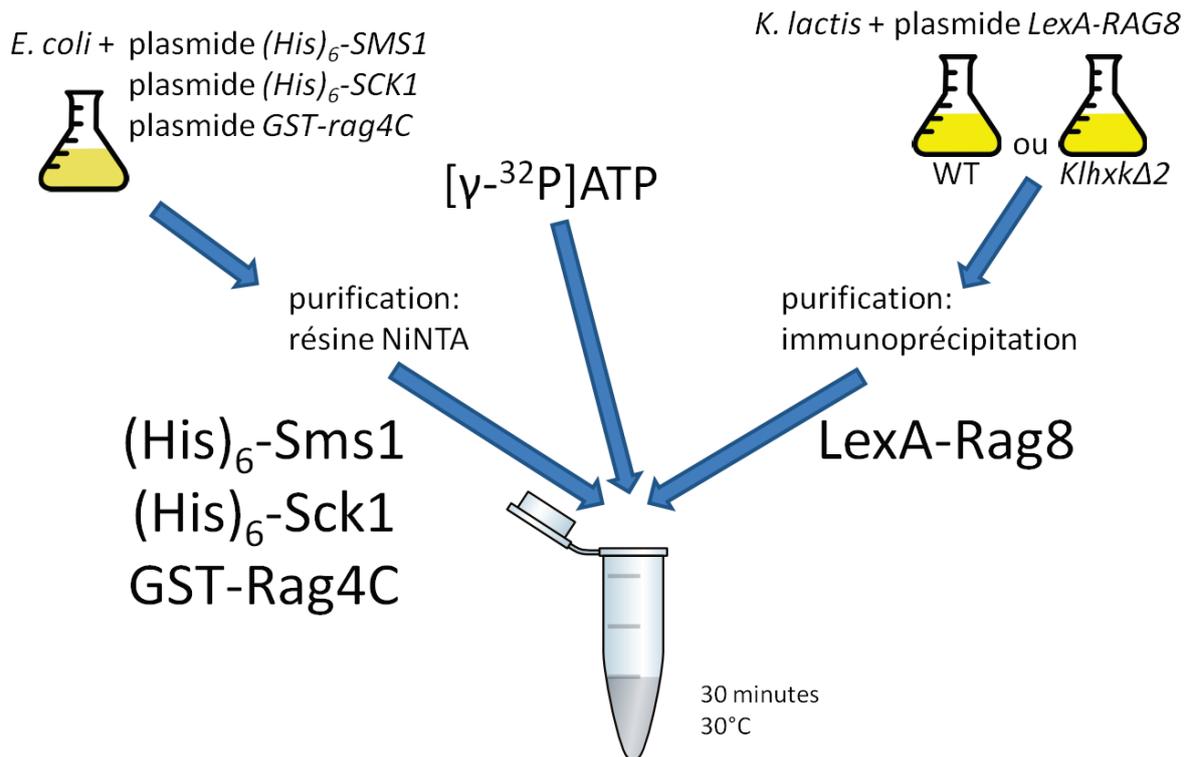


Figure 96: Représentation schématique du protocole de l'essai kinase Rag8 envers ses substrats potentiels Sck1, Sms1 et Rag4C. La caséine kinase I LexA-Rag8 a été purifiée à partir de souches de levures *K. lactis*, sauvage ou mutant de l'hexokinase, cultivées en présence de glucose. La kinase n'a pas été éluée avant la réaction enzymatique : l'essai kinase a eu lieu directement sur la résine.

4. Méthodes cellulaires : microscopie à fluorescence

La microscopie à fluorescence a été utilisée pour détecter la présence et la localisation cellulaire de protéines de fusion couplées à la GFP.

Les cellules exprimant ces protéines ont été cultivées jusqu'à la phase exponentielle de croissance en milieu synthétique. Les cellules ont été collectées par centrifugation et montées entre lame et lamelle dans la goutte de surnageant restant. L'observation des cellules a été effectuée avec un filtre GFP installé sur le microscope à fluorescence Zeiss AxioSkop2. Les images ont été traitées avec le logiciel Photoshop (Adobe) ou ImageJ (Rasband, W.S., 1997), et les images sélectionnées sont représentatives de l'ensemble de l'échantillon observé.

5. Méthodes d'analyse métabolomique

Diverses analyses métabolomiques ont été réalisées pour comparer les métabolites issus de la glycolyse dans des souches de levure *K. lactis* sauvage et mutants glycolytiques. Une mesure rapide de la quantité d'ATP intracellulaire a été effectuée au laboratoire. Plus tard, une analyse métabolomique plus poussée a été réalisée par HPLC en collaboration avec Jean-Marie François au LISBP (Toulouse).

5. a. Détermination de la corrélation DO_{600 nm}/nombre de cellules et DO_{600 nm}/masse sèche pour les souches de levure *K. lactis*

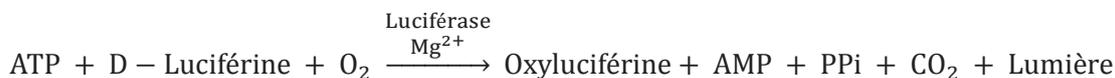
Pour permettre d'exprimer les résultats de mesure de la quantité de métabolites en μmol par gramme de masse sèche de matériel biologique, la corrélation DO_{600 nm}/masse sèche a été déterminée pour les souches et les conditions étudiées.

Tout d'abord la corrélation DO_{600 nm}/nombre de cellules a été définie. Pour chaque condition, 3 cultures à 3 DO_{600 nm} différentes (comprise entre 0,2 et 5) ont été utilisées et la concentration cellulaire moyenne a été déterminée au microscope à l'aide d'une cellule de Thoma. Pour chaque mesure, 6 moyens carrés ont été comptés et le nombre de cellules est calculé d'après la moyenne de ces comptages.

Pour chaque condition pour laquelle la corrélation DO_{600 nm}/masse sèche a été déterminée, 3 cultures à 3 DO_{600 nm} différentes (comprises entre 0,4 et 5) ont été réalisées. 50 ml de cultures ont été filtrés grâce à une pompe à vide en utilisant des filtres cellulose acétate 0,2 μm (Sartorius) préalablement pesés. Après filtration, les filtres ont été séchés 24h à 85°C (dessiccation des cellules) puis pesés. Le poids de matière sèche est déterminé par soustraction du poids après filtration et séchage par le poids avant filtration. Un filtre sans cellule a été pesé avant et après séchage pour estimer la perte d'humidité des filtres.

5. b. Mesure de la quantité d'ATP cellulaire

Le kit ATPlite (Perkin-Elmer) destiné à mesurer la quantité d'ATP intracellulaire dans des cellules mammifères a été adapté pour la mesure dans des levures *K. lactis*. Ce kit est basé sur une réaction enzymatique catalysée par la luciférase et produisant de la luminescence :



Seulement 100 μl de culture à DO_{600 nm}=1 sont nécessaires pour la mesure. Le protocole d'extraction suivant a été utilisé, après adaptation de (Gonzales et al., 1997) : 420 μl d'éthanol 100 % et 40 μl de tampon Hépers 1 M pH 8,0 sont ajoutés aux 100 μl de culture (cellules et milieu). L'ensemble a été porté à 80°C pendant 3 minutes puis refroidi 3 minutes sur la glace. Ensuite l'échantillon a été concentré au SpeedVac par évaporation de l'éthanol et resuspendu dans 100 μl d'eau distillée ultra-pure.

Pour la mesure de la quantité d'ATP, le protocole du kit a été suivi et les mesures ont été réalisées dans une plaque 96 puits grâce à un lecteur de plaque de luminescence (Tecan). Du matériel de manipulation garanti sans ATP a été utilisé. En bref, 50 μl de tampon de lyse du kit ont été ajoutés aux 100 μl de matériel biologique préparés comme expliqué ci-dessus. Après 5 minutes d'agitation, 50 μl de solution du kit contenant le substrat ont été ajoutés. Après encore 5 minutes d'agitation et 10 minutes d'incubation dans le noir, la luminescence est mesurée. En parallèle, une courbe-étalon a été réalisé avec différentes concentrations d'ATP préparées comme les échantillons biologiques. Des blancs ont également été réalisés pour calculer la luminescence due au milieu de culture. Toutes les mesures ont été réalisées en triplicata technique et répétées au moins 2 fois avec de nouvelles cultures.

Cette technique permet de mesurer rapidement la quantité d'ATP dans différentes souches et conditions de culture mais présente l'inconvénient de ne pas séparer les cellules du milieu de culture avant l'extraction. Ainsi l'ATP extracellulaire est probablement mesuré et peut biaiser les mesures en cas de relargage d'ATP par les cellules dans le milieu extracellulaire.

5. c. Analyse des métabolites issus de la glycolyse par HPLC

L'analyse métabolomique a visé à mesurer les métabolites intracellulaires issus du métabolisme du glucose après ajout de glucose 2% dans le milieu. Pour cela des prélèvements sont réalisés à différents temps avant et après la stimulation glucose : -2 min, 0, 30 s, 1 min, 3 min, 10 min, 20 min, 1h et 5h. Chaque culture a été réalisée en duplicatas.

La préparation des échantillons et l'analyse métabolomique par HPLC ont eu lieu à Toulouse dans le laboratoire de Jean-Marie François (Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques & des Procédés, UMR CNRS 5504 & INRA 792, 135 avenue de Rangueil, F-31077 Toulouse cedex 04) en octobre 2013.

5. c. i. Préparation des échantillons pour l'analyse métabolomique

Les levures ont été mises en culture en milieu synthétique liquide Slactate ou SG dans un volume de 100 ml jusqu'à atteindre une $DO_{600\text{ nm}}=2$. Chaque prélèvement est équivalent à la quantité de cellules comprises dans 20 $DO_{600\text{ nm}}$ (20 ml à $DO_{600\text{ nm}}=2$), ce qui correspond à une masse sèche équivalente à 5 mg. La culture a été filtrée avec un système de pompe à vide et des filtres Sartolon polyamide 0,45 μm (Sartorius Stedim). Le filtre a ensuite été rincé avec de l'eau ou du glucose 2% (pour préserver l'osmolarité si du glucose était présent dans le milieu de culture). Le filtre a été plongé dans 10 ml d'une solution d'éthanol à 75%, vortexé et porté 4 minutes à 80°C. Après refroidissement dans la glace, la solution d'éthanol et de levures a été transférée dans un tube à hémolyse et séchée au SpeedVac à 45°C. Le résidu obtenu a été resuspendu dans 250 μl d'eau ultra-pure, centrifugé 10 minutes à 15000 g et le surnageant a été congelé à -20°C jusqu'à l'analyse.

5. c. ii. Analyse métabolomique par HPLC : chromatographie anionique couplée à une détection UV et un spectromètre de masse

L'analyse par HPLC a été réalisée par Amélie Vax au LISBP, Toulouse.

Les métabolites ont été quantifiés en utilisant un système ICS-3000 (Dionex) qui est équipé de différents éléments, notamment : un détecteur UV en réseau (Ultimate 3000, Dionex), un détecteur de conductivité (partie intégrante de l'ICS-3000, Dionex) et un détecteur sensible à la masse (MSQ Plus, Thermo Scientific).

5. c. iii. Traitement des données des mesures de détection des métabolites en UV et en spectrométrie de masse

Après la détection, les résultats ont été obtenus sous forme de pics de détection qui ont permis le calcul des aires sous la courbe correspondantes. Grâce à l'analyse de solutions standards où les différents métabolites étaient présents à une concentration déterminée, la concentration en métabolite dans l'échantillon analysé a été déterminée. Enfin la quantité de métabolites par masse de matière biologique sèche (en $\mu\text{mol/g}$) a été calculée grâce à l'Équation 3.

$$Y = X \times \frac{V}{DW} \quad \text{avec} \quad DW = \text{nombre d'unités DO} \times \text{masse sèche/DO}$$

Équation 3: Quantité de métabolite par masse sèche ($Y=\mu\text{mol/g}$). X est la concentration du métabolite dans l'échantillon, en mM, V est le volume utilisé pour resuspendre l'échantillon, en μl (ici 250 μl), le nombre d'unités $DO_{600\text{ nm}}$ est d'environ 20 par échantillon et la masse sèche/ $DO_{600\text{ nm}}$ a été définie pour chaque souche et condition.

Le logiciel R (R Core Team, 2012) a été utilisé pour traiter les résultats et tracer les graphes représentant la quantité de métabolites au cours du temps.

VI. Annexes

Résultats de l'analyse métabolomique

Les résultats de l'analyse métabolomique sont donnés ci-dessous sous forme de graphiques qui représentent la quantité de métabolites par gramme de matière sèche en fonction du temps. Sur ces graphiques, seuls les temps jusqu'à vingt minutes ont été représentés. Pour chaque condition, une page montre les métabolites issus de la glycolyse, l'autre les différents nucléotides mesurés.

Les conditions testées sont présentées dans l'ordre suivant (croissance en milieu Slactate si ce n'est pas mentionné) :

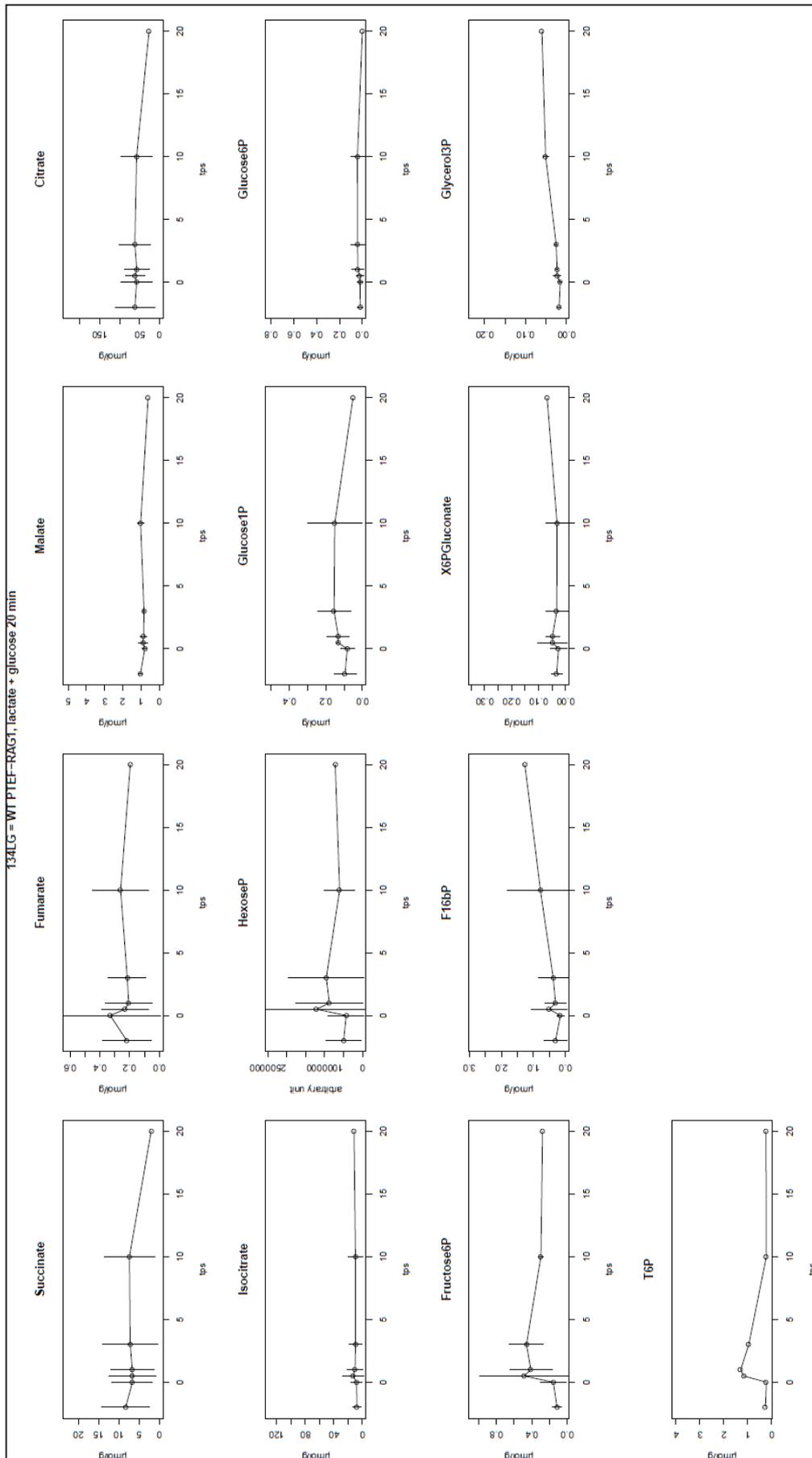
- "134LG = WT PTEF1-RAG1, lactate + glucose 20 min" : souche ACRK134 *P_{ScTEF1}RAG1* qui a subi une stimulation glucose
- "97LG = mutant hxx, lactate + glucose 20 min" : souche ACRK97 $\Delta K/hxx$ qui a subi une stimulation glucose
- "130LG = mutant eno, lactate + glucose 20 min" : souche ACRK130 $\Delta K/eno$ qui a subi une stimulation glucose
- "128LG = mutant rgt1, lactate + glucose 20 min" : souche ACRK128 $\Delta K/lrgt1$ qui a subi une stimulation glucose
- "136LG = mutant hxx PTEF1-RAG1, lactate + glucose 20 min" : souche ACRK136 $\Delta K/hxx P_{ScTEF1}RAG1$ qui a subi une stimulation glucose
- "138LG = mutant eno PTEF1-RAG1, lactate + glucose 20 min" : souche ACRK139 $\Delta K/eno P_{ScTEF1}RAG1$ qui a subi une stimulation glucose
- "130LG = mutant eno, lactate + glucose 20 min" : souche ACRK130 $\Delta K/eno$ qui a subi une stimulation glucose
- "9S1LGIA = WT, lactate + glucose + IA 20 min" : souche MWL9S1 *WT* qui a subi une stimulation glucose à t = 0 et un traitement à l'IA 0,25 mM à t = 10 minutes
- "134LGIA = WT PTEF1-RAG1, lactate + glucose + IA 20 min" : souche ACRK134 *P_{ScTEF1}RAG1* qui a subi une stimulation glucose à t = 0 et un traitement à l'IA 0,25 mM à t = 10 minutes
- "9S1LIA = WT, lactate + IA 20 min" : souche MWL9S1 *WT* qui a subi un traitement à l'IA 0,25 mM à t = 0
- "9S1GIA = WT, glucose + IA 20 min" : souche MWL9S1 *WT* qui a subi un traitement à l'IA 0,25 mM à t = 0 après croissance en milieu SG (glucose).

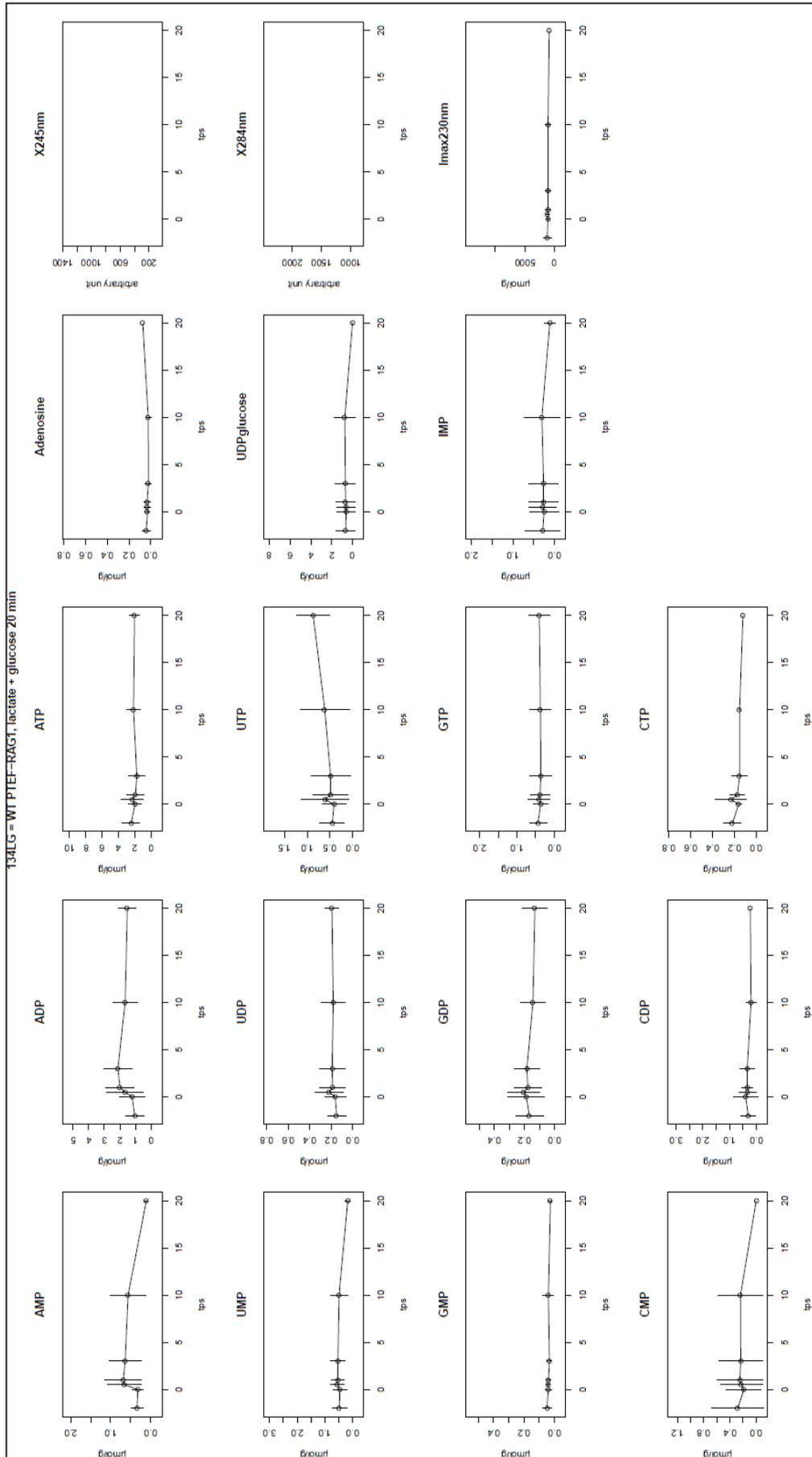
Métabolites

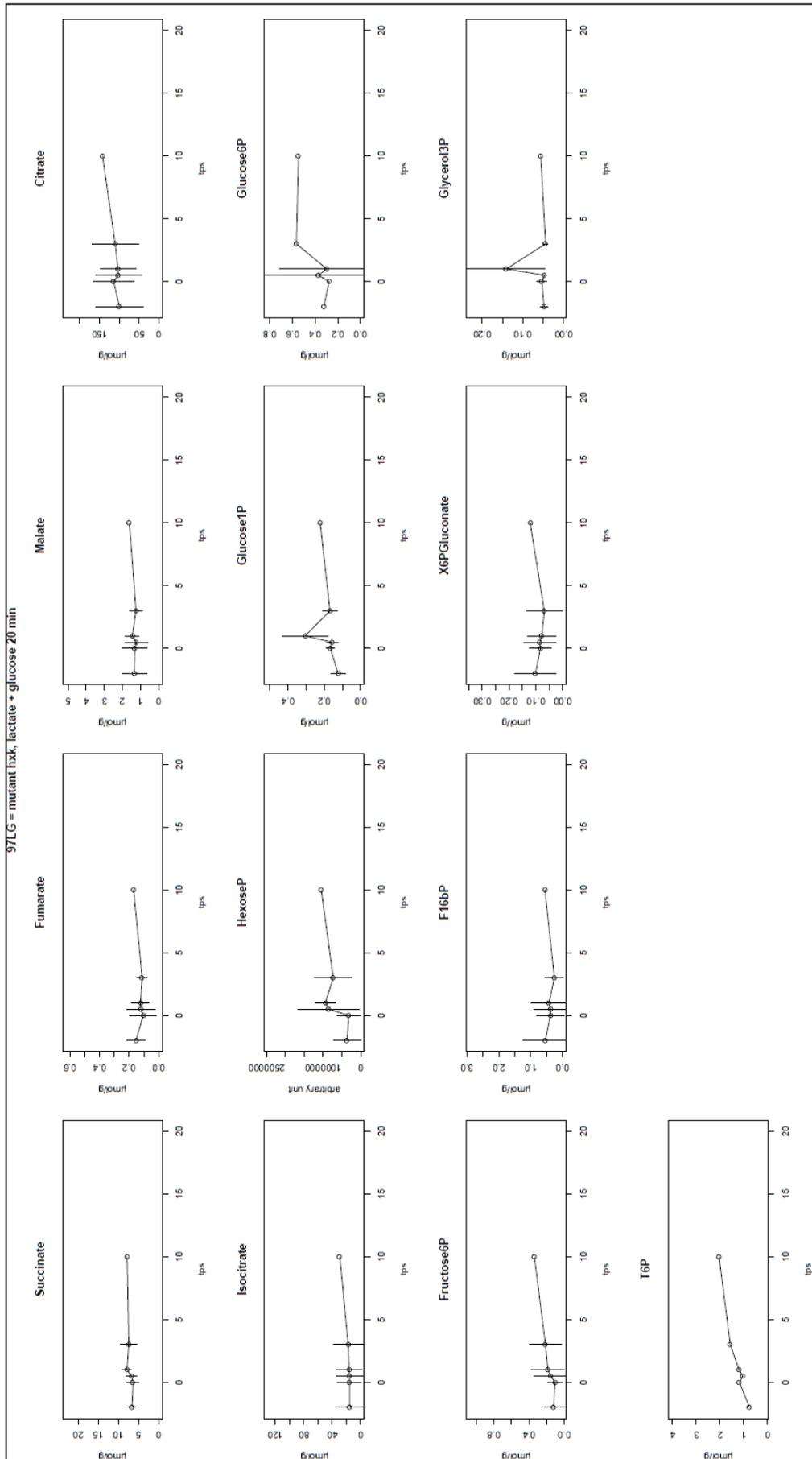
Les duplicatas réalisés à t = 0 sont représentés, l'un à t = -2 puis l'autre à t = 0. Les quantités de métabolites (mesurées par spectrométrie de masse) sont exprimées en μmol par g de matière sèche biologique, sauf pour « HexoseP » qui n'est pas identifié et ne peut pas être quantifié par rapport à des standards. Les valeurs indiquées sont la moyenne de duplicata, sauf pour le T6P qui a été mesuré dans un seul duplicata. Les écarts-type sont représentés. HexoseP : hexose-phosphate, Glucose1P : glucose-1-phosphate, Glucose6P : glucose-6-phosphate, Fructose6P : fructose-6-phosphate, F16bP : fructose-1,6-bisphosphate, X6PGluconate : 6-phospho-gluconate, Glycerol3P : glycérol-3-phosphate et T6P : tréhalose-6-phosphate.

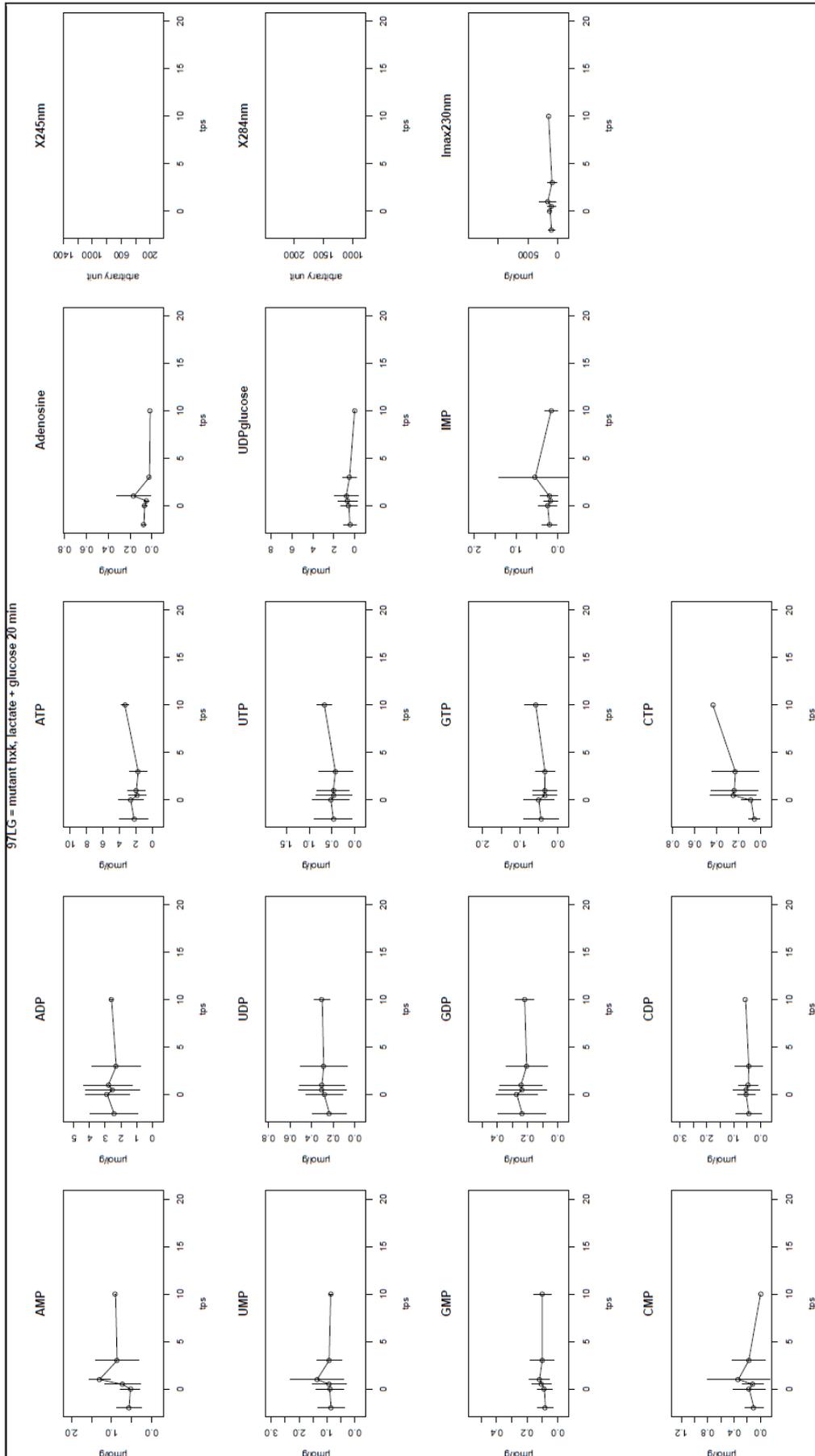
Nucléotides

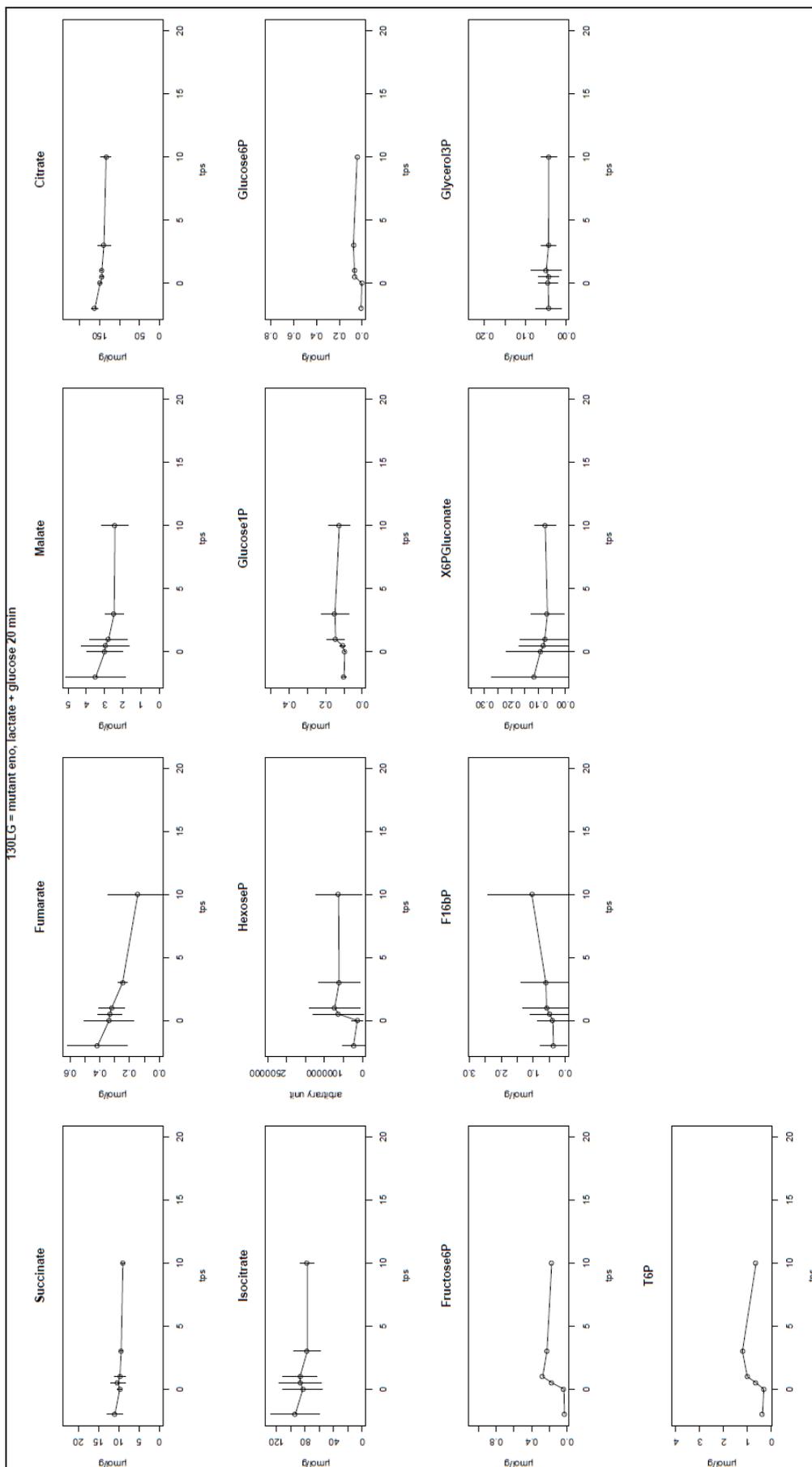
Les duplicatas réalisés à t = 0 sont représentés, l'un à t = -2 puis l'autre à t = 0. Les quantités de nucléotides (quantité mesurée à la fois par spectrométrie de masse et en UV pour la plupart) sont exprimés en μmol par g de matière sèche biologique, sauf pour les nucléotides non-identifiés qui ne peuvent pas être quantifiés (X245nm, X284nm et lmax230nm). Les valeurs indiquées sont la moyenne des mesures de duplicata biologique par deux moyens de détection (MS et UV). Les écarts-type sont représentés.

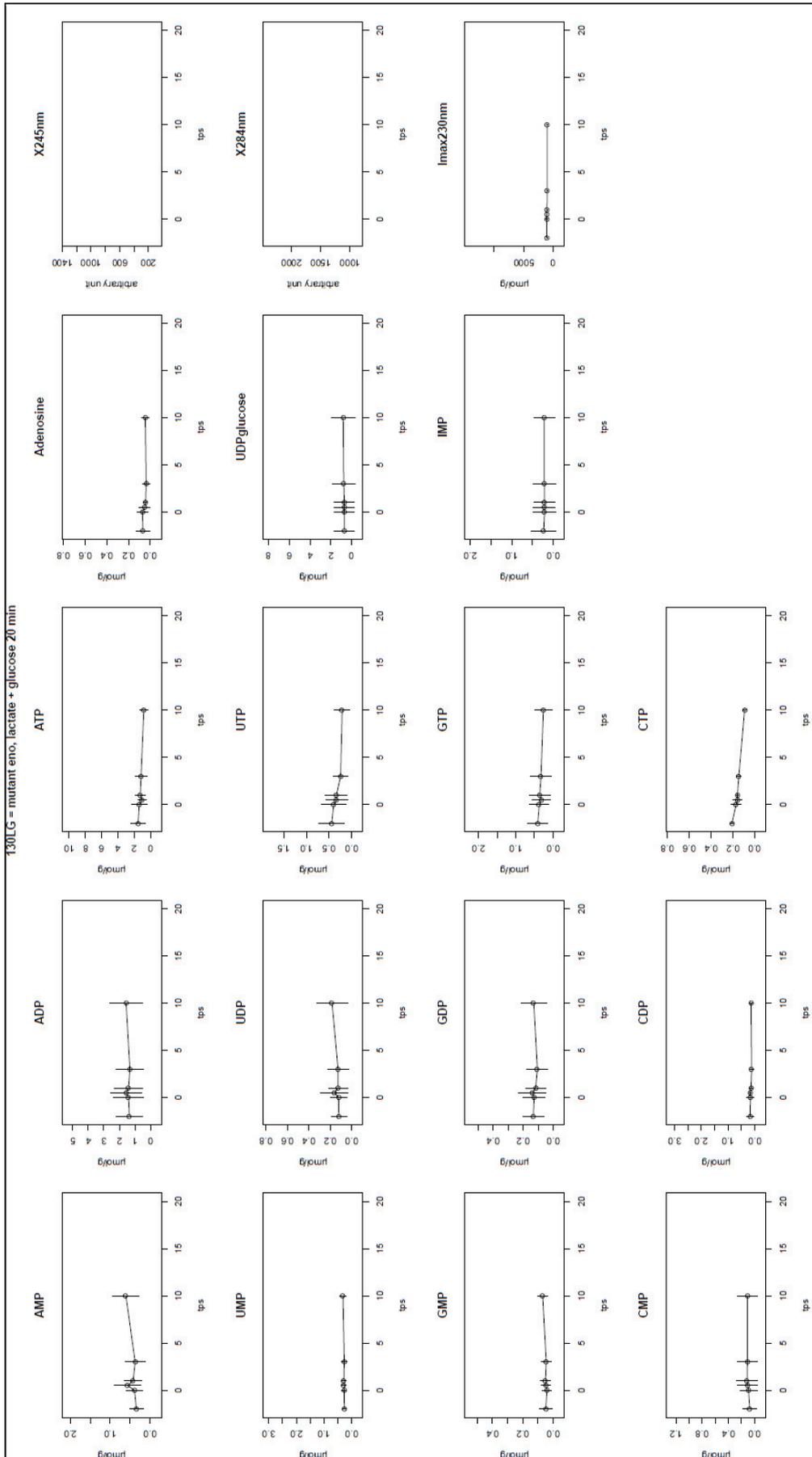


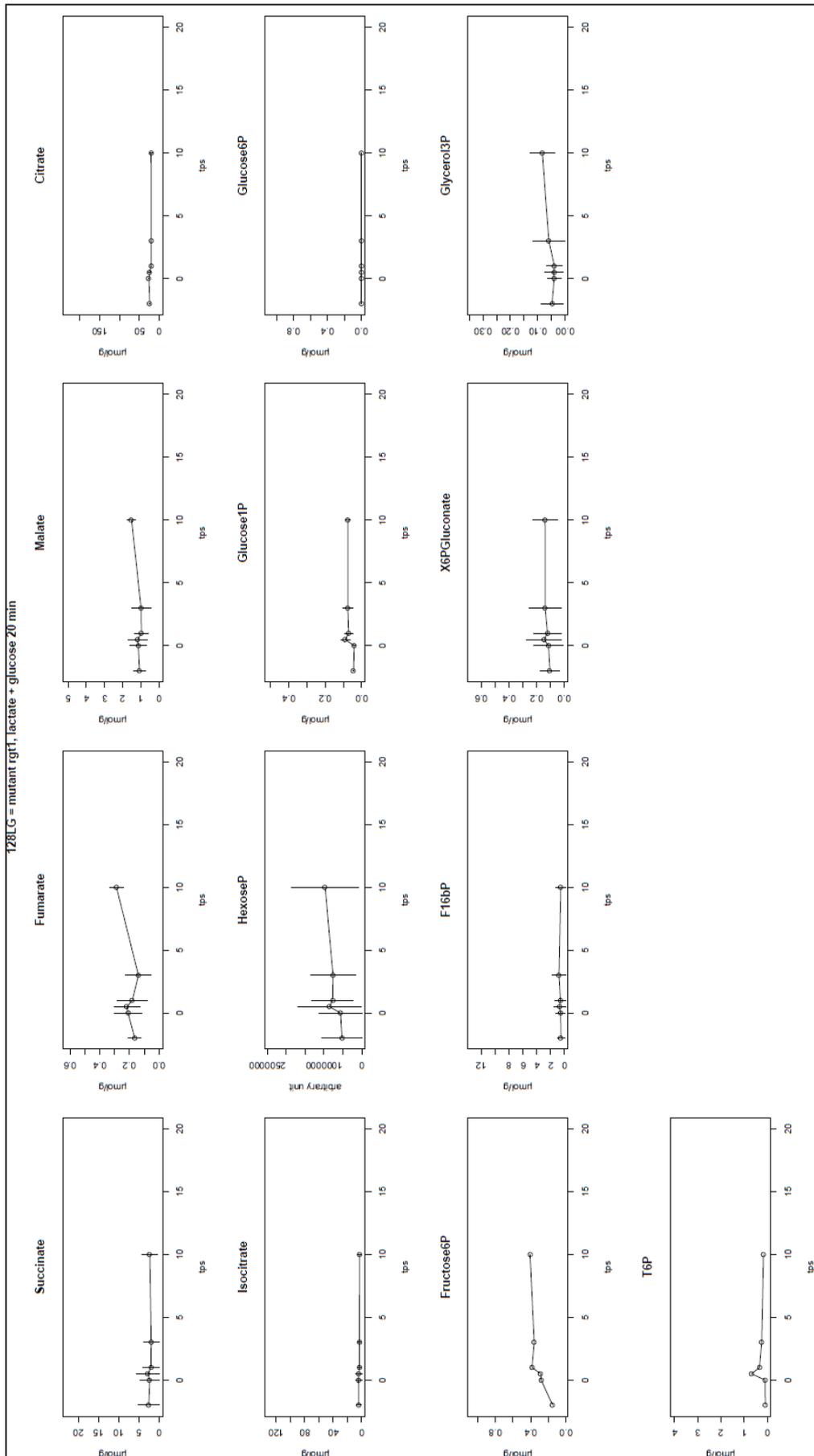


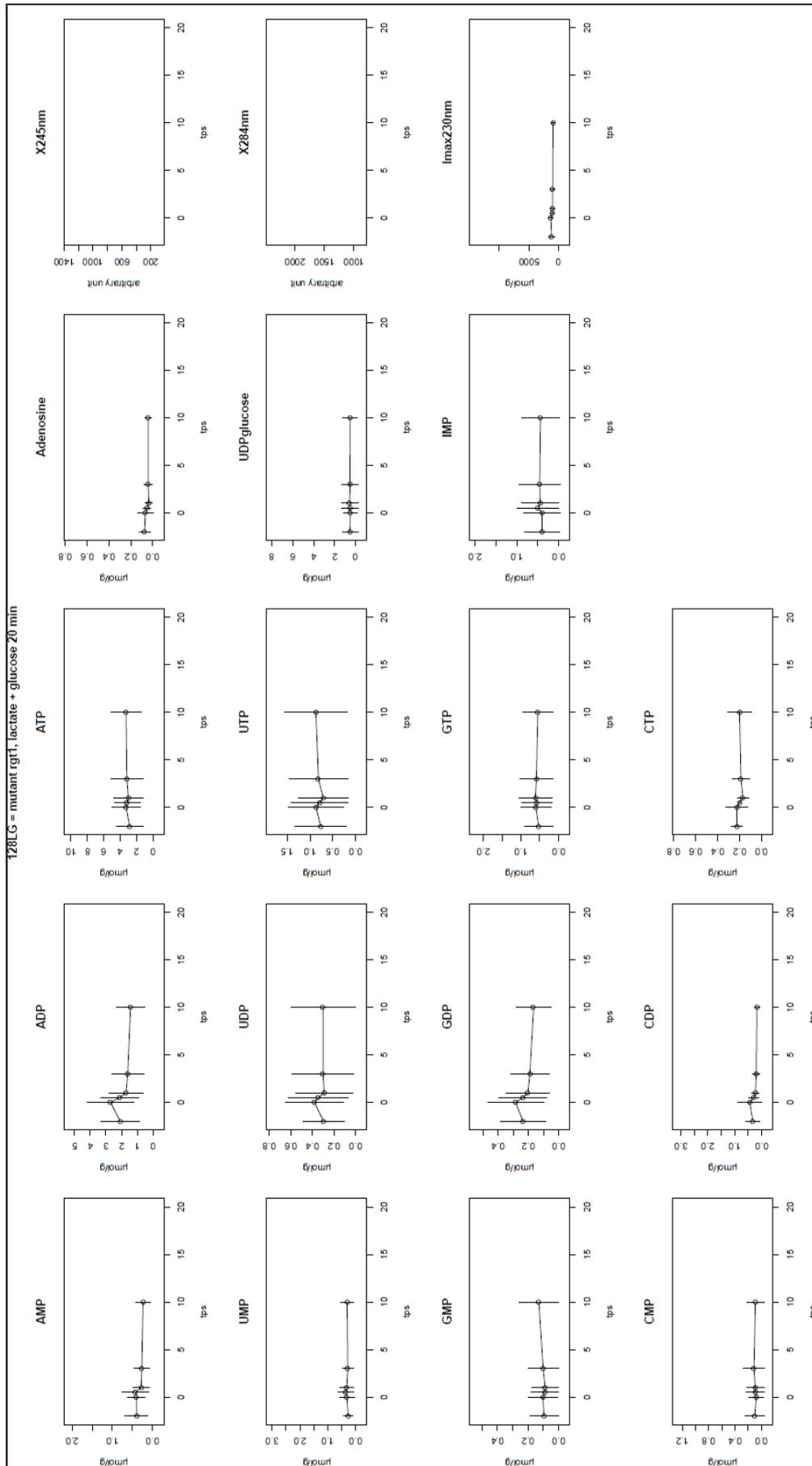


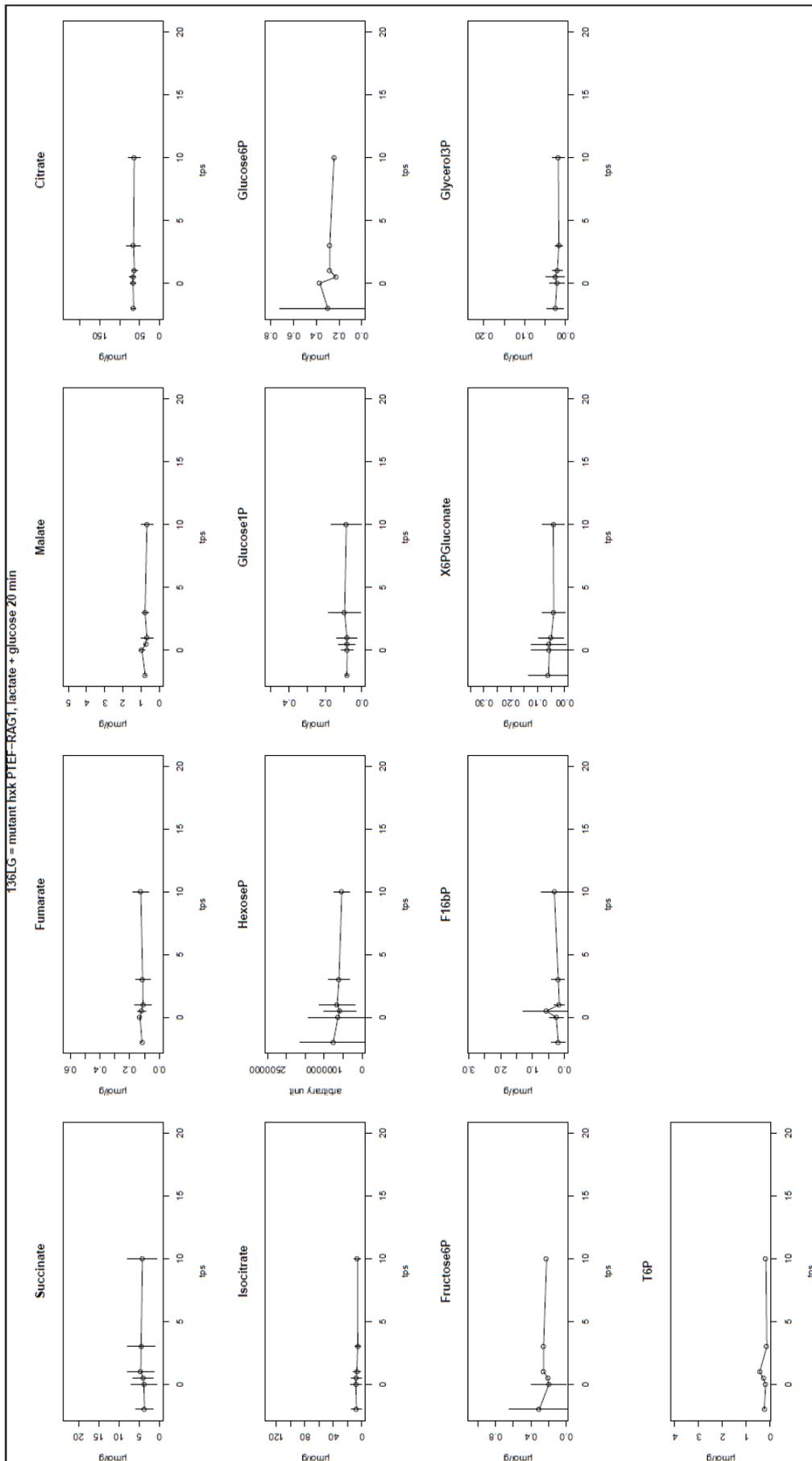


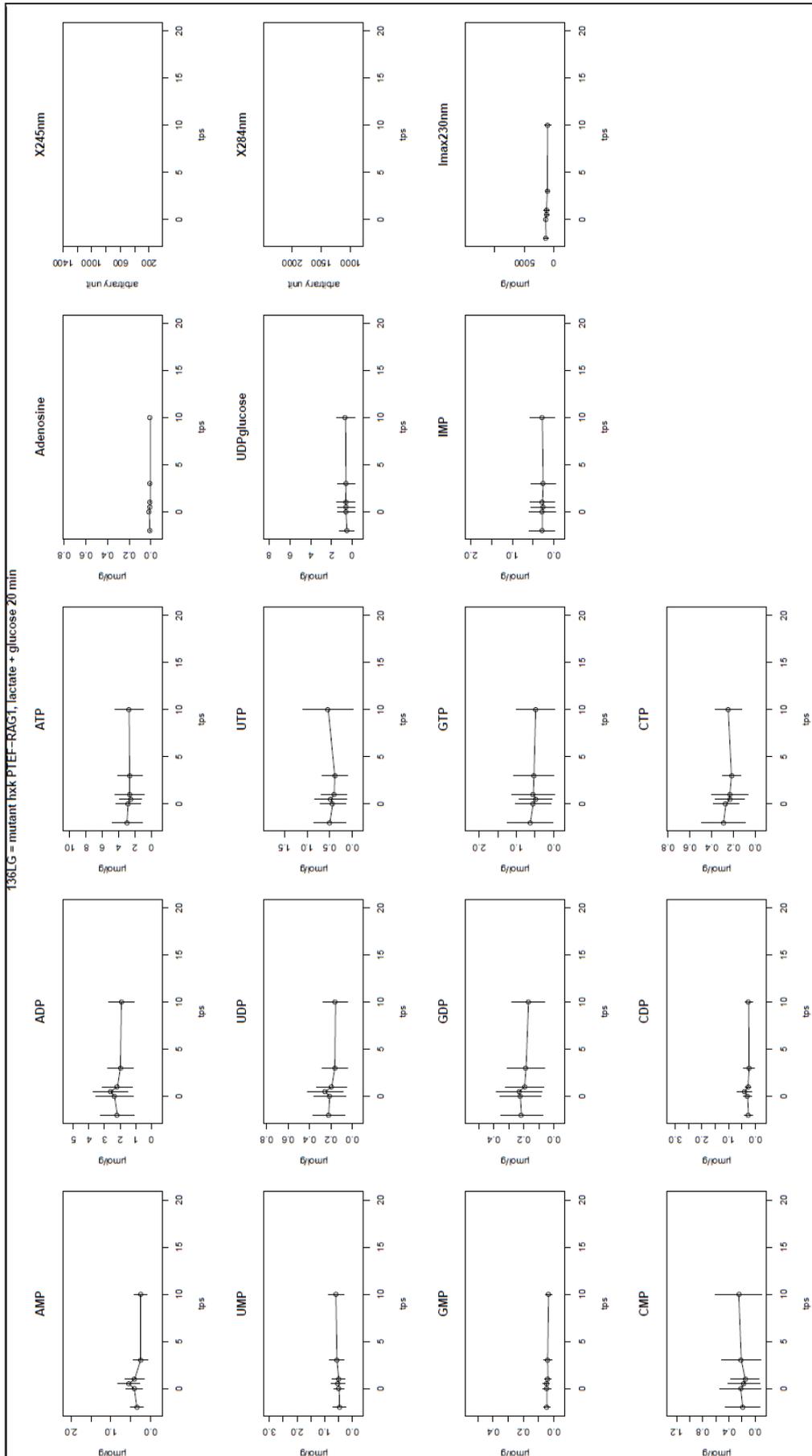


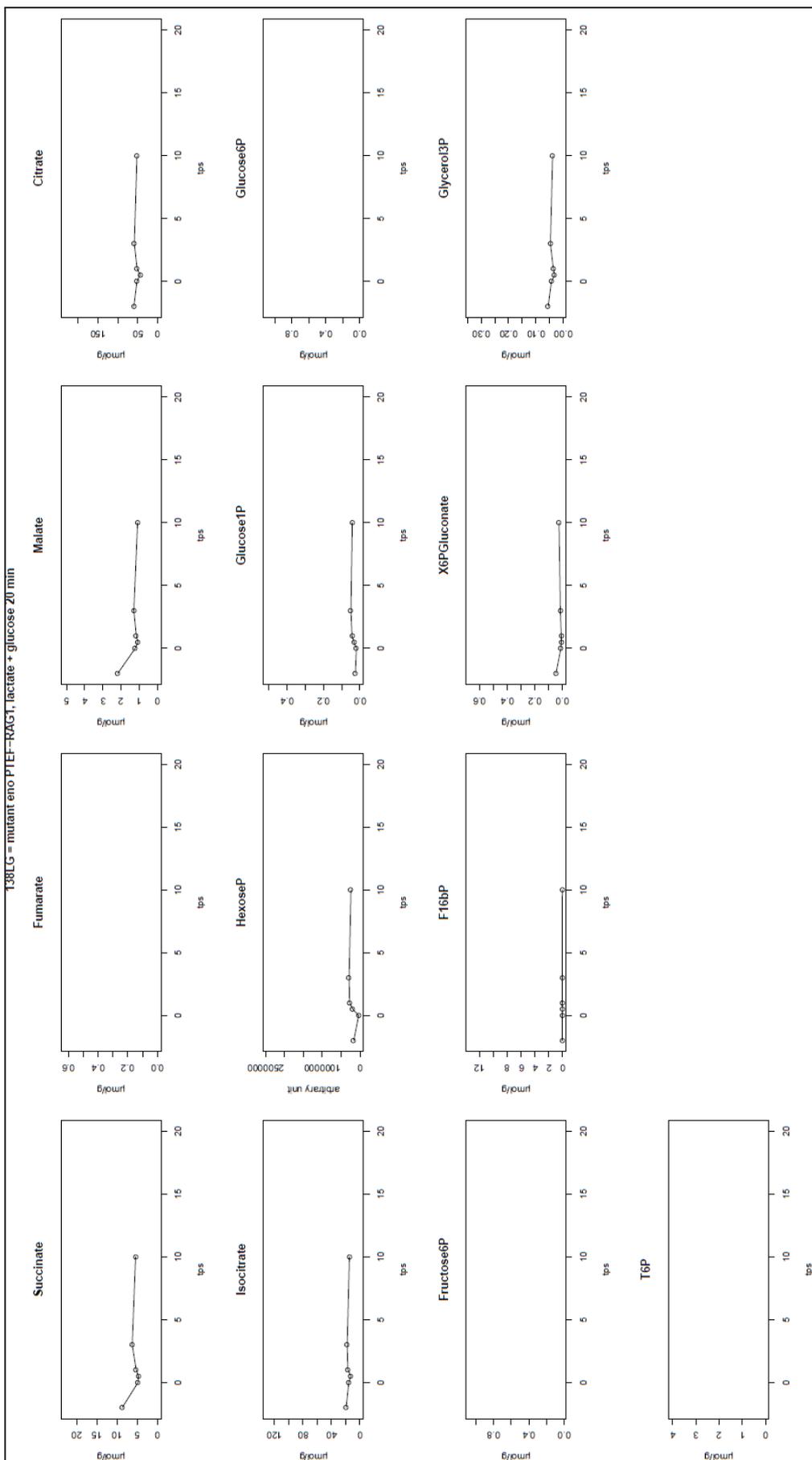


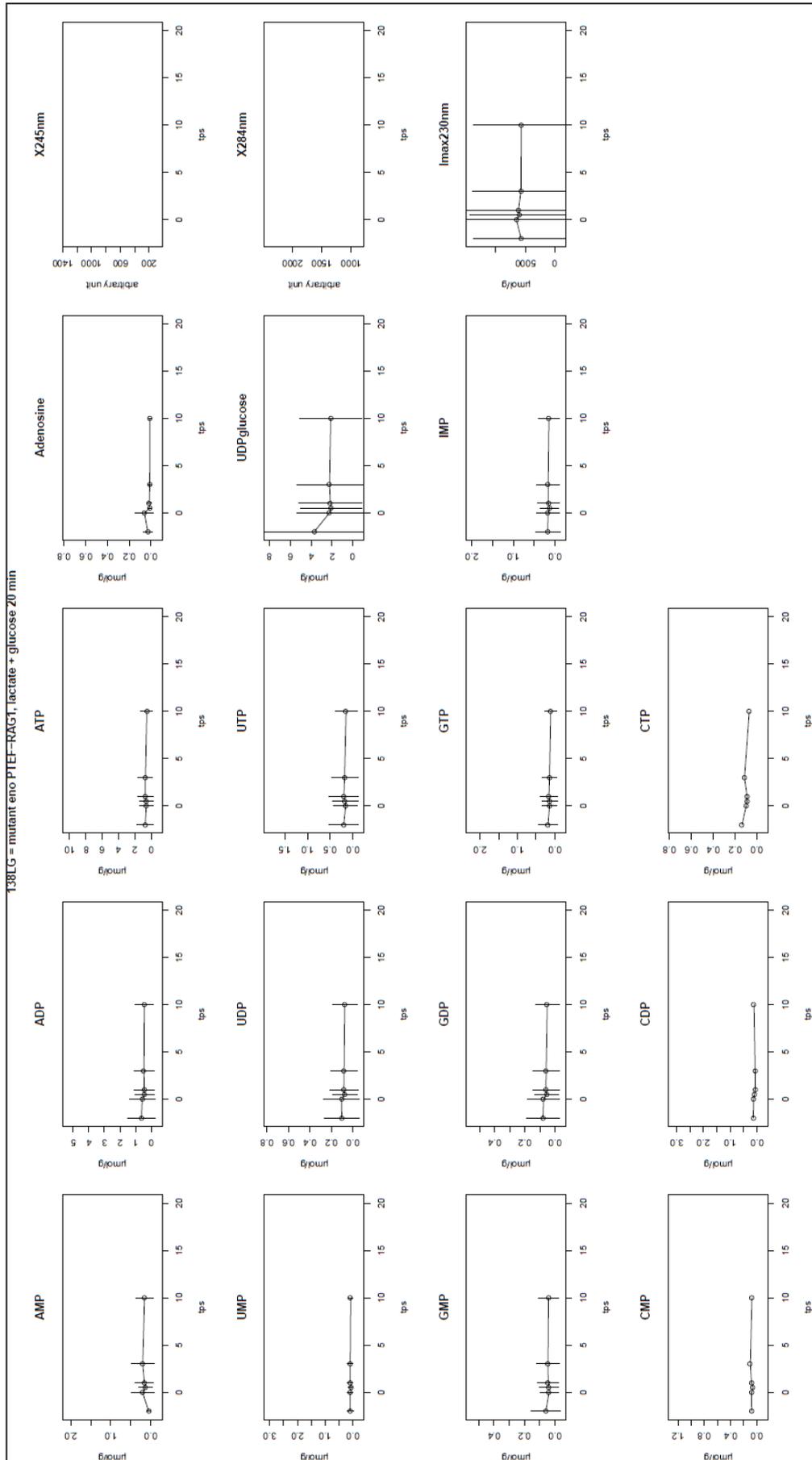


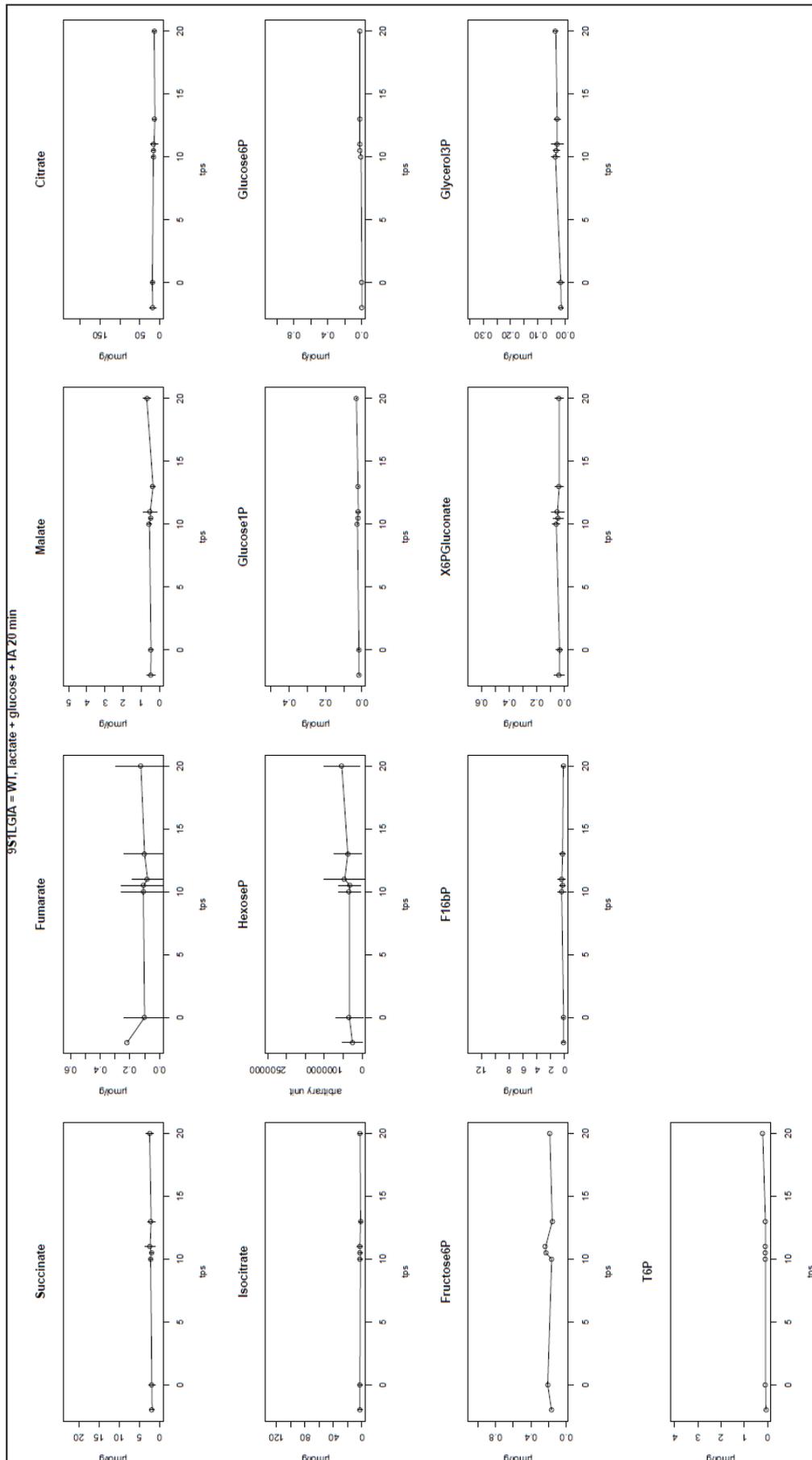


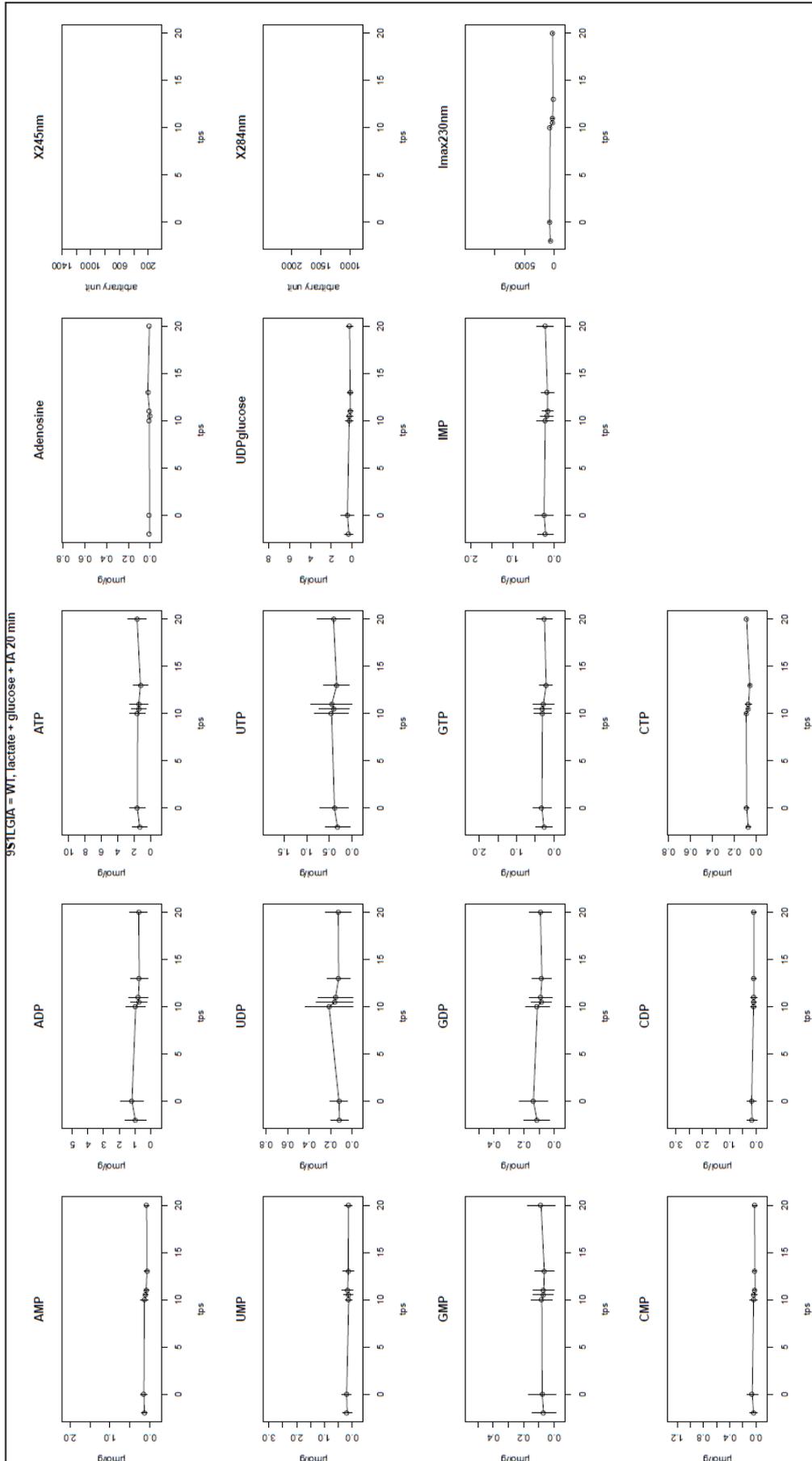


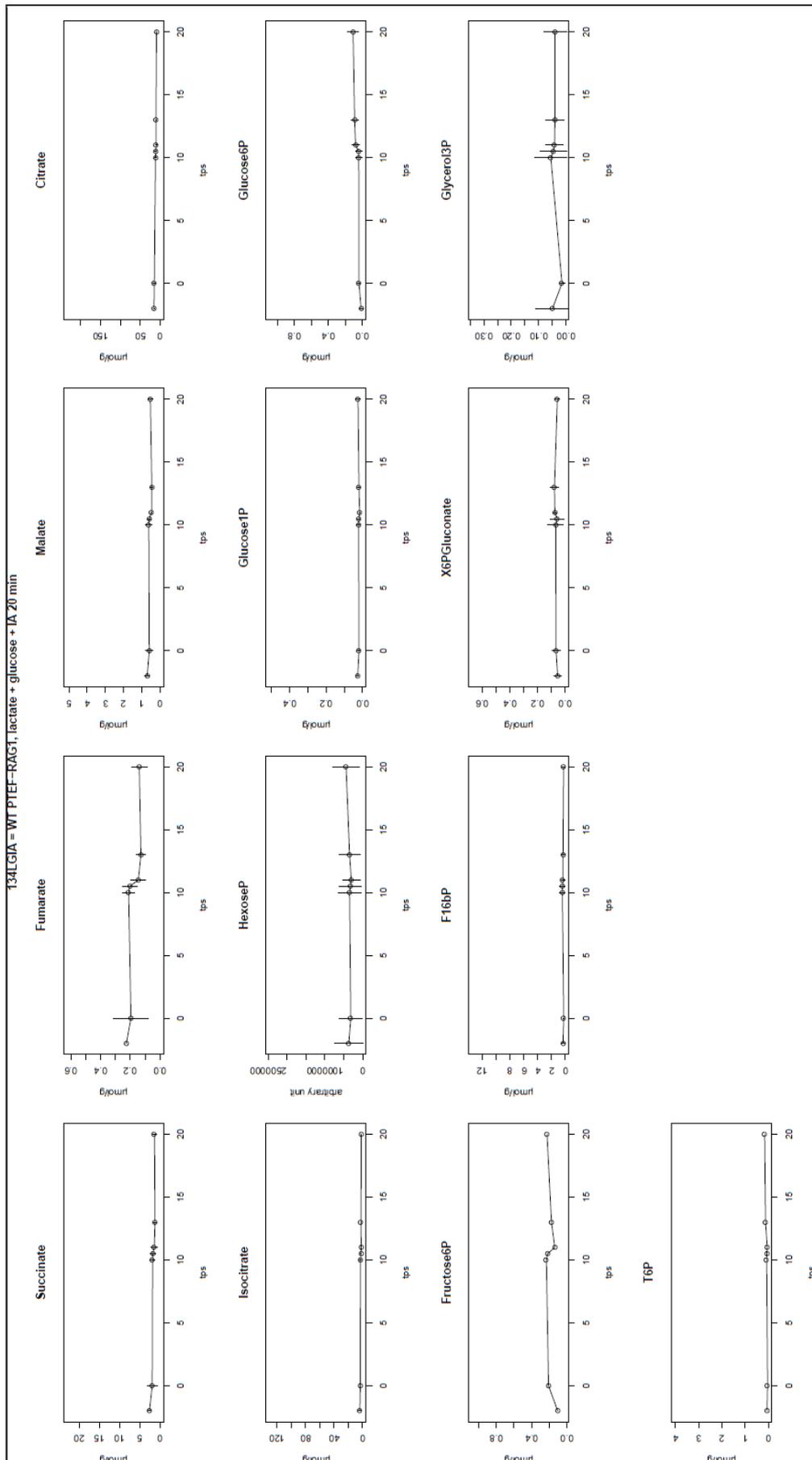


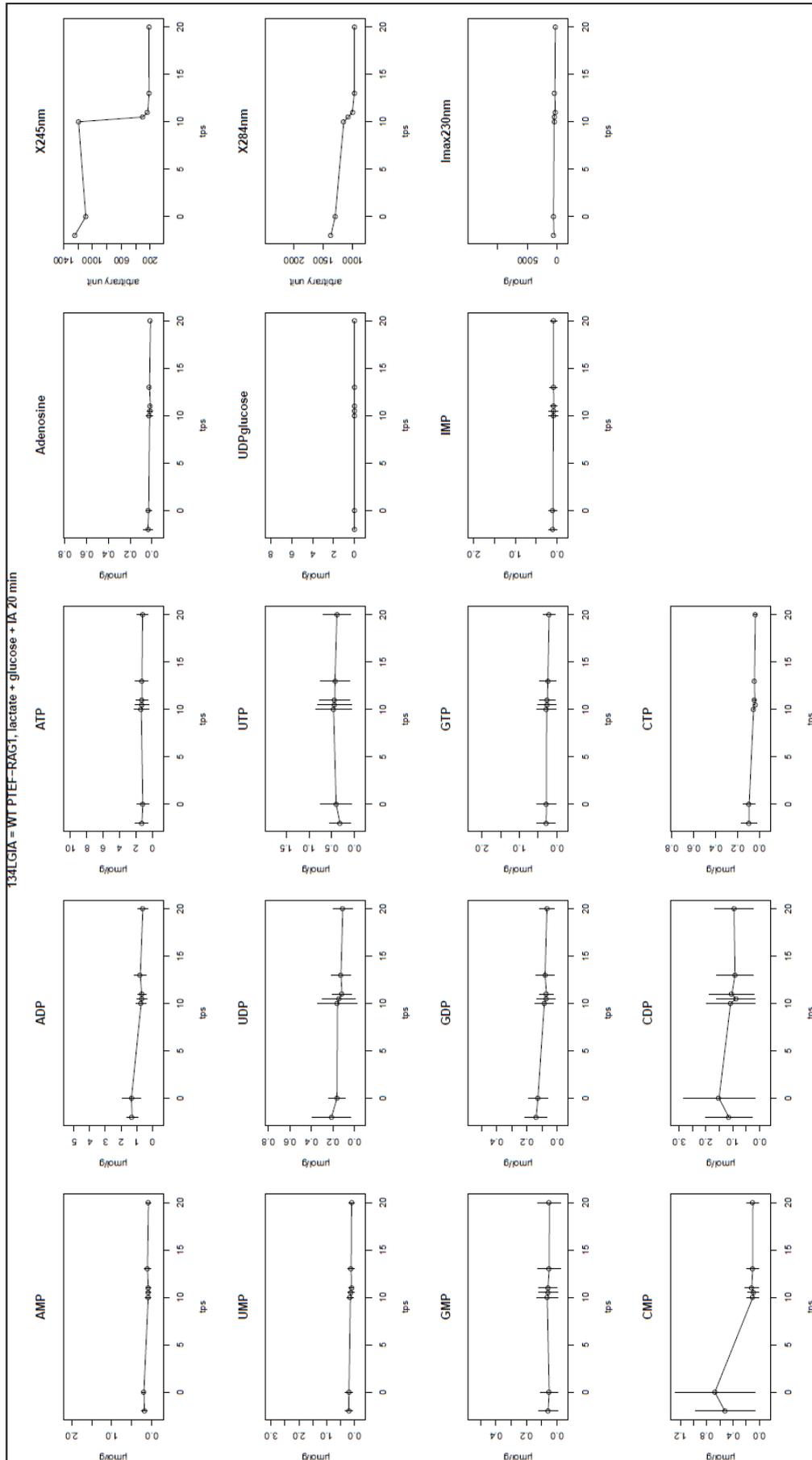


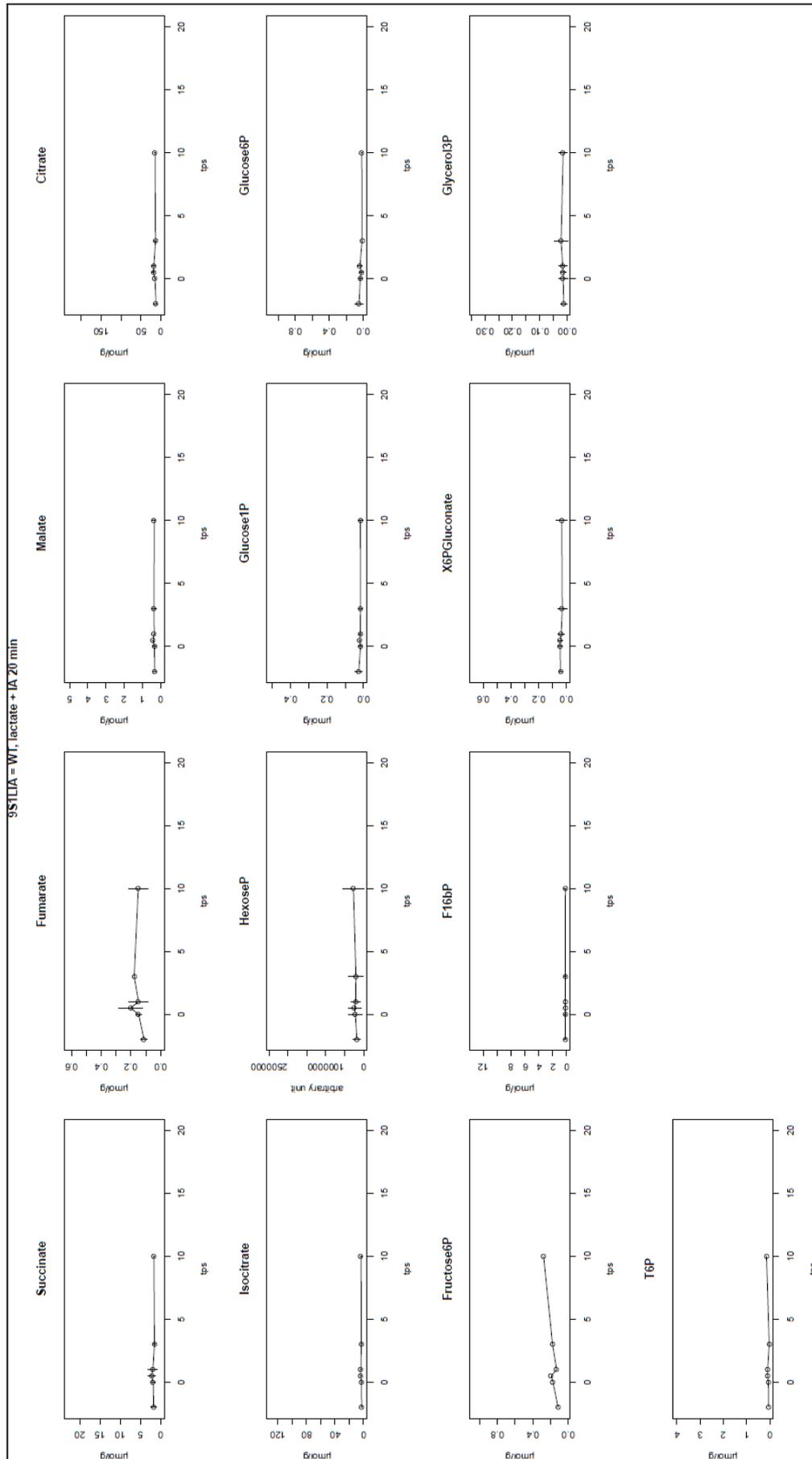


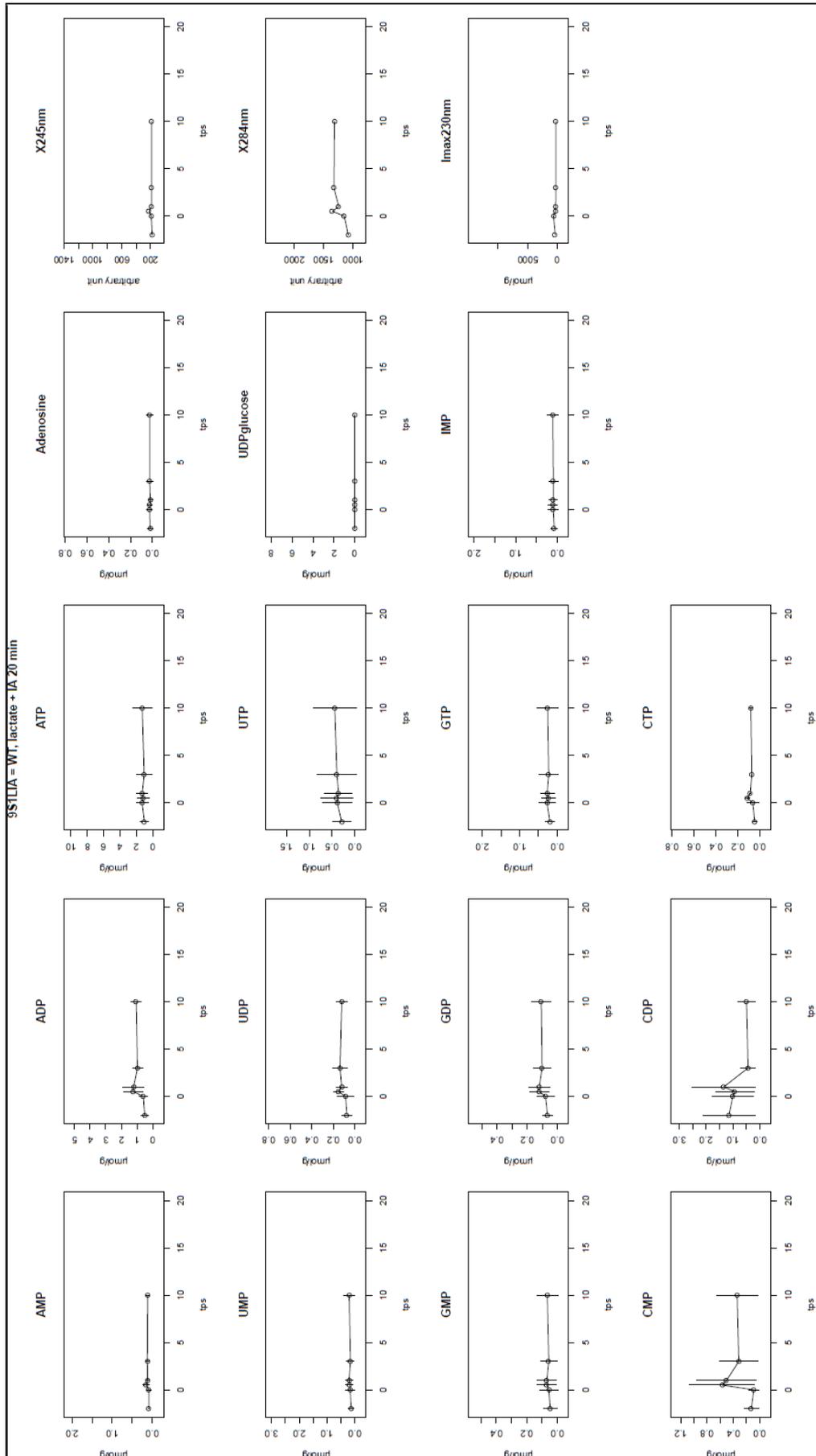


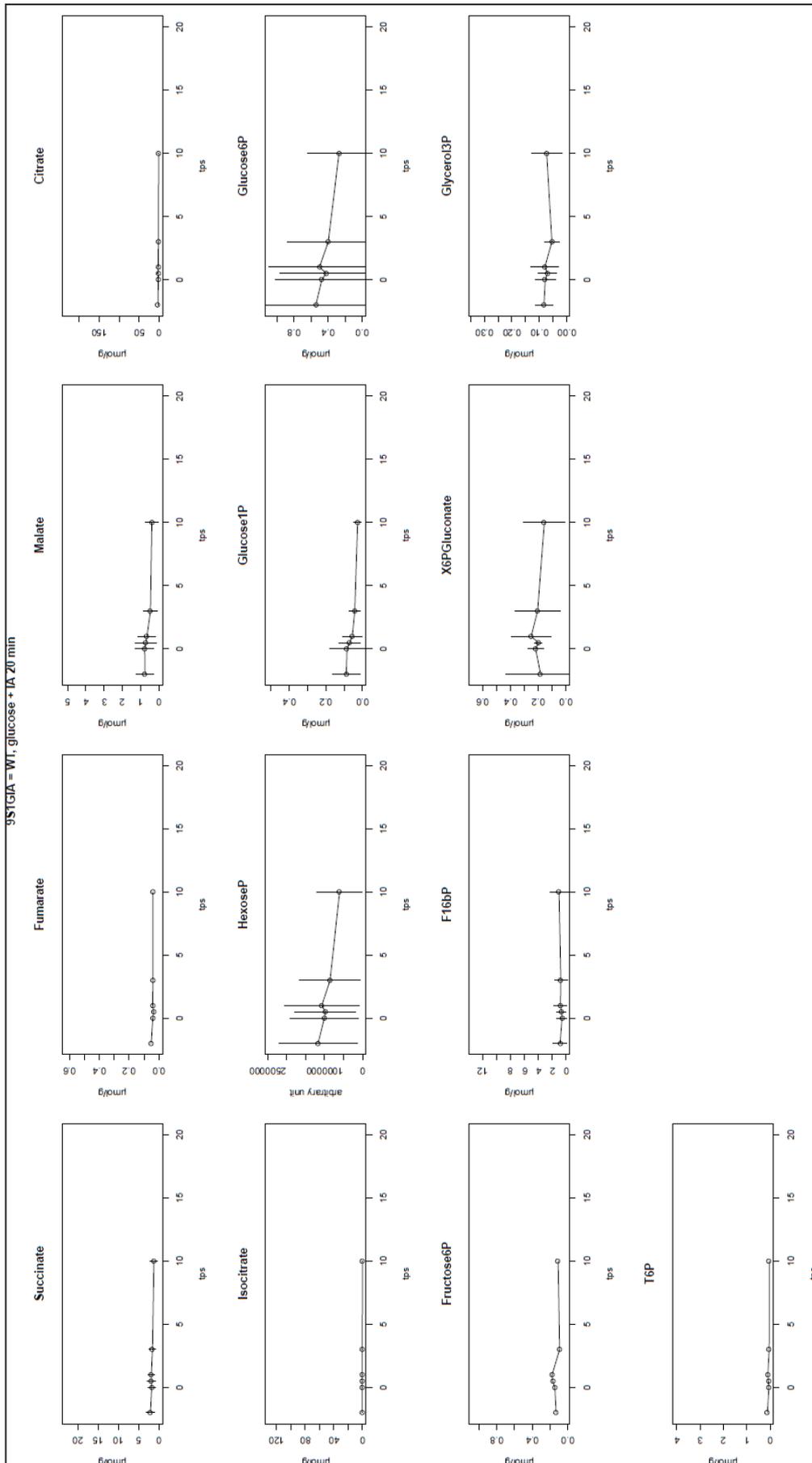












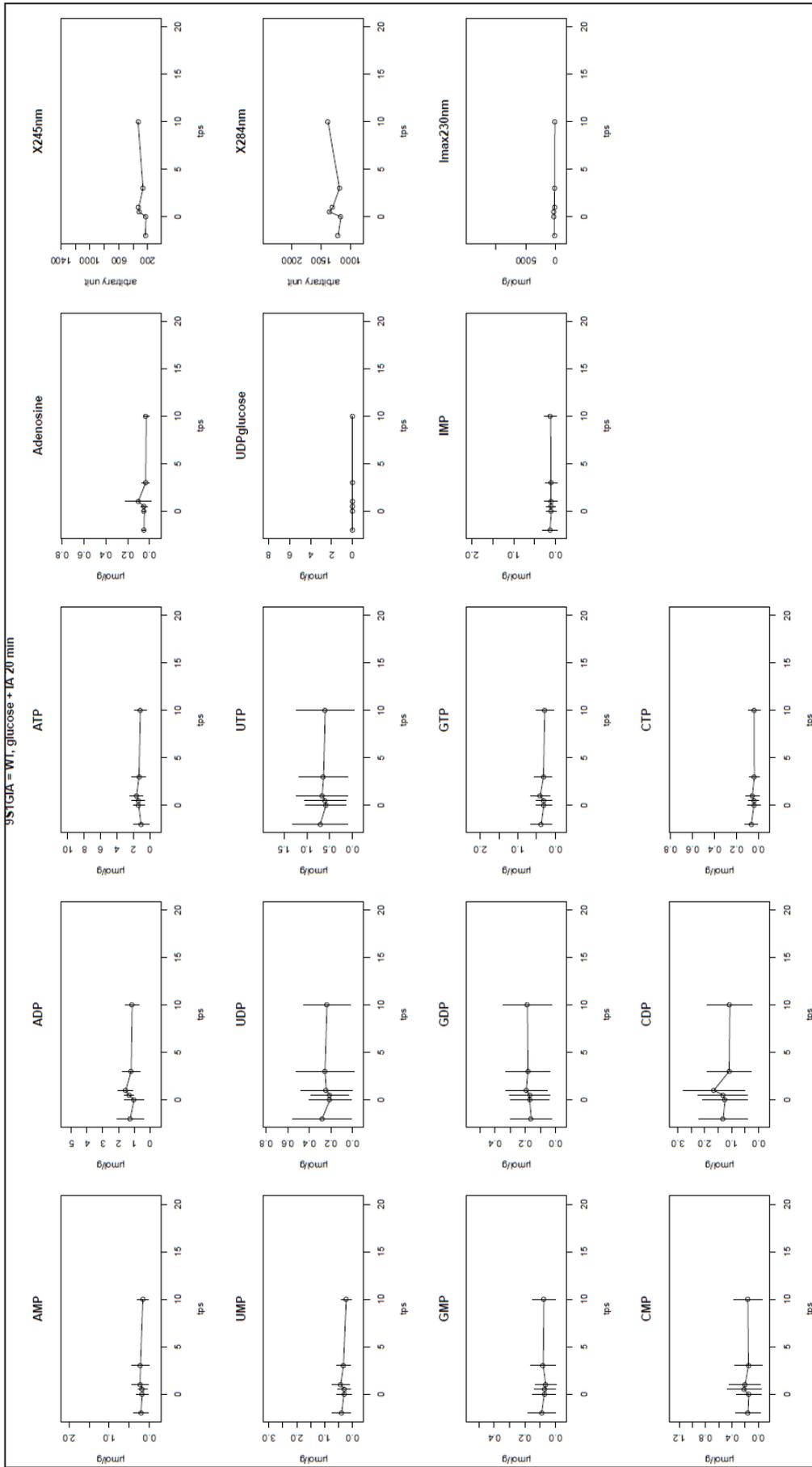


Tableau 18: Souches de levures *K. lactis* et *S. cerevisiae* utilisées. Pour *K. lactis*, les souches en bleu clair sont des dérivés par étiquetage direct de MW270-7B, les souches en gris sont issues de croisement et dissection et les souches en vert sont des dérivés par étiquetage direct de MWL9S1. Pour les souches utilisées dans la Publication, se référer au tableau de souche inclus de la Publication (page 111).

Souche	Génotype	Source
<i>K. lactis</i>		
MW270-7B	<i>MATa leu2 metA1-1 uraA1-1</i>	(Billard et al., 1996)
MWK3	isogénique à MW270-7B sauf <i>KlenoΔ1::KanMX4</i>	(Lemaire and Wésolowski-Louvel, 2004)
MWK7	isogénique à MW270-7B sauf <i>Klrgt1Δ1::URA3</i>	(Rolland et al., 2006)
MWK8	isogénique à MW270-7B sauf <i>rag4Δ1::URA3</i>	(Betina et al., 2001)
MWK11/F1	isogénique à MW270-7B sauf <i>KlhkΔ2::ura3</i>	Collection du laboratoire
MWK12	<i>MATa ade2-1 uraA1-1 rag2Δ1::URA3 (KlpgiΔ1)</i>	(Goffrini et al., 1991)
MWL1118	<i>MATa lysA1 trp1 uraA1 KIRGT1-3HA::KanMX4 KlhkΔ2::ura3</i>	Collection du laboratoire
MLK203	<i>MATα trp1 uraA1 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4</i>	Ce travail
MLK227	<i>MATα leu2 uraA1 KlhkΔ2::ura3 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4</i>	Ce travail
MLK265	<i>MATα leu2 lysA1-1 metA1-1 uraA1-1 KlhkΔ2::ura3 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4 SMS1-13MYC::KanMX6</i>	Ce travail
MLK266	<i>MATα leu2 trp(1) uraA1-1 KlhkΔ2::ura3 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4 SMS1-13MYC::KanMX6</i>	Ce travail
MLK268	<i>MATa leu2 lysA1-1 uraA1-1 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4 SMS1-13MYC::KanMX6 ΔKlnej1::loxP</i>	Ce travail
MLK274	<i>MATα trp(1) uraA1-1 KlhkΔ2::ura3 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4 KIRGT1-3HA::KanMX4</i>	Ce travail
MLK276	<i>MATa uraA1-1 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4 KIRGT1-3HA::KanMX4</i>	Ce travail
KIAS10	<i>MAT? RGT1-3HA::KanMX4 RAG5-GFP::KanMX4 ade2-1 nej1::loxP</i>	Ce travail
KIAS26	<i>MATα SMS1-13MYC::KanMX4 KlhkΔ2::URA3 uraA1-1 leu2 trp1 lysA1</i>	Ce travail
KIAS29	<i>MATα SMS1-13MYC::KanMX4 uraA1-1</i>	Ce travail
KIAS90	<i>MAT? leu2 trp1 uraA1-1 RAG1-GFP::KanMX4 KlhkΔ2::ura3</i>	Ce travail
MWL9S1	<i>MATa leu2 lys A1-1 metA1-1 trp1 uraA1-1 lac4-8 ΔKlnej1::loxP</i>	(Wésolowski-Louvel, 2011)
MWL1099	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KIRGT1-3HA::KanMX4</i>	Collection du laboratoire
MLK190	isogénique à MWL9S1 sauf <i>RAG4-3HA::KanMX6</i>	Collection du laboratoire
MLK191	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4</i>	Collection du laboratoire
MLK192	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4 (clone 2)</i>	Collection du laboratoire
MLK199	isogénique à MWL9S1 sauf <i>SMS1-13MYC::KanMX6</i>	Collection du laboratoire
MLK239	isogénique à MWL9S1 sauf <i>RAG4-TAP::KanMX4</i>	Collection du laboratoire
KIAS1	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KLHXK-GFP::KanMX4</i>	Ce travail
KIAS61	isogénique à MWL9S1 sauf <i>RAG1-GFP::KanMX4</i>	Ce travail

KIAS93	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX4::P_{ScGAL1}GFP-RAG8</i>	Ce travail
KIAS107	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX4::P_{ScGAL1}GFP-RAG4</i>	Ce travail
KIAS109	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX4::P_{ScGAL1}GFP-RAG4</i>	Ce travail
KIAS113	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX4::P_{ScGAL1}GFP-RAG8</i>	Ce travail
ACRK85	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K40R}</i>	Ce travail
ACRK86	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K687R-K690R}</i>	Ce travail
ACRK87	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{Δ659-686}</i>	Ce travail
ACRK88	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{Δ659-686} (clone 2)</i>	Ce travail
ACRK94	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K723R-K775R}</i>	Ce travail
ACRK95	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::KanMX6</i>	Ce travail
ACRK97	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2</i>	Ce travail
ACRK101	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 RAG4-TAP::KanMX4</i>	Ce travail
ACRK106	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-RAG4</i>	Ce travail
ACRK107	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K40R}</i>	Ce travail
ACRK108	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K687R-K690R}</i>	Ce travail
ACRK109	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{Δ659-686}</i>	Ce travail
ACRK110	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4^{K723R-K775R}</i>	Ce travail
ACRK118	isogénique à MWL9S1 sauf <i>rag4¹⁻⁶⁸⁶-URA3-3HA::KanMX6</i>	Ce travail
ACRK123	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4¹⁻⁶⁸⁶-URA3</i>	Ce travail
ACRK125	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}3HA-rag4¹⁻⁷²⁶-URA3</i>	Ce travail
ACRK128	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlrgt1::NatNT2</i>	Ce travail
ACRK130	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKleno::NatNT2</i>	Ce travail
ACRK132	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGAL1}RAG1</i>	Ce travail
ACRK133	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScGPD}RAG1</i>	Ce travail
ACRK134	isogénique à MWL9S1 sauf <i>KanMX6::P_{ScTEF1}RAG1</i>	Ce travail
ACRK135	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX6::P_{ScGPD}RAG1</i>	Ce travail
ACRK136	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 KanMX6::P_{ScTEF1}RAG1</i>	Ce travail
ACRK139	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKleno::NatNT2 KanMX6::P_{ScTEF1}RAG1</i>	Ce travail
ACRK162	isogénique à MWL9S1 sauf <i>rag4¹⁻⁵³⁸-TAP::KanMX6</i>	Ce travail
ACRK163	isogénique à MWL9S1 sauf <i>rag4¹⁻⁵³⁸-TAP::KanMX6 (clone 2)</i>	Ce travail
ACRK164	isogénique à MWL9S1 sauf <i>ΔKlhxk::NatNT2 rag4¹⁻⁵³⁸-TAP::KanMX6</i>	Ce travail
<i>S. cerevisiae</i>		
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>	EUROSCARF
γAS233	isogénique à BY4742 sauf <i>HXT1-GFP::KanMX4</i>	Ce travail
γAS248	<i>MATα ade2-1 his3 leu2,112 trp1Δ2 ura3 eno1::KanMX4 eno2::HIS3 RGT1-6HA::NatNT2</i>	Ce travail

Solutions diverses utilisées en biochimie des protéines

Cocktail d'inhibiteurs de protéases

La recette suivante est utilisée pour constituer un stock cent fois concentré (100x):

benzamidine 2 mM, TLCK (tosyllysine chloromethyl ketone) 28 μ M, TPCK (tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone) 24 μ M, leupeptine 4 μ M, pepstatine 3 μ M, aprotinine 0,384 μ M (2,5 μ g/ml), PMSF 1 mM et EDTA 5 mM.

Tampon de Laemmli

La recette suivante est utilisée pour constituer un stock dix fois concentré (5x):

Tris-Cl pH 6,8 0,3 M, bleu de bromophénol 0,05 % (w/v), glycérol 50%, SDS 10 % (w/v) et β -mercaptoéthanol 25% (v/v).

Solution de coloration au rouge Ponceau:

Ponceau S 0,1 % (w/v) et acide acétique 5 % (v/v).

Coloration au bleu de Coomassie:

Le gel est incubé sous agitation au moins 30 minutes avec la solution de coloration. Ensuite, il est rincé et incubé sous agitation plusieurs heures avec la solution de décoloration, qui doit être changée régulièrement.

Pour un litre de solution de coloration au Bleu de Coomassie :

2,5 g de bleu de Coomassie, 455 ml de méthanol ou d'éthanol, 455 ml d'eau distillée et déionisée (ddH₂O) et 90 ml d'acide acétique.

Pour un litre de solution de décoloration après coloration au Bleu de Coomassie :

200 ml de méthanol, 100 ml d'acide acétique et 700 ml d'eau distillée et déionisée (ddH₂O).

VII. Communications

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet de communications lors de congrès nationaux et internationaux.

Ils ont été présentés oralement lors du « 26th International Conference of Yeast Genetics and Molecular Biology », Goethe University à Francfort sur le Main, Allemagne, du 29 août au 3 septembre 2013 dans une présentation intitulée « Glycolysis controls glucose signaling by targeting the glucose sensor Rag4 in *Kluyveromyces lactis* ». Une présentation portant le même titre a également été réalisée au symposium satellite sur *Kluyveromyces lactis*.

Des communications par affiche ont été présentées dans des congrès nationaux et internationaux :

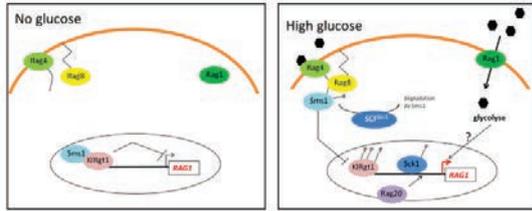
- 10^{ème} rencontre des levuristes francophones : colloque « Levures, modèles et outils » qui a eu lieu du 2 au 4 avril 2012 à Toulouse. Titre du poster : « La glycolyse contrôle la signalisation du glucose chez la levure *Kluyveromyces lactis* »
- 26th International Conference of Yeast Genetics and Molecular Biology », Goethe University à Francfort sur le Main, Allemagne, du 29 août au 3 septembre 2013. Titre du poster : « Glycolysis controls glucose signaling by targeting the glucose sensor Rag4 in *Kluyveromyces lactis* »
- Symposium satellite sur *Kluyveromyces lactis* à la 26th International Conference of Yeast Genetics and Molecular Biology », Goethe University à Francfort sur le Main, Allemagne, du 29 août au 3 septembre 2013. Titre du poster : « Glycolysis controls glucose signaling by targeting the glucose sensor Rag4 in *Kluyveromyces lactis* »

La glycolyse contrôle la signalisation du glucose chez la levure *Kluyveromyces lactis*

Amélie Cairey-Remonay, Alexandre Soulard, Julien Deffaud, Micheline Wésolowski-Louvel, Marc Lemaire
Génétique Moléculaire des Levures, UMR 5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie, Université Claude Bernard Lyon 1, 69622 Villeurbanne Cedex, France
amelie.cairey-remonay@etu.univ-lyon1.fr



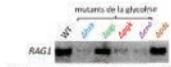
Modèle de la signalisation glucose chez *K. lactis*



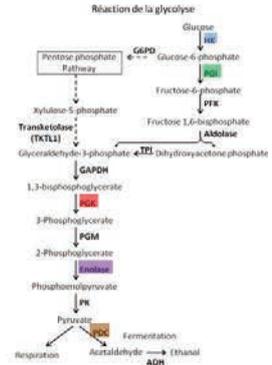
La signalisation du glucose est un processus essentiel permettant aux cellules de s'adapter rapidement à leur environnement en assurant l'entrée et l'utilisation optimale du glucose. La levure *Kluyveromyces lactis* présente un système de transport du glucose simplifié: les perméases de glucose, de haute et de basse affinité, sont codées par des gènes uniques. Le gène *RAG1* (perméase de faible affinité) est inducible par de fortes concentrations de glucose et réprimé par le répresseur *K/Rgt1* en absence de glucose. L'activité du répresseur *K/Rgt1* nécessite son association avec le facteur *Sms1*. La régulation de *RAG1* dépend de la détection du glucose extracellulaire par un senseur membranaire unique, *Rag4*. Ce senseur assure la transmission d'un signal glucose dans la cellule dont la propagation aboutit à la dégradation de *Sms1*, puis à la phosphorylation et l'inactivation du répresseur *K/Rgt1* (1). Une fois *Sms1* dégradé en présence de glucose, la répression du gène de perméase *RAG1* est levée et l'activateur transcriptionnel *Sck1* optimise l'expression de *RAG1* (2). Le facteur *Rag20*, similaire à *Snf2* de *S. cerevisiae*, est un facteur de remodelage de la chromatine nécessaire à l'expression de *RAG1* (Poster 40).

En présence de glucose, l'expression du gène *RAG1* nécessite une glycolyse fonctionnelle

Chez divers mutants de la glycolyse (*hxk*, *pgk*, *eno*), le gène de la perméase *RAG1* n'est pas exprimé en présence de glucose, suggérant l'existence d'un signal intracellulaire issu du métabolisme du glucose (3). Pour comprendre le contrôle de la glycolyse sur l'expression de *RAG1*, nous étudions les régulateurs du gène *RAG1* (*Sms1*, *K/Rgt1*) dans des cellules où la glycolyse est altérée par l'utilisation de mutants nuls (des gènes d'hexokinase ou d'énolase).



Analyse par Northern blot de l'expression du gène de la perméase du glucose *RAG1* chez différents mutants de la glycolyse.



Quels sont les facteurs de la signalisation glucose régulés par la glycolyse?

Analyse transcriptionnelle des régulateurs de *RAG1*



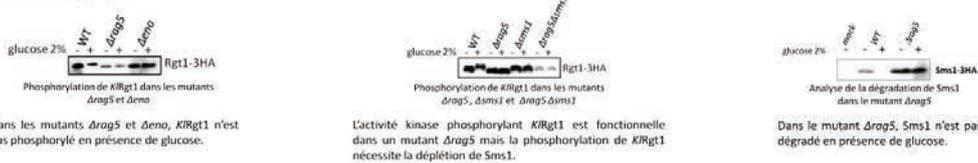
Analyse par Northern blot de l'expression de gènes régulateurs de *RAG1* dans les mutants de la glycolyse

L'expression du gène du senseur *Rag4* et de *K/Rgt1* est faiblement affectée par une glycolyse non-fonctionnelle. En revanche, l'expression de *SCK1* et *SMS1* est très fortement affectée dans les différents mutants de la glycolyse testés, comme celle de *RAG1*. Ces 3 gènes sont régulés par le répresseur *K/Rgt1* (1).

La glycolyse contrôle l'activité du répresseur *K/Rgt1*?

Analyse post-traductionnelle de *K/Rgt1* et *Sms1*

Lorsque *Sms1* est dégradé en présence de glucose, l'activité répresseur de *K/Rgt1* est régulée et inactivée par phosphorylation (1). Les régulateurs *K/Rgt1* et *Sms1* ont été analysés par Western-blot dans des mutants de la glycolyse.

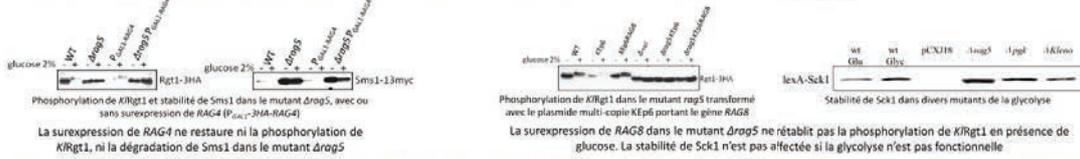


En présence de glucose, le répresseur *K/Rgt1* n'est pas inactivé par phosphorylation quand la glycolyse n'est pas fonctionnelle. Ce défaut de phosphorylation n'est pas lié à une absence d'activité(s) kinase mais à l'absence de dégradation du co-répresseur *Sms1*. Ces résultats expliquent les effets transcriptionnels d'un défaut de la glycolyse.

La glycolyse contrôle la stabilité de *Sms1*. En amont de la signalisation glucose au niveau du senseur *Rag4* ou de la kinase *Rag8*?

Glycolyse et étapes précoces de la signalisation glucose

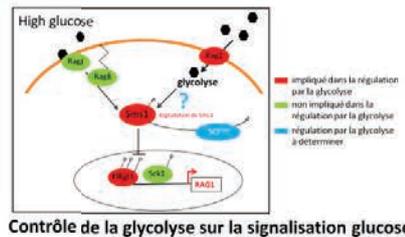
Le senseur *Rag4* et la kinase *Rag8* sont des facteurs membranaires initiant la voie de signalisation du glucose. L'activité kinase *Rag8* est aussi nécessaire à la stabilité de l'activateur *Sck1* (2). Un défaut d'expression/activité de l'un de ces facteurs peut expliquer l'absence de dégradation de *Sms1* dans un mutant glycolytique. Nous avons testé i) si une surexpression des gènes *RAG4* ou *RAG8* pouvait contrecarrer les effets de la glycolyse sur la phosphorylation de *K/Rgt1* et la stabilité de *Sms1* ii) la stabilité d'une fusion *LexA-Sck1* dans un mutant glycolytique.



La surexpression de *RAG4* ne restaure ni la phosphorylation de *K/Rgt1*, ni la dégradation de *Sms1* dans le mutant *Δrag5*. Les 1^{ères} étapes de la signalisation glucose ne semblent pas affectées dans un mutant de la glycolyse. L'absence de dégradation de *Sms1* n'est pas due à un défaut d'expression des gènes *RAG4* et *RAG8*, ni à un défaut d'activité de la kinase *Rag8*, quand la glycolyse n'est pas fonctionnelle.

La glycolyse contrôle la signalisation glucose en ciblant la stabilité de *Sms1* par un mécanisme inconnu.

Le co-répresseur *Sms1* est la pierre angulaire de la signalisation glucose chez *K. lactis* car de sa dégradation en présence de glucose dépend le déblocage du verrou transcriptionnel opéré par le répresseur *K/Rgt1*. La dégradation de *Sms1* est induite par la détection du glucose extracellulaire par le senseur membranaire *Rag4* (1) mais nos résultats montrent que la stabilité de *Sms1* est aussi contrôlée par un signal intracellulaire provenant de la glycolyse. Cependant, ni la nature de ce signal intracellulaire, ni les acteurs influencés par ce signal ne sont encore connus. Des tests d'inhibiteurs chimiques de la glycolyse sont en cours pour valider les résultats obtenus par la dérégulation génétique de la glycolyse. Ces outils seront utiles pour déterminer le signal provenant de la glycolyse et les acteurs impliqués dans cette régulation inédite.



Contrôle de la glycolyse sur la signalisation glucose

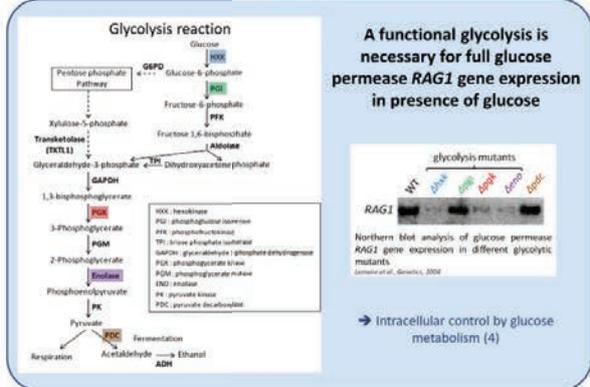
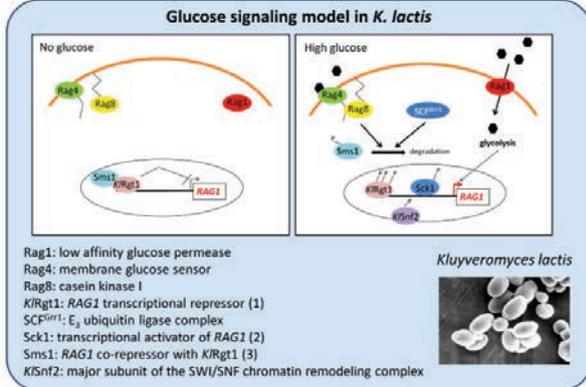
(1) Hnatova M. et al., 2008, *Eukaryot. Cell* 7: 1299-1308

(2) Neil H. et al., 2007, *Mol. Microbiol.* 63: 1537-1548

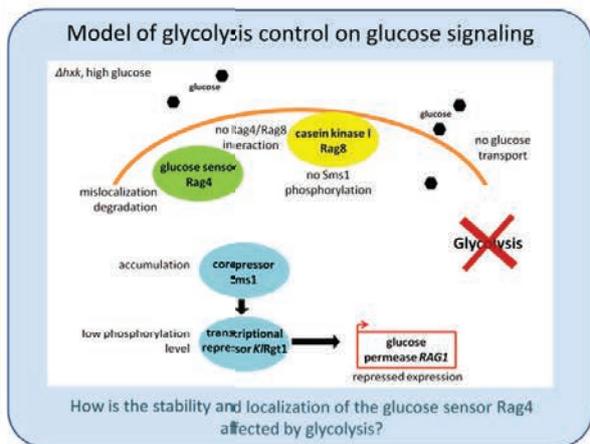
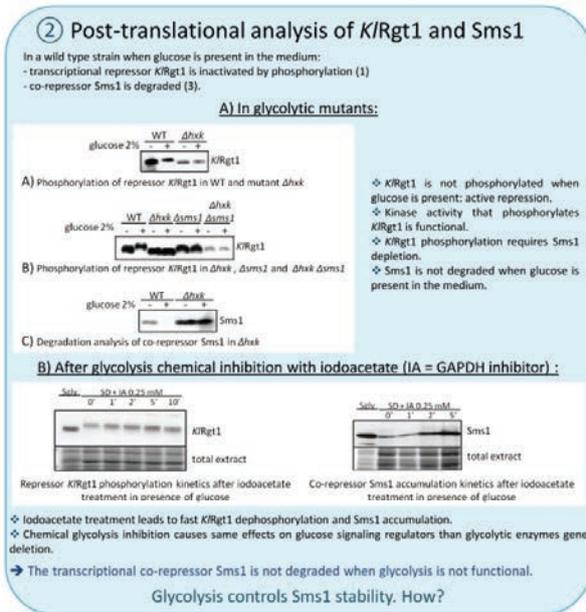
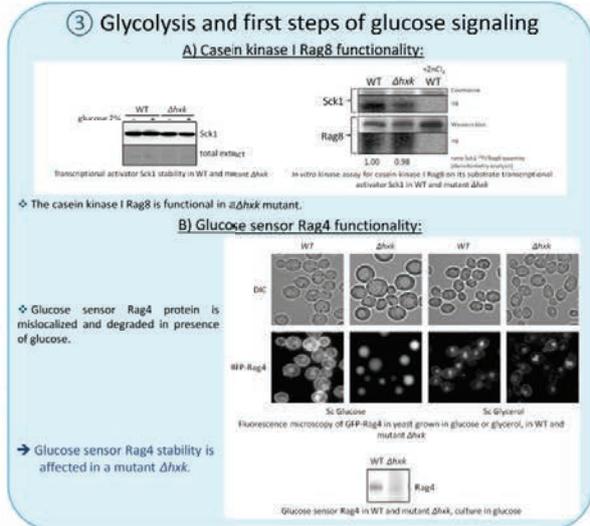
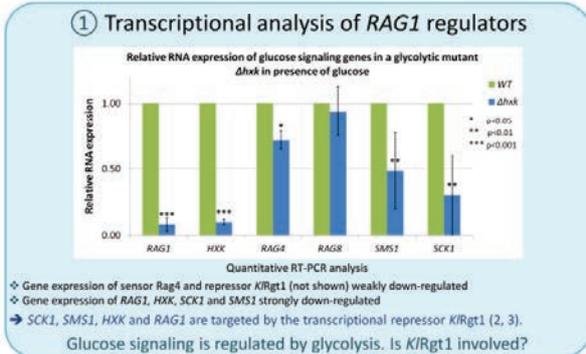
(3) Lemaire M. and Wésolowski-Louvel, 2004, *Genetics* 168: 723-31

Glycolysis controls glucose signaling by targeting the glucose sensor Rag4 in *Kluyveromyces lactis*

Amélie Cairey-Remonnay, Alexandre Soulard, Julien Deffaud, Micheline Wésolowski-Louvel, Marc Lemaire
Génétique Moléculaire des Levures, UMR 5240 Microbiologie Adaptation et Pathogénie, Université Claude Bernard Lyon 1
69622 Villeurbanne Cedex, France - amelie.cairey-remonnay@etu.univ-lyon1.fr



Is glucose signaling regulated by glycolysis? If yes, what are the targets?



Glycolysis affects glucose signaling by targeting stability and localization of the glucose sensor Rag4.

[1] Rolland S. et al., 2006, *Genetics* 174: 617-626 [2] Neil H. et al., 2007, *Mol. Microbiol.* 63: 1537-1548 [3] Hnatova M. et al., 2008, *Eukaryot. Cell* 7: 1299-1308 [4] Lemaire M. and Wésolowski-Louvel, 2004, *Genetics* 168: 723-31

VIII. Références

- Ahuatzi, D., Herrero, P., Cera, T. de la, Moreno, F., 2004. The Glucose-regulated Nuclear Localization of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* 279, 14440–14446. doi:10.1074/jbc.M313431200
- Ahuatzi, D., Riera, A., Pelaez, R., Herrero, P., Moreno, F., 2006. Hxk2 Regulates the Phosphorylation State of Mig1 and Therefore Its Nucleocytoplasmic Distribution. *J. Biol. Chem.* 282, 4485–4493. doi:10.1074/jbc.M606854200
- Amigoni, L., Martegani, E., Colombo, S., 2013. Lack of *HXK2* Induces Localization of Active Ras in Mitochondria and Triggers Apoptosis in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2013, 1–10. doi:10.1155/2013/678473
- Amodeo, G.A., Momcilovic, M., Carlson, M., Tong, L., 2010. Biochemical and functional studies on the regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* AMPK homolog SNF1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 397, 197–201. doi:10.1016/j.bbrc.2010.05.083
- An, S., Kumar, R., Sheets, E.D., Benkovic, S.J., 2008. Reversible Compartmentalization of *de Novo* Purine Biosynthetic Complexes in Living Cells. *Science* 320, 103–106. doi:10.1126/science.1152241
- Araiza-Olivera, D., Chiquete-Felix, N., Rosas-Lemus, M., Sampedro, J.G., Peña, A., Mujica, A., Uribe-Carvajal, S., 2013. A glycolytic metabolite in *Saccharomyces cerevisiae* is stabilized by F-actin. *FEBS J.* 280, 3887–3905. doi:10.1111/febs.12387
- Araiza-Olivera, D., Sampedro, J.G., Mujica, A., Peña, A., Uribe-Carvajal, S., 2010. The association of glycolytic enzymes from yeast confers resistance against inhibition by trehalose. *FEMS Yeast Res.* 10, 282–289. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00605.x
- Arbuckle, M.I., Kane, S., Porter, L.M., Seatter, M.J., Gould, G.W., 1996. Structure–Function Analysis of Liver-Type (GLUT2) and Brain-Type (GLUT3) Glucose Transporters: Expression of Chimeric Transporters in *Xenopus* Oocytes Suggests an Important Role for Putative Transmembrane Helix 7 in Determining Substrate Selectivity. *Biochemistry (Mosc.)* 35, 16519–16527. doi:10.1021/bi962210n
- Babu, P., Bryan, J.D., Panek, H.R., Jordan, S.L., Forbrich, B.M., Kelley, S.C., Colvin, R.T., Robinson, L.C., 2002. Plasma membrane localization of the Yck2p yeast casein kinase 1 isoform requires the C-terminal extension and secretory pathway function. *J. Cell Sci.* 115, 4957–4968. doi:10.1242/jcs.00203
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J.W., Elledge, S.J., 1996. *SKP1* Connects Cell Cycle Regulators to the Ubiquitin Proteolysis Machinery through a Novel Motif, the F-Box. *Cell* 86, 263–274. doi:10.1016/S0092-8674(00)80098-7
- Bao, W.-G., Guiard, B., Fang, Z.-A., Donnini, C., Gervais, M., Passos, F.M.L., Ferrero, I., Fukuhara, H., Bolotin-Fukuhara, M., 2008. Oxygen-dependent transcriptional regulator Hap1p limits glucose uptake by repressing the expression of the major glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* 7, 1895–1905.
- Bär, D., Golbik, R., Hübner, G., Lilie, H., Müller, E.-C., Naumann, M., Otto, A., Reuter, R., Breunig, K.D., Kriegel, T.M., 2003. The Unique Hexokinase of *Kluyveromyces lactis*: molecular and functional characterization and evaluation of a role in glucose signaling. *J. Biol. Chem.* 278, 39280–39286. doi:10.1074/jbc.M305706200
- Barnard, J.P., Reynafarje, B., Pedersen, P.L., 1993. Glucose catabolism in African trypanosomes. Evidence that the terminal step is catalyzed by a pyruvate transporter capable of facilitating uptake of toxic analogs. *J. Biol. Chem.* 268, 3654–3661.
- Barsoum, E., Rajaei, N., Åström, S.U., 2011. RAS/Cyclic AMP and Transcription Factor Msn2 Regulate Mating and Mating-Type Switching in the Yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* 10, 1545–1552. doi:10.1128/EC.05158-11
- Baruffini, E., Goffrini, P., Donnini, C., Lodi, T., 2006. Galactose transport in *Kluyveromyces lactis*: major role of the glucose permease Hgt1. *FEMS Yeast Res.* 6, 1235–1242. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00107.x
- Behlke, J., Heidrich, K., Naumann, M., Müller, E.-C., Otto, A., Reuter, R., Kriegel, T., 1998. Hexokinase 2 from *Saccharomyces cerevisiae*: Regulation of Oligomeric Structure by *in Vivo* Phosphorylation at Serine-14. *Biochemistry (Mosc.)* 37, 11989–11995. doi:10.1021/bi980914m
- Belinchón, M.M., Gancedo, J.M., 2007a. Glucose controls multiple processes in *Saccharomyces cerevisiae* through diverse combinations of signaling pathways. *FEMS Yeast Res.* 7, 808–818.
- Belinchón, M.M., Gancedo, J.M., 2007b. Different signalling pathways mediate glucose induction of *SUC2*, *HXT1* and pyruvate decarboxylase in yeast. *FEMS Yeast Res.* 7, 40–47. doi:10.1111/j.1567-1364.2006.00136.x
- Benanti, J.A., Cheung, S.K., Brady, M.C., Toczyski, D.P., 2007. A proteomic screen reveals SCF^{Grr1} targets that regulate the glycolytic–gluconeogenic switch. *Nat. Cell Biol.* 9, 1184–1191. doi:10.1038/ncb1639
- Bergandi, L., Aina, V., Garetto, S., Malavasi, G., Aldieri, E., Laurenti, E., Matera, L., Morterra, C., Ghigo, D., 2010. Fluoride-containing bioactive glasses inhibit pentose phosphate oxidative pathway and glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in human osteoblasts. *Chem. Biol. Interact.* 183, 405–415. doi:10.1016/j.cbi.2009.11.021
- Betina, S., Goffrini, P., Ferrero, I., Wésolowski-Louvel, M., 2001. *RAG4* gene encodes a glucose sensor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 158, 541–548.
- Bharucha, N., Ma, J., Dobry, C.J., Lawson, S.K., Yang, Z., Kumar, A., 2008. Analysis of the Yeast Kinome Reveals a Network of Regulated Protein Localization during Filamentous Growth. *Mol. Biol. Cell* 19, 2708–2717. doi:10.1091/mbc.E07-11-1199
- Bianchi, M.M., Tizzani, L., Destruelle, M., Frontali, L., Wésolowski-Louvel, M., 1996. The “petite-negative” yeast *Kluyveromyces lactis* has a single gene expressing

- pyruvate decarboxylase activity. *Mol. Microbiol.* 19, 27–36. doi:10.1046/j.1365-2958.1996.346875.x
- Billard, P., Ménart, S., Blaisonneau, J., Bolotin-Fukuhara, M., Fukuhara, H., Wésolowski-Louvel, M., 1996. Glucose uptake in *Kluyveromyces lactis*: role of the *HGT1* gene in glucose transport. *J. Bacteriol.* 178, 5860–5866.
- Blaisonneau, J., Fukuhara, H., Wésolowski-Louvel, M., 1997. The *Kluyveromyces lactis* equivalent of casein kinase I is required for the transcription of the gene encoding the low-affinity glucose permease. *Mol. Gen. Genet.* 253, 469–477.
- Blázquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., Gancedo, J.M., 1993. Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett.* 329, 51–54. doi:10.1016/0014-5793(93)80191-V
- Blondel, M., Bach, S., Bamps, S., Dobbelaere, J., Wiget, P., Longaretti, C., Barral, Y., Meijer, L., Peter, M., 2005. Degradation of Hof1 by SCF^{Grr1} is important for actomyosin contraction during cytokinesis in yeast. *EMBO J.* 24, 1440–1452. doi:10.1038/sj.emboj.7600627
- Bodenmiller, B., Wanka, S., Kraft, C., Urban, J., Campbell, D., Pedrioli, P.G., Gerrits, B., Picotti, P., Lam, H., Vitek, O., Brusniak, M.-Y., Roschitzki, B., Zhang, C., Shokat, K.M., Schlapbach, R., Colman-Lerner, A., Nolan, G.P., Nesvizhskii, A.I., Peter, M., Loewith, R., von Mering, C., Aebersold, R., 2010. Phosphoproteomic Analysis Reveals Interconnected System-Wide Responses to Perturbations of Kinases and Phosphatases in Yeast. *Sci. Signal.* 3, rs4. doi:10.1126/scisignal.2001182
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M.G., Caldeira, J., Albergaria, H., 2014. Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 843–853. doi:10.1007/s00253-013-5411-y
- Brandina, I., Smirnov, A., Kolesnikova, O., Entelis, N., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., Tarassov, I., 2007. tRNA import into yeast mitochondria is regulated by the ubiquitin-proteasome system. *FEBS Lett.* 581, 4248–4254. doi:10.1016/j.febslet.2007.08.013
- Breunig, K.D., Bolotin-Fukuhara, M., Bianchi, M.M., Bourgarel, D., Falcone, C., Ferrero, I., Frontali, L., Goffrini, P., Krijger, J.J., Mazzoni, C., Milkowski, C., Steensma, H.Y., Wésolowski-Louvel, M., Zeeman, A.M., 2000. Regulation of primary carbon metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 771–780. doi:10.1016/S0141-0229(00)00170-8
- Broach, J.R., 2012. Nutritional Control of Growth and Development in Yeast. *Genetics* 192, 73–105. doi:10.1534/genetics.111.135731
- Brown, J., 1962. Effects of 2-deoxyglucose on carbohydrate metabolism: review of the literature and studies in the rat. *Metabolism.* 11, 1098–1112.
- Brown, V., Sabina, J., Johnston, M., 2009. Specialized Sugar Sensing in Diverse Fungi. *Curr. Biol.* 19, 436–441. doi:10.1016/j.cub.2009.01.056
- Brown, V., Sexton, J.A., Johnston, M., 2006. A glucose sensor in *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 5, 1726–1737. doi:10.1128/EC.00186-06
- Busturia, A., Lagunas, R., 1986. Catabolite Inactivation of the Glucose Transport System in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 132, 379–385. doi:10.1099/00221287-132-2-379
- Butler, D.K., All, O., Goffena, J., Loveless, T., Wilson, T., Toenjes, K.A., 2006. The *GRR1* gene of *Candida albicans* is involved in the negative control of pseudohyphal morphogenesis. *Fungal Genet. Biol.* 43, 573–582. doi:10.1016/j.fgb.2006.03.004
- Cassart, J.-P., Georis, I., Östling, J., Ronne, H., Vandenhoute, J., 1995. The *MIG1* repressor from *Kluyveromyces lactis*: cloning, sequencing and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 371, 191–194.
- Celenza, J.L., Marshall-Carlson, L., Carlson, M., 1988. The yeast *SNF3* gene encodes a glucose transporter homologous to the mammalian protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 2130–2134.
- Chambers, A., Packham, E.A., Graham, I.R., 1995. Control of glycolytic gene expression in the budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Curr. Genet.* 29, 1–9. doi:10.1007/BF00313187
- Chan, A.Y., Swaminathan, R., Cockram, C.S., 1989. Effectiveness of sodium fluoride as a preservative of glucose in blood. *Clin. Chem.* 35, 315–317.
- Chan, C.-Y., Parra, K.J., 2014. Yeast Phosphofructokinase-1 Subunit Pfk2p Is Necessary for pH Homeostasis and Glucose-dependent Vacuolar ATPase Reassembly. *J. Biol. Chem.* 289, 19448–19457. doi:10.1074/jbc.M114.569855
- Chen, M., Lopes, J.M., 2007. Multiple Basic Helix-Loop-Helix Proteins Regulate Expression of the *ENO1* Gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 6, 786–796. doi:10.1128/EC.00383-06
- Chen, X.J., 1996. Low- and high-copy-number shuttle vectors for replication in the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 172, 131–136.
- Chen, X.J., Wésolowski-Louvel, M., Fukuhara, H., 1992. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. II. Transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1*. *Mol. Gen. Genet.* 233, 97–105.
- Chen, Y., Tye, B.K., 1995. The yeast Mcm1 protein is regulated posttranscriptionally by the flux of glycolysis. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4631–4639.
- Chen, Z., Zhang, H., Lu, W., Huang, P., 2009. Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1787, 553–560. doi:10.1016/j.bbabi.2009.03.003
- Cheong, J.K., Virshup, D.M., 2011. Casein kinase 1: Complexity in the family. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 465–469. doi:10.1016/j.biocel.2010.12.004
- Chesneau, L., Dupré, S., Burdina, A., Roger, J., Panse, S.L., Jacquet, M., Cuif, M.-H., 2004. Gyp5p and Gyl1p are

- involved in the control of polarized exocytosis in budding yeast. *J. Cell Sci.* 117, 4757–4767. doi:10.1242/jcs.01349
- Chi, M.M., Pusateri, M.E., Carter, J.G., Norris, B.J., McDougal, D.B., Lowry, O.H., 1987. Enzymatic assays for 2-deoxyglucose and 2-deoxyglucose 6-phosphate. *Anal. Biochem.* 161, 508–513.
- Cho, J.-I., Ryoo, N., Eom, J.-S., Lee, D.-W., Kim, H.-B., Jeong, S.-W., Lee, Y.-H., Kwon, Y.-K., Cho, M.-H., Bhoo, S.H., Hahn, T.-R., Park, Y.-I., Hwang, I., Sheen, J., Jeon, J.-S., 2009. Role of the Rice Hexokinases *OsHXK5* and *OsHXK6* as Glucose Sensors. *Plant Physiol.* 149, 745–759. doi:10.1104/pp.108.131227
- Cho, Y.-H., Yoo, S.-D., Sheen, J., 2006. Regulatory Functions of Nuclear Hexokinase 1 Complex in Glucose Signaling. *Cell* 127, 579–589. doi:10.1016/j.cell.2006.09.028
- Cialfi, S., Uccelletti, D., Carducci, A., Wésolowski-Louvel, M., Mancini, P., Heipieper, H.J., Saliola, M., 2011. *K/Hsl1* is a component of glycerol response pathways in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 157, 1509–1518. doi:10.1099/mic.0.044040-0
- Cieśla, M., Mierzejewska, J., Adamczyk, M., Farrant, A.-K.Ö., Boguta, M., 2014. Fructose bisphosphate aldolase is involved in the control of RNA polymerase III-directed transcription. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1843, 1103–1110. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.02.007
- Colombo, S., Ronchetti, D., Thevelein, J.M., Winderickx, J., Martegani, E., 2004. Activation State of the Ras2 Protein and Glucose-induced Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 46715–46722. doi:10.1074/jbc.M405136200
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H.N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., Thevelein, J.M., 2014. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 254–299. doi:10.1111/1574-6976.12065
- Coons, D.M., Vagnoli, P., Bisson, L.F., 1997. The C-terminal domain of Snf3p is sufficient to complement the growth defect of *snf3* null mutations in *Saccharomyces cerevisiae*: *SNF3* functions in glucose recognition. *Yeast* 13, 9–20. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199701)13:1<9::AID-YEA51>3.0.CO;2-U
- Cotton, P., Soulard, A., Wésolowski-Louvel, M., Lemaire, M., 2012. The SWI/SNF *K/Snf2* subunit controls the glucose signaling pathway to coordinate glycolysis and glucose transport in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* 11, 1382–1390. doi:10.1128/EC.00210-12
- Crabtree, H.G., 1935. The differential effect of radium radiation on the carbohydrate metabolism of normal and tumour tissues irradiated at low temperature. *Biochem. J.* 29, 2334–2343.
- Dale, S., Wilson, W.A., Edelman, A.M., Hardie, D.G., 1995. Similar substrate recognition motifs for mammalian AMP-activated protein kinase, higher plant HMG-CoA reductase kinase-A, yeast SNF1, and mammalian calmodulin-dependent protein kinase I. *FEBS Lett.* 361, 191–195. doi:10.1016/0014-5793(95)00172-6
- Daran-Lapujade, P., Jansen, M.L.A., Daran, J.-M., Gulik, W. van, Winde, J.H. de, Pronk, J.T., 2004. Role of Transcriptional Regulation in Controlling Fluxes in Central Carbon Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* - A chemostat culture study. *J. Biol. Chem.* 279, 9125–9138. doi:10.1074/jbc.M309578200
- Daran-Lapujade, P., Rossell, S., Gulik, W.M. van, Luttik, M.A.H., Groot, M.J.L. de, Slijper, M., Heck, A.J.R., Daran, J.-M., Winde, J.H. de, Westerhoff, H.V., Pronk, J.T., Bakker, B.M., 2007. The fluxes through glycolytic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* are predominantly regulated at posttranscriptional levels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 15753–15758. doi:10.1073/pnas.0707476104
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piškur, J., 2014. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Res.* 14, 826–832. doi:10.1111/1567-1364.12161
- Davie, J.K., Edmondson, D.G., Coco, C.B., Dent, S.Y.R., 2003. Tup1-Ssn6 Interacts with Multiple Class I Histone Deacetylases in Vivo. *J. Biol. Chem.* 278, 50158–50162. doi:10.1074/jbc.M309753200
- Dechant, R., Binda, M., Lee, S.S., Pelet, S., Winderickx, J., Peter, M., 2010. Cytosolic pH is a second messenger for glucose and regulates the PKA pathway through V-ATPase. *EMBO J.* 2515–2526.
- De la Cera, T., Herrero, P., Moreno-Herrero, F., Chaves, R.S., Moreno, F., 2002. Mediator Factor Med8p Interacts with the Hexokinase 2: Implication in the Glucose Signalling Pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.* 319, 703–714. doi:10.1016/S0022-2836(02)00377-7
- Delgado, M.L., Gil, M.L., Gozalbo, D., 2003. Starvation and temperature upshift cause an increase in the enzymatically active cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase protein in yeast. *FEMS Yeast Res.* 4, 297–303. doi:10.1016/S1567-1356(03)00159-4
- Delgado, M.L., O'Connor, J.E., Azorín, I., Renau-Piqueras, J., Gil, M.L., Gozalbo, D., 2001. The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase polypeptides encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* *TDH1*, *TDH2* and *TDH3* genes are also cell wall proteins. *Microbiology* 147, 411–417.
- Deng, D., Xu, C., Sun, P., Wu, J., Yan, C., Hu, M., Yan, N., 2014. Crystal structure of the human glucose transporter GLUT1. *Nature* 510, 121–125. doi:10.1038/nature13306
- Deshaies, R.J., 1999. Scf and Cullin/Ring H2-Based Ubiquitin Ligases. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15, 435–467. doi:10.1146/annurev.cellbio.15.1.435
- Díaz-Ramos, A., Roig-Borrellas, A., García-Melero, A., López-Aleman, R., 2012. α -Enolase, a multifunctional protein: its role on pathophysiological situations. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012, 156795. doi:10.1155/2012/156795
- Díaz-Ruiz, R., Avéret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., Rigoulet, M., 2008. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation Is Regulated by Fructose 1,6-Bisphosphate. A possible role in Crabtree effect

- induction? *J. Biol. Chem.* 283, 26948–26955. doi:10.1074/jbc.M800408200
- Díaz -Ruiz, R., Rigoulet, M., Devin, A., 2011. The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1807, 568–576. doi:10.1016/j.bbabi.2010.08.010
- Díaz -Ruiz, R., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., Rigoulet, M., 2009. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1796, 252–265. doi:10.1016/j.bbcan.2009.07.003
- Dietvorst, J., Karhumaa, K., Kielland-Brandt, M.C., Brandt, A., 2010. Amino acid residues involved in ligand preference of the Snf3 transporter-like sensor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 27, 131–138. doi:10.1002/yea.1737
- Dietzel, K.L., Ramakrishnan, V., Murphy, E.E., Bisson, L.F., 2012. *MTH1* and *RGT1* demonstrate combined haploinsufficiency in regulation of the hexose transporter genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genet.* 13, 1–10.
- Dlugai, S., Hippler, S., Wiczorke, R., Boles, E., 2001. Glucose-dependent and -independent signalling functions of the yeast glucose sensor Snf3. *FEBS Lett.* 505, 389–392. doi:10.1016/S0014-5793(01)02854-X
- Dong, J., Dickson, R.C., 1997. Glucose represses the lactose-galactose regulon in *Kluyveromyces lactis* through a *SNF1* and *MIG1*-dependent pathway that modulates galactokinase (*GAL1*) gene expression. *Nucleic Acids Res.* 25, 3657.
- Dong, L., Xu, C.W., 2003. Carbohydrates induce mono-ubiquitination of H2B in yeast. *J. Biol. Chem.* 279, 1577–1580. doi:10.1074/jbc.C300505200
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., Montigny, J. de, Marck, C., Neuvéglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J.-M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisramé, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., Daruvar, A. de, Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J.-M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.-F., Straub, M.-L., Suleau, A., Swennen, D., Tekai, F., Wésolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P., Souciet, J.-L., 2004. Genome evolution in yeasts. *Nature* 430, 35–44. doi:10.1038/nature02579
- Dyląg, M., Lis, P., Niedźwiecka, K., Ko, Y.H., Pedersen, P.L., Goffeau, A., Ułaszewski, S., 2013. 3-Bromopyruvate: A novel antifungal agent against the human pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 322–327. doi:10.1016/j.bbrc.2013.02.125
- Eckert-Boulet, N., Regenbreg, B., Nielsen, J., 2005. Grr1p is required for transcriptional induction of amino acid permease genes and proper transcriptional regulation of genes in carbon metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 47, 139–149. doi:10.1007/s00294-004-0553-1
- Edmondson, D.G., Smith, M.M., Roth, S.Y., 1996. Repression domain of the yeast global repressor Tup1 interacts directly with histones H3 and H4. *Genes Dev.* 10, 1247–1259. doi:10.1101/gad.10.10.1247
- Elf, S.E., Chen, J., 2013. Targeting glucose metabolism in patients with cancer. *Cancer*. doi:10.1002/cncr.28501
- Entian, K.D., Zimmermann, F.K., 1980. Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 177, 345–350.
- Erickson, J.R., Johnston, M., 1994. Suppressors reveal two classes of glucose repression genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 136, 1271–1278.
- Estrada, E., Agostinis, P., Vandenheede, J.R., Goris, J., Merlevede, W., François, J., Goffeau, A., Ghislain, M., 1996. Phosphorylation of Yeast Plasma Membrane H⁺-ATPase by Casein Kinase I. *J. Biol. Chem.* 271, 32064–32072. doi:10.1074/jbc.271.50.32064
- Feig, S.A., Shohet, S.B., Nathan, D.G., 1971. Energy Metabolism in Human Erythrocytes. *J. Clin. Invest.* 50, 1731–1737. doi:10.1172/JCI106662
- Feng, Y., Davis, N.G., 2000. Akr1p and the Type I Casein Kinases Act prior to the Ubiquitination Step of Yeast Endocytosis: Akr1p Is Required for Kinase Localization to the Plasma Membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 5350–5359. doi:10.1128/MCB.20.14.5350-5359.2000
- Feo, S., Arcuri, D., Piddini, E., Passantino, R., Giallongo, A., 2000. *ENO1* gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Lett.* 473, 47–52. doi:10.1016/S0014-5793(00)01494-0
- Fernandez-Garcia, P., Pelaez, R., Herrero, P., Moreno, F., 2012. Phosphorylation of yeast hexokinase 2 regulates its nucleocytoplasmic shuttling. *J. Biol. Chem.* doi:10.1074/jbc.M112.401679
- Finley, D., Ulrich, H.D., Sommer, T., Kaiser, P., 2012. The Ubiquitin-Proteasome System of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 192, 319–360. doi:10.1534/genetics.112.140467
- Fleming, A.B., Pennings, S., 2001. Antagonistic remodelling by Swi-Snf and Tup1-Ssn6 of an extensive chromatin region forms the background for *FLO1* gene regulation. *EMBO J.* 20, 5219–5231. doi:10.1093/emboj/20.18.5219
- Flick, J.S., Johnston, M., 1991. *GRR1* of *Saccharomyces cerevisiae* is required for glucose repression and encodes a protein with leucine-rich repeats. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5101–5112. doi:10.1128/MCB.11.10.5101

- Flick, K.M., 2003. Grr1-dependent Inactivation of Mth1 Mediates Glucose-induced Dissociation of Rgt1 from *HXT* Gene Promoters. *Mol. Biol. Cell* 14, 3230–3241. doi:10.1091/mbc.E03-03-0135
- Gadura, N., Robinson, L.C., Michels, C.A., 2005. Glc7-Reg1 Phosphatase Signals to Yck1,2 Casein Kinase 1 to Regulate Transport Activity and Glucose-Induced Inactivation of *Saccharomyces* Maltose Permease. *Genetics* 172, 1427–1439. doi:10.1534/genetics.105.051698
- Gambée, J., Andrews, P.C., DeJongh, K., Grant, G., Merrill, B., Mische, S., Rush, J., 1995. Assignment of cysteine and tryptophan residues during protein sequencing: Results of ABRF-94SEQ. *Tech. Protein Chem.* 6, 209–217.
- Gamo, F.J., Lafuente, M.J., Gancedo, C., 1994. The mutation *DGT1-1* decreases glucose transport and alleviates carbon catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176, 7423.
- Gancedo, C., Flores, C.-L., 2004. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res.* 4, 351–359. doi:10.1016/S1567-1356(03)00222-8
- Ganster, R.W., Shen, W., Schmidt, M.C., 1993. Isolation of STD1, a high-copy-number suppressor of a dominant negative mutation in the yeast TATA-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 13, 3650.
- Gao, X., Wang, H., Yang, J.J., Liu, X., Liu, Z.-R., 2012. Pyruvate Kinase M2 Regulates Gene Transcription by Acting as a Protein Kinase. *Mol. Cell* 45, 598–609. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.001
- Georis, I., Cassart, J.P., Breunig, K.D., Vandenhoute, J., 1999. Glucose repression of the *Kluyveromyces lactis* invertase gene *KIINV1* does not require Mig1p. *Mol. Gen. Genet.* 261, 862–870.
- Ghaemmaghami, S., Huh, W.-K., Bower, K., Howson, R.W., Belle, A., Dephoure, N., O’Shea, E.K., Weissman, J.S., 2003. Global analysis of protein expression in yeast. *Nature* 425, 737–741.
- Giardina, B.J., Chiang, H.-L., 2013a. The key gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase is secreted during prolonged glucose starvation and is internalized following glucose re-feeding via the non-classical secretory and internalizing pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Signal. Behav.* 8, e24936. doi:10.4161/psb.24936
- Giardina, B.J., Chiang, H.-L., 2013b. Fructose-1,6-bisphosphatase, Malate Dehydrogenase, Isocitrate Lyase, Phosphoenolpyruvate Carboxykinase, Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase, and Cyclophilin A are secreted in *Saccharomyces cerevisiae* grown in low glucose. *Commun. Integr. Biol.* 6, e27216. doi:10.4161/cib.27216
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H., Oliver, S.G., 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274, 546, 563–567.
- Goffrini, P., Algeri, A.A., Donnini, C., Wesolowski-Louvel, M., Ferrero, I., 1989. RAG1 and RAG2: nuclear genes involved in the dependence/independence on mitochondrial respiratory function for growth on sugars. *Yeast* 5, 99–106. doi:10.1002/yea.320050205
- Goffrini, P., Ficarella, A., Donnini, C., Lodi, T., Puglisi, P.P., Ferrero, I., 1996. *FOG1* and *FOG2* genes, required for the transcriptional activation of glucose-repressible genes of *Kluyveromyces lactis*, are homologous to *GAL83* and *SNF1* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 29, 316–326. doi:10.1007/BF02208612
- Goffrini, P., Ficarella, A., Ferrero, I., 1995. Hexokinase activity is affected in mutants of *Kluyveromyces lactis* resistant to glucose repression. *Microbiology* 141, 441–447. doi:10.1099/13500872-141-2-441
- Goffrini, P., Wésolowski-Louvel, M., Ferrero, I., 1991. A phosphoglucose isomerase gene is involved in the Rag phenotype of the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Gen. Genet.* 228, 401–409.
- Goffrini, P., Wesolowski-Louvel, M., Ferrero, I., Fukuhara, H., 1990. *RAG1* gene of the yeast *Kluyveromyces lactis* codes for a sugar transporter. *Nucleic Acids Res.* 18, 5294.
- Gomes, R.A., Miranda, H.V., Silva, M.S., Graça, G., Coelho, A.V., Ferreira, A.E., Cordeiro, C., Freire, A.P., 2006. Yeast protein glycation *in vivo* by methylglyoxal. *FEBS J.* 273, 5273–5287. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05520.x
- Gomes, R.A., Oliveira, L.M.A., Silva, M., Ascenso, C., Quintas, A., Costa, G., Coelho, A.V., Sousa Silva, M., Ferreira, A.E.N., Ponces Freire, A., Cordeiro, C., 2008. Protein glycation *in vivo*: functional and structural effects on yeast enolase. *Biochem. J.* 416, 317. doi:10.1042/BJ20080632
- Gonzales, B., François, J., Renaud, M., 1997. A rapid and reliable method for metabolite extraction in yeast using boiling buffered ethanol. *Yeast* 13, 1347–1355.
- Gonzalez, D., Hamidi, N., Del Sol, R., Benschop, J.J., Nancy, T., Li, C., Francis, L., Tzouros, M., Krijgsveld, J., Holstege, F.C.P., Conlan, R.S., 2014. Suppression of Mediator is regulated by Cdk8-dependent Grr1 turnover of the Med3 coactivator. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 2500–2505. doi:10.1073/pnas.1307525111
- González Siso, M.I., Cerdán, M.E., 2012. *Kluyveromyces lactis*: A Suitable Yeast Model to Study Cellular Defense Mechanisms against Hypoxia-Induced Oxidative Stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2012, 1–14. doi:10.1155/2012/634674
- González Siso, M.I., Freire Picos, M.A., Cerddn, M.E., 1996. Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose by *Kluyveromyces lactis rag2* mutants. *FEBS Lett.* 387, 7–10. doi:10.1016/0014-5793(96)00390-0

- Gorietti, D., Zanni, E., Palleschi, C., Delfini, M., Uccelletti, D., Saliola, M., Miccheli, A., 2013. Depletion of casein kinase I leads to a NAD(P)⁺/NAD(P)H balance-dependent metabolic adaptation as determined by NMR spectroscopy-metabolomic profile in *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta BBA-Gen. Subj.*
- Gould, G.W., Holman, G.D., 1993. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295, 329–341.
- Graham, J.W.A., Williams, T.C.R., Morgan, M., Fernie, A.R., Ratcliffe, R.G., Sweetlove, L.J., 2007. Glycolytic Enzymes Associate Dynamically with Mitochondria in Response to Respiratory Demand and Support Substrate Channeling. *Plant Cell Online* 19, 3723–3738. doi:10.1105/tpc.107.053371
- Grant, C.M., Quinn, K.A., Dawes, I.W., 1999. Differential Protein S-Thiolation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Isoenzymes Influences Sensitivity to Oxidative Stress. *Mol. Cell. Biol.* 19, 2650–2656.
- Gruhler, A., Olsen, J.V., Mohammed, S., Mortensen, P., Faergeman, N.J., Mann, M., Jensen, O.N., 2005. Quantitative phosphoproteomics applied to the yeast pheromone signaling pathway. *Mol. Cell. Proteomics* 4, 310–327. doi:10.1074/mcp.M400219-MCP200
- Grüning, N.-M., Rinnerthaler, M., Bluemlein, K., Müllleder, M., Wamelink, M.M.C., Lehrach, H., Jakobs, C., Breitenbach, M., Ralser, M., 2011. Pyruvate Kinase Triggers a Metabolic Feedback Loop that Controls Redox Metabolism in Respiring Cells. *Cell Metab.* 14, 415–427. doi:10.1016/j.cmet.2011.06.017
- Gustavsson, A.-K., van Niekerk, D.D., Adiels, C.B., Kooi, B., Goksör, M., Snoep, J.L., 2014. Allosteric regulation of phosphofructokinase controls the emergence of glycolytic oscillations in isolated yeast cells. *FEBS J.* 281, 2784–2793. doi:10.1111/febs.12820
- Haguenauer-Tsapis, R., André, B., 2004. Membrane trafficking of yeast transporters: mechanisms and physiological control of downregulation, in: *Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport*. Springer, pp. 23–45.
- Havula, E., Hietakangas, V., 2012. Glucose sensing by ChREBP/MondoA–Mlx transcription factors. *Semin. Cell Dev. Biol.* 23, 640–647. doi:10.1016/j.semcdb.2012.02.007
- Haw, R., Devi Yarragudi, A., Uemura, H., 2001. Isolation of *GCR1*, a major transcription factor of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, from *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 18, 729–735. doi:10.1002/yea.718
- Hazbun, T.R., Fields, S., 2002. A Genome-wide Screen for Site-specific DNA-binding Proteins. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 538–543. doi:10.1074/mcp.T200002-MCP200
- Hedbacker, K., Carlson, M., 2008. SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 13, 2408.
- Heidrich, K., Otto, A., Behlke, J., Rush, J., Wenzel, K.-W., Kriegel, T., 1997. Autophosphorylation–Inactivation Site of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry (Mosc.)* 36, 1960–1964. doi:10.1021/bi9623643
- Heiland, S., Radovanovic, N., Höfer, M., Winderickx, J., Lichtenberg, H., 2000. Multiple Hexose Transporters of *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Bacteriol.* 182, 2153–2162. doi:10.1128/JB.182.8.2153-2162.2000
- Henderson, P.J.F., Baldwin, S.A., 2013. This is about the in and the out. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 654–655. doi:10.1038/nsmb.2604
- Herrgård, M.J., Swainston, N., Dobson, P., Dunn, W.B., Arga, K.Y., Arvas, M., Buthgen, N., Borger, S., Costenoble, R., Heinemann, M., Hucka, M., Le Novère, N., Li, P., Liebermeister, W., Mo, M.L., Oliveira, A.P., Petranovic, D., Pettifer, S., Simeonidis, E., Smallbone, K., Spasić, I., Weichart, D., Brent, R., Broomhead, D.S., Westerhoff, H.V., Kürdar, B., Penttilä, M., Klipp, E., Pálsson, B.Ø., Sauer, U., Oliver, S.G., Mendes, P., Nielsen, J., Kell, D.B., 2008. A consensus yeast metabolic network reconstruction obtained from a community approach to systems biology. *Nat. Biotechnol.* 26, 1155–1160. doi:10.1038/nbt1492
- Hnatova, M., Wésolowski-Louvel, M., Dieppois, G., Deffaud, J., Lemaire, M., 2008. Characterization of *KLRR1* and *SMS1* genes, two new elements of the glucose signaling pathway of *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* 7, 1299–1308. doi:10.1128/EC.00454-07
- Hofmann, K., Stoffel, W., 1993. TMpred. ExPASy, Institut für Biochemie, Medizinische Fakultät, Universität zu Köln, Köln, FRG.
- Holt, L.J., Tuch, B.B., Villén, J., Johnson, A.D., Gygi, S.P., Morgan, D.O., 2009. Global analysis of Cdk1 substrate phosphorylation sites provides insights into evolution. *Science* 325, 1682–1686. doi:10.1126/science.1172867
- Hong, S.-P., Carlson, M., 2007. Regulation of Snf1 Protein Kinase in Response to Environmental Stress. *J. Biol. Chem.* 282, 16838–16845. doi:10.1074/jbc.M700146200
- Hong, S.-P., Leiper, F.C., Woods, A., Carling, D., Carlson, M., 2003. Activation of yeast Snf1 and mammalian AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8839–8843. doi:10.1073/pnas.1533136100
- Horák, J., 2003. The role of ubiquitin in down-regulation and intracellular sorting of membrane proteins: insights from yeast. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1614, 139–155. doi:10.1016/S0005-2736(03)00195-0
- Horák, J., 2013. Regulations of sugar transporters: insights from yeast. *Curr. Genet.* 59, 1–31. doi:10.1007/s00294-013-0388-8
- Horak, J., Regelman, J., Wolf, D.H., 2002. Two Distinct Proteolytic Systems Responsible for Glucose-induced Degradation of Fructose-1,6-bisphosphatase and the Gal2p Transporter in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Share the Same Protein Components of the Glucose Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* 277, 8248–8254. doi:10.1074/jbc.M107255200
- Horak, J., Wolf, D.H., 2005. The ubiquitin ligase SCF^{Grr1} is required for Gal2p degradation in the yeast

- Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 1185–1190. doi:10.1016/j.bbrc.2005.08.008
- Hsiung, Y.G., Chang, H.-C., Pellequer, J.-L., Valle, R.L., Lanker, S., Wittenberg, C., 2001. F-Box Protein Grr1 Interacts with Phosphorylated Targets via the Cationic Surface of Its Leucine-Rich Repeat. *Mol. Cell. Biol.* 21, 2506–2520. doi:10.1128/MCB.21.7.2506-2520.2001
- Hubbard, E.J., Jiang, R., Carlson, M., 1994. Dosage-dependent modulation of glucose repression by *MSN3* (*STD1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14, 1972–1978.
- Iida, H., Yahara, I., 1985. Yeast heat-shock protein of Mr 48,000 is an isoprotein of enolase. *Nature* 315, 688–690. doi:10.1038/315688a0
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M., Sakaki, Y., 2001. A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 4569–4574. doi:10.1073/pnas.061034498
- Jacoby, J., Hollenberg, C.P., Heinisch, J.J., 1993. Transaldolase mutants in the yeast *Kluyveromyces lactis* provide evidence that glucose can be metabolized through the pentose phosphate pathway. *Mol. Microbiol.* 10, 867–876. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb00957.x
- Jacoby, J.J., Heinisch, J.J., 1997. Analysis of a transketolase gene from *Kluyveromyces lactis* reveals that the yeast enzymes are more related to transketolases of prokaryotic origins than to those of higher eukaryotes. *Curr. Genet.* 31, 15–21. doi:10.1007/s002940050171
- Jahreis, K., Pimentel-Schmitt, E.F., Brückner, R., Titgemeyer, F., 2008. Ins and outs of glucose transport systems in eubacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 891–907. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00125.x
- Janke, C., Magiera, M.M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M., 2004. A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast* 21, 947–962. doi:10.1002/yea.1142
- Jiang, R., Carlson, M., 1997. The Snf1 protein kinase and its activating subunit, Snf4, interact with distinct domains of the Sip1/Sip2/Gal83 component in the kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2099–2106.
- Jones, A.R., Gillan, L., Milmlow, D., 1995. The anti-glycolytic activity of 3-bromopyruvate on mature boar spermatozoa *in vitro*. *Contraception* 52, 317–320. doi:10.1016/0010-7824(95)00217-X
- Jones, J.G., Otieno, S., Barnard, E.A., Bhargava, A.K., 1975. Essential and nonessential thiols of yeast hexokinase. Reactions with iodoacetate and iodoacetamide. *Biochemistry (Mosc.)* 14, 2396–2403.
- Jonkers, W., Rep, M., 2009. Lessons from Fungal F-Box Proteins. *Eukaryot. Cell* 8, 677–695. doi:10.1128/EC.00386-08
- Jouandot, D., Roy, A., Kim, J.-H., 2011. Functional dissection of the glucose signaling pathways that regulate the yeast glucose transporter gene (HXT) repressor Rgt1. *J. Cell. Biochem.* 112, 3268–3275. doi:10.1002/jcb.23253
- Jules, M., Guillou, V., François, J., Parrou, J.-L., 2004. Two Distinct Pathways for Trehalose Assimilation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 2771–2778. doi:10.1128/AEM.70.5.2771-2778.2004
- Jurica, M.S., Mesecar, A., Heath, P.J., Shi, W., Nowak, T., Stoddard, B.L., 1998. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure* 6, 195–210.
- Kanapka, J.A., Hamilton, I.R., 1971. Fluoride inhibition of enolase activity *in vivo* and its relationship to the inhibition of glucose-6-P formation in *Streptococcus salivarius*. *Arch. Biochem. Biophys.* 146, 167–174.
- Kang, H.T., Hwang, E.S., 2006. 2-Deoxyglucose: An anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sci.* 78, 1392–1399. doi:10.1016/j.lfs.2005.07.001
- Kaniak, A., Xue, Z., Macool, D., Kim, J.H., Johnston, M., 2004. Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 3, 221–231.
- Karhumaa, K., Wu, B., Kielland-Brandt, M.C., 2010. Conditions with high intracellular glucose inhibit sensing through glucose sensor Snf3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Biochem.* 110, 920–925.
- Karpel, R.L., Burchard, A.C., 1981. A basic isozyme of yeast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase with nucleic acid helix-destabilizing activity. *Biochim. Biophys. Acta* 654, 256–267.
- Keleher, C.A., Redd, M.J., Schultz, J., Carlson, M., Johnson, A.D., 1992. Ssn6-Tup1 is a general repressor of transcription in yeast. *Cell* 68, 709–719.
- Keller, K.E., Tan, I.S., Lee, Y.-S., 2012. SAICAR Stimulates Pyruvate Kinase Isoform M2 and Promotes Cancer Cell Survival in Glucose-Limited Conditions. *Science* 338, 1069–1072. doi:10.1126/science.1227833
- Kennelly, P.J., Krebs, E.G., 1991. Consensus sequences as substrate specificity determinants for protein kinases and protein phosphatases. *J. Biol. Chem.* 266, 15555–15558.
- Kettner, K., Krause, U., Mosler, S., Bodenstein, C., Kriegel, T.M., Rödel, G., 2012. *Saccharomyces cerevisiae* gene YMR291W/*TDA1* mediates the *in vivo* phosphorylation of hexokinase isoenzyme 2 at serine-15. *FEBS Lett.* 586, 455–458. doi:10.1016/j.febslet.2012.01.030
- Kettner, K., Kuettnner, E.B., Otto, A., Lilie, H., Golbik, R.P., Sträter, N., Kriegel, T.M., 2013. *In vivo* phosphorylation and *in vitro* autophosphorylation-inactivation of *Kluyveromyces lactis* hexokinase KHxk1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.121

- Kettner, K., Müller, E.-C., Otto, A., Rädcl, G., Breunig, K.D., Kriegel, T.M., 2007. Identification and characterization of a novel glucose-phosphorylating enzyme in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 7, 683–692. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00259.x
- Kiers, J., Zeeman, A.M., Luttik, M., Thiele, C., Castrillo, J.I., Steensma, H.Y., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 1998. Regulation of alcoholic fermentation in batch and chemostat cultures of *Kluyveromyces lactis* CBS 2359. *Yeast* 14, 459–469. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(19980330)14:5<459::AID-YEA248>3.0.CO;2-O
- Kimata, K., 2001. Expression of the glucose transporter gene, ptsG, is regulated at the mRNA degradation step in response to glycolytic flux in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 20, 3587–3595. doi:10.1093/emboj/20.13.3587
- Kim, J., Dang, C.V., 2005. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem. Sci.* 30, 142–150. doi:10.1016/j.tibs.2005.01.005
- Kim, J.H., Brachet, V., Moriya, H., Johnston, M., 2006. Integration of transcriptional and posttranslational regulation in a glucose signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5, 167–173.
- Kim, J.-H., Johnston, M., 2006. Two Glucose-sensing Pathways Converge on Rgt1 to Regulate Expression of Glucose Transporter Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 281, 26144–26149. doi:10.1074/jbc.M603636200
- Kim, J.-H., Polish, J., Johnston, M., 2003. Specificity and Regulation of DNA Binding by the Yeast Glucose Transporter Gene Repressor Rgt1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5208–5216. doi:10.1128/MCB.23.15.5208-5216.2003
- Kim, J.-H., Roy, A., Jouandot, D., 2nd, Cho, K.H., 2013. The glucose signaling network in yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 1830, 5204–5210. doi:10.1016/j.bbagen.2013.07.025
- Knippschild, U., Gocht, A., Wolff, S., Huber, N., Löhler, J., Stöter, M., 2005. The casein kinase 1 family: participation in multiple cellular processes in eukaryotes. *Cell. Signal.* 17, 675–689. doi:10.1016/j.cellsig.2004.12.011
- Ko, H.-C., Hsiao, T.-Y., Chen, C.-T., Yang, Y.-L., 2013. *Candida albicans* ENO1 null mutants exhibit altered drug susceptibility, hyphal formation, and virulence. *J. Microbiol.* 51, 345–351. doi:10.1007/s12275-013-2577-z
- Kopperschläger, G., Bär, J., Stellwagen, E., 1993. Limited proteolysis of yeast phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* 217, 527–533. doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb18273.x
- Kosow, D.P., Rose, I.A., 1971. Activators of yeast hexokinase. *J. Biol. Chem.* 246, 2618–2625.
- Ko, Y.H., Pedersen, P.L., Geschwind, J.F., 2001. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase. *Cancer Lett.* 173, 83–91. doi:10.1016/S0304-3835(01)00667-X
- Ko, Y.H., Smith, B.L., Wang, Y., Pomper, M.G., Rini, D.A., Torbenson, M.S., Hüllihen, J., Pedersen, P.L., 2004. Advanced cancers: eradication in all cases using 3-bromopyruvate therapy to deplete ATP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324, 269–275. doi:10.1016/j.bbrc.2004.09.047
- Kraakman, L., Lemaire, K., Ma, P., Teunissen, A.W.R.H., Donaton, M.C.V., Van Dijck, P., Winderickx, J., De Winde, J.H., Thevelein, J.M., 1999. A *Saccharomyces cerevisiae* G-protein coupled receptor, Gpr1, is specifically required for glucose activation of the cAMP pathway during the transition to growth on glucose. *Mol. Microbiol.* 32, 1002–1012. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01413.x
- Krampe, S., Boles, E., 2002. Starvation-induced degradation of yeast hexose transporter Hxt7p is dependent on endocytosis, autophagy and the terminal sequences of the permease. *FEBS Lett.* 513, 193–196. doi:10.1016/S0014-5793(02)02297-4
- Krampe, S., Stamm, O., Hollenberg, C.P., Boles, E., 1998. Catabolite inactivation of the high-affinity hexose transporters Hxt6 and Hxt7 of *Saccharomyces cerevisiae* occurs in the vacuole after internalization by endocytosis. *FEBS Lett.* 441, 343–347. doi:10.1016/S0014-5793(98)01583-X
- Kresnowati, M.T.A.P., van Winden, W.A., Almering, M.J.H., ten Pierick, A., Ras, C., Knijnenburg, T.A., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T., Heijnen, J.J., Daran, J.M., 2006. When transcriptome meets metabolome: fast cellular responses of yeast to sudden relief of glucose limitation. *Mol. Syst. Biol.* 2. doi:10.1038/msb4100083
- Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G., Sonnhammer, E.L., 2001. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J. Mol. Biol.* 305, 567–580. doi:10.1006/jmbi.2000.4315
- Kruckeberg, A., Ye, L., Berden, J., Van Dam, K., 1999. Functional expression, quantification and cellular localization of the Hxt2 hexose transporter of *Saccharomyces cerevisiae* tagged with the green fluorescent protein. *Biochem J* 339, 299–307.
- Krüger, A., Grüning, N.-M., Wamelink, M.M.C., Kerick, M., Kirpy, A., Parkhomchuk, D., Bluemlein, K., Schweiger, M.-R., Soldatov, A., Lehrach, H., Jakobs, C., Ralser, M., 2011. The Pentose Phosphate Pathway Is a Metabolic Redox Sensor and Regulates Transcription During the Antioxidant Response. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 311–324. doi:10.1089/ars.2010.3797
- Kuchin, S., Vyas, V.K., Kanter, E., Hong, S.-P., Carlson, M., 2003. Std1p (Msn3p) Positively Regulates the Snf1 Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 163, 507–514.
- Kuettner, E.B., Kettner, K., Keim, A., Svergun, D.I., Volke, D., Singer, D., Hoffmann, R., Müller, E.-C., Otto, A., Kriegel, T.M., Strater, N., 2010. Crystal Structure of Hexokinase K/Hxk1 of *Kluyveromyces lactis*: a molecular basis for understanding the control of yeast hexokinase functions via covalent modification and oligomerization.

- J. Biol. Chem. 285, 41019–41033. doi:10.1074/jbc.M110.185850
- Kumar, P.R., Yu, Y., Sternglanz, R., Johnston, S.A., Joshua-Tor, L., 2008. NADP Regulates the Yeast *GAL* Induction System. *Science* 319, 1090–1092. doi:10.1126/science.1151903
- Kuser, P.R., Krauchenco, S., Antunes, O.A., Polikarpov, I., 2001. The high resolution crystal structure of yeast hexokinase PII with the correct primary sequence provides new insights into its mechanism of action. *J. Biol. Chem.* 275, 20814–20821. doi:10.1074/jbc.M910412199
- Kushnirov, V.V., 2000. Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* 16, 857–860. doi:10.1002/1097-0061(20000630)16:9<857::AID-YEA561>3.0.CO;2-B
- Kuzhandaivelu, N., Jones, W.K., Martin, A.K., Dickson, R.C., 1992. The signal for glucose repression of the lactose-galactose regulon is amplified through subtle modulation of transcription of the *Kluyveromyces lactis* Kl-GAL4 activator gene. *Mol. Cell. Biol.* 12, 1924.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lafuente, M.J., Gancedo, C., Jauniaux, J.-C., Gancedo, J.M., 2000. Mth1 receives the signal given by the glucose sensors Snf3 and Rgt2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 35, 161–172. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01688.x
- Lakshmanan, J., Mosley, A.L., Özcan, S., 2003. Repression of transcription by Rgt1 in the absence of glucose requires Std1 and Mth1. *Curr. Genet.* 44, 19–25. doi:10.1007/s00294-003-0423-2
- Lamas-Maceiras, M., Freire-Picos, M.A., Torres, A.M.R., 2011. Transcriptional repression by *Kluyveromyces lactis* Tup1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 38, 79–84. doi:10.1007/s10295-010-0832-4
- Lang, M.J., Martinez-Marquez, J.Y., Prosser, D.C., Ganser, L.R., Buelto, D., Wendland, B., Duncan, M.C., 2014. Glucose Starvation Inhibits Autophagy via Vacuolar Hydrolysis and Induces Plasma Membrane Internalization by Down-regulating Recycling. *J. Biol. Chem.* 289, 16736–16747. doi:10.1074/jbc.M113.525782
- Lauwers, E., André, B., 2006. Association of Yeast Transporters with Detergent-Resistant Membranes Correlates with Their Cell-Surface Location. *Traffic* 7, 1045–1059. doi:10.1111/j.1600-0854.2006.00445.x
- Leandro, M.J., Fonseca, C., Gonçalves, P., 2009. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts: an overview. *FEMS Yeast Res.* 9, 511–525. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00509.x
- Lee, M.N., Ha, S.H., Kim, J., Koh, A., Lee, C.S., Kim, J.H., Jeon, H., Kim, D.-H., Suh, P.-G., Ryu, S.H., 2009. Glycolytic Flux Signals to mTOR through Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-Mediated Regulation of Rheb. *Mol. Cell. Biol.* 29, 3991–4001. doi:10.1128/MCB.00165-09
- Lemaire, K., Van de Velde, S., Van Dijck, P., Thevelein, J.M., 2004. Glucose and Sucrose Act as Agonist and Mannose as Antagonist Ligands of the G Protein-Coupled Receptor Gpr1 in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell* 16, 293–299.
- Lemaire, M., Guyon, A., Betina, S., Wésolowski-Louvel, M., 2002. Regulation of glycolysis by casein kinase I (Rag8p) in *Kluyveromyces lactis* involves a DNA-binding protein, Sck1p, a homologue of Sgc1p of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 40, 355–364. doi:10.1007/s00294-001-0266-7
- Lemaire, M., Wésolowski-Louvel, M., 2004. Enolase and glycolytic flux play a role in the regulation of the glucose permease gene *RAG1* of *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 168, 723–731. doi:10.1534/genetics.104.029876
- Lewis, D.A., Bisson, L.F., 1991. The *HXT1* gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters. *Mol. Cell. Biol.* 11, 3804.
- Liang, H., Gaber, R.F., 1996. A novel signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae* defined by Snf3-regulated expression of HXT6. *Mol. Biol. Cell* 7, 1953–1966.
- Li, F.N., Johnston, M., 1997. Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *EMBO J.* 16, 5629–5638. doi:10.1093/emboj/16.18.5629
- Lis, P., Zarzycki, M., Ko, Y.H., Casal, M., Pedersen, P.L., Goffeau, A., Ułaszewski, S., 2012. Transport and cytotoxicity of the anticancer drug 3-bromopyruvate in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 44, 155–161. doi:10.1007/s10863-012-9421-8
- Lodi, T., Fontanesi, F., Ferrero, I., Donnini, C., 2004. Carboxylic acids permeases in yeast: two genes in *Kluyveromyces lactis*. *Gene* 339, 111–119. doi:10.1016/j.gene.2004.06.019
- Lodi, T., Saliola, M., Donnini, C., Goffrini, P., 2001. Three Target Genes for the Transcriptional Activator Cat8p of *Kluyveromyces lactis*: Acetyl Coenzyme A Synthetase Genes *KIACS1* and *KIACS2* and Lactate Permease Gene *KIJEN1*. *J. Bacteriol.* 183, 5257–5261. doi:10.1128/JB.183.18.5257-5261.2001
- Longtine, M.S., Mckenzie III, A., Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., Pringle, J.R., 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953–961. doi:10.1002/(SICI)1097-0061(199807)14:10<953::AID-YEA293>3.0.CO;2-U
- López, M.C., Baker, H.V., 2000. Understanding the Growth Phenotype of the Yeast *gcr1* Mutant in Terms of Global Genomic Expression Patterns. *J. Bacteriol.* 182, 4970–4978. doi:10.1128/JB.182.17.4970-4978.2000
- Lorenz, M.C., Muir, R.S., Lim, E., McElver, J., Weber, S.C., Heitman, J., 1995. Gene disruption with PCR products in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*.

- Ludin, K., Jiang, R., Carlson, M., 1998. Glucose-regulated interaction of a regulatory subunit of protein phosphatase 1 with the Snf1 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 6245–6250.
- Luo, L., Tong, X., Farley, P.C., 2007. The *Candida albicans* gene *HGT12* (orf19.7094) encodes a hexose transporter. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51, 14–17. doi:10.1111/j.1574-695X.2007.00274.x
- Lushchak, V., Abrat, O., Miedzobrodzki, J., Semchysyn, H., 2008. Pdr12p-dependent and -independent fluorescein extrusion from baker's yeast cells. *Acta Biochim. Pol.* 55, 595–601.
- Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O., Johnston, M., 1998. Characterization of Three Related Glucose Repressors and Genes They Regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 150, 1377–1391.
- Lutfiyya, L.L., Johnston, M., 1996. Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of *SUC2* expression. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4790–4797.
- Maher, J.C., Krishan, A., Lampidis, T.J., 2004. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-d-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 53, 116–122. doi:10.1007/s00280-003-0724-7
- Ma, H., Han, B.-K., Guaderrama, M., Aslanian, A., Yates, J.R., Hunter, T., Wittenberg, C., 2013. Psy2 targets the PP4 family phosphatase Pph3 to dephosphorylate Mth1 and repress glucose transporter gene expression. *Mol. Cell. Biol.* doi:10.1128/MCB.00279-13
- Maier, A., Völker, B., Boles, E., Fuhrmann, G.F., 2002. Characterisation of glucose transport in *Saccharomyces cerevisiae* with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters. *FEMS Yeast Res.* 2, 539–550. doi:10.1111/j.1567-1364.2002.tb00121.x
- Ma, P., Wera, S., Dijck, P.V., Thevelein, J.M., 1999. The *PDE1*-encoded Low-Affinity Phosphodiesterase in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Has a Specific Function in Controlling Agonist-induced cAMP Signaling. *Mol. Biol. Cell* 10, 91–104. doi:10.1091/mbc.10.1.91
- Mark, K.G., Simonetta, M., Maiolica, A., Seller, C.A., Toczyski, D.P., 2014. Ubiquitin Ligase Trapping Identifies an SCFSaf1 Pathway Targeting Unprocessed Vacuolar/Lysosomal Proteins. *Mol. Cell* 53, 148–161. doi:10.1016/j.molcel.2013.12.003
- Marshall-Carlson, L., Celenza, J.L., Laurent, B.C., Carlson, M., 1990. Mutational analysis of the *SNF3* glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1105–1115. doi:10.1128/MCB.10.3.1105
- Marshall-Carlson, L., Neigeborn, L., Coons, D., Bisson, L., Carlson, M., 1991. Dominant and recessive suppressors that restore glucose transport in a yeast *snf3* mutant. *Genetics* 128, 505–512.
- Mates, N., Kettner, K., Heidenreich, F., Pursche, T., Migotti, R., Kahlert, G., Kuhlisch, E., Breunig, K.D., Schellenberger, W., Dittmar, G., Hoflack, B., Kriegel, T.M., 2014. Proteomic and functional consequences of hexokinase deficiency in glucose-repressible *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell. Proteomics* mcp.M113.032714. doi:10.1074/mcp.M113.032714
- Mayer, F.V., Heath, R., Underwood, E., Sanders, M.J., Carmena, D., McCartney, R.R., Leiper, F.C., Xiao, B., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L.F., Ogrodowicz, R., Martin, S.R., Schmidt, M.C., Gamblin, S.J., Carling, D., 2011. ADP Regulates SNF1, the *Saccharomyces cerevisiae* Homolog of AMP-Activated Protein Kinase. *Cell Metab.* 14, 707–714. doi:10.1016/j.cmet.2011.09.009
- Mazzoni, C., Saliola, M., Falcone, C., 1992. Ethanol-induced and glucose-insensitive alcohol dehydrogenase activity in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.* 6, 2279–2286. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb01403.x
- Mazzoni, C., Serafini, A., Falcone, C., 2005. The Inactivation of *KINOT4*, a *Kluyveromyces lactis* Gene Encoding a Component of the CCR4-NOT Complex, Reveals New Regulatory Functions. *Genetics* 170, 1023–1032. doi:10.1534/genetics.105.041863
- McCartney, R.R., Chandrashekarappa, D.G., Zhang, B.B., Schmidt, M.C., 2014. Genetic Analysis of Resistance and Sensitivity to 2-deoxyglucose in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 114.169060. doi:10.1534/genetics.114.169060
- Menon, B.B., Sarma, N.J., Pasula, S., Deminoff, S.J., Willis, K.A., Barbara, K.E., Andrews, B., Santangelo, G.M., 2005. Reverse recruitment: The Nup84 nuclear pore subcomplex mediates Rap1/Gcr1/Gcr2 transcriptional activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5749–5754. doi:10.1073/pnas.0501768102
- Metallo, C.M., Vander Heiden, M.G., 2010. Metabolism strikes back: metabolic flux regulates cell signaling. *Genes Dev.* 24, 2717–2722. doi:10.1101/gad.2010510
- Mickelson, M.N., 1977. Glucose Transport in *Streptococcus agalactiae* and Its Inhibition by Lactoperoxidase-Thiocyanate-Hydrogen Peroxide. *J. Bacteriol.* 132, 541–548.
- Micolonghi, C., Ottaviano, D., Di Silvio, E., Damato, G., Heipieper, H.J., Bianchi, M.M., 2012. A dual signalling pathway for the hypoxic expression of lipid genes, dependent on the glucose sensor Rag4, is revealed by the analysis of the *KIMGA2* gene in *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 158, 1734–1744. doi:10.1099/mic.0.059402-0
- Micolonghi, C., Wésolowski-Louvel, M., Bianchi, M.M., 2011. The Rag4 glucose sensor is involved in the hypoxic induction of *KIPDC1* gene expression in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* 10, 146–148. doi:10.1128/EC.00251-10
- Miermont, A., Uhlendorf, J., McClean, M., Hersen, P., 2011. The Dynamical Systems Properties of the HOG Signaling Cascade. *J. Signal Transduct.* 2011, e930940. doi:10.1155/2011/930940

- Mikesh, L.M., Bruns, D.E., 2008. Stabilization of Glucose in Blood Specimens: Mechanism of Delay in Fluoride Inhibition of Glycolysis. *Clin. Chem.* 54, 930–932. doi:10.1373/clinchem.2007.102160
- Mitsui, K., Matsushita, M., Kanazawa, H., 2010. *Saccharomyces cerevisiae* glucose signalling regulator Mth1p regulates the organellar Na⁺/H⁺ exchanger Nhx1p. *Biochem. J.* 432, 343–352. doi:10.1042/BJ20100796
- Miura, N., Shinohara, M., Tatsukami, Y., Sato, Y., Morisaka, H., Kuroda, K., Ueda, M., 2013. Spatial Reorganization of *Saccharomyces cerevisiae* Enolase To Alter Carbon Metabolism under Hypoxia. *Eukaryot. Cell* 12, 1106–1119. doi:10.1128/EC.00093-13
- Moellering, R.E., Cravatt, B.F., 2013. Functional Lysine Modification by an Intrinsically Reactive Primary Glycolytic Metabolite. *Science* 341, 549–553. doi:10.1126/science.1238327
- Mollinedo, F., 2012. Lipid raft involvement in yeast cell growth and death. *Mol. Cell. Oncol.* 2, 140. doi:10.3389/fonc.2012.00140
- Moore, P.A., Sagliocco, F.A., Wood, R.M., Brown, A.J., 1991. Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5330–5337. doi:10.1128/MCB.11.10.5330
- Moreno, F., Ahuatzli, D., Riera, A., Palomino, C.A., Herrero, P., 2005. Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 265–268.
- Moriya, H., Johnston, M., 2004. Glucose sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae* through the Rgt2 glucose sensor and casein kinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 1572–1577. doi:10.1073/pnas.0305901101
- Mosley, A.L., Lakshmanan, J., Aryal, B.K., Özcan, S., 2003. Glucose-mediated Phosphorylation Converts the Transcription Factor Rgt1 from a Repressor to an Activator. *J. Biol. Chem.* 278, 10322–10327. doi:10.1074/jbc.M212802200
- Mueckler, M., Thorens, B., 2013. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol. Aspects Med.* 34, 121–138. doi:10.1016/j.mam.2012.07.001
- Mumberg, D., Müller, R., Funk, M., 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119–122. doi:10.1016/0378-1119(95)00037-7
- Nazarko, V.Y., Futej, K.O., Thevelein, J.M., Sibirny, A.A., 2008. Differences in glucose sensing and signaling for pexophagy between the baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* and the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Autophagy* 4, 381–384.
- Neary, C.L., Pastorino, J.G., 2010. Nucleocytoplasmic shuttling of hexokinase II in a cancer cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 394, 1075–1081. doi:10.1016/j.bbrc.2010.03.129
- Neary, C.L., Pastorino, J.G., 2013. Akt inhibition promotes hexokinase 2 redistribution and glucose uptake in cancer cells. *J. Cell. Physiol.* 228, 1943–1948. doi:10.1002/jcp.24361
- Neigeborn, L., Carlson, M., 1987. Mutations Causing Constitutive Invertase Synthesis in Yeast: Genetic Interactions with *snf* Mutations. *Genetics* 115, 247–253.
- Neil, H., Hnatova, M., Wésolowski-Louvel, M., Rycovska, A., Lemaire, M., 2007. Sck1 activator coordinates glucose transport and glycolysis and is controlled by Rag8 casein kinase I in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.* 63, 1537–1548. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05606.x
- Neil, H., Lemaire, M., Wésolowski-Louvel, M., 2004. Regulation of glycolysis in *Kluyveromyces lactis*: role of *KIGCR1* and *KIGCR2* in glucose uptake and catabolism. *Curr. Genet.* 45, 129–139. doi:10.1007/s00294-003-0473-5
- Newcomb, L.L., Diderich, J.A., Slattery, M.G., Heideman, W., 2003. Glucose regulation of *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle genes. *Eukaryot. Cell* 2, 143–149.
- Nikawa, J., Cameron, S., Toda, T., Ferguson, K.M., Wigler, M., 1987. Rigorous feedback control of cAMP levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 1, 931–937. doi:10.1101/gad.1.9.931
- Nishi, K., Park, C.S., Pepper, A.E., Eichinger, G., Innis, M.A., Holland, M.J., 1995. The *GCR1* requirement for yeast glycolytic gene expression is suppressed by dominant mutations in the *SGC1* gene, which encodes a novel basic-helix-loop-helix protein. *Mol. Cell. Biol.* 15, 2646–2653.
- Obenauer, J.C., Cantley, L.C., Yaffe, M.B., 2003. Scansite 2.0: Proteome-wide prediction of cell signaling interactions using short sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* 31, 3635–3641.
- Oliveira, A.P., Ludwig, C., Picotti, P., Kogadeeva, M., Aebersold, R., Sauer, U., 2012. Regulation of yeast central metabolism by enzyme phosphorylation. *Mol. Syst. Biol.* 8. doi:10.1038/msb.2012.55
- Oliveira, A.P., Sauer, U., 2012. The importance of post-translational modifications in regulating *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *FEMS Yeast Res.* 12, 104–117. doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00765.x
- Olsen, L.F., Andersen, A.Z., Lunding, A., Brasen, J.C., Poulsen, A.K., 2009. Regulation of Glycolytic Oscillations by Mitochondrial and Plasma Membrane H⁺-ATPases. *Biophys. J.* 96, 3850–3861. doi:10.1016/j.bpj.2009.02.026
- Orlova, M., Kanter, E., Krakovich, D., Kuchin, S., 2006. Nitrogen Availability and TOR Regulate the Snf1 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* 5, 1831–1837. doi:10.1128/EC.00110-06
- Özalp, V.C., Pedersen, T.R., Nielsen, L.J., Olsen, L.F., 2010. Time-resolved Measurements of Intracellular ATP in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* using a New Type of Nanobiosensor. *J. Biol. Chem.* 285, 37579–37588. doi:10.1074/jbc.M110.155119
- Özcan, S., Dover, J., Johnston, M., 1998. Glucose sensing and signaling by two glucose receptors in the yeast

- Saccharomyces cerevisiae*. EMBO J. 17, 2566–2573. doi:10.1093/emboj/17.9.2566
- Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A.G., Wöfl, S., Johnston, M., 1996a. Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. 93, 12428–12432.
- Özcan, S., Johnston, M., 1995. Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. Mol. Cell. Biol. 15, 1564–1572.
- Özcan, S., Johnston, M., 1996. Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose. Mol. Cell. Biol. 16, 5536–5545.
- Özcan, S., Johnston, M., 1999. Function and regulation of yeast hexose transporters. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63, 554–569.
- Özcan, S., Leong, T., Johnston, M., 1996b. Rgt1p of *Saccharomyces cerevisiae*, a key regulator of glucose-induced genes, is both an activator and a repressor of transcription. Mol. Cell. Biol. 16, 6419–6426.
- Palomino, A., Herrero, P., Moreno, F., 2005. Rgt1, a glucose sensing transcription factor, is required for transcriptional repression of the *HXX2* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. Biochem. J. 388, 697.
- Palomino, A., Herrero, P., Moreno, F., 2006. Tpk3 and Snf1 protein kinases regulate Rgt1 association with *Saccharomyces cerevisiae* *HXX2* promoter. Nucleic Acids Res. 34, 1427–1438. doi:10.1093/nar/gkl028
- Pandit, S., Kim, J.-E., Jung, K.-H., Chang, K.-W., Jeon, J.-G., 2011. Effect of sodium fluoride on the virulence factors and composition of *Streptococcus mutans* biofilms. Arch. Oral Biol. 56, 643–649. doi:10.1016/j.archoralbio.2010.12.012
- Panek, H.R., Stepp, J.D., Engle, H.M., Marks, K.M., Tan, P.K., Lemmon, S.K., Robinson, L.C., 1997. Suppressors of *YCK*-encoded yeast casein kinase 1 deficiency define the four subunits of a novel clathrin AP-like complex. EMBO J. 16, 4194–4204.
- Pao, S.S., Paulsen, I.T., Saier, M.H., 1998. Major Facilitator Superfamily. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 1–34.
- Papamichos-Chronakis, M., Gligoris, T., Tzamarias, D., 2004. The Snf1 kinase controls glucose repression in yeast by modulating interactions between the Mig1 repressor and the Cyc8-Tup1 co-repressor. EMBO Rep. 5, 368–372. doi:10.1038/sj.embor.7400120
- Paquin, N., Ménade, M., Poirier, G., Donato, D., Drouet, E., Chartrand, P., 2007. Local Activation of Yeast *ASH1* mRNA Translation through Phosphorylation of Khd1p by the Casein Kinase Yck1p. Mol. Cell 26, 795–809. doi:10.1016/j.molcel.2007.05.016
- Parris, G.E., 2008. 2-Deoxy-d-glucose as a potential drug against fusogenic viruses including HIV. Med. Hypotheses 70, 776–782. doi:10.1016/j.mehy.2007.08.021
- Pasula, S., Chakraborty, S., Choi, J.H., Kim, J.-H., 2010. Role of casein kinase 1 in the glucose sensor-mediated signaling pathway in yeast. BMC Cell Biol. 11, 17. doi:10.1186/1471-2121-11-17
- Pasula, S., David Jouandot, I.I., Kim, J.H., 2007. Biochemical evidence for glucose-independent induction of HXT expression in *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett. 581, 3230.
- Pathania, D., Millard, M., Neamati, N., 2009. Opportunities in discovery and delivery of anticancer drugs targeting mitochondria and cancer cell metabolism. Adv. Drug Deliv. Rev. 61, 1250–1275. doi:10.1016/j.addr.2009.05.010
- Peláez, R., Herrero, P., Moreno, F., 2009. Nuclear Export of the Yeast Hexokinase 2 Protein Requires the Xpo1 (Crm1)-dependent Pathway. J. Biol. Chem. 284, 20548–20555. doi:10.1074/jbc.M109.013730
- Peláez, R., Herrero, P., Moreno, F., 2010. Functional domains of yeast hexokinase 2. Biochem. J. 432, 181–190. doi:10.1042/BJ20100663
- Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R.-H., Huang, P., 2006. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. Oncogene 25, 4633–4646. doi:10.1038/sj.onc.1209597
- Petit, T., Diderich, J.A., Kruckeberg, A.L., Gancedo, C., Van Dam, K., 2000. Hexokinase Regulates Kinetics of Glucose Transport and Expression of Genes Encoding Hexose Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 182, 6815–6818.
- Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. Nucleic Acids Res. 29, e45–e45.
- Pirollo, J.S., Allen, D.G., 1986. Assessment of techniques for preventing glycolysis in cardiac muscle. Cardiovasc. Res. 20, 837–844. doi:10.1093/cvr/20.11.837
- Polish, J.A., Kim, J.-H., Johnston, M., 2005. How the Rgt1 Transcription Factor of *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by Glucose. Genetics 169, 583–594. doi:10.1534/genetics.104.034512
- Polupanov, A.S., Nazarko, V.Y., Sibirny, A.A., 2012. Gss1 protein of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* is involved in glucose sensing, pexophagy and catabolite repression. Int. J. Biochem. Cell Biol. 44, 1906–1918. doi:10.1016/j.biocel.2012.07.017
- Polupanov, A.S., Sibirny, A.A., 2013. Cytoplasmic extension peptide of *Pichia pastoris* glucose sensor Gss1 is not compulsory required for glucose signaling. Cell Biol. Int. doi:10.1002/cbin.10189
- Portela, P., Moreno, S., Rossi, S., 2006. Characterization of yeast pyruvate kinase 1 as a protein kinase A substrate, and specificity of the phosphorylation site sequence in the whole protein. Biochem. J. 396, 117. doi:10.1042/BJ20051642
- Prior, C., Mamessier, P., Fukuhara, H., Chen, X.J., Wesolowski-Louvel, M., 1993. The hexokinase gene is

- required for transcriptional regulation of the glucose transporter gene *RAG1* in *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Cell Biol.* 13, 3882–3889.
- Prochasson, P., Neely, K.E., Hassan, A.H., Li, B., Workman, J.L., 2003. Targeting Activity Is Required for SWI/SNF Function In Vivo and Is Accomplished through Two Partially Redundant Activator-Interaction Domains. *Mol. Cell* 12, 983–990. doi:10.1016/S1097-2765(03)00366-6
- Ptacek, J., Devgan, G., Michaud, G., Zhu, H., Zhu, X., Fasolo, J., Guo, H., Jona, G., Breitkreutz, A., Sopko, R., 2005. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* 438, 679–684.
- Purnapatre, K., Gray, M., Piccirillo, S., Honigberg, S.M., 2005. Glucose Inhibits Meiotic DNA Replication through SCF^{Grr1}-p-Dependent Destruction of Ime2p Kinase. *Mol. Cell Biol.* 25, 440–450. doi:10.1128/MCB.25.1.440-450.2005
- Quistgaard, E.M., Löw, C., Moberg, P., Trésaugues, L., Nordlund, P., 2013. Structural basis for substrate transport in the GLUT-homology family of monosaccharide transporters. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 766–768. doi:10.1038/nsmb.2569
- Radivojac, P., Vacic, V., Haynes, C., Cocklin, R.R., Mohan, A., Heyen, J.W., Goebel, M.G., Iakoucheva, L.M., 2010. Identification, analysis, and prediction of protein ubiquitination sites. *Proteins* 78, 365–380. doi:10.1002/prot.22555
- Raez, L.E., Papadopoulos, K., Ricart, A.D., Chiorean, E.G., Dipaola, R.S., Stein, M.N., Rocha Lima, C.M., Schlesselman, J.J., Tolba, K., Langmuir, V.K., Kroll, S., Jung, D.T., Kurtoglu, M., Rosenblatt, J., Lampidis, T.J., 2013. A phase I dose-escalation trial of 2-deoxy-D-glucose alone or combined with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 71, 523–530. doi:10.1007/s00280-012-2045-1
- Ralsler, M., Wameling, M.M., Struys, E.A., Joppich, C., Krobitsch, S., Jakobs, C., Lehrach, H., 2008. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 17807.
- Randez-Gil, F., Blasco, A., Prieto, J.A., Sanz, P., 1995a. DOGR1 and DOGR2: two genes from *Saccharomyces cerevisiae* that confer 2-deoxyglucose resistance when overexpressed. *Yeast* 11, 1233–1240. doi:10.1002/yea.320111303
- Randez-Gil, F., Herrero, P., Sanz, P., Prieto, J.A., Moreno, F., 1998a. Hexokinase PII has a double cytosolic-nuclear localisation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 425, 475–478. doi:10.1016/S0014-5793(98)00289-0
- Randez-Gil, F., Prieto, J.A., Sanz, P., 1995b. The expression of a specific 2-deoxyglucose-6P phosphatase prevents catabolite repression mediated by 2-deoxyglucose in yeast. *Curr. Genet.* 28, 101–107.
- Randez-Gil, F., Sanz, P., Entian, K.-D., Prieto, J.A., 1998b. Carbon Source-Dependent Phosphorylation of Hexokinase PII and Its Role in the Glucose-Signaling Response in Yeast. *Mol. Cell Biol.* 18, 2940–2948.
- Rasband, W.S., 1997. ImageJ. U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.
- R Core Team, 2012. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rechsteiner, M., Rogers, S.W., 1996. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 21, 267–271.
- Reddi, A.R., Culotta, V.C., 2013. SOD1 integrates signals from oxygen and glucose to repress respiration. *Cell* 152, 224–235. doi:10.1016/j.cell.2012.11.046
- Reibstein, D., den Hollander, J.A., Pilkis, S.J., Shulman, R.G., 1986. Studies on the regulation of yeast phosphofructo-1-kinase: its role in aerobic and anaerobic glycolysis. *Biochemistry (Mosc.)* 25, 219–227.
- Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M., 1997. Kinetic Characterization of Individual Hexose Transporters of *Saccharomyces Cerevisiae* and their Relation to the Triggering Mechanisms of Glucose Repression. *Eur. J. Biochem.* 245, 324–333. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00324.x
- Richard, P., 2003. The rhythm of yeast. *FEMS Microbiol. Rev.* 27, 547–557.
- Rigamonte, T.A., Silveira, W.B., Fietto, L.G., Castro, I.M., Breunig, K.D., Passos, F.M.L., 2011. Restricted sugar uptake by sugar-induced internalization of the yeast lactose/galactose permease Lac12. *FEMS Yeast Res.* 11, 243–251. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00709.x
- Ringel, A.E., Ryznar, R., Picariello, H., Huang, K., Lazarus, A.G., Holmes, S.G., 2013. Yeast Tdh3 (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) Is a Sir2-Interacting Factor That Regulates Transcriptional Silencing and rDNA Recombination. *PLoS Genet* 9, e1003871. doi:10.1371/journal.pgen.1003871
- Rizzetto, L., Zanni, E., Uccelletti, D., Ferrero, I., Goffrini, P., 2012. Extension of Chronological Lifespan by Hexokinase Mutation in *Kluyveromyces lactis* Involves Increased Level of the Mitochondrial Chaperonin Hsp60. *J. Aging Res.* 2012, 1–10. doi:10.1155/2012/946586
- Robinson, K.A., Lopes, J.M., 2000. Survey and Summary: *Saccharomyces cerevisiae* basic helix-loop-helix proteins regulate diverse biological processes. *Nucleic Acids Res.* 28, 1499–1505.
- Robinson, L.C., Bradley, C., Bryan, J.D., Jerome, A., Kweon, Y., Panek, H.R., 1999. The Yck2 yeast casein kinase 1 isoform shows cell cycle-specific localization to sites of polarized growth and is required for proper septin organization. *Mol. Biol. Cell* 10, 1077–1092.
- Robinson, L.C., Hubbard, E.J., Graves, P.R., DePaoli-Roach, A.A., Roach, P.J., Kung, C., Haas, D.W., Hagedorn, C.H., Goebel, M., Culbertson, M.R., 1992. Yeast casein kinase I homologues: an essential gene pair. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 28.

- Robinson, L.C., Menold, M.M., Garrett, S., Culbertson, M.R., 1993. Casein kinase I-like protein kinases encoded by *YCK1* and *YCK2* are required for yeast morphogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2870–2881.
- Rodríguez, A., De La Cera, T., Herrero, P., Moreno, F., 2001. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *GLK1*, *HXX1* and *HXX2* genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 355, 625–631.
- Rogers, S., Wells, R., Rechsteiner, M., 1986. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* 234, 364–368.
- Rolland, F., De Winde, J.H., Lemaire, K., Boles, E., Thevelein, J.M., Winderickx, J., 2000. Glucose-induced cAMP signalling in yeast requires both a G-protein coupled receptor system for extracellular glucose detection and a separable hexose kinase-dependent sensing process. *Mol. Microbiol.* 38, 348–358. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02125.x
- Rolland, S., Hnatova, M., Lemaire, M., Leal-Sanchez, J., Wesolowski-Louvel, M., 2006. Connection between the Rag4 glucose sensor and the *K/Rgt1* repressor in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* 174, 617–626. doi:10.1534/genetics.106.059766
- Rosas-Lemus, M., Uribe-Alvarez, C., Chiquete-Félix, N., Uribe-Carvajal, S., 2014. In *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphate contributes to the Crabtree effect through closure of the mitochondrial unspecific channel. *Arch. Biochem. Biophys.* 555–556, 66–70. doi:10.1016/j.abb.2014.05.027
- Roth, A.F., Davis, N.G., 2000. Ubiquitination of the PEST-like Endocytosis Signal of the Yeast α -Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* 275, 8143–8153. doi:10.1074/jbc.275.11.8143
- Roth, A.F., Feng, Y., Chen, L., Davis, N.G., 2002. The yeast DHHC cysteine-rich domain protein *Akr1p* is a palmitoyl transferase. *J. Cell Biol.* 159, 23–28. doi:10.1083/jcb.200206120
- Roth, A.F., Papanayotou, I., Davis, N.G., 2011. The yeast kinase *Yck2* has a tripartite palmitoylation signal. *Mol. Biol. Cell* 22, 2702–2715. doi:10.1091/mbc.E11-02-0115
- Roy, A., Jouandot, D., Cho, K.H., Kim, J.-H., 2014a. Understanding the mechanism of glucose-induced relief of *Rgt1*-mediated repression in yeast. *FEBS Open Bio* 4, 105–111. doi:10.1016/j.fob.2013.12.004
- Roy, A., Kim, J.-H., 2014. Endocytosis and Vacuolar Degradation of the Yeast Cell Surface Glucose Sensors *Rgt2* and *Snf3*. *J. Biol. Chem.* 289, 7247–7256. doi:10.1074/jbc.M113.539411
- Roy, A., Kim, Y.-B., Cho, K.H., Kim, J.-H., 2014b. Glucose starvation-induced turnover of the yeast glucose transporter *Hxt1*. *Biochim. Biophys. Acta.* doi:10.1016/j.bbagen.2014.05.004
- Roy, A., Shin, Y.J., Cho, K.H., Kim, J.-H., 2013a. *Mth1* regulates the interaction between the *Rgt1* repressor and the *Ssn6-Tup1* corepressor complex by modulating PKA-dependent phosphorylation of *Rgt1*. *Mol. Biol. Cell* 24, 1493–1503. doi:10.1091/mbc.E13-01-0047
- Roy, A., Shin, Y.J., Kim, J.-H., 2013b. Construction of yeast strains useful for screening drugs that inhibit glucose uptake and glycolysis. *Anal. Biochem.* 436, 53–54. doi:10.1016/j.ab.2013.01.013
- Royt, P.W., 1983. Asymmetry of glucose transport in the yeast, *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta* 728, 363–370.
- Rubenstein, E.M., McCartney, R.R., Zhang, C., Shokat, K.M., Shirra, M.K., Arndt, K.M., Schmidt, M.C., 2008. Access denied: *Snf1* activation loop phosphorylation is controlled by availability of the phosphorylated threonine 210 to the PP1 phosphatase. *J. Biol. Chem.* 283, 222–230. doi:10.1074/jbc.M707957200
- Ruiz, A., Xu, X., Carlson, M., 2011. Roles of two protein phosphatases, *Reg1-Glc7* and *Sit4*, and glycogen synthesis in regulation of *SNF1* protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6349–6354. doi:10.1073/pnas.1102758108
- Ruiz, A., Xu, X., Carlson, M., 2013. *Ptc1* Protein Phosphatase 2C Contributes to Glucose Regulation of *SNF1/AMP-activated Protein Kinase (AMPK)* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* jbc.M113.503763. doi:10.1074/jbc.M113.503763
- Sabina, J., Johnston, M., 2009. Asymmetric Signal Transduction through Paralogs That Comprise a Genetic Switch for Sugar Sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 284, 29635–29643. doi:10.1074/jbc.M109.032102
- Saliola, M., Scappucci, G., De Maria, I., Lodi, T., Mancini, P., Falcone, C., 2006. Deletion of the Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Gene *KIZWF1* Affects both Fermentative and Respiratory Metabolism in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* 6, 19–27. doi:10.1128/EC.00189-06
- Saliola, M., Tramonti, A., Lanini, C., Cialfi, S., De Biase, D., Falcone, C., 2012. Intracellular NADPH levels affect the oligomeric state of the glucose 6-phosphate dehydrogenase. *Eukaryot. Cell.* doi:10.1128/EC.00211-12
- Santangelo, G.M., 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282.
- Sanz, P., Alms, G.R., Haystead, T.A.J., Carlson, M., 2000. Regulatory Interactions between the *Reg1-Glc7* Protein Phosphatase and the *Snf1* Protein Kinase. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1321–1328. doi:10.1128/MCB.20.4.1321-1328.2000
- Sanz, P., Rande-Gil, F., Prieto, J.A., 1994. Molecular characterization of a gene that confers 2-deoxyglucose resistance in yeast. *Yeast* 10, 1195–1202. doi:10.1002/yea.320100907
- Sato, T., Lopez, M.C., Sugioka, S., Jigami, Y., Baker, H.V., Uemura, H., 1999. The E-box DNA binding protein *Sgc1p* suppresses the *gcr2* mutation, which is involved in transcriptional activation of glycolytic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*
- Scheffler, I.E., de la Cruz, B.J., Prieto, S., 1998. Control of mRNA turnover as a mechanism of glucose repression in

- Saccharomyces cerevisiae*. Int. J. Biochem. Cell Biol. 30, 1175–1193. doi:10.1016/S1357-2725(98)00086-7
- Scheie, A.A., Assev, S., Rölla, G., 1988. Combined effect of xylitol, NaF and ZnCl₂ on growth and metabolism of *Streptococcus sobrinus* OMZ 176. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 96, 761–767.
- Schmelzle, T., Beck, T., Martin, D.E., Hall, M.N., 2004. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. Mol. Cell. Biol. 24, 338–351. doi:10.1128/MCB.24.1.338-351.2004
- Schmidt, M.C., McCartney, R.R., Zhang, X., Tillman, T.S., Solimeo, H., Wöfl, S., Almonte, C., Watkins, S.C., 1999. Std1 and Mth1 proteins interact with the glucose sensors to control glucose-regulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 19, 4561–4571.
- Schmidt, M.M., 2009. Differential effects of iodoacetamide and iodoacetate on glycolysis and glutathione metabolism of cultured astrocytes. Front. Neuroenergetics 1. doi:10.3389/neuro.14.001.2009
- Schüller, H.-J., 2003. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Curr. Genet. 43, 139–160. doi:10.1007/s00294-003-0381-8
- Schulz, T.J., Zarse, K., Voigt, A., Urban, N., Birringer, M., Ristow, M., 2007. Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress. Cell Metab. 6, 280–293. doi:10.1016/j.cmet.2007.08.011
- Schuster, M.K., Grabner, M., 1986. epepfind. Austrian National EMBnet node.
- Senac, T., Hahn-Hägerdal, B., 1990. Intermediary Metabolite Concentrations in Xylulose- and Glucose-Fermenting *Saccharomyces cerevisiae* Cells. Appl. Environ. Microbiol. 56, 120–126.
- Sexton, J.A., Brown, V., Johnston, M., 2007. Regulation of sugar transport and metabolism by the *Candida albicans* Rgt1 transcriptional repressor. Yeast 24, 847–860. doi:10.1002/yea.1514
- Shirai, T., Matsuda, F., Okamoto, M., Kondo, A., 2013. Evaluation of control mechanisms for *Saccharomyces cerevisiae* central metabolic reactions using metabolome data of eight single-gene deletion mutants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 3569–3577. doi:10.1007/s00253-012-4597-8
- Sikorski, R.S., Hieter, P., 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics 122, 19–27.
- Silva, A., Almeida, B., Sampaio-Marques, B., Reis, M.I.R., Ohlmeier, S., Rodrigues, F., Vale, A. do, Ludovico, P., 2011. Glycerolaldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) is a specific substrate of yeast metacaspase. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res. 1813, 2044–2049. doi:10.1016/j.bbamcr.2011.09.010
- Silveira, M.C., Carvajal, E., Bon, E.P., 1996. Assay for *in vivo* yeast invertase activity using NaF. Anal. Biochem. 238, 26–28. doi:10.1006/abio.1996.0244
- Simpson-Lavy, K.J., Johnston, M., 2013. SUMOylation regulates the SNF1 protein kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. 201304839. doi:10.1073/pnas.1304839110
- Singh, D., Banerji, A.K., Dwarakanath, B.S., Tripathi, R.P., Gupta, J.P., Mathew, T.L., Ravindranath, T., Jain, V., 2005. Optimizing Cancer Radiotherapy with 2-Deoxy-D-Glucose. Strahlenther. Onkol. 181, 507–514. doi:10.1007/s00066-005-1320-z
- Sirover, M.A., 1999. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta BBA - Protein Struct. Mol. Enzymol. 1432, 159–184. doi:10.1016/S0167-4838(99)00119-3
- Skowrya, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., Harper, J.W., 1997. F-Box Proteins Are Receptors that Recruit Phosphorylated Substrates to the SCF Ubiquitin-Ligase Complex. Cell 91, 209–219. doi:10.1016/S0092-8674(00)80403-1
- Skowrya, D., Koepp, D.M., Kamura, T., Conrad, M.N., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Elledge, S.J., Harper, J.W., 1999. Reconstitution of G1 Cyclin Ubiquitination with Complexes Containing SCF^{Grr1} and Rbx1. Science 284, 662–665. doi:10.1126/science.284.5414.662
- Smallbone, K., Messiha, H.L., Carroll, K.M., Winder, C.L., Malys, N., Dunn, W.B., Murabito, E., Swainston, N., Dada, J.O., Khan, F., Pir, P., Simeonidis, E., Spasić, I., Wishart, J., Weichart, D., Hayes, N.W., Jameson, D., Broomhead, D.S., Oliver, S.G., Gaskell, S.J., McCarthy, J.E.G., Paton, N.W., Westerhoff, H.V., Kell, D.B., Mendes, P., 2013. A model of yeast glycolysis based on a consistent kinetic characterisation of all its enzymes. FEBS Lett. 587, 2832–2841. doi:10.1016/j.febslet.2013.06.043
- Smith, R.L., Johnson, A.D., 2000. Turning genes off by Ssn6–Tup1: a conserved system of transcriptional repression in eukaryotes. Trends Biochem. Sci. 25, 325–330. doi:10.1016/S0968-0004(00)01592-9
- Snowdon, C., Hlynyaluk, C., Van Der Merwe, G., 2008. Components of the Vid30c are needed for the rapamycin-induced degradation of the high-affinity hexose transporter Hxt7p in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Yeast Res. 8, 204–216. doi:10.1111/j.1567-1364.2007.00327.x
- Snowdon, C., Schierholtz, R., Poliszczuk, P., Hughes, S., Van Der Merwe, G., 2009. ETP1/YHL010c is a novel gene needed for the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. FEMS Yeast Res. 9, 372–380. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00497.x
- Snowdon, C., van der Merwe, G., 2012. Regulation of Hxt3 and Hxt7 turnover converges on the Vid30 Complex and requires inactivation of the Ras/cAMP/PKA pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. PLoS ONE 7, e50458. doi:10.1371/journal.pone.0050458

- Souza, A.A., Miranda, M.N., da Silva, S.F., Bozaquel-Morais, B., Masuda, C.A., Ghislain, M., Montero-Lomelí, M., 2012. Expression of the glucose transporter *HXT1* involves the Ser-Thr protein phosphatase Sit4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 12, 907–917. doi:10.1111/j.1567-1364.2012.00839.x
- Spielewoy, N., Flick, K., Kalashnikova, T.I., Walker, J.R., Wittenberg, C., 2004. Regulation and Recognition of SCF^{Grr1} Targets in the Glucose and Amino Acid Signaling Pathways. *Mol. Cell. Biol.* 24, 8994–9005.
- Stasyk, O.G., Maidan, M.M., Stasyk, O.V., Dijck, P.V., Thevelein, J.M., Sibirny, A.A., 2008. Identification of hexose transporter-like sensor *HXS1* and functional hexose transporter *HXT1* in the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Eukaryot. Cell* 7, 735–746. doi:10.1128/EC.00028-08
- Stasyk, O.V., Stasyk, O.G., Komduur, J., Veenhuis, M., Cregg, J.M., Sibirny, A.A., 2004. A Hexose Transporter Homologue Controls Glucose Repression in the Methylotrophic Yeast *Hansenula polymorpha*. *J. Biol. Chem.* 279, 8116–8125. doi:10.1074/jbc.M310960200
- Stoltzman, C.A., Peterson, C.W., Breen, K.T., Muoio, D.M., Billin, A.N., Ayer, D.E., 2008. Glucose sensing by MondoA:Mix complexes: A role for hexokinases and direct regulation of thioredoxin-interacting protein expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 6912–6917. doi:10.1073/pnas.0712199105
- Storici, F., Lewis, L.K., Resnick, M.A., 2001. *In vivo* site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* 19, 773–776.
- Sträter, N., Marek, S., Kuettner, E.B., Kloos, M., Keim, A., Brüser, A., Kirchberger, J., Schöneberg, T., 2011. Molecular architecture and structural basis of allosteric regulation of eukaryotic phosphofructokinases. *FASEB J.* 25, 89–98. doi:10.1096/fj.10-163865
- Sudarsanam, P., Iyer, V.R., Brown, P.O., Winston, F., 2000. Whole-genome expression analysis of *snf/swi* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 3364–3369.
- Sun, L., Zeng, X., Yan, C., Sun, X., Gong, X., Rao, Y., Yan, N., 2012. Crystal structure of a bacterial homologue of glucose transporters GLUT1-4. *Nature* 490, 361–366. doi:10.1038/nature11524
- Tarrío, N., Becerra, M., Cerdán, M.E., Siso, M.I.G., 2006a. Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 6, 371–380. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00021.x
- Tarrío, N., Cerdán, M.E., Siso, M.I.G., 2006b. Characterization of the second external alternative dehydrogenase from mitochondria of the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1757, 1476–1484. doi:10.1016/j.bbabi.2006.09.002
- Tarrío, N., Díaz Prado, S., Cerdán, M.E., González Siso, M.I., 2005. The nuclear genes encoding the internal (*KIND1*) and external (*KINDE1*) alternative NAD(P)H: ubiquinone oxidoreductases of mitochondria from *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1707, 199–210. doi:10.1016/j.bbabi.2004.12.008
- Theobald, U., Mailinger, W., Baltes, M., Rizzi, M., Reuss, M., 1997. *In vivo* analysis of metabolic dynamics in *Saccharomyces cerevisiae*: I. Experimental observations. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 305–316. doi:10.1002/(SICI)1097-0290(19970720)55:2<305::AID-BIT8>3.0.CO;2-M
- Thorens, B., 2004. Mechanisms of glucose sensing and multiplicity of glucose sensors. *Ann. Endocrinol.* 65, 9–12.
- Tizzani, L., Meacock, P., Frontali, L., Wésolowski-Louvel, M., 1998. The *RAG3* gene of *Kluyveromyces lactis* is involved in the transcriptional regulation of genes coding for enzymes implicated in pyruvate utilization and genes of the biosynthesis of thiamine pyrophosphate. *FEMS Microbiol. Lett.* 168, 25–30.
- Tomás-Cobos, L., Casadomé, L., Mas, G., Sanz, P., Posas, F., 2004. Expression of the *HXT1* Low Affinity Glucose Transporter Requires the Coordinated Activities of the HOG and Glucose Signalling Pathways. *J. Biol. Chem.* 279, 22010–22019. doi:10.1074/jbc.M400609200
- Tomás-Cobos, L., Sanz, P., 2002. Active Snf1 protein kinase inhibits expression of the *Saccharomyces cerevisiae HXT1* glucose transporter gene. *Biochem. J.* 368, 657.
- Tomás-Cobos, L., Viana, R., Sanz, P., 2005. TOR kinase pathway and 14-3-3 proteins regulate glucose-induced expression of *HXT1*, a yeast low-affinity glucose transporter. *Yeast* 22, 471–479. doi:10.1002/yea.1224
- Uemura, H., Jigami, Y., 1992. Role of *GCR2* in transcriptional activation of yeast glycolytic genes. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3834–3842.
- Vagnoli, P., Coons, D.M., Bisson, L.F., 1998. The C-terminal domain of Snf3p mediates glucose-responsive signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 160, 31–36.
- Vancura, A., Sessler, A., Leichus, B., Kuret, J., 1994. A prenylation motif is required for plasma membrane localization and biochemical function of casein kinase I in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 269, 19271–19278.
- Vandamme, J., Castermans, D., Thevelein, J.M., 2012. Molecular mechanisms of feedback inhibition of protein kinase A on intracellular cAMP accumulation. *Cell. Signal.* 24, 1610–1618. doi:10.1016/j.cellsig.2012.04.001
- Van Oevelen, C.J.C., Teeffelen, H.A.A.M. van, Werven, F.J. van, Timmers, H.T.M., 2006. Snf1p-dependent Spt-Ada-Gcn5-acetyltransferase (SAGA) Recruitment and Chromatin Remodeling Activities on the *HXT2* and *HXT4* Promoters. *J. Biol. Chem.* 281, 4523–4531. doi:10.1074/jbc.M509330200
- Van Suylekom, D., van Donselaar, E., Blanchetot, C., Do Ngoc, L.N., Humbel, B.M., Boonstra, J., 2007. Degradation of the hexose transporter Hxt5p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol. Cell* 99, 13–23. doi:10.1042/BC20060040

- Varanasi, U.S., Klis, M., Mikesell, P.B., Trumbly, R.J., 1996. The Cyc8 (Ssn6)-Tup1 corepressor complex is composed of one Cyc8 and four Tup1 subunits. *Mol. Cell Biol.* 16, 6707–6714.
- Varma, A., Singh, B.B., Karnani, N., Lichtenberg-Fraté, H., Höfer, M., Magee, B.B., Prasad, R., 2000. Molecular cloning and functional characterisation of a glucose transporter, *CaHGT1*, of *Candida albicans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 182, 15–21.
- Verho, R., Richard, P., Jonson, P.H., Sundqvist, L., Londesborough, J., Penttilä, M., 2002. Identification of the First Fungal NADP-GAPDH from *Kluyveromyces lactis*. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 13833–13838. doi:10.1021/bi0265325
- Vincent, O., Townley, R., Kuchin, S., Carlson, M., 2001. Subcellular localization of the Snf1 kinase is regulated by specific beta subunits and a novel glucose signaling mechanism. *Genes Dev.* 15, 1104–1114. doi:10.1101/gad.879301
- Visser, D., van Zuylen, G.A., van Dam, J.C., Eman, M.R., Pröll, A., Ras, C., Wu, L., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J., 2004. Analysis of *in vivo* kinetics of glycolysis in aerobic *Saccharomyces cerevisiae* by application of glucose and ethanol pulses. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 157–167. doi:10.1002/bit.20235
- Vollert, C.S., Uetz, P., 2004. The Phox Homology (PX) Domain Protein Interaction Network in Yeast. *Mol. Cell Proteomics* 3, 1053–1064. doi:10.1074/mcp.M400081-MCP200
- Walther, T., Mtimet, N., Alkim, C., Vax, A., Loret, M.-O., Ullah, A., Gancedo, C., Smits, G., François, J.M., 2013. Metabolic phenotypes of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with altered trehalose-6-phosphate dynamics. *Biochem. J.* doi:10.1042/BJ20130587
- Walther, T., Novo, M., Rössger, K., Létisse, F., Loret, M.-O., Portais, J.-C., François, J.-M., 2010. Control of ATP homeostasis during the respiro-fermentative transition in yeast. *Mol. Syst. Biol.* 6. doi:10.1038/msb.2009.100
- Wang, R., Solomon, M.J., 2012. Identification of She3 as an SCF^{Grr1} Substrate in Budding Yeast. *PLoS ONE* 7, e48020. doi:10.1371/journal.pone.0048020
- Wang, Y., Pierce, M., Schnepfer, L., Güldal, C.G., Zhang, X., Tavazoie, S., Broach, J.R., 2004. Ras and Gpa2 Mediate One Branch of a Redundant Glucose Signaling Pathway in Yeast. *PLoS Biol* 2, e128. doi:10.1371/journal.pbio.0020128
- Webb, J.L., 1966. Enzyme and metabolic inhibitors. New York, Academic Press.
- Weinert, B.T., Iesmantavicius, V., Moustafa, T., Schölz, C., Wagner, S.A., Magnes, C., Zechner, R., Choudhary, C., 2014. Acetylation dynamics and stoichiometry in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Syst. Biol.* 10. doi:10.1002/msb.134766
- Weinert, B.T., Schölz, C., Wagner, S.A., Iesmantavicius, V., Su, D., Daniel, J.A., Choudhary, C., 2013. Lysine Succinylation Is a Frequently Occurring Modification in Prokaryotes and Eukaryotes and Extensively Overlaps with Acetylation. *Cell Rep.* 4, 842–851. doi:10.1016/j.celrep.2013.07.024
- Weirich, J., Goffrini, P., Kuger, P., Ferrero, I., Breunig, K.D., 1997. Influence of Mutations in Hexose-Transporter Genes on Glucose Repression in *Kluyveromyces lactis*. *Eur. J. Biochem.* 249, 248–257. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.t01-1-00248.x
- Wellen, K.E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U.M., Bui, T.V., Cross, J.R., Thompson, C.B., 2009. ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation. *Science* 324, 1076–1080. doi:10.1126/science.1164097
- Wellen, K.E., Lu, C., Mancuso, A., Lemons, J.M.S., Ryczko, M., Dennis, J.W., Rabinowitz, J.D., Collier, H.A., Thompson, C.B., 2010. The hexosamine biosynthetic pathway couples growth factor-induced glutamine uptake to glucose metabolism. *Genes Dev.* 24, 2784–2799. doi:10.1101/gad.1985910
- Wésolowski-Louvel, M., 2011. An efficient method to optimize *Kluyveromyces lactis* gene targeting. *FEMS Yeast Res.* 11, 509–513. doi:10.1111/j.1567-1364.2011.00741.x
- Wésolowski-Louvel, M., Goffrini, P., Ferrero, I., Fukuhara, H., 1992a. Glucose transport in the yeast *Kluyveromyces lactis*. I. Properties of an inducible low-affinity glucose transporter gene. *Mol. Gen. Genet.* 233, 89–96.
- Wésolowski-Louvel, M., Prior, C., Bornecque, D., Fukuhara, H., 1992b. Rag-mutations involved in glucose metabolism in yeast: Isolation and genetic characterization. *Yeast* 8, 711–719. doi:10.1002/yea.320080904
- Westergaard, S.L., Bro, C., Olsson, L., Nielsen, J., 2004. Elucidation of the role of Grr1p in glucose sensing by *Saccharomyces cerevisiae* through genome-wide transcription analysis. *FEMS Yeast Res.* 5, 193–204. doi:10.1016/j.femsyr.2004.06.013
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P., Boles, E., 1999. Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 464, 123–128. doi:10.1016/S0014-5793(99)01698-1
- Wiedemuth, C., Breunig, K.D., 2005. Role of Snf1p in Regulation of Intracellular Sorting of the Lactose and Galactose Transporter Lac12p in *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot. Cell* 4, 716–721. doi:10.1128/EC.4.4.716-721.2005
- Willems, A.R., Schwab, M., Tyers, M., 2004. A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res., The Ubiquitin-Proteasome System* 1695, 133–170. doi:10.1016/j.bbamcr.2004.09.027
- Williamson, T., Schwartz, J.-M., Kell, D.B., Stateva, L., 2009. Deterministic mathematical models of the cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Syst. Biol.* 3, 70. doi:10.1186/1752-0509-3-70
- Winkler, A.A., Goedegebure, R.H.G.A., Zonneveld, B.J.M., Steensma, H.Y., Hooykaas, P.J.J., 2000. Isolation and partial characterization of the *Kluyveromyces lactis*

- homologue of *SKP1*. *Curr. Genet.* 38, 8–16.
doi:10.1007/s002940000128
- Wolfe, K.H., Shields, D.C., others, 1997. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387, 708–712.
- Wong, K.H., Struhl, K., 2011. The Cyc8-Tup1 complex inhibits transcription primarily by masking the activation domain of the recruiting protein. *Genes Dev.* 25, 2525–2539. doi:10.1101/gad.179275.111
- Wright, E.M., Loo, D.D.F., Hirayama, B.A., 2011. Biology of Human Sodium Glucose Transporters. *Physiol. Rev.* 91, 733–794. doi:10.1152/physrev.00055.2009
- Xiao, B., Heath, R., Saiu, P., Leiper, F.C., Leone, P., Jing, C., Walker, P.A., Haire, L., Eccleston, J.F., Davis, C.T., Martin, S.R., Carling, D., Gamblin, S.J., 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature* 449, 496–500.
doi:10.1038/nature06161
- Xu, R., Pelicano, H., Zhou, Y., Carew, J.S., Feng, L., Bhalla, K.N., Keating, M.J., Huang, P., 2005. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells: A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. *Cancer Res.* 65, 613–621.
- Xu, Y.-F., Zhao, X., Glass, D.S., Absalan, F., Perlman, D.H., Broach, J.R., Rabinowitz, J.D., 2012. Regulation of Yeast Pyruvate Kinase by Ultrasensitive Allosteric Independent of Phosphorylation. *Mol. Cell* 48, 52–62.
doi:10.1016/j.molcel.2012.07.013
- Yan, N., 2013. Structural advances for the major facilitator superfamily (MFS) transporters. *Trends Biochem. Sci.* 38, 151–159.
doi:10.1016/j.tibs.2013.01.003
- Yasuhara, T., Ohashi, A., 1987. New chelator-sensitive proteases in matrix of yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 277–283.
doi:10.1016/S0006-291X(87)80507-7
- Yoshida, A., Wei, D., Nomura, W., Izawa, S., Inoue, Y., 2011. Reduction of glucose uptake through inhibition of hexose transporters and enhancement of their endocytosis by methylglyoxal in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 287, 701–711.
doi:10.1074/jbc.M111.322222
- Young, E.T., Dombek, K.M., Tachibana, C., Ideker, T., 2003. Multiple Pathways Are Co-regulated by the Protein Kinase Snf1 and the Transcription Factors Adr1 and Cat8. *J. Biol. Chem.* 278, 26146–26158.
doi:10.1074/jbc.M301981200
- Zachariae, W., Kuger, P., Breunig, K.D., 1993. Glucose repression of lactose/galactose metabolism in *Kluyveromyces lactis* is determined by the concentration of the transcriptional activator *LAC9 (KIGAL4)*. *Nucleic Acids Res.* 21, 69.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Schnepfer, L., Slonim, N., Broach, J.R., 2009. Glucose regulates transcription in yeast through a network of signaling pathways. *Mol. Syst. Biol.* 5, 245. doi:10.1038/msb.2009.2
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X., Broach, J.R., 2008. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42, 27–81.
doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130206
- Zhai, L., Graves, P.R., Robinson, L.C., Italiano, M., Culbertson, M.R., Rowles, J., Cobb, M.H., DePaoli-Roach, A.A., Roach, P.J., 1995. Casein kinase I gamma subfamily - molecular cloning, expression, and characterization of three mammalian isoforms and complementation of defects in the *Saccharomyces cerevisiae YCK* genes. *J. Biol. Chem.* 270, 12717–12724.
- Zheng, L., Baumann, U., Reymond, J.-L., 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* 32, e115–e115.
doi:10.1093/nar/gnh110
- Zheng, L., Roeder, R.G., Luo, Y., 2003. S Phase Activation of the Histone H2B Promoter by OCA-S, a Coactivator Complex that Contains GAPDH as a Key Component. *Cell* 114, 255–266. doi:10.1016/S0092-8674(03)00552-X
- Zimmermann, F.K., Scheel, I., 1977. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to carbon catabolite repression. *Mol. Gen. Genet.* 154, 75–82.