



HAL
open science

Étude de la voie de signalisation de la kinase TOR (Target Of Rapamycin) chez *Arabidopsis thaliana* et applications médicales

Camille Ingargiola

► **To cite this version:**

Camille Ingargiola. Étude de la voie de signalisation de la kinase TOR (Target Of Rapamycin) chez *Arabidopsis thaliana* et applications médicales. Biologie moléculaire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASB003 . tel-03921638

HAL Id: tel-03921638

<https://theses.hal.science/tel-03921638v1>

Submitted on 4 Jan 2023

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.

Étude de la voie de signalisation de la kinase TOR
(Target Of Rapamycin) chez *Arabidopsis thaliana* et
applications médicales

*Study of the TOR (Target Of Rapamycin) kinase signalling pathway in
Arabidopsis thaliana and medical applications*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°567, Sciences du Végétal : du gène à l'écosystème (SEVE)
Spécialité de doctorat : Biologie
Graduate School : BioSphERA - Biologie, Société, Ecologie & Environnement, Ressources,
Agriculture & Alimentation
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay

Thèse préparée dans l'unité de recherche **Institut Jean-Pierre Bourgin** (IJPB, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech), sous la direction de **Christian MEYER**, Directeur de recherche et le co-encadrement d'**Anne-Sophie LEPRINCE**, Maîtresse de conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 11 février 2022, par

Camille INGARGIOLA

Composition du Jury

Marianne DELARUE Professeure, IPS2, Université Paris-Saclay	Présidente
Alain BOUCHEREAU Professeur, INRAE, Université de Rennes1	Rapporteur & Examineur
Hoai-Nam TRUONG-CELLIER Chargée de Recherche, HDR, INRAE, Université de Bourgogne	Rapporteuse & Examinatrice
Sophie FILLEUR Maîtresse de Conférences, I2BC, Université Paris-Saclay	Examinatrice
Mario PENDE Directeur de Recherche, INSERM, Université Paris Descartes	Examineur
Christian MEYER Directeur de Recherche, INRAE, Université Paris-Saclay	Directeur de thèse
Anne-Sophie LEPRINCE Maîtresse de Conférences, INRAE, Sorbonne Université	Co-encadrante

Remerciements

La recherche, et plus particulièrement la thèse, c'est un travail commun. Aussi, je voudrais commencer ce manuscrit en remerciant l'ensemble des personnes qui m'ont aidée dans cette aventure.

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de thèse, Christian Meyer (alias The Boss), sans qui cette thèse n'aurait pas pu voir le jour. Christian, merci pour tes conseils avisés sur mes expériences et de m'avoir laissé l'autonomie dont j'avais besoin. Merci également pour ton aide pour la préparation de mes présentations et de ce manuscrit. Merci pour ton optimisme sans faille et pour la figurine THOR dans le bureau, je pense qu'elle a également eu un rôle dans ce travail. Un grand merci également à ma co-encadrante de thèse, Anne-Sophie Leprince. Anne-Sophie, merci pour ta gentillesse et ta pédagogie. Tu fais partie de ces enseignants qui m'ont donné goût à la biologie végétale. Je te remercie bien-sûr pour tes nombreux conseils et pour avoir toujours trouvé le temps pour que nous discutions de mon projet.

Je remercie également notre directrice d'équipe, Anne Krapp, pour m'avoir accueillie dans l'équipe et pour m'avoir appris à toujours aller au bout de mes hypothèses.

Je remercie évidemment ma collègue Isabelle Jéhanno. Merci pour ta gentillesse, ton honnêteté, tes conseils et ton aide, pour les manips et pour l'à côté. Merci également de m'avoir fait découvrir qu'en matière de thé, il n'y a pas que le thé noir :) et une pensée spéciale pour tous les mots que nous avons pu inventer, l'important c'est de se comprendre !

Merci à tous les autres membres mon équipe, Patrick Berquin, pour nos discussions du midi (notamment sur la SF ou la langue des signes avec Virginie et Isabelle) et pour ton aide sur les dosages de nitrate, Thomas Girin, pour ton dynamisme et ta passion des abeilles, Sylvie Ferrario-Méry pour tes conseils sur les expériences d'uptake et les discussions à propos de chats. Merci également à Garry Duville pour ta bonne humeur, nos discussions au labo et en dehors. Zsolt Kelemen, merci pour tes conseils en microscopie confocale et pour nos discussions du midi et merci également à Virginie Bréhaut pour ta gentillesse et ton expertise en qPCR ! Je remercie aussi Alizée Teinturier et Guillaume Sarrailhé pour votre bonne humeur.

Les équipes en labo sont également faites de départ, aussi je tiens à remercier les anciens membres de l'équipe. Un grand merci à Céline Forzani qui m'a accompagnée pendant mon stage et le début de ma thèse. Tu as initié les travaux sur le mutant *loki*, et je tiens à te remercier pour ton aide et nos nombreuses discussions philosophiques. Merci à Mathilde Grégoire, qui est devenue une vraie amie. Merci pour toutes nos

discussions sur la thèse et la vie et merci pour ton soutien. Merci également à Gustavo Turqueto-Duarte pour m'avoir fait progresser en anglais, Déborah Barbé et Elie Fernandez pour nos discussions (métalleuses) et merci aussi à Mickaël Durand.

Durant ma thèse, j'ai eu la chance de pouvoir encadrer une étudiante en stage de M1 et M2. Merci donc à Justine Broutin pour l'aide que tu m'as apportée pour les manip (et désolée pour tous les hypocotyles qu'on a dû couper dans l'obscurité !). J'ai vraiment apprécié de t'encadrer et de travailler avec toi.

Je voudrais également remercier Luc Bachelet, pour avoir toujours mis l'ambiance au labo le matin. Merci pour nos discussions matinales sur fond musical (et désolée pour toute la verrerie que j'ai pu t'apporter durant ma thèse).

Cette thèse aurait été différente sans la bonne ambiance qui règne au Bâtiment 3, je remercie donc toutes les personnes du bat3 pour y avoir participer. Merci notamment à Anne Marmagne pour la super gestion du bâtiment et l'analyse de mes expériences d'uptake. Tu as toujours été disponible quand j'en avais besoin. Merci également à Céline Masclaux-Daubresse pour son expertise sur la GS et à Rozenn Le Hir, pour avoir toujours été à l'écoute et de très bons conseils. Un grand merci aux « jeunes » du bâtiment, Garry, Thomas, Bérengère, Antoine, Nolwenn, Elie, Déborah, Alizée, Manon, Mathilde, Mégane, Roua, Emilie, pour votre bonne humeur et les bons moments qu'on a pu passer au labo et en dehors :) Mention spéciale à Roua, puisque nous avons rédigé nos manuscrits en même temps.

L'IJPB, c'est également d'autres équipes et d'autres bâtiments. Je voudrais remercier la plateforme de l'OV-Chimie/Métabolisme de l'IJPB, en particulier Gilles Clément pour son aide dans les analyses métabolomiques et Grégory Mouille pour les analyses pariétales et nos discussions sur le mutant *loki*. Merci également à la plateforme Observatoire du Végétal-Cytologie/imagerie de l'IJPB, notamment Gladys Cloarec pour m'avoir formée au confocal et pour son aide lors de mes séances microscopies, Nero Borrega pour la micro-dissection des amas de *loki*, Cyril Gaertner pour le MEB. Merci à Jean-Christophe Palauqui et Katia Belcram pour leurs conseils sur la transparisation d'échantillons et les marquages, Aurélie Hurel pour m'avoir formée à l'axiozoom et l'équipe des serristes pour l'entretien des cultures en serre.

Merci aux membres de l'équipe de Ganna Panasyuk pour leur accueil à l'INEM (Institut Necker des Enfants Malades) et leur expertise sur la culture de lignées cancéreuses. Ganna, merci pour ton accueil dans ton labo et tes connaissances sur les voies mTOR.

Merci également aux membres de mon comité de thèse, Sophie Jasinski, Jean Colcombet et Ganna Panasyuk pour leurs remarques et conseils lors de nos discussions.

Enfin je voudrais remercier tout particulièrement mes proches. Un immense merci à Florent D., ma moitié, pour ta présence et tes encouragements tout au long de cette thèse. Il faut toujours croire en ses rêves et se donner les moyens d'y arriver, quoi qu'il arrive. Merci à ma famille, mes parents, ma mamie (en ayant une pensée pour papi), mon frère, ma sœur et leurs tribus et ma belle-mère. Même si j'ai parfois dû vous parler une autre langue, vous avez toujours eu foi en moi. Merci également à mes amis qui ont toujours été là pour moi, notamment Emeline et Moise, malgré la distance, vous êtes au top ! (Eme, c'est bientôt ton tour :)), Omaé, Agathe, Mathilde, Sandrine, Diane et les autres. Merci également à mes deux superviseurs en chef à la maison, alias la team moustache. C'est toujours plus inspirant d'avoir un chat sur les genoux pour écrire.

Pour finir, je voudrais adresser mes remerciements aux membres du Jury pour avoir accepté d'évaluer mes travaux de recherche. Merci à Hoai-Nam Truong-Cellier et Alain Bouchereau d'avoir accepté d'être mes rapporteurs ainsi que Sophie Filleur, Mario Pende et Marianne Delarue pour être mes examinateurs.

Merci également à la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) d'avoir financé ces trois années de doctorat (ECO201806006346).



Table des matières

Liste des abréviations.....	4
Avant-propos... ..	7
I- Introduction	8
A. La voie TOR chez les Eucaryotes.....	8
1. Les complexes TOR chez la levure et les mammifères.....	9
a) Présentation de la protéine TOR et de ses partenaires.....	9
i. La protéine kinase TOR	9
ii. LST8.....	10
iii. RAPTOR/ KOG1	10
iv. RICTOR/AVO3.....	11
b) Inhibition de la voie TORC1 par la rapamycine.....	11
c) Principales régulations des voies TOR.....	12
i. Les facteurs régulant la voie mTOR	12
ii. Les processus biologiques régulés par les voies TOR.....	15
2. Le complexe TORC1 chez les organismes photosynthétiques	20
a) Présentation du complexe TORC1 chez les plantes	20
i. AtTOR.....	20
ii. RAPTOR	22
iii. LST8.....	24
b) Les outils pour l'étude de la voie de signalisation TOR.....	26
i. Les inhibiteurs de TOR, des outils d'étude du complexe TORC1	26
ii. Mesure de l'activité de TOR chez les plantes.....	27
c) Rôles et implications du complexe TORC1 chez les organismes photosynthétiques	27
i. Les facteurs régulant la voie TOR en amont.....	27
ii. Les processus biologiques régulés par la voie TOR	31
B. La voie TOR et l'azote chez les eucaryotes	40
1. Régulations entre le complexe TOR et l'azote chez la Levure et les animaux ...	40
a) Régulations chez la Levure	40
i. Régulation du complexe TORC1	40
ii. Régulation du métabolisme azoté par le complexe TORC1.....	42
b) Régulations chez les animaux	42

c) Le cas particulier des relations entre la voie mTORC1 et la glutamine dans les cellules cancéreuses.....	45
2. L'azote et le métabolisme azoté chez les plantes	47
3. Régulations entre la voie TORC1 et l'azote chez les organismes photosynthétiques.....	49
a) Régulations de la voie TOR par l'azote	49
b) Régulations du métabolisme azoté par la voie TOR	52
C. TOR et les V-ATPases chez les eucaryotes	54
1. Présentation de la V-ATPase.....	55
a) Structure générale de la V-ATPase	55
b) Régulations et rôles de la V-ATPase chez les eucaryotes.....	57
i. La sous-unité H.....	57
ii. Les nutriments	57
iii. Le complexe RAVE	58
iv. Les V-ATPases végétales	59
2. Régulations entre les V-ATPases et la voie TORC1 chez les eucaryotes.....	60
a) La V-ATPase et la voie TORC1 chez les animaux et la Levure.....	60
b) La V-ATPase et la voie TORC1 chez les plantes	62
Mon projet de thèse.....	64
II- Résultats de la thèse.....	66
A. Régulations entre la voie TORC1 et le métabolisme azoté.....	66
1. Article <i>The Arabidopsis Target of Rapamycin (TOR) kinase regulates ammonium assimilation and glutamine metabolism</i>	66
2. Effets de l'inhibition du métabolisme de la glutamine sur les voies mTOR de cellules cancéreuses.....	85
a) Lignée Hek293, 6h de traitement.....	87
b) Lignée Hepa1.6, traitée pendant 6 ou 24h	88
i. Effets du GA sur les cellules Hepa1.6 à 6h de traitement.....	88
ii. Effets du GA sur les cellules Hepa1.6 à 24h de traitement.....	89
c) Discussion et Perspectives à cette étude exploratoire.....	89
B. Caractérisation du mutant <i>Arabidopsis loki</i> présentant une prolifération cellulaire ectopique TOR-dépendante	92
1. Crible génétique et identification d'un gène candidat.....	92
a) Détails du crible génétique.....	92

b) Identification d'un gène candidat.....	93
2. Effets physiologiques de la mutation <i>loki</i>	93
a) Les mutants d'insertion <i>loki</i>	93
b) Le phénotype des mutants <i>loki</i>	95
i. Croissance et environnement nutritionnel	95
ii. Activité de TOR chez les mutants <i>loki</i>	95
iii. Analyses métabolomiques.....	96
3. Caractérisation des amas ectopiques dépendants de l'inhibition de TOR	97
a) Le rôle du sucre.....	97
b) L'inhibition de TOR est responsable du phénotype d'amas ectopiques dans le fond mutant <i>loki</i>	97
c) Structure et organisation des amas.....	99
4. Perturbation de la paroi cellulaire des mutants <i>loki</i>	101
5. Etude du lien potentiel entre LOKI et les V-ATPases	103
a) Confirmation du phénotype d'amas ectopiques TOR-dépendant chez les mutants V-ATPases.....	104
b) Comparaison phénotypique entre les mutants <i>loki</i> et <i>det3</i>	105
i. Etude de la sensibilité au stress salin	105
ii. Dosage nitrates	106
iii. Défauts d'adhésion cellulaire	106
iv. Sensibilité à l'inhibition de la biosynthèse de cellulose.....	107
v. Etude transcriptomique comparative entre les mutants <i>loki</i> et <i>det3</i>	108
Discussion et perspectives	113
Discussion générale et perspectives	118
Le mot de la fin	125
Matériels et Méthodes	126
1. Matériels et Méthodes de la partie Résultats A.2. Effets de l'inhibition du métabolisme de la glutamine sur les voies mTOR de cellules cancéreuses	126
2. Matériel et Méthode de la partie Résultats B. Caractérisation du mutant Arabidopsis <i>loki</i> présentant une prolifération cellulaire ectopique TOR-dépendante	
127	
Bibliographie	136
Annexe : Revue Ingargiola et al. 2020	155

Liste des abréviations

4EBP-1 : eIF4E Binding Protein

ABA: Acide Abscisique

ADN-T : ADN de transfert

AMPK: AMP-activated Kinase

AMTs: AMMONIUM TRANSPORTERS

ARNr: ARN ribosomiaux

ATG gene: gene AuTophagy

ATP: Adenosine Triphosphate

AVO3: Adheres Voraciously to TOR protein 3

BiFC: Bimolecular Fluorescence Complementation

CDK: Cyclin Dependent Kinase

cDNA: Complementary DNA

CLV: CLAVATA

COP1: Constitutive Photomorphogenesis

CYC: Cyclin

DYRK: Dual specificity tyrosine phosphorylation Regulated Kinase

EF1 α : Eukaryotic translation Elongation Factor 1 α

Fd-GOGAT: Ferredoxin dependent GOGAT

FKBP12: FK506 Binding Protein 12

GAP: GTPase Activating Protein

GDH: Glutamate dehydrogenase

GDP/GTP: Guanosine Diphosphate/ Guanosine Triphosphate

GLS: Glutaminase

GOGAT: Glutamate Synthase

GS: Glutamine Synthetase

HIF α : Hypoxia-Inducible Factor

IGF: Insulin-like Growth Factors
IPMS1: IsoPropyl Malate Synthase 1
IRS: Insulin Receptor Substrate
KOG1: Kontroller Of Growth 1
LOKI: LOcalised proliferation depending on TOR Kinase Inhibition
LST8: Lethal with Sec Thirteen 8
mTOR: TOR mammals
NIA: NITRATE REDUCTASE
NII: NITRITE REDUCTASE
PCR: Polymerase Chain Reaction
PI3K: Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIKK: Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase
qPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction
RAPTOR: Regulatory-Associated Protein of TOR
RBR: Retinoblastoma-related Protein
ROP2: Rho-like small GTPase 2
ROS: Reactive Oxygen Species
RPS6: Ribosomal Protein S6
S6K: S6 Kinase
SIR: Sulfite Reductase
Snf1: Sucrose non-fermenting 1 kinase
SnRK1: Snf1-Related Kinase 1
SREBP: Sterol Regulatory Element-Binding Protein
TAG: Triacylglycéride
Tair: The Arabidopsis Information Resource
TAP46: Type 2A phosphatase-associated protein of 46 kDa
TGN/EE: trans-Golgi Network/Early Endosome
TOR: Target Of Rapamycin

TORC1/2: TOR complex 1/2

TSC: Tuberous Sclerosis Complex

V-ATPase: Vacuolar-type ATPase

WT: Wild Type

WUS: Wuschel

YAK1: Yet Another Kinase 1

Avant-propos...

Les organismes vivants sont sensibles aux variations de leur environnement et développent des réponses adaptatives plus ou moins rapides pour répondre au mieux à ces changements. Les plantes étant des organismes fixes, elles sont soumises à de nombreuses contraintes environnementales biotiques et abiotiques, pouvant avoir de fortes répercussions sur leur développement. Il existe différentes voies de signalisation contrôlant des processus biologiques variés pour répondre le plus finement possible aux modifications environnementales. Ces voies de signalisation souvent très conservées chez les eucaryotes sont majoritairement étudiées chez des organismes modèles comme la levure ou certains mammifères, mais moins chez les organismes photosynthétiques. Mon projet de thèse avait pour objectif d'étudier l'une de ces voies de signalisation essentielle au développement des eucaryotes, la voie de signalisation TOR (Target Of Rapamycin), chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, plus communément appelée Arabette des dames. Le but est d'étudier les relations entre cette voie et le métabolisme azoté chez les plantes mais aussi de découvrir de nouveaux acteurs de la voie TOR. Étudier chez les plantes cette voie de signalisation conservée chez les eucaryotes, qui est liée à de nombreuses pathologies humaines lorsqu'elle est dérégulée, permet de trouver de potentielles nouvelles cibles thérapeutiques et de valoriser le modèle végétal. Les plantes ont encore beaucoup de choses à nous apprendre !

I- Introduction

La voie de signalisation TOR (Target Of Rapamycin) est une voie importante chez les eucaryotes, contrôlant différents processus biologiques au sein des organismes, qu'ils soient uni ou multicellulaires. De nombreuses études sur cette voie ont été réalisées chez la Levure (premier organisme chez lequel la protéine kinase TOR a été mise en évidence) ainsi que chez les mammifères. Cette voie de signalisation a peu été étudiée chez les organismes photosynthétiques, mais de plus en plus d'études sont menées chez ces organismes. Dans ce chapitre, je vais présenter la voie TOR chez les eucaryotes, en abordant les régulations principales en amont et en aval de cette voie chez les mammifères et en détaillant davantage la voie TOR chez les organismes photosynthétiques. Je détaillerai ensuite les relations entre TOR et l'azote chez les eucaryotes, en présentant l'importance du métabolisme azoté chez les plantes et les régulations déjà connues entre la voie TOR et l'azote puis j'aborderai les régulations entre TOR et les V-ATPases chez les eucaryotes. Ces trois grandes parties fourniront les éléments nécessaires à la compréhension des problématiques et objectifs de ma thèse.

A. La voie TOR chez les Eucaryotes

La protéine TOR est une protéine kinase de grande taille (environ 280 KDa), appartenant à la famille des Phosphatidylinositol Kinase-related Kinases (PIKK) (Adami et al. 2007). Cette protéine kinase TOR peut phosphoryler des protéines au niveau de résidus Ser/Thr. L'ajout de groupements phosphate chargés négativement permet ainsi de moduler l'activité de ces protéines, de manière positive ou négative.

La protéine TOR a été mise en évidence pour la première fois chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Heitman et al. 1991). En souhaitant mieux comprendre la perception de l'environnement par les cellules, Heitman et al. ont réalisé un crible génétique utilisant des composés immunosuppresseurs naturels, issus de micro-organismes du sol (Heitman et al. 1991; Heitman 2015). Trois molécules différentes ont été appliquées sur des levures mutées, à savoir soit la cyclosporine, le FK506 ou la rapamycine. La rapamycine est un métabolite secondaire produit par la bactérie *Streptomyces hygroscopicus* et ayant une activité antifongique. Pour entrer dans quelques détails historiques qui font les grandes anecdotes, cette bactérie a été trouvée dans des échantillons de sols prélevés dans les années 1960, provenant de l'île de Pâques (Sehgal, Baker, and Vézina 1975). Également appelée Rapa Nui par les autochtones, l'île donna ultérieurement son nom à la Rapamycine. Grâce à ce crible, les auteurs ont isolé des souches résistantes à la rapamycine, donnant à deux des mutants,

N-ter HEAT FAT FRB PI3K FATC C-ter

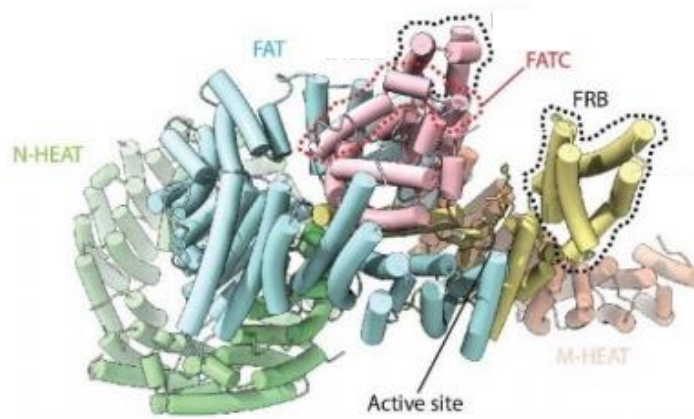


Figure 1: Organisation des différents domaines composants mTOR

En N-terminal, TOR est composée de répétitions HEAT (Huntingtin, facteur d'Elongation 3, sous-unité A de la protéine PP2A et TOR1), suivi du domaine FAT (FRAP, ATM, TRRAP), du domaine FRB (FKBP12 Rapamycin Binding) où se fixe le complexe Rapamycine-FKBP12, inhibant l'activité de la kinase TOR. Ce domaine est suivi du domaine kinase PI3K et en C-terminal le FATC (FRAP, ATM, TRRAP C-terminal). Adapté d'après Tafur et al., 2020

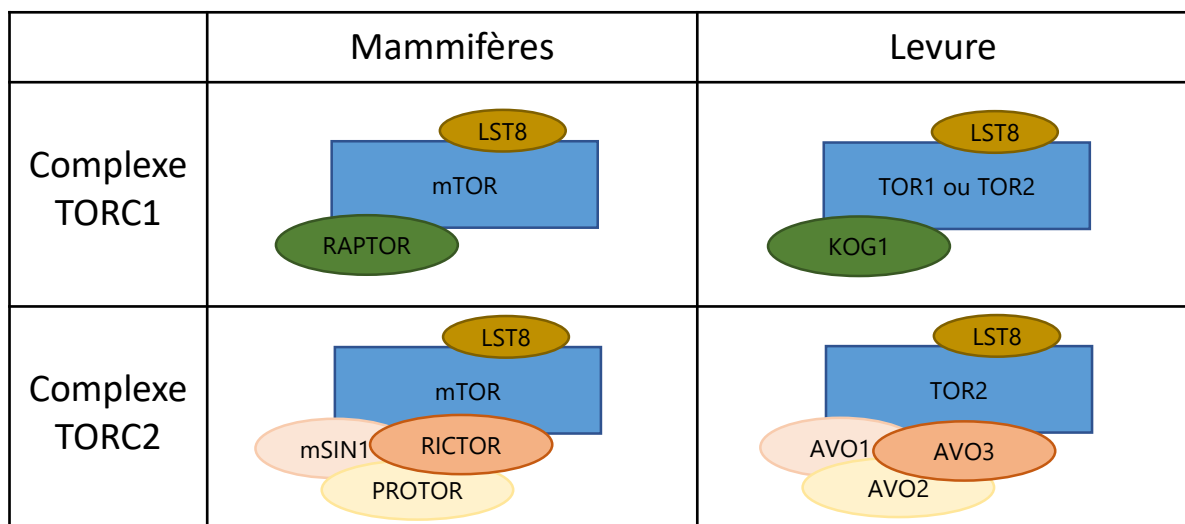


Figure 2: Représentation schématique des protéines composant les complexes TORC1 et TORC2 chez les Mammifères et la Levure

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Molecular Weight (kDa)	<i>Homo sapiens</i>	Molecular Weight (kDa)
TORC1 ^o	1164	mTORC1 ^o	948
Tor1 or Tor2	281	mTOR	289
Kog1	178	Raptor (RPTOR)	149
Lst8	34	mLst8	36
Tco89	89	-	-
-	-	PRAS40 (AKT1S1)	27
-	-	DEPTOR	46
TORC2 ^o	1436	mTORC2 ^o	1152
Tor2	281	mTOR	289
Avo1	131	mSin1 (MAPKAP1)	59
Avo2	47	-	-
Avo3	164	Rictor	192
Lst8	34	mLst8	36
Bit61 or Bit2	61	Protor1 or Protor2 (PRR5)	42 or 41
-	-	DEPTOR	46

Tableau 1: Composants des complexes TORC1 et TORC2 chez *S. cerevisiae* et l'Homme
D'après Tafur et al., 2020

TOR1 et TOR2, leur nom de « Target Of Rapamycin », tandis que le troisième mutant identifié correspond à la protéine FKBP12, qui était déjà connue.

1. Les complexes TOR chez la levure et les mammifères

a) Présentation de la protéine TOR et de ses partenaires

i. La protéine kinase TOR

Malgré quelques nuances structurales, la kinase TOR est très conservée chez tous les eucaryotes. Cette protéine possède cinq grands domaines (*Figure 1*). En N-terminal, on retrouve un domaine de répétitions HEAT (Huntingtin, facteur d'Elongation 3, sous-unité A de la protéine PP2A et TOR1) dont le nombre de motifs peut varier suivant les espèces et qui permet des interactions protéines-protéines. Ce domaine est suivi du domaine FAT (FRAP, ATM, TRRAP) qui, avec le domaine C-terminal FATC (FRAP, ATM, TRRAP C-terminal), sont des domaines conservés chez les protéines appartenant à la famille des PIKK, FRAP, ATM et TRAPP. Le domaine suivant le domaine FAT est le domaine FRB (FKBP12 Rapamycin Binding) auquel le complexe Rapamycine-FKBP12 va se fixer pour inhiber l'activité de la kinase TOR. Nous détaillerons le mécanisme de cette inhibition ultérieurement. Enfin, le cinquième domaine composant la protéine TOR est le domaine responsable de son activité kinase et correspond au domaine PI3K (Adami et al. 2007). Ce domaine kinase de TOR présente des homologues de séquence avec le domaine kinase de lipides kinases telles que les phosphatidylinositol kinases de type PI3 Kinase (PI3K), appartenant elles aussi à la famille des PIKK.

Chez la levure, et contrairement aux autres eucaryotes, il existe deux gènes TOR codant deux protéines TOR, appelées TOR1 et TOR2 (Lorenz and Heitman 1995; Crespo and Hall 2002). Ces protéines peuvent interagir avec différents partenaires protéiques pour former deux complexes distincts, TORC1 et TORC2 (*Figure 2*). Le complexe TORC1 peut-être composé indifféremment des protéines TOR1 ou TOR2, de KOG1 (Kontroller Of Growth protein 1) et LST8 (Lethal with Sec Thirteen 8). Le complexe TORC2 correspond quant à lui à l'association des protéines TOR2, AVO3 (Adheres Voraciously to TOR2 protein 3) et LST8 (Loewith et al. 2002). Les protéines AVO1 et AVO2 (respectivement mSIN1 et PROTOR chez les animaux) interagissent également avec les composants du complexe TORC2 (*Figure 2*), jouant principalement un rôle régulateur (Loewith et al. 2002; Pearce et al. 2007).

Chez les mammifères, une seule protéine mTOR a été identifiée. Cette protéine peut également former deux complexes, mTORC1 et mTORC2 (*Figure 2*), en interagissant soit avec RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of TOR) et LST8 pour former mTORC1, soit avec RICTOR et LST8 pour former mTORC2 (*Tableau 1*) (Yang et al. 2016)

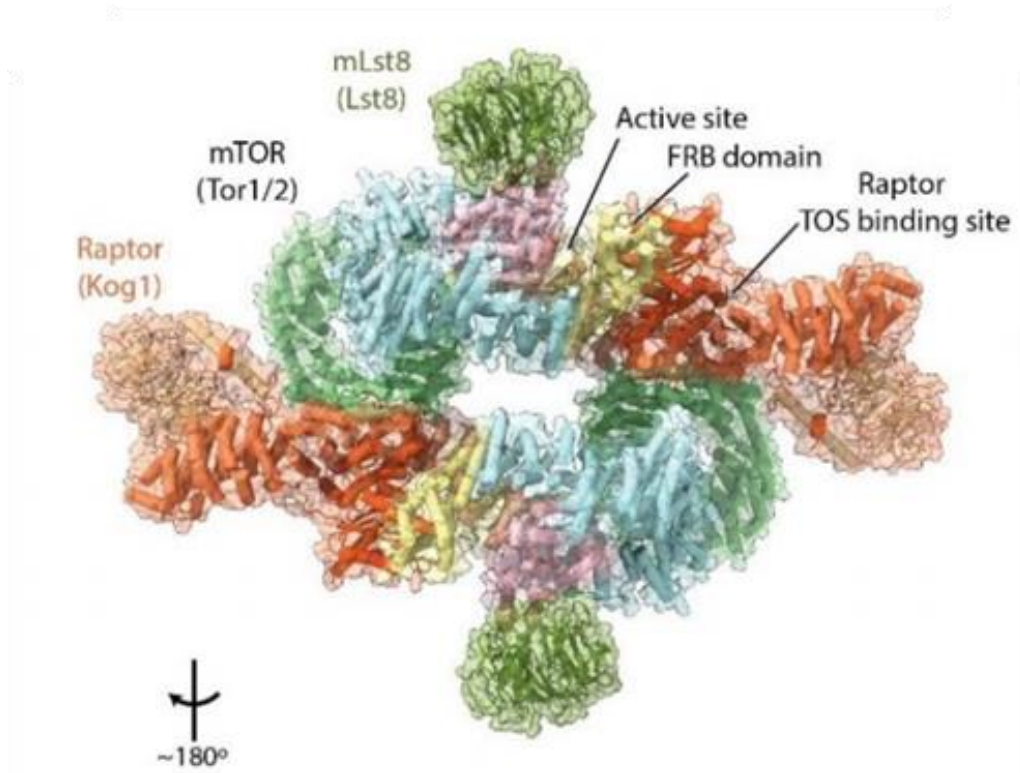


Figure 3 Structure du dimère mTORC1

D'après Tafur et al., 2020.

Les noms entre parenthèses correspondent à la nomenclature chez la Levure.

S6K1_human	1	MAGV-----FDIDLQPEDAGS	E	DELE	E	BGGQLNES	
S6K_Xenopus	1	MAGV-----FDIDLQPEDAIS	E	DELE	D	GGTFIEF	
S6K_Drosophila	1	MADVSDPSEL	FDLELHDLELQDDKARDS	D	D	-----	
S6K_C.elegans	1	MADV-----FEFELEGHESQAS	PQRHAYHYDNCTE				
S6K2_human	1	MAAV-----FDLDLETEEGSEGE	G	PEL	SPADACP		
S6K_artemnia f.	1	MAGV-----FDIELHEP	DTAHLTIQSE	LQSD	ES		
S6K_Aplysia	1	MSNMTGA---	FDLELTEDGGRTE	V	SDEE	YFEADES	

			TOS motif				

Figure 4: Séquence FDIDL du motif TOS (TOR Signaling) de la protéine kinase S6K et sa conservation au sein des espèces

D'après l'étude de Schalm and Blenis, 2002

(Scaiola et al. 2020). Comme mentionné ci-dessus, les protéines mSIN1 et PROTOR interagissent également avec le complexe TORC2 (*Figure 2*).

Comme chez la Levure, le complexe mTORC1 est actif sous forme dimérisé (*Figure 3*). Cette dimérisation est médiée par le complexe Tel2-Tti1-Tti2(TTT)-RUVBL qui est assemblé lorsque le niveau énergétique cellulaire est suffisant. Cependant, en cas de stress énergétique, le complexe TTT-RUVBL est désassemblé. Ceci empêche la dimérisation du complexe mTORC1 et inhibe son activité, en réduisant fortement sa localisation lysosomale et son association aux Rag GTPases (voir partie B.1.b) (Kim et al. 2013).

ii. LST8

Cette petite protéine d'environ 35kDa est uniquement composée de domaines WD40 (Yang et al. 2013) qui permettent des interactions protéines-protéines. C'est la seule protéine commune aux deux complexes TORC1 et TORC2. LST8 interagit avec TOR au niveau de son domaine kinase (Adami et al. 2007). Sa fonction exacte n'est pas encore très bien connue. Toutefois, en permettant des interactions protéines-protéines, le rôle de LST8 au sein des complexes TOR pourrait être de favoriser le recrutement de substrats mais aussi de régulateurs de ces complexes, favorisant à la fois l'activité de la kinase TOR et la stabilité des complexes TOR.

iii. RAPTOR/ KOG1

Spécifique du complexe TORC1, la protéine RAPTOR/ KOG1 est très conservée chez les eucaryotes. D'un poids moléculaire d'environ 180 kDa, cette protéine est composée d'un domaine RNC (Raptor N-terminal Conserved) en position N-terminale, de répétitions HEAT, permettant des interactions protéines-protéines, et de motifs WD40, qui permettent la formation réversible de complexes protéiques (Loewith et al. 2002). RAPTOR interagit avec la protéine TOR au niveau des répétitions HEAT de la kinase (Kim et al. 2002). Il a été démontré chez les animaux qu'au sein du complexe TORC1, la protéine RAPTOR permet le recrutement des différents substrats de mTORC1 via des motifs « TOS » (TOR Signaling), composés de cinq acides aminés présents sur ses cibles (Schalm and Blenis 2002; Nojima et al. 2003). Ainsi, pour la protéine S6K (S6 Kinase), une cible directe de TOR impliquée dans la régulation positive de la traduction, ce motif assez bien conservé correspond à la séquence FDIDL située en partie N-terminale (acides aminés 5 à 9, *Figure 4*) (Schalm and Blenis 2002). La délétion de ce motif abolit l'activité de la protéine S6K, celle-ci n'étant plus activée par TOR. La protéine 4EBP-1 (eIF4E Binding Protein), autre cible directe de TOR impliquée dans la régulation

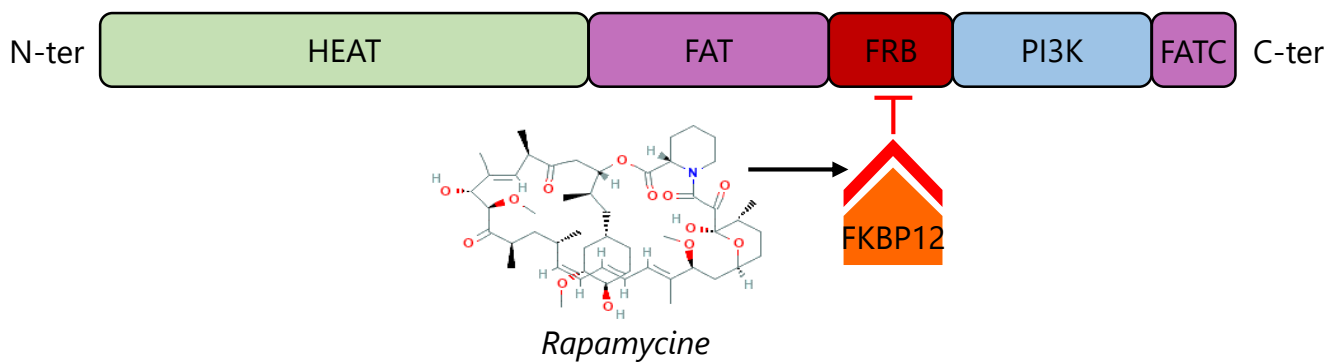


Figure 5: Fixation du complexe Rapamycine-protéine FKBP12 (FK506-Binding Protein) au niveau du domaine FRB de TOR, inhibant l'activité kinase de TOR
La structure chimique de la rapamycine est issue de PubChem.

négative de la traduction, présente également un motif TOS composé des résidus FEMDI (Schalm and Blenis 2002). Pour ces deux motifs, la mutation d'un de ces cinq résidus peut inhiber la phosphorylation de S6K ou 4EBP-1 par la kinase TOR. C'est notamment le cas pour la mutation du résidu phénylalanine en alanine, qui empêche l'interaction avec RAPTOR, inhibant la phosphorylation de ces substrats par TOR (Schalm and Blenis 2002).

iv. RICTOR/AVO3

Cette protéine est un composant spécifique du complexe TORC2 chez la Levure et les mammifères (Loewith et al. 2002). Contrairement aux protéines LST8 et RAPTOR, sa séquence est moins conservée au sein des eucaryotes. Le complexe TORC2 n'a pas été mis en évidence chez les organismes photosynthétiques et cette protéine semble absente chez les végétaux (voir partie A.2.). La diminution d'expression de RICTOR entraîne une diminution de la phosphorylation de PKC α (Protein Kinase C α) au niveau de la Ser657, diminuant son activité et impactant le cytosquelette d'actine (Sarbasov et al. 2004).

b) Inhibition de la voie TORC1 par la rapamycine

Comme évoqué précédemment, la rapamycine a permis de découvrir la protéine TOR chez la Levure grâce à un crible pharmacologique. Cette molécule antifongique est un inhibiteur spécifique du complexe TORC1, mais qui n'a pas d'effet sur l'activité du complexe TORC2 (Loewith et al. 2002). Son mécanisme d'action est le suivant : la rapamycine se lie à une petite protéine de 12kDa, FKBP12 (FK506-Binding Protein, *Figure 5*), formant un complexe qui va se fixer au domaine FRB de la protéine TOR (Lorenz and Heitman 1995), inhibant ainsi son activité kinase (Weisman and Choder 2001). Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer cette inhibition par le complexe rapamycine-FKBP12 : i) La fixation du complexe rapamycine-FKBP12 entraînerait un changement de conformation qui déstabiliserait l'interaction entre RAPTOR et TOR (Kim et al. 2002; Yip et al. 2010) ; ii) la fixation du complexe rapamycine-FKBP12 pourrait gêner l'accès au site catalytique de TOR, limitant la phosphorylation de ses cibles, surtout lorsque celles-ci sont de taille importante (Yip et al. 2010) ; iii) la fixation de plusieurs complexes rapamycine-FKBP12 conduirait à la dissociation du complexe TORC1 (Yip et al. 2011). Toutefois, on notera que la mutation des résidus Ser1972 de TOR1 chez la Levure ou Ser2035 de mTOR chez les animaux empêche cette interaction avec la rapamycine.

L'insensibilité du complexe TORC2 à la rapamycine s'explique quant à elle par le fait que le complexe FKBP12-Rapamycine ne se fixe pas au complexe TORC2 (Loewith et

al. 2002). Ceci est dû à la protéine RICTOR qui, de par sa position dans le complexe TORC2, bloque l'accès du complexe FKBP12-rapamycine au domaine FRB de la protéine TOR (Scaiola et al. 2020).

Depuis, comme pour de nombreuses kinases, différents inhibiteurs de TOR ont été découverts par différentes sociétés pharmaceutiques. En effet, TOR a un rôle important dans plusieurs maladies humaines dont le cancer (voir A.1.c)ii. Les processus régulés par la voie mTOR). Contrairement à la rapamycine, ces molécules bloquent la poche de fixation de l'ATP de la kinase TOR, inhibant son activité. On notera principalement le LY294002 (inhibiteur bloquant l'ensemble des PI3K), la TORIN1/2 ou l'AZD-8055 (inhibiteurs spécifiques de TOR) (Chresta et al. 2010; Montané and Menand 2013).

c) Principales régulations des voies TOR

Les voies TOR ont été très largement étudiées dans de nombreuses publications chez la Levure et les mammifères. Ainsi, de nombreux acteurs de ces voies TOR sont largement conservés chez les Eucaryotes (Tatebe and Shiozaki 2017). J'ai choisi de présenter dans cette partie les principaux éléments intervenant dans les régulations de la voie mTORC1. Le complexe TORC2 n'ayant pas été identifié chez les organismes photosynthétiques, seuls certains points de la voie mTORC2 seront mentionnés.

i. Les facteurs régulant la voie mTOR

Percevoir les facteurs environnants est essentiel pour la cellule et pour l'organisme. La kinase TOR intervient dans la perception de certains de ces facteurs pour permettre une réponse appropriée de l'organisme.

Les nutriments

Les nutriments carbonés et azotés sont perçus par la voie TOR et permettent son activation chez *S.cerevisiae* (Kuruvilla et al. 2001; Crespo et al. 2002) et chez les mammifères (Dyachok et al. 2016; Orozco et al. 2020). Pour déterminer l'état d'activation de mTOR, il est possible de suivre par western-blot, à l'aide d'anticorps phospho-spécifiques, l'état de phosphorylation de certaines de ses cibles, telles que S6K au niveau du résidu Ser389 (Shaw et al. 2004a) ou 4EBP-1 au niveau du résidu Thr70, (DeYoung et al. 2008; Takahara and Maeda 2012). Plus mTOR est actif, plus ces protéines sont phosphorylées (Fingar 2002). Les sucres sont des activateurs majeurs de la voie TOR. Le glucose est le principal sucre activateur de la voie mTOR bien que d'autres sucres comme le mannose par exemple peuvent activer cette voie (Orozco et al. 2020). Ainsi, une carence en glucose diminue la phosphorylation de S6K1, cible directe de TOR, démontrant l'inhibition de l'activité de la kinase dans ces conditions

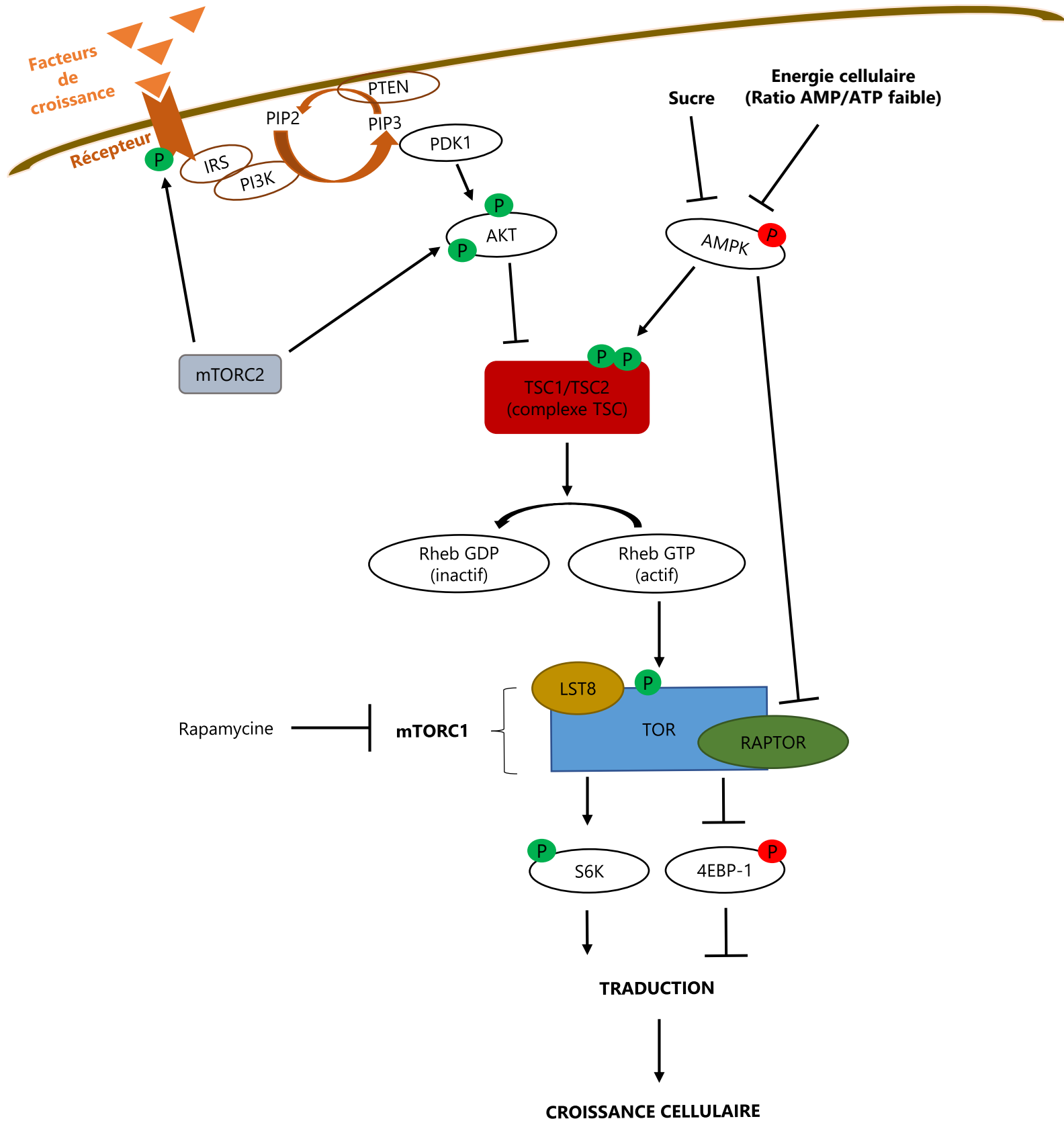


Figure 6: Signalisation dépendante des facteurs de croissance de type Insuline conduisant à l'activation de mTORC1 par la voie PI3K/AKT/TSC

Les facteurs de croissance stimulent la voie mTORC1 grâce à différents acteurs, notamment PI3K, PDK1, AKT qui permettent de lever l'inhibition du complexe TSC sur Rheb qui peut alors activer mTORC1. Les P dans des ronds verts correspondent à des phosphorylations activatrices, tandis que les rouges correspondent à des phosphorylations inhibitrices.

(Orozco et al. 2020). Les composés azotés de type acides aminés sont également des éléments activateurs de TOR chez la Levure et les mammifères. Les acides aminés activent des Rag-GTPases, qui permettent alors le recrutement et l'activation de mTOR à la surface du lysosome ou de la vacuole chez la Levure (Sancak et al. 2008). Les détails de ces régulations seront décrits dans la partie B. de cette introduction.

Les facteurs de croissance

Chez les mammifères, les facteurs de croissance sont également un autre type de signal régulant la voie mTORC1. Des facteurs de croissance, tels que l'insuline ou les Insulin-like Growth Factors (IGF), participent à la croissance de l'organisme notamment à travers la régulation de la division cellulaire. Compte tenu du fait que mTORC1 est impliqué dans la stimulation de la prolifération des cellules, de nombreuses études portant sur les régulations de la voie mTORC1 par ces facteurs de croissance ont été publiées. Ces régulations se font principalement par la voie PI3K/AKT/TSC1-TSC2 (*Figure 6*). La fixation de ces facteurs de croissance à leur récepteur permet le recrutement d'IRS (Insulin Receptor Substrate) et la fixation de PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) de classe I à IRS. La PI3K va alors phosphoryler du PIP₂ (Phosphatidylinositol-4,5-Phosphate), le convertissant en PIP₃ (Phosphatidylinositol-3,4,5-Phosphate), tandis que la lipide phosphatase PTEN catalyse la réaction inverse. L'accumulation de PIP₃ favorise le recrutement de PDK1 et AKT à la membrane, permettant alors à PDK1 d'activer AKT par phosphorylation (Wullschleger et al. 2006). Une fois activée, AKT va inhiber le complexe TSC (Tuberous Sclerosis Complex) qui est impliqué dans l'inactivation de mTORC1. Ce complexe TSC est composé de deux protéines : TSC1, qui joue davantage un rôle régulateur, et TSC2, qui porte l'activité de ce complexe (Inoki et al. 2003b). TSC2 stimule l'hydrolyse du GTP associé à la GTPase Rheb, qui se retrouve alors sous sa forme inactive liée au GDP (Inoki et al. 2003b). Or, il a été montré que la S6K est phosphorylée lorsque Rheb est sous sa forme active GTP, indiquant que Rheb est un activateur de mTOR (Inoki et al. 2003b; Long et al. 2005a; Long et al. 2005b). Ainsi TSC2, en inhibant Rheb, conduit à la diminution de la phosphorylation de S6K mais aussi de 4EBP-1, deux cibles connues de mTORC1. Ces résultats démontrent que Rheb-GTP agit en amont de mTOR et régule positivement son activité. Ainsi, l'insuline, à travers cette cascade de signalisation, conduit à la dissociation du complexe TSC suite à l'inhibition de TSC par AKT (Menon et al. 2014), ce qui permet de lever l'inactivation de Rheb, qui active alors la voie mTORC1.

Concernant le mécanisme d'activation de mTORC1 par Rheb, l'étude de Long et al. de 2005 a mis en évidence que Rheb se fixe directement sur mTOR, à cheval au niveau de son domaine FRB et de son domaine kinase. On notera que Rheb co-immunoprécipite

également avec RAPTOR et TSC2. De plus, Inoki et al., 2003 ont démontré que Rheb permettait la phosphorylation de mTOR au niveau de son résidu Ser2448, prouvant que Rheb se fixe et active mTOR lorsqu'il est sous sa forme active GTP. Ainsi, on obtient un modèle où les facteurs de croissance permettent l'activation de mTOR. mTOR phosphoryle à son tour différentes cibles, notamment la S6K pour l'activer et 4EBP-1 pour l'inhiber favorisant ainsi la traduction et *in fine*, la croissance cellulaire. Il est à noter que mTORC2 intervient également dans cette voie d'activation de mTORC1 par les facteurs de croissance. Il a été démontré que mTORC2 permet l'activation des récepteurs à l'insuline ou les récepteurs Insulin-like par phosphorylation (Y. Yin et al. 2016) et active également AKT (Sarbasov et al. 2006; Wullschleger et al. 2006).

Médiation du stress par la kinase AMPK

La présence de nutriments et de facteurs de croissance correspond à des conditions favorables au développement et donc à l'activation de la voie mTOR. Toutefois, en cas de stress comme des carences nutritionnelles, l'organisme doit pouvoir réguler finement la voie mTORC1 pour limiter les processus cellulaires coûteux en énergie tels que la traduction et la croissance cellulaire. La Ser/Thr kinase Snf1 (Sucrose non-fermenting 1 kinase) chez la Levure ou AMPK (AMP-activated Kinase) chez les animaux sont des kinases antagonistes de TOR, qui inhibent son activité (Inoki et al. 2003a). Chez les mammifères, AMPK est capable de percevoir les changements de niveaux énergétiques de la cellule à travers le ratio AMP/ATP. Ainsi, lorsque le niveau énergétique cellulaire est faible, correspondant à un ratio AMP/ATP élevé, la kinase AMPK est activée par le suppresseur de tumeur LKB1 (Inoki et al. 2003a; Shaw et al. 2004a; Shaw et al. 2004b). Cette activation passe par la phosphorylation du résidu Thr172 d'AMPK. Une fois activée, AMPK va inhiber mTORC1 de deux manières différentes. La première, par la phosphorylation de la protéine RAPTOR sur les résidus Ser722 et Ser792, inhibant complètement l'activité du complexe TORC1 (Gwinn et al. 2008). La seconde, par l'activation du complexe TSC (*Figure 6*). En effet, AMPK peut interagir avec TSC2 lorsque les conditions énergétiques de la cellule sont défavorables. Cette interaction permet l'activation de TSC2 via notamment la phosphorylation de deux sites principaux, Thr1227 et Ser1345, ce qui empêche *in fine* l'activation de mTORC1 (Inoki et al. 2003a). Ainsi, lorsque TSC2 est actif dans ces conditions de stress énergétique, mais également de carence en glucose, on constate que les cellules sont de taille réduite (Inoki et al. 2003a).

L'hypoxie est également un type de stress auquel la voie mTORC1 est sensible, des conditions hypoxiques entraînant une diminution de la phosphorylation de différentes cibles de mTORC1 (Liu et al. 2006). Dans ces conditions, AMPK peut être activée,

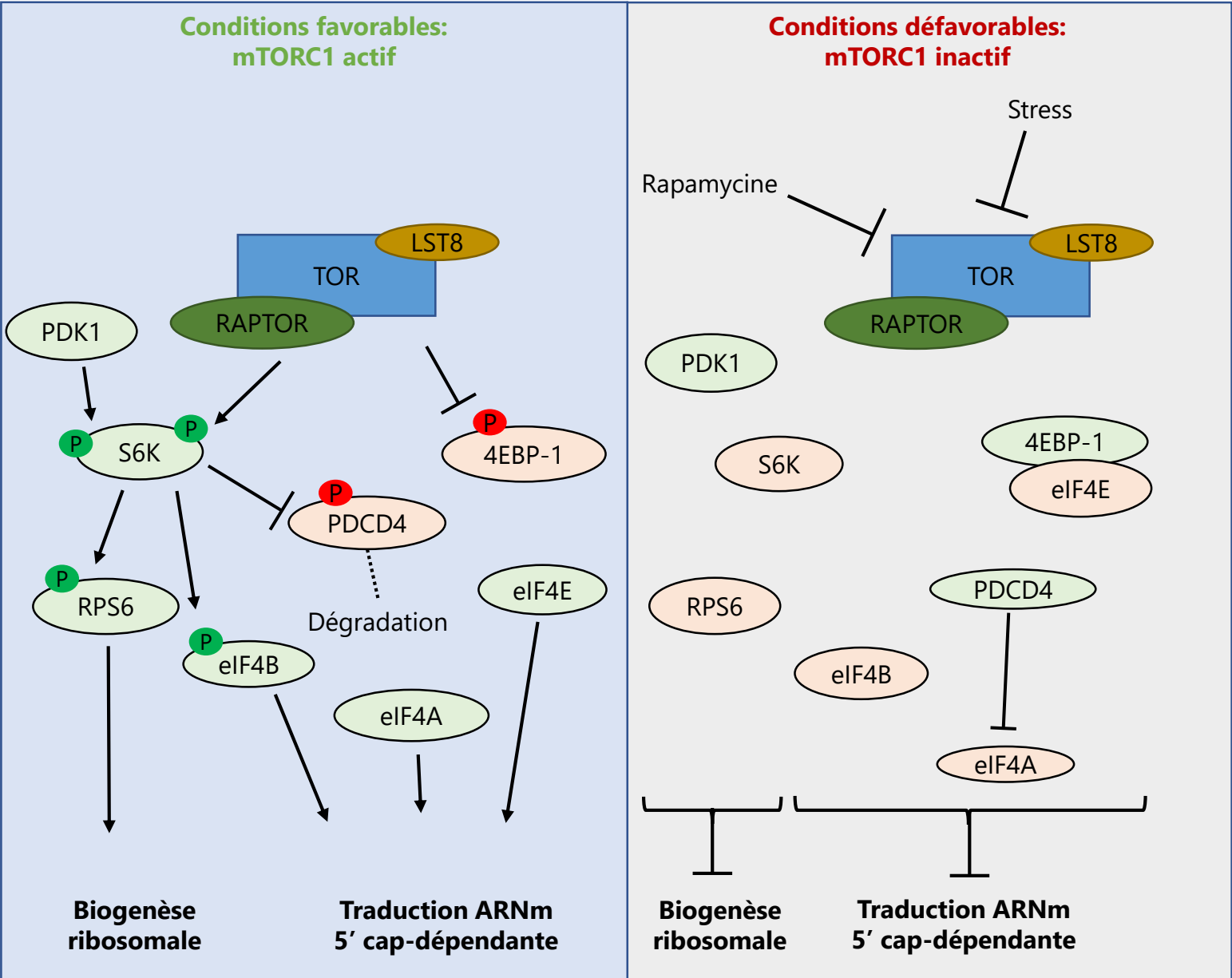


Figure 7: Régulation de la traduction par la voie mTORC1
 Les P dans des ronds verts correspondent à des phosphorylations activatrices, tandis que les rouges correspondent à des phosphorylations inhibitrices. Les protéines en fond vert sont activées, celles en rouge sont inhibées.

inhibant mTORC1 par les mécanismes mentionnés précédemment. Les protéines REDD1 et REDD2, des protéines induites par le stress, peuvent également être activées et inhiber la voie mTOR en agissant en amont de TSC2 (Corradetti et al. 2005; DeYoung et al. 2008). En conditions favorables, le complexe TSC est associé à la protéine 14-3-3 qui limite son activité. En conditions de faible O₂, REDD1 est activée et va se fixer à la 14-3-3, libérant le complexe TSC qui va alors inhiber mTORC1 (DeYoung et al. 2008).

ii. Les processus biologiques régulés par les voies TOR

La Traduction

La traduction des protéines est un processus cellulaire extrêmement coûteux en énergie pour les cellules, qui est régulé par la voie de signalisation mTORC1 par l'intermédiaire de la phosphorylation activatrice de S6K et inhibitrice de 4EBP-1 (*Figure 7*), S6K favorisant la traduction à l'inverse de 4EBP-1.

Chez les eucaryotes, l'initiation de la traduction se fait par la fixation de la petite sous-unité 40S du ribosome au niveau de l'extrémité 5' de l'ARNm à traduire. Cet ARNm possède une coiffe qui va être reconnue par le facteur d'initiation eIF4E, composant du complexe d'initiation de la traduction eIF4F avec eIF4G. D'autres facteurs eIF (eukaryotic translation Initiation Factor) s'associent avec ce complexe eIF4F, permettant l'initiation de la traduction au niveau de l'extrémité 5' de l'ARN. L'ensemble va se déplacer avec le ribosome le long du brin pour permettre sa traduction.

La S6K est une protéine kinase qui modifie notamment la protéine ribosomale RPS6 présente au niveau de la petite sous-unité 40S du ribosome, par phosphorylation sur les résidus Ser235/236 (Ferrari et al. 1991; Shaw et al. 2004a). Bien que les conséquences de cette phosphorylation ne soient pas clairement établies, RPS6 interviendrait dans la biosynthèse des ribosomes (Liu and Sabatini 2020). La kinase S6K phosphoryle et active également eIF4B, un régulateur positif du complexe d'initiation 5'cap, eIF4F (Holz et al. 2005; Csibi et al. 2014). D'après le modèle de Holz et al. de 2005, S6K pourrait être associée au complexe eIF3. Les auteurs ont démontré une interaction entre ce complexe, mTOR et RAPTOR, permettant le recrutement du complexe TORC1. En phosphorylant S6K, mTOR entrainerait sa dissociation de eIF3, permettant à S6K d'être phosphorylée par une seconde kinase, PDK1. Suite à ces différentes phosphorylations, S6K peut ensuite activer eIF4B. En parallèle, S6K phosphoryle également un suppresseur de tumeur nommé PDCD4 (Programmed Cell Death Protein 4), qui est un inhibiteur du facteur d'initiation eIF4A. La phosphorylation de PDCD4 entraîne sa dégradation, levant son inhibition sur eIF4A et son activité hélicase (*Figure 7*) (Dorrello et al. 2006).

Dans les conditions où mTORC1 est inactif, 4EBP-1 séquestre eIF4E, (d'où son nom, eIF4E Binding Protein), empêchant la formation du complexe d'initiation eIF4F et donc l'initiation de la traduction des ARN 5'cap-dépendante. Lorsque mTORC1 est actif, la phosphorylation de 4EBP-1 par mTORC1 permet la libération d'eIF4E (Brunn et al. 1997; Fingar 2002) et par conséquent, la traduction des ARNm 5'cap-dépendante. Toutefois, il semblerait qu'un autre acteur soit nécessaire en plus de mTORC1 pour permettre cette complète dissociation d'eIF4E-4EBP-1 (Gingras et al. 1999).

En conclusion, lorsqu'il est actif, le complexe mTORC1 est impliqué dans la régulation positive de la traduction (*Figure 7*) et intervient ainsi dans la régulation de différents processus biologiques. Son inhibition par un traitement à la rapamycine provoque une réduction de la taille des cellules, démontrant l'implication de la voie mTORC1 dans la régulation de la taille cellulaire. Ceci se fait au travers des voies S6K et 4EBP1, qui régulent la traduction et *in fine* la croissance cellulaire (Fingar 2002).

La division cellulaire

La division cellulaire est un processus qui doit être finement contrôlé. L'étude de Fingar et al. (2003) a montré qu'un traitement à la rapamycine retarde l'entrée en phase S de cellules U2OS (cellules d'ostéosarcome humain) de plusieurs heures par rapport aux cellules en condition contrôle, démontrant l'implication de la voie mTORC1 dans cette régulation. La diminution de l'expression de S6K1 par l'utilisation d'une lignée RNAi limite grandement la progression en phase G1 du cycle cellulaire. Toutefois, cela ne semble pas bloquer complètement l'entrée en phase S, ce qui suggère que d'autres voies, pouvant être régulées par mTOR, interviendraient dans cette régulation du cycle. Nous avons vu précédemment que mTOR, inactive 4EBP-1 par phosphorylation. La surexpression de cette protéine 4EBP-1 inhibe partiellement la progression en phase G1 des cellules. Toutefois, la surexpression de eIF4E permet de réduire partiellement l'inhibition de la progression du cycle observée suite à l'inhibition de mTORC1. La division cellulaire fait intervenir principalement trois grandes familles d'acteurs : les cyclines, les CDK et les inhibiteurs de CDK. mTOR intervient à différentes étapes du cycle cellulaire, en régulant notamment la synthèse protéique de certains de ces acteurs à travers la phosphorylation de S6K et 4EBP-1, telle que la cycline B chez l'oursin (Chassé et al. 2016) ou la synthèse de CDK1 (Hassanian et al. 2016).

Ainsi, il semble que la voie mTORC1 jouerait davantage un rôle temporel dans le contrôle de la division.

Le complexe mTORC2 interviendrait quant à lui dans le contrôle spatial, en agissant sur le cytosquelette d'actine. En effet, le complexe TORC2, via RICTOR, régule l'organisation

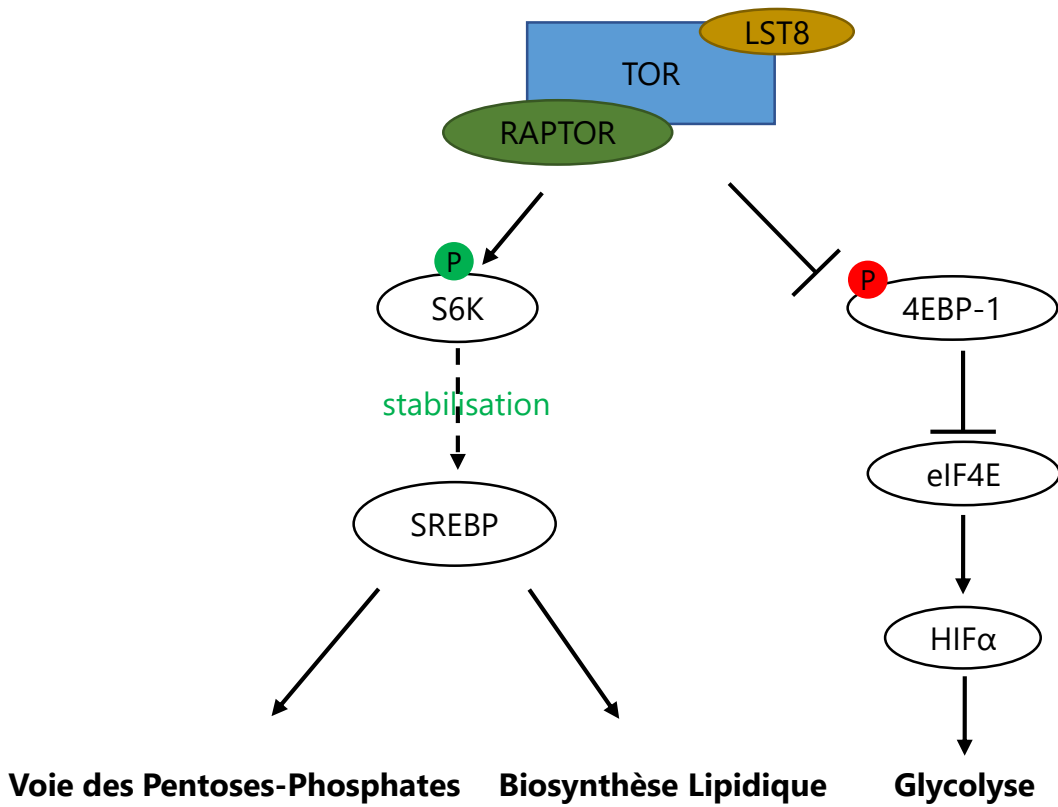


Figure 8: Implication métabolique de la voie mTORC1

Les P dans des ronds verts correspondent à des phosphorylations activatrices, tandis que les rouges correspondent à des phosphorylations inhibitrices. D'après Düvel et al., 2010

du cytosquelette d'actine, à travers la phosphorylation de la PKC α (Protéine Kinase C de type α). Cette kinase est impliquée dans la régulation de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération et la mobilité cellulaire et la diminution de son activité dans une lignée siRNA provoque notamment une augmentation de l'épaisseur des fibres d'actine. Un mutant knock-down (KD) *ric* présente également des fibres d'actine plus épaisses et désorganisées (Sarbasov et al. 2004).

Le métabolisme cellulaire

Une analyse multi-omique (transcriptomique et métabolique) a été réalisée par Düvel et al. en 2010 pour étudier les classes de gènes induits ou réprimés par la voie mTORC1. Cette étude a permis de mettre en évidence que mTORC1 régule positivement l'expression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans différentes voies métaboliques telles que la voie des pentoses phosphates, la glycolyse ou encore la biosynthèse des acides gras (*Figure 8*). Différents facteurs de transcription interviennent en aval de mTORC1 pour réguler ces voies métaboliques, tels que HIF α (Hypoxia-Inducible Factor) ou SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein) (Düvel et al. 2010). HIF α , impliqué dans la régulation de l'expression de différents gènes de la glycolyse (Hu et al. 2003), est davantage traduit lorsque mTORC1 est actif, grâce à l'inhibition de 4EBP-1 par mTORC1 (Düvel et al. 2010). SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Protein), stimule la voie des pentoses-phosphates et la biosynthèse lipidique. Cette activation de SREBP1 en aval de mTORC1 se fait par S6K1, qui permet de le stabiliser. SREBP1 est moins actif dans les cellules KO pour S6K1, ce qui entraîne la réduction de l'expression de ses cibles et donc une diminution générale de la voie des pentoses-phosphates et de la biosynthèse lipidique (Düvel et al. 2010).

De plus, mTORC2 est impliqué dans la régulation du métabolisme lipidique et du glucose, par la voie AKT induite par les facteurs de croissance tels que l'insuline (Hagiwara et al. 2012). Ainsi, une déficience en mTORC2 au niveau hépatique chez la souris conduit à des désordres métaboliques comme l'hyperglycémie ou l'hypolipidémie.

L'autophagie

L'autophagie est un mécanisme important, conservé au sein des êtres vivants eucaryotes. Elle permet le recyclage de composants cytoplasmiques, tels que les protéines, lors de la sénescence ou de stress environnementaux. Le processus d'autophagie débute par la formation dans le cytosol de vésicules à double membrane, appelées autophagosomes, qui se forment autour des molécules ou structures

cellulaires à recycler, appelées cargos. Ces cargos vont être libérés dans la vacuole (chez la Levure ou les plantes) ou le lysosome (pour les animaux) après fusion membranaire entre autophagosome et vacuole/lysosome. C'est dans ces organites que les cargos vont être dégradés par des hydrolases (Soto-Burgos et al. 2018). Les gènes ATG (Autophagy-related genes) sont impliqués dans le déclenchement de l'autophagie et certains sont régulés négativement par TOR. Chez la Levure, l'activité kinase de la protéine APG1 (ATG1), impliquée dans la formation des autophagosomes, augmente lorsque les cellules sont traitées à la rapamycine (Kamada et al. 2000). En revanche, l'utilisation d'un mutant *TOR1* résistant à la rapamycine abolit cette activité. Par conséquent, l'induction de l'autophagie par ATG1 est contrôlée par la voie TORC1. Les auteurs ont montré que ce contrôle d'ATG1 par TOR passait par un intermédiaire, ATG13, lui-même phosphorylé par TOR. Comme pour la Levure, ATG13 est également phosphorylé par mTOR chez les mammifères au niveau du résidu Ser258. ATG13 peut également être phosphorylé par la voie AMPK sur le résidu Ser224 (Puente et al. 2016), notamment lors d'une carence en glucose. Ceci démontre que la régulation de l'autophagie dépend d'une balance entre les voies mTOR et AMPK.

mTOR et les pathologies humaines

Du fait de son rôle central dans la régulation de processus biologiques essentiels pour les organismes vivants, des anomalies de la voie mTOR peuvent conduire à différentes pathologies chez les mammifères dont la principale est le développement de cancers (pour revue, (Zoncu et al. 2011)). Nous avons vu précédemment que la kinase mTOR intervenait dans la régulation temporelle (mTORC1) et spatiale (mTORC2) de la croissance et des divisions cellulaires. Dans l'étude de Sato et al., 2010, les auteurs ont analysé les mutations mTOR présentes dans certains cas de cancers humains. Ils ont déterminé que les mutations S2215Y et R2505P provoquent une activation constitutive de mTORC1. Dans cet état d'hyperactivation, mTORC1 est insensible à la carence nutritionnelle et les cellules présentent une perturbation importante du cycle cellulaire, avec une augmentation de cellules en phase S (Sato et al. 2010). Toutefois, d'autres acteurs intervenant dans les voies mTOR peuvent également être mutés et potentiellement favoriser l'apparition de cancer, principalement lorsque cela conduit à une hyperactivation de la voie mTORC1. C'est le cas notamment de REDD1 qui permet de limiter la prolifération cellulaire en favorisant l'inhibition de mTORC1 par TSC. Ainsi, la perte de REDD1 conduit à un développement tumoral chez les cellules murines (DeYoung et al. 2008). Des mutations au niveau des protéines RICTOR, Rag-C, GATOR1, HIF1- α ou du complexe TSC peuvent également conduire à des événements pro-tumoraux (Bar-Peled et al. 2013; Cheng et al. 2015; Dill et al. 2015; Okosun et al. 2016;

Ho et al. 2017). La voie mTORC1 intervient également sur la viabilité et la longévité des organismes. Des souris déficientes en protéines S6K ont une forte réduction de leur viabilité (Pende et al. 2004).

La voie mTOR régulant différents aspects métaboliques, elle peut également être associée à des maladies métaboliques telles que l'obésité (Chang et al. 2009) ou le diabète de type 2, qui sont des pathologies observées lors de défaut de réponse à l'insuline (pour revue (Zoncu et al. 2011)). Une revue récente suggère que chez les personnes souffrant d'obésité, la voie mTOR pourrait être impliquée dans la sensibilité accrue au virus SARS-Cov-2. L'hypothèse avancée est que pour de forts apports nutritionnels favorisant l'obésité, la voie mTOR serait hyperactivée. Compte tenu du fait que les coronavirus, dont le SARS-Cov-2, détournent la machinerie traductionnelle cellulaire, une suractivation de mTOR favoriserait la réplication du virus chez les personnes souffrant d'obésité (Bolourian and Mojtahedi 2020).

Différentes études ont montré que la voie mTOR est également impliquée dans les phénomènes d'épilepsie. Il ressort que l'hyperactivation de la voie mTORC1 conduirait à l'apparition de crises épileptiques. L'inactivation de PTEN, lipide phosphatase inhibant l'accumulation de PIP₃ à la membrane (voir partie A.1.c.i, facteurs de croissance), conduit à la suractivation de mTORC1 et induit des crises d'épilepsie (Pun et al. 2012). De la même manière, la perte de fonction de DEPDC5, une GTPase activant GATOR1, un inhibiteur de mTORC1 (voir partie B.1.b), provoque également une suractivation de mTORC1. Chez les embryons de souris, cela se caractérise par des défauts de migration des cellules neuronales, qui peuvent être empêchés par l'injection de rapamycine. C'est à l'âge adulte que les souris KO DEPDC5 souffrent de ces crises (Ribierre et al. 2018).

Ainsi, de nombreuses études sont menées dans le domaine de la recherche médicale pour comprendre les régulations de la voie mTOR, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles et de nouveaux inhibiteurs de mTOR. La rapamycine a démontré son activité anti-tumorale (Eng et al. 1984) en inhibant la voie TOR mais elle est également utilisée pour limiter les rejets de greffes grâce à son rôle immunosuppresseur. Pour perfectionner les propriétés pharmacocinétiques de la rapamycine, des rapalogues (analogues de la rapamycine) sont également étudiés (Schreiber et al. 2019). Ces molécules pourraient ainsi servir de traitement pour différentes pathologies humaines.

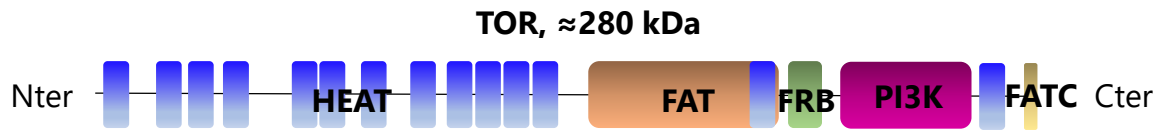


Figure 9: Représentation des 5 grands domaines conservés de la protéine TOR chez *Arabidopsis thaliana*

En N-terminal, la protéine TOR est composée de 12 répétitions HEAT (Huntingtin, facteur d'Elongation 3, sous-unité A de la protéine PP2A et TOR1), suivi du domaine FAT (FRAP, ATM, TRRAP), du domaine FRB (FKBP12 Rapamycin Binding) suivi du domaine kinase PI3K et en C-terminal le FATC (FRAP, ATM, TRRAP C-terminal).

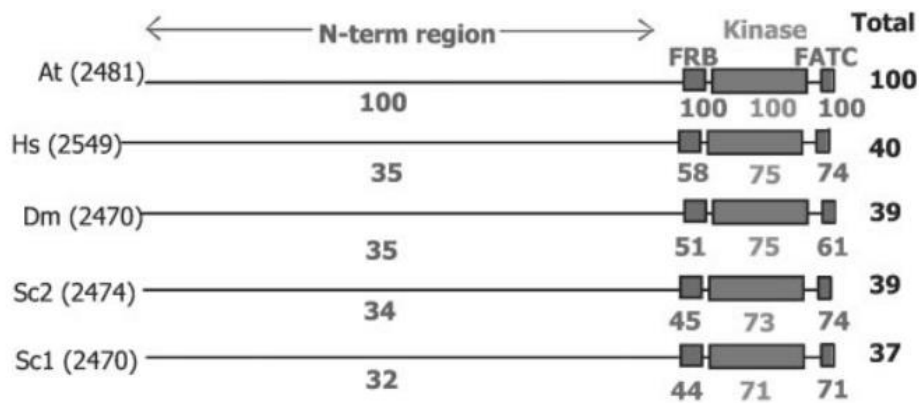


Figure 10: Comparaison des séquences protéiques de TOR chez *Arabidopsis thaliana* (At), *Homo sapiens* (Hs), *Drosophila melanogaster* (Dm) et *Saccharomyces Cerevisiae* (Sc). Issu de Menand et al., 2002

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre d'acides aminés constituant la protéine TOR pour chaque espèce. Les chiffres correspondent aux pourcentages d'identité par domaine entre la protéine AtTOR et les protéines TOR des autres espèces. Sc1 et Sc2 correspondent aux protéines TOR1 et TOR2 présentes chez *S.cerevisiae*.

2. Le complexe TORC1 chez les organismes photosynthétiques

a) Présentation du complexe TORC1 chez les plantes

Chez les organismes photosynthétiques, seul le complexe TORC1 a été mis en évidence à ce jour. Comme chez les mammifères, ce complexe TORC1 végétal est composé des protéines TOR, RAPTOR et LST8, que je vais décrire dans les différentes sous-parties suivantes. Il est à noter que comme chez les mammifères et la Levure, le complexe TORC1 est actif sous forme dimérisée chez les plantes (Brunkard et al. 2020).

i. AtTOR

Gène et structure de la protéine AtTOR

Chez Arabidopsis, comme chez les mammifères, on retrouve une seule protéine TOR (AtTOR), codée par un unique gène *TOR* (At1G50030). Cette protéine AtTOR constituée de 2481 acides-aminés, a une masse moléculaire de 279kDa (Menand et al. 2002). Par conséquent, la kinase TOR est une protéine de grande taille. Les cinq grands domaines protéiques décrits dans la partie A.1. pour les protéines TOR de Levure et de mammifères sont également présents chez AtTOR (*Figure 9*). On notera que le nombre de motifs HEAT en partie N-terminale s'élève à 12 pour cette espèce. Par ailleurs, ce domaine contient un motif Leucine Zipper qui permet à la protéine de se lier à l'ADN (Ren et al. 2011).

D'après l'étude de Menand et al. (2002), la séquence protéique de AtTOR présente une plus grande homologie de séquence avec mTOR avec laquelle elle partage 40% d'identité de séquence (*Figure 10*). D'autre part, AtTOR est plus proche de ScTOR2 (39% d'identité) que de ScTOR1 (37% d'identité).

Profil d'expression et localisation de la protéine

L'analyse de la collection du laboratoire a permis d'identifier un mutant d'ADN-T avec une séquence uidA, codant la protéine GUS, au niveau de l'ADN-T inséré dans le gène *AtTOR*. Ceci a permis de mettre en évidence le profil d'expression du gène *AtTOR*. Ce gène est exprimé principalement dans les zones riches en divisions cellulaires, telles que dans l'embryon et l'albumen dans la graine, au niveau des méristèmes primaires caulinaires, des méristèmes primaires et secondaires racinaires, ainsi qu'au niveau du centre quiescent du méristème racinaire (*Figure 11,1 et 2*) (Menand et al. 2002; Barrada et al. 2015). On retrouve également une expression de TOR au niveau des boutons floraux et de cals. Chez le haricot, les transcrits TOR sont retrouvés dans la plupart des tissus mais le niveau maximal d'expression est retrouvé dans la zone méristématique, suggérant que l'activité de TOR est tissu-spécifique (Nanjareddy et al. 2016). Au niveau

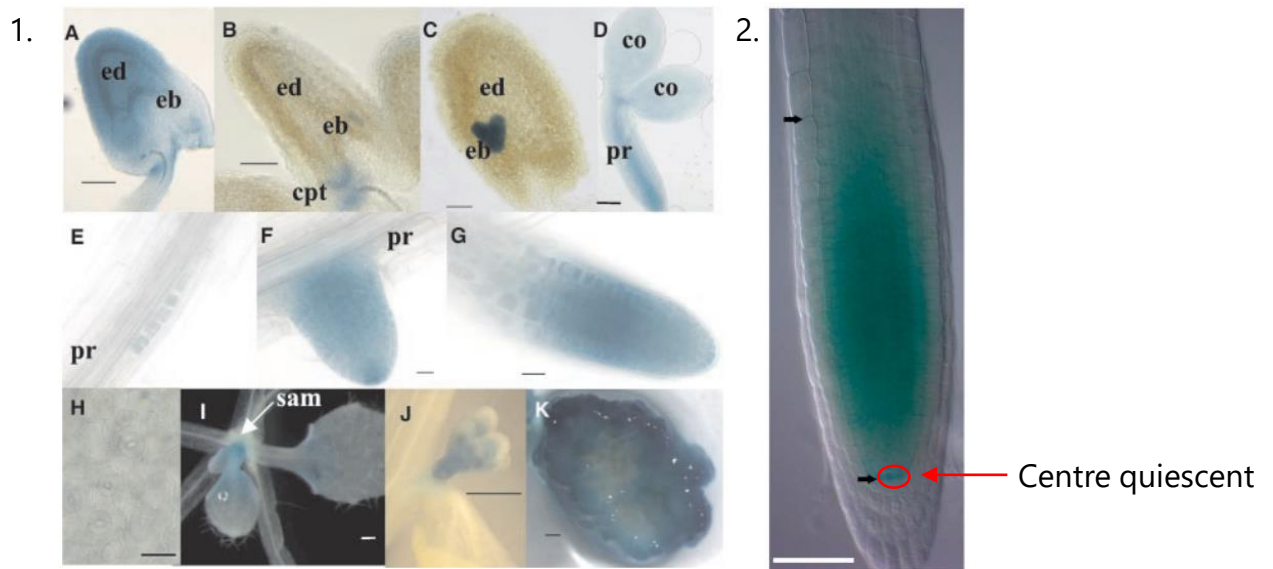


Figure 11: Expression du rapporteur TOR:GUS chez *Arabidopsis thaliana*

1. Localisation de la fusion TOR::GUS à différents stades du développement embryonnaire (A-D), au niveau de l'émergence des racines latérales (E-G), dans les feuilles (H), les feuilles primordiales (I), les boutons floraux (J) et un cal de 1 mois (K). Échelle: 50µm (A-D), 20µm (E-H), 500µm (I-K). ed= albumen, eb=embryon, cpt=chalaze, pr=racine principale, sam=méristème apical caulinaire. Issu de Menand et al., 2002

2. Plantules de 4 jours. Au niveau racinaire, AtTOR est exprimé au niveau du méristème et du centre quiescent. Les deux flèches noires délimitent le méristème racinaire. Le centre quiescent est entouré en rouge. Échelle: 50µm. Issu de Barrada et al., 2015

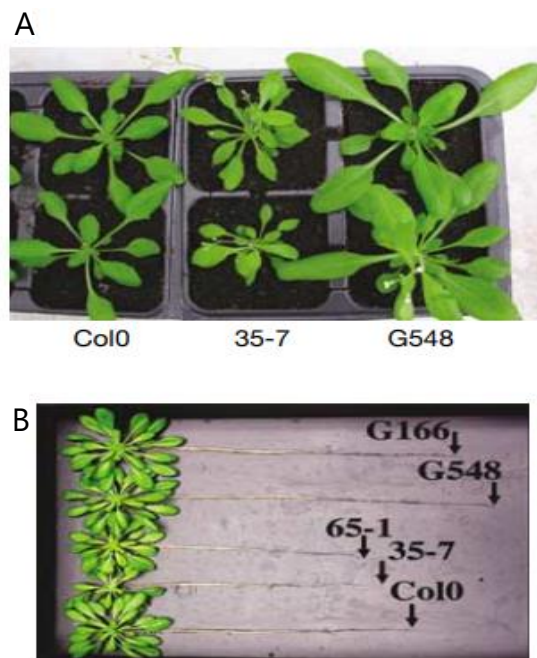


Figure 12: *AtTOR* régule positivement le développement général de la plante

Issu de Deprost et al., 2007

(A) Partie aérienne de plantes cultivées en serre pendant 36 jours.

(B) Partie racinaire de plantes cultivées en hydroponie pendant 49 jours.

Les lignées 35-7 et 65-1 correspondent à des lignées TOR RNAi.

Les lignées G548 et G166 correspondent à des lignées RNAi surexprimant *AtTOR*.

cellulaire, une protéine fusion TOR-GFP a permis de montrer que la protéine TOR est localisée au niveau du cytoplasme et du noyau. L'adressage au noyau dépend d'une séquence NLS6 présente au niveau du domaine kinase de TOR (Ren et al. 2011).

Les conséquences des mutations dans le gène *AtTOR*

Pour mieux comprendre les implications de cette protéine dans le développement de la plante, différentes approches ont été utilisées, comme l'inhibition totale de l'expression de *TOR* par l'insertion d'ADN-T (Menand et al. 2002), l'inactivation contrôlée de son expression par ARN interférant (RNAi) (Deprost et al. 2007) ou encore par une approche de surexpression sous contrôle d'un promoteur p35S.

Compte tenu de sa localisation, il apparaît que la kinase TOR est essentielle pour le développement de la plante. Dans l'étude de Menand et al. (2002), la mutation du gène *TOR* par l'insertion d'un ADN-T, proche du domaine FRB, est létale au stade précoce du développement embryonnaire. Afin de pouvoir étudier l'influence du niveau d'expression de *AtTOR* sur le développement de la plante, Deprost et al. ont étudié en 2007 des plantes (lignées 35-7 et 65-1, *Figure 12*) dans lesquelles l'expression du gène *TOR* était partiellement éteinte grâce à une construction RNAi. Ils ont ainsi démontré que la diminution d'expression de *TOR* limite le développement des plantes au niveau de la partie aérienne et racinaire. Cette inhibition du développement a été confirmée par différentes approches, notamment par l'utilisation de lignées à microARN artificiels inductibles à l'éthanol, pour diminuer les transcrits *TOR* (Deprost et al. 2007; Caldana et al. 2013). Dans ces conditions, la croissance des feuilles en cours de développement est totalement arrêtée, malgré une diminution de la quantité d'ARNm *AtTOR* estimée de 20%, démontrant l'importance de TOR dans le développement de la plante. A l'inverse, la surexpression de *TOR* stimule quant à elle le développement des plantes (lignées G548 et G166 en *Figure 12*) car les racines et les feuilles de rosettes de ces plantes sont plus grandes, tout comme la taille des cellules épidermiques. Pour déterminer si *TOR* pouvait aussi jouer un rôle dans l'élongation cellulaire, les auteurs ont cultivé les lignées G548 et G166 à l'obscurité. Chez les plantes étiolées, la croissance de l'hypocotyle dépend de l'élongation cellulaire. Toutefois, les résultats montrent que le niveau d'expression de *TOR* ne semble pas affecter la croissance des hypocotyles, suggérant que TOR n'est pas impliquée dans les processus d'élongation cellulaire.

L'inactivation de l'expression de TOR dans les lignées inductibles à l'éthanol conduit aussi à un phénotype de sénescence précoce, marquée notamment par l'augmentation des sucres solubles dans les feuilles ou une augmentation des activités GS (Glutamine Synthétase) et GDH (Glutamate Déshydrogénase). Ces résultats témoignent d'une certaine remobilisation nutritionnelle qui peut être en lien avec l'activation de

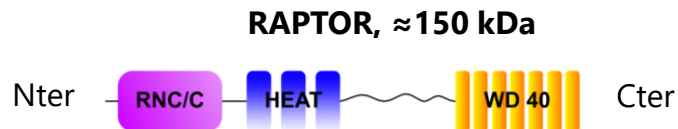


Figure 13: Représentation des 3 grands domaines conservés de la protéine RAPTOR chez *Arabidopsis thaliana*

En N-terminal, la protéine RAPTOR est composée du domaine RNC/C (Raptor N-terminal Conserved/Caspase), suivi de trois répétitions HEAT (Huntingtin, facteur d'Elongation 3, sous-unité A de la protéine PP2A et TOR1), et de sept motifs WD40 en C-terminal, permettant des interactions protéine-protéine.

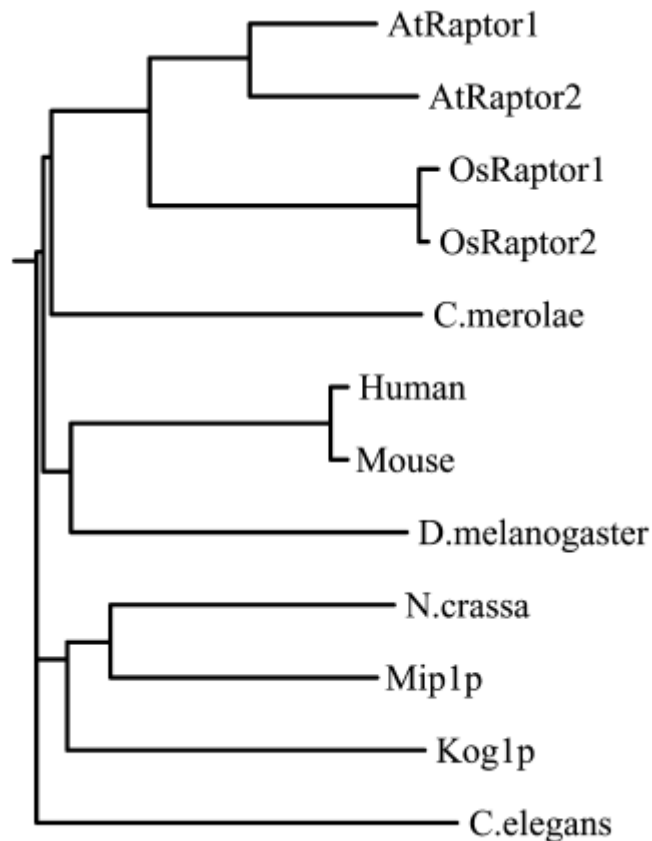


Figure 14: Arbre phylogénétique représentant l'homologie des séquences protéiques de RAPTOR au sein des eucaryotes

Alignement de séquence réalisé avec le programme ClustalW et l'analyse d'homologie de séquence avec le package Phylip et le programme Drawtree.

KOG1 correspond à la protéine RAPTOR chez *S.cerevisiae*, Mip1 chez *S.pombe*. Os= *Oryza sativa* (riz). Les séquences de RAPTOR sont très conservées entre les plantes supérieures. Issu de Deprost et al., 2005.

l'autophagie induite par l'inhibition de TOR (Deprost et al. 2007; Moreau et al. 2012; Caldana et al. 2013). Par ailleurs, un autre point phénotypique à noter est que des variations du niveau d'expression de *TOR* provoque également des variations au niveau de la quantité de graines produites, la surexpression de *TOR* augmentant la production de graines (Deprost et al. 2007). Par conséquent, la kinase TOR semble être impliquée dans le rendement des plantes, ce qui pourrait avoir des applications futures en agronomie.

Pour déterminer si tous les domaines protéiques de la kinase TOR sont impliqués dans cette régulation du développement, Ren et al., (2011) ont étudié les conséquences de la suppression de certains domaines sur le développement de la plante. En tronquant la protéine au niveau du domaine FATC (domaine en C-terminal), les mutants présentent un développement embryonnaire normal, indiquant que la protéine TOR reste fonctionnelle sans ce domaine. Il est intéressant de noter que chez les mammifères ou la Levure, ce domaine est essentiel pour que TOR soit fonctionnelle (Takahashi et al. 2000; Dames 2010), laissant supposer qu'il y a eu une divergence fonctionnelle entre les espèces au niveau du domaine FATC. En revanche, des insertions au niveau du domaine HEAT entraîne une létalité embryonnaire tout comme les insertions au niveau des domaines FAT et FRB. Du fait de l'importance de la fonction catalytique du domaine kinase, une insertion au niveau de ce domaine provoque l'arrêt complet du développement.

ii. RAPTOR

Gènes et structure de RAPTOR

Chez *Arabidopsis*, deux gènes *RAPTOR* ont été mis en évidence, *AtRaptor1* (At3G08850) et *AtRaptor2* (At5G01770) (Anderson et al. 2005; Deprost et al. 2005). Chez *Cyanidioschyzon merolae*, une algue rouge unicellulaire, seul un gène *RAPTOR* a été identifié, suggérant une duplication du gène ancestral chez les plantes vasculaires supérieures (Deprost et al. 2005).

Chez *Arabidopsis*, les deux gènes *RAPTOR* codent tous deux des protéines d'environ 150kDa qui partagent une séquence protéique commune de 76% (Deprost et al. 2005). Ces deux protéines sont composées de différents domaines (*Figure 13*), avec en N-terminal un motif conservé RNC/C (Raptor N-terminal Conserved / Caspase), proche d'un domaine caspase. Ce domaine est suivi de trois répétitions HEAT, impliquées dans les interactions protéines-protéines, notamment avec les motifs HEAT de la protéine TOR, ce qui participe à la formation du complexe TORC1 (Mahfouz 2006). En C-terminal, on compte sept motifs WD40, permettant la formation réversible de



Figure 15: Phénotype du mutant *raptor* chez *Arabidopsis thaliana*
Plantes cultivées en serre pendant 50 jours. Photo personnelle

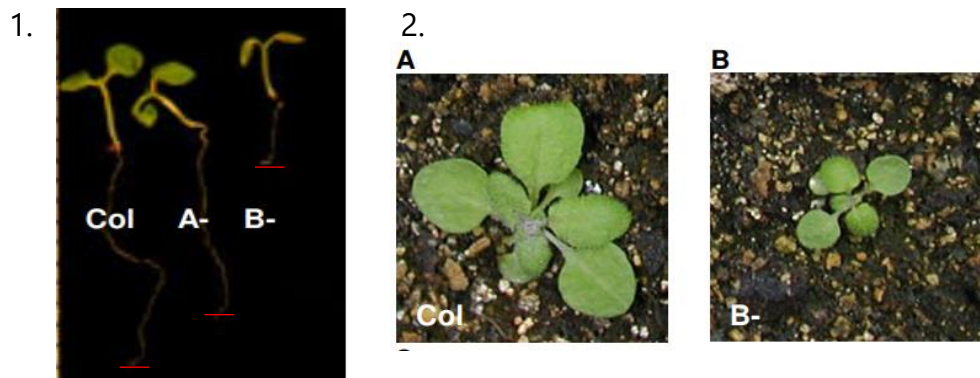


Figure 16: Phénotype du mutant *raptor* au niveau de la partie aérienne et racinaire

*Le mutant *raptor* présente un développement ralenti. (1) Racine du mutant *raptor* après 8 jours de culture sur milieu in vitro. Col= WT, A-= mutant *raptor*.5g (*RAPTOR2*) B-= mutant *raptor*.3g (*RAPTOR1*), (2) Plantes cultivées en serre pendant 15 jours. Issu de Anderson et al., 2005*

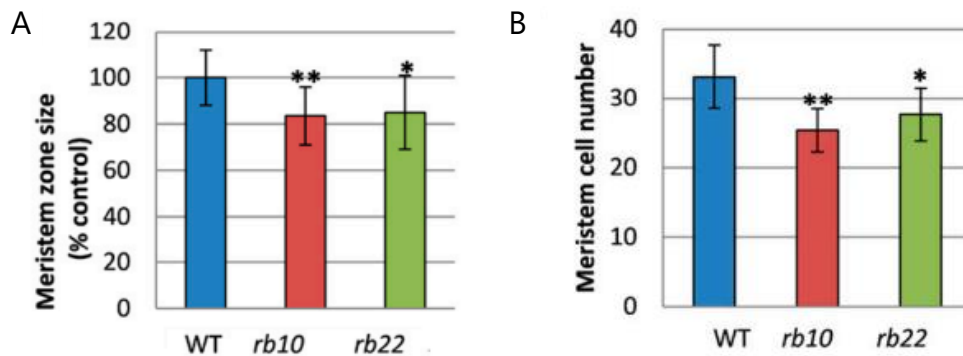


Figure 17: La mutation de *RAPTOR* impacte le méristème racinaire, expliquant la réduction de sa racine primaire

*Plantules de 12 jours (A) Taille du méristème racinaire, (B) Nombre de cellules du méristème. Mutants *rb10* et *rb22*= mutants du gène *RAPTOR1*. Issu de Salem et al., 2018*

complexes protéiques (Anderson et al. 2005). Les séquences protéiques des deux protéines RAPTOR sont très conservées entre les plantes supérieures (Figure 14).

Profil d'expression

Les deux gènes *RAPTOR*, présentent les mêmes profils d'expression. Ils sont exprimés dans différents tissus de la plante comme les racines, les rosettes, les cals et les graines. Toutefois le gène *AtRAPTOR1* est davantage exprimé par rapport à *AtRAPTOR2*. Par ailleurs, le niveau d'expression de *AtRAPTOR1* est assez proche à celui de *AtTOR* (Deprost et al. 2005).

Les mutants raptor

L'insertion d'un ADN-T dans le gène *TOR* étant létale au stade précoce du développement de l'embryon (Menand et al. 2002), l'étude en laboratoire de mutants *tor* s'avère délicate. Toutefois, il est possible d'utiliser des mutants des deux partenaires protéiques de TOR, RAPTOR et LST8, pour mener à bien ces études et comprendre les rôles du complexe TORC1 chez les plantes. Nous allons nous intéresser dans cette partie aux phénotypes des mutants *raptor*.

Dans la littérature, les premières études décrivant les deux gènes *RAPTOR*, Deprost et al. en 2005 et Anderson et al. en 2005, ont été publiés dans un court laps de temps. Par conséquent, la nomenclature des deux gènes *RAPTOR* n'est pas la même suivant l'article. Pour faciliter la compréhension, j'harmoniserai la nomenclature de la façon suivante :

Accession du gène	Nomenclature Article	Nomenclature harmonisée
At3G08850	<i>AtRaptor1</i> (Deprost et al., 2005) <i>AtRaptor1B</i> (Anderson et al., 2005)	<i>RAPTOR1</i>
At5G01770	<i>AtRaptor2</i> (Deprost et al., 2005) <i>AtRaptor1A</i> (Anderson et al., 2005)	<i>RAPTOR2</i>

D'après ces deux études, le mutant du gène *RAPTOR2* n'a pas de phénotype particulier, contrairement au mutant du gène *RAPTOR1*. Celui-ci présente un développement ralenti et diminué par rapport au WT (Figure 15), aussi bien au niveau de la partie aérienne qu'au niveau racinaire (Figure 16). En effet, ce mutant *raptor1* possède des racines plus petites et plus fines, du fait d'une réduction du nombre de cellules méristématiques et de la croissance du méristème racinaire apical (Figure 17) (Anderson et al. 2005; Salem et al. 2018) et présentant moins de poils racinaires (Salem et al. 2018). Du fait de ce retard général de croissance, la floraison de ce mutant se retrouve également impactée (Anderson et al. 2005). Le mutant *raptor2* n'ayant pas de

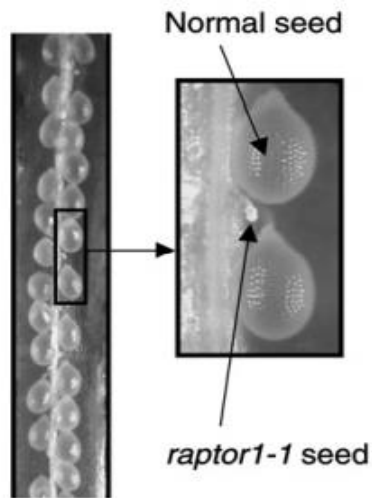


Figure 18: Phénotype de la mutation *raptor* au niveau de la graine

Silique hétérozygote du mutant raptor1. La mutation raptor peut stopper le développement embryonnaire. Issu de Deprost et al., 2004

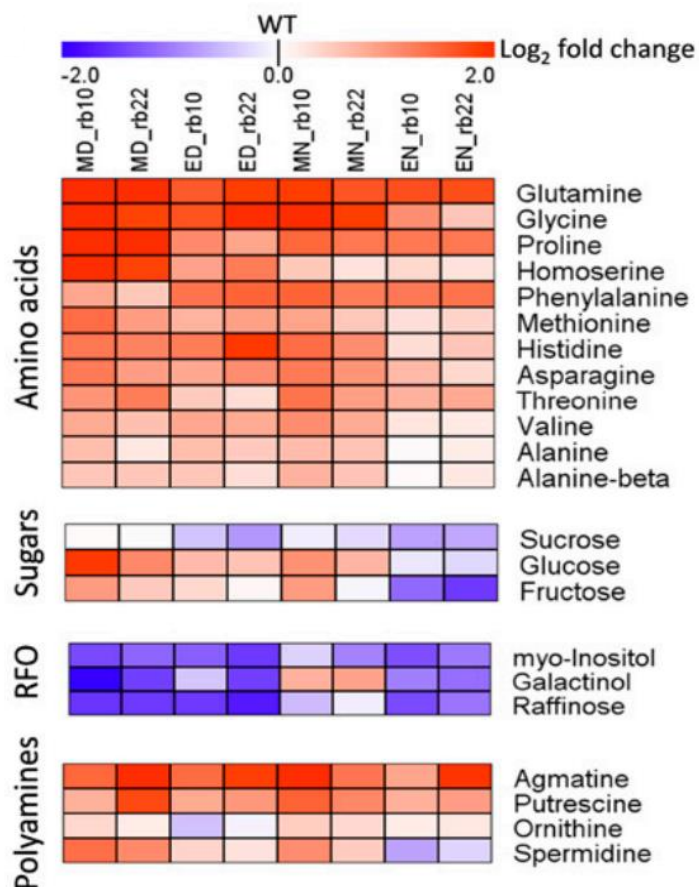


Figure 19: La mutation *raptor* entraîne des désordres métaboliques

Heat map montrant les modifications des teneurs en acides aminés, sucres, famille du raffinose et oligosaccharides (RFO) et des polyamines au sein de mutants raptor1 (rb10 et rb22) par rapport au WT. ED= End of the day, EN= End of the night, MD= middle of the day, MN= middle of the night. Issu de Salem et al., 2018

phénotype contrairement au mutant *raptor1*, seul le mutant *raptor1* sera étudié dans la suite de ce manuscrit. L'appellation « les mutants *raptor* » fera référence aux mutants alléliques du gène *RAPTOR1*.

D'autre part, Deprost et al. ont montré en 2005 que dans des siliques de plantes hétérozygotes, les graines homozygotes *raptor* avaient un développement fortement impacté comparé aux graines sauvages (*Figure 18*). Par ailleurs, les graines *raptor* présentent une perte de coloration par rapport aux graines WT, phénotype expliqué par la diminution du taux de flavonoïdes colorés de type proanthocyanidines chez le mutant (Salem et al. 2017). Ces graines sécrètent également moins de mucilage et présentent un retard de germination dû à des modifications hormonales au sein de la graine, notamment une augmentation du taux d'acide abscissique (ABA). Enfin, la viabilité des graines *raptor* est diminuée d'environ 20% par rapport aux graines WT, démontrant l'implication importante de *RAPTOR* dans le développement de la graine à la plante.

A ces perturbations développementales s'ajoutent également des perturbations métaboliques, caractérisées par une accumulation des acides-aminés et une diminution des oligosaccharides (*Figure 19*) (Salem et al. 2018). Ces dérégulations métaboliques seront traitées plus en détails dans la partie A.2.c)ii. La régulation des métabolismes primaire et secondaire.

iii. LST8

Gènes et Structure de LST8

Deux gènes *LST8* ont été mis en évidence chez *Arabidopsis* à savoir *LST8-1* (At3G18140) et *LST8-2* (At2G22040). Ces deux gènes sont composés de 10 exons et 9 introns. Le gène *LST8-1* code pour une petite protéine de 305 acides-aminés correspondant à un poids moléculaire de 34kDa tandis que le gène *LST8-2* code pour une protéine de 312 acides-aminés (35 kDa) (Moreau et al. 2012).

Ces petites protéines *LST8* présentent un seul type de domaine comportant sept motifs WD40 (*Figure 20*) qui permettent des interactions protéines-protéines, notamment avec la kinase TOR au niveau de ses domaines FRB et kinase comme cela a été démontré par une approche de double-hybride (Moreau et al. 2012).

D'après l'article de Moreau et al., 2012, les deux gènes *LST8* partagent 75% d'identité commune. Par ailleurs, ces protéines partagent davantage d'identité commune avec la protéine *LST8* de la levure que la protéine animale, avec des identités communes respectivement de 51 et 45%. Il est à noter que le mutant *lst8* chez la levure peut être

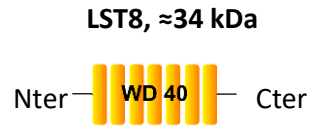


Figure 20: Représentation du domaine WD40 conservé de la protéine LST8 chez *Arabidopsis thaliana*
Ce domaine contient sept motifs WD40 permettant des interactions protéines-protéines.

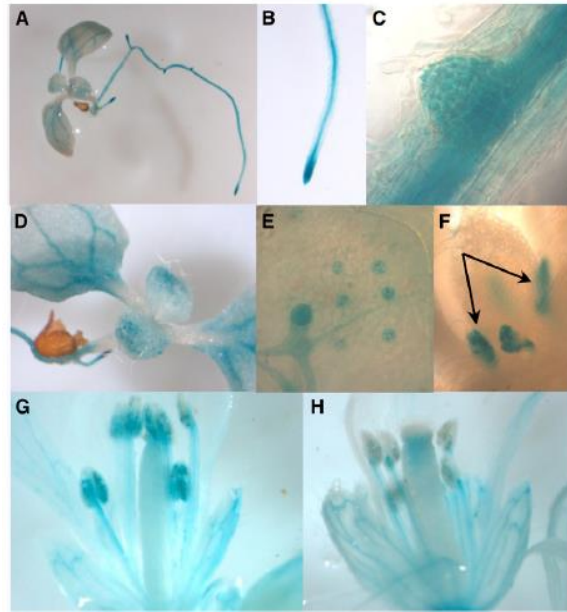


Figure 21: Localisation de l'expression de LST8 par la construction pLST8::GUS
(A) Plantule entière, (B) pointe racinaire, (C) émergence des racines secondaires, (D) partie aérienne, (E) cellules de garde, (F) feuilles et stipules, (G,H) fleurs. Issu de Moreau et al., 2012



Figure 22: Phénotype du mutant *lst8*
(A) Plantes cultivées 4 semaines en jour court en chambre de culture, (B) Plantes cultivées 4 semaines en jour court puis 1 semaine en jour long en chambre de culture. (A-B) Le WT est à gauche, le mutant *lst8* à droite, (C-D) culture du mutant *lst8* en serre, en jour long. (C) Multiples méristèmes apicaux (flèches rouges), (D) Multiples tiges. Issu de Moreau et al., 2012

complémenté par le gène *LST8-1* d'*Arabidopsis*, confirmant une certaine conservation de la fonction de cette protéine au sein des Eucaryotes.

Profil d'expression

Chez *Arabidopsis*, seul le gène *LST8-1* semble être significativement exprimé. Une fusion transcriptionnelle pLST8 ::GUS a permis de visualiser l'expression du gène *LST8-1* dans différents organes de la plante (*Figure 21* ; Moreau et al. 2012). Dans la racine, *LST8* est exprimé au niveau du cylindre central, des racines latérales émergentes et de la pointe racinaire. Concernant la partie aérienne de la plante, l'expression de *LST8-1* est retrouvée au niveau de la vasculature des cotylédons, au niveau des stomates et des stipules des feuilles. Enfin on retrouve également une expression de *LST8-1* au niveau des fleurs, notamment dans les anthères et le pollen.

Dans l'étude de Moreau et al. (2012), la fusion traductionnelle de LST8 ::GFP a permis d'identifier la localisation cellulaire de la protéine LST8. Celle-ci est associée aux endosomes.

Les mutants *lst8*

Le phénotype du mutant *lst8* a été très largement étudié dans la publication de Moreau et al. 2012. Compte tenu du fait que le gène *LST8-2* n'est pas exprimé, les auteurs ont porté leur analyse sur deux mutants nuls du gène *LST8-1*. Les insertions d'ADN-T sont localisées soit au niveau du 4^{ème} exon (*lst8-1-1*, Salk_02459), soit au niveau du 5^{ème} intron (*lst8-1-2*, Sail_641D10) mais ces deux mutants présentent des phénotypes similaires. Tout comme les mutants *raptor*, les mutants *lst8* ont des défauts de développement importants. Ces mutants présentent une diminution de leur croissance en jour court (culture avec 8h de jour), avec une réduction de leur partie aérienne et racinaire. Une culture en jour court empêche la floraison de ces mutants. Pour une culture en jour long, c'est-à-dire pour 16h de jour, leur phénotype est aggravé, pouvant aller jusqu'à l'arrêt complet du développement, avec un jaunissement des feuilles, indiquant la sénescence des tissus. Pour les plantes survivant à ces conditions, elles présentent un aspect « buissonnant », avec de nombreuses tiges, et elles développent de nombreux méristèmes apicaux (*Figure 22*). Certaines plantes parviennent à la floraison dans ces conditions mais les siliques de ces plantes sont très petites.

De plus, ces mutants *lst8* présentent également des désordres métaboliques accentués par la transition en jour long, au niveau azoté et carboné. On notera notamment une forte accumulation de glutamine et autres acides-aminés tels que la proline, une augmentation en amidon et sucres de type glucose et fructose, ou encore une

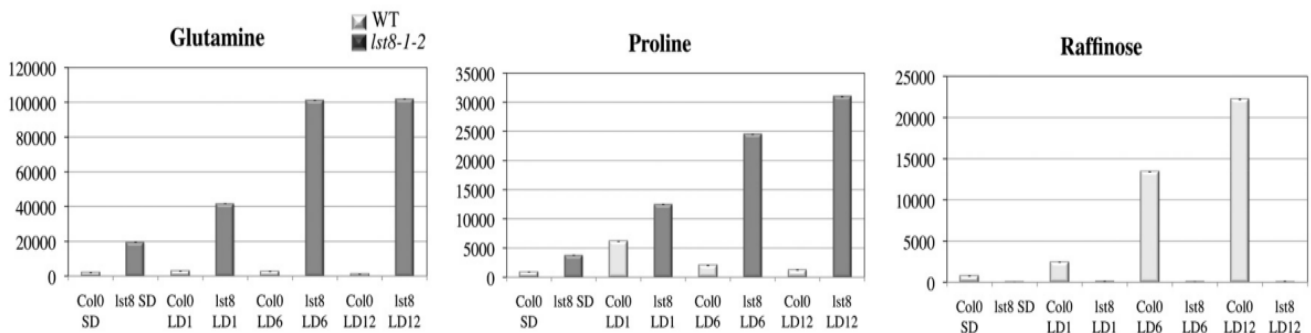


Figure 23: La mutation *Ist8* provoque des désordres métaboliques de type azoté et carboné, notamment lors du passage en jour long

Le mutant *Ist8* présente une accumulation de métabolites tels que la glutamine ou la proline mais pas de raffinose lors de la transition jours courts/ jours longs. Les valeurs sont dérivées des zones normalisées de pics spécifiques après une analyse GC-MS. SD= jour court (8h de lumière), LD= jour long (16h de lumière). LDn, nombre de jours en conditions LD. Issu de Moreau et al., 2012

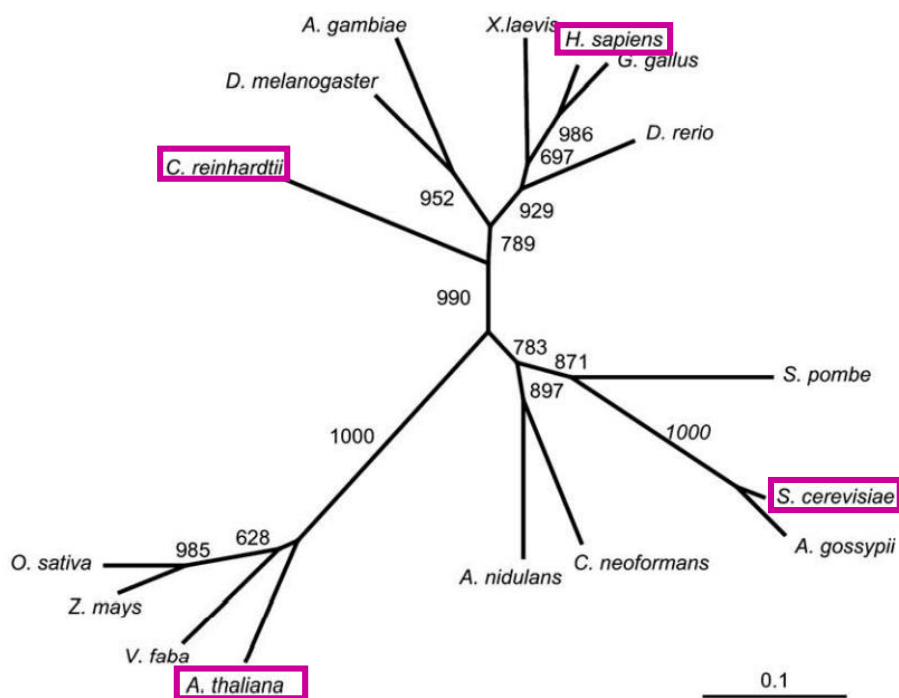


Figure 24: Arbre phylogénétique représentant la proximité entre les protéines FKBP12 au sein des eucaryotes

La protéine FKBP12 de *C. reinhardtii* est plus proche de celle de l'Homme que des plantes supérieures, expliquant la différence de sensibilité à la rapamycine par rapport aux plantes. Issu de Crespo et al., 2005

diminution importante des teneurs en osmoprotecteurs tels que le raffinose, galactinol et tréhalose, démontrant l'incapacité de ces mutants à s'adapter au passage en jour long (*Figure 23*) (Moreau et al. 2012). Ces dérégulations métaboliques seront traitées plus en détails dans la partie A.2.c)ii. La régulation des métabolismes primaire et secondaire.

b) Les outils pour l'étude de la voie de signalisation TOR

i. Les inhibiteurs de TOR, des outils d'étude du complexe TORC1

Nous avons vu au tout début de ce chapitre que la protéine kinase TOR a été découverte grâce à un crible sur rapamycine, considérée depuis comme l'Inhibiteur historique de TOR chez la Levure et les animaux. Toutefois chez les plantes, on observe une certaine insensibilité à cet inhibiteur, notamment chez *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* ou *Zea mays* (Menand et al. 2002; Crespo et al. 2005). Rappelons que pour se fixer à TOR et ainsi l'inhiber, la rapamycine doit se lier à la protéine FKBP12. Par une analyse double hybride, aucune interaction n'a été observée entre AtFKBP12, le domaine FRB de AtTOR et la rapamycine (Mahfouz et al. 2006; Sormani et al. 2007). Cependant, la protéine humaine HsFKBP12 peut se lier au domaine FRB d'AtTOR (Mahfouz et al. 2006). De même, la protéine de levure ScFKBP12 est également capable de fixer le domaine FRB de TOR en présence de rapamycine chez *Arabidopsis* (Menand et al. 2002; Sormani et al. 2007) et l'expression de ScFKBP12 chez *Arabidopsis* rend ces plantes transgéniques sensibles à cet inhibiteur (Sormani et al. 2007; Ren et al. 2012). L'hypothèse principale avancée dans ces études pour expliquer cette perte de sensibilité à la rapamycine chez les plantes est une différence importante de la séquence en acides-aminés de FKBP12 par rapport à celle de la Levure ou des mammifères (Mahfouz et al. 2006; Sormani et al. 2007). Ainsi, la croissance de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* est sensible à la rapamycine car la séquence protéique de FKBP12 chez *Chlamydomonas* est plus proche de la HsFKBP12 que des FKBP12 végétales (*Figure 24*) (Crespo et al. 2005).

Cependant, une étude réalisée sur une suspension de cellules végétales de type protoplastes a montré qu'à des concentrations nettement plus importantes (entre 1 et 10 μ M) que celles utilisées chez la Levure ou les mammifères (entre 10 et 50nM), la rapamycine pouvait avoir un effet sur la voie TOR de cellules végétales, nuanciant cette insensibilité constatée chez les plantes (Xiong and Sheen 2012).

De par l'importance de la voie mTOR chez les mammifères et son implication dans plusieurs pathologies humaines, cette protéine est devenue une cible thérapeutique d'intérêt en recherche médicale, occasionnant l'étude et la création de plusieurs molécules inhibitrices. Bien que les plantes soient relativement insensibles à la

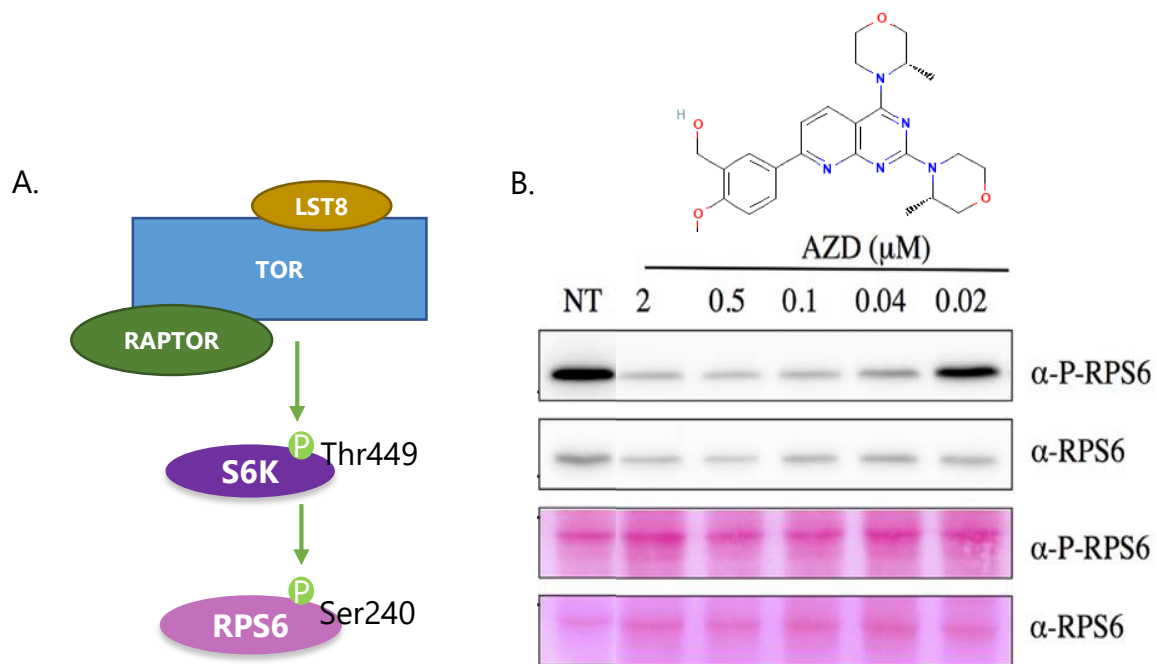


Figure 25: L'AZD-8055 (AZD) est un inhibiteur de TOR chez les plantes

(A) La kinase TOR, lorsqu'elle est active, phosphoryle S6K (S6 Kinase) qui phosphoryle à son tour la protéine ribosomale RPS6. En suivant l'état de phosphorylation de S6K ou RPS6 avec des anticorps spécifiques, il est possible de suivre l'activité du complexe TORC1. (B) Western-Blot réalisé chez *Arabidopsis thaliana* démontrant une baisse de la phosphorylation de RPS6 en présence d'AZD-8055 (AZD), de manière dose-dépendante. L'AZD est donc un inhibiteur de TOR. La structure chimique de l'AZD provient de PubChem. D'après Céline Forzani et Dobrenel et al., 2016

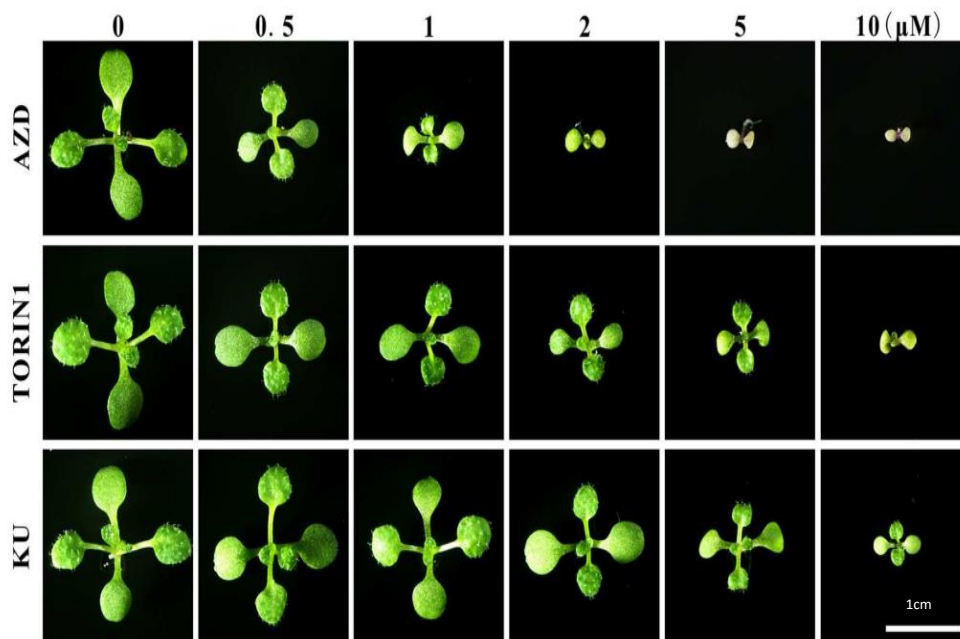


Figure 26: Effet de différents inhibiteurs de TOR sur le développement d'*Arabidopsis* Cotylédons à 10 jours de culture en présence d'inhibiteurs de TOR. L'AZD inhibe davantage le développement par rapport à la TORIN1 ou au KU. Issu de Dong et al., 2015

rapamycine, il existe d'autres inhibiteurs pharmacologiques ciblant TOR auxquelles les plantes sont sensibles. On distingue ainsi des molécules ciblant les PI3K, telles que le LY294002, puisque AtTOR possède un domaine kinase PI3K-like, des molécules ciblant spécifiquement TOR. C'est notamment le cas de l'AZD-8055 (*Figure 25, B*), les TORIN1/2, le KU ou le WYE-132. Ces molécules sont des inhibiteurs compétitifs de la fixation de l'ATP au niveau du domaine kinase de TOR. Toutefois, l'AZD est celui qui impacte le plus le développement des plantes (*Figure 26*) (Montané and Menand 2013; Dong et al. 2015). On notera que les mutants du complexe TORC1 sont hypersensibles à ces inhibiteurs, chez *Arabidopsis* comme chez *Chlamydomonas* (Forzani et al. 2019; Couso et al. 2020).

ii. Mesure de l'activité de TOR chez les plantes

Pour déterminer les acteurs ou signaux pouvant réguler l'activité de la kinase TOR, il est important d'avoir des outils permettant de suivre cette activité. Il est décrit dans la littérature que la kinase TOR phosphoryle la protéine kinase S6K y compris chez les organismes photosynthétiques, notamment au niveau du résidu Thr449 (Xiong and Sheen 2012; Xiong et al. 2013; O'Leary et al. 2020). La protéine RAPTOR est impliquée dans ce processus d'activation de la S6K, une interaction entre ces deux protéines ayant été mise en évidence. Ceci permet que S6K soit présentée à la kinase TOR, entraînant donc sa phosphorylation et activation. Une fois activée, la S6K phosphoryle à son tour d'autres cibles dont la protéine ribosomale S6 (RPS6), notamment sur un résidu Ser240 chez les plantes (*Figure 25, A*) (Mahfouz et al. 2006; Dobrenel et al. 2016). En laboratoire, il est donc possible d'estimer l'activité de TOR en mesurant l'état de phosphorylation par western blot soit de S6K, comme cible directe, soit de RPS6, comme cible indirecte, au niveau des résidus connus pour être phosphorylés par TOR. Ainsi, il est possible par exemple de confirmer l'effet d'inhibiteurs de TOR tels que l'AZD chez les plantes, démontré par la baisse de phosphorylation de RPS6 (*Figure 25, B*).

c) Rôles et implications du complexe TORC1 chez les organismes photosynthétiques

Nous allons nous intéresser dans cette partie aux différents rôles du complexe TORC1 chez les plantes et l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Les régulations TOR-Azote seront abordées quant-à-elles dans une partie spécifique, en B.3.

i. Les facteurs régulant la voie TOR en amont Le sucre, produit de la photosynthèse

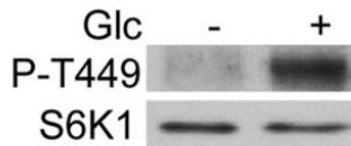


Figure 27: Le glucose active TOR chez *Arabidopsis thaliana*

Western blot montrant une augmentation de la phosphorylation de S6K sur le résidu T449 en présence de glucose alors que la quantité de protéine S6K est la même, démontrant une augmentation de l'activité de TOR dans ces conditions. Issu de Xiong and Sheen, 2012

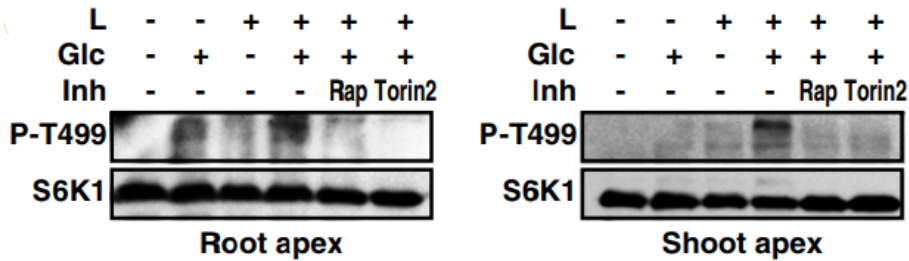


Figure 28: Le glucose seul peut activer TOR au niveau racinaire mais la lumière est nécessaire en plus du sucre pour cette activation au niveau de la partie aérienne

Augmentation de la phosphorylation de S6K sur le résidu T449, démontrant une augmentation de l'activité de TOR dans ces conditions. Rap=rapamycine, un inhibiteur de TOR tout comme Torin2. Glc= glucose, L= lumière. Issu de Xiong and Sheen, 2012

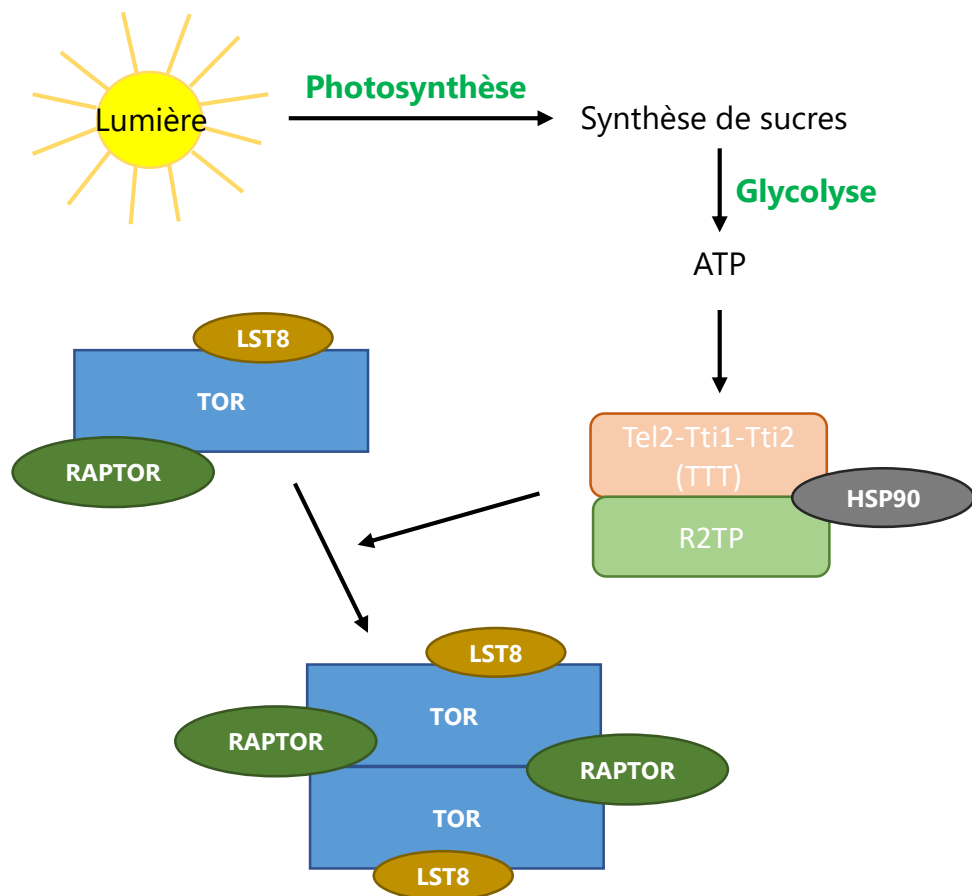


Figure 29: Le complexe R2TP/TTT-HSP90 permet la dimérisation du complexe TORC1 en présence de sucre

TTT= Tel2-Tti1-Tti2, R2TP= Pontin/RuvBL1-Reptin/RuvBL2-Spaghetti/Tah1-Pih1

Tout comme chez la Levure et les mammifères, de nombreuses études ont montré une activation de la voie TOR par les sucres chez les plantes principalement sous forme de saccharose ou de glucose (*Figure 27*) (Xiong and Sheen 2012; Xiong et al. 2013; Dobrenel et al. 2016). La lumière, au travers de la photosynthèse, permet la synthèse de sucre et d'autres métabolites carbonés chez les plantes. Ces composés carbonés sont essentiels à leur développement. Chen et al., (2018) ont démontré que la lumière permettait aussi l'activation de TOR indépendamment de la photosynthèse. Les détails de ce mécanisme régulé par l'auxine seront décrits dans le paragraphe portant sur les phytohormones (Partie A.2.c.i.). Le glucose seul peut activer TOR au niveau de l'apex racinaire tandis qu'au niveau de la partie aérienne, la lumière et le glucose ensemble sont nécessaires à l'activation de TOR (*Figure 28*), indiquant que ces deux types de signaux sont impliqués dans la régulation de TOR (X. Li et al. 2017). Le sucre intervient dans l'activation du complexe TORC1 en permettant sa dimérisation à l'aide d'un complexe de protéines chaperonnes composé de R2TP (Reptin-Pontin)-TTT et de HSP90 (Sugimoto 2018; Brunkard et al. 2020). Le sucre, à travers la glycolyse, permet la synthèse d'ATP. Le complexe R2TP-TTT/HSP90 est capable de percevoir des changements de niveau d'énergie, et plus particulièrement le niveau d'ATP. Ainsi, lorsque le niveau d'ATP est suffisant, ce complexe favorise la dimérisation de TORC1 (*Figure 29*). A l'inverse, une diminution des teneurs en sucre réduit la glycolyse et donc la synthèse d'ATP, ce qui limite l'activité du complexe R2TP-TTT/HSP90 et empêche la dimérisation et l'activation de TORC1. Enfin, une carence en sucre inhibe l'activité de TOR (Xiong and Sheen 2012) en conduisant notamment à l'activation de SnRK1 (Baena-Gonzalès and Lunn 2020).

Les nutriments

Les plantes ont besoin de carbone et d'azote pour se développer (l'azote sera traité dans ce chapitre introductif dans la partie B.3) mais elles utilisent également d'autres macronutriments essentiels présents dans le sol, tels que le potassium, le soufre ou encore le phosphore. Différentes études ont montré que ces éléments peuvent agir sur la voie TOR, qui perçoit ainsi leur disponibilité et permet de réguler en conséquence le développement de la plante.

L'ensemble de ces régulations nutritionnelles sont présentées en détails dans la revue (Ingargiola et al. 2020), présente à la fin de ce manuscrit. Seul le rôle de la voie TOR dans la perception de la disponibilité en phosphore (P) et soufre (S) seront décrits ci-dessous.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, le complexe TORC1 est impliqué dans la perception du P (Couso et al. 2020). Les auteurs ont montré que chez le WT, une carence en P

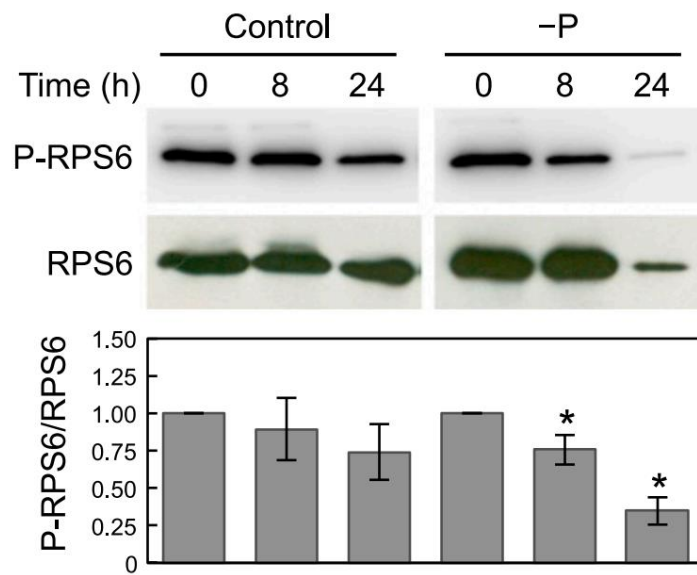


Figure 30: La carence en phosphore inhibe l'activité de TOR chez *C.reinhardtii*

Western blot montrant une diminution de la phosphorylation de RPS6, cible indirecte de TOR, dans le temps, lors d'une carence en phosphore (P). La quantification du ratio de la forme phosphorylée de RPS6 sur la forme totale (P-RPS6/RPS6) démontre que cette diminution de phosphorylation est significative uniquement en absence de P. Issu de Couso et al., 2020

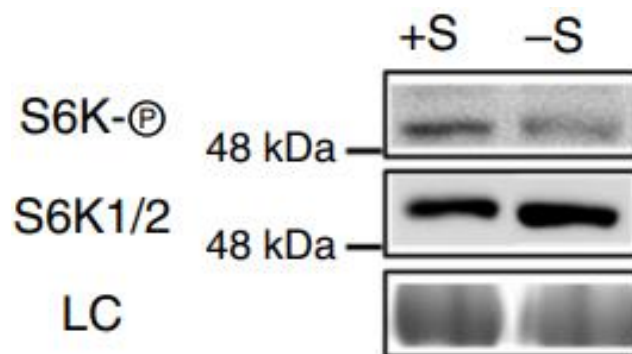


Figure 31: La carence en soufre inhibe l'activité de TOR chez *A.thaliana*

Western blot montrant une diminution de la phosphorylation de la kinase S6 (S6K), cible directe de TOR, lors d'une carence en soufre (S). Issu de Dong et al., 2017

entraîne une diminution de l'abondance de la protéine LST8, ainsi qu'une inhibition de la voie TOR (*Figure 30*) et donc une activation de l'autophagie, démontrée par l'augmentation de la protéine ATG8. Ainsi, le mutant *lst8* est hypersensible à une carence en P et surexprime une phosphatase alcaline nommée PHOX, qui est un marqueur de réponse à la carence en phosphore. Ces résultats démontrent donc l'implication du complexe TORC1 et plus précisément de LST8 dans la réponse au phosphore chez *Chlamydomonas*.

Le soufre (S) est également un macronutriment important pour les plantes, puisqu'il entre dans la composition de différentes molécules dont les acides aminés Cys et Met. Chez *Arabidopsis*, une étude a montré que le soufre agit également sur la voie TOR, une carence en soufre inhibant son activité (*Figure 31*) (Dong et al. 2017). En effet, l'assimilation du soufre requiert notamment l'enzyme Sulfite Réductase (SIR) qui réduit les sulfites en sulfides. Une carence en soufre entraîne donc une réduction des sulfides, affectant le métabolisme du carbone et la glycolyse. De par la baisse de glucose, l'activité du complexe TORC1 s'en retrouve inhibée. L'étude du mutant *sir1-1* a permis de confirmer cette relation entre le métabolisme du soufre et la voie TORC1, celle-ci étant également diminuée dans le mutant *sir1-1*. Ainsi, une limitation en soufre diminue l'activité de TOR de manière indirecte, notamment par la diminution de glucose, activateur connu de TOR. Cette inactivation de la voie TOR en condition de carence en soufre a ainsi comme conséquences une diminution de l'activité méristématique et une activation de l'autophagie (Dong et al. 2017).

SnRK1, l'antagoniste de TOR

Lors de situations de stress environnemental, comme une carence nutritionnelle, la voie TOR est généralement inhibée, permettant des phénomènes de recyclage et d'autophagie. L'acteur majoritaire de cette inhibition chez les plantes est la kinase SnRK1 (Snf1-Related Kinase 1) (Soto-Burgos and Bassham 2017), un complexe hétérotrimérique composée de sous-unités catalytiques α (KIN10, 11 et 12) et régulatrices β et γ (pour revue (Wurzinger et al. 2018)). SnRK1 est l'orthologue de la kinase AMPK (AMP-activated Kinase) chez les mammifères et de Snf1 (Sucrose non-fermenting 1 kinase) chez la Levure (pour revue (Crozet et al. 2014)). Les mutants *snrk1* présentent une augmentation de la phosphorylation de différentes cibles de TOR, notamment RPS6 (Nukarinen et al. 2016), prouvant que SnRK1 est un inhibiteur de la voie TOR. Par ailleurs, cette même étude a démontré par BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) une interaction entre SnRK1 et RAPTOR. En réalisant un test kinase *in vitro*, les auteurs ont également mis en évidence que la sous-unité KIN10 de la kinase SnRK1 phosphoryle la protéine RAPTOR, comme AMPK chez les

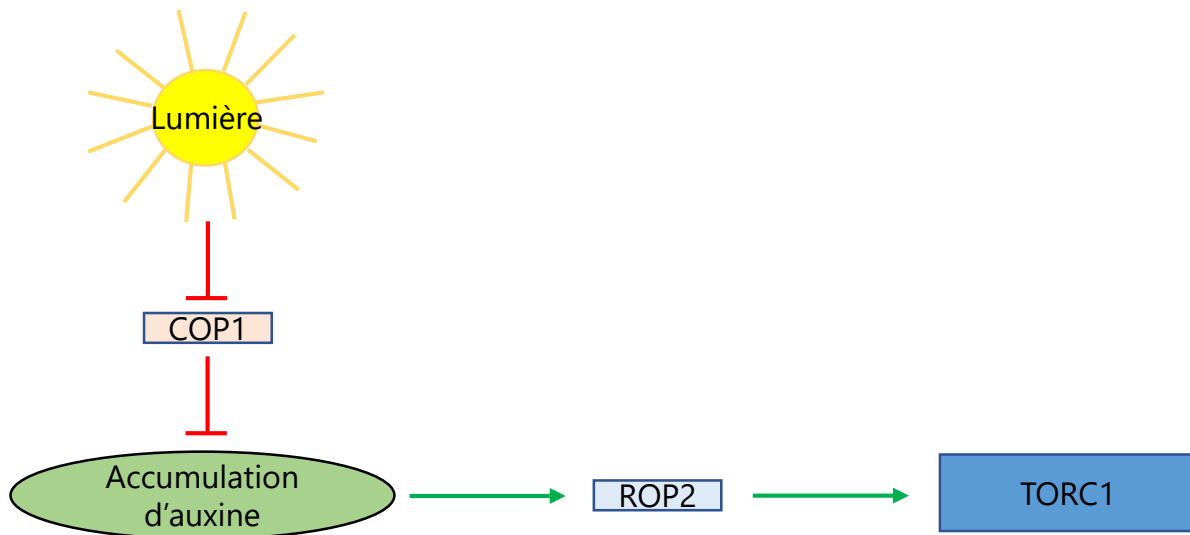


Figure 32: L'accumulation d'auxine permise par la lumière permet l'activation de ROP2, qui stimule la voie TOR

COP1=Constitutive Photomorphogenesis est une ubiquitine ligase E3 inhibant l'accumulation d'auxine. ROP2=Rho-like small GTPase 2, stimule le complexe TORC1. D'après l'étude de Cai et al., 2017

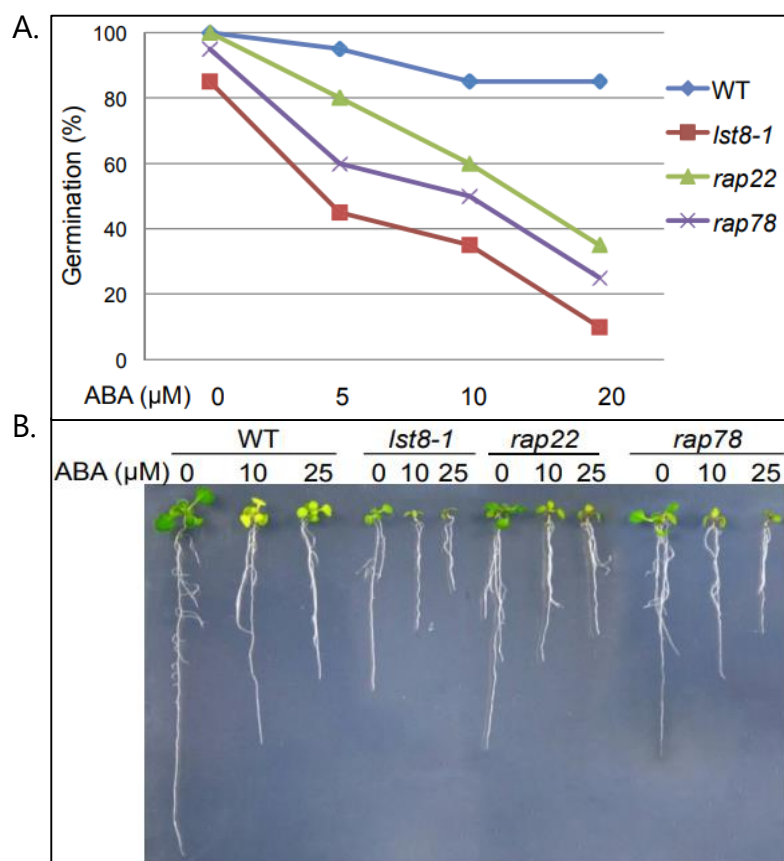


Figure 33: Les mutants du complexe TORC1 sont plus sensibles à l'ABA que le WT

(A) Pourcentage de germination des graines pour différentes concentrations en acide abscissique (ABA) 3 jours après stratification. (B) Plantules de 12 jours sur 1 μM d'ABA. rap22 et rap78 sont deux mutants alléliques du gène RAPTOR1.

Issu de Kravchenko et al., 2015

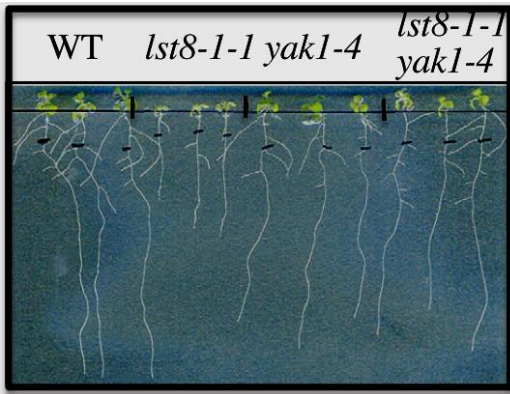
animaux. Cette phosphorylation pourrait entraîner un changement de conformation de RAPTOR et donc du complexe TORC1, inhibant ainsi l'activité kinase de TOR. Réciproquement, RAPTOR interagit également avec deux sous-unités de SnRK1, KIN10 et KIN11 (Van Leene et al. 2019, source BioGRID issu de Tair, The Arabidopsis Information Resource), témoignant d'une interaction forte entre ces deux voies de signalisation.

La lumière et les phytohormones

Des facteurs endogènes, comme les phytohormones, peuvent également influencer sur l'activité du complexe TORC1 chez les plantes. D'après la littérature, l'auxine, une phytohormone indispensable au développement de la plante, régule positivement la voie TOR (*Figure 32*) (Schepetilnikov et al. 2013; 2017). La lumière, indépendamment de la photosynthèse, permet l'activation de la voie TOR chez les plantes (Chen et al. 2018). La perception de la lumière via les photorécepteurs, phytochromes A et cryptochromes, conduit à l'inactivation de COP1 (Constitutive Photomorphogenesis), une ubiquitine ligase E3 agissant comme un inhibiteur de la synthèse d'auxine (Cai et al. 2017; H. Chen et al. 2018). La lumière favorise donc la biosynthèse et l'accumulation d'auxine au niveau de la partie aérienne des plantes. L'auxine permet alors l'activation de ROP2 (Rho-like small GTPase 2), protéine qui co-immunoprécipite avec TOR (X. Li et al. 2017), ce qui conduit à l'activation de TOR (X. Li et al. 2017; Schepetilnikov et al. 2017).

L'acide abscissique (ABA) est un régulateur négatif de la germination des graines. Plusieurs études ont montré que les mutants du complexe TOR présentent une hypersensibilité à l'application d'ABA. Ainsi les mutants TOR RNAi présentent une sensibilité accrue à l'ABA comparés au WT (Deprost et al. 2007; P. Wang et al. 2018), de même que les mutants *raptor* et *lst8* qui présentent une diminution dose-dépendante du taux de germination des graines ainsi qu'une altération du développement (*Figure 33*) (Kravchenko et al. 2015). On notera que le mutant *lst8* semble plus sensible à ce traitement que le mutant *raptor*. Toutefois, l'hypersensibilité du mutant *raptor* à l'ABA peut être partiellement compensée par l'application de gibbérellines (GA), permettant une amélioration de la germination malgré la présence d'ABA (Salem et al. 2017). Selon l'étude de Deprost et al., l'ABA diminuerait l'expression de *AtTOR* ou l'activité de la kinase, inhibant donc la voie TOR. L'ABA est aussi une hormone impliquée dans la réponse des plantes à certains stress abiotiques comme les stress hydriques et salins. Les plantes confrontées à ces stress vont rapidement synthétiser de l'ABA. Wang et al. (2018) ont démontré qu'en condition de stress, la perception de l'ABA par son récepteur conduit à l'activation de la kinase SnRK2 (SNF1-

A.



B.

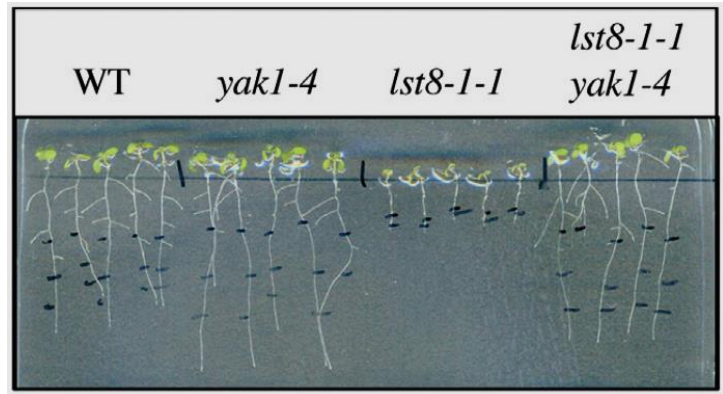


Figure 34: Le mutant *yak1* supprime le phénotype du mutant *lst8*

(A) Plantules de 12 jours *in vitro*, (B) le mutant *yak1* est moins sensible à l'AZD que le WT. *yak1* supprime l'hypersensibilité du mutant *lst8* à l'AZD. Plantules de 11 jours sur 1 μ M d'AZD. Issu de Forzani et al., 2019

Related Protein Kinase 2), impliquée comme SnRK1 dans la réponse aux stress. Une fois activée par l'ABA, SnRK2 phosphoryle la protéine RAPTOR au niveau du site Ser897, conduisant à la dissociation de RAPTOR du complexe TORC1 et donc à l'inhibition de l'activité de TOR.

ii. Les processus biologiques régulés par la voie TOR

De manière générale, on considère que lorsque les conditions environnementales sont favorables, le complexe TORC1 régule positivement les processus biologiques coûteux en énergie (traduction des ARNm, divisions cellulaires et réactions anaboliques) et inhibe les phénomènes de recyclage tels que l'autophagie. Nous allons voir plus en détails dans cette partie les processus biologiques régulés par la voie TOR chez les organismes photosynthétiques.

La régulation générale du développement

Nous avons vu en partie A.2.a. que l'inhibition de l'activité TOR par des agents pharmacologiques ou dans les fonds mutants *raptor* ou *lst8* entraîne un retard de développement important des plantes (Moreau et al. 2012; Montané and Menand 2013; Salem et al. 2018) tout comme une inhibition de la croissance cellulaire chez *C.reinhardtii* (Crespo et al. 2005). Chez le haricot, une lignée TOR RNAi présente une biomasse réduite. Ces plantes sont caractérisées notamment par une réduction de la partie aérienne et un système racinaire limité, tant au niveau de la longueur de la racine primaire que du nombre de racines latérales (Nanjareddy et al. 2016). La voie TOR est donc importante pour le développement général de la plante.

Ce développement résulte de régulations positives et négatives de différents processus. Chez *Arabidopsis*, TOR intervient dans la stimulation d'acteurs favorisant le développement et l'inhibition d'acteurs négatifs pour le développement. En effectuant un crible génétique pour sélectionner des supprimeurs du mutant *lst8* et ainsi identifier de nouveaux composants de la voie TOR, C. Forzani dans notre équipe a isolé le mutant *yak1* (Figure 34, A) (Forzani et al. 2019). YAK1 (Yet Another Kinase 1) est une protéine kinase de la famille DYRK (Dual specificity tyrosine phosphorylation Regulated Kinase). YAK1 peut phosphoryler différentes cibles sur des résidus Ser/Thr et Tyr mais elle est également capable de s'autophosphoryler, sur le résidu Ser-202 (Kim 2015). Cette kinase conservée chez les eucaryotes est impliquée dans la régulation négative du développement (Forzani et al. 2019). En effet, le croisement *lst8-1-1xyak1-4* (noté par la suite *lst8xyak1*) présente une meilleure croissance et une floraison plus précoce que le simple mutant *lst8-1-1*. De même, la mutation du gène *YAK1* entraîne une moindre

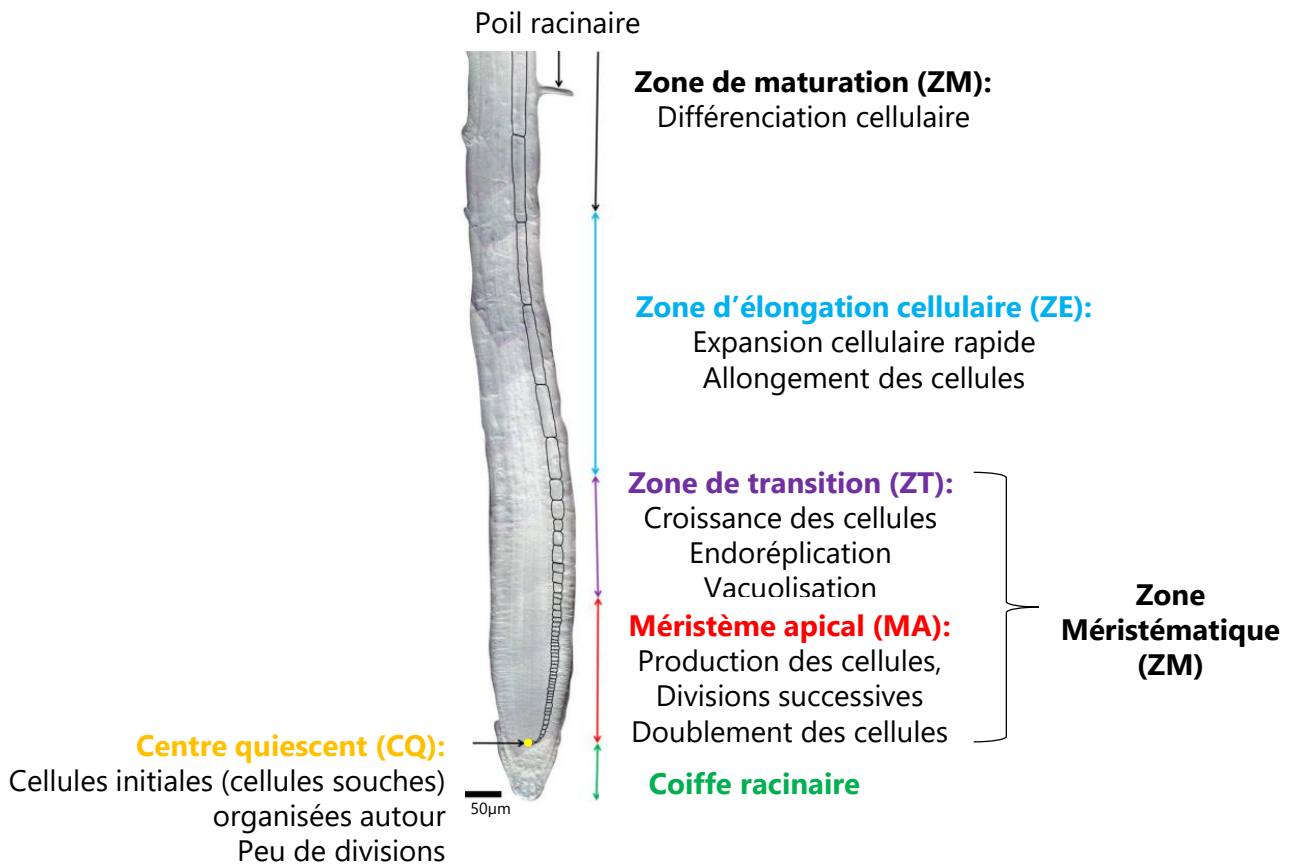


Figure 35: Organisation du méristème racinaire

Le méristème est composé de différentes zones: la coiffe racinaire, le centre quiescent, le méristème apical et la zone de transition, la zone d'élongation et la zone de maturation. La taille de cette représentation schématique n'est pas à l'échelle, la zone méristématique étant plus réduite par rapport à la zone d'élongation. Adapté de Barrada et al., 2015

sensibilité à l'inhibition de TOR par l'AZD que chez la plante sauvage et le double mutant *lst8yak1* est moins sensible à la présence d'AZD que le simple mutant *lst8* (Figure 34, B) (Barrada et al. 2019; Forzani et al. 2019).

Pour déterminer le lien entre la voie TOR et YAK1 et savoir si YAK1 est située en aval ou en amont de TOR, Forzani et al. ont suivi l'état de phosphorylation de la protéine RPS6 par western blot dans le mutant *yak1*. L'inhibition de *YAK1* ne change pas l'état de phosphorylation de RPS6 donc *YAK1* n'agit pas sur l'activité de TOR. De plus, une approche par BiFC a montré que *YAK1* interagit physiquement avec RAPTOR et que TOR phosphoryle *YAK1 in vitro*, entraînant son inactivation et favorisant *in fine* le développement de la plante (Forzani et al. 2019; Van Leene et al. 2019). En conclusion, *YAK1* est une cible de TOR qui est responsable d'une partie importante des perturbations développementales liées à l'inactivation de TOR.

La régulation du cycle cellulaire et des méristèmes

Les plantes sont des organismes ayant une croissance continue tout au long de leur vie. On distingue deux territoires à fortes divisions cellulaires aux extrémités de la plante, appelés méristèmes, qui permettent cette croissance : les méristèmes apicaux racinaire et caulinaire. L'activité de ces méristèmes est contrôlée notamment par les signaux environnementaux et les phytohormones. Le méristème apical racinaire (MAR) est constitué de différentes zones (Figure 35, adaptée de Barrada et al. 2015) : le Centre Quiescent (CQ) où se situent les cellules pluripotentes à faible taux de division, entouré des cellules dites initiales, qui vont être à l'origine des cellules des différents tissus de la racine. Ces cellules initiales vont se diviser une à une, entraînant une forte production cellulaire au niveau de la zone du Méristème Apical (MA), caractérisée par des divisions successives et un doublement du nombre de cellules. Les cellules filles issues de ces divisions sont ensuite poussées par les nouvelles cellules en division vers la zone de transition (ZT), où elles vont grossir notamment par des phénomènes d'endoréplication et de vacuolisation. La MA et la ZT forment ainsi ce qu'on appelle la Zone Méristématique (ZM). Les cellules issues de la ZM vont ensuite s'allonger dans le sens de la longueur de la racine. On observe ainsi une expansion cellulaire rapide au niveau de la Zone d'Elongation cellulaire (ZE), où l'on n'observe plus de division cellulaire. Enfin, les cellules une fois allongées vont commencer à se différencier pour acquérir leur identité cellulaire au niveau de la Zone de Maturation (ZDM). C'est à partir de cette zone que les poils racinaires absorbants commencent à se former.

De nombreuses études dans la littérature indiquent que TOR intervient dans la régulation des méristèmes. Le gène *TOR* est notamment exprimé dans le CQ (Barrada et al. 2015). Ainsi, la taille des cellules de la ZM est réduite en présence d'AZD de

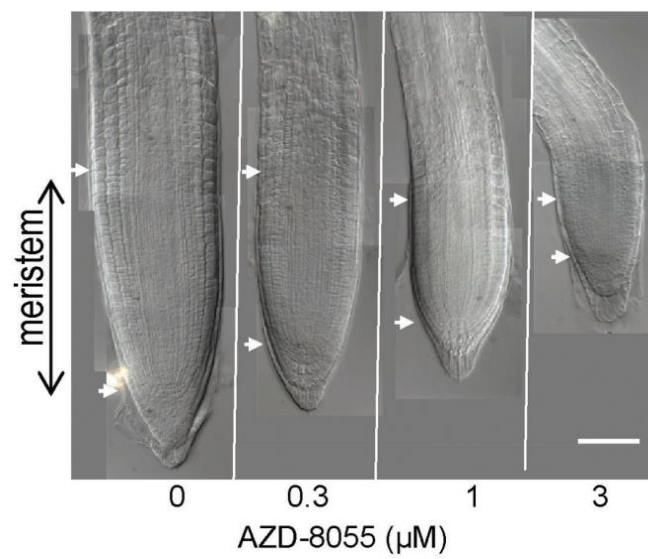


Figure 36: L'inhibition de TOR diminue la taille de la zone méristématique

Mesures réalisées 2 jours après transfert de plantules de 3 jours sur différentes concentrations d'AZD. Les deux flèches blanches délimitent la zone méristématique.

Issu de Montané and Menand, 2013

manière dose-dépendante (*Figure 36*), du fait de la diminution du nombre de cellules en division et à la diminution de leur croissance (Ren et al. 2012; Montané and Menand 2013). De la même manière, le mutant *raptor* présente également une réduction du méristème racinaire et du nombre de cellules méristématiques (Salem et al. 2018), démontrant que l'inactivation du complexe TOR impacte l'activité du méristème racinaire.

La division cellulaire est notamment sous le contrôle de kinases CDK (Cyclin Dependent Kinases), elles-mêmes régulées par des Cyclines (CYC). L'expression du marqueur CYCB1;1-GUS est ainsi utilisée pour déterminer le taux de cellules en division au niveau du méristème apical. L'expression de ce marqueur est réduite au niveau du méristème apical dans un contexte où TOR est inhibée, traduisant une diminution de l'activation des CDKs et donc une diminution de la capacité proliférative des cellules dans ces conditions (Barrada et al. 2015). Des résultats similaires ont également été obtenus chez le haricot où l'inhibition de TOR par RNAi conduit à une diminution de la taille du méristème racinaire et une réduction des transcrits de différentes cyclines (Nanjareddy et al. 2016). Ces résultats suggèrent donc que TOR participe à l'activité du méristème racinaire en régulant les processus de divisions cellulaires. De plus, en 2019 Barrada et al. ont mis en évidence que le gène *YAK1* est exprimé dans le méristème racinaire, notamment au niveau de la zone méristématique où *TOR* est également exprimé. Ceci suggère que TOR pourrait y réguler *YAK1*. Dans cette même étude, les auteurs ont montré que l'inhibition de TOR induit l'expression de certains gènes SMR (SiaMese-Related), codant des inhibiteurs de CDKs. Cette induction des gènes SMR sur AZD est abolie par l'ajout de pINDY, un inhibiteur de la kinase *YAK1*. Ces résultats suggèrent que le complexe TORC1, en réprimant l'activité de la kinase *YAK1*, favorise la division cellulaire en empêchant l'expression des gènes *SMR* (Barrada et al. 2019). En étudiant la taille de la zone méristématique après inhibition de TOR, il ressort que celle-ci est plus grande dans le mutant *yak1* sur AZD comparée au WT. De même, les cellules corticales sont plus nombreuses dans le mutant *yak1* sur AZD. Ceci indique clairement que la kinase *YAK1* est un régulateur négatif majeur de la régulation du nombre de divisions cellulaires à la fois des cellules méristématiques et différenciées. Montané et Menand avaient montré en 2013 que l'inhibition de TOR diminuait l'élongation cellulaire. Or, le mutant *yak1* sur AZD présente des cellules épidermales plus longues, démontrant que *YAK1* intervient négativement dans l'élongation cellulaire (Barrada et al. 2019). Enfin, dans un contexte où TOR est inhibée, la surexpression de *YAK1* provoque une réduction de la ZM tandis que son inhibition produit l'effet inverse. La réduction du méristème racinaire lorsque TOR est inhibée nécessite donc en aval l'intervention de *YAK1* (Barrada et al. 2019).

L'étude de Xiong et al. (2013) a montré que la voie TOR intervient également au niveau du méristème racinaire dans la régulation de la phase S du cycle cellulaire, phase correspondant à la réplication de l'ADN préalable à la division cellulaire. La régulation de l'expression des gènes impliqués dans cette phase S dépend de l'activité du facteur de transcription E2Fa, lui-même activé par la cascade de signalisation CYC-CDK-RBR (Retinoblastoma-related protein). Ces auteurs ont montré que l'activation par le glucose du complexe TOR conduit à l'expression des gènes régulés par E2Fa et permet la phosphorylation de la kinase S6K et de E2Fa. Ce dernier, qui co-immunoprécipite avec TOR, est une cible directe de TOR qui participe ainsi à sa régulation probablement indépendamment de la S6K et de la voie de signalisation CYC-CDK-RBR. Par conséquent, TOR intervient également dans la régulation du cycle cellulaire au niveau du méristème racinaire par l'intermédiaire de E2Fa.

Concernant la partie aérienne de la plante, TOR est également impliquée dans le contrôle du méristème apical caulinaire (MAC). L'activation du MAC dépend de la lumière à la fois comme molécule signal et comme activateur de la photosynthèse (Pfeiffer et al. 2016). La lumière et le glucose produit par la photosynthèse sont deux signaux qui participent ensemble à l'activation du méristème. Pfeiffer et al. (2016) ont montré que le complexe TORC1 est un intermédiaire majeur de l'activation transcriptionnelle de *WUS* (*WUSCHEL*) à la fois par la lumière, mais aussi comme senseur des produits issus de la photosynthèse. Le gène *WUS* est un gène méristématique exprimé au niveau de la zone centrale du méristème. Ce gène code la protéine à homéodomaine *WUS*, impliquée dans le maintien de l'identité méristématique des cellules souches, à l'inverse des protéines *CLAVATA* (*CLV*). Il existe une balance entre la régulation positive de l'expression de *CLV3* par *WUS* et la répression de l'expression de *WUS* par *CLV3*, permettant ainsi de maintenir la taille du réservoir de cellules souches dans la zone centrale du méristème (pour revue Doerner, 2000). TOR est également impliquée dans l'élongation cellulaire au niveau de la partie aérienne. La croissance des plantules dans l'obscurité permet d'observer ce phénomène d'élongation, sans aucune division cellulaire, en mesurant la longueur de l'hypocotyle. Lorsque TOR est inhibée, l'élongation cellulaire est diminuée car la croissance des hypocotyles est réduite dans ces conditions par rapport au sauvage (Ren et al. 2012).

Les régulations de la biogenèse ribosomale et de la traduction

La traduction est un processus essentiel dans le développement des organismes qui nécessite beaucoup d'énergie. Elle doit être finement régulée, notamment en fonction des facteurs biotiques et abiotiques auxquels sont soumis les organismes, pour

développer une réponse appropriée. Compte tenu de l'importance de la voie TOR dans la perception d'une grande variété de signaux et son implication dans les réponses biologiques, son rôle dans la régulation de la traduction a été étudié chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, l'expression du gène *AtEBP1* (ErbB-3 epidermal growth factor receptor binding protein, homologue de *4-EBP1* chez l'Homme, régulateur négatif de l'assemblage ribosomal et de la traduction) est plus importante lorsque *TOR* est surexprimé. A l'inverse, *AtEBP1* est moins exprimé dans un contexte où *TOR* est inhibé, laissant supposer que EBP1 pourrait être une cible de TOR dans la régulation de la traduction chez *Arabidopsis* (Deprost et al. 2007).

Dans des lignées TOR RNAi induites à l'éthanol, Deprost et al. en 2007 ont observé d'une part une diminution des polysomes, c'est-à-dire une diminution de l'abondance de ribosomes associés à un ARN messager, et d'autre part, une diminution d'un facteur deux de la quantité de protéines solubles. Ces résultats démontrent une régulation de la biogenèse ribosomale et donc de la traduction par TOR chez les plantes, comme chez les autres eucaryotes.

Il a ainsi été établi que TOR intervient dans la régulation de l'expression des transcrits des ARN ribosomaux (ARNr). En effet, les mutants embryonnaires *tor* présentent une faible expression de différents pré-ARNr 45S (ARNr 18S, petite sous-unité ribosomale, 5,8S et 25S, grande sous-unité ribosomale), qui ne dépasse pas les 40% par rapport au WT (Ren et al. 2011). Au contraire, la surexpression du domaine kinase TOR suffit à augmenter de six fois le taux d'expression des pré-ARNr 45S par rapport au WT, tandis que la surexpression totale de TOR permet une augmentation huit fois supérieure (Ren et al. 2011). TOR participerait à l'activation de l'expression du pré-ARNr 45S grâce à un motif de type « Leucine Zipper » présent au niveau de son domaine HEAT, qui permet une interaction directe avec la région promotrice du gène (Ren et al. 2011).

De plus, l'inhibition de TOR par la Torin2 diminue l'expression des ARNm codant les protéines ribosomales chloroplastiques (Dobrenel et al. 2016), cytosoliques et mitochondriales (Scarpin and al. 2020). Ainsi, le complexe TORC1 intervient dans la régulation de la traduction en participant aux processus de biogenèse des ribosomes.

Comme il a déjà été décrit précédemment (partie A.2.b)ii.), la kinase TOR en phosphorylant et activant la kinase S6K, induit la phosphorylation de la protéine RPS6 (Dobrenel et al. 2016). Le degré de phosphorylation de RPS6 est utilisé comme paramètre permettant de quantifier le niveau d'activité de TOR. La fonction de la protéine RPS6 et les conséquences de sa phosphorylation ne sont pas encore bien connues mais RPS6 étant un composant de la petite sous-unité 40S du ribosome, cela suggère que la voie TOR participe à la régulation de l'activité des ribosomes.

Enfin, une étude récente a démontré que la protéine LARP1 (La-related protein 1), impliquée dans la régulation de la traduction des ARNm en liant un motif polypyrimidines (TOP) en 5' des ARNm cibles et suivant son état de phosphorylation, est une cible de TOR (Scarpin et al. 2020). Certaines des protéines codées par ces ARNm participent à la biogenèse des ribosomes. Cette voie TORC1-LARP1-5'TOP est également retrouvée chez les mammifères (Tcherkezian et al. 2014).

La régulation des métabolismes primaire et secondaire

De nombreuses études métabolomiques menées chez *Arabidopsis* et *Chlamydomonas* ont montré que l'inhibition pharmacologique ou génétique du complexe TORC1 entraîne d'importantes perturbations du métabolisme primaire et secondaire.

La diminution de l'expression de TOR dans les lignées amiR*tor* (lignées à microARNs inductibles) provoque une importante accumulation d'acides-aminés tels que la glutamine, la proline ou l'histidine (Caldana et al. 2013), observée également suite à un traitement inhibiteur de TOR chez *Arabidopsis* ou *Chlamydomonas* (Ren et al. 2012; Jüppner et al. 2018), pour le mutant *lst8* (Moreau et al. 2012; Forzani et al. 2019) ou le mutant *raptor* (Salem et al. 2018). L'inhibition de TOR semble entraîner des défauts du métabolisme de l'azote ou de l'utilisation des composés azotés (Caldana et al. 2013).

On observe également une augmentation des intermédiaires du cycle de Krebs (TCA), comme le citrate, l' α -kétoglutarate, le succinate lorsque le complexe TORC1 est inactivé (Moreau et al. 2012; Ren et al. 2012; Caldana et al. 2013). L'inhibition de la voie TOR entraîne donc des altérations métaboliques au niveau azoté et carboné. L'étude de Forzani et al. démontre que l'accumulation d'acides-aminés et des intermédiaires du TCA du mutant *lst8* sont partiellement supprimés dans le double mutant *lst8xyak1*, suggérant que YAK1 pourrait être activée en absence de TOR et ainsi intervenir dans les modifications constatées, au moins dans le mutant *lst8*.

En plus des accumulations déjà mentionnées, les analyses montrent également un enrichissement des TAGs (Triacylglycérides), après inhibition de TOR que ce soit par une approche pharmacologique ou génétique (mutants *raptor* et *lst8*), chez *Arabidopsis* comme chez *Chlamydomonas*, démontrant l'implication du complexe TORC1 dans la régulation négative de la synthèse lipidique (Caldana et al. 2013; Imamura et al. 2015; Salem et al. 2018; Couso et al. 2020). L'amidon, composé servant de stockage comme les TAGs, est également accumulé lorsque TOR est inhibé (Moreau et al. 2012; Caldana et al. 2013; Salem et al. 2018).

Concernant les modifications du métabolisme secondaire, on retiendra principalement que l'inhibition de TOR provoque une augmentation des pigments de types

anthocyanes et flavonoïdes (Caldana et al. 2013; Salem et al. 2018). L'étude de Salem et al. de 2018 montre que le mutant *raptor1* présente également une accumulation des métabolites secondaires phénoliques et de la lignine. Les voies des polyamines, avec notamment une accumulation de putrescine, et des molécules antioxydantes sont également impactées par l'inhibition de TOR (Ren et al. 2012; Salem et al. 2018). Cette inhibition est accompagnée d'une élévation des composés de type ROS (Reactive Oxygen Species), témoignant d'un stress et désordre métabolique (Ren et al. 2012). L'ensemble de ces résultats démontrent que le complexe TORC1 est impliqué dans la régulation de nombreuses étapes du métabolisme primaire et secondaire.

Les régulations hormonales

Nous avons vu précédemment que les phytohormones telles que l'auxine et l'ABA pouvaient réguler la voie TORC1. La réciproque est également vraie. Au stade graine, le mutant *raptor* présente des modifications hormonales traduites par une augmentation des teneurs en ABA, auxine et acide jasmonique, expliquant le retard de germination de ces mutants (Salem et al. 2017). Au stade plantule, lorsque le complexe TORC1 est inactivé de manière pharmacologique (AZD), ou génétique (mutants *raptor* et *lst8*), des dosages par HPLC-MS/MS indiquent une forte diminution des teneurs en ABA, contrairement à d'autres hormones telles que les auxines ou l'acide salicylique (Kravchenko et al. 2015; Salem et al. 2018). On notera que cette diminution d'ABA est plus importante pour le mutant *lst8* que les mutants *raptor*. Pour expliquer cette diminution des teneurs en ABA et cette différence entre les mutants TORC1, les auteurs ont mesuré l'expression de gènes du métabolisme de l'ABA. Chez le WT traité à l'AZD et le mutant *lst8*, l'expression de différents gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ABA (*ZEP*, *NCED3* et *AAO3*) est diminuée, tandis que seule l'expression du gène *AAO3* semble diminuer significativement pour les mutants *raptor*. Le gène *CYP707A2* impliqué dans le catabolisme de l'ABA est quant à lui davantage exprimé lorsque TOR est inhibée. La voie TOR semble donc intervenir dans la régulation du métabolisme de l'ABA, en stimulant l'expression de gènes de biosynthèse et inhibant ceux du catabolisme (Kravchenko et al. 2015). De plus, Wang et al. en 2018 ont démontré que la kinase TOR phosphoryle la Ser119 des récepteurs à l'ABA, les PYLs, et notamment PYL1, cette phosphorylation étant réduite en présence d'inhibiteurs de TOR. La phosphorylation de ce résidu, en limitant l'interaction de l'ABA à son récepteur, entraîne l'inhibition de la voie de l'ABA et favorise le développement de la plante. Ces données suggèrent donc qu'en conditions favorables, le complexe TORC1 inhibe la perception de l'ABA, empêchant la mise en place des réponses aux stress de la plante.

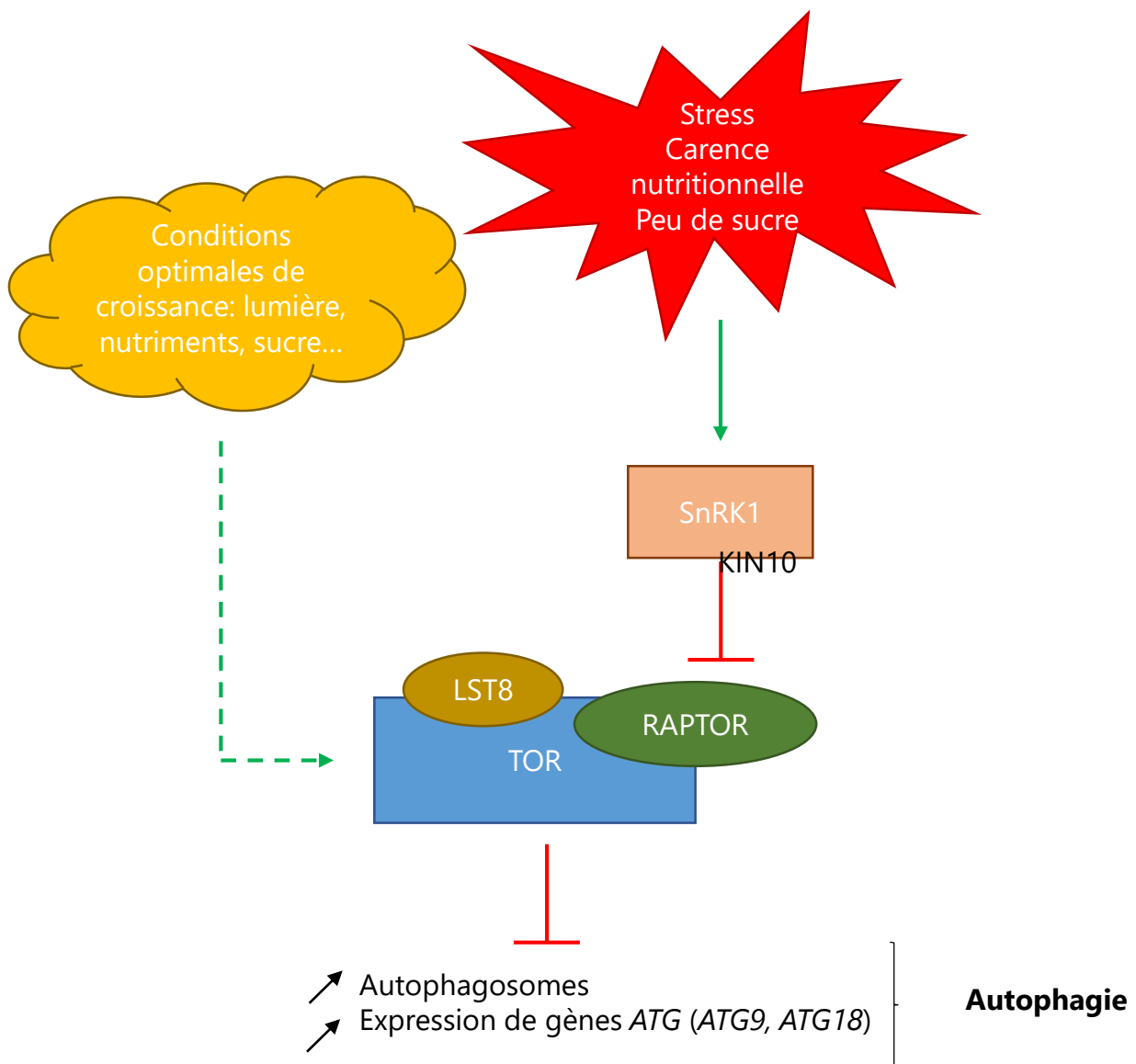


Figure 37: Le complexe TORC1 réprime l'autophagie lorsque les conditions de croissance sont optimales

En cas de stress, la kinase SnRK1, par sa sous-unité KIN10, inhibe le complexe TORC1, stimulant l'autophagie.

Par ailleurs, la voie TOR, en lien avec le sucre, favorise également la croissance des hypocotyles à l'obscurité, en stimulant la voie des Brassinostéroïdes (BR) (Z. Zhang et al. 2016). En effet, en présence de sucre, la voie TOR est active et induit l'élongation des hypocotyles. Une analyse transcriptomique réalisée sur des plantules étiolées RNAi de TOR, induites à l'éthanol (*tor-es*), a révélé une diminution de gènes de la biosynthèse des BRs mais également de gènes régulés par les Brs, dont certains sont impliqués dans l'élongation cellulaire. La voie des BR est donc également impliquée dans cette élongation de l'hypocotyle, notamment le facteur de transcription de la voie des BR, BZR1. Ce facteur de transcription agit en aval de TOR dans cette stimulation de l'élongation cellulaire, le croisement entre les mutants *bzr1xtor-es* se développant mieux que le simple mutant *tor-es*. De plus, une carence en sucre ou un traitement par l'AZD diminue les teneurs de BZR1 contrairement à la surexpression de TOR qui entraîne son accumulation. En effet, lorsque la kinase TOR est inhibée, lors d'une carence en sucre ou par un traitement à l'AZD, cela active l'autophagie qui va entraîner la dégradation de BZR1, limitant de ce fait l'élongation de l'hypocotyle. TOR permet donc de stabiliser BZR1, favorisant ainsi l'élongation de l'hypocotyle (Zhang et al. 2016).

En conclusion de ces régulations hormonales, la voie TOR réprimerait les réponses à l'ABA et favoriserait celles à l'auxine et aux BRs, de sorte à promouvoir le développement de la plante et inhiber les réponses aux stress lorsque les conditions environnementales sont favorables (et inversement en conditions défavorables). On notera la possible implication de YAK1 dans la voie de l'ABA, d'après l'identification de certaines protéines liées à l'ABA et phosphorylées par cette kinase (Kim et al. 2015). YAK1 intervient dans la régulation de l'expression de gènes de réponse à l'ABA (Kim et al. 2016) et les mutants *yak1* sont hyposensibles à cette hormone. Ainsi, l'introgression d'une mutation *yak1* dans un fond mutant *lst8* diminue-t-elle la sensibilité à l'ABA (Forzani et al. 2019).

La régulation de l'autophagie

L'autophagie est un mécanisme essentiel pour le recyclage de composés cellulaires. Il permet à la fois de limiter l'accumulation de composés pouvant être toxiques et de recycler des composants qui seront réutilisés pour la synthèse des macromolécules nécessaires au développement ou la survie de l'organisme, notamment en cas de carences nutritionnelles. Chez *Arabidopsis*, les gènes *ATG* (AuTophagy) sont importants pour ce mécanisme d'autophagie et une trentaine de gènes *ATG* sont nécessaires (pour revues (Avila-Ospina et al. 2014; van Rensburg et al. 2019)). La kinase *ATG1* avec la protéine *ATG13* forment un complexe permettant l'induction de

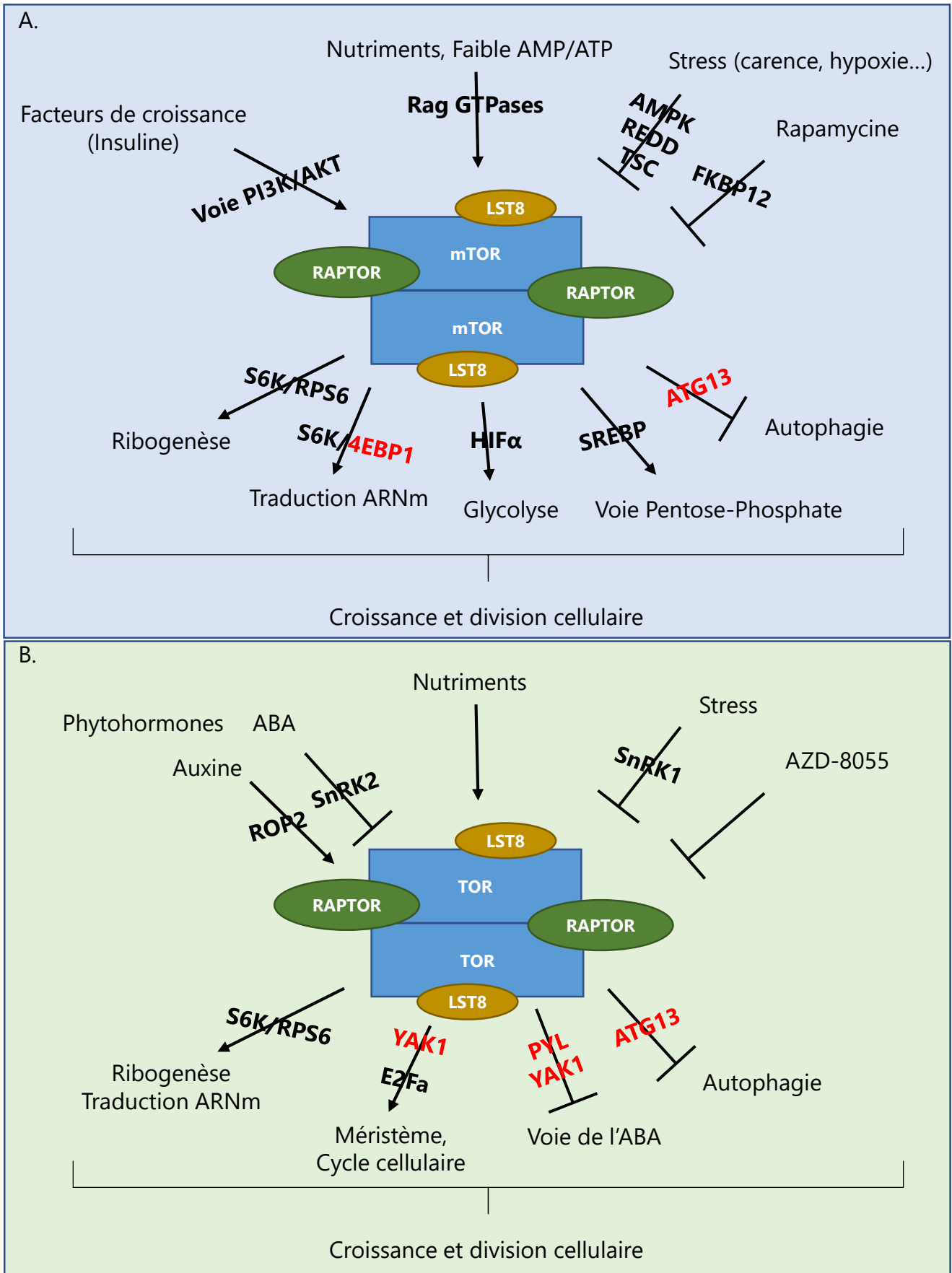


Figure 38: La voie TORC1 phosphoryle et contrôle de nombreuses cibles impliquées dans des processus similaires au sein des eucaryotes

Résumé de la voie TORC1 et de ses principaux acteurs chez (A) les animaux, (B) les organismes photosynthétiques. Les acteurs en rouge sont réprimés par TORC1.

l'autophagie. Le suivi par marquage du nombre et de la vitesse de déplacement des autophagosomes sont des paramètres renseignant sur l'état d'activation de l'autophagie. Il est possible de visualiser les autophagosomes en utilisant comme marqueur la protéine ATG8 fusionnée à la GFP, ATG8 participant également à leur formation et au recrutement de cargos (pour revue (Yin et al. 2020)). L'introgession de la fusion traductionnelle ATG8 ::GFP dans des lignées TOR RNAi, a permis d'observer une accumulation d'autophagosomes, traduisant une autophagie activée de manière constitutive (Liu and Bassham 2010). De plus, plusieurs gènes *ATG* tels que *ATG18*, *ATG9*, sont surexprimés dans ces lignées TOR RNAi. Cette régulation est conservée au sein des plantes puisque chez le haricot, les lignées TOR RNAi expriment davantage les gènes *ATG1*, *ATG13* et *ATG8* (Nanjareddy et al. 2016). Ceci suggère que le complexe TORC1 inhibe l'autophagie lorsqu'il est actif (*Figure 37*). Le gène *ATG18* est important pour la formation des autophagosomes, leur formation étant fortement impactée dans le mutant RNAi-*AtATG18* (Liu and Bassham 2010). En croisant cette lignée à une lignée TOR-RNAi, les auteurs n'ont plus observé d'accumulation d'autophagosomes, ce qui suggère que TOR régule l'autophagie de manière *ATG18* dépendante (Liu and Bassham 2010).

A l'inverse, on observe davantage d'autophagosomes lorsque la sous-unité KIN10 de SnRK1 est surexprimée, donc SnRK1 stimule l'autophagie (Soto-Burgos and Bassham 2017). Ceci est en accord avec le fait que, comme chez les mammifères, le complexe TORC1 inhibe l'autophagie mais lorsque celui-ci est inhibé par SnRK1, qui est activée par les carences nutritionnelles, on observe une plus forte activation de l'autophagie.

*En conclusion de cette première partie introductive, nous avons pu constater que la voie TOR joue véritablement un rôle de carrefour essentiel au développement et la survie de l'organisme, lui permettant d'intégrer les conditions environnementales afin d'y adapter son métabolisme et son développement. La voie TOR est capable de percevoir différents types de signaux (nutriments, facteurs de croissance et phytohormones, stress, lumière...) à travers différents acteurs (Rag GTPases, Rheb, AMPK/SnRK, ROP2...) pouvant être plus ou moins conservés. En réponse à ces cascades de signalisation, le complexe TORC1 va permettre la régulation de nombreux processus biologiques (biogenèse ribosomale et traduction, divisions cellulaires, croissance, autophagie, métabolisme) en ciblant des cibles variées (S6K et RPS6, EBP1, E2Fa, ATG, YAK1...) de manière très conservée au sein des eucaryotes (*Figure 38*).*

B. La voie TOR et l'azote chez les eucaryotes

L'azote est un élément essentiel pour la croissance des organismes vivants puisqu'il entre dans la composition de nombreuses molécules telles que les nucléotides, les acides aminés ou encore des composants de la paroi cellulaire. Ainsi, la perception de sa quantité et de sa qualité au niveau cellulaire est nécessaire pour développer une réponse appropriée, aussi bien au niveau cellulaire qu'à l'échelle de l'organisme. Dans cette seconde partie, nous allons détailler les régulations existantes entre l'azote et la voie TOR.

1. Régulations entre le complexe TOR et l'azote chez la Levure et les animaux

a) Régulations chez la Levure

i. Régulation du complexe TORC1

Chez la levure, une carence azotée entraîne une diminution de l'activité de TORC1, démontrée par la diminution de la phosphorylation de RPS6 au niveau des résidus Ser232/Ser233 (équivalent aux résidus Ser235/Ser236 chez l'Homme). Toutefois, l'ajout d'azote dans le milieu suite à cette carence permet la ré-augmentation de la phosphorylation de RPS6 (González et al. 2015). En effet, l'azote, sous forme d'acides aminés, est capable d'activer la voie TORC1 (Stracka et al. 2014; Reidman et al. 2019). En cultivant des *S.pombe* en milieu carencé, Reidman et al. ont montré dans leur étude de 2019 que l'ajout d'acides aminés tels que la glutamine, l'asparagine, ou l'arginine induit une augmentation du niveau de phosphorylation de PSK1, un substrat de TOR orthologue de la S6K animale, par rapport à la condition carencée. D'autres acides aminés ont été testés chez *S.pombe* ou *S.cerevisiae*, mais n'induisent qu'une très faible activation de TORC1, tels que le glutamate, la leucine ou la méthionine (Stracka et al. 2014; Reidman et al. 2019). Différentes classes d'acides aminés ont donc été déterminées en fonction de leur pouvoir activateur de TORC1 :

- Les forts activateurs : glutamine, asparagine, arginine, aspartate mais aussi l'ammonium
- Les intermédiaires : la sérine
- Les faibles activateurs : thréonine, glutamate, proline, les acides aminés branchés comme la valine, la leucine et l'isoleucine, les acides aminés hydrophobes (alanine, méthionine, phénylalanine et le tryptophane).

Cultiver des cellules en présence d'une source azotée de faible qualité (c'est-à-dire à faible pouvoir activateur, comme la proline), en ajoutant ensuite une source azotée de bonne qualité telle que la glutamine, permet d'augmenter significativement et en

quelques minutes la phosphorylation de cibles de TORC1, comme Sch9, un orthologue de S6K, chez *S.cerevisiae* (Stracka et al. 2014). Toutefois un traitement par la rapamycine, en présence de glutamine, inhibe cette phosphorylation, démontrant que Sch9 est bien phosphorylée par TORC1 en réponse à la glutamine. En étudiant l'effet de ces différentes sources azotées sur la croissance et la prolifération des cellules, Stracka et al. ont mis en évidence qu'une source azotée de bonne qualité permettait l'activation de la voie TORC1 et ainsi augmentait la prolifération cellulaire. Chez la Levure, comme chez les mammifères, les acides aminés peuvent réguler la voie TORC1 par l'intermédiaire de petites protéines à activité GTPase (small GTPases). Chez la Levure, Gtr1 et Gtr2 forment un hétérodimère, en réponse à certains acides aminés (Gtr1 est alors associé au GTP et Gtr2 au GDP). Ainsi activé, cet hétérodimère va pouvoir interagir avec KOG1, orthologue de RAPTOR, au niveau de la vacuole, permettant le recrutement et l'activation de TORC1 (pour revue, (González and Hall 2017)).

Toutefois, la glutamine, qui présente un fort pouvoir activateur de TORC1, se démarque des autres acides aminés puisque l'activation de TORC1 se fait indépendamment des Gtr (Tanigawa and Maeda 2017). Cette activation fait intervenir Vps34 (PI3K chez la Levure) et Pib2 (PI-3-phosphate [PI(3)P]-binding FYVE domain-containing vacuolar protein). Vps34, en formant du PI3P, permet le recrutement de Pib2 à la surface de la vacuole et, en présence de glutamine, Pib2 interagit avec TOR1 et KOG1, activant TORC1 (Tanigawa and Maeda 2017).

La glutamine est synthétisée à partir d'un ammonium et d'un glutamate, et cette réaction est catalysée par l'enzyme Glutamine Synthétase (GS). L'ajout de MSX, un inhibiteur de l'activité GS, diminue l'activité de TORC1 (Crespo et al. 2002; Stracka et al. 2014) sauf si de la glutamine est présente dans le milieu (Reidman et al. 2019). En revanche, la présence d'autres acides aminés, même s'ils ont un fort pouvoir activateur, ne permet pas de ré-induire l'activité de TORC1 en présence de MSX. Plusieurs études proposent que ces acides aminés doivent être préalablement convertis en glutamine pour activer la voie TORC1 (Stracka et al. 2014; Reidman et al. 2019). Un résultat qui conforte cette hypothèse est que le taux de glutamine intracellulaire augmente fortement lorsque les cellules sont cultivées en présence d'une source azotée de bonne qualité. A l'inverse, des cellules cultivées en présence d'une source azotée de faible qualité ne présentent qu'une très faible élévation des teneurs en glutamine intracellulaire (Stracka et al. 2014).

Chez la levure, PP2A est une phosphatase dont les sous-unités catalytiques sont notées Pph21 et Pph22. SIT4 est une phosphatase de type 2A, associée aux sous-unités catalytiques de PP2A. SIT4, Pph21 et Pph22 interagissent avec TAP42, un partenaire du complexe PP2A et une protéine essentielle à la survie de la cellule chez *S.cerevisiae* (Di

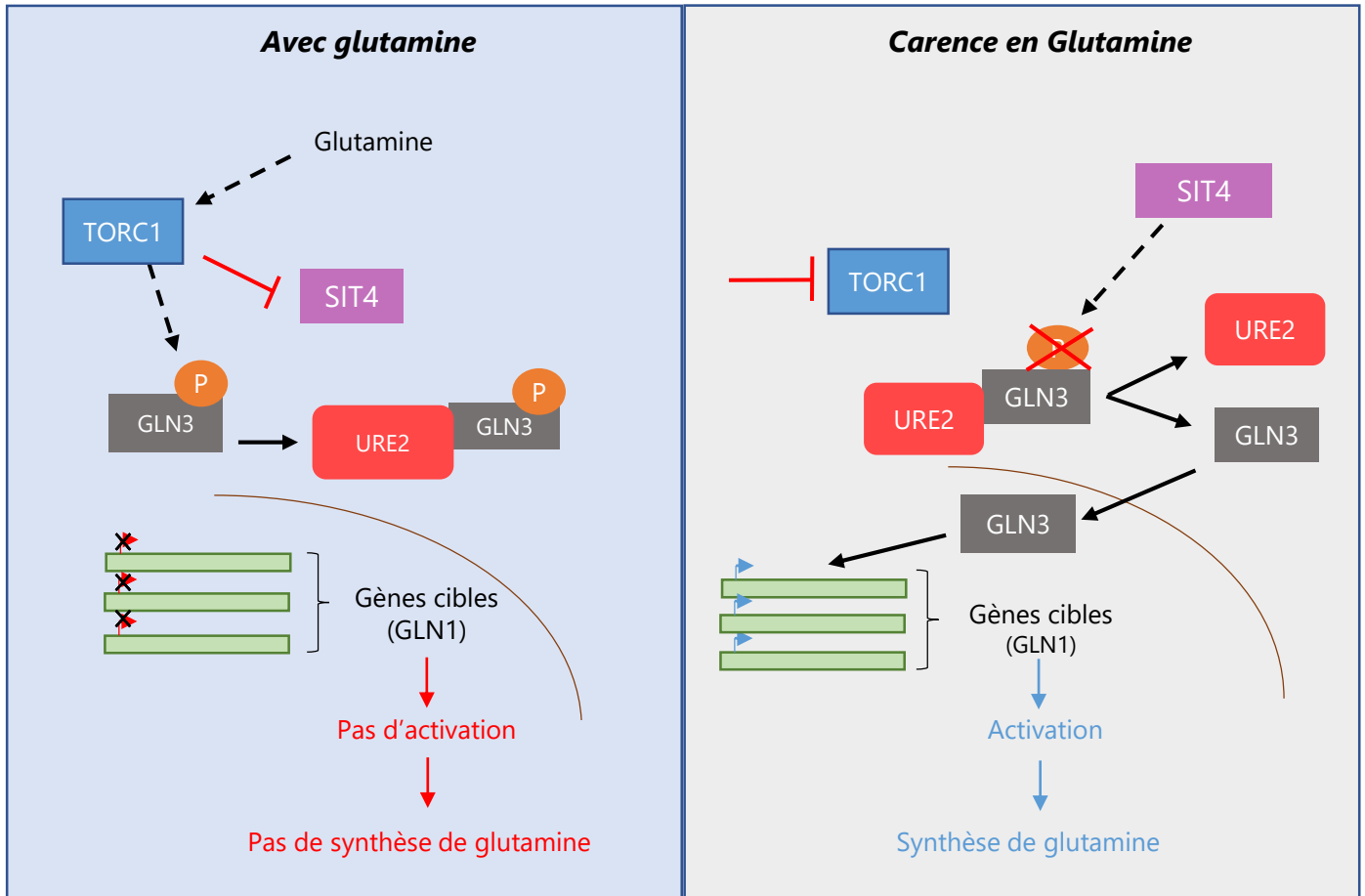


Figure 39: Chez la levure, TORC1 régule le facteur de transcription GLN3 en réponse à l'azote

En présence de glutamine, source d'azote préférentielle de la Levure, TORC1 est activé. GLN3 est phosphorylé et se retrouve lié à URE2, empêchant sa translocation nucléaire et l'activation de ses gènes cibles. Lorsque TORC1 est inhibé, l'inhibition sur la phosphatase SIT4 est levée, permettant la déphosphorylation de GLN3. Libéré d'URE2, il passe dans le noyau pour activer ses gènes cibles, dont GLN1 permettant la synthèse de glutamine. D'après les résultats de l'étude de Crespo et al., 2002.

Como and Arndt 1996). La phosphorylation de TAP42 par TOR entraîne l'interaction entre TAP42, SIT4 et Pph21 (Jiang and Broach 1999). Cette interaction s'avère importante pour leur fonction au sein de la cellule (Wang et al. 2003). En revanche, lorsque la voie TOR est inhibée, notamment lors d'une carence nutritionnelle, cela provoque la dissociation et l'activation de SIT4-TAP42 (Di Como and Arndt 1996).

ii. Régulation du métabolisme azoté par le complexe TORC1

Chez la Levure, la GS est codée par le gène *GLN1*. Ce gène est notamment régulé par le facteur de transcription GLN3. En présence de glutamine, GLN3 est phosphorylé et se lie avec la protéine URE2 au niveau du cytoplasme, empêchant l'expression de *GLN1*. Toutefois, un traitement au MSX ou à la rapamycine entraîne la déphosphorylation de GLN3 par SIT4 (qui est libérée de TAP42 dans ces conditions), le libérant d'URE2 et provoquant sa translocation dans le noyau et donc l'expression du gène *GLN1* (Crespo et al. 2002; Li et al. 2017). Ainsi, en présence de glutamine, TORC1 est activé et empêche la translocation nucléaire de GLN3 en inhibant SIT4 (*Figure 39*) (Crespo et al. 2002). Cela limite donc la synthèse de glutamine puisque celle-ci est disponible en quantité suffisante dans la cellule.

En conclusion, en fonction de l'environnement nutritionnel, le complexe TORC1 va pouvoir réguler différentes branches de programmes transcriptionnels pour contrôler la réponse adaptative de la cellule.

b) Régulations chez les animaux

Comme chez la Levure, la voie TORC1 est également activée par les acides aminés chez les animaux. Cette activation fait intervenir différents acteurs dans une cascade de signalisation aboutissant à la localisation de mTOR au niveau du lysosome (*Figure 40*) comme en témoigne une expérience de co-localisation de mTOR et RAPTOR avec un marqueur lysosomal, LAMP2 (Sancak et al. 2010). L'absence d'acides aminés empêche cette co-localisation lysosomale. Cette activation fait intervenir les small Rag GTPases. Chez les mammifères, on dénombre quatre Rag nommées RagA, RagB, RagC et RagD. Ces Rag peuvent former des hétérodimères RagA/B avec RagC/D (pour revue, González and Hall, 2017). La présence d'acides aminés modifie le statut GTP/GDP de ces hétérodimères et permet leur activation : RagA ou RagB sont couplés au GTP et RagC ou RagD sont couplés au GDP. Ceci permet alors le recrutement du complexe mTORC1 au niveau du lysosome, par une interaction directe avec la protéine RAPTOR. La co-localisation lysosomale en présence d'acides aminés est inhibée dans les fonds mutants

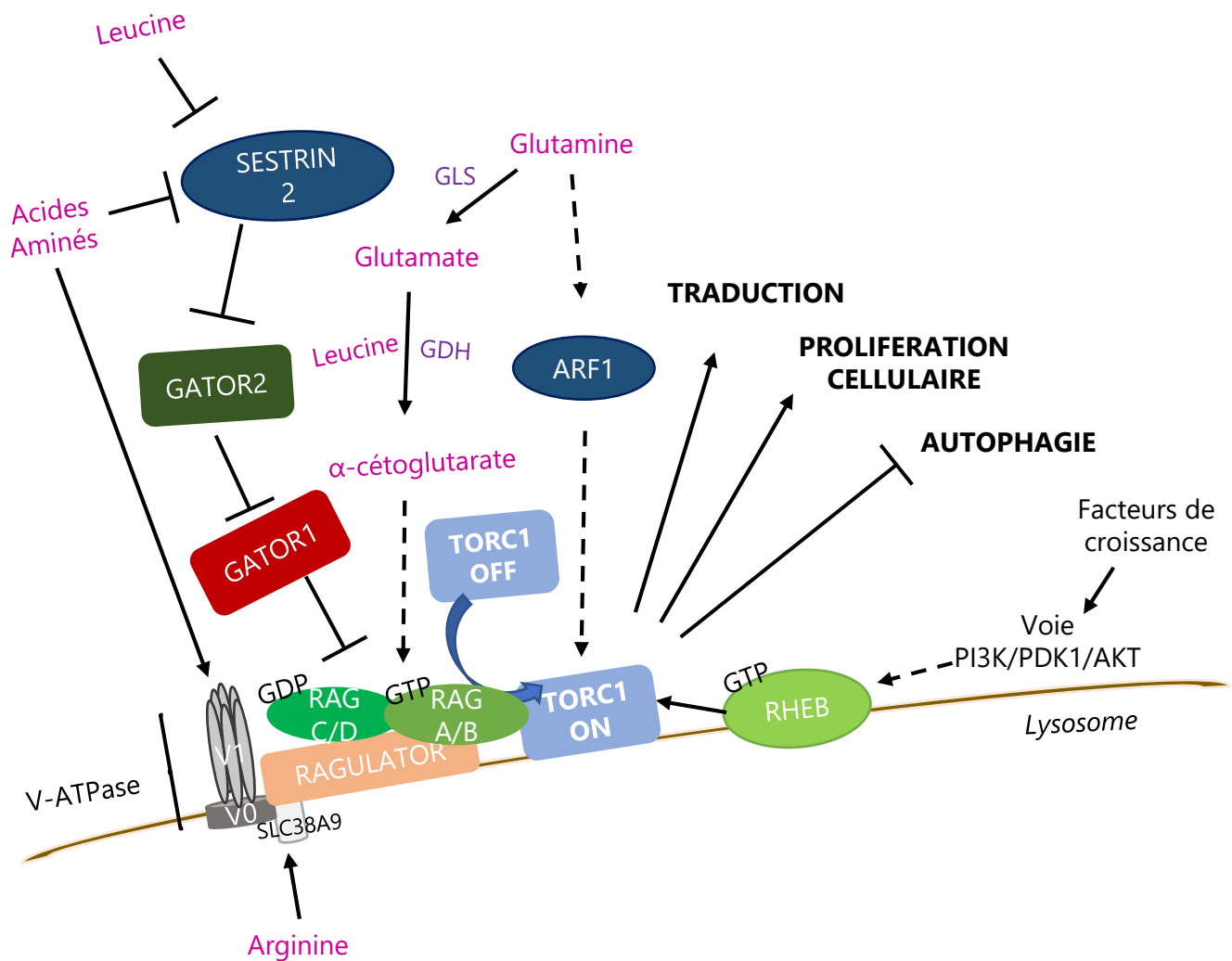


Figure 40: Représentation simplifiée des activations lysosomales de mTORC1 en réponse aux acides aminés

L'activation lysosomale de mTORC1 fait appel à différents acteurs. Les acides aminés activent les hétérodimères Rag (GTP pour RagA/B et GDP pour RagC/D) qui, avec le complexe RAGULATOR, permettent le recrutement de mTORC1 au lysosome et son activation. GATOR1 est un inhibiteur de RagB. En présence d'acides aminés GATOR2 se lie à GATOR1, inactivant ce dernier, ce qui permet l'induction de mTORC1. En absence d'azote, SESTRIN2 est actif et inhibe GATOR2. GATOR1 ainsi libéré inhibe RagB et empêche la translocation et l'activation lysosomale de mTORC1. La glutamine permet également l'activation de mTORC1 par différentes voies, notamment la synthèse d'α-cétoglutarate ou par le biais d'ARF1. RHEB, en réponse aux facteurs de croissance médiée par la voie PI3K/PDK1/AKT, va pouvoir activer mTORC1 dans ces conditions. L'activité de mTORC1 est donc régulée à plusieurs niveaux par les acides aminés. Suite à son activation lysosomale, mTORC1 va pouvoir phosphoryler différentes cibles, impliquées dans des processus essentiels tels que la traduction, la prolifération cellulaire ou l'autophagie.

ragA ou *ragB* démontrant que la translocation lysosomale de mTORC1 en réponse aux acides aminés se fait de manière Rag-dépendante (Sancak et al. 2010).

Cette même étude démontre qu'un autre élément, le complexe trimérique RAGULATOR, est également nécessaire à cette activation lysosomale de mTORC1 en présence d'acides aminés (Sancak et al. 2010). Ce complexe est également localisé au niveau de la membrane lysosomale et interagit avec les Rag GTPases. Une mutation dans le gène *RAGULATOR* entraîne une localisation cytoplasmique de mTORC1 malgré la présence d'acides aminés. De plus, en présence d'acides aminés, lorsque la protéine RagB est chargée en GTP, une co-immunoprécipitation a permis de mettre en évidence l'interaction entre RAGULATOR et les protéines mTORC1 et RAPTOR. L'ensemble RAGULATOR-RagGTPases(GTP)-mTORC1 forme donc un super-complexe au niveau du lysosome pour permettre l'activation de la voie mTORC1 en réponse aux acides aminés (Sancak et al. 2010).

La localisation lysosomale de mTORC1 est également régulée par deux complexes pentamériques, GATOR1 et GATOR2. GATOR1 inhibe la localisation lysosomale de mTORC1 tandis que GATOR2 favorise cette translocation lysosomale de mTORC1 en interagissant et inhibant GATOR1, lorsque les conditions nutritionnelles sont favorables (Kim et al. 2015). Les protéines SESTRINs vont quant à elles réguler négativement la voie mTORC1, notamment lors de stress, par le biais de deux voies différentes : d'une part, par l'activation de la voie AMPK/TSC et d'autre part, en contrôlant l'activité des protéines GATORs selon les conditions nutritionnelles (*Figures 6 et 40*). La protéine SESTRIN2 peut spécifiquement se lier à GATOR2, mais pas à GATOR1. Cette fixation limite la formation du complexe GATOR1/2 et favorise la libération de GATOR1, qui va inhiber RagB en hydrolysant le GTP via son activité GAP (GTPase Activating Protein). En résulte l'inhibition de la translocation lysosomale de mTORC1 et de son activité (Kim et al. 2015). Toutefois, en présence de leucine, l'interaction SESTRIN2-GATOR2 est inhibée par la fixation directe de la leucine sur SESTRIN2, fixation démontrée par l'utilisation de leucine radiomarquée (Wolfson et al. 2016). Dans ces conditions, le complexe GATOR1/2 reste associé, empêchant l'inhibition de RagB et donc de mTORC1 par GATOR1. Ainsi, SESTRIN2, à travers les GATORs, peut réguler la localisation lysosomale de mTORC1 et son activité, en fonction de la disponibilité en leucine.

La carence en acides aminés diminue l'activité de TORC1, comme l'indique la réduction de la phosphorylation de S6K (Hara et al. 1998). Toutefois, ce phénomène est réversible, l'ajout d'acides aminés dans le milieu stimulant de nouveau la voie TORC1. Individuellement, la majorité des acides aminés n'activent que faiblement mTORC1 (Dyachok et al. 2016). Cependant, en plus de la leucine (Dyachok et al. 2016; Wolfson

et al. 2016), deux autres acides aminés sont importants pour l'activation de mTORC1 chez les mammifères, l'arginine (Hara et al. 1998) et la glutamine (Lingqin Yuan et al. 2015). Les transporteurs d'acides aminés sont de bons candidats dans la perception de la disponibilité en azote et permettent aussi l'activation de mTORC1, notamment par les Rag GTPases. SLC38A9, transporteur de l'arginine, est localisé au niveau des endosomes tardifs et de la membrane lysosomale (Rebsamen et al. 2015). Des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que SLC38A9 interagit avec le complexe RAGULATOR et les Rag GTPases en fonction de leur statut énergétique GTP/GDP (Rebsamen et al. 2015; Wang et al. 2015). L'inhibition de ce transporteur limite l'activation de mTORC1 par les acides aminés (Rebsamen et al. 2015; Wang et al. 2015). Les transporteurs de leucine (SLC7A5-SLC3A2) et de glutamine (SLC1A5, Na⁺-dependent transporter) sont également importants pour l'activité de mTORC1 (Nicklin et al. 2009).

La glutamine semble jouer deux rôles distincts dans l'activation de mTORC1. Le premier est indépendant des Rags. En effet, alors que la mutation de RagA ou B empêche la stimulation de mTORC1 par la leucine ou l'arginine, la glutamine induit tout de même une activation de cette kinase dans ces fonds mutants, ainsi que dans des mutants *ragulator* ou des mutants de transporteurs d'acides aminés. La translocation lysosomale de mTORC1 par la glutamine est donc indépendante des Rag A et B. Toutefois, l'inactivation pharmacologique de la v-ATPase, une ATPase régulant l'acidification du lysosome et qui interagit avec les protéines Rags et RAGULATOR pour stimuler mTORC1 en réponse aux acides aminés (voir partie C), inhibe l'activation de mTORC1 par la glutamine. La glutamine active donc mTORC1, notamment par sa translocation lysosomale par la GTPase ARF1. Cette activation nécessite une V-ATPase et un lysosome fonctionnels (Jewell et al. 2015).

Le second rôle de la glutamine dans l'activation de mTORC1 semble être lié à son catabolisme. En effet, après déamination de la glutamine par la GLS (Glutaminase) pour former du glutamate (réaction de glutaminolyse), celui-ci est transformé en α -cétoglutarate par une deuxième réaction, catalysée par la GDH (Glutamate Déhydrogénase) (Csibi et al. 2014) et nécessite de la leucine comme co-facteur. L' α -cétoglutarate va ensuite permettre l'activation des Rags et donc de mTORC1 (pour revue González and Hall, 2017). L'inhibition de l'activité glutaminase inhibe ainsi mTOR.

En parallèle de ces différentes activations lysosomales, la voie PI3K/PDK/AKT, activée par les facteurs de croissance (voir partie A.1.c.i, facteurs de croissance), permet quant à elle l'activation de la protéine RHEB. Cette protéine est présente constitutivement à la membrane du lysosome (Menon et al. 2014), et va à son tour interagir avec mTORC1

et ainsi l'activer. La présence unique soit des acides aminés soit des facteurs de croissance ne suffit pas à stimuler complètement l'activité de mTORC1 (Menon et al. 2014). Ces deux types de signaux semblent donc nécessaires pour une activation complète du complexe.

c) Le cas particulier des relations entre la voie mTORC1 et la glutamine dans les cellules cancéreuses

Selon les données de l'Institut National du Cancer, 382000 nouveaux cas de cancers ont été estimés en 2018 en France métropolitaine, les types les plus fréquents étant le cancer du sein et de la prostate. 157400 décès ont été recensés pour cette même année. La recherche médicale étudie de nombreux acteurs cellulaires impliqués dans le développement de ces cancers et pouvant être des cibles thérapeutiques potentielles. Compte tenu des différents rôles de la glutamine dans la stimulation de la voie mTORC1, son métabolisme est très étudié et devient, avec la voie mTORC1, une véritable cible thérapeutique pour lutter contre la prolifération des cellules cancéreuses (Tanaka et al. 2015). La glutamine est l'acide aminé libre le plus abondant dans le sang et une source importante d'azote dans les cellules de mammifère. Dans des lignées cellulaires saines, la consommation de nutriments, sous forme d'azote et de sucre, se fait selon une certaine balance équilibrée, pour subvenir aux besoins des cellules. Les cellules cancéreuses présentent quant à elles d'importantes perturbations métaboliques, et notamment une surconsommation de ces nutriments. Ainsi, le métabolisme de la glutamine est fortement dérégulé dans ces cellules cancéreuses qui présentent une augmentation du prélèvement de la glutamine (Csibi et al. 2014; Lampa et al. 2017) et de son catabolisme (Tanaka et al. 2015) pour former de l' α -cétoglutarate, fournissant de l'énergie et des intermédiaires métaboliques nécessaires à leur prolifération accrue (Csibi et al. 2014). L'étude de différentes lignées cancéreuses ovariennes a montré que la prolifération de ces cellules était stimulée de manière dose-dépendante par la concentration en glutamine présente dans le milieu. Une carence en glutamine arrête le cycle cellulaire en phase G1, tandis que l'ajout de glutamine entraîne une augmentation des teneurs protéiques de la cycline D1 et de la CDK4, permettant le passage de G1 à la phase S. De plus, la glutamine active la voie mTORC1, démontrée par l'augmentation de la phosphorylation de S6K, ce qui stimule la division cellulaire. Les conditions les plus optimales pour cette prolifération correspondent à la présence combinée de glutamine et de glucose dans le milieu. La présence de glutamine augmente le prélèvement de glucose par les cellules et la production d'ATP, ce qui favorise leur division. Dans ces lignées, la glutamine stimule la glutaminolyse, notamment par l'augmentation de l'activité GDH (Yuan et al. 2015).

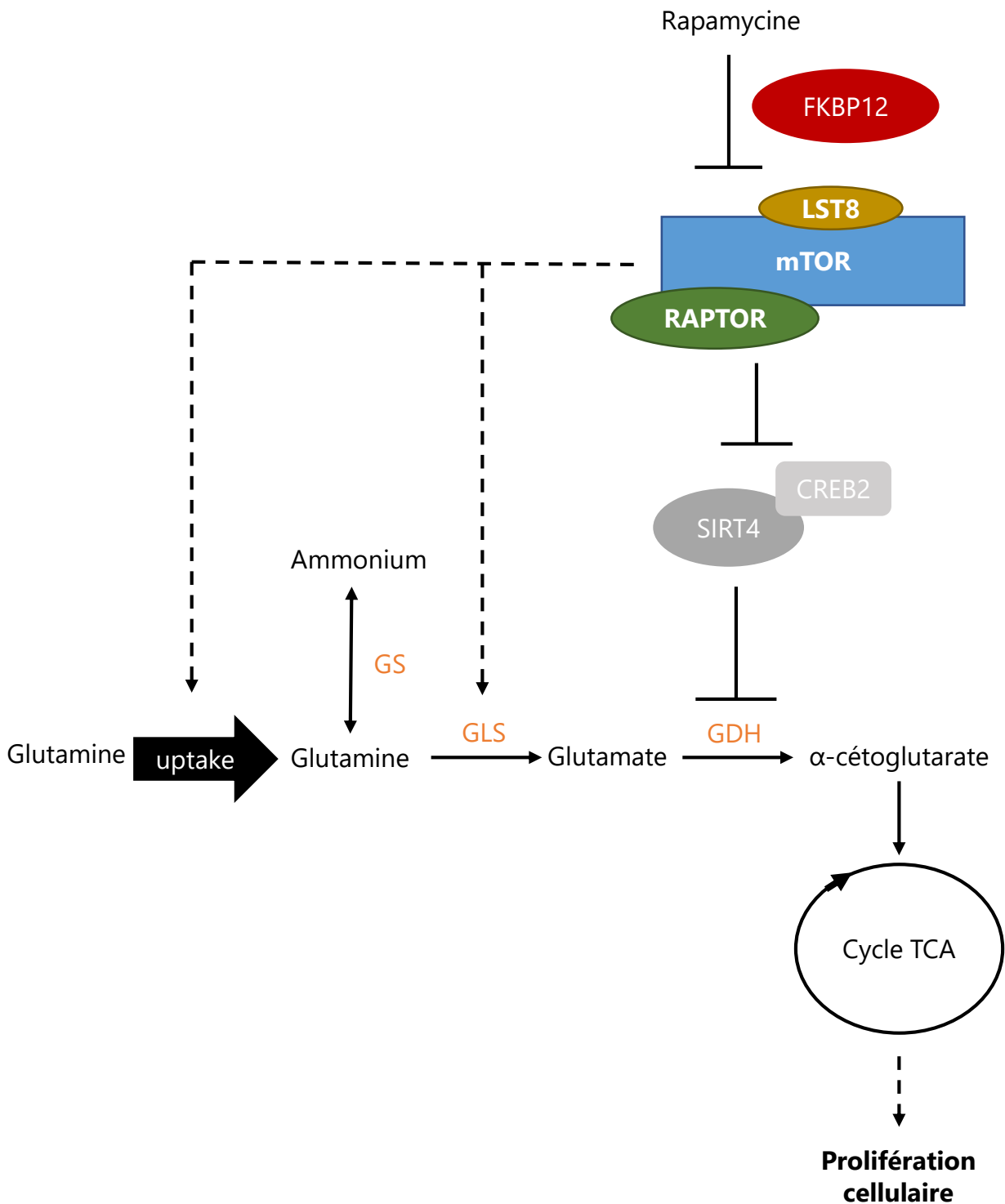


Figure 41: TORC1 inhibe SIRT4, permettant l'induction de GDH et le catabolisme de la glutamine

mTORC1 intervient dans la régulation du prélèvement de glutamine par les cellules, et agit également sur l'enzyme GLS (Glutaminase), impliquée dans la formation de glutamate à partir de glutamine. La suractivation de mTORC1 dans les cellules cancéreuses conduit également à la répression de SIRT4, un facteur de transcription inhibant la GDH (Glutamate Déshydrogénase), en favorisant la dégradation de CREB2 (cAMP response element binding-2), un stabilisateur de SIRT4, par le protéasome. Levant l'inhibition sur la GDH, le glutamate issu de glutamine forme de l'α-cétoglutarate, pour alimenter notamment le cycle TCA, stimulant d'autant plus la prolifération cellulaire. Adapté de l'étude de Csibi et al., 2014

Nous avons vu précédemment que la glutamine stimule le complexe mTORC1 mais la réciproque est également vraie. Lorsque mTORC1 est actif, il stimule notamment le prélèvement et la consommation de glutamine par la cellule (Csibi et al. 2014). Dans le cas de cellules cancéreuses où mTORC1 peut être suractivé, on observe également une surconsommation de glutamine, qui peut être inhibée par un traitement par la rapamycine. L'inhibition de mTORC1 qui en découle entraîne une accumulation de glutamine et de glutamate mais pas d' α -cétoglutarate (Alfredo Csibi et al. 2014) car l'inhibition de mTORC1 diminue l'activité de la GDH (*Figure 41*). La formation de glutamate à partir de glutamine semble être régulée par mTORC1 et correspond à une étape limitante dans ce processus (Yuan et al. 2015). L'enzyme GDH peut être régulée négativement par le facteur de transcription SIRT4 (Haigis et al. 2006). Ce facteur de transcription est régulé par la protéine CREB2 (cAMP response element binding-2), de manière TOR-dépendante. En effet, lorsque mTORC1 est inhibé, on observe une augmentation l'expression de *SIRT4* (Csibi et al. 2013) ainsi qu'une accumulation de CREB2 qui se fixe à SIRT4 et le stabilise. Dans ces conditions, la GDH est inhibée et on observe une diminution du prélèvement de glutamine ainsi que de la prolifération des cellules cancéreuses, témoignant du rôle de SIRT4 comme un suppresseur de tumeur (Csibi et al. 2013). En revanche, lorsque mTORC1 est actif, il va permettre l'adressage de CREB2 au protéasome via sa fixation à une ligase E3. N'étant plus stabilisé par CREB2, SIRT4 est réprimé, levant son inhibition de la GDH, ce qui conduit à l'utilisation de la glutamine pour alimenter le cycle TCA.

Des lignées cellulaires issues d'un cancer du sein ou d'un glioblastome (cancer du cerveau touchant les cellules gliales) montrent également une augmentation de l'expression de la glutaminase (GLS), enzyme impliquée dans la première étape du catabolisme de la glutamine. Ceci témoigne à nouveau d'une perturbation du métabolisme de la glutamine dans les lignées cancéreuses (Tanaka et al. 2015; Lampa et al. 2017). Un traitement à la rapamycine entraîne une réduction de l'expression de GLS (Csibi et al. 2014). Cette inhibition de la GLS provoque une diminution de l'alimentation du cycle TCA par le catabolisme de la glutamine ainsi qu'une diminution de l'activité mTORC1 et par conséquent, une diminution de la prolifération cellulaire (Lampa et al. 2017). Dans cette même étude, les auteurs ont mis en évidence que l'inhibition conjointe de la GLS et de mTORC1 permettait une réduction plus importante de la prolifération des cellules cancéreuses. Ainsi, différents essais de traitements anti-cancéreux ciblent plusieurs acteurs du métabolisme et de la signalisation cellulaire pour diminuer plus efficacement la prolifération des cellules et pour éviter également les phénomènes de résistance aux traitements (inhibiteurs de

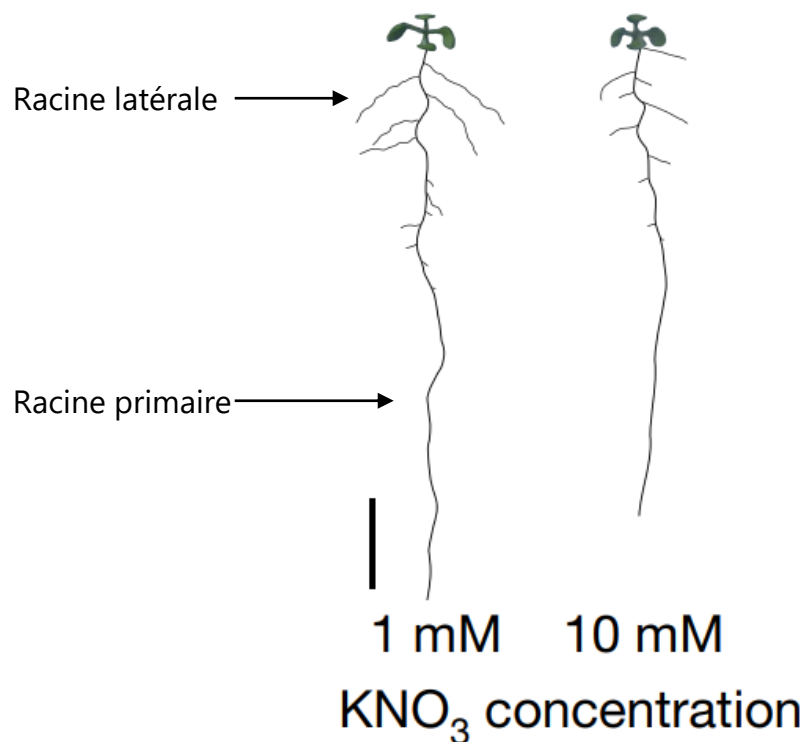


Figure 42: La concentration en azote dans le milieu impacte l'architecture racinaire

Système racinaire de plantules WT d'*Arabidopsis* sur un milieu à faible (1mM) ou forte (10mM) concentration en nitrate. En conditions faible nitrate, la racinaire primaire est plus longue, tout comme les racines latérales, qui sont également plus nombreuses. Développer le système racinaire en conditions faible azote permet d'agrandir la surface de prélèvement de la plante. Issu de Gaudinier et al., 2018.

Transporteurs/Enzymes	Gènes	Isoformes
NPF (faible affinité)	<i>NRT1</i> (<i>NRT1;1</i> et <i>NRT1;2</i>)	<i>NRT1;1</i> et <i>NRT1;2</i>
NRT2 (forte affinité)	<i>NRT2</i> (<i>NRT2;1</i> , <i>NRT2;2</i> , <i>NRT2;4</i> et <i>NRT2;5</i>)	<i>NRT2;1</i> , <i>NRT2;2</i> , <i>NRT2;4</i> et <i>NRT2;5</i>
AMTs	<i>AMT</i> (<i>AMT1;1</i> à <i>AMT1;5</i>) <i>AMT2.1</i>	<i>AMT1</i> (<i>AMT1;1</i> à <i>AMT1;5</i>) <i>AMT2;1</i>
NR	<i>NIA1</i> , <i>NIA2</i>	<i>NIA1</i> , <i>NIA2</i>
NiR	<i>NII</i>	<i>NII</i>
GS	<i>GLN1</i> (<i>GLN1;1</i> à <i>GLN1;5</i>) <i>GLN2</i>	<i>GS1</i> (<i>1;1</i> à <i>1;5</i>) <i>GS2</i>
GOGAT	<i>GLU1</i> , <i>GLU2</i>	NADH-GOGAT Fd-GOGAT

Tableau 2: Acteurs du prélèvement et de l'assimilation de l'azote chez *Arabidopsis*

synthèse d'ADN ou de division cellulaire couplés à la rapamycine et/ou des inhibiteurs du métabolisme des acides aminés).

2. L'azote et le métabolisme azoté chez les plantes

Pour les plantes, l'azote est également un élément essentiel. Les plantes, par leur système racinaire, peuvent prélever de l'azote inorganique sous deux formes majoritaires, le nitrate (NO_3^-) ou l'ammonium (NH_4^+) (Bloom and Sukrapanna 1992). Cet azote provient de différents processus naturels tels que la décomposition de la matière organique dans le sol ou la fixation de l'azote atmosphérique. Chez *Arabidopsis*, comme chez de nombreuses plantes de climat tempéré, le nitrate est la forme d'azote préférentielle. Compte tenu des variations environnementales et de la composition du sol, la concentration en azote est amenée à changer. En conditions limitantes d'azote (moins de 2mM Nitrate en sol pour *Arabidopsis*), le développement de la plante est diminué, avec notamment une forte réduction de la masse de la rosette et du rendement en graines (Lemaître et al. 2008). La disponibilité en azote dans le sol impacte donc le développement général de la plante. Concernant le système racinaire, la longueur de la racine primaire est plus longue en conditions limitées (1mM) et les racines latérales plus longues et plus nombreuses chez *Arabidopsis* (Figure 42) (Gaudinier et al. 2018). Ce contrôle de l'architecture racinaire en fonction de la disponibilité en nutriments azotés correspond à un premier niveau de régulation de l'assimilation de l'azote, une plus grande surface racinaire permettant de prélever davantage de nutriments dans le sol (Gent and Forde 2017).

Pour s'adapter à ces variations de concentrations, la plante dispose également de différents types de transporteurs. On distingue les transporteurs à forte affinité (HATS, High Affinity Transport System), qui prélèvent l'azote lorsqu'il est en faible concentration dans le milieu (10 à 100 μM), des transporteurs à faible affinité (LATS, Low Affinity Transport System), qui prélèvent l'azote lorsqu'il est en forte concentration. Ainsi, le nitrate peut être prélevé par les transporteurs NRT1 (appelés également NPF pour Nitrate transporter 1/peptide transporter family), transporteurs de type LATS et NRT2 (Nitrate transporter 2), transporteurs de type HATS (pour revue (Krapp 2015)). L'ammonium est quant à lui prélevé par les transporteurs AMT (Tableau 2) (Yuan et al. 2007; Kiba and Krapp 2016; Giehl et al. 2017). On notera que les transporteurs AMT1 sont davantage impliqués dans le prélèvement d'ammonium de type HATS (Yuan et al. 2007), tandis que le transporteur AMT2;1 serait davantage impliqué dans le prélèvement de type LATS (Giehl et al. 2017). Par ailleurs, l'expression de certains transporteurs d'azote est régulée par le statut azoté de la plante entière, laissant penser

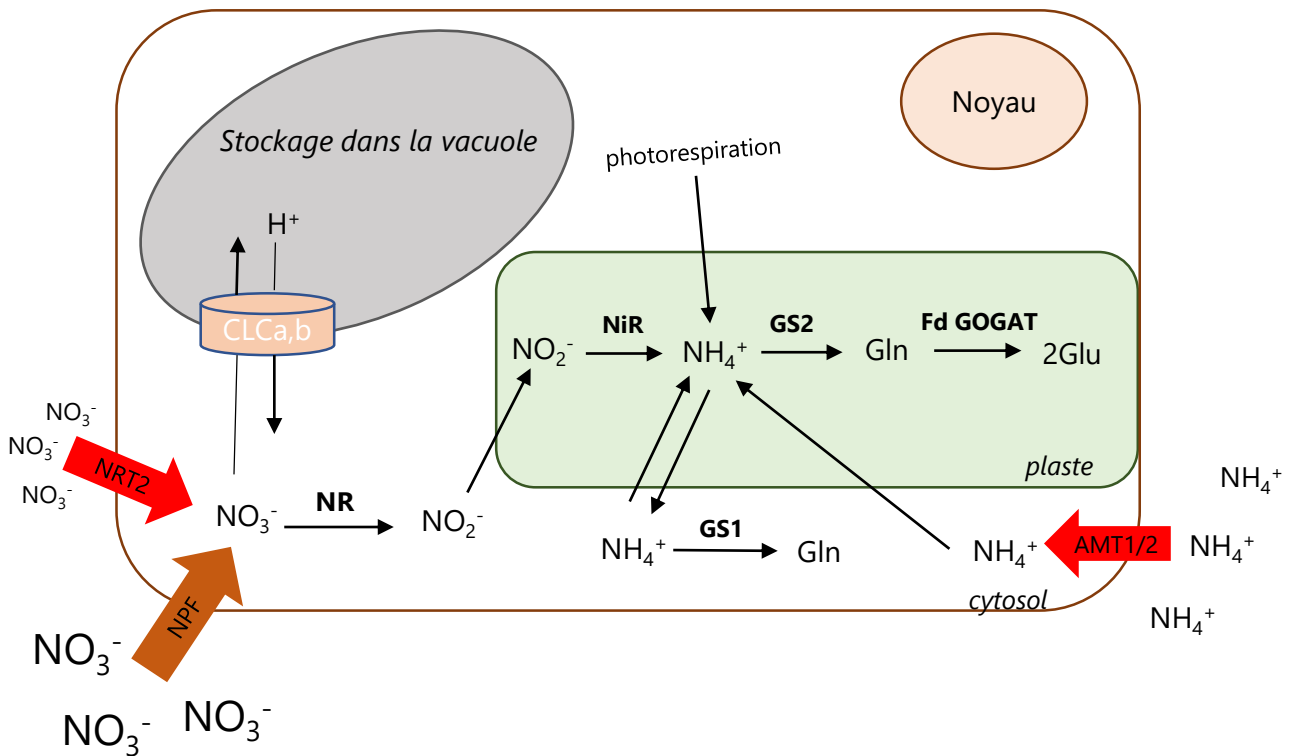


Figure 43: Représentation simplifiée du métabolisme azoté chez *A.thaliana*

L'azote inorganique, sous forme de nitrate (NO_3^-) ou d'ammonium (NH_4^+) est prélevé par le système racinaire via des transporteurs à forte ou faible affinité. Il peut être stocké dans la vacuole ou transporté jusqu'à la partie aérienne pour y être assimilé. Différentes enzymes sont impliquées dans cette assimilation, permettant la réduction du nitrate en nitrite (NO_2^-), lui-même réduit en ammonium. Cet ammonium, avec un glutamate (Glu), permet la formation de glutamine (Gln) par la GS. La Fd-GOGAT synthétise ensuite deux glutamates. NR= Nitrate Réductase, NiR= Nitrite Réductase, GS= Glutamine Synthétase, Fd-GOGAT= Ferredoxin dépendent GOGAT. Les transporteurs NPF (Nitrate transporter 1/peptide transporter family) et NRT2 (nitrate transporter 2) sont des transporteurs de nitrate à faible et forte affinité respectivement. Les transporteurs AMT (Ammonium Transporter) permettent quant à eux le transport d'ammonium. CLCa,b= canal chloride permettant le stockage de nitrate dans la vacuole. Inspiré de la revue de Krapp, 2015

que des molécules signal permettent une communication entre la partie aérienne et la partie racinaire.

Une fois prélevé par le système racinaire, cet azote peut être directement assimilé au niveau des racines ou être transporté au niveau de la partie aérienne de la plante par les vaisseaux xylémiens pour y être soit assimilé, soit stocké dans la vacuole. Ce stockage fait notamment intervenir le canal chlorure CLCa,b, qui va permettre l'entrée d'un NO_3^- dans la vacuole contre la sortie d'un proton dans le cytosol (pour revue (Guan 2017)).

L'assimilation de l'azote fait intervenir différentes enzymes (*Tableau 2*). Cette assimilation est très bien décrite dans la revue Krapp, 2015. Le nitrate est tout d'abord réduit au niveau du cytosol par la Nitrate Réductase (NR) pour former du nitrite, en utilisant du NADH comme pouvoir réducteur. Le nitrite est ensuite transporté dans le chloroplaste pour y être réduit à son tour en ammonium, par la Nitrite Réductase (NiR), qui utilise alors de la ferrédoxine comme pouvoir réducteur. Cet ammonium, avec un glutamate, sert ensuite à former de la glutamine. Cette étape est catalysée par la Glutamine Synthétase de type 2 dans le chloroplaste (GS2). On notera que la GS1 correspond à la forme cytosolique de cette enzyme qui peut également assimiler de l'ammonium pour son recyclage (Y. Ji et al. 2019), tandis que la GS2 est localisée principalement au niveau de la partie aérienne où l'on retrouve de nombreux chloroplastes. La construction chimérique GLN2::GFP montre que cette protéine est également localisée dans les mitochondries des feuilles (Taira et al. 2004). Pour catalyser cette réaction, la GS utilise de l'ATP. Enfin, la glutamine permet la synthèse de deux glutamates par transamination de l' α -cétogutarate via la Fd-GOGAT (Ferredoxin dependent GOGAT) au niveau de la partie aérienne, ou la NADH-GOGAT, au niveau racinaire (Coschigano et al. 1998) (*Figure 43*).

Différents isoformes existent pour ces enzymes de l'assimilation de l'azote. Leur localisation ou affinité peuvent varier afin de développer des réponses les plus adéquates possibles en fonction des conditions environnementales. Par exemple, l'expression des gènes *GLN1*, codant les différentes isoformes de GS1, diffère en fonction des conditions en nitrate, *GLN1;1* et *GLN1;4* étant davantage exprimés pour de faibles concentrations en nitrate (Moison et al. 2018) tandis que *GLN1;2* est davantage exprimé pour de fortes concentrations en nitrate (Lothier et al. 2011). L'expression de ces gènes dépend également de l'organe de la plante, *GLN1;1* et *GLN1;2* étant davantage exprimés au niveau de la rosette et de la tige, tandis que *GLN1;5* est surtout exprimé au niveau des fleurs (Moison et al. 2018).

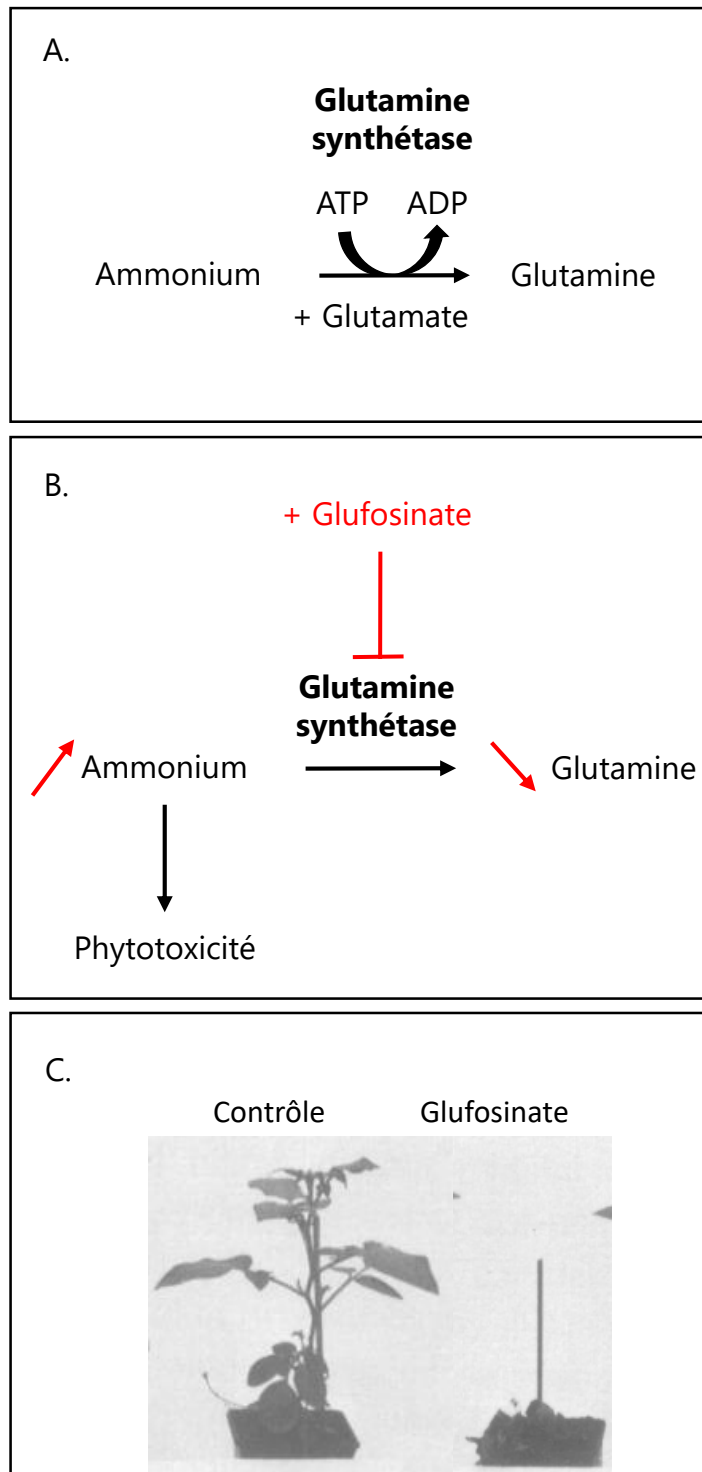


Figure 44: Effet du glufosinate sur le métabolisme de la glutamine et la croissance de la plante

(A) Biosynthèse de la glutamine, catalysée par la Glutamine Synthétase (GS), nécessitant de l'ammonium, l'incorporation de glutamate et de l'ATP. (B) Inhibition de la GS par le glufosinate, diminuant la biosynthèse de glutamine et entraînant une accumulation d'ammonium pouvant être phytotoxique. (C) Effet phytotoxique du glufosinate sur des pieds de Tabac. Les plantes ont été traitées avec 20l/ha de glufosinate. Les plantes sont observées 10 jours après le traitement. Seules les plantes contrôles ont survécu. Photo modifiée de l'étude de Block et al., 1987.

On notera que l'ammonium peut provenir soit directement du sol, soit de l'assimilation du nitrate, de la dégradation protéique ou encore de la photorespiration (Masclaux-Daubresse et al. 2006 ; Thomsen et al. 2014). L'isoforme GS2 est notamment impliquée dans l'assimilation de l'ammonium issu de la photorespiration (Ferreira et al. 2019), qui, lorsqu'il est présent en excès, peut s'avérer phytotoxique (Jian et al. 2018). Cette assimilation permet donc, à la fois de synthétiser de la glutamine et du glutamate, qui serviront de précurseurs pour la synthèse d'autres acides aminés, mais la synthèse de glutamine sert également d'étape de détoxification de l'ammonium, évitant ainsi son accumulation. L'inhibition de la GS, qu'elle soit génétique ou pharmacologique, peut donc également participer à cette accumulation d'ammonium (De Block et al. 1987; Lothier et al. 2011; Takano et al. 2019). Ainsi, l'inhibition du gène *GLN1;2* provoque une diminution de l'activité GS et une augmentation des teneurs en ammonium (Lothier et al. 2011). Compte tenu du fait que l'ammonium peut être nocif pour la plante lorsqu'il est accumulé, différents herbicides reposent sur ce principe et ciblent la GS, provoquant une accumulation d'ammonium et l'arrêt de la croissance de la plante (*Figure 44*) (De Block et al. 1987; Abdeen and Miki 2009). Ces molécules inhibant la GS sont des analogues de glutamate organo-phosphorés (phosphinothricines, (Logusch et al. 1991)), comme le glufosinate d'ammonium (composant actif de l'herbicide Basta) (Abdeen and Miki 2009). Ces molécules se fixent de manière irréversible au site actif de la GS et inhibent ainsi son activité (Logusch et al. 1991).

Enfin, le nitrate, en plus d'être un nutriment essentiel pour les plantes, joue également un rôle de molécule signal, régulant par exemple le développement des racines latérales et l'expression de gènes du métabolisme azoté (pour revues (Zhang and Forde 1999.; Vidal et al. 2020)). Ainsi, en fonction de sa disponibilité, le nitrate va permettre la mise en place rapide de tout un programme d'expression de gènes (Vidal et al. 2020), en induisant notamment des facteurs de transcription (Marchive et al. 2013), afin d'adapter la croissance et le métabolisme de la plante. C'est ce que l'on appelle la réponse primaire au nitrate. La famille de facteurs de transcription NLP (Nin-like proteins) est impliquée dans cette réponse, particulièrement NLP7 (Castaings et al. 2009; Marchive et al. 2013).

3. Régulations entre la voie TORC1 et l'azote chez les organismes photosynthétiques

a) Régulations de la voie TOR par l'azote

Compte tenu des nombreuses étapes composant l'assimilation de l'azote chez les organismes photosynthétiques et de leur coût énergétique, différentes régulations

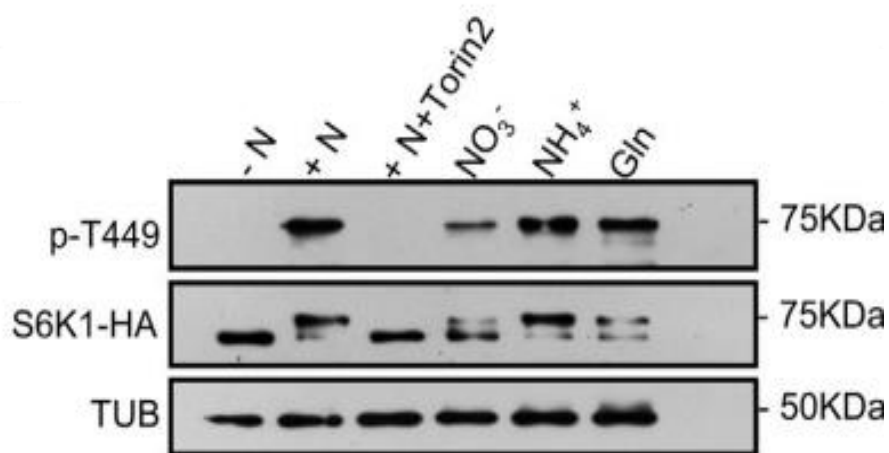


Figure 45: Le nitrate, l'ammonium et la glutamine activent TOR

Western blot montrant l'état de phosphorylation du résidu Thr449 de la S6K, une cible directe de la kinase TOR, en fonction des traitements appliqués. La tubuline (TUB) sert ici de témoin de charge et confirme que la même quantité de protéines a été déposée pour l'ensemble des conditions. Les plantules 35S::S6K1-HA ont été traitées 30 minutes. La condition +N correspond à 1mM de nitrate de potassium et 1mM de succinate d'ammonium. NO₃⁻= potassium nitrate 1mM, NH₄⁺= succinate d'ammonium 1mM, Gln= glutamine 1mM. Torin2 est un inhibiteur de TOR. Pré-traitement d'une heure à 25μM. Issu de Liu et al., 2021

concertées doivent avoir lieu pour contrôler le bon déroulement de ce processus important pour le métabolisme et la croissance de la plante.

Dans un premier temps, l'organisme doit percevoir la quantité et la qualité de l'azote présent dans son environnement. Une étude de phosphoprotéomique réalisée en condition de carence azotée chez *Chlamydomonas* montre que la carence impacte l'activité de TOR, modifiant l'état de phosphorylation de différentes cibles telles que le facteur d'initiation de la traduction eIF4B. Ainsi, des processus normalement inhibés par la voie TOR sont activés lors de cette carence, comme l'autophagie ou l'accumulation de lipides et d'amidon (Imamura et al. 2015; Roustan et al. 2017). La carence azotée inhibe donc l'activité de TOR chez *Chlamydomonas*, toutefois ceci ne semble se produire qu'en présence de lumière car à l'obscurité, on ne retrouve pas cette diminution d'activité (Upadhyaya et al. 2020)

Chez *Arabidopsis*, il a été montré qu'en cas de surexpression du gène *TOR*, dans des conditions où le nitrate est présent en excès (100mM), la racine primaire est plus longue que pour le WT, dont le développement racinaire est inhibé par l'excès d'azote (Deprost et al. 2007). En revanche, en condition de carence, cette surexpression n'impacte pas la longueur racinaire. Par conséquent, l'augmentation de l'expression du gène *TOR* permet de lever l'inhibition de la croissance racinaire provoquée par un excès d'azote.

Chez le maïs, une étude récente a également permis d'associer la stimulation de la croissance racinaire en condition faible azote à la voie TOR. Selon cette étude, l'azote en conditions limitées entraîne une augmentation du transport de l'auxine de la partie aérienne de la plante vers le système racinaire. En s'y accumulant, l'auxine stimule le complexe TORC1, qui à son tour participerait au processus de croissance racinaire, permettant ainsi de prélever davantage de nutriments présents dans le sol (Sun et al. 2020).

Une autre étude récente (Liu et al. 2021) a montré chez *Arabidopsis*, qu'en condition de carence en azote, l'activité du complexe TORC1 ainsi que l'expression de la construction pCYCB1::GUS, un marqueur d'activité mitotique, étaient inhibées au niveau de la partie aérienne de la plante, impactant grandement le développement des feuilles. En revanche, l'apport d'azote inorganique ou d'acides aminés (nitrate, ammonium ou glutamine) active TOR. On notera d'ailleurs que l'ammonium et la glutamine activent plus fortement TOR que le nitrate (*Figure 45*). Dans ces conditions, l'expression de pCYCB1::GUS au niveau des feuilles est rétablie, témoignant de l'importance du complexe TORC1 dans la régulation du développement des feuilles en fonction de l'apport en azote (Liu et al. 2021). L'azote pourrait agir comme un signal pour stimuler la GTPase ROP2 qui en réponse activerait TOR, permettant ainsi la

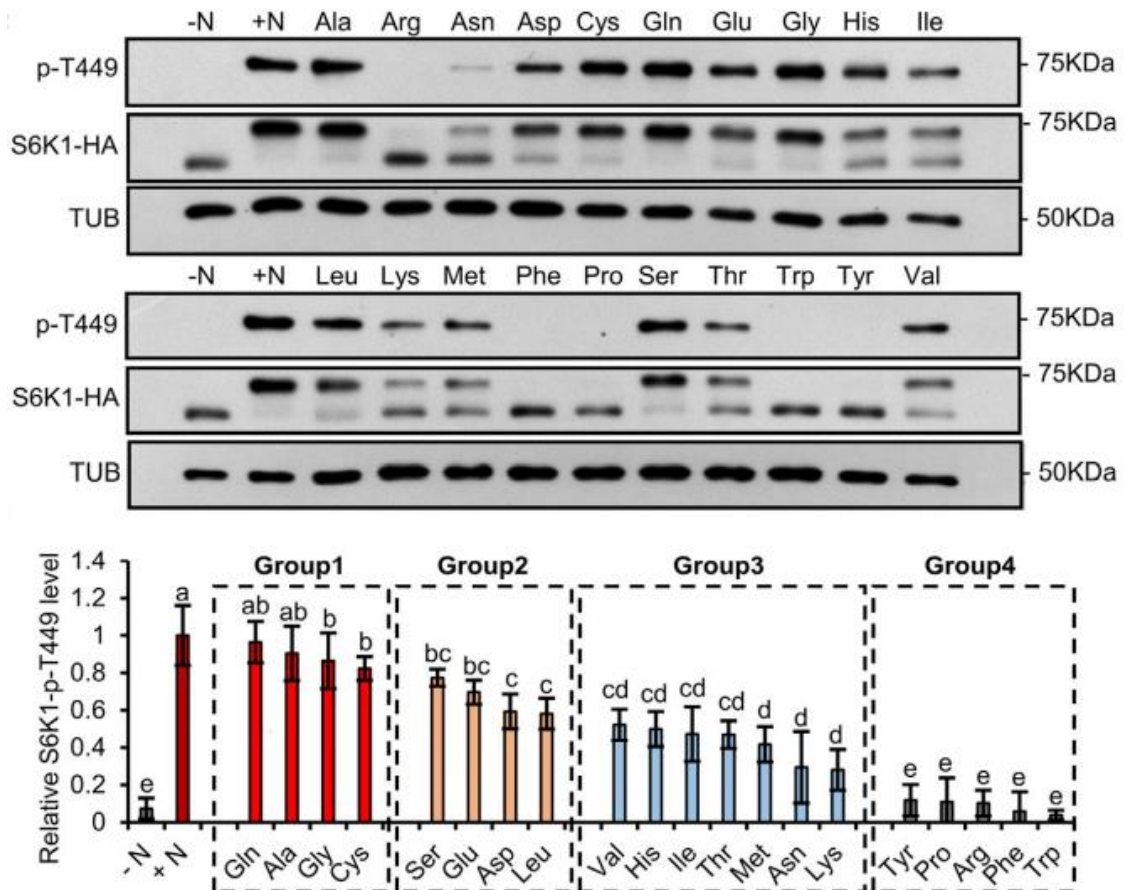


Figure 46: Effet de 20 acides aminés sur l'activité de TOR

Western blot montrant l'état de phosphorylation du résidu Thr449 de la S6K, une cible directe de la kinase TOR, en fonction des traitements azotés appliqués. La tubuline (TUB) sert ici de témoin de charge et confirme que la même quantité de protéines a été déposée pour l'ensemble des conditions. Les plantules 35S::S6K1-HA ont été traitées 30 minutes avec un type d'acide aminé à 1mM. Les graphiques représentent la quantification de la phosphorylation du résidu T449 de S6K. On distingue 4 groupes suivant le pouvoir activateur des acides aminés sur TOR. Issu de Liu et al., 2021

croissance de la feuille. En effet, l'activation constitutive de ROP2 permet une activité élevée de TOR malgré une carence azotée. L'ajout d'un inhibiteur de TOR dans ces conditions inhibe cette activité démontrant que ROP2 agit en amont de TOR (Liu et al. 2021).

Nous avons vu précédemment que chez la Levure et les animaux, les acides aminés sont des acteurs majeurs de la régulation de l'activité de la voie TORC1. Chez les organismes photosynthétiques, le mécanisme de perception des acides aminés est encore assez mal connu. Cependant, différentes études ont montré que certains acides aminés peuvent activer la voie TORC1 chez les plantes, témoignant d'une certaine conservation des régulations de la voie TOR par l'azote au sein des eucaryotes. Ainsi, il a récemment été montré chez *Arabidopsis* que l'apport de glutamine ou d'isoleucine active TOR (O'Leary et al. 2020). Des plantules cultivées en condition de carence azotée ont permis de déterminer plus précisément le pouvoir activateur des acides aminés sur la voie TOR, en testant l'effet de 20 acides aminés différents sur la phosphorylation de S6K (Liu et al. 2021). Il ressort de cette expérience que 15 acides aminés peuvent activer rapidement TOR, mais qu'ils présentent des pouvoirs activateurs différents, comme observé chez la Levure. Ainsi, on distingue 4 grands groupes (*Figure 46*) :

- *Groupe 1, acides aminés ayant un très fort pouvoir activateur (80-100%):*
Glutamine, Alanine, Glycine, Cystéine
- *Groupe 2, acides aminés ayant un fort pouvoir activateur (60-80%):*
Sérine, Glutamate, Aspartate, Leucine
- *Groupe 3, acides aminés ayant un faible pouvoir activateur (35-60%) :*
Valine, Histidine, Isoleucine, Thréonine, Méthionine, Asparagine et Lysine
- *Groupe 4, acides aminés n'ayant pas de pouvoir activateur :*
Tyrosine, Proline, Arginine, Phénylalanine et Tryptophane

L'hypothèse avancée par les auteurs pour expliquer la différence de pouvoir activateur de ces acides aminés serait l'origine de leur squelette carboné.

Récemment, une étude a mis en évidence un lien entre la voie TORC1 et une enzyme impliquée dans la biosynthèse de leucine, IPMS1 (IsoPropyl Malate Synthase 1). Une mutation du gène *ROL17* a été identifiée chez *Arabidopsis* comme un suppresseur de *lrx1* (leucine-rich repeat extensin 1) qui produit un raccourcissement des racines. Cette mutation a été localisée dans un gène qui code pour cette enzyme IPMS1 (Schaufelberger et al. 2019). La mutation de ce gène entraîne une perte de la sensibilité à l'inhibition de TOR par l'AZD. Au niveau métabolique, ce mutant présente une accumulation de valine mais pas de modification des teneurs en leucine. Toutefois d'autres métabolites comme le galactinol, un oligosaccharide précurseur du raffinose,

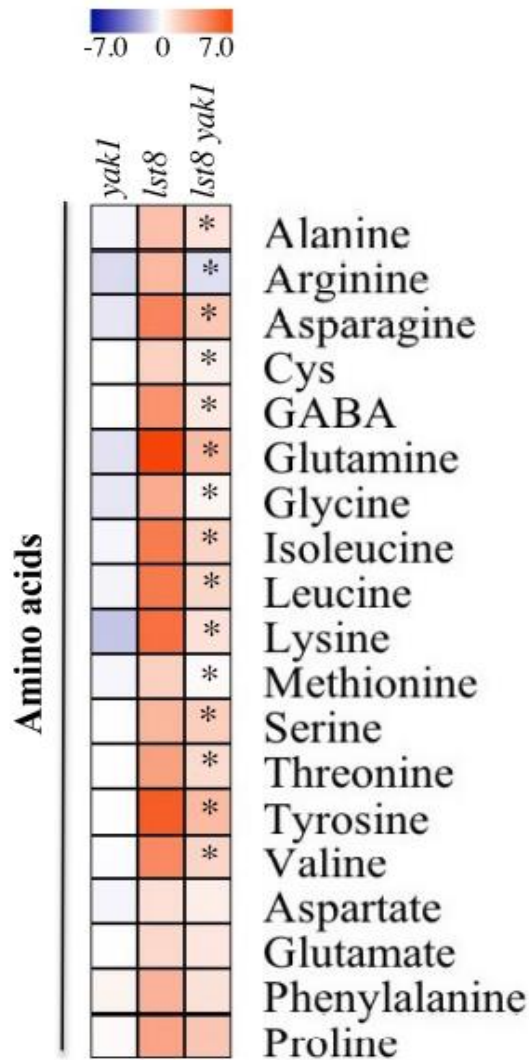


Figure 47: La mutation *yak1* corrige partiellement les désordres métaboliques azotés du mutant *lst8*

Les plantules ont été cultivées 7 jours *in vitro*. L'intensité des couleurs bleues et rouges indique une diminution et une augmentation respectivement des métabolites par rapport au sauvage. Les * correspondent aux différences significatives entre le mutant *lst8* et le double mutant *lst8yak1*. Issu de Forzani et al., 2019

sont modifiés dans ce mutant (Schaufelberger et al. 2019). Nous avons vu précédemment en partie A.2.c.ii que des modifications de la voie TOR peuvent modifier les teneurs de ces métabolites (Ren et al. 2012; Caldana et al. 2013). Ceci suggérerait une modification de la voie TOR dans le mutant *rol17*. Ce mutant *rol17* permet également de réduire la sensibilité de *lrx1* à l'AZD, au niveau racinaire (Schaufelberger et al. 2019). Dans l'étude de Cao et al. 2019, la perte de fonction d'IPMS1 provoque aussi une accumulation de valine et d'isoleucine, stimulant l'activité de TOR dans ce fond mutant. En effet, l'étude du mutant *eva1* (ER, Vacuole and Actin1), montre que celui-ci est également un mutant du gène *IPMS1* (Cao et al. 2019). Dans ce fond mutant, la perte de fonction d'IPMS1 entraîne des défauts au niveau de la morphologie de la vacuole, qui semble être composée de petites vacuoles surnuméraires, accolées à la principale. L'appareil de golgi et le réseau du réticulum endoplasmique sont également impactés. Ce mutant *eva1* présente une diminution des teneurs en leucine, contrairement à *rol17*. L'inhibition de la voie TOR dans le mutant *eva1* permet d'améliorer partiellement son phénotype tandis qu'un traitement par l'AZD permet de diminuer les structures vacuolaires surnuméraires. La phosphorylation de S6K est également augmentée dans ce mutant. D'après ces résultats, les défauts observés lorsque IPMS1 est non fonctionnel seraient donc dus à une suractivation de TOR (Cao et al. 2019). Ceci pourrait s'expliquer par l'élévation des teneurs en acides aminés dans ce fond mutant, activant TOR par un mécanisme probablement similaire à celui retrouvé chez les animaux et la Levure, c'est-à-dire au niveau d'organites tels que la vacuole ou le lysosome.

b) Régulations du métabolisme azoté par la voie TOR

L'inhibition pharmacologique (AZD-8055) ou génétique (mutants *raptor* et *lst8*) de la voie TOR entraîne une accumulation d'acides aminés au sein des tissus de la plante, et notamment une accumulation de glutamine (Moreau et al. 2012; Salem et al. 2018; Forzani et al. 2019). Le mutant *yak1* supprime en partie le phénotype du mutant *lst8* au niveau de son retard de croissance, mais également de l'accumulation des acides aminés et principalement de la glutamine (*Figure 47*) (Forzani et al. 2019). Chez *Chlamydomonas* cette accumulation d'acides aminés est également observée en moins d'une heure après l'inhibition de TOR par un traitement à la rapamycine (Jüppner et al. 2018; Mubeen et al. 2018). La limitation en carbone dans le milieu a tendance à limiter cette accumulation d'acides aminés, qui est d'autant plus réduite pour une carence à la fois en carbone et en azote (Mubeen et al. 2018). La disponibilité en carbone, en plus de l'azote, semble donc importante dans cette accumulation d'acides aminés suite à l'inhibition de TOR. L'étude de Mubeen et al. (2018) montre également qu'en présence

de nitrate comme seule source d'azote, cette accumulation d'acides aminés est très limitée, par rapport à une culture avec de l'ammonium. De plus, dans un contexte où TOR est inhibée, le prélèvement d'ammonium est augmenté. Les teneurs en ammonium sont en accord avec cette élévation du prélèvement. En utilisant l'incorporation d'ammonium marqué ($^{15}\text{NH}_4$), davantage d'acides aminés sont marqués suite à l'inhibition de TOR, tels que la glutamine et le glutamate, l'alanine, l'asparagine, l'arginine et la sérine. Le glutamate présente le marquage le plus important. Il ressort donc que l'ammonium est mieux incorporé lorsque TOR est inactivé. La mesure d'activités enzymatiques telles que celles de la GS, la GOGAT ou l'Alat (Aminotransférase, étape post-assimilation de l'azote) montre que celles-ci augmentent significativement suite à l'inhibition de TOR. En conclusion, l'inhibition de TOR chez *Chlamydomonas* provoque une augmentation du prélèvement d'ammonium et de son assimilation, entraînant une augmentation des acides aminés. Lorsque la voie TOR est activée, elle semble donc limiter cette assimilation d'ammonium, régulant ainsi les teneurs en acides aminés.

Chez *Arabidopsis*, le mutant *lst8* présente une augmentation des activités enzymatiques de la NR et NiR, en réponse au transfert en condition de culture « Jour long ». En revanche, l'activité de la GS dans ces conditions est diminuée par rapport au WT (Moreau et al. 2012). Ainsi, la voie TOR semble intervenir dans la régulation de mêmes acteurs entre les organismes photosynthétiques, mais différemment, notamment en fonction des conditions environnementales, mais aussi en fonction de l'espèce. C'est le cas pour la régulation de l'activité des enzymes impliquées dans l'assimilation de l'azote par exemple.

Comme chez la Levure, les protéines TAP46 (orthologue de TAP42 de *S.cerevisiae* chez les plantes) et PP2A interviendraient dans la voie de signalisation TOR chez les plantes pour réguler le métabolisme azoté. Une analyse de double-hybride a mis en évidence l'interaction entre TAP46 et PP2A (Ahn et al. 2011). La mutation de *TAP46* confère un phénotype similaire à celui de l'inhibition de TOR, (diminution des polysomes et de la synthèse protéique, accumulation des autophagosomes, accumulation de glutamine et remobilisation nutritionnelle). Au niveau du métabolisme azoté ce mutant présente, comme la lignée RNAi TOR, une diminution de l'activité NR. A l'inverse, la surexpression de *TAP46* entraîne l'augmentation des activités NR et NiR (Ahn et al. 2015). Cette augmentation de l'assimilation de l'azote lorsque *TAP46* est surexprimé est corrélée à la stimulation de la croissance de la plante. En étudiant l'expression de gènes du métabolisme azoté, il ressort que l'expression de NII, NIA2 et GS2 et GOGAT diminue dans une lignée d'extinction RNAi TAP46 mais qu'au contraire, l'expression de GS1 et GDH augmente, comme observé pour des lignées RNAi de TOR (Deprost et al. 2007;

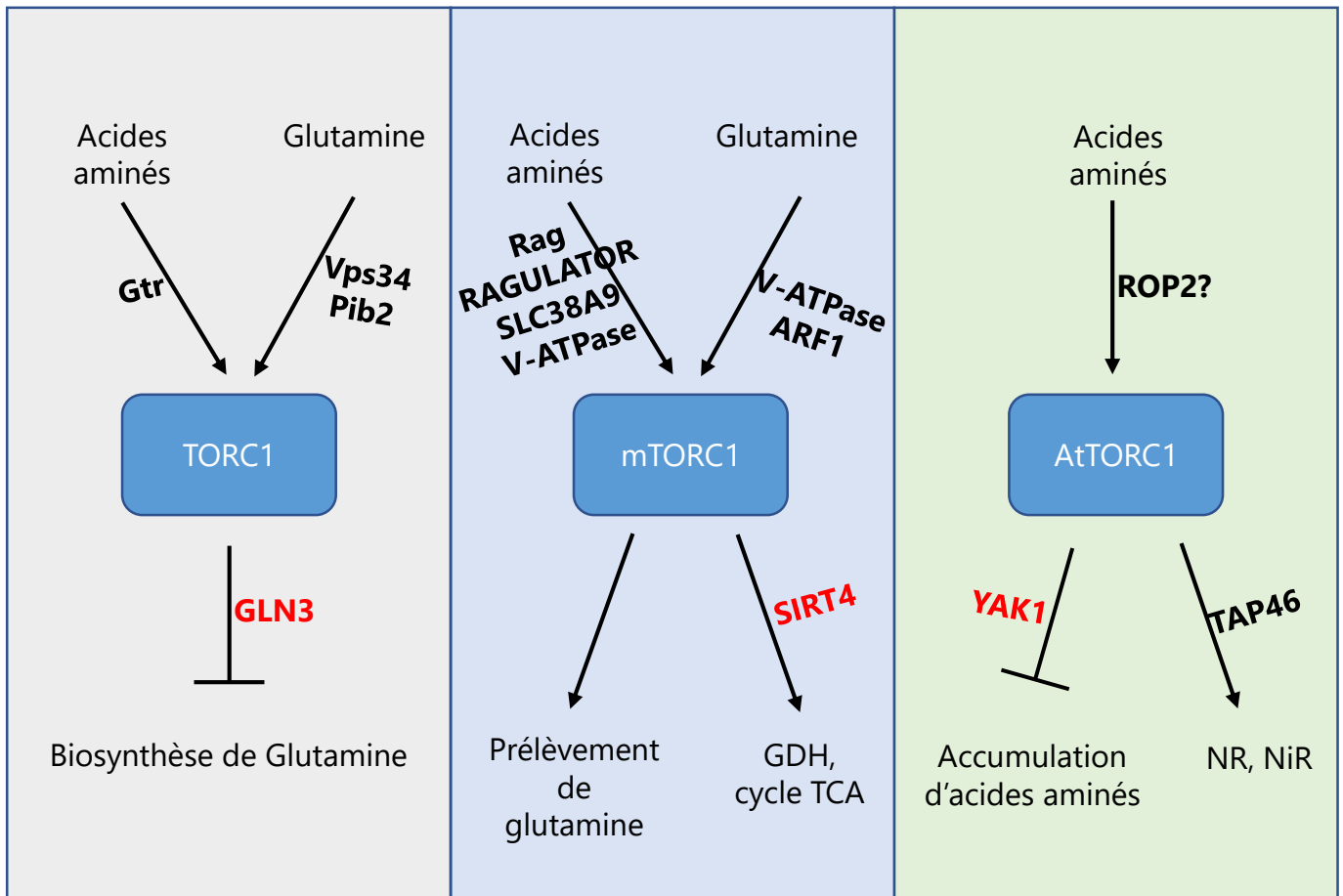


Figure 48: L'azote est perçu par la voie TORC1 qui peut également réguler des acteurs du métabolisme azoté chez les eucaryotes

Les acteurs en rouge sont réprimés par la voie TORC1. A noter que la voie TORC1 suractivée dans les cellules cancéreuses stimule le prélèvement de glutamine et son catabolisme, en régulant notamment GDH par la répression de SIRT4.

Ahn et al. 2011). La répression de *TAP46* ou *TOR* limite l'assimilation de l'azote au niveau génétique et enzymatique, mais stimule le recyclage nutritionnel. En fonction de temps de culture, l'inhibition de *TAP46* ou *TOR* par lignées RNAi provoque également des variations de l'activité de PP2A. Pour une inhibition sur le long terme, l'inhibition de *TAP46* ou de *TOR* diminue l'activité de PP2A bien que le taux de transcrits et de protéines PP2A restent constants (Ahn et al. 2011). Il a été montré que *TAP46* est phosphorylée par *TOR* (Ahn et al. 2011) et agit donc en aval de cette voie. Lorsque *TAP46* est surexprimé, la protéine S6K est davantage phosphorylée, et inversement lorsque *TAP46* est inhibée, confirmant que *TAP46* est un effecteur positif de la voie *TOR* (Ahn et al. 2015).

*En conclusion de cette seconde partie introductive, nous avons vu que la voie TORC1 est régulée par les nutriments azotés chez les eucaryotes. L'azote, en fonction de sa nature et de sa disponibilité, peut activer cette voie de manière plus ou moins importante. On notera que les acides aminés de type leucine et arginine ressortent comme de forts activateurs de TORC1. La glutamine apparaît également comme un élément activateur particulier de TORC1 chez les eucaryotes, passant par différentes voies. Chez les animaux et la Levure, ces acides aminés permettent in fine la translocation et l'activation lysosomale de mTORC1 par différents acteurs (RagGTPases/Gtr, RAGULATOR/EGO, GATOR2/SEACAT...). Le mécanisme exact d'activation chez les organismes photosynthétiques reste à déterminer. Finalement, en réponse à ces sources azotées, la voie TORC1 va réguler différentes cibles impliquées notamment dans la régulation du métabolisme (*TAP42/GLN3* chez la Levure, *SIRT4* chez les Animaux, *TAP46* et *YAK1* chez les Plantes) (Figure 48). Ceci permet le développement de l'organisme en conséquence de la disponibilité et de la nature de la source azotée. Nous retiendrons également le dérèglement du métabolisme de la glutamine dans les cellules cancéreuses en lien avec la suractivation de mTORC1.*

C. TOR et les V-ATPases chez les eucaryotes

Il a été montré que l'ATPase vacuolaire/lysosomale ou V-ATPase était un élément régulateur important de l'activité *TOR* chez, respectivement, les levures et les animaux. Chez les plantes, la relation potentielle entre les V-ATPases et *TOR* n'a pas encore été mise en évidence. Cependant, dans le cadre de ce projet de thèse, la caractérisation du mutant d'*Arabidopsis loki*, issu d'un crible génétique pour découvrir de nouveaux acteurs de la voie *TOR*, semble révéler l'existence d'un tel lien (voir Partie II-B). De ce fait, la structure et le rôle de la V-ATPase vont être présentés plus en détails dans cette partie de l'introduction.

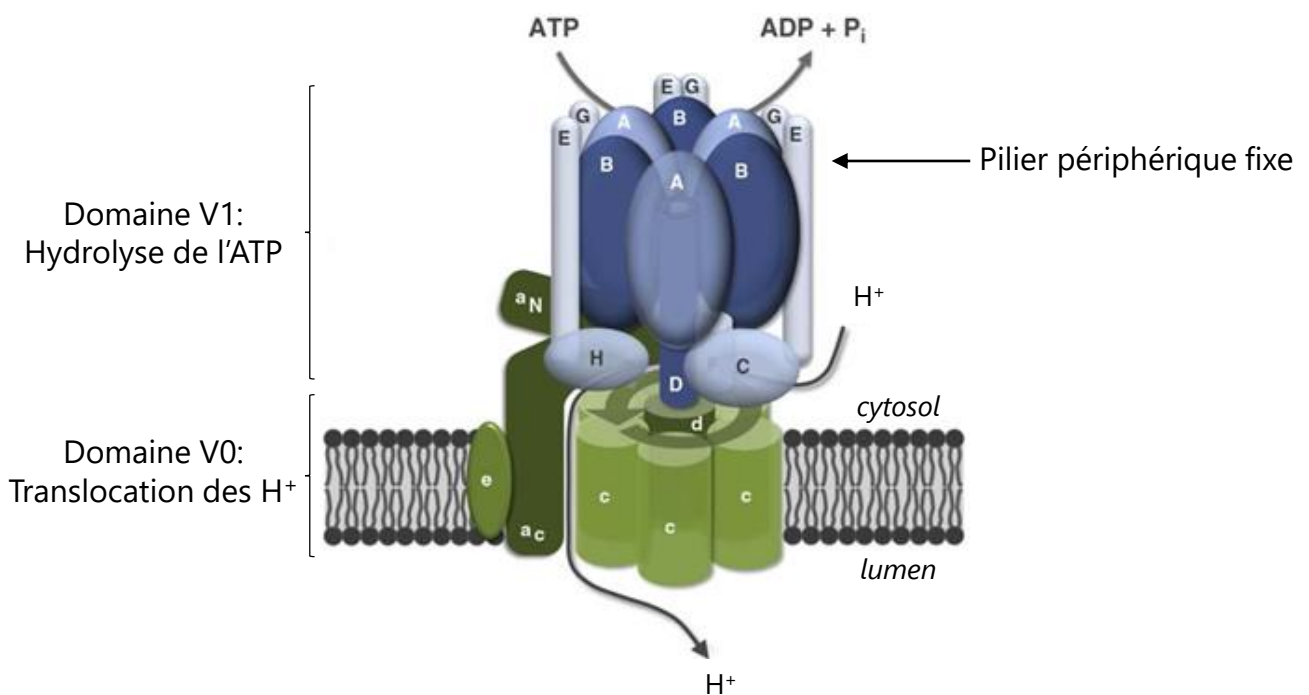


Figure 49: Représentation de la structure de la V-ATPase

Le domaine V1 correspond au domaine cytosolique de la V-ATPase, responsable de l'hydrolyse de l'ATP. Il est composé des sous-unités VHA-A à H. Le domaine V0 correspond au domaine membranaire, responsable de la translocation des protons du cytosol vers le lumen. Il est constitué des sous-unités a, c, c', d et e. Les domaines V1 et V0 sont reliés par un cylindre central composé des sous-unités D, F et d.

Issu de Schumacher and Krebs, 2010

1. Présentation de la V-ATPase

a) Structure générale de la V-ATPase

Différents processus au sein de la cellule nécessitent un pH ou un gradient de pH particulier pour se dérouler correctement. C'est notamment le cas pour les transports actifs à travers la membrane, les phénomènes d'endocytose ou encore la dégradation protéique.

Les V-ATPases (Vacuolar proton-translocating ATPase), ou H⁺-ATPases, sont des pompes à protons ATP-dépendantes conservées chez les eucaryotes, composées de nombreuses sous-unités (Parry et al. 1989; Sze et al. 1992). Leur rôle est d'hydrolyser de l'ATP cytosolique pour permettre le transport de protons contre leur gradient de concentration à travers la membrane de différents organites tels que le lysosome/vacuole, ou le réseau trans-golgien (TGN, comprenant l'appareil de golgi et les endosomes). Différentes revues reprennent l'organisation générale de ces structures chez la Levure, les animaux et les plantes (Schumacher and Krebs 2010; Whitton et al. 2018). Ces V-ATPases sont de gros complexes multi-hétéromériques, composées de deux grands domaines, V0 et V1 (*Figure 49*). Le domaine V1 correspond au domaine cytosolique de la V-ATPase, responsable de l'hydrolyse de l'ATP. Il est composé d'au moins huit sous-unités différentes notées VHA-A à VHA-H, dont le poids moléculaire s'étend de 13 à 70 kDa. Ce domaine V1 est relié au domaine V0 qui se situe dans la membrane. V0 peut fixer les protons cytosoliques et permettre leur translocation dans le lumen, participant ainsi à l'acidification de l'organite. Ce domaine est composé d'un anneau protéolipidique, regroupant différentes sous-unités notées VHA-a, c, c' (chez la Levure), c'', d et e. Leur poids moléculaire est compris entre 17 et 100 kDa. Pour résumer l'organisation de ces multiples sous-unités au sein de la V-ATPase, nous retiendrons que le domaine V1 correspond à un arrangement hexamérique des sous-unités A et B, placées de manière alternée, qui permettent l'hydrolyse de l'ATP (Wang et al. 2020). Le domaine V1 est ainsi composé de trois sous-unités A et trois sous-unités B. Le domaine V0 regroupe l'anneau protéolipidique composé de cinq sous-unités c (ce nombre peut varier suivant l'espèce) et c'', et les sous-unités a et e. Ceci permet la translocation des protons à travers la membrane, grâce à la rotation de l'anneau (Wang et al. 2020). Les domaines V1 et V0 sont reliés par un cylindre central, composé des sous-unités D, F et d. On notera également que la partie N-terminale de la sous-unité a permet de lier le domaine V1 en interagissant avec les domaines C-terminaux des sous-unités A et H (Landolt-Marticorena et al. 2000). L'hydrolyse d'ATP au sein du domaine V1 permet la libération d'énergie, entraînant la rotation de l'anneau. Ceci permet alors la translocation des protons à travers la membrane, établissant un gradient de protons nécessaire pour les transports de type secondaires et pour le système sécrétoire. Aussi, pour éviter que la rotation de

l'anneau n'entraîne un mouvement général de la V-ATPase, trois piliers périphériques fixes permettent de maintenir la pompe en place. Ces piliers sont constitués des sous-unités E, G, C et H et de la partie N-terminale de la sous-unité a (*Figure 49*). Chez la levure, la sous-unité C formée de deux domaines globulaires appelés « Foot » (comprenant les parties N et C-terminales) et « Head » (résidus 166 à 263) interagit avec les sous-unités E et G du pilier périphérique via sa partie Head (Oot and Wilkens 2010). La sous-unité H fixe quant à elle les sous-unités E et G via sa partie N-terminale (Oot et al. 2016; Wang et al. 2020) et la partie catalytique de la V-ATPase via sa partie C-terminale (Oot et al. 2016). Chez le modèle bovin, la sous-unité H interagit également avec le domaine cytosolique de la sous-unité a1 dans le cerveau (Wang et al. 2020). Les V-ATPases endosomales animales et les V-ATPases vacuolaires des plantes présentent une certaine conservation au niveau de leurs sous-unités et de leur organisation (Parry et al. 1989). De même, la séquence protéique de la sous-unité VHA-a est bien conservée entre la Levure et les plantes, d'autant plus au niveau de la partie C-terminale (résidus 402 à 816). Des résidus de la partie C-terminale (L, R, H et E) impliqués dans le pompage des protons sont conservés entre ces espèces démontrant l'importance de la fonction des V-ATPases au sein des eucaryotes (Kluge et al. 2004).

Par ailleurs, différentes études démontrent que la localisation de la V-ATPase varie en fonction de l'isoforme de la sous-unité a. Ainsi chez *Arabidopsis*, la fusion traductionnelle VHA-a1-GFP est localisée au niveau du TGN tandis que les isoformes a2 et a3 sont retrouvés au niveau du tonoplaste, membrane vacuolaire (Dettmer et al. 2006). Chez la Levure, l'isoforme de la sous-unité a, nommée Vph1p, entraîne une localisation vacuolaire de la V-ATPase (Manolson et al. 1992). La seconde isoforme notée Stv1p, fusionnée à un tag-HA, permet de conclure à une localisation au niveau du Golgi (compartiment tardif) (Kawasaki-Nishi et al. 2001). En revanche, sa surexpression conduit à une localisation vacuolaire (Manolson et al. 1994). Enfin, chez les mammifères, l'expression des ARNm des différentes isoformes a varie selon les tissus étudiés (Peng et al. 1999). L'isoforme de cette sous-unité a est également liée au degré d'invasion des cellules cancéreuses, notamment les cellules issues de cancer du sein. Les isoformes a3 et a4 semblent être particulièrement impliquées dans cette invasion (Hinton et al. 2009; McGuire et al. 2019). De nombreuses études en cancérologie ont également mis en évidence la dérégulation et notamment la surexpression de certaines sous-unités et de leurs isoformes dans le cas de différents cancers, de manière organes-spécifiques (pour revue Whitton et al. 2018).

b) Régulations et rôles de la V-ATPase chez les eucaryotes

i. La sous-unité H

Un premier acteur de la régulation de la V-ATPase est la sous-unité H du domaine V1. Il a été montré chez la levure, que cette sous-unité H fixe la partie catalytique de la V-ATPase et semble donc être importante pour l'activité de la pompe à protons (Landolt-Marticorena et al. 2000). La séquence protéique de la sous-unité H est composée d'une séquence N-terminale allant des résidus 1 à 348 (5 répétitions HEAT impliquées dans les interactions entre protéines) reliée à la partie C-terminale (résidus 353 à 478) par quatre acides-aminés. En étudiant l'effet de la délétion de la partie N-terminale ou C-terminale sur la capacité d'hydrolyse de l'ATP du domaine V1, les auteurs ont pu déterminer que la partie N-terminale est suffisante pour activer cette hydrolyse (Liu et al. 2005). La délétion des résidus 331 à 353 inhibe l'activité V-ATPase, alors que la délétion des résidus 180 à 195 diminue de moitié l'activité ATPase par rapport au WT (Flannery and Stevens 2008). Concernant la partie C-terminale de la sous-unité H, elle joue davantage un rôle dans le pompage des protons (Liu et al. 2005). De plus, lorsque le domaine V1 est libre, la sous-unité H empêche l'hydrolyse d'ATP en interagissant avec la sous-unité F, constituant du cylindre central, c'est-à-dire du rotor de cette V-ATPase (Jefferies and Forgac 2009).

ii. Les nutriments

Les nutriments peuvent également impacter la V-ATPase. Chez *Arabidopsis*, l'excès de zinc (300µM de ZnSO₄) provoque une augmentation du pH vacuolaire des cellules qui passe alors d'environ 5,3 à 5,7. Ces résultats témoignent d'un défaut d'activité V-ATPase conduisant à une alcalinisation du pH vacuolaire (Fukao and Ferjani 2011). Le glucose régule également la V-ATPase, en jouant sur l'assemblage/désassemblage des domaines V1 et V0. Il a été montré chez la Levure que la V-ATPase se désassemble de manière réversible lorsque le glucose est en faible concentration, réduisant de plus de 50% son activité (Kane 1995). Ceci limite ainsi la dégradation de l'ATP en ADP, ce qui permet de conserver de l'énergie en conditions limitantes. En absence de glucose, on retrouve davantage de sous-unités V1 dans le cytosol, mais ce phénomène est inversé lorsque l'on rajoute du glucose (Kane 1995; Sardon et al. 2002). Ainsi l'ajout de glucose dans un milieu carencé permet le réassemblage de la V-ATPase, sans synthèse protéique *de novo* (Kane 1995). Par ailleurs, lorsque la kinase Sch9 (orthologue de S6K) est inactivée chez la Levure, l'induction de l'export de proton par l'ajout de glucose est inhibée, témoignant d'une V-ATPase non fonctionnelle dans ce fond mutant (Wilms et al. 2017). Les auteurs ont démontré une interaction entre Sch9 et la V-ATPase lorsque les conditions de culture sont favorables. Toutefois, une carence en glucose diminue

cette interaction. Dans un fond mutant *sch9* cultivé en absence de glucose, les V-ATPases sont moins désassemblées, impliquant Sch9 dans le désassemblage de la V-ATPase en réponse à la carence en glucose (Wilms et al. 2017). Chez les plantes, l'ajout de glucose sur des feuilles détachées d'*Arabidopsis* stimule également l'activité V-ATPase (Liu et al. 2016). Le rôle régulateur du glucose sur les V-ATPases a également été constaté dans une étude menée sur des cellules épithéliales du tubule rénal de porc (Sautin et al. 2005), témoignant d'une conservation de cette régulation de l'activité V-ATPase au sein des eucaryotes. En suivant la fluorescence du DAMP, une sonde à pH acide, les auteurs ont observé qu'en absence de glucose, le pH était plus élevé tandis qu'en rajoutant du glucose, la fluorescence du DAMP était plus importante, témoignant d'un pH acide. Toutefois, cet effet stimulateur du sucre sur la diminution du pH est réduit par la présence d'inhibiteurs de V-ATPase (Concanamycine A) ou de PI3K/mTOR (LY294002, LY). Le glucose régule donc également l'assemblage/désassemblage de la V-ATPase chez les mammifères. Toutefois, l'inhibition de mTOR/PI3K par le LY réduit l'assemblage de la V-ATPase induite par le sucre (Sautin et al. 2005). De même, dans le processus de maturation de cellules dendritiques, l'utilisation de Wortmannin (inhibiteur de PI3K) ou de rapamycine réduit l'assemblage de la V-ATPase, impactant son activité. La voie PI3K/mTORC1 régule donc positivement l'assemblage de la V-ATPase (Lieberman et al. 2014). Il a d'ailleurs été montré que le virus Influenza A (virus de la grippe) active la voie PI3K-AKT et que PI3K, sous sa forme phosphorylée, interagit avec la sous-unité E du domaine V1 dans le cytoplasme des cellules infectées. Lorsque la V-ATPase est active, cela acidifie des vésicules où se trouve le virus et permet sa sécrétion dans le cytoplasme puis son import dans le noyau pour sa réplication (Marjuki et al. 2011).

iii. Le complexe RAVE

Chez la Levure, il existe un régulateur des V-ATPases vacuolaires et endosomales appelé RAVE (Regulator of ATPase of Vacuoles and Endosomes), impliqué dans la stabilisation de la V-ATPase et son réassemblage glucose-dépendant. Ce complexe RAVE est constitué de trois composants, Rav1p, Rav2p et Skp1p (Seol et al. 2001). Ce complexe est capable de se fixer au domaine V1 en interagissant avec les sous-unités E et G (Smardon et al. 2002). RAVE, via Rav2p est capable également de fixer la sous-unité C indépendamment de V1, pour permettre son assemblage à la V-ATPase (Smardon and Kane 2007). La perte de fonction RAVE entraîne notamment un défaut au niveau de l'assemblage de la V-ATPase qui se retrouve moins stable, du fait d'une baisse de la liaison des domaines V1-V0 (Smardon et al. 2002). Après une ré-addition de glucose, le mutant *rav1* chez la Levure présente un pH vacuolaire élevé à environ 7

1.

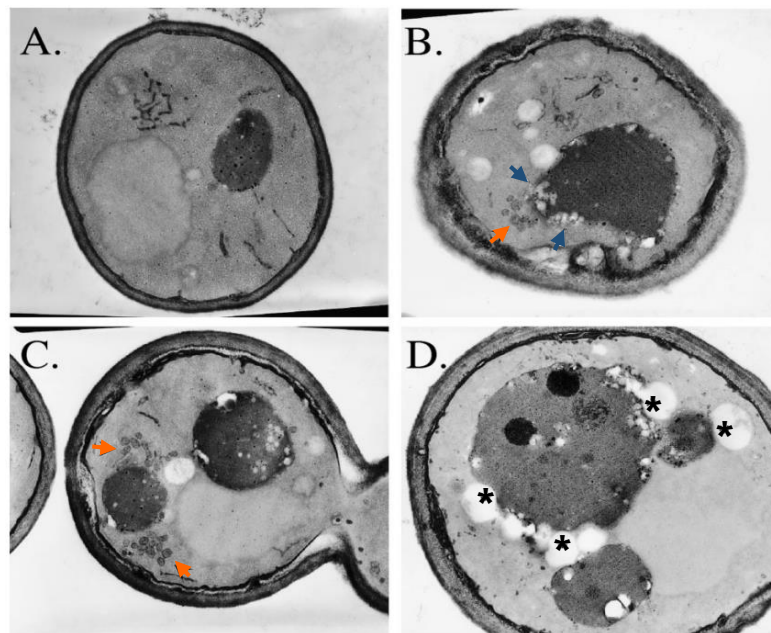
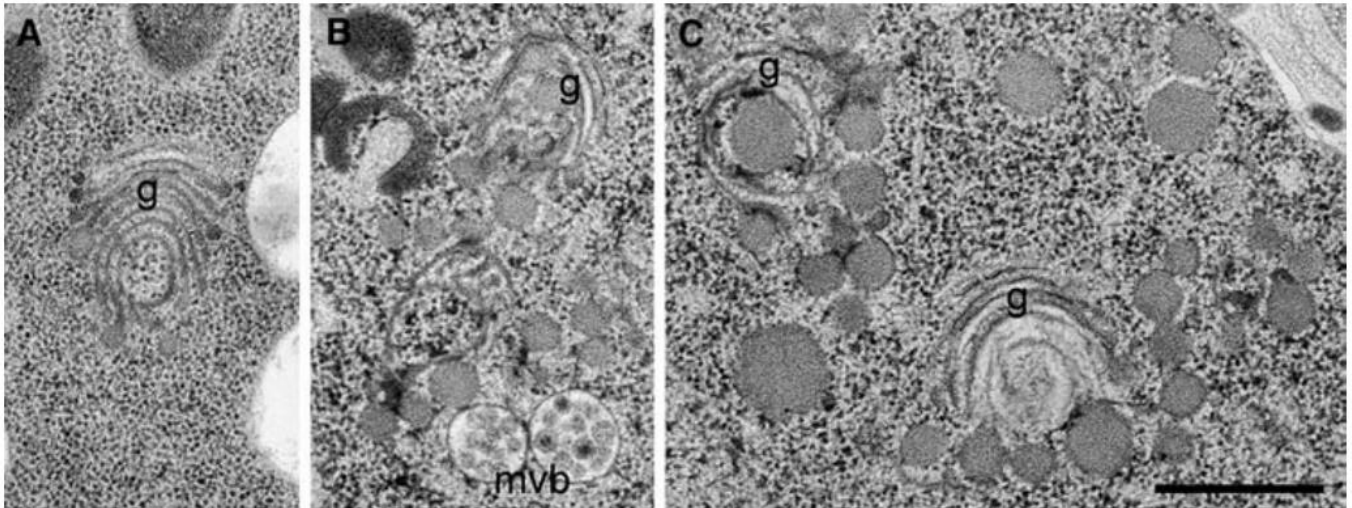


Figure 3. Aberrant organelles accumulate in *soi3-1* cells. Electron microscopy of wild-type (CRY2) (A) and *soi3-1* (SPB400-r8) cells (B-D). Black arrowheads indicate the accumulation of fenestrated ovoids (endosome-like structures, B and C) and white arrowheads point to ovoids contiguous with and apparently fusing with vacuoles (B). Asterisks label excess lipid particles also seen in *soi3-1* mutants (D).

Figure 50: L'inhibition de la V-ATPase impacte la morphologie de l'appareil de Golgi et provoque une accumulation de vésicules chez les plantes et la Levure

1. Inhibition de la V-ATPase par la concanamycine chez les plantes. (A) à (C) microscopie électronique de cellules du cortex de la pointe racinaire présentant une morphologie du golgi et du TGN modifiée par le traitement Concanamycine. (A) enflement des extrémités des citernes du golgi, (B,C) Fragmentation du golgi et accumulation de grosses vésicules. g= Golgi, mvb= corps multivésiculaires. Issu de Dettmer et al., 2006

2. Inhibition de la V-ATPase dans le fond mutant *soi3-1* (*Rav1p*) chez la Levure. (A) Microscopie électronique sur une cellule WT, (B-D) sur les cellules mutantes *soi3-1*. Les flèches oranges indiquent l'accumulation de structures « endosome-like » ovoïdes, les flèches bleues les structures ovoïdes contiguës semblant fusionner à la vacuole. Les astérisques pointent les particules lipidiques excessives dans le mutant *soi3-1*. Issu de Sipos et al., 2004

alors que le pH vacuolaire du type sauvage s'est acidifié à environ 5,9 (Smardon et al. 2014). Ceci démontre le défaut d'activité V-ATPase chez le mutant *rav1p*. De par l'impact sur l'activité V-ATPase, cela se répercute sur les processus dépendants du gradient de pH tel que le transport entre l'endosome précoce et le compartiment pré-vacuolaire. Le mutant *soi3-1*, correspondant à Rav1p, présente ainsi une accumulation anormale de structures membranaires ovoïdes proches de l'endosome et de la vacuole et une diminution du trafic entre ces deux compartiments cellulaires (Sipos et al. 2004). Il est à noter qu'à l'inverse, la surexpression de Rav1p est nocive pour les cellules mais que son effet peut être supprimé par la surexpression de Skp1p (Brace et al. 2006).

iv. Les V-ATPases végétales

Chez les plantes, l'inhibition de la V-ATPase par la concanamycine diminue également le transport endosomal. Au bout de 2h, le marqueur du trafic endocytique FM4-64 est retrouvé au niveau du tonoplaste chez les cellules contrôles, contrairement aux cellules traitées à la concanamycine (Dettmer et al. 2006). La morphologie de l'appareil de Golgi est également impactée par l'inhibition de la V-ATPase par la concanamycine, les citernes ayant un aspect anormal, avec un renflement des extrémités, et une accumulation de vésicules rappelant les structures observées dans l'étude de Sipos et al., 2004 (Dettmer et al. 2006) (*Figure 50*).

Par ailleurs différentes études recensent les rôles de la V-ATPase chez *Arabidopsis*. Ainsi la sous-unité B du domaine V1, qui possède trois isoformes différentes (AtVAB1, AtVAB2 et AtVAB3) présente un motif conservé « profilin-like actin-binding motif ». Ces différentes isoformes sont capables de fixer les filaments d'actine et interviennent dans leur maintien, AtVAB1 et AtVAB3 inhibant la dépolymérisation de ces filaments (Ma et al. 2012).

Concernant la sous-unité d du domaine V0, deux isoformes existent, nommés AtVHA-d1 et d2. Une fusion traductionnelle AtVHA-d2-GFP indique que cette sous-unité est localisée au niveau vacuolaire (*Figure 51*). Lorsque la plante est soumise à différents stress abiotiques comme les stress salin, oxydatif ou osmotique, l'expression du gène *AtVHA-d2* augmente significativement contrairement à *AtVHA-d1*. Cette isoforme d2 pourrait donc être impliquée dans la réponse à ces différents stress, le mutant *Atvha-d2* y étant en effet plus sensible (Feng et al. 2020). De même que la sous-unité vacuolaire d2, la sous-unité endosomale c est également impliquée dans les réponses de la plante à des stress abiotiques. Cette sous-unité possède trois isoformes, codées par cinq gènes *AtVHA-c* dont l'expression est augmentée lors de stress. La surexpression de *VHA-c* stimule la croissance de la plante en augmentant l'activité V-

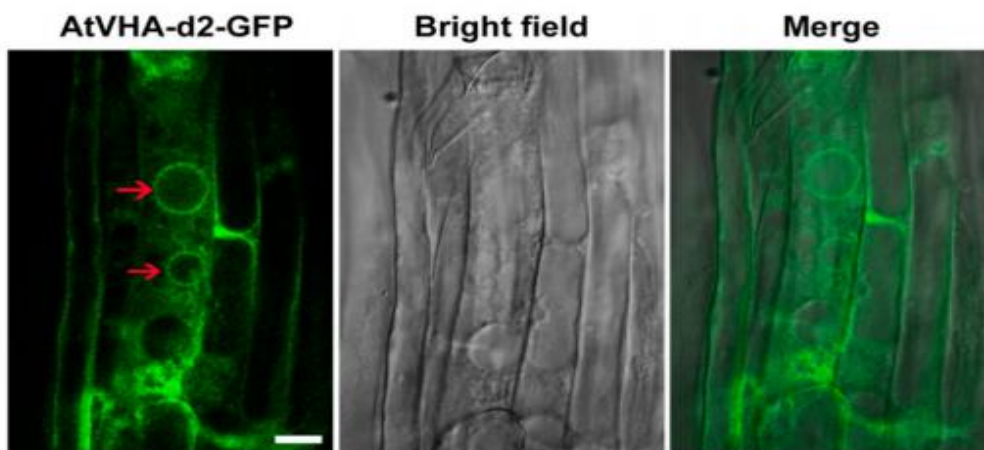


Figure 51: AtVHA-d2-GFP a une localisation vacuolaire chez Arabidopsis
La GFP, fusionnée à la sous-unité VHA-d2, fluorescence en vert. Les flèches rouges indiquent les vacuoles. Echelle= 10 μ m. Issu de Feng et al., 2020

ATPase et en influençant le trafic endosomal dépendant de la V-ATPase (Zhou et al. 2016). De plus, la surexpression de *VHA-c* (*PutVHA-c*) conduit à des hypocotyles plus longs lorsque cette lignée est cultivée à l'obscurité. Du fait de sa localisation à travers le système sécrétoire (TGN/EE), *PutVHA-c* permet de stimuler l'expansion cellulaire en favorisant le transport de différents composants de la paroi cellulaire (Zhou et al. 2018). A l'inverse, le mutant *det3*, mutant endosomal de la sous-unité C du domaine V1, présente un défaut d'assemblage de la V-ATPase, réduisant son activité et conduisant notamment à une augmentation du pH dans le TGN/EE (Schumacher et al. 1999; Luo et al. 2015). Cette alcalinisation impacte la motilité du Golgi et du TGN/EE, ce qui a été mis en évidence par le marqueur GFP-CesA3 (complexe Cellulose synthase assemblé dans l'appareil de Golgi). Pour rappel, la cellulose synthase est une enzyme impliquée dans la synthèse de cellulose, composant principal de la paroi végétale. Ce mutant *det3* présente donc une perturbation du trafic vésiculaire au niveau du TGN avec des défauts de sécrétion et notamment une diminution de l'exocytose de la cellulose synthase (Luo et al. 2015). En conséquence, l'hypocotyle du mutant *det3* est fortement réduit par rapport à la plante sauvage à l'obscurité (Schumacher et al. 1999; Brück et al. 2008; Luo et al. 2015). Enfin le double mutant *VHA-a2xVHA-a3*, mutant vacuolaire de la sous-unité a du domaine V0, présente une augmentation du pH vacuolaire. On notera que l'activité de la NR est augmentée dans ce mutant, accompagnée d'une accumulation de glutamine probablement du fait d'un défaut de stockage du nitrate dans la vacuole (Krebs et al. 2010).

Pour conclure, bien que la structure et les fonctions des V-ATPases soient assez bien conservées chez les eucaryotes, les acteurs régulant la V-ATPase chez la Levure tels que le complexe RAVE ne sont pas encore bien identifiés chez les plantes.

2. Régulations entre les V-ATPases et la voie TORC1 chez les eucaryotes

a) La V-ATPase et la voie TORC1 chez les animaux et la Levure

Chez la Levure, la V-ATPase participe à l'activation de TORC1. Le glucose, qui régule l'assemblage de la V-ATPase, stimule à la fois le taux de croissance et la taille des cellules de manière dose-dépendante. Il en va de même pour le pH cytosolique. En absence de glucose, Sch9 est déphosphorylée, indiquant une inhibition de la voie TORC1, mais l'ajout de glucose stimule sa phosphorylation. De même, la délétion de *VMA2* (équivalent de la sous-unité B1 du domaine V1 chez l'Homme) entraîne une baisse de la phosphorylation de Sch9. *Gtr1*, acteur de l'activation de TORC1 chez la Levure à l'instar des Rag GTPases chez les mammifères, interagit avec la V-ATPase. Cette interaction n'a aucun effet sur l'activité de la V-ATPase, mais la surexpression de

Gtr1 dans un mutant *vma2* permet de corriger ses défauts de croissance. Ainsi Gtr1 agit en aval de la V-ATPase pour activer le complexe TORC1 (Dechant et al. 2014).

Plusieurs études démontrent également un lien entre l'activité V-ATPase et l'activation de mTORC1, notamment en lien avec les acides aminés. L'utilisation d'ARN interférents contre des composants de la V-ATPase dans des cellules de drosophile réduit le taux de phosphorylation de la protéine S6K malgré la présence d'acides aminés. Ce résultat démontre la participation de la V-ATPase dans l'activation de mTORC1 chez les animaux (Zoncu et al. 2011).

Dans l'étude de Takayama et al. (2017), les auteurs ont amputé une nageoire de poisson zèbre, un organisme capable de se régénérer, et ont suivi le signal émis par un marqueur fluorescent des lysosomes acides, le LysoTracker. Trois heures après l'amputation, le marquage fluorescent est important puis diminue, témoignant d'un processus d'acidification pendant la régénération de la nageoire. Cette acidification lysosomale est impactée par l'utilisation d'inhibiteurs de la V-ATPase tels que la concanamycine A (ConA) ou Bafilomycin A1 (BafA1). La V-ATPase est donc impliquée dans ce phénomène de régénération (Takayama et al. 2018). L'inhibition de la V-ATPase est également accompagnée d'une diminution de la phosphorylation de S6K (Zoncu et al. 2011; Takayama et al. 2017). Ainsi, l'acidification du lysosome grâce à la V-ATPase est nécessaire à l'activation de TORC1. Nous avons vu en partie B.1.b que l'activation de mTORC1 par les acides aminés requiert différents acteurs, à savoir les Rag GTPases, le complexe RAGULATOR, le transporteur d'acides aminés SLC38A9 et la V-ATPase, formant un méga-complexe à la surface du lysosome. Pour rappel, la glutamine et la leucine sont des acides aminés importants dans l'activation de mTORC1. Les auteurs ont donc étudié l'effet de ces deux acides aminés au niveau de la partie amputée. Appliqués séparément, la leucine ou la glutamine ne permettent pas une activation efficace de TORC1 dans cette situation, mais une fois combinés l'intensité du LysoTracker est stimulée et TOR est activée. L'injection d'un morpholino (ARN antisens) dirigé contre le transporteur d'acides aminés *slc* (*slc7a5-MO*) limite l'acidification lysosomale. Les transporteurs d'acides-aminés et les acides aminés régulent donc positivement mTORC1 en permettant l'acidification du lysosome par la V-ATPase (Takayama et al. 2017). Par ailleurs, l'inhibition de la V-ATPase modifie les teneurs en métabolites dans le lysosome. De nombreux métabolites sont ainsi accumulés suite à la diminution de leur efflux-pH dépendant (Abu-Remaileh et al. 2017). La perte du transporteur SLC38A9 ou l'inhibition de mTORC1 diminue également l'efflux de certains acides aminés du lysosome. mTORC1 régule donc l'abondance d'acides aminés au niveau du lysosome grâce à un mécanisme impliquant le transporteur SLC38A9.

Pour comprendre le lien entre les différents acteurs de l'activation lysosomale de mTORC1, une expérience de co-immunoprécipitation a permis de mettre en évidence que RAGULATOR co-immunoprécipite avec les deux domaines de la V-ATPase tandis que les Rag GTPases co-immunoprécipitent avec les sous-unités du domaine V1 (Zoncu et al. 2011). Ainsi la délétion de la sous-unité V0 de la V-ATPase, qui interagit avec RAGULATOR, inhibe l'activité de mTORC1 (Jewell et al. 2015). RAGULATOR permet donc une interaction à la fois physique mais également fonctionnelle entre la V-ATPase et les Rag GTPases (Zoncu et al. 2011).

Puisque les protéines RagA/B induisent l'activation de mTORC1, notamment en favorisant sa translocation au niveau du lysosome en réponse aux acides aminés, des auteurs se sont intéressés à l'induction de mTORC1 dans le fond mutant KO *ragA/B*. L'activité de mTORC1 est diminuée dans ce fond mutant malgré la présence d'acides aminés comme la leucine (Jewell et al. 2015). En revanche, la glutamine continue d'activer mTORC1 dans ce fond mutant *ragA/B*. La glutamine permet une translocation lysosomale tardive de mTORC1 malgré l'absence de RagA/B. Ainsi, la glutamine active mTORC1 indépendamment de RagA/B mais aussi indépendamment des transporteurs d'acides aminés ou de RAGULATOR. Toutefois, en inhibant la V-ATPase dans ce mutant KO *ragA/B*, la stimulation de mTORC1 par la glutamine est perdue. La V-ATPase permet donc aussi l'induction de mTORC1 par la glutamine (Jewell et al. 2015).

Enfin, d'autres acteurs protéiques semblent participer à la localisation lysosomale de mTORC1 par le biais de la V-ATPase. C'est notamment le cas du facteur de transcription E2F1, connu pour être impliqué dans la progression du cycle cellulaire. E2F1 stimule l'expression de la sous-unité b du domaine V0 et donc l'activité de la V-ATPase. En effet, l'induction de l'expression de E2F1 conduit à une acidification du pH lysosomal tandis que la perte de E2F1 par siRNA entraînant une élévation du pH lysosomal. Ainsi, en stimulant le recrutement de la V-ATPase, E2F1 permet la régulation du trafic lysosomal et l'interaction entre la protéine RagB et le domaine V1 de la V-ATPase, induisant l'activation de mTORC1 (Meo-Evoli et al. 2015).

b) La V-ATPase et la voie TORC1 chez les plantes

Chez les plantes, le lien potentiel entre la V-ATPase et TOR n'est pas encore connu. Une étude de 2016 démontre l'activation de la V-ATPase par la PI3K végétale (VPS34) en lien avec un traitement au méthyl jasmonate (MeJA), composé induisant la sénescence des feuilles (Liu et al. 2016). Chez le riz, l'utilisation de lignées transgéniques KO OsVHA-A (sous-unité A de V1) démontre que l'alcalinisation du pH vacuolaire suite à la perte de l'activité V-ATPase stimule l'ouverture des stomates (Zhang et al. 2013). Il

existe donc une relation entre le pH vacuolaire et l'ouverture stomatale. L'application de sucre sur les feuilles augmente l'activité V-ATPase. Cette activation peut être supprimée par l'utilisation de LY294002, inhibiteur de PI3K. Des expériences de double-hybride et de BiFC ont mis en évidence l'interaction entre PI3K et la sous-unité B du domaine V1 de la V-ATPase, renforçant l'idée d'une régulation de la V-ATPase par PI3K (Liu et al. 2016). Le gène *AtVPS34* codant pour la kinase PI3K est induit suite au traitement MeJA. Dans ce contexte, l'inhibition génétique (mutant *pi3k*) ou pharmacologique (LY294002) de PI3K diminue à la fois l'activité V-ATPase induite par le traitement MeJA et donc l'ouverture des stomates (Liu et al. 2016).

Pour conclure sur cette dernière partie introductive, nous avons constaté que les V-ATPases sont des structures massives conservées au sein des eucaryotes, ayant un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du pH cellulaire et des organites. La V-ATPase participe donc à la régulation de nombreux transports cellulaires pH-dépendants. La V-ATPase est également impliquée dans l'activation de la voie TORC1 en réponse aux nutriments, notamment azotés, chez les animaux et la Levure. Toutefois, les régulations potentielles entre la V-ATPase, la voie TORC1 (et autres acteurs régulateurs possibles) n'ont pas encore été étudiées chez les organismes photosynthétiques.

Mon projet de thèse

Au cours de cette introduction, nous avons pu constater le rôle essentiel de la voie TORC1 au sein des eucaryotes dans la perception de l'environnement nutritionnel et hormonal, et la régulation fine de nombreux acteurs pour répondre au mieux à l'ensemble de ces signaux. La voie TORC1 est particulièrement étudiée chez la Levure, organisme chez lequel TOR a été mise en évidence pour la première fois, et chez les mammifères, compte tenu du fait que des dérégulations de la voie TORC1 peuvent aboutir à de nombreuses pathologies. Chez les organismes photosynthétiques, de plus en plus d'études sont menées sur la voie TOR. Les plantes étant des organismes fixes, il est d'autant plus pertinent d'étudier comment ces organismes perçoivent et répondent aux nombreux signaux biotiques et abiotiques auxquels ils sont soumis pour maintenir leur croissance. Dans la deuxième partie de l'introduction, j'ai notamment souligné le fait que la voie TORC1 était impliquée dans la perception de l'environnement nutritionnel azoté chez la Levure et les animaux mais peu de données existent à ce sujet chez les plantes. Compte tenu de l'importance du métabolisme azoté chez les plantes, la première partie de mon projet de thèse porte sur les régulations entre la voie TORC1 et le métabolisme azoté chez la plante modèle *Arabidopsis*. J'ai notamment étudié l'impact de l'inhibition de TOR sur les différentes étapes du métabolisme azoté, et plus particulièrement la synthèse de glutamine, acide aminé ayant un rôle prédominant dans l'activation de TORC1 chez les mammifères et la Levure. Cette première partie sera présentée sous forme d'un article scientifique qui est soumis et en cours de revue dans le journal *Plant Physiology*. En complément de ce premier objectif, une partie de ma thèse s'est déroulée à l'Institut Necker des Enfants Malades (INEM), en collaboration avec l'équipe du Dr Ganna Panasyuk et avec le Dr Mario Pende. De par l'importance de la glutamine dans les processus cancéreux, l'objectif de cette collaboration est d'étudier l'effet sur les voies mTOR d'un composant actif d'herbicide ciblant la biosynthèse de glutamine. Nous avons mené cette étude dans différentes lignées cancéreuses pour mieux envisager d'éventuelles applications médicales. Enfin, le dernier objectif de ma thèse est d'identifier un nouveau composant de la voie TOR chez les plantes. Un crible génétique a été réalisé précédemment sur des plantes doubles haploïdes ayant subi une mutagenèse de type EMS (Méthanesulfonate d'éthyle). Le but de ce crible était d'identifier des plantules ayant une différence de sensibilité à l'inhibition de TOR. Plusieurs mutants ont été identifiés lors de ce crible et nous avons choisi d'étudier le mutant noté *HD305* pour sa sensibilité à l'AZD mais également pour son phénotype d'apparition d'amas cellulaires ectopiques lors de l'inhibition de TOR. Le gène muté responsable de ce phénotype a été identifié

par séquençage et code une protéine dont la fonction n'est pas connue à ce jour mais dont l'orthologue chez la Levure pourrait être Rav1p. Mon travail consiste donc en la caractérisation de ce mutant que nous avons appelé *loki* (LOcalised proliferation depending on TOR Kinase Inhibition), notamment par des analyses phénotypiques, métabolomiques et transcriptomiques.

II- Résultats de la thèse

A. Régulations entre la voie TORC1 et le métabolisme azoté

1. Article *The Arabidopsis Target of Rapamycin (TOR) kinase regulates ammonium assimilation and glutamine metabolism*

Cette partie des résultats est présentée sous forme d'un article scientifique, article qui a été soumis dans le journal *Plant Physiology*.

The Arabidopsis Target of Rapamycin (TOR) kinase regulates ammonium assimilation and glutamine metabolism

Camille Ingargiola¹, Isabelle Jehanno¹, Céline Forzani¹, Anne Marmagne¹, Justine Broutin¹, Gilles Clément¹, Anne-Sophie Leprince^{1,2} and Christian Meyer^{1,*}

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France ; camille.ingargiola@inrae.fr (C.I) ; isabelle.jehanno@inrae.fr (I.J) ; anne.marmagne@inrae.fr (A.M) ; justine.broutin@inrae.fr (J.B.) ; gilles.clement@inrae.fr (G.C) ; anne-sophie.leprince@inrae.fr (A-S.L)

² Faculté des Sciences et d'Ingénierie, Sorbonne Université, UFR 927, 4 Place Jussieu, 75252 Paris, France

One sentence summary: The conserved Target of Rapamycin (TOR) kinase is an important sensor and regulator of the nitrogen metabolism and we show here that inhibiting this kinase affects ammonium uptake and results in Gln accumulation in a glutamine synthetase-dependent manner.

Author contributions: C.I., I.J., J.B. and C.F. performed the experiments, A.M. measured ¹⁵N enrichment, G.C. performed and analyzed GC-MS metabolites measurements, A-S.L., C.I., C.F. and C.M. designed the experiments, C.I, A-S.L. and C.M. analyzed the data and wrote the manuscript. C.M. is responsible for contact and ensures communication.

Funding information: C.I. is supported by a Ph.D. grant from the Fondation de la Recherche Médicale (FRM ECO201806006346). Our work is partly supported by a French State grant (Saclay Plant Sciences, ANR-17-EUR-0007, EUR SPS-GSR) managed by the French National Research Agency under an Investment for the Future program (reference n° ANR-11-IDEX-0003-02).

* **Correspondence :** christian.meyer@inrae.fr

Abstract

In Eukaryotes, Target of Rapamycin (TOR) is a well conserved kinase that controls cell metabolism and growth in response to nutrients and environmental factors. Nitrogen (N) is an essential element for plants and TOR functions as a crucial N and amino acid sensor in animals and yeast. However, the knowledge on the connections between TOR and the overall N metabolism and assimilation in plants is still limited. In this study, we investigate the regulation of TOR in *Arabidopsis* by the N source and the impact of the TOR signaling pathway on N metabolism. Inhibition of TOR globally decreases ammonium uptake while triggering a massive accumulation of amino acids such as Gln, but also of polyamines. Coherently, TOR complex mutants were found to be hypersensitive to Gln. We also show that the glutamine synthetase inhibitor glufosinate abolishes Gln accumulation resulting from TOR inhibition and improved the growth of TOR complex mutants. These results suggest that a high level of Gln contributes to the reduction in plant growth triggered by TOR inhibition. Glutamine synthetase activity was reduced by TOR inhibition while the enzyme amount increased. In conclusion our findings show that the TOR pathway is intimately connected to N metabolism and that a decrease in TOR activity results in a glutamine synthetase-dependent Gln and amino acids accumulation.

INTRODUCTION

Sensing available nutrients and efficiently assimilating them is a challenge common to all living organisms for optimal growth and adaptation to changing environments. The tight control of cellular processes involved in nutrients assimilation by different levels of regulatory steps is crucial for maintaining metabolic homeostasis within the cells and between organs (Efeyan et al., 2015). Indeed, when nutrients are abundant, high levels of protein synthesis can be maintained to support cell division and differentiation. By contrast, growth has to stopped in nutrient poor conditions to preserve energy while nutrient stores need to be remobilized to sustain basic metabolism. Nitrogen (N) is an essential macro-element for plants and its availability is important for growth and thus for crop yield (O'Brien et al., 2016; Fichtner et al., 2021). Plant roots can take up N from the soil and plants mainly use inorganic N sources such as nitrate (NO₃) or ammonium (NH₄) (Bloom et al., 1992, for review see Kiba and Krapp, 2016). Nitrate can be stored in the vacuole, assimilated directly in the roots or transported to the shoots for its assimilation into nitrite, ammonium and finally glutamine (Krapp et al., 2015; Vidal et al., 2020). Several enzymes are involved in this assimilation: Nitrate and Nitrite Reductases (NR and NiR), Glutamine Synthetase (GS) which converts ammonium and glutamate into glutamine, and Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase (GOGAT) which produces two molecules of glutamate by trans-amination of alpha-ketoglutarate. Consequently, GS and GOGAT enzymes are also involved in ammonium detoxification mechanisms (Guan et al., 2016). Assimilation of N is also needed for the synthesis of other N-containing molecules, like other amino acids, polyamines, nucleotides, secondary metabolites or hormones.

In Eukaryotes, the TOR (Target Of Rapamycin) protein kinase is a conserved and important regulatory element controlling many aspects of C and N metabolism in relation with crucial cellular processes like mRNA translation, cell proliferation, and autophagy (Wullschleger et al., 2006; Gonzalez and Hall, 2017; Brunkard, 2020; Ingargiola et al., 2020; Liu and Sabatini, 2020). Belonging to the Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase (PIKK) family, this large

Ser/Thr kinase is involved in two protein complexes in Yeast and Mammals. In the TORC1 complex, TOR interacts with LST8 (Lethal with Sec Thirteen 8) and KOG1 (Kontroller of Growth protein 1)/RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of TOR) (Adami et al., 2007) whereas in the TOR complex 2 (TORC2), TOR (TOR2 in Yeast) interacts with LST8 and AVO3 (Adheres Voraciously to TOR2 protein3)/RICTOR (Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR).

All photosynthetic organisms contain genes coding for TOR, LST8 and RAPTOR proteins but there is so far no evidence for the presence of a TORC2 complex (Maegawa et al., 2015; Dobrenel et al., 2016a; Perez-Perez et al., 2017). LST8 binds the TOR kinase domain to stabilize the complex (Moreau et al., 2012; Aylett et al., 2016) and RAPTOR interacts with the HEAT repeats of the Arabidopsis TOR kinase (Mahfouz et al., 2006). Both proteins probably regulate the docking and phosphorylation of specific TOR substrates. While *tor* mutations are embryo lethal at an early stage of plant development, *lst8* and *raptor* mutants are viable, but present many developmental and metabolic alterations (Menand et al., 2002; Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2005; Moreau et al., 2012; Salem et al., 2018). For example, *lst8* mutants contain higher concentrations of almost all free amino acids but this is particularly striking for glutamine (Gln) which accumulates to high amounts (Moreau et al., 2012; Forzani et al., 2019). Similarly, mutations of RAPTOR (Salem et al.; 2018), TOR inhibition by silencing in plants (Ren et al., 2012; Caldana et al., 2013) or by rapamycin (TOR inhibitor) treatment in *Chlamydomonas reinhardtii* (Mubeen et al., 2018) also trigger an increase in the accumulation of amino acids. This amino acid accumulation could be due to an increased recycling of N-containing molecules by autophagy, a process that is activated by TOR inhibition and/or to a decrease in mRNA translation (Liu and Bassham, 2010; Diaz-Troya et al., 2011; Soto-Burgos and Bassham, 2017). In *Chlamydomonas* this build-up of amino acids has been ascribed to an increased assimilation of exogenous N since it was reduced when cells were beforehand starved for C or N nutrients but not when treated with inhibitors of translation or proteolysis (Mubeen et al., 2018).

Recently, inactivation of the dual specificity Tyr/Ser YAK1 (Yet Another Kinase 1) kinase was identified as a strong suppressor of TOR deficiency in Arabidopsis (Barrada et al., 2019; Forzani et al., 2019). The YAK1 kinase interacts with RAPTOR and is a direct TOR substrate (Forzani et al., 2019). Interestingly, inhibition of the YAK1 kinase in the *lst8* background restores growth and strongly decreases glutamine accumulation (Forzani et al., 2019). YAK1 was originally found in yeast where it phosphorylates and regulates transcription factors like Hsf1 and Msn2/4 involved in the responses to stress and nutrient starvation (Lee et al., 2008). In yeast, TOR also has a strong impact on Gln metabolism by repressing the nuclear localization of the central Gln3 transcription factor which is the regulator of ammonium assimilation (Crespo et al., 2002). Consistently, growth on poor or limited N sources inhibits TOR which results in Gln3 activation (Beck and Hall, 1999; Tate et al., 2021). In animals Gln was shown to be a strong inducer of TOR activity through glutamine catabolism (Villar et al., 2015; Yuan et al., 2015; Tanigawa and Maeda, 2017). Indeed, cancerous cells often have an increased glutamine catabolism, which promotes high TOR activity, to fuel their high needs for energy, N and C sources (Martinez-Outschoorn et al., 2017).

More generally, several studies demonstrated in yeast and mammals that TOR activity is regulated by nutrient availability and amino acids. As an example, Stracka et al. showed by following Sch9 phosphorylation (a direct TOR target), that N source acts on TOR activity in yeast. The authors determined two N source categories, one “high-end” (like glutamine, ammonium, asparagine) and one “low-end” (serine, branched amino acids and hydrophobic

amino acids), the first category inducing TOR activity while poor N sources inhibit TOR (Stracka et al., 2014). In the same way, Meng et al., demonstrated that in human embryonic kidney HEK293A cells, amino acids activate mTORC1 and promote its localization to the lysosome (Meng et al., 2020). Indeed, in animals and yeast, TORC1 is stimulated following recruitment to the lysosomal/vacuolar surface by amino acid activated V-ATPase through the RagGTPase/Ragulator complex (Liu and Sabatini, 2020). As in yeast and mammals, TOR activity in plants is also regulated by nutrient availability, especially sugar, sulfur and amino acids (for review Ingargiola et al., 2020). In stress conditions or during C starvation, SnRK1 (Snf1-Related Kinase 1) is activated, phosphorylates the RAPTOR component of the TORC1 complex and inhibits TOR activity (Nukarinen et al., 2016). In plants, N is important for growth but our knowledge about the connections between TOR and N metabolism were hitherto scarce. However, several recent reports describe the regulations of TORC1 by amino acids in photosynthetic organisms. O’Leary et al. showed that isoleucine or glutamine activate TOR in mature leaves of Arabidopsis (O’Leary et al., 2020). Moreover, loss of function of isopropylmalate synthase 1 (IPMS1), an enzyme involved in Leu synthesis, resulted in the accumulation of Val and to a reduced sensitivity towards TOR inhibitors like AZD-8055 as a consequence of TOR activation (Schaufelberger et al., 2019). In another study, mutation of *IPMS1* was also found to be responsible for the Arabidopsis *eval* mutant phenotype affected in vacuole morphogenesis through hyperactivation of TOR (Cao et al., 2019). As in the previous study this mutation resulted in the accumulation of Val and other branched-chain amino acids (BCAA) and in TOR activation. Finally, it was found that inorganic N and amino acids activate TOR through the small GTPase Rho-related protein from plants 2 (ROP2) which was also shown to be implicated in auxin induction of TOR activity (Schepetilnikov et al., 2017; Liu et al., 2021). Therefore, the stimulation of TOR activity by amino acids, especially glutamine and BCAA, seems to be a conserved hallmark of this kinase in eukaryotic organisms.

To better establish the relation between N metabolism and the TOR kinase in plants, we describe here the consequences of variations in TOR activity on N metabolism in Arabidopsis. We first investigated the influence of N supply on TOR activity as well as the impact of TOR inhibition on inorganic N uptake and amino acid synthesis. Finally, by using GS inhibitors, we showed that the accumulation of Gln and other amino acids observed after TOR inhibition is dependent on GS activity. Accordingly, growth of TORC1 mutants was improved by GS inhibitors like phosphinothricin. Our results thus provide new evidence of a tight link between the TOR signalling pathway and the N metabolism in plants and show that GS is involved in the accumulation of amino acids observed after TOR inhibition.

RESULTS

C/N balance regulates TOR activity

Nitrogen and Carbon are important elements for plant growth. It is now established that TOR is strongly activated by sugar in plants (Xiong et al., 2013; Dobrenel et al., 2016a) and recent studies highlight the regulation of TOR activity by different nitrogen sources and amino acids such as glutamine (Cao et al., 2019; O’Leary et al., 2020; Liu et al., 2021). Variations in the nutritional environment will affect C/N balance. Therefore, it is important for plants to sense this balance in order to efficiently adapt their metabolism and growth. We thus tried to determine whether the C/N balance could modulate TOR activity in Arabidopsis. In plants, as

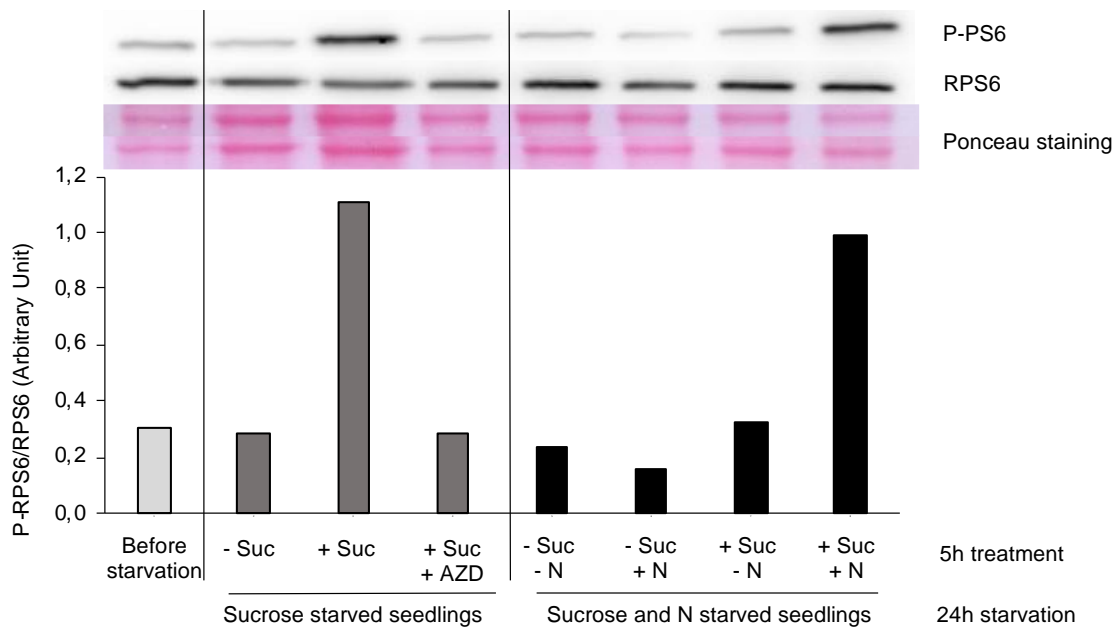


Figure 1: Nitrate is required for the full activation of TOR by sucrose.

Five days old seedlings were grown on solid *Arabidopsis* medium (1mM KNO_3 and 0.3% sucrose) then transferred for 24h starvation in liquid *Arabidopsis* media either without sucrose only, or without sucrose and nitrate. For sucrose starved seedlings (-Suc), 1% Sucrose (+Suc) was then added for 5h with (+AZD) or without $1\mu M$ AZD. For sucrose and nitrogen starved seedlings, 1% sucrose (+/- Suc) and/or 5mM KNO_3 (+/-N) were added. The same KCl concentration was maintained under the different conditions tested. Twenty five μg of total proteins extracted from around 20 seedlings were loaded for each sample and were used for western blot analysis. Membrane were incubated with phospho-specific antibodies against ribosomal protein S6 (P-RPS6) Ser240 or against total RPS6. Western blots were revealed using Goat anti-rabbit IgG-HRP as secondary antibody. Exposition time: 90sec for P-RPS6, 15 sec for RPS6. Western blot was repeated three times.

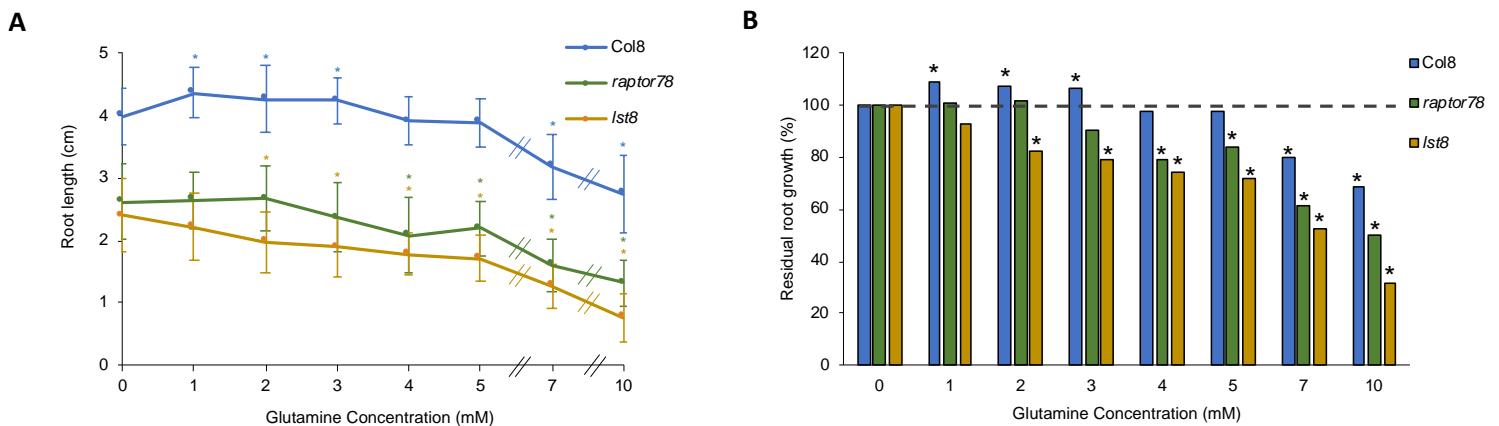


Figure 2: raptor78 and Ist8 mutants of the TORC1 complex are hypersensitive to glutamine.

(A) Primary root length and (B) Residual root growth of 10 days old wild type control (Col8), raptor78 and Ist8 mutants on different glutamine concentrations. Nitrate (0.1mM KNO_3) was added for all Gln concentrations to stimulate seed germination. The residual root growth was calculated as a percentage compared to the 0mM glutamine condition (=100%). Results of one typical experiment are shown. $n \geq 12$. Stars indicate for each genotype significant differences compared to the control 0mM glutamine condition (Mann and Whitney statistical test, $p < 0.05$).

in other Eukaryotes, TOR phosphorylates S6 Kinase (S6K) which then phosphorylates Ribosomal Protein S6 (RPS6) (Mahfouz et al., 2006; Wullschleger et al., 2006). RPS6 phosphorylation on Ser240 has thus been used as a robust readout for TOR activity (Dobrenel et al., 2016b). Using specific antibodies against RPS6 and P-RPS6 we were able to estimate the level of TOR activation by the C/N balance (Figure 1). In the first part of the experiment, 5-days old Arabidopsis seedlings grown on solid medium were transferred for 24 h into liquid medium without sucrose to trigger sugar starvation. The seedlings were then treated for 5h with 1% sucrose in order to stimulate TOR activity +/- 1 μ M AZD-8055, a potent and validated TOR inhibitor in plants (Montané and Menand, 2013). As expected, the addition of sucrose induces approximately a 4-fold increase of the P-RPS6/RPS6 ratio, reflecting TOR activation, whereas this activation is inhibited when AZD-8055 is added to the medium, despite the presence of sucrose. These expected results validate the experimental setting used to measure the influence of N on TOR activity. In a second experiment, 5-days old Arabidopsis seedlings grown on solid medium were transferred for 24 h into liquid medium without sucrose and KNO₃. Seedlings were then treated for 5h with or without 1% sucrose and/or 5mM KNO₃. The addition of sucrose alone or KNO₃ alone did not induce TOR activity, but when both nutrients were added to the medium, a 4-fold induction of TOR activity was observed (Figure 1). We also tested 5mM glutamine or ammonium succinate as N sources in combination with sucrose to activate TOR (Supplemental Figure S1). In the same way, TOR activity was higher when both sucrose and a N source like Gln or ammonium were provided. We can thus conclude that the presence of N in the culture medium is necessary for the full TOR activation by sucrose.

TORC1 mutants are more sensitive to glutamine

We tried to further define the relations between Gln and TOR by first characterizing the effect of this amino acid on the root growth of TORC1 mutants. To address this question, we used T-DNA insertion mutants affected either in the *Raptor3g* gene (At3g08850, named *raptor 78*) or in the *Lst8-1* gene (At3g18140, named *lst8*). These TORC1 mutants have already been extensively validated and studied (Anderson et al., 2005; Deprost et al., 2005; Moreau et al., 2012; Salem et al. 2018). Mutant plants were grown together with the WT control *in vitro* on increasing Gln concentrations, and primary root growth was measured (Figure 2). The root growth of WT seedlings was slightly but significantly increased by low concentration of Gln compared to the starvation condition, whereas for higher glutamine concentrations (7 to 10 mM), root growth was partially inhibited. The root length of both *raptor 78* and *lst8* mutants was always shorter than WT seedlings and both mutants were more sensitive to Gln inhibition (Figure 2B). The growth phenotype of *lst8* mutants is generally more severe than the one of *raptor* mutants. Coherently, *lst8* mutant seems to be more sensitive to Gln with a significative effect on root growth compared to WT and *raptor* mutant even for low concentrations of Gln. This higher sensitivity to Gln could be explained by the fact that both *raptor* and *lst8* mutants already contain high levels of this amino acid.

TOR inhibition decreases ammonium uptake by the roots

Free Gln and other amino acids can be produced by proteolysis, by ammonium recycling or by the assimilation of inorganic N after uptake from the soil. To elucidate the origin of the amino acid accumulation, and particularly of Gln, when TOR is inhibited, we first examined the first

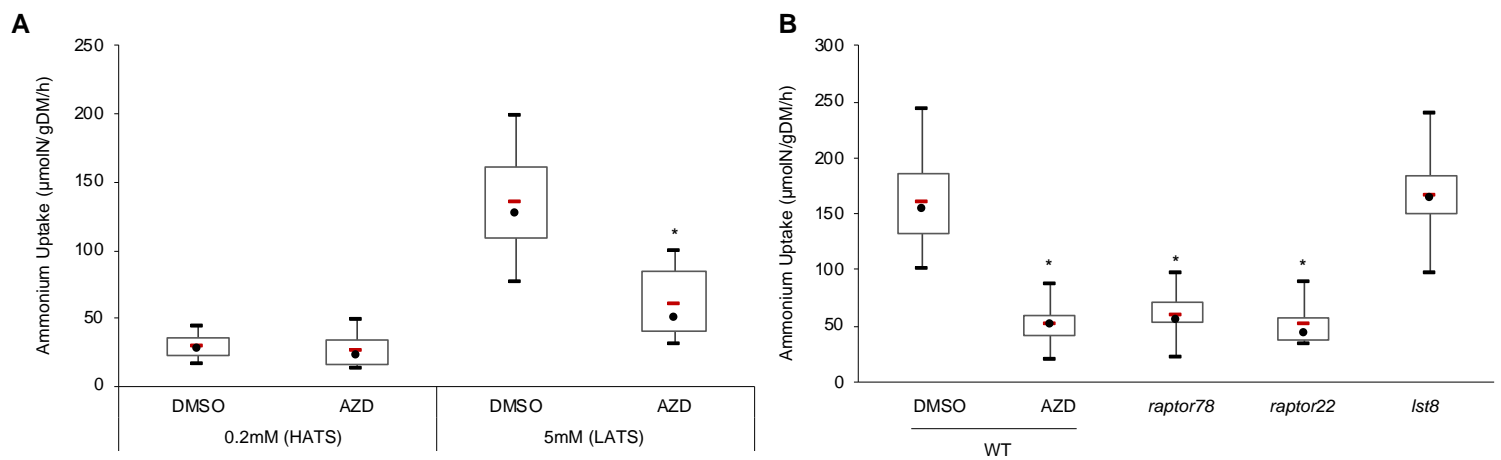


Figure 3: TOR inhibition represses low affinity ammonium uptake in Arabidopsis.

Ten days old seedlings were grown on solid Arabidopsis medium (5mM KNO_3 , 1% sucrose) and treated as described in Supplemental Figure S2 (see also Material and Methods for details).

(A) Col8 seedlings were pre-treated for 2h with 2μM AZD-8055 before the addition of either 0.2mM $^{15}NH_4$ (HATS) or 5mM $^{15}NH_4$ (LATS). Plant were collected after 5min and dried before measurements of ^{15}N enrichment. $n=18$ samples per condition. **(B)** TORC1 mutants (*lst8-1*, *raptor22*, *raptor78*), and WT seedlings were treated with 2μM AZD-8055 in the presence of 5mM $^{15}NH_4$ (LATS). $n=14$ to 18 (6 samples for *raptor22*).

Red bars represent the mean and black dots represent the median. DMSO are the control vehicle conditions. Stars indicate statistically significant differences compared to WT DMSO condition (non-parametric Kruskal and Wallis Statistical test, $p<0.05$). gDM: gram dry matter.

step of N assimilation, namely the uptake of nitrate and ammonium by the root system. Depending on the availability of these N sources in the soil, different transporter families are involved in uptake. NPF transporters (Nitrate Transporter 1/ Peptide transporter family) are involved in nitrate uptake for high concentrations (LATS, Low Affinity Transporter System) and NRT2 (Nitrate Transporter 2) are operating at low concentrations (HATS, High Affinity Transporter System) (for review, Kiba and Krapp, 2016). The ammonium transporters' (AMT/MEP/Rh) superfamily is involved in high affinity ammonium uptake and redistribution within the plant (HATS, for review, von Wirén et al., 2000, Ludewig et al., 2007, Hao et al., 2020). Plant roots have also a low-affinity transport system (LATS) for ammonium. HATS plays a major role when ammonium in the soil is at μ molar concentration while LATS mainly operates at mmolar or higher concentrations (Liu and von Wirén, 2017).

In *Chlamydomonas*, it has been shown that TOR is involved in the regulation of ammonium uptake, which was found to be higher when cells were treated with rapamycin (Mubeen et al., 2018). To determine if TOR is also involved in the regulation of inorganic N transport in *Arabidopsis*, we measured ^{15}N labelled nitrate or ammonium uptake after 2h TOR inhibition by AZD-8055 (Supplemental Figure S2A). Ten days old seedlings grown on solid medium were transferred to liquid *Arabidopsis* media with or without $2\mu\text{M}$ of AZD-8055. Uptake was measured with two different ^{15}N concentrations, 0.2mM (for HATS) and 5mM (for LATS). TOR inhibition by AZD-8055 had no effect on nitrate uptake for both concentrations (Supplemental Figure S2B), as observed in *Chlamydomonas*. However, the LATS component of ammonium uptake decreased significantly after TOR inhibition by AZD-8055 but the HATS component was unaffected (Figure 3A). We also measured the LATS component of ammonium uptake after long term TOR inhibition by AZD-8055 and found that it was reduced in a similar way (Supplemental Figure S2C). To confirm this result, we determined ammonium uptake at high concentration (LATS) in *lst8* and *raptor* TORC1 mutants (Figure 3B). As expected, *raptor* mutants showed a 3 times lower ammonium uptake than WT seedlings, but surprisingly ammonium uptake in *lst8* mutants was at the same level than in WT seedlings. These results suggest that in *Arabidopsis* TOR is not involved in the regulation of high or low affinity nitrate uptake, but positively regulates ammonium low affinity uptake. Contrary to *Chlamydomonas*, TOR activity seems to stimulate ammonium uptake in a RAPTOR-dependent manner but independently of LST8. This is one of the few examples of a biological process in which RAPTOR and LST8 have different roles.

TOR inhibition leads to an ammonium and Gln increase in a GS-dependent manner

The decrease of ammonium uptake observed after TOR inhibition should trigger a lower ammonium and Gln accumulation, whereas it has been extensively documented that TOR inhibition results in Gln accumulation. These seemingly conflicting results prompted us to address the role of GS, the enzyme responsible for Gln synthesis, in the accumulation and growth-inhibitory properties of this amino acid in relation to TOR activity. The GS enzyme catalyses the amination of glutamate (Glu) using ammonium to produce Gln. The active ingredient of non-selective herbicides like Basta is Glufosinate-Ammonium (GA), also named phosphinothricin, which is a potent GS inhibitor (Logusch et al., 1990). GA is a L-glutamate analogue that binds the active site of GS. This GS inhibition, in addition to prevent glutamine production, leads to ammonium accumulation part of which comes from photorespiration and protein degradation (reviewed in Li et al., 2014). To investigate the mechanisms of Gln

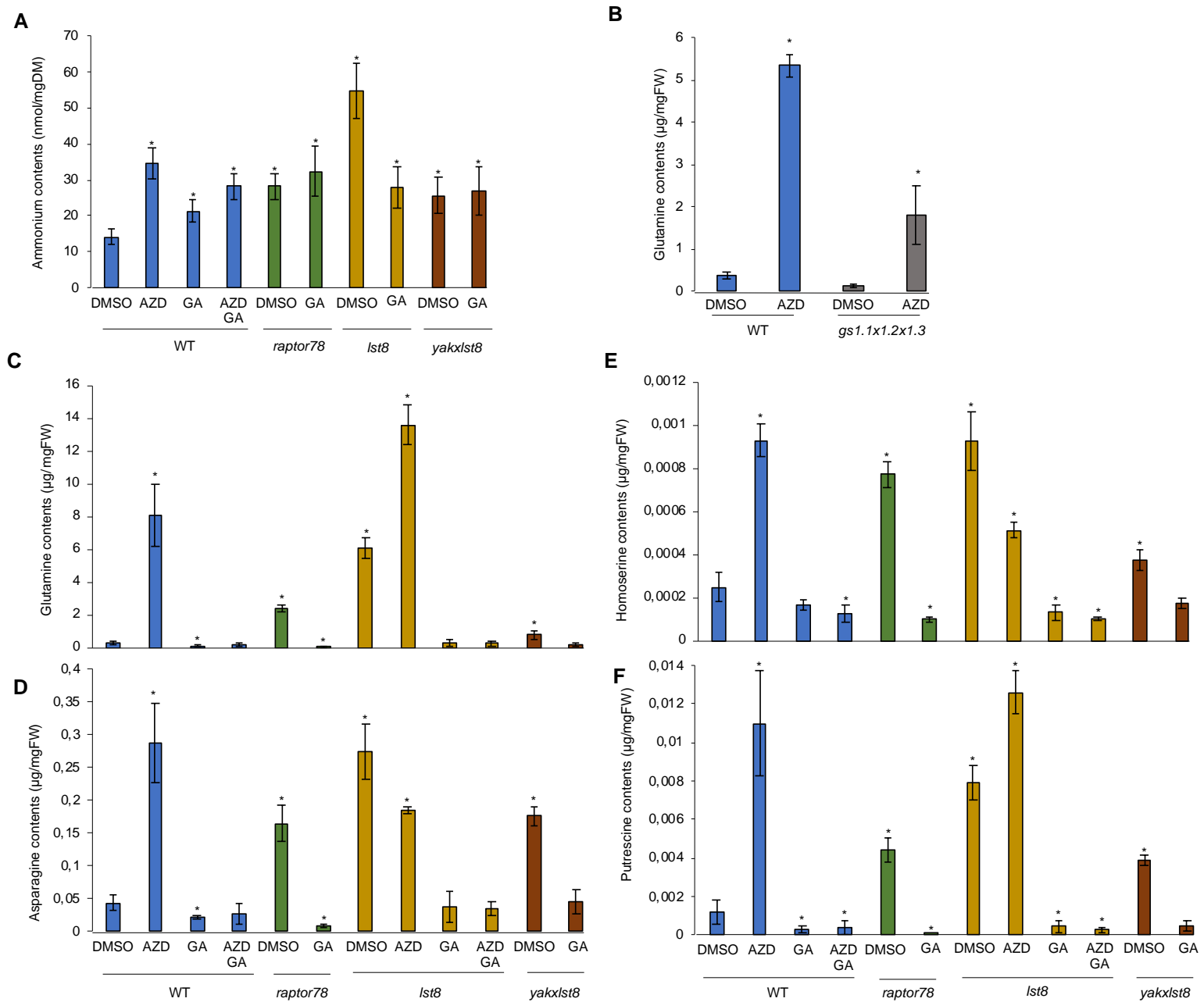


Figure 4: TOR inhibition leads to metabolic changes and Gln accumulation in a GS-dependent manner.

Seedlings were grown 5 days on solid *Arabidopsis* medium then transferred on solid *Arabidopsis* media with either 0.25µM AZD-8055, or Glufosinate ammonium (GA) at 2mg/L (GS inhibitor), or both AZD and GA. The seedlings were harvested after 7 days for metabolomic analysis (n=3). For the experiment with the GS1 triple mutant (B), seedlings were grown directly on 0.25µM AZD-8055 for 10 days. (A) Ammonium contents in WT seedlings and TORC1 mutants (*raptor78*, *lst8* and *yak1lst8*). Means are the result of 5 independent experiments. (B) Effect of AZD-8055 treatment on Gln contents in WT and a GS1 triple mutant (*gs1.1x1.2x1.3*) (n= 4 and 5 repetitions, for respectively, WT and *gs1.1x1.2x1.3* seedlings). (C, D) Effect of AZD-8055 or GA treatments on metabolites contents in WT seedlings and TORC1 mutants. Stars indicate statistically significant differences compared to the WT control plants treated with DMSO condition (non-parametric Mann and Whitney Statistical test, p<0.05).

accumulation after TOR inhibition, we first measured ammonium contents in WT or TORC1 mutant seedlings (Figure 4A). We also used *lst8* mutant suppressed by the introduction of a *yak1* kinase mutation (*yakxlst8*, Forzani et al., 2019). For WT seedlings, GA addition in the growth medium resulted in a significant increase in ammonium contents compared to DMSO control conditions. This suggests that GA is active as expected in our experimental conditions. Interestingly, whereas TOR inhibition represses ammonium uptake, we still observe an increase in ammonium contents after genetic or pharmacological TOR inactivation (Figure 4A). The *raptor* mutation triggers an increase in ammonium which is not augmented by GA. Conversely, the *lst8* mutants displayed the highest concentration of ammonium while GA decreased this accumulation. We have shown before that inactivating the YAK1 kinase suppresses most of the metabolic perturbations brought about by *lst8* mutation (Forzani et al., 2019). However, while ammonium concentration decreased by 50% in *yakxlst8* seedlings, they still contain more ammonium than the WT control.

We then studied the effect of GS inhibition by GA on the TORC1 mutants. For this purpose, we performed metabolomic analyses using seedlings transferred on medium in the presence of TOR and/or GS inhibitors. Our results confirmed the global accumulation of free amino acids triggered by TOR inhibition that has been observed in earlier reports (Figure 4, B-E; see Ingargiola et al., 2020 and references therein). It is interesting to note that *lst8* mutants treated with AZD-8055 present the strongest accumulation of free Gln compared to control condition ($0.25 \pm 0.1 \mu\text{g Gln mg}^{-1}$ fresh weight for WT compared to $13.61 \pm 1.2 \mu\text{g mg}^{-1}$ for *lst8* seedlings on AZD-8055). Without AZD-8055, TORC1 mutants contained more Gln than WT but *lst8* seedlings accumulated two times more Gln than *raptor* mutants (Figure 4C). This higher Gln content in *lst8* mutants could explain their higher sensitivity to the supply of Gln (Figure 2). The pattern of Asn accumulation mirrored that of Gln but at a much lower concentration (Figure 4D), except for the effect of AZD-8055 on *lst8* mutants which lowered Asn concentration but increased Gln. Similarly, TOR deficiency strongly increased the amounts of homoserine (HoSer). HoSer is derived from Asp and is an important non proteogenic intermediate amino acid for the production of Met, Thr and Ile. Glu is used for the synthesis of amino acids like GABA, Pro and Arg. Contrary to Gln, TOR inhibition did not significantly affect the level of Glu which often shows a rather constant level in plants. As for the other amino acids, TOR inhibition increased the levels of Arg but also the amounts of both agmatine and putrescine, a polyamine (Figure 4F and Supplemental Figure S3). In Arabidopsis, putrescine is synthesized from Arg via agmatine that is produced by Arg decarboxylase (Hanfrey et al., 2001). Putrescine and other polyamines are involved in the regulation of stress responses and growth (Takahashi 2020). These results show that TOR has a global and strong impact on Gln and Glu metabolisms.

The inhibition of GS activity by GA treatment strikingly abolished the Gln accumulation caused by TOR inhibition, either after using AZD-8055 or in *raptor* and *lst8* mutants. The levels of other amino acids including Asn, HoSer, agmatine but also of putrescine were also reduced in TOR-inhibited plants after GA treatment (Figure 4 and Supplemental Figure S3). As expected, GA also reduced Gln contents in control WT plants. In Arabidopsis, the GS enzymes are localized either in the cytosol for the five GS1 isoforms and in the plastids for GS2. To confirm our hypothesis, we used the GS1 triple mutant *gs1.lx1.2xl.3* (Moison et al., 2018). The *gs1.lx1.2xl.3* triple mutant also accumulated Gln after TOR inhibition, but to a lesser extent than the AZD-treated WT plants (Figure 4B). The decrease in Gln level after TOR inhibition was thus lower in the triple *gs1* mutant line than after GA treatment of WT plants but the GS2

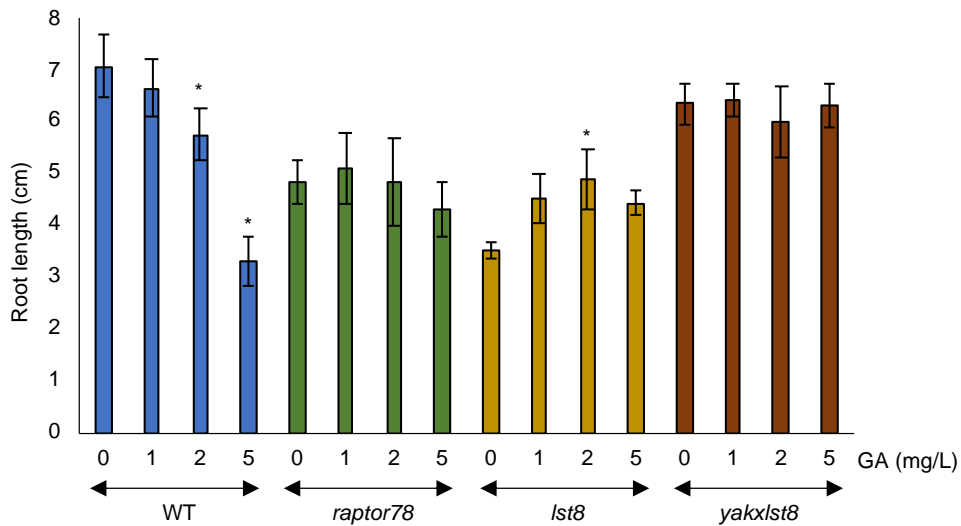


Figure 5: TORC1 mutants are more resistant to GS inhibition by Glufosinate ammonium (GA) than WT.

The root length of WT seedlings and TORC1 mutants (*raptor78*, *lst8*, *yakxlst8*) were measured 9 days post-transfer on *Arabidopsis media* containing different GA concentrations. This figure shows one representative experiment among 4 experiments. Stars indicate significant differences compared to the control 0 mg/L condition for each genotype ($n=20$, non-parametric Kruskal and Wallis Statistical test, $p<0.05$).

isoenzyme is still active in these mutants compared to GA-treated plants. Taken together, these data strongly suggest that the Gln accumulation triggered by TOR inhibition is depending on GS activity.

The observation that GA suppressed Gln accumulation after TOR inhibition prompted us to determine the effect of GA on the growth of TORC1 mutants. Five days old TORC1 mutant seedlings were transferred on medium containing different GA concentrations and the root length was measured 9 days post-transfer (Figure 5). As expected for an herbicide, WT seedlings presented a significant inhibition of root growth for 2 and 5mg/L of GA. Indeed, the highest GA concentration halved WT root length. However, GA improved the root growth of TORC1 mutants at low concentrations, especially for *lst8* seedlings and globally TORC1 mutants were less sensitive to GA than WT (Figure 5). Conversely, and as expected, *gs1* triple mutants were hypersensitive to GA compared to WT (Supplemental Figure S4). Similar experiments were performed with Methionine Sulfoximine (MSX), another GS inhibitor, confirming the partial resistance of TORC1 mutants to GS inhibition compared to WT seedlings (data not shown). The improved root growth of TORC1 mutants after GS inhibition could be the result of the diminished accumulation of Gln, or Gln derivatives like putrescine, which are toxic at high concentrations. Coherently, the *gs1* triple mutant, but also the quadruple *amt* (ammonium transporter) mutant, which both accumulate less Gln, are more resistant to TOR inhibition than WT when grown on AZD-8055 (Supplemental Figure S5).

TOR inhibition leads to a deregulation of N metabolism and GS enzymes in Arabidopsis

To gain more insight into the regulations of Gln metabolism by TOR in Arabidopsis, we asked how the inhibition of TOR is affecting the mRNA level of genes involved in ammonium uptake and nitrate assimilation. We thus analyzed by quantitative RT-PCR the expression of some marker genes either in the presence of nitrate or ammonium (Figure 6A). On nitrate, several genes were more expressed after TOR inhibition such as *AMT1;1* (ammonium transporter), *GLN1;1*, *GLN1;3* (encoding GS1 isoforms) or *GLU2* (a Fd-GOGAT mainly expressed in roots (Coschigano et al., 1998)). More genes were induced by TOR inhibition when plants were grown on ammonium, including *AMT1;3*, *AMT1;5*, *Nii* (nitrite reductase), *Nia1* and *Nia2* (nitrate reductase) as well as *GLN1;1-1;3* and *GLU2*. The increase in gene expression was higher on ammonium and even more in the *lst8* mutant. To focus on Gln metabolism, we also determined GS protein levels and activities after TOR inhibition (Figure 6, B-C). Nitrate-grown seedlings treated with AZD had a lower GS activity compared to the WT (Figure 6C). Accordingly, GS activity was also lower in *raptor78* and *lst8* mutants whereas the *yakxlst8* suppressor mutant shows a GS activity equivalent to the WT. The fact that pharmacological and genetical TORC1 inhibitions decrease GS activity is somewhat counter-intuitive given the massive Gln accumulation resulting from the inhibition of this complex. Finally, we analysed GS proteins level by immuno-blot in 10 days old seedlings (Figure 6B). The *gs1.1x1.2x1.3* mutant presents an important decrease of GS1 protein level compared to the WT, compensated by an increase of GS2 protein, which agrees with the results of Moison et al., 2018. Genetic or pharmacologic TOR inhibition leads to an increase of GS1 and GS2 protein levels. The *raptor* and *lst8* mutants display a strong increase of GS protein levels which is higher than in seedlings treated by AZD-8055. These results suggest that the GS protein is less active after TOR inhibition and thus that TOR may be required for GS activation.

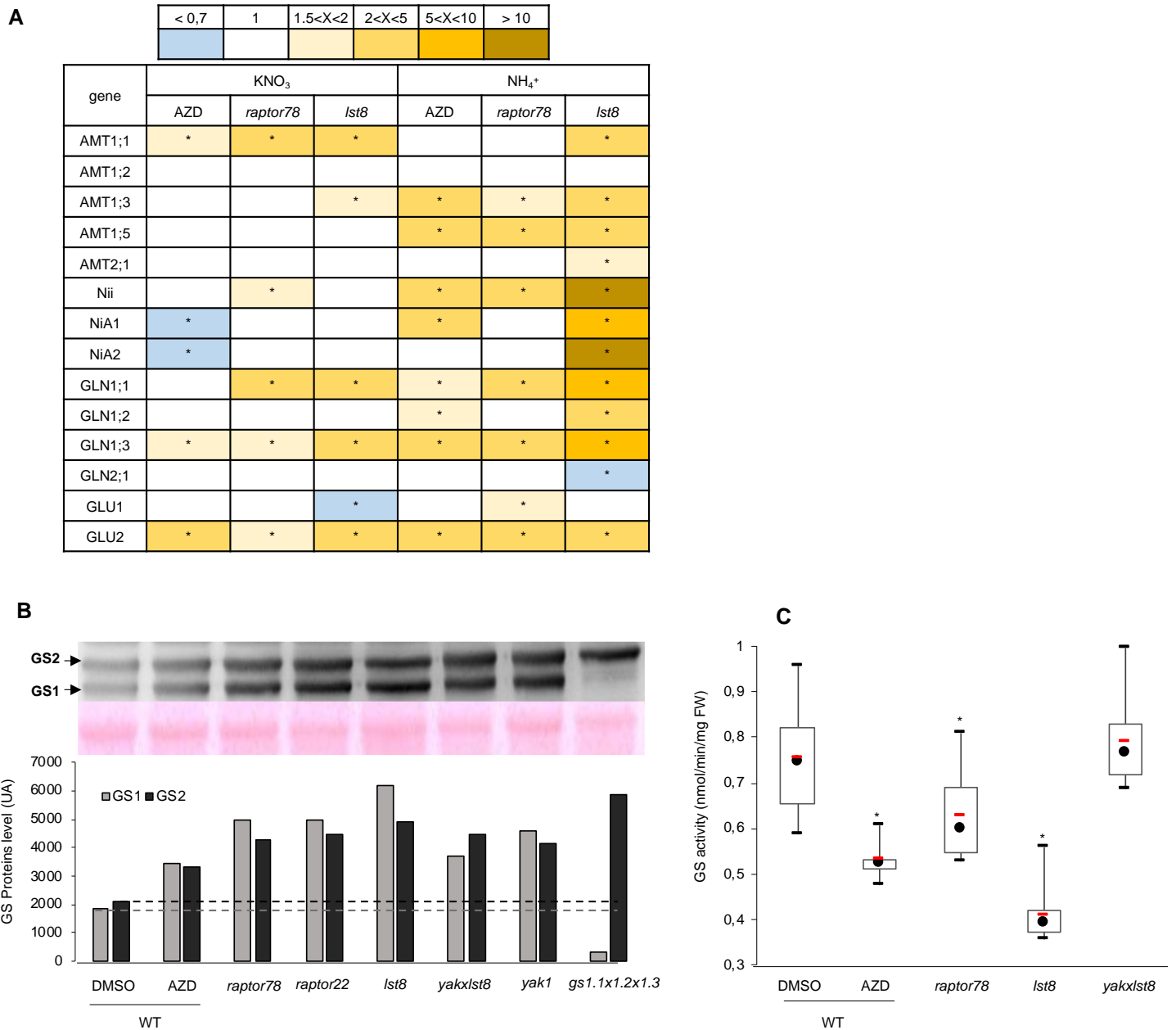


Figure 6: Impact of TOR inhibition on the expression of N metabolism genes and GS activity.

(A) Effects of genetic or pharmacological TOR inhibition on the expression of N assimilation genes, AMT: ammonium transporters, Nii: nitrite reductase, Nia: nitrate reductase; GLN: Gln synthetase, GLU: Glu synthase. Gene expression levels were determined by quantitative RT-PCR using 10 days old WT and TORC1 mutants seedlings (*raptor78* and *lst8*) grown on 5mM KNO₃ or ammonium succinate. The changes in gene expression were determined as described in Material and Methods with expression levels in nitrate or ammonium-grown plants treated with DMSO as controls. Mean ratios from three independent experiments are shown as fold changes. Stars indicate statistical difference (Mann & Whitney statistical test).

(B) GS1 and GS2 amounts were determined using WT seedlings, TORC1 mutants (*raptor22*, *raptor78*, *lst8*, *yak1* and *yak1x1st8*) and the *gs1.1x1.2x1.3* triple mutant grown on Arabidopsis medium with 5mM KNO₃ and 1% sucrose. Western Blot was performed with a total GS antibody (1:1000), 19 to 35 seedlings per sample. GS1: 42kDa, GS2: 38kDa. Western blot signals were quantified by densitometry.

(C) GS activity in 10 days old WT seedlings and TORC1 mutants (*raptor78*, *lst8* and *yak1x1st8*) grown as above (the results are the means of 6 independent experiments). Red bars represent the mean and black dots represent the median. Stars indicate significant differences compared to WT (non-parametric Mann & Whitney Statistical test, $p < 0.05$).

DISCUSSION

The intricate connections between the availability of nutrients and the regulations of energy-demanding cellular processes such as mRNA translation or cell growth must be tightly and precisely orchestrated. A wealth of studies in animals and yeast have shown that the conserved TOR kinase lies at the heart of these interactions (Efeyan et al., 2015; González and Hall, 2017). Several studies have also demonstrated that in algae and plants TOR activity is strongly influenced by the N status and the supply of amino acids (Mubeen et al., 2018; Cao et al., 2019; O’Leary et al., 2020; Upadhyaya et al., 2020; Liu et al., 2021). The main goal of this study was to better describe and understand the large accumulation of free amino acids frequently observed in both plants and algae after TOR inhibition (see Ingargiola et al., 2020 and references therein).

The first objective was to determine the effect of different nutrients and N sources on TOR activity in Arabidopsis. To estimate TOR activity, we used as a proxy the phosphorylation of RPS6 on Ser240 (Dobrenel et al., 2016b). We confirm that, as previously observed, sucrose is a very potent inducer of TOR activity in Arabidopsis (Xiong et al., 2013; Dobrenel et al., 2016b). However, both N and C supplies seem to be required for TOR activation (Figure 1). This result is in line with the previous observations that both sugar and nitrate are necessary to coordinate the synthesis of the translational machinery, which is largely TOR-dependent (Dobrenel et al., 2016b; Scarpin et al. 2020), and that mRNA translation is highly sensitive to the C/N status of the plant (Gutiérrez et al., 2007). Ammonium and Gln were also found to activate TOR in sugar starved Arabidopsis seedlings re-supplied with sucrose (Supplemental Figure S1). The induction of TOR activity by Gln was already recently described in several reports (for example O’Leary et al., 2020; Liu et al., 2021).

We focused our study on the accumulation of Gln, which is by far the most affected amino acid after TOR inhibition (Moreau et al., 2012; Ren et al., 2012; Caldana et al., 2013; Salem et al., 2018; Forzani et al., 2019). Indeed, Gln concentration increased by more than 50 times in *lst8* mutants (Figure 4). However, this concerns only free Gln and not total proteins in the plants which decrease upon TOR inhibition (Deprost et al., 2007). This Gln accumulation could be due to (at least) three mechanisms which are (i) an increase in glutamine biosynthesis from ammonium by GS, (ii) a decrease in the use of Gln for protein or amino acid synthesis by transaminases like GOGAT and/or (iii) an increase in protein degradation and recycling phenomena. For the latter explanation, it is indeed known that TOR inhibition triggers autophagic processes leading to protein degradation within the vacuole (Liu and Bassham, 2010). Similarly, TOR inhibition decreases mRNA translation and thus the use of free amino acids (Deprost et al., 2007). Nevertheless, these processes are slow and Gln is accumulated very rapidly after TOR inhibition (Mubeen et al., 2018). Moreover, one would expect an accumulation of all amino acids and Gln is predominantly accumulated. Most amino acids derive, directly or indirectly, from Gln by transamination reactions and would probably not accumulate if the use of Gln is diminished. This probably rules out the second hypothesis for Gln accumulation.

The report by Mubeen et al. (2018) showing that ¹⁵N incorporation into amino acids was higher in cells treated by rapamycin supports the assumption that a higher N assimilation is the cause for the build-up of Gln. The authors also found that ammonium uptake was higher after TOR inhibition by rapamycin. The fact that Gln is also the amino acid which is used for transport between organs in Arabidopsis could also explain the fact that it is accumulated to higher extend than other amino acids (Dinkeloo et al., 2018). To further explore this hypothesis of

deregulation of Gln synthesis, we first determined the impact of TOR inhibition on nitrate and ammonium transport using ^{15}N labelling. Surprisingly, nitrate uptake was not significantly affected by TOR inhibition, although its LATS component was reduced by AZD-8055 treatment (Supplemental Figure S2). Conversely, the low affinity/high-capacity transport system of ammonium ions was decreased after either pharmacological or genetic inhibition of TOR (Figure 2). AMT transporters are involved in the HATS component of ammonium transport (Liu and von Wirén, 2017) and it has been suggested earlier that the LATS ammonium transport might occur via the potassium channel (Wang et al., 1994). Interestingly, it was shown recently that inhibition of TOR reduces potassium uptake in Arabidopsis (Deng et al., 2020). In yeast, TOR regulates potassium homeostasis through the control of the plasma membrane (H^+)-ATPase (Mahmoud et al., 2017). This decrease in low affinity ammonium uptake was also observed after long term TOR inhibition (Supplemental Figure S2). Conversely, ammonium concentration increased in the same conditions either after pharmacological or genetic inhibition of TOR (Figure 4A). A similar build-up of ammonium was detected in Chlamydomonas treated with rapamycin (Mubeen et al., 2018). In yeast, TOR inhibition results in the up-regulation of the NPR1 kinase activity and in the subsequent phosphorylation and activation of the MEP2 ammonium transporter (Boeckstaens et al., 2014). But yeast uses ammonium as a poor N source and activates its transport and assimilation in N starved conditions. Interestingly, the tonoplast-localized receptor-like kinase CAP1, mutation of which results in higher ammonium concentrations in the cytosol and lower uptake through the tonoplast, complemented the yeast *npr1* mutants, thus suggesting that TOR may control ammonium homeostasis in plants through CAP1 (Bai et al., 2014). The fact that TOR-inhibited plants accumulate ammonium and Gln whereas uptake is reduced could suggest that ammonium originates from another source than from the growth medium. It could for example be envisaged that TOR inhibition stimulates the photorespiratory pathway thereby increasing ammonium production by Gly oxidation in mitochondria. Indeed, a large proportion of ammonium is coming from photorespiration in C3 plants like Arabidopsis.

A recent screen for ammonium-insensitive Arabidopsis mutants identified the GS2 gene as a causal mutation and the authors suggested that higher GS2 activity in high ammonium conditions produced more H^+ and resulted in an acid stress response inhibiting growth (Hachiya et al., 2021). This could be also the case after TOR inhibition in Arabidopsis since Gln is accumulating in a GS-dependent manner (Figure 4). Furthermore, in yeast rapamycin treatment has been shown to inhibit the plasma membrane (H^+)-ATPase (Mahmoud et al., 2017). If this inhibition of H^+ efflux also happens in plants, it would further contribute to cytosol acidification and growth reduction. Coherently, we discovered that inhibition of total GS activity by the herbicide Glufosinate (GA) drastically reduced Gln and other amino acids accumulation (Figure 4). This result shows that Gln is originating from ammonium assimilation by GS. Since GA inhibits both cytosolic GS1 and chloroplastic GS2, we cannot conclude on the specific contribution of GS isoforms on Gln accumulation (Takano and Dayan, 2020). GA is very specific for GS and competes with Glu for the active site. GA is phosphorylated by GS into phospho-L-phosphinothricin, but ammonium cannot be later incorporated to produce Gln. This leads to an irreversible inactivation of GS and to a strong reduction in the overall enzyme activity since GA is readily translocated within the plant (Takano and Dayan, 2020). Therefore, the reduction in Gln accumulation is probably the cause for the growth improvement observed in TORC1 mutants treated with GA, whereas growth of WT plants was hampered by this herbicide as expected (Figure 5). However, *lst8* mutants and AZD-treated WT seedlings displayed a marked reduction in ammonium accumulation after treatment with GA whereas

ammonium levels increased in treated control plants (Figure 4). Indeed, the action of GA as herbicide is thought to be through ammonium accumulation resulting from the impairment of GS activity but other cellular processes such as photorespiration could be affected and it has been shown that GA increases the cellular pool of Leu and Val which are known inducers of TOR activity in plants (Wendler et al., 1990; Cao et al., 2019).

We also showed that TORC1 mutants were hypersensitive to high concentrations of Gln in the growth medium compared to WT seedlings, growth of which was also affected for concentrations above 5 mM (Figure 2). In consequence, it is probably both ammonium buildup and assimilation in addition to Gln accumulation which are toxic when TOR activity is reduced. However, at this point it is difficult to conclude that Gln *per se*, or a molecule derived from Gln, is the cause of the growth reduction in TOR-limited plants. For example, Arg is synthesized from Gln and Glu and is catabolized into agmatine which then serves as a precursor for the synthesis of putrescine, a precursor for longer polyamines like spermidine and spermine. In *Arabidopsis* it seems that most putrescine is synthesized from Arg unlike other plants where ornithine is the precursor molecule (Hanfrey et al., 2001). While Arg levels are only modestly increased by TOR inhibition, the levels of both agmatine and putrescine were highly augmented (Supplemental Figure S3). High levels of putrescine have been shown to inhibit growth but putrescine and agmatine amounted to 100 times less than Gln in TOR-inhibited plants (Fuell et al., 2010). Very recently, it was suggested that TOR activity regulates polyamine metabolism and degradation by controlling the translation of the involved enzymes (Salazar-Diaz et al., 2021). Similarly, Salem et al. (2018) have also measured increased levels of Gln, agmatine, and putrescine in *Arabidopsis raptor* mutants.

We have also observed in ammonium-fed *lst8* mutants or in plants treated with AZD-8055 an increase in the mRNA level of enzymes involved in nitrate assimilation as well as of the AMT ammonium transporters (Figure 6). It was shown earlier that excess Gln repress the expression of the *Amt1;1* transporter but, conversely, we observed an increase in its expression in ammonium-grown *lst8* mutants or no changes (Rawat et al., 1999). On the contrary, the *Nii* and *Nia* genes showed the expected repression by the increased Gln levels (Vincentz et al., 1993). While GS1 and GS2 mRNA and protein levels generally increased, total GS activity was found to decrease following pharmacological or genetic inhibition of TOR (Figure 6). This suggests that the higher Gln accumulation could trigger, by a feedback mechanism, a lower GS activity, as well as lower ammonium uptake and concomitantly an increase in GS expression to compensate for this decrease of enzymatic activity. The fact the decrease in GS activity is proportional to Gln levels (i.e. respectively lower and higher for *lst8* mutants) would support this hypothesis. Alternatively, GS could be activated by TOR through a direct or indirect phosphorylation. Indeed, it is known that GS can be regulated by phosphorylation (Ji et al., 2019). Accordingly, the GOGAT enzyme was found to be phosphorylated in a TOR-dependent manner (van Leene et al., 2019). However, rapamycin treatment of *Chlamydomonas* cells resulted in higher GS activity (Mubeen et al., 2018). These differences may reflect the different ways of life between an unicellular alga for which excess Gln can be easily excreted into the surrounding water and a pluricellular land plant.

CONCLUSION

Our data reveal that the Gln and amino acid accumulation caused by TOR inhibition is suppressed by genetic or pharmacological inhibition of GS activity. Furthermore, GS inhibitor

such as the herbicide GA clearly improves the growth of TORC1 mutants. The study of N fluxes within the plant with heavy isotope tracer will be required to obtain a more complete view of the metabolic perturbations responsible for the effect of TOR and/or GS inhibition on metabolism and growth of plants.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

In this study, we used *Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia 8 as wild-type. The *lst8* mutant (noted *lst8-1*, At3g18140, SALK_02459) was obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC). The *raptor* mutants (At3g08850) noted *raptor78* (SALK_078159) and *raptor22* (SALK_022096) were obtained from the NASC or the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC). The *yak1* and *yak1xlst8* double mutant were previously describes (Forzani et al., 2019). The triple *gs1.1x1.2x1.3* mutant was kindly provided by Dr. Céline Masclaux-Daubresse. This mutant was previously described in Moison et al., 2018.

Plant Growth Conditions

Seedlings were grown *in vitro* on vertical plates containing Arabidopsis medium with 5mM KNO₃, 1% sucrose, 2.5mM KH₂PO₄, 2mM MgSO₄, 1mM CaCl₂, 0.05% 2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid sodium salt (MES), 1X microelements (Moreau et al., 2012), 5mM Iron Ammoniacal Citrate and 0.5% Phytigel. The seeds were stratified at 4°C for 2 days and then transferred in controlled growth chambers at 21°C with a photoperiod of 16h light/8h night. For phenotypic analysis, root length was measured with the NeuronJ plugin in the ImageJ software.

Protein extraction, Western Blot Analysis and TOR activity measurements

For TOR activity measurements, 5 days old seedlings were grown on solid Arabidopsis medium (1mM KNO₃ and 0,3% sucrose) and then transferred for 24h starvation in liquid Arabidopsis media either only without sucrose, or without sucrose and nitrate. For sucrose starved seedlings, medium supplemented with 1% Sucrose (+Suc) was then added for 5h with or without 1μM AZD-8055 (Sellekchem). For sucrose and nitrogen starved seedlings, media supplemented with +/- 1% sucrose (+/- Suc) +/- 5mM KNO₃ (+/-N) were added. The level of RPS6 phosphorylation was used as a readout of TOR activity. Total proteins were extracted from whole seedlings using 1X Laemmli Buffer (50mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10% Glycerol, 0.0025% bromophenol blue) and 400mM DTT. Protein extracts were heated 5 min at 95°C and then centrifuged to removed cell debris. Protein concentrations were determined using Bradford reagent (Bio-Rad) at 595nm. An equal amount of proteins (25μg for TOR activity measurement, 28μg for GS protein levels) were loaded in 12% acrylamide resolving SDS-PAGE gel and separated by migration for 1h at 150V and 2A. Proteins were then transferred on PVDF membranes following the Trans-Blot®Turbo™ Blotting System protocol. Membranes were blocked with 5% milk-PBS solution (13.7mM NaCl, 0.27mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 0.2mM KH₂PO₄) and 0,05% Tween20. Then, membranes were incubated with rabbit primary antibodies directed against either total RPS6, or P-RPS6 (for both dilution 1:5000) as described in Dobrenel et al. (2016b), or with anti-GS antibodies (dilution 1/1000) (Lothier et al., 2011). Goat anti-rabbit IgG-HRP (Sigma) was used as secondary antibody (dilution 1/5000). Immunodetection was performed using the Clarity Western ECL detection kit (Bio-Rad). The

equal transfer of proteins on the membrane was evaluated by Ponceau Staining. P-RPS6/RPS6 ratio and GS protein levels were quantified with the ImageJ software.

¹⁵N Uptake Analysis

Ten days old seedlings were pre-treated in 1mM KNO₃ +/- AZD 2μM for 2h (Supplemental Figure S2A) and were after washed 1 min in 0.1mM CaSO₄ solution, treated 5 min in liquid Arabidopsis media containing as N source 0.2mM (for HATS) or 5mM (for LATS) K¹⁵NO₃ or (¹⁵NH₄)₂SO₄ (99% labelling). Afterwards the seedlings were washed again 1 min in the CaSO₄ solution. After 48h in oven (70°C), ¹⁵N uptake was determined by isotope ratio mass spectrometry from 0.6 to 1mg of dry matter. The uptake was then calculated as :

$$\text{Uptake } (\mu\text{molN/gMS/h}) = \%N \times (10000/14) \times ((\text{At}\%^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{sample}} - \text{At}\%^{15}\text{N}/^{14}\text{N}_{\text{natural}}) / 99\%) \times (60(\text{min}) / ^{15}\text{N incubation time})$$

Metabolomic Analysis

For metabolomic analysis and ammonium measurements, 5 days old seedlings were transferred for 7 days on new media with DMSO as a control, 0,25μM AZD-8055, 2mg/L glufosinate ammonium (Sigma) or 0,25μM AZD-8055 + 2mg/L glufosinate ammonium. Glutamine and metabolites levels were determined by GC-MS on *in vitro* grown whole seedlings. For details on sample preparations, metabolite quantifications and analyses see Forzani et al. (2019).

Ammonium measurement

For ammonium measurements, 500μL of 80% ethanol was added to 100mg of fresh material then incubated 1hr at 4°C, and centrifuged at 15000 rpm (4°C for 15 min). Supernatants were collected and conserved for the analysis. Two 80% ethanol extraction were further performed (500μL then 250μL), followed by a 50% ethanol extraction and then water extraction (250μL). 2mM NH₄Cl solution was used for building a reference curve with a range between 0 and 200nmol. Ammonium was then measured as described by Moison et al. (2018).

RNA extraction and quantitative RT-PCR

Total RNAs were extracted from 10 days whole seedlings (around 50mg of fresh material) using the Trizol® reagent method. Total RNA (1μg) was used for DNase I Thermo Scientific treatment and RT reaction using RevertAid H Minus RT Thermo Scientific. The quantitative RT-PCR was performed using pink Sybr from Biorad. The expression of the Actin2 gene (AT3G18780) and EF1 gene (AT5G60390) were used as genes reference. The primers used for these analyses are listed in Supplemental Table S1.

Glutamine Synthetase activity measurement

GS activity was evaluated by the measurement of γ-glutamylhydroxamate at 540nm. Enzymes were extracted from whole seedlings (150mg of fresh material) with an extraction buffer containing 10mM Na-EDTA, 10mM MgCL₂ and 250mM pH7,6 Tris-HCl. β-mercaptoethanol (13 microM final concentration) and 4 nM leupeptine were added in this buffer before extraction. Samples were centrifuged at 12 000 rpm for 10 min at 4°C and the supernatants were collected. GS activity was then determined as described previously (Moreau et al., 2012).

Acknowledgements: We wish to thank Dr. Céline Masclaux-Daubresse for providing seeds of the *gs1* triple mutant (*gs1.1x1.2x1.3*) and GS antibodies, Dr. Nicolaus von Wirén for the quadruple *qko* AMT seedlings, Virginie Bréhaut for Nii and Nia primers and Dr. Anne Krapp for the inspiring discussions on N metabolism. We also thank our colleagues of IJPB for discussions and advices.

References

- Adami A, García-Alvarez B, Arias-Palomo E, Barford D, Llorca O** (2007) Structure of TOR and its complex with KOG1. *Mol Cell* **27**: 509-516
- Anderson G, Veit B, Hanson M** (2005) The Arabidopsis AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol* **3**: 12
- Aylett CH, Sauer E, Imseng S, Boehringer D, Hall MN, Ban N, Maier T** (2016) Architecture of human mTOR complex 1. *Science* **351**: 48-52
- Bai L, Ma X, Zhang G, Song S, Zhou Y, Gao L, Miao Y, Song CP** (2014) A Receptor-Like Kinase Mediates Ammonium Homeostasis and Is Important for the Polar Growth of Root Hairs in Arabidopsis. *Plant Cell* **26**: 1497-1511
- Barrada A, Djendli M, Desnos T, Mercier R, Robaglia C, Montané MH, Menand B** (2019) A TOR-YAK1 signaling axis controls cell cycle, meristem activity and plant growth in Arabidopsis. *Development* **146**: 3
- Beck T, Hall MN** (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692
- Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL** (1992) Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. *Plant Physiol* **99**: 1294-1301
- Boeckstaens M, Llinares E, Van Vooren P, Marini AM** (2014) The TORC1 effector kinase Npr1 fine tunes the inherent activity of the Mep2 ammonium transport protein. *Nat Commun* **5**: 3101
- Brunkard JO** (2020) Exaptive Evolution of Target of Rapamycin Signaling in Multicellular Eukaryotes. *Dev Cell* **54**: 142-155
- Caldana C, Li Y, Leisse A, Zhang Y, Bartholomaeus L, Fernie AR, Willmitzer L, Giavalisco P** (2013) Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **73**: 897-909
- Cao P, Kim SJ, Xing A, Schenck CA, Liu L, Jiang N, Wang J, Last RL, Brandizzi F** (2019) Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in. *Elife* **8**
- Coschigano KT, Melo-Oliveira R, Lim J, Coruzzi GM** (1998) Arabidopsis *gls* mutants and distinct Fd-GOGAT genes. Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell* **10**: 741-752
- Crespo JL, Powers T, Fowler B, Hall MN** (2002) The TOR-controlled transcription activators GLN3, RTG1, and RTG3 are regulated in response to intracellular levels of glutamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6784-6789
- Deng K, Wang W, Feng L, Yin H, Xiong F, Ren M** (2020) Target of rapamycin regulates potassium

- uptake in Arabidopsis and potato. *Plant Physiol Biochem* **155**: 357-366
- Deprost D, Truong H, Robaglia C, Meyer C** (2005) An Arabidopsis homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem Biophys Res Commun* **326**: 844-850
- Deprost D, Yao L, Sormani R, Moreau M, Leterreux G, Nicolai M, Bedu M, Robaglia C, Meyer C** (2007) The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep* **8**: 864-870
- Dinkeloo K, Boyd S, Pilot G** (2018) Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. *Semin Cell Dev Biol* **74**: 105-113
- Dobrenel T, Caldana C, Hanson J, Robaglia C, Vincentz M, Veit B, Meyer C** (2016) TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annu Rev Plant Biol* **67**: 261-285
- Dobrenel T, Mancera-Martínez E, Forzani C, Azzopardi M, Davanture M, Moreau M, Schepetilnikov M, Chicher J, Langella O, Zivy M, Robaglia C, Ryabova LA, Hanson J, Meyer C** (2016) The Arabidopsis TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6. *Front Plant Sci* **7**: 1611
- Díaz-Troya S, Pérez-Pérez ME, Pérez-Martín M, Moes S, Jenó P, Florencio FJ, Crespo JL** (2011) Inhibition of protein synthesis by TOR inactivation revealed a conserved regulatory mechanism of the BiP chaperone in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol* **157**: 730-741
- Efeyan A, Comb WC, Sabatini DM** (2015) Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* **517**: 302-310
- Fichtner F, Dissanayake IM, Lacombe B, Barbier F** (2021) Sugar and Nitrate Sensing: A Multi-Billion-Year Story. *Trends Plant Sci* **26**: 352-374
- Forzani C, Duarte GT, Van Leene J, Clément G, Huguet S, Paysant-Le-Roux C, Mercier R, De Jaeger G, Leprince AS, Meyer C** (2019) Mutations of the AtYAK1 Kinase Suppress TOR Deficiency in Arabidopsis. *Cell Rep* **27**: 3696-3708
- Fuell C, Elliott KA, Hanfrey CC, Franceschetti M, Michael AJ** (2010) Polyamine biosynthetic diversity in plants and algae. *Plant Physiol Biochem* **48**: 513-520
- González A, Hall MN** (2017) Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *EMBO J* **36**: 397-408
- Guan M, de Bang TC, Pedersen C, Schjoerring JK** (2016) Cytosolic Glutamine Synthetase Gln1;2 Is the Main Isozyme Contributing to GS1 Activity and Can Be Up-Regulated to Relieve Ammonium Toxicity. *Plant Physiol* **171**: 1921-1933
- Gutiérrez RA, Lejay LV, Dean A, Chiaromonte F, Shasha DE, Coruzzi GM** (2007) Qualitative network models and genome-wide expression data define carbon/nitrogen-responsive molecular machines in Arabidopsis. *Genome Biol* **8**: R7
- Hachiya T, Inaba J, Wakazaki M, Sato M, Toyooka K, Miyagi A, Kawai-Yamada M, Sugiura D, Nakagawa T, Kiba T, Gojon A, Sakakibara H** (2021) Excessive ammonium assimilation by plastidic glutamine synthetase causes ammonium toxicity in Arabidopsis thaliana. *Nat Commun* **12**: 4944
- Hanfrey C, Sommer S, Mayer MJ, Burtin D, Michael AJ** (2001) Arabidopsis polyamine biosynthesis: absence of ornithine decarboxylase and the mechanism of arginine decarboxylase activity. *Plant J* **27**: 551-560

- Hao DL, Zhou JY, Yang SY, Qi W, Yang KJ, Su YH** (2020) Function and Regulation of Ammonium Transporters in Plants. *Int J Mol Sci* **21**
- Ingargiola C, Turqueto Duarte G, Robaglia C, Leprince AS, Meyer C** (2020) The Plant Target of Rapamycin: A Conduc TOR of Nutrition and Metabolism in Photosynthetic Organisms. *Genes (Basel)* **11**: 1285
- Ji Y, Li Q, Liu G, Selvaraj G, Zheng Z, Zou J, Wei Y** (2019) Roles of Cytosolic Glutamine Synthetases in Arabidopsis Development and Stress Responses. *Plant Cell Physiol* **60**: 657-671
- Kiba T, Krapp A** (2016) Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture. *Plant Cell Physiol* **57**: 707-714
- Krapp A** (2015) Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Curr Opin Plant Biol* **25**: 115-122
- Lee P, Cho BR, Joo HS, Hahn JS** (2008) Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol Microbiol* **70**: 882-895
- Li B, Li G, Kronzucker HJ, Baluška F, Shi W** (2014) Ammonium stress in Arabidopsis: signaling, genetic loci, and physiological targets. *Trends Plant Sci* **19**: 107-114
- Liu GY, Sabatini DM** (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**: 183-203
- Liu Y, Bassham D** (2010) TOR is a negative regulator of autophagy in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **5**: e11883
- Liu Y, Duan X, Zhao X, Ding W, Wang Y, Xiong Y** (2021) Diverse nitrogen signals activate convergent ROP2-TOR signaling in Arabidopsis. *Dev Cell* **56**: 1283-1295
- Liu Y, von Wirén N** (2017) Ammonium as a signal for physiological and morphological responses in plants. *J Exp Bot* **68**: 2581-2592
- Logusch EW, Walker DM, McDonald JF, Franz JE, Villafranca JJ, DiIanni CL, Colanduoni JA, Li B, Schineller JB** (1990) Inhibition of Escherichia coli glutamine synthetase by alpha- and gamma-substituted phosphinothricins. *Biochemistry* **29**: 366-372
- Lothier J, Gaufichon L, Sormani R, Lemaître T, Azzopardi M, Morin H, Chardon F, Reisdorf-Cren M, Avice JC, Masclaux-Daubresse C** (2011) The cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 plays a role in the control of plant growth and ammonium homeostasis in Arabidopsis rosettes when nitrate supply is not limiting. *J Exp Bot* **62**: 1375-1390
- Ludewig U, Neuhäuser B, Dynowski M** (2007) Molecular mechanisms of ammonium transport and accumulation in plants. *FEBS Lett* **581**: 2301-2308
- Maegawa K, Takii R, Ushimaru T, Kozaki A** (2015) Evolutionary conservation of TORC1 components, TOR, Raptor, and LST8, between rice and yeast. *Mol Genet Genomics* **290**: 2019-2030
- Mahfouz MM, Kim S, Delauney AJ, Verma DP** (2006) Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* **18**: 477-490
- Mahmoud S, Planes MD, Cabedo M, Trujillo C, Rienzo A, Caballero-Molada M, Sharma SC, Montesinos C, Mulet JM, Serrano R** (2017) TOR complex 1 regulates the yeast plasma membrane proton pump and pH and potassium homeostasis. *FEBS Lett* **591**: 1993-2002

- Martinez-Outschoorn UE, Peiris-Pagés M, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP** (2017) Cancer metabolism: a therapeutic perspective. *Nat Rev Clin Oncol* **14**: 113
- Menand B, Desnos T, Nussaume L, Berger F, Bouchez D, Meyer C, Robaglia C** (2002) Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 6422-6427
- Meng D, Yang Q, Wang H, Melick CH, Navlani R, Frank AR, Jewell JL** (2020) Glutamine and asparagine activate mTORC1 independently of Rag GTPases. *J Biol Chem* **295**: 2890-2899
- Moison M, Marmagne A, Dinant S, Soulay F, Azzopardi M, Lothier J, Citerne S, Morin H, Legay N, Chardon F, Avice JC, Reisdorf-Cren M, Masclaux-Daubresse C** (2018) Three cytosolic glutamine synthetase isoforms localized in different-order veins act together for N remobilization and seed filling in Arabidopsis. *J Exp Bot* **69**: 4379-4393
- Montané MH, Menand B** (2013) ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J Exp Bot* **64**: 4361-4374
- Moreau M, Azzopardi M, Clément G, Dobrenel T, Marchive C, Renne C, Martin-Magniette ML, Taconnat L, Renou JP, Robaglia C, Meyer C** (2012) Mutations in the Arabidopsis homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell* **24**: 463-481
- Mubeen U, Jüppner J, Alpers J, Hincha DK, Giavalisco P** (2018) Target of Rapamycin Inhibition in. *Plant Cell* **30**: 2240-2254
- Nukarinen E, Nägele T, Pedrotti L, Wurzinger B, Mair A, Landgraf R, Börnke F, Hanson J, Teige M, Baena-Gonzalez E, Dröge-Laser W, Weckwerth W** (2016) Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Sci. Rep.* **6**, 31697
- O'Brien J A, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi G, Gutiérrez RA** (2016) Nitrate transport, sensing and responses in plants. *Molecular Plant* **9**: 837-856
- O'Leary BM, Oh GGK, Lee CP, Millar AH** (2020) Metabolite Regulatory Interactions Control Plant Respiratory Metabolism via Target of Rapamycin (TOR) Kinase Activation. *Plant Cell* **32**: 666-682
- Pérez-Pérez ME, Couso I, Crespo JL** (2017) The TOR Signaling Network in the Model Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biomolecules* **7**
- Rawat SR, Silim SN, Kronzucker HJ, Siddiqi MY, Glass AD** (1999) AtAMT1 gene expression and NH₄⁺ uptake in roots of Arabidopsis thaliana: evidence for regulation by root glutamine levels. *Plant J* **19**: 143-152
- Ren M, Venglat P, Qiu S, Feng L, Cao Y, Wang E, Xiang D, Wang J, Alexander D, Chalivendra S, Logan D, Mattoo A, Selvaraj G, Datla R** (2012) Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *Plant Cell* **24**: 4850-4874
- Salazar-Díaz K, Dong Y, Papdi C, Ferruzca-Rubio EM, Olea-Badillo G, Ryabova LA, Dinkova TD** (2021) TOR senses and regulates spermidine metabolism during seedling establishment and growth in maize and Arabidopsis. *iScience* **24**: 103260
- Salem MA, Li Y, Bajdzienko K, Fisahn J, Watanabe M, Hoefgen R, Schöttler MA, Giavalisco P** (2018) RAPTOR Controls Developmental Growth Transitions by Altering the Hormonal and Metabolic Balance. *Plant Physiol* **177**: 565-593

- Scarpin MR, Leiboff S, Brunkard JO** (2020) Parallel global profiling of plant TOR dynamics reveals a conserved role for LARP1 in translation. *Elife* **9**
- Schaufelberger M, Galbier F, Herger A, de Brito Francisco R, Roffler S, Clement G, Diet A, Hörtensteiner S, Wicker T, Ringli C** (2019) Mutations in the Arabidopsis ROL17/isopropylmalate synthase 1 locus alter amino acid content, modify the TOR network, and suppress the root hair cell development mutant *lrx1*. *J Exp Bot* **70**: 2313-2323
- Schepetilnikov M, Makarian J, Srouf O, Geldreich A, Yang Z, Chicher J, Hammann P, Ryabova LA** (2017) GTPase ROP2 binds and promotes activation of target of rapamycin, TOR, in response to auxin. *EMBO J* **36**: 886-903
- Soto-Burgos J, Bassham DC** (2017) SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **12**: e0182591
- Stracka D, Jozefczuk S, Rudroff F, Sauer U, Hall MN** (2014) Nitrogen source activates TOR (target of rapamycin) complex 1 via glutamine and independently of Gtr/Rag proteins. *J Biol Chem* **289**: 25010-25020
- Takahashi T** (2020) Plant Polyamines. *Plants* **2020**, *9*, 511
- Takano HK, Dayan FE** (2020) Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. *Pest Manag Sci* **76**: 3911-3925
- Tanigawa M, Maeda T** (2017) An In Vitro TORC1 Kinase Assay That Recapitulates the Gtr-Independent Glutamine-Responsive TORC1 Activation Mechanism on Yeast Vacuoles. *Mol Biol Cell* **37**: 21
- Tate JJ, Rai R, De Virgilio C, Cooper TG** (2021) N- and C-terminal Gln3-Tor1 interaction sites: one acting negatively and the other positively to regulate nuclear Gln3 localization. *Genetics* **217**: 4
- Upadhyaya S, Agrawal S, Gorakshakar A, Rao BJ** (2020) TOR kinase activity in *Chlamydomonas reinhardtii* is modulated by cellular metabolic states. *FEBS Lett* **594**: 3122-3141
- Van Leene J, Han C, Gadeyne A, Eeckhout D, Matthijs C, Cannoot B, De Winne N, Persiau G, Van De Slijke E, Van de Cotte B, Stes E, Van Bel M, Storme V, Impens F, Gevaert K, Vandepoele K, De Smet I, De Jaeger G** (2019) Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nat Plants* **5**: 316-327
- Vidal EA, Alvarez JM, Araus V, Riveras E, Brooks MD, Krouk G, Ruffel S, Lejay L, Crawford NM, Coruzzi GM, Gutiérrez RA** (2020) Nitrate in 2020: Thirty Years from Transport to Signaling Networks. *Plant Cell* **32**: 2094-2119
- Villar VH, Merhi F, Djavaheri-Mergny M, Durán RV** (2015) Glutaminolysis and autophagy in cancer. *Autophagy* **11**: 1198-1208
- von Wirén N, Gazzarrini S, Gojon A, Frommer WB** (2000) The molecular physiology of ammonium uptake and retrieval. *Curr Opin Plant Biol* **3**: 254-261
- Vincentz M, Moureaux T, Leydecker MT, Vaucheret H, Caboche M** (1993) Regulation of nitrate and nitrite reductase expression in *Nicotiana plumbaginifolia* leaves by nitrogen and carbon metabolites. *Plant J* **3**: 315-324
- Wang MY, Glass A, Shaff JE, Kochian LV** (1994) Ammonium Uptake by Rice Roots (III. Electrophysiology). *Plant Physiol* **104**: 899-906

- Wendler C, Barniske M, Wild A** (1990) Effect of phosphinothricin (glufosinate) on photosynthesis and photorespiration of C3 and C 4 plants. *Photosynth Res* **24**: 55-61
- Wullschleger S, Loewith R, Hall MN** (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**: 471-484
- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J** (2013) Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* **496**: 181-186
- Yuan L, Sheng X, Willson AK, Roque DR, Stine JE, Guo H, Jones HM, Zhou C, Bae-Jump VL** (2015) Glutamine promotes ovarian cancer cell proliferation through the mTOR/S6 pathway. *Endocr Relat Cancer* **22**: 577-591

Supplemental Data:

FigS1: Other sources of N, such as Gln or ammonium, allow full activation of TOR by sucrose

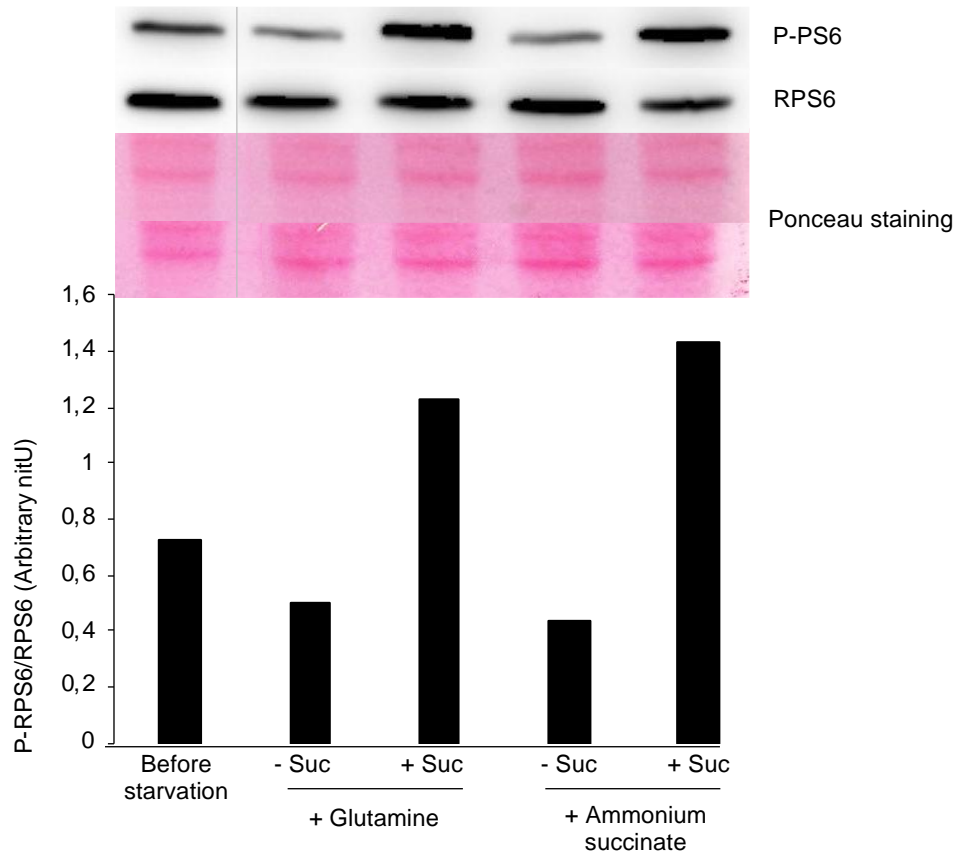
FigS2: ¹⁵N influx experiments

FigS3: Metabolite levels are affected by TOR inhibition

FigS4: Root growth of the triple *gs1* mutant is hypersensitive to Glufosinate ammonium (GA) compared to the WT

FigS5: Root growth of GS and ammonium transporters (AMT) mutants is less sensitive to TOR inhibition.

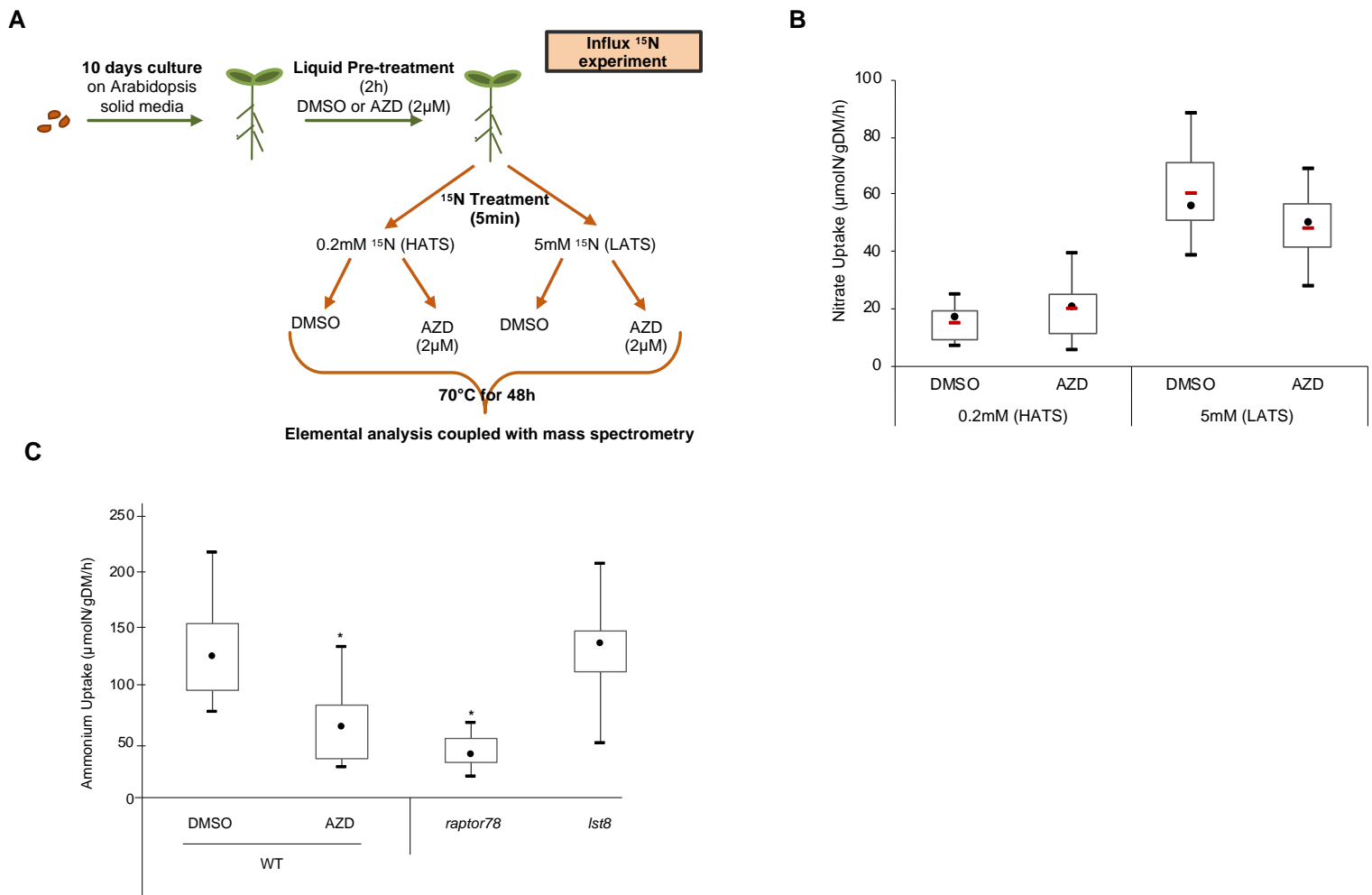
FigS6: List of the primers used in Figure 6



Supplemental Figure S1: Other sources of N, such as Gln or ammonium, allow full activation of TOR by sucrose.

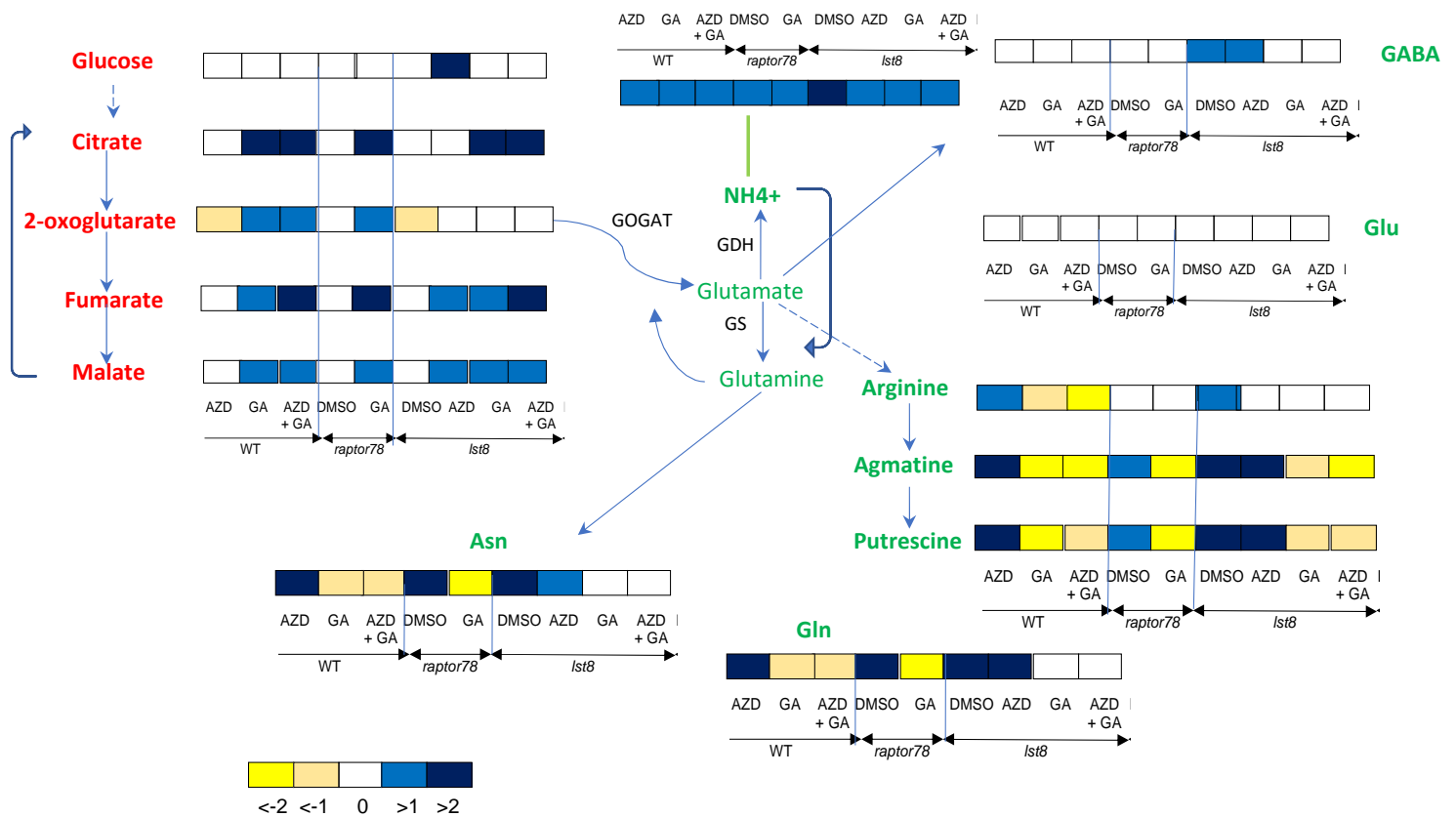
Five days old seedlings were grown on solid *Arabidopsis* medium (1mM KNO_3 and 0.3% sucrose) then transferred for 24h starvation in liquid *Arabidopsis* media without sucrose. 1% Sucrose (+/- Suc) was then added for 5h in *Arabidopsis* media with either 5mM glutamine or ammonium succinate as N sources. The same KCl concentration was maintained under the different conditions tested. Twenty eight μ g of total proteins extracted from around 30 seedlings were loaded for each sample and were used for western blot analysis. Membrane were incubated with phospho-specific antibodies against ribosomal protein S6 (P-RPS6) Ser240 or against total RPS6. Western blots were revealed using Goat anti-rabbit IgG-HRP as secondary antibody.

Exposition time: 3 minutes for P-RPS6, 20 sec for RPS6.



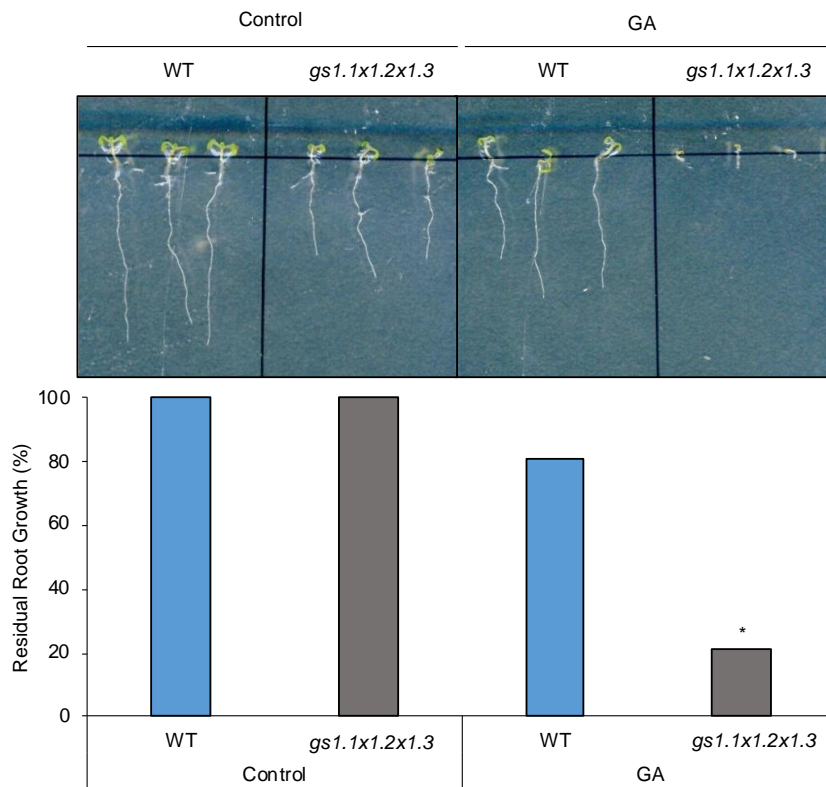
Supplemental Figure S2: ^{15}N influx experiments.

- (A) Experimental design for ^{15}N influx experiments. Seedlings were grown on solid Arabidopsis medium for 10 days (5mM KNO_3 , 1% sucrose) and, for each conditions, around 5 seedlings were first transferred for 2h to 4mL of liquid medium for a pre-treatment with 1mM KNO_3 +/- $2\mu\text{M AZD-8055}$. After washing for 1min with 0.1mM CaSO_4 solution, the seedlings were incubated for 5min with ^{15}N (K^{15}NO_3 or $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), +/- $2\mu\text{M AZD-8055}$ at either 0.2mM or 5mM ^{15}N to determine, respectively, High Affinity Transport System (HATS) or Low Affinity Transport System (LATS). Seedlings were again washed in the CaSO_4 solution and dried for 48h at 70°C . ^{15}N amounts were determined by isotope ratio mass spectrometry.
- (B) Inactivation of TOR has no impact on HATS and LATS dependent nitrate uptake. $n= 19$ or 20 per condition. DMSO are the control vehicle conditions. There were no statistically significant differences compared to WT DMSO condition (non-parametric Kruskal and Wallis Statistical test, $p<0.05$). gDM: gram dry matter.
- (C) Seedlings were grown on solid Arabidopsis medium for 10 days (5mM KNO_3 , 1% sucrose) with DMSO or $0.25\mu\text{M AZD-8055}$ and then transferred to liquid medium and treated for 5min with $5\text{mM } ^{15}\text{NH}_4$ (LATS component). WT seedlings grown on AZD were treated with $2\mu\text{M AZD-8055}$ during the influx experiment. Pool of 2 experiments, n between 8 to 14 seedlings. Black dots represent the median. Stars indicate statistically significant differences compared to WT DMSO condition (non-parametric Kruskal and Wallis Statistical test, $p<0.05$).



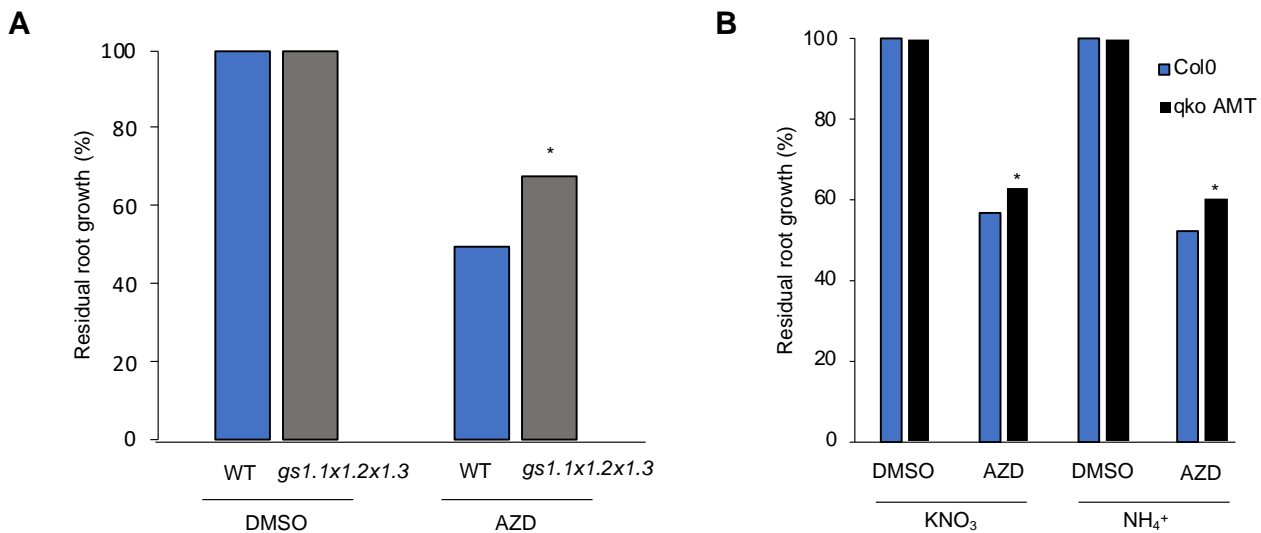
Supplemental Figure S3: Metabolite levels are affected by TOR inhibition.

The amounts of organic and amino acids were determined by GC-MS analysis (see Material and Methods) and are highly affected by pharmacological (AZD-8055) or genetic (*raptor* and *lst8* mutants) TOR inhibition. Seven days old seedlings were grown *in vitro* on *Arabidopsis media* supplemented with 0.3% sucrose under long day conditions. The intensities of the yellow and blue colors indicate, respectively, a decrease and an increase in the metabolite levels compared to WT treated with DMSO (control vehicle conditions). Values indicate log₂ fold change.



Supplemental Figure S4: Root growth of the triple *gs1* mutant is hypersensitive to Glufosinate ammonium (GA) compared to the WT.

*Residual root growth of 9 days old WT and triple *gs1.1x1.2x1.3* mutant seedlings grown on Arabidopsis medium with or without 2mg/L GA (n between 18 and 21 seedlings per condition). Stars indicate a significant effect of GA (Mann and Whitney statistical test, $p < 0.05\%$).*



Supplemental Figure S5: Root growth of GS and ammonium transporters (AMT) mutants is less sensitive to TOR inhibition.

*(A) Five days old WT and *gs1.1x1.2x1.3* triple mutant seedlings were transferred on Arabidopsis media with or without 0.25 μ M AZD-8055.*

Root length was measured 6 days post-transfer (n between 14 and 34 seedlings per condition).

*(B) Five days old WT and AMT quadruple mutant (*qko AMT*) seedlings were transferred on Arabidopsis media in the presence of either 5mM KNO₃ or ammonium succinate (5mM) as N sources, and with or without AZD 0.25 μ M AZD-8055. Root length was measured 8 days post-transfer (n between 13 and 20 seedlings per condition). Stars indicate a statistically significant effect of TOR inhibition (Mann and Whitney statistical test, $p < 0.05\%$).*

Gene	Accession	Forward Primer	Reverse Primer
<i>Actin</i>	AT3G18780	GCCATCCAAGCTGTTCTCTC	CCCTCGTAGATTGGCACAGT
<i>EF1</i>	At5G60390	CTGGAGGTTTTGAGGCGGTA	CAAAGGGTGAAAGCAAGAAGA
<i>AMT1;1</i>	AT4G13510	GGCGTCACTTGTTGCCTTG	GCCGTTGTATGTGCCTGTCT
<i>AMT1;2</i>	AT1G64780	TCGGATTTAACTTGCTTGCC	ATTCTTTCCTTGCGAACAGC
<i>AMT1;3</i>	AT3G24300	GAAGGCCATATGGACTATTTATGGG	CGAGGAGGAGTAGCTGATCGAGG
<i>AMT1;5</i>	AT3G24290	GCGAGGAATGGATTTAGCAGGTCAT	GGCTGGAGGGTTAGGCGCACGAGGT
<i>AMT2;1</i>	AT2G38290	TATGCTCTTTGGGGAGATGG	TGACACCTCTAGCACATGAAC
<i>Nii</i>	AT2G15620	TGCTGATGACGTTCTTCCACTCTGC	CTGAGGGTTGACTCCGAAATAGTCTC
<i>NiA1</i>	AT1G77760	ATCGTCAAAGAAACCGAAGTC	ACGGAGCATGGATGAGTT
<i>NiA2</i>	AT1G37130	GGTTACGCATATTCCGGAG	CATGCACGAACAGCAATC
<i>GLN1;1</i>	AT5G37600	CAACCTTAACCTCTCAGACTCCACT	CAGCTGCAACATCAGGGTTGCTA
<i>GLN1;2</i>	AT1G66200	TAACCTTGACATCTCAGACAACAGT	TCAGCAATAACATCAGGGTTAGCA
<i>GLN1;3</i>	AT3G17820	TAACCTCAACCTCACCGATGCCACC	CTTGGCAACGTCGGGGTGGCTG
<i>GLN2;1</i>	AT5G35630	CCAACATGTCAGATGAGAGTGCC	CCAGGTGCTTGACCGGTACTCG
<i>GLU1</i>	AT5G04140	ATATGCAACGTAGACCGTGCG	ATGAGCCGGATGTTCATACCG
<i>GLU2</i>	At2G41220	ACCAGTGGGACAAACACAGC	TCGGAGGTACAAGTTGCCAG

Supplemental Table S1: List of the primers used in Figure 6.

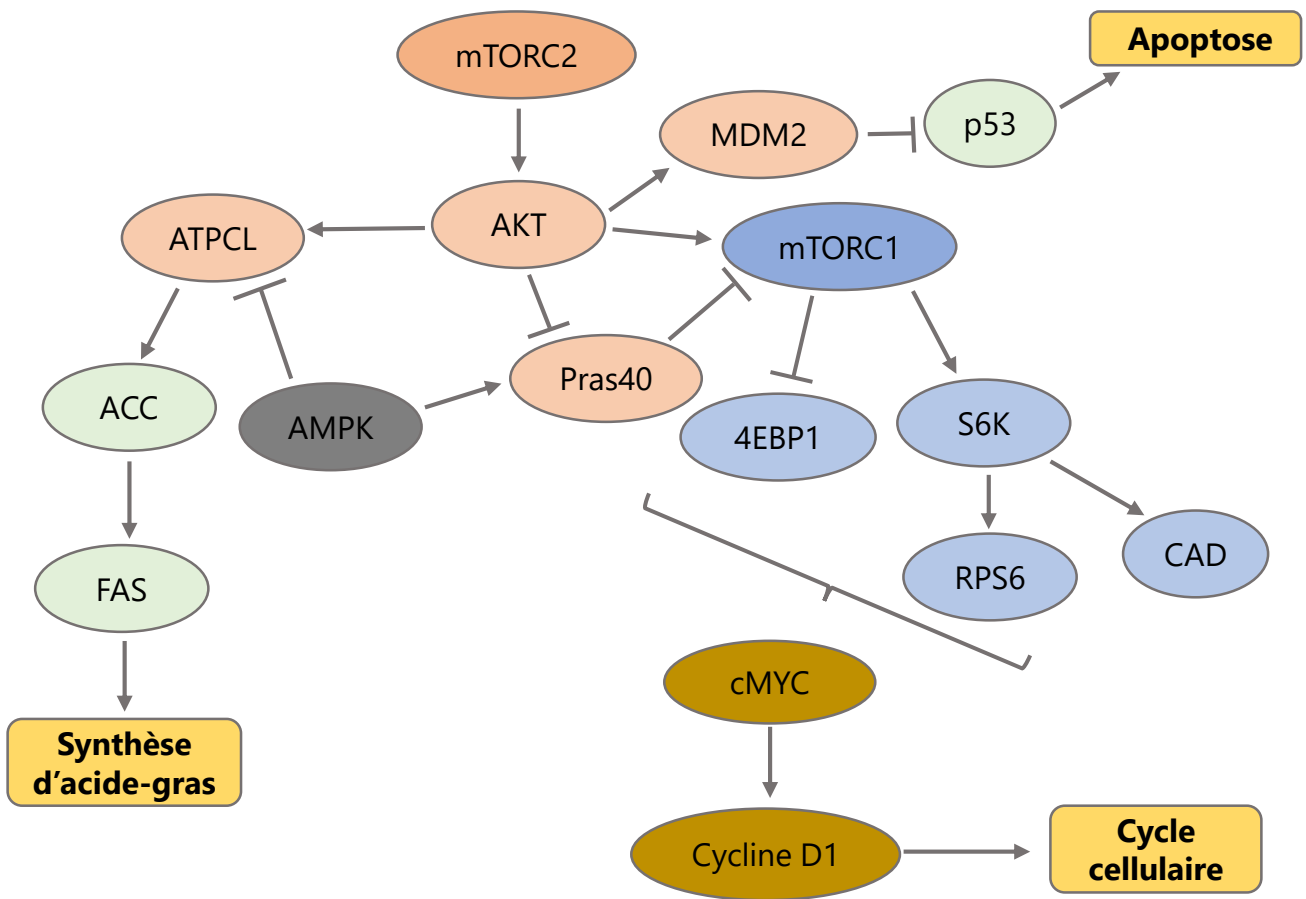
2. Effets de l'inhibition du métabolisme de la glutamine sur les voies mTOR de cellules cancéreuses

Cette étude exploratoire a été menée en collaboration avec l'équipe du Dr G. Panasyuk et le Dr M. Pende, à l'Institut Necker des Enfants Malades (Paris) et porte sur l'application en recherche biomédicale de l'inhibition de la GS par un composé actif d'herbicide, le glufosinate d'ammonium.

Nous avons abordé dans la partie introductive de ce manuscrit le fait que la voie mTORC1 pouvait être suractivée lors de mutation affectant la kinase mTOR ou des acteurs de la voie mTORC1 (DeYoung et al. 2008; Sato et al. 2010; Bar-Peled et al. 2013; Cheng et al. 2015; Okosun et al. 2016; Ho et al. 2017). Cette suractivation est notamment en lien avec l'apparition de cancers. Les cancers correspondent entre autres à des divisions cellulaires accrues, devenues insensibles aux régulations qui tendent normalement à les limiter. Ainsi, ces lignées cellulaires peuvent présenter des levées de l'inhibition de contact, conduisant à une prolifération anarchique et désorganisée des cellules. Les cellules cancéreuses peuvent également éviter le phénomène de mort cellulaire programmée qui, combinée à leur capacité de division plus élevée, les rendent parfois « immortelles ». Ces cellules cancéreuses présentent des modifications métaboliques, notamment l'effet Warburg qui favorise la glycolyse et la fermentation pour produire de l'ATP plutôt que la phosphorylation oxydative, limitant ainsi le stress oxydatif et les phénomènes d'apoptose (pour revues (Bhattacharya et al. 2016; Pascale et al. 2020)). Les tumeurs se trouvent dans un microenvironnement hypoxique (faible O₂) et nous avons vu en introduction que la voie mTORC1 favorise les divisions cellulaires et active les HIFs (Hypoxia-Inducible Factors) (Düvel et al. 2010), qui stimulent notamment la glycolyse (Hu et al. 2003). Enfin, ces cellules peuvent stimuler l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, via des facteurs VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Largo et al. 2020), sécrétés par les cellules cancéreuses ou leurs cellules voisines. Cette angiogenèse permet ainsi l'irrigation et l'apport de nutriments à la tumeur. La glutamine est un acide aminé abondant dans le sang qui peut activer mTOR indépendamment des Rag GTPases (Tanigawa and Maeda 2017). Des études sur des lignées cancéreuses ont démontré une dérégulation du métabolisme de la glutamine avec notamment une stimulation de son prélèvement par les cellules (Csibi et al. 2014; Lampa et al. 2017) et de son catabolisme (Tanaka et al. 2015), permettant la formation d' α -cétoglutarate. Ce composé est lui-même capable d'activer mTOR (revue (González and Hall 2017)), et permet également d'alimenter le cycle TCA, qui serviront à la synthèse d'acides nucléiques, de protéines et de lipides, éléments essentiels à la prolifération des cellules. Ainsi, la présence de glutamine dans le milieu permet de

stimuler la voie mTOR et les divisions cellulaires (Yuan et al. 2015). Dans le premier chapitre de mon manuscrit, j'ai mis en évidence le fait que le complexe TORC1 intervenait dans la régulation de différentes étapes du métabolisme azoté chez *Arabidopsis thaliana*, et notamment au niveau du métabolisme de la glutamine. Chez les mammifères, la voie mTORC1 participe également à la régulation du métabolisme de la glutamine, en favorisant son prélèvement et son catabolisme (Csibi et al. 2014). Ainsi, métabolisme de la glutamine et voie mTORC1 semblent connectés et participent à la prolifération des cellules cancéreuses. La rapamycine et autres rapalogues ont été utilisés pour bloquer la voie mTORC1 et limiter la prolifération de cellules cancéreuses (Eng et al. 1984; Schreiber et al. 2019). Toutefois, en fonction des propriétés pharmacodynamiques de ces inhibiteurs, des phénomènes de résistance peuvent se développer lors des traitements, d'autant plus lorsqu'il s'agit d'une monothérapie. Le métabolisme de la glutamine est également étudié comme une cible thérapeutique. La glutaminase (GLS) est importante pour la prolifération des cellules cancéreuses. Des lignées représentatives du cancer du sein rendues déficientes pour cette enzyme, présentent des perturbations du métabolisme de la glutamine, du cycle TCA et une réduction de la prolifération cellulaire (Lampa et al. 2017). Toutefois, en ciblant la glutaminase (GLS), Davidson et al. ont montré un effet limité sur le développement de tumeur du poumon (Davidson et al. 2016). Les cellules cancéreuses semblent répondre différemment en fonction de leur origine. L'utilisation d'antagoniste de glutamine (DON= 6-diazo-5-oxo-L-norleucine ou composés similaires) peut entraîner une réduction de la croissance de tumeurs, en bloquant le métabolisme de la glutamine mais également le métabolisme de la tumeur, notamment au niveau du métabolisme du glucose via le cycle TCA, ou l'effet Warburg (Leone et al. 2019).

C'est donc dans ce contexte que s'inscrit cette étude exploratoire que j'ai menée à l'Institut Necker des Enfants Malades (INEM), à Paris, en collaboration avec le Dr Ganna Panasyuk et son équipe, et avec le Dr Mario Pende. Compte tenu des dérégulations observées de la voie mTORC1 et du métabolisme de la glutamine dans différentes lignées cancéreuses, il nous est apparu pertinent d'étudier l'effet d'un inhibiteur de la Glutamine Synthétase (GS) sur les voies mTOR et la croissance de cellules cancéreuses. J'ai donc utilisé un inhibiteur de la GS, le Glufosinate d'ammonium (GA), composé actif de l'herbicide Basta. Ces herbicides ciblent la GS et sont appelés Phosphinotricines (Logusch et al. 1991). Chez la Levure, le GA inhibe la croissance en inhibant partiellement la voie TORC1 (Vallejo et al. 2017). La problématique de cette partie en lien avec la cancérologie est donc de déterminer l'effet que pourrait avoir le GA sur les voies mTOR (mTORC1 et mTORC2) de différentes lignées cancéreuses.



Voies et processus	Cibles
mTORC1	Cibles directes: S6K, 4EBP Cibles indirectes: - RPS6 (Cible de S6K) - CAD (Voie pyrimidine, Cible de S6K)
mTORC2	Cibles directes: AKT Cibles indirectes: - ATPCL (ATP Citrate Lyase, cible de AKT) - Pras40 (Proline-rich AKT1 substrate 1, Cible de AKT) - MDM2 (E3 Ubiquitin-protein ligase Mdm2, régulation de l'apoptose par p53, Cible de AKT)
Cycle Cellulaire	- c-Myc (Myc proto-oncogene protein, facteur de transcription) - Cycline D1
Métabolisme	Métabolisme de la Glutamine: c-Myc Métabolisme lipidique: ATPCL, ACC (Acetyl-CoA carboxylase) Synthèse des nucléotides: CAD Enzyme Glycolytique: HK2 (Hexokinase 2) Apoptose: MDM2, p53

Figure 52: Représentation schématique des voies mTOR et de leurs principales cibles suivies par Western-Blot

Les protéines en bleu correspondent à des cibles plus ou moins directes de mTORC1, et en orange les cibles plus ou moins directes de mTORC2.

J'ai utilisé trois lignées cellulaires différentes. La lignée HEK293 correspond à des cellules embryonnaires rénales humaines, dites immortalisées. Les Hepa1.6 sont des hépatocytes cancéreux murins. Les HeLa sont des cellules utérines humaines, cancéreuses. Ces trois lignées ont été cultivées en présence soit de DMSO, servant de contrôle positif, soit d'inhibiteurs de TOR, TORIN2 ou AZD-8055 (100nM), servant de contrôles négatifs, soit avec différentes concentrations de GA (1, 5, 10, 25 ou 50 mg/L). Enfin, différents temps de traitement ont été testés, à 1 ou 3h (temps court), à 6h (temps intermédiaire) et 24h (temps long).

Pour étudier l'effet général du GA sur ces lignées cellulaires, nous avons récolté et extrait les protéines de ces cellules pour réaliser des western blot en utilisant des anticorps dirigés contre différents acteurs en amont et en aval des voies mTORC1 et mTORC2 animales (*Figure 52*), impliqués dans différents processus biologiques, afin de déterminer si le taux de phosphorylation ou la quantité de ces protéines est impactée par la présence de GA dans le milieu. Le signal mesuré est ensuite rapporté à celui obtenu pour la tubuline, servant de témoin de charge dans ces expériences. Différents types d'anticorps primaires ont été utilisés en fonction de la cible étudiée. Certains anticorps sont ainsi dirigés contre la forme phosphorylée des protéines (P-RPS6, P-mTOR, P-Pras,...), ou permettent de mettre en évidence une différence de migration (shift) due à une modification de l'état de phosphorylation (4-EBP). D'autres anticorps sont également dirigés contre la forme totale de la protéine, permettant de mettre en évidence une variation de la quantité de protéines en fonction du traitement (Cycline D1, HK2,...). Concernant la lignée HeLa, elle ne semble pas répondre particulièrement à la présence de cet inhibiteur de GS dans le milieu (données non présentées) contrairement aux lignées Hek293 et Hepa1.6 dont les résultats sont détaillés ci-après.

a) Lignée Hek293, 6h de traitement

Les résultats concernant la lignée HEK293 pour 6h de traitement sont présentés en Figure 53. On constate que différentes cibles semblent être affectées par la présence de GA dans le milieu. Les cibles directes (S6K, 4EBP) ou indirectes (RPS6, CAD) de mTORC1 étudiées ne présentent pas de variation de leur phosphorylation en présence de GA contrairement aux inhibiteurs de mTOR qui entraînent une forte réduction de leur taux de phosphorylation (*Figures 53 et 54, A*). Ces résultats suggèrent une insensibilité de la voie mTORC1 au glufosinate pour cette lignée, au bout de 6h de traitement. Concernant la voie mTORC2, les quantifications présentées en Figure 54, B démontrent une diminution de la phosphorylation de AKT, une cible directe de mTORC2, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de cibles indirectes telles que

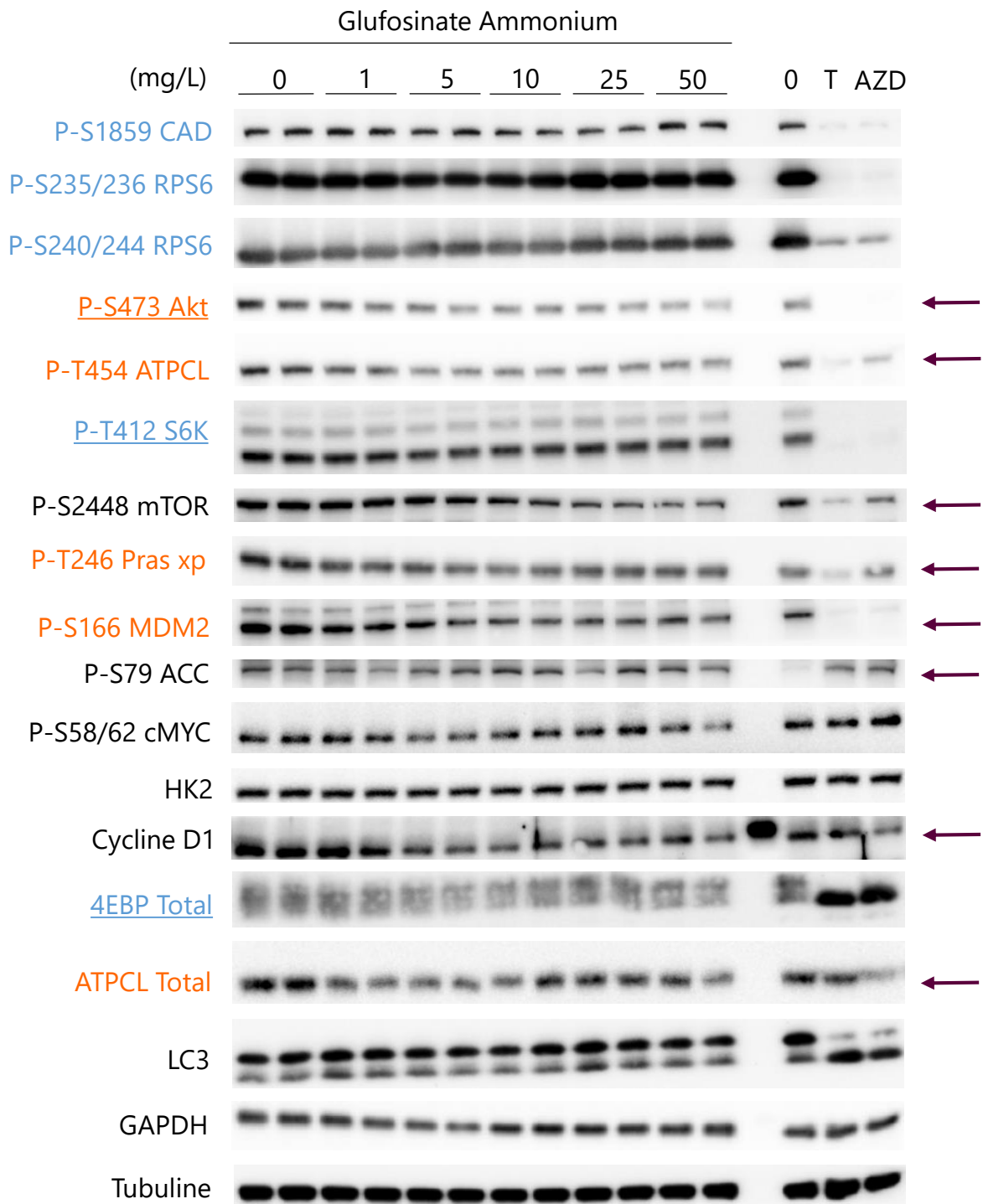


Figure 53: Le Glufosinate d'ammonium impacte davantage la voie mTORC2 chez les cellules HEK293 à 6h de traitement

Les protéines en bleu appartiennent à la voie mTORC1. Les protéines en orange appartiennent à la voie mTORC2. Les cibles directes sont soulignées. Les flèches indiquent les cibles affectées par le glufosinate. T= Torin2, un inhibiteur de mTOR, servant de contrôle avec l'AZD-8055. Inhibiteurs utilisés à une concentration de 100nM. La tubuline sert de témoin de charge. P= phosphorylation, les lettres/chiffres correspondent aux résidus phosphorylés. Certains anticorps sont dirigés contre la forme phosphorylée des protéines (P), d'autres la forme totale. Pour 4EBP, on suit l'état de phosphorylation à travers le changement de migration de la protéine.

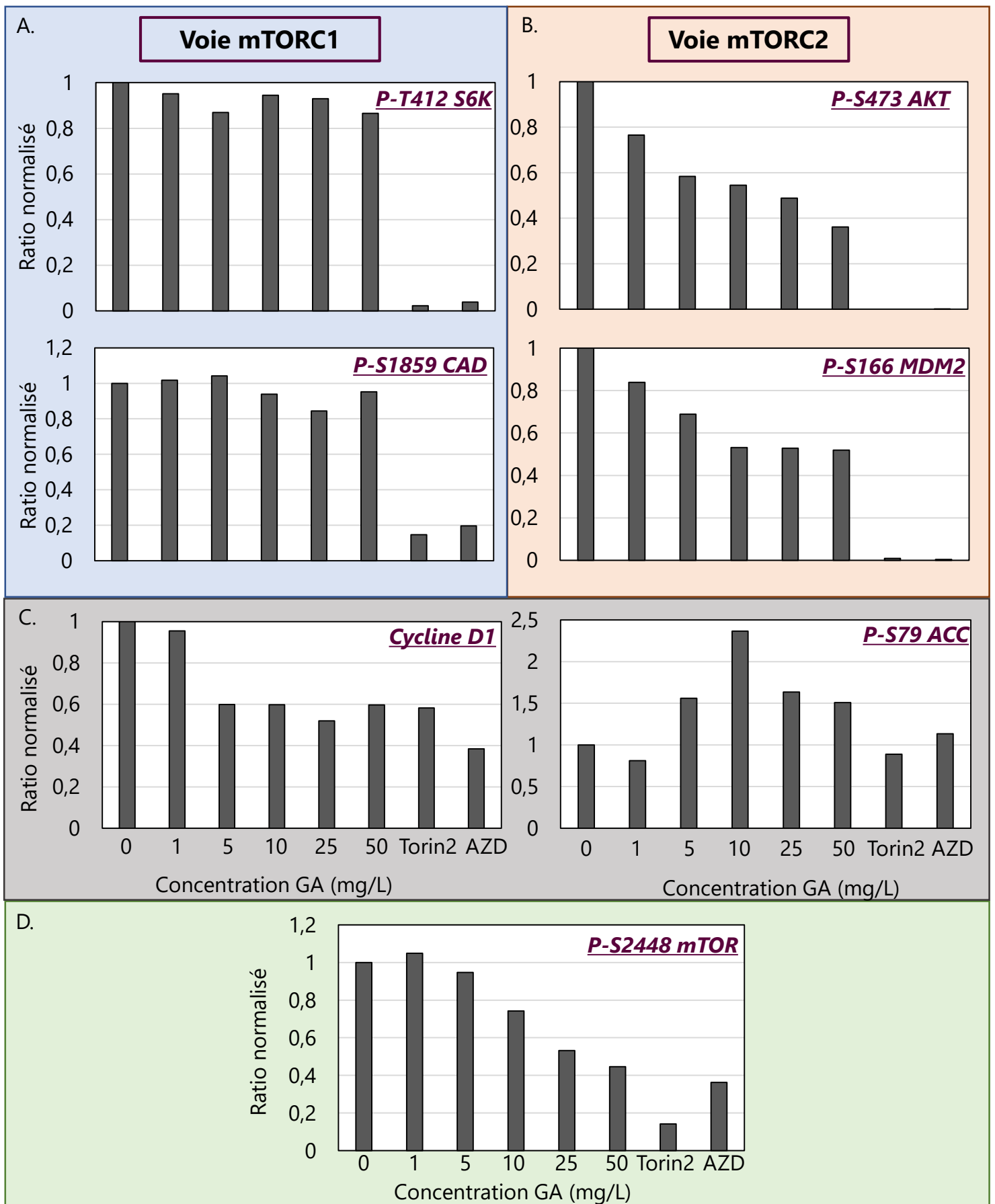


Figure 54: Le Glufosinate d'Ammonium (GA) impacte davantage la voie mTORC2 chez les cellules HEK293 à 6h de traitement

La première ligne correspond à des cibles directes de mTORC1 ou mTORC2, la deuxième ligne à des cibles indirectes. (A) Cibles de la voie mTORC1, (B) Cibles de la voie mTORC2, (C) la cycline D1 est impliquée dans la division cellulaire et ACC dans la synthèse d'acides-gras, (D) Phosphorylation de mTOR. Les contrôles Torin2 et AZD sont à 100nM. Quantification des westerns présentés en Figure 53. P=Phosphorylation. Normalisation par rapport à la tubuline.

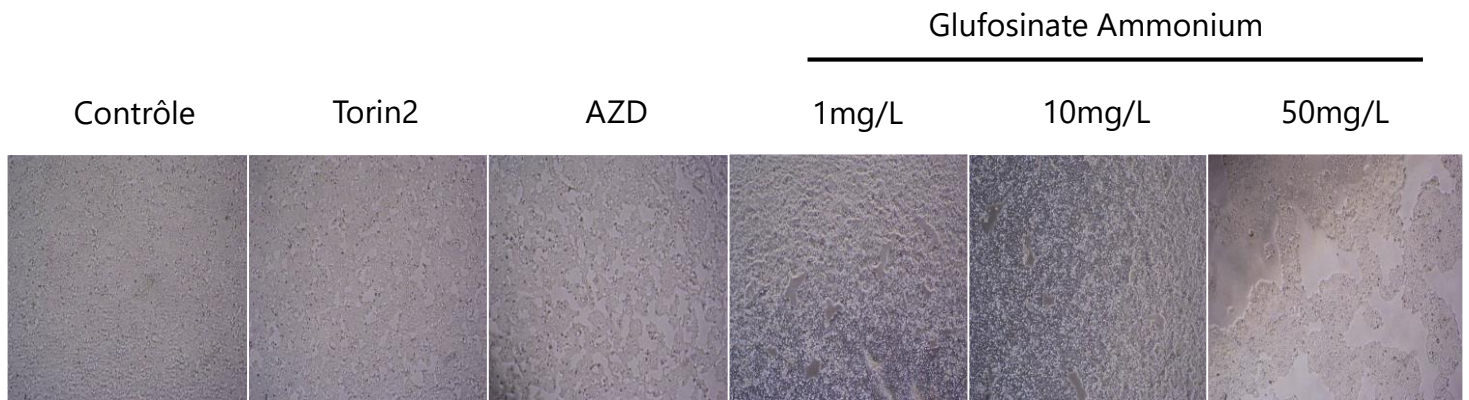


Figure 55: Le Glufosinate d'Ammonium (GA) impacte la prolifération des cellules HEK293

Torin2 et AZD sont à la concentration de 100nM et servent de contrôles.

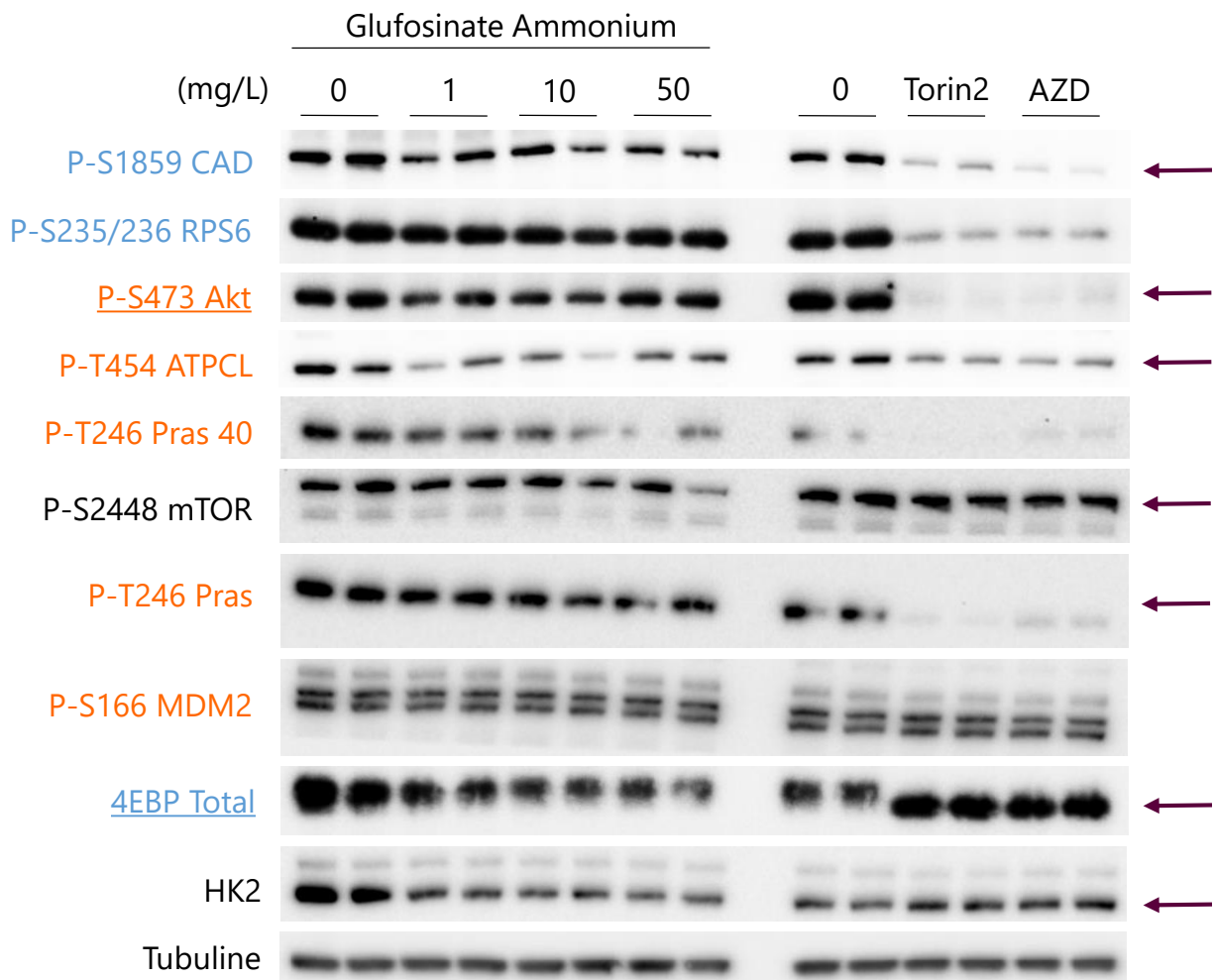


Figure 56: Le Glufosinate d'ammonium impacte les voies mTOR chez les cellules Hepa1.6 à 6h de traitement

Les protéines en bleu appartiennent à la voie mTORC1. Les protéines en orange appartiennent à la voie mTORC2. Les cibles directes sont soulignées. Les flèches indiquent les cibles affectées par le glufosinate. Torin2 et AZD sont des inhibiteurs de mTOR, utilisés à 100nM. La tubuline sert de témoin de charge. P= phosphorylation, les lettres/chiffres correspondent aux résidus phosphorylés. Certains anticorps sont dirigés contre la forme phosphorylée des protéines (P), d'autres la forme totale. Pour 4EBP, on suit l'état de phosphorylation à travers le changement de migration de la protéine.

MDM2 ou Pras40 (*Figure 53*). MDM2 est une ubiquitine ligase qui favorise la dégradation du suppresseur de tumeur p53. La baisse de 50% de la phosphorylation de MDM2 irait donc dans le sens d'une stimulation de l'apoptose par p53 en présence de GA. De plus, les diminutions de phosphorylation observées semblent être dose-dépendantes. Toutefois, on constatera que ces réductions n'atteignent jamais l'état de phosphorylation quasi nul observé pour les contrôles négatifs Torin2 ou AZD. Ainsi, la voie mTORC2 semble être impactée par le GA au bout de 6h de traitement pour cette lignée. Une analyse réalisée au bout d'une heure de traitement démontre également une réduction de la voie mTORC2 en réponse au GA mais cette réduction est plus marquée au bout de 6h. De plus, la phosphorylation de mTOR est également diminuée en présence de GA, de manière dose-dépendante. Pour une concentration de GA à 50mg/L, la phosphorylation de mTOR est réduite de moitié comparée à la condition contrôle sans inhibiteur, témoignant d'une action du GA sur mTOR (*Figure 54, D*).

De même, on constate une diminution de la quantité de Cycline D1, impliquée dans la division cellulaire et une augmentation de la phosphorylation de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), enzyme impliquée dans la première étape de la synthèse des acides gras (*Figure 54, C*). La phosphorylation de ACC a un effet inhibiteur sur son activité et résulte de l'action de l'AMP kinase, l'orthologue de SnRK1 chez les animaux, qui est activée dans un contexte où TOR est inhibée. Ainsi le GA semble limiter la synthèse lipidique et les divisions cellulaires dans ces conditions. J'ai ensuite observé ces cellules à la loupe au bout de 6h de traitement pour contrôler l'effet du GA sur la densité cellulaire. Ces observations sont présentées en *Figure 55*. Comme attendu d'après les données de la littérature, la prolifération cellulaire est réduite en présence des inhibiteurs de mTOR. Pour les concentrations de GA à 1 et 10mg/L, la prolifération cellulaire diminue également mais de manière moins importante comparée aux inhibiteurs de mTOR. En revanche, à 50mg/L de GA, la prolifération cellulaire est davantage impactée qu'en présence de TORIN2 ou d'AZD. Ainsi, la prolifération cellulaire semble globalement être impactée par la présence de GA dans le milieu, ce qui est en accord avec la baisse de Cycline D1 constatée.

b) Lignée Hepa1.6, traitée pendant 6 ou 24h

i. Effets du GA sur les cellules Hepa1.6 à 6h de traitement

Les résultats concernant la lignée Hepa1.6 pour 6h de traitement sont présentés en *Figure 56*. Comme pour la lignée Hek293, différentes cibles sont impactées par la présence de GA. Les quantifications de ces western présentées en *Figure 57* ont mis en évidence une diminution de la phosphorylation de cibles directe (4EBP) et indirecte (CAD) de mTORC1. Leur phosphorylation est réduite de moitié pour les concentrations

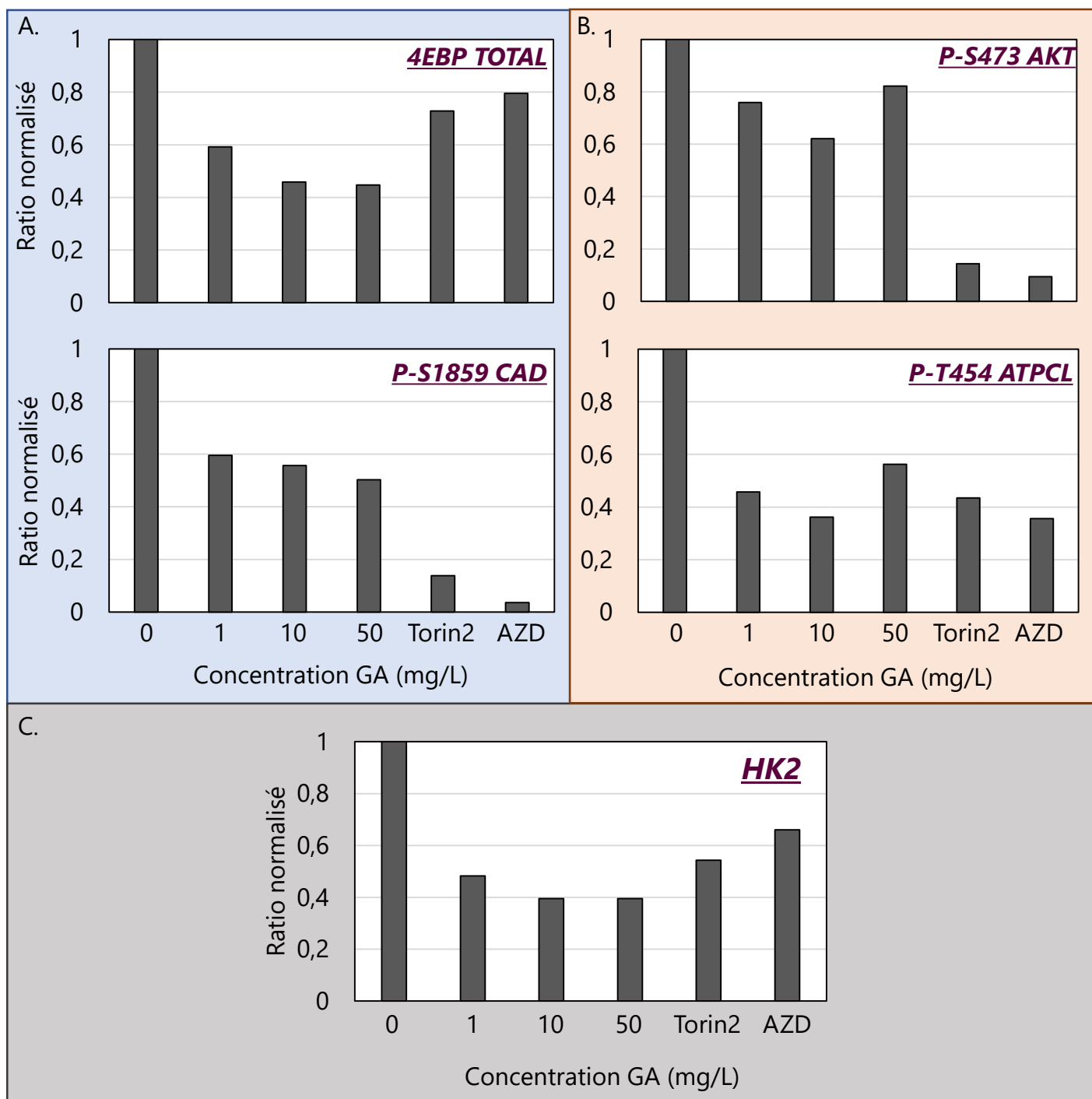


Figure 57: Le Glufosinate d'Ammonium (GA) impacte négativement les voies mTORC1 et mTORC2 chez les cellules Hepa1.6 à 6h de traitement

La première ligne correspond à des cibles directes de mTORC1 ou mTORC2, la deuxième ligne à des cibles indirectes. (A) Protéines de la voie mTORC1, (B) protéines de la voie mTORC2, (C) l'hexokinase HK2 est une enzyme glycolytique, informant sur le métabolisme du glucose. Torin2 et AZD sont à la concentration de 100nM et servent de contrôles. Quantification des westerns présentés en Figure 56. Normalisation par rapport à la tubuline.

de GA à 10 ou 50mg/L, suggérant une diminution de la voie mTORC1 en présence de GA, contrairement à ce qui a été observé pour la lignée HEK293. Les lignées cellulaires ne semblent donc pas toutes répondre de la même façon au GA. Concernant la voie mTORC2, on constate également une diminution de la phosphorylation de AKT, cible directe de mTORC2 et de cibles indirectes, notamment ATPCL (ATP Citrate Lyase), diminuée de moitié comme en présence de Torin2 ou d'AZD. La voie mTORC2 est donc sensible de façon répétable à la présence de GA. Enfin, la quantité d'hexokinase 2 (HK2), une enzyme glycolytique phosphorylant le glucose en glucose-6-phosphate, est également réduite par la présence de GA et de manière plus importante comparée aux inhibiteurs de mTOR. Ceci suggère donc des perturbations métaboliques dans cette lignée cellulaire en réponse au GA et plus particulièrement des perturbations affectant le métabolisme du glucose.

ii. Effets du GA sur les cellules Hepa1.6 à 24h de traitement

Les résultats concernant la lignée Hepa1.6 pour 24h de traitement sont présentés en Figure 58. De manière surprenante, on observe une tendance inverse à ce qui a été observé au bout de 6h de traitement. Au bout de 24h de traitement au GA, on observe plutôt une augmentation de la phosphorylation des cibles mTOR, telles que RPS6 et CAD, cibles indirectes de mTORC1 ou encore AKT et Pras40 pour des cibles respectivement directe et indirecte de mTORC2. On notera que la phosphorylation de CAD et Pras40 est d'autant plus stimulée par la présence de GA. Pour 10 et 50mg/L, l'état de phosphorylation augmente respectivement de 1,7 ou 2,5 fois par rapport au contrôle sans inhibiteur. Ceci irait dans le sens d'une stimulation des voies mTOR dans ces conditions. Les inhibiteurs de mTOR démontrent bien quant à eux une inhibition de la phosphorylation de ces différentes cibles. Les voies mTORC1 et mTORC2 sont donc bien inhibées en présence de Torin2 et AZD au bout de 24h. Ces résultats nous permettent de conclure que le GA n'inhibe plus les voies mTOR au bout de 24h de traitement et semblerait même les stimuler dans cette lignée cellulaire. La diminution de HK2 observée en réponse au GA à 6h n'est pas retrouvée à 24h, suggérant des modifications métaboliques en réponse au GA au bout de 24h.

c) Discussion et Perspectives à cette étude exploratoire

Pour conclure sur cette étude exploratoire menée sur les lignées cancéreuses, il apparaît que l'inhibition de la GS par le Glufosinate d'ammonium peut impacter les voies mTOR de manière plus ou moins importante selon la lignée étudiée. Les résultats avec la lignée HeLa, dont les voies mTOR ne semblent pas être affectées par le GA, comparée aux lignées Hek293 ou Hepa1.6, illustrent bien cette différence de sensibilité

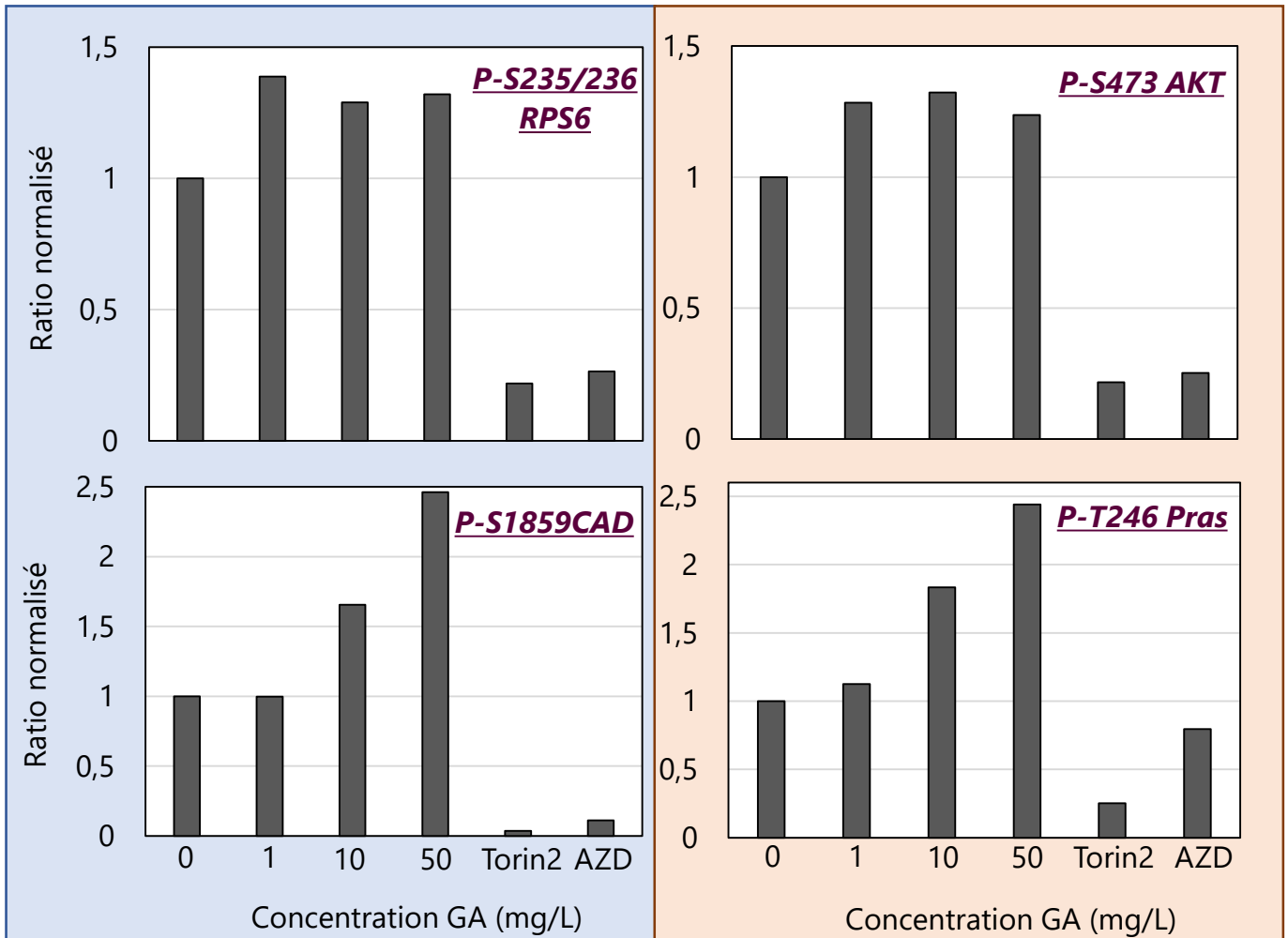
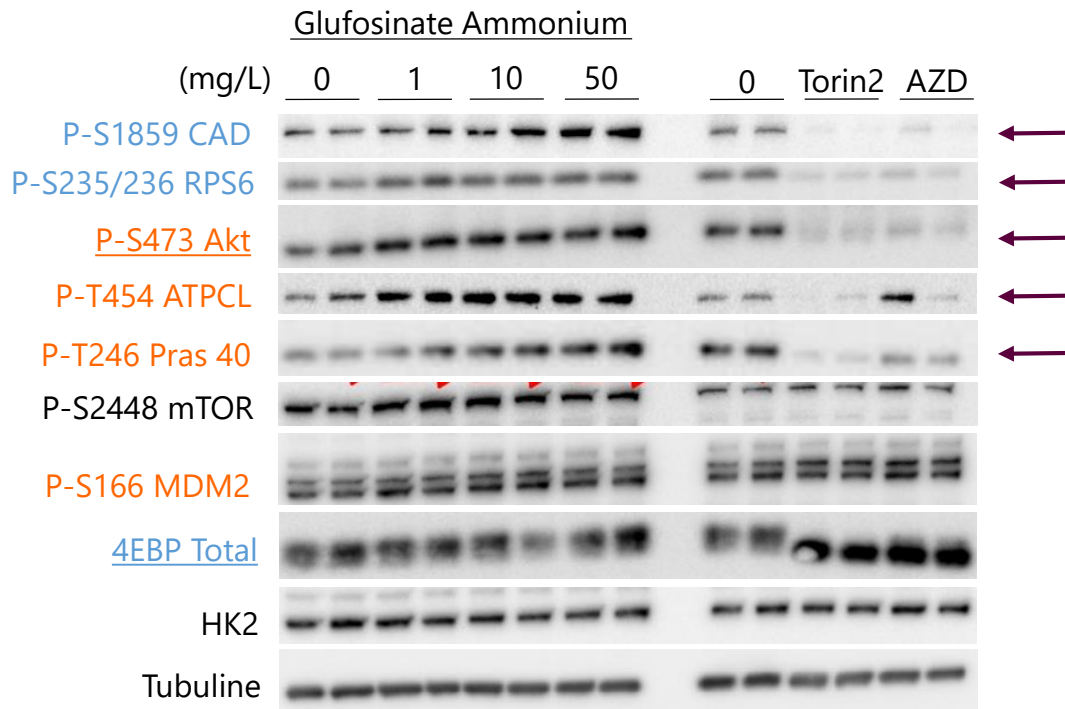


Figure 58: Le Glufosinate d'Ammonium (GA) semble stimuler les voies mTORC1 et mTORC2 chez les cellules Hepa1.6 à 24h de traitement

Les cibles de mTORC1 sont représentées en bleu. Les cibles de mTORC2 sont représentées en orange. Les cibles directes sont soulignées. Les flèches indiquent les cibles affectées par le glufosinate. Torin2 et AZD sont à la concentration de 100nM et servent de contrôles. P= phosphorylation, les lettres/chiffres correspondent aux résidus phosphorylés. Normalisation par rapport à la tubuline.

entre lignées cellulaires. Des répétitions seront nécessaires pour valider définitivement ce résultat. De même, pour la lignée Hek293, seule la voie mTORC2 semble être diminuée à 6h (*Figures 53 et 54*) de traitement tandis que pour la lignée Hepa1.6, les voies mTORC1 et mTORC2 sont inhibées (*Figures 56 et 57*). Enfin, ces premiers résultats ont également permis de mettre en évidence une variation de la réponse au GA en fonction du temps de traitement. Ainsi, pour 6h de traitement, la lignée Hepa1.6 présente une diminution de la phosphorylation de cibles des voies mTOR tandis qu'à 24h de traitement, le GA ne régule plus négativement ces voies mais semblerait même les stimuler (*Figure 58*). Cet effet « stimulateur » observé à 24h de traitement pourrait être dû au fait que les cellules contrôles cultivées en absence d'inhibiteur ont continué à se diviser, développant ainsi un stress lié à la densité cellulaire importante et à la limitation en nutriments alors que les cellules traitées au GA ont vu leur prolifération largement diminuée. L'effet du GA pourrait également s'être dissipé au bout de 24h, engendrant une reprise de croissance et une réactivation de TOR. Si cette hypothèse s'avère être vraie, ceci suggérerait donc que le GA aurait bien un effet sur la prolifération cellulaire mais limité dans le temps et moindre que celui des inhibiteurs de mTOR. Dénombrer les cellules dans les différentes conditions testées, par cytométrie en flux, et effectuer un test de viabilité cellulaire permettrait de vérifier cette hypothèse. Etudier l'effet du GA sur les voies mTOR pour différentes densités cellulaires pourrait également apporter des explications quant à cette stimulation des voies mTOR observée au bout de 24h de traitement. Par ailleurs, la glutamine active mTORC1 notamment à travers sa translocation lysosomale et ce, indépendamment des Rag GTPases (Jewell et al. 2015). Il serait pertinent d'étudier, par immunofluorescence, la localisation subcellulaire de mTOR en présence de GA dans les différentes lignées cellulaires testées et à différents temps de traitement. Cette expérience permettrait de déterminer si l'inhibition de la GS peut réguler l'activité de mTOR à travers sa localisation.

Nous avons vu précédemment que le glucose est un nutriment essentiel pour les cellules cancéreuses puisque le glucose stimule la voie mTORC1 mais parce qu'il permet également la synthèse d'ATP par la glycolyse et la fermentation (Effet Warburg). Du fait de l'importance du métabolisme du glucose pour ces lignées cancéreuses, des inhibiteurs de l'hexokinase, première enzyme de la glycolyse, sont étudiés en cancérologie. L'étude de Kwiatkowska et al. démontre ainsi qu'une lignée de cellules MDA-MB-231 (cancer du sein) est sensible au 3-Bromopyruvate, un composé inhibant HK2 (Kwiatkowska et al. 2016). Ainsi, l'impact du GA sur l'hexokinase 2 au bout de 6h de traitement (*Figure 57, C*) irait dans le sens d'une réduction du métabolisme du glucose dans la lignée Hepa1.6. Ce point est donc important à noter puisqu'il permettrait de participer à la réduction de la division cellulaire. De même, la réduction

de la prolifération cellulaire observée à 6h pour la lignée Hek293 (*Figure 55*), en accord avec la réduction des teneurs en Cycline D1 (*Figures 53 et 54*), est un résultat encourageant pour l'utilisation d'inhibiteurs de la GS tels que le GA dans les études de cancérologie. Ces résultats pourraient initier une étude plus importante sur la caractérisation complète de l'effet du GA sur différentes lignées cancéreuses. La lignée Hepa1.6, lignée de cellules hépatocytes, présentant des réponses plus importantes au GA, il serait intéressant de continuer cette analyse en utilisant d'autres lignées cellulaires issues de cancer du foie.

L'impact du GA sur la synthèse lipidique (ACC) et nucléotidique (CAD) pourrait être dû à l'effet du GA sur le métabolisme de la glutamine. Pour confirmer ces résultats, il serait pertinent d'effectuer des analyses métabolomiques sur les lignées Hek293 et Hepa1.6 pour déterminer les teneurs en glutamine en fonction des différents temps de traitement et les différentes concentrations testées. Ceci permettrait également de comparer l'effet du GA, mais également des inhibiteurs de mTOR, entre le modèle animal et végétal, notamment avec les données que j'ai obtenues chez Arabidopsis. Ces analyses métabolomiques permettraient de confirmer également l'effet du GA sur la synthèse lipidique et le métabolisme du glucose.

Enfin, dans la perspective d'établir de nouveaux traitements anti-cancéreux, des études sont menées pour cibler à la fois le métabolisme de la glutamine (en ciblant GLS) et mTOR (Lampa et al. 2017). La combinaison de plusieurs thérapies permet de limiter les phénomènes de résistance aux traitements (Tanaka et al. 2015). Pour faire suite à mon travail réalisé à l'INEM, il serait donc pertinent d'étudier s'il existe un effet synergétique entre l'inhibition commune de la GS et de mTOR, en appliquant différentes doses de GA et de rapamycine ou d'AZD. Dans ces conditions, il serait intéressant de contrôler à la fois l'action combinée de ces inhibiteurs sur les voies mTOR et différentes cibles métaboliques telles que p53 (apoptose), ACC (synthèse lipidique), HK2 (glycolyse) par western-blot mais aussi sur la prolifération des cellules cancéreuses. Compte-tenu des effets du temps de traitement observés lors de mes expériences, ces analyses devront être réalisées à différents temps de traitement.

B. Caractérisation du mutant *Arabidopsis loki* présentant une prolifération cellulaire ectopique TOR-dépendante

Ce chapitre correspond à la deuxième grande partie de ma thèse qui porte sur la caractérisation d'un mutant issu d'un crible génétique de résistance ou hypersensibilité à l'inhibiteur de TOR AZD-8055, dont le but était d'identifier de nouveaux acteurs de la voie TOR chez *Arabidopsis*. Ce travail a été initié dans notre équipe par Céline Forzani, qui a réalisé le crible sur des lignées issues d'une mutagenèse de type EMS (Capilla-Perez et al. 2018). Un mutant a particulièrement retenu notre attention par son phénotype. Après séquençage, le gène responsable de ce phénotype a été identifié et des mutants d'insertion ont été obtenus afin de confirmer que la mutation identifiée était bien responsable du phénotype observé. Je commencerai donc ce chapitre en présentant les grandes étapes de ce crible et l'identification du gène candidat. Je développerai ensuite les différentes analyses que j'ai menées pour caractériser ce mutant présentant un phénotype dépendant de l'inhibition de TOR.

1. Crible génétique et identification d'un gène candidat

a) Détails du crible génétique

Dans le but d'identifier de nouveaux composants de la voie TOR chez *Arabidopsis*, un crible génétique a été réalisé sur différentes lignées issues d'une population de plantes haploïdes doublées (HD), ayant subi une mutagenèse de type EMS (Méthanesulfonate d'éthyle) ce qui permet de fixer l'ensemble des mutations à l'état homozygote (Capilla-Perez et al. 2018). Ce type de mutagenèse permet d'induire des mutations aléatoires dans le génome. Elle a été réalisée sur des plantules Col-0 ayant une mutation homozygote du gène *Glabra-1* (*Glb1*), entraînant la perte des trichomes sur ces plantules. La première génération (M1) a été mutagénisée puis s'est autofécondée pour donner ensuite la seconde génération (M2). Chaque plante M2 a été croisée avec une lignée mutante *tailswap* qui permet l'obtention directe de plantes haploïdes (génération M3). Les lignées mutantes sont issues d'une diploïdisation spontanée. Ces plantes ont ensuite donné la population finale M4 (Capilla-Perez et al. 2018). Ainsi, l'utilisation de plantes haploïdes permet de fixer les mutations résultant de la mutagenèse EMS. Ces différentes lignées ont ensuite été semées sur un milieu contenant des inhibiteurs des voies PI3K ou TOR et les plantules plus sensibles ou plus résistantes à ces inhibiteurs par rapport aux plantules sauvages ont été sélectionnées. Le premier crible a été effectué sur du LY294002 (LY), un inhibiteur de PI3K et de TOR. Le second a été réalisé sur AZD-8055 (AZD), un inhibiteur spécifique de TOR. Différents mutants ont été retenus et notamment le mutant *HD305*, qui présentait une partie

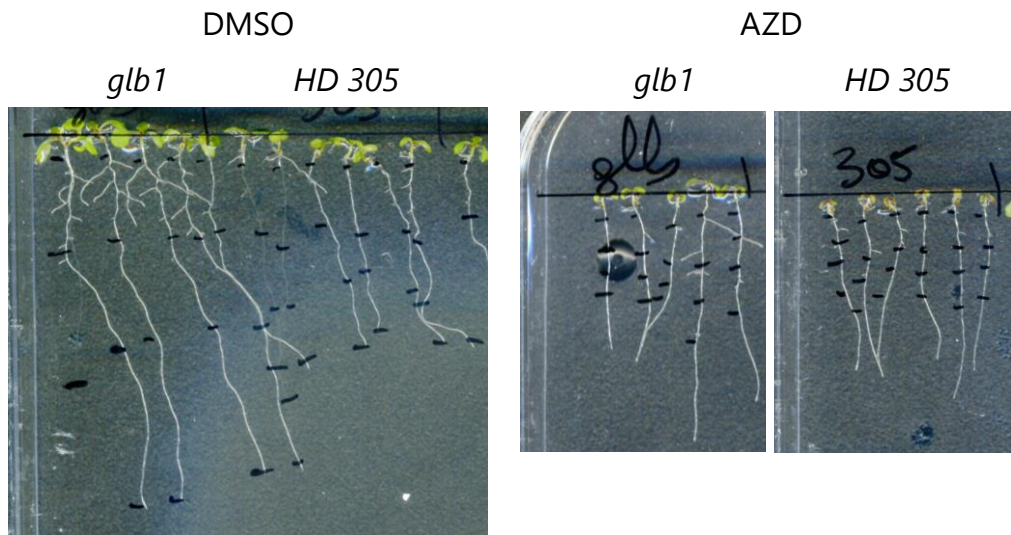


Figure 59: La croissance de la partie aérienne du mutant *HD305* est sensible à l'AZD

L'AZD est utilisé à la concentration de $0,25\mu\text{M}$. *Glb1* correspond au contrôle *Glabra-1*, génotype sur lequel a été réalisé la mutagenèse EMS. Expérience réalisée par Céline Forzani.

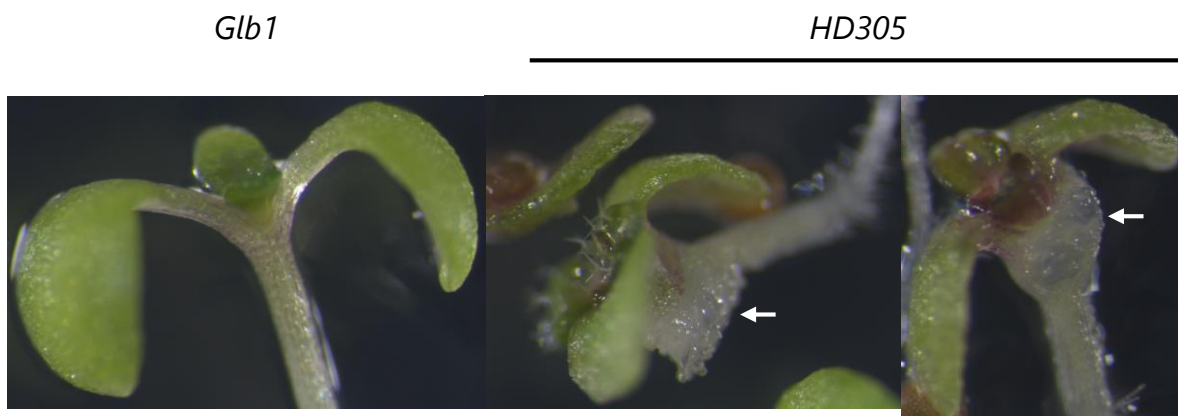


Figure 60: La partie aérienne du mutant *HD305* présente des amas cellulaires ectopiques en présence d'AZD

Culture sur AZD à $0,25\mu\text{M}$. *Glb1* correspond au contrôle *Glabra-1*, génotype sur lequel a été réalisé la mutagenèse EMS. Expérience réalisée par Céline Forzani. Les flèches indiquent les amas cellulaires ectopiques.

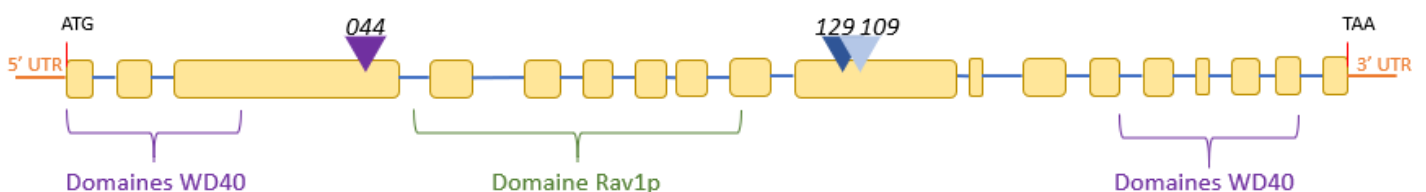


Figure 61: Représentation schématique des domaines de la protéine LOKI

Des domaines WD40 sont retrouvés en parties N-ter et C-ter. LOKI possède également un domaine Rav1p. 044, 109 et 129 correspondent aux sites d'insertion de l'ADN-T des lignées mutantes d'insertions *loki044*, *loki109* et *loki129*.

aérienne réduite en présence d'AZD par rapport au contrôle *glb1* (Figure 59). En plus de cette sensibilité, ce mutant présentait également des amas cellulaires ectopiques au niveau de la partie aérienne des plantules et ce, uniquement lorsque la kinase TOR était inhibée (Figure 60), puisque ce phénotype n'est pas observé sur DMSO. Aucune autre lignée issue de ce crible ne présentait cette présence d'amas ectopiques sur AZD.

b) Identification d'un gène candidat

Ce mutant *HD305* a ensuite été croisé avec le sauvage Col0 et la génération F2 résultant de ce croisement a été séquencée en réalisant une analyse de masse (bulk segregant analysis, toutes les plantes F2 présentant le phénotype initial ont été récoltées et séquencées ensemble), afin de déterminer les mutations fixées au sein de cette population. Après séquençage, le gène muté responsable de ce phénotype a été identifié avant mon arrivée par C.Forzani. La mutation causale correspond à l'apparition d'un codon stop dans la séquence du gène noté At2G46560 (chromosome 2), qui code pour une protéine d'environ 275kDa (2513 résidus aminés), dont la fonction n'était pas connue. Compte tenu du phénotype cellulaire observé en absence d'activité TOR, nous avons choisi d'appeler ce gène *LOKI* pour Localised Proliferation depending on TOR Kinase Inhibition. Ainsi, cette protéine *LOKI* possède plusieurs domaines WD40, domaines retrouvés chez les protéines RAPTOR et LST8, permettant des interactions protéines-protéines. Ces domaines WD40 sont situés en parties N et C-terminales. Cette protéine présente également un domaine Rav1p (Figure 61). Ce type de domaine est retrouvé en partie C-terminale de la protéine RAV1, composant du complexe RAVE, chez la Levure (voir Introduction, C.1.b).

2. Effets physiologiques de la mutation *loki*

a) Les mutants d'insertion *loki*

Pour mieux caractériser l'effet de cette mutation *loki*, des mutants d'insertion ont été obtenus dans les collections d'*Arabidopsis* disponibles. Il n'existe actuellement aucune publication sur ces mutants. Nous disposons ainsi au laboratoire de trois lignées d'insertion notées *loki044*, *loki109* et *loki129*. La localisation de ces insertions est représentée sur la figure 61, les insertions *loki109* et *129* étant proches l'une de l'autre comparées à l'insertion *044*. On notera également que l'insertion *044* est localisée entre la partie 5' et le domaine Rav1p tandis que les insertions *109* et *129* se trouvent entre le domaine Rav1p et la partie 3' de la séquence. Dans un premier temps, j'ai étudié le phénotype de ces mutants *loki* sur AZD pour les comparer au mutant *HD305* et ainsi confirmer que le gène *LOKI* est bien responsable de ce phénotype. Sur DMSO, la partie aérienne des plantules *loki* est bien développée, comme pour les contrôles Col8 et

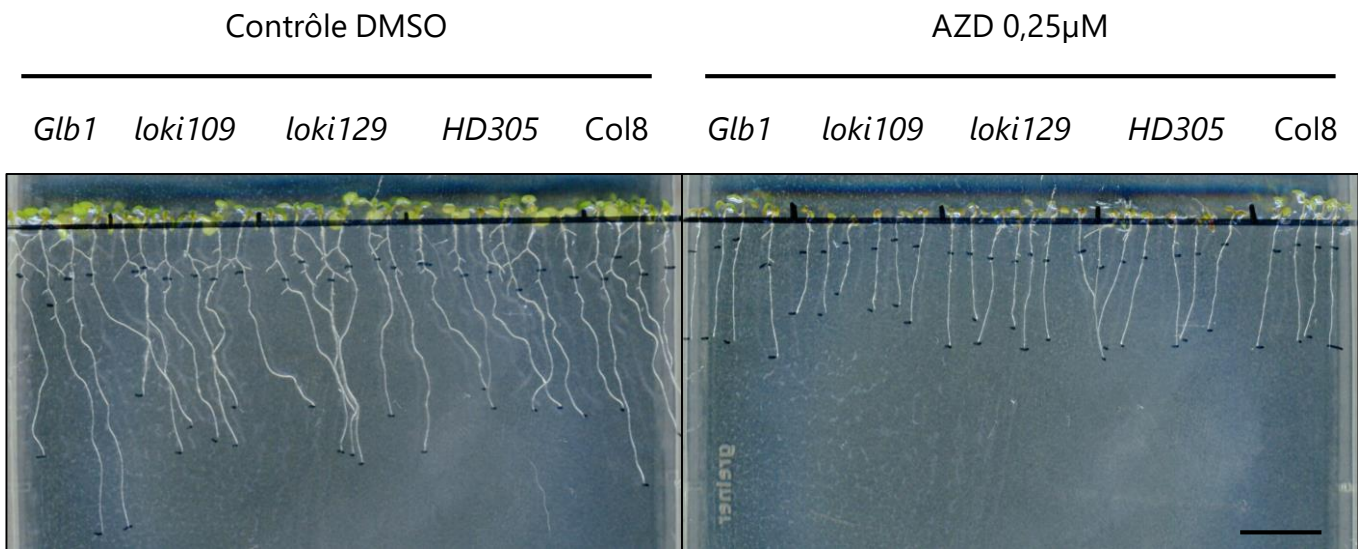


Figure 62: La croissance de la partie aérienne des mutants *loki* est hypersensible à l'AZD comme observé pour le mutant *HD305*

Plantules au stade J+9. Echelle: 1,45cm.

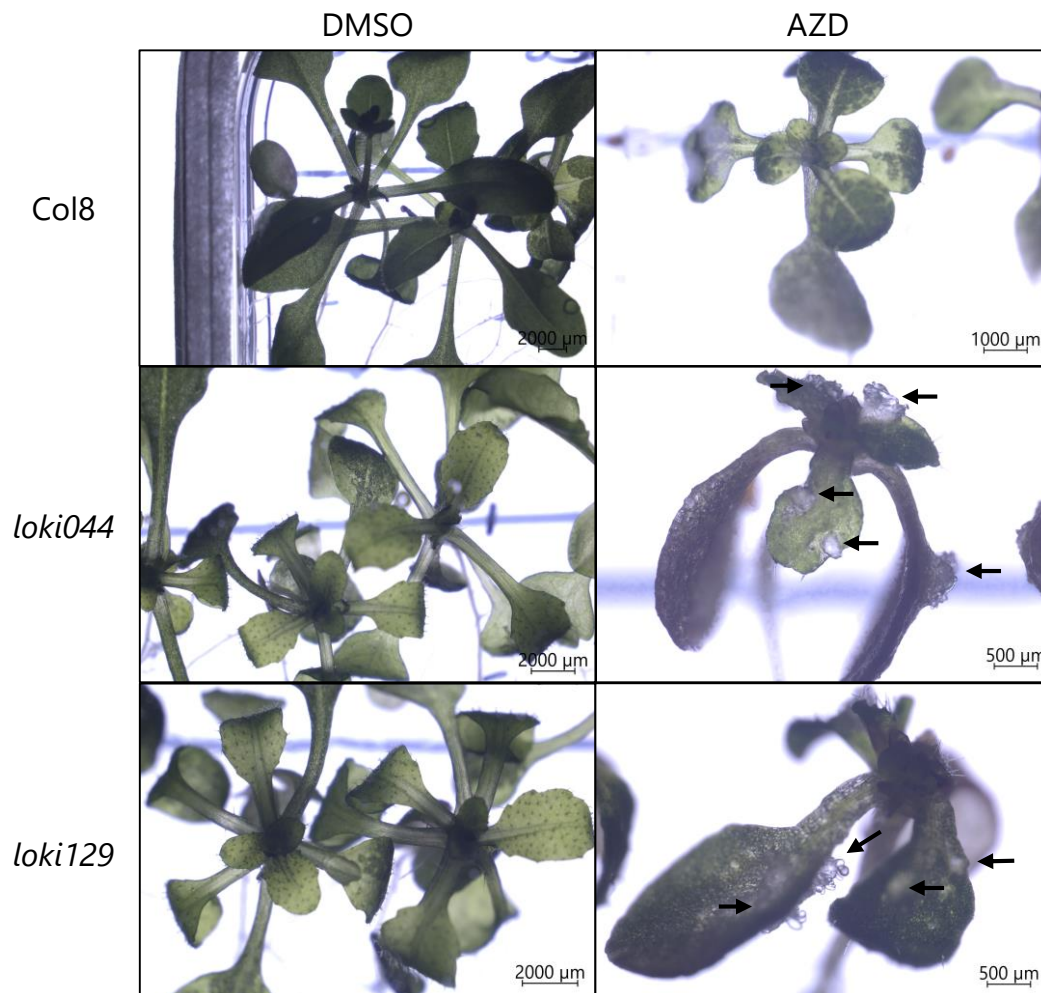


Figure 63: Les mutants *loki* présentent des amas cellulaires ectopiques au niveau de leur partie aérienne en présence d'AZD

Plantules cultivées in vitro pendant 24 jours sur un milieu Arabidopsis 1% sucrose et en présence de DMSO (contrôle) ou 0,25µM d'AZD. Les flèches indiquent les amas cellulaires ectopiques. Observations réalisées au microscope stéréoscopique à large champ (axiozoom).

Glb1. Le mutant *HD305* présente une partie aérienne plus petite, pouvant s'expliquer par les différentes mutations autres que la mutation *loki*. Cultivés sur 0,25µM d'AZD, les mutants *loki* présentent une plus forte réduction de la partie aérienne comparée aux contrôles Col8 et *glb1*, confirmant la sensibilité de la partie aérienne de ces mutants à l'AZD, comme le mutant *HD305* (Figure 62). J'ai voulu ensuite confirmer si ces mutants *loki* présentent bien des amas ectopiques en présence d'AZD. Ces plantules ont donc été cultivées *in vitro* sur un milieu Arabidopsis contenant 1% sucrose, en présence ou en absence d'AZD. La figure 63 représente les observations réalisées sur ces plantules grâce à un microscope stéréoscopique à large champ (axiozoom Zeiss), après 24 jours de culture. Sur DMSO, la partie aérienne du sauvage Col8 et des mutants *loki* se développe correctement, sans anomalie particulière. Sur 0,25µM d'AZD, la partie aérienne des différents génotypes est réduite suite à l'inhibition de TOR et les mutants *loki* présentent plusieurs amas cellulaires ectopiques au niveau des feuilles, qui sont absents chez le sauvage. J'ai également cultivé ces lignées mutantes sur Torin2, un autre inhibiteur de TOR. Des amas ectopiques ont également été observés dans ces conditions. Ces résultats démontrent que les mutants d'insertion *loki* se comportent comme le mutant *HD305* et que ce phénotype est bien lié spécifiquement à l'inhibition de TOR.

J'ai ensuite caractérisé les mutants *loki* par RT-PCR afin de déterminer si ces mutants présentent une expression résiduelle du gène *LOKI* ou si celle-ci est complètement éteinte. Compte tenu du haut poids moléculaire de *LOKI*, cette RT-PCR a été réalisée avec une Taq Phusion, une ADN polymérase à haute affinité, plus performante pour les grands gènes (cette Taq peut être utilisée pour des séquences allant jusqu'à 20kb). En utilisant des amorces reconnaissant la séquence de l'ADNc de *LOKI* aux extrémités 5' et 3', on constate bien une bande à environ 7000 paires de bases chez les plantules sauvages Col8, correspondant à l'ARNm dérivé du gène *LOKI* (Figure 64). L'absence de bande dans le contrôle H₂O confirme qu'il n'y a pas eu de contamination lors de l'expérience. Pour les trois lignées mutantes *loki*, l'absence de bande à la taille attendue de 7000 paires de bases démontre que le gène *LOKI* n'est pas exprimé dans ces lignées d'insertion (Figure 64). Les mutants *loki* sont donc des mutants nuls. Par ailleurs aucun ADNc n'était encore décrit dans les bases de données pour le gène *LOKI*, ces résultats montrent donc que l'annotation de ce gène était correcte en ce qui concerne la prédiction de l'existence et de la taille de l'ARNm.

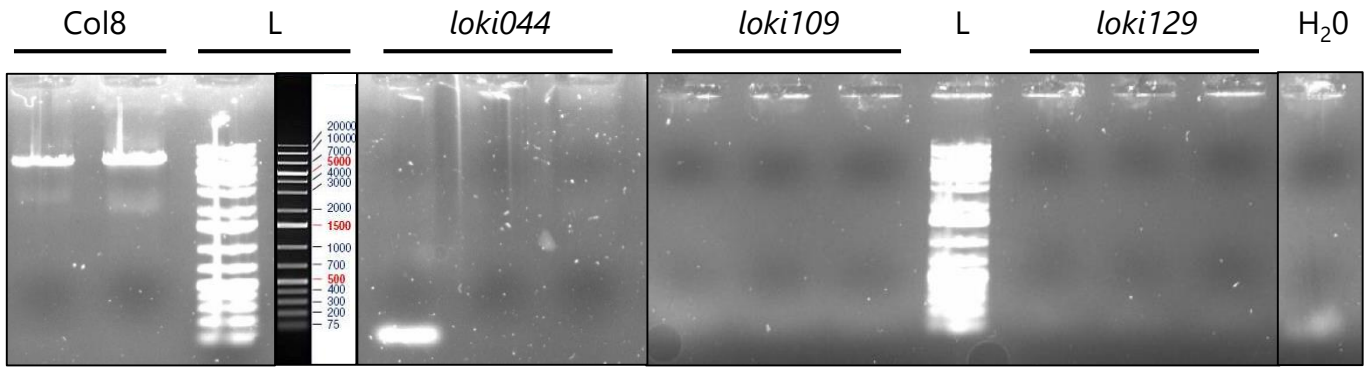


Figure 64: Les mutants *loki* sont des mutants nuls

Gels de RT-PCR réalisés sur des plantules de 18 jours, avec une Taq phusion. Les échantillons Col8 présentent une bande à la taille attendue (environ 7000 paires de bases), correspondant à l'ADNc de LOKI. Les mutants *loki* ne présentent pas cette bande. L= Ladder 1kb plus. RT-PCR réalisées par C. Ingargiola et I. Jéhanno.

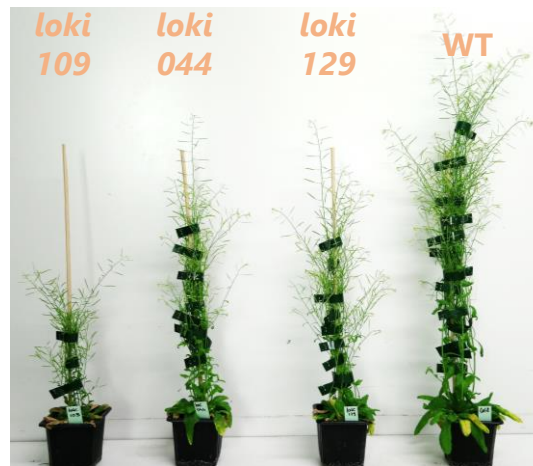


Figure 65: Les mutants *loki* présentent une croissance légèrement réduite par rapport au sauvage

Plantes cultivées en serre, J+64,

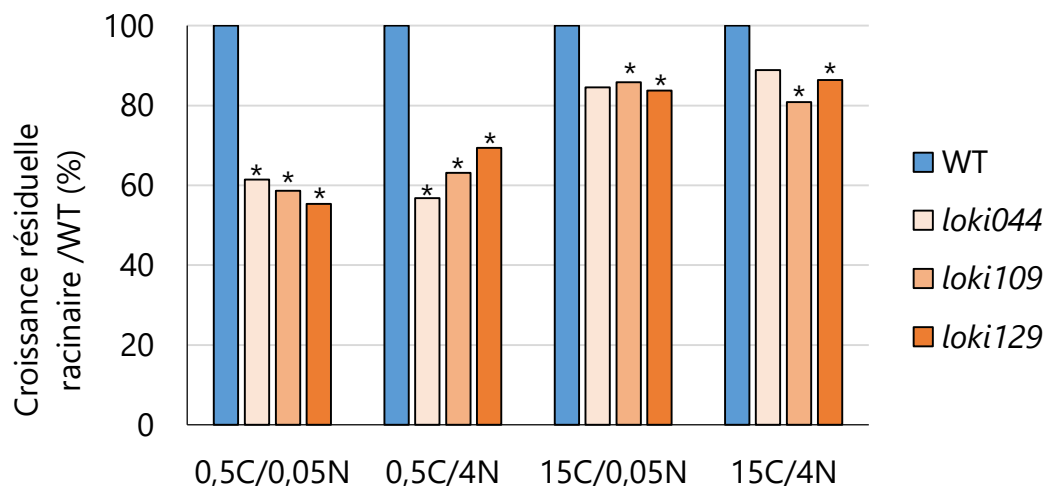


Figure 66: Les mutants *loki* sont sensibles à la carence en sucre

Croissance résiduelle racinaire de plantules cultivées *in vitro* pendant 11 jours sur un milieu *Arabidopsis* sur différents ratios Carbone/Azote (C/N). 0,5C/0,05N= 0,05% de saccharose et 0,05mM KNO_3 (carence en sucre et en azote), 0,5C/4N= 0,05% saccharose et 4mM KNO_3 (carence en sucre), 15C/0,05N= 1,5% saccharose et 0,05mM KNO_3 (carence en azote), 15C/4N= 1,5% saccharose et 4mM KNO_3 (pas de carence). Pool de 3 expériences indépendantes. Effectifs compris entre 17 et 30 plantules. * correspond aux différences significatives, test non paramétrique Kruskal & Wallis ($p < 0,05$).

b) Le phénotype des mutants *loki*

i. Croissance et environnement nutritionnel

En observant de manière générale les mutants *loki* cultivés en serre, on constate que les plantes sont plus petites comparées au sauvage Col8 (*Figure 65*). Pour caractériser l'effet physiologique de la mutation *loki* chez *Arabidopsis*, les mutants ont été cultivés *in vitro* sur boîtes verticales pour pouvoir quantifier la longueur racinaire en fonction de l'environnement nutritionnel, notamment sucré et azoté. Pour rappel, nous avons vu en introduction et dans la première partie de ce manuscrit que le sucre et l'azote stimulent l'activité du complexe TORC1. Des plantules *loki* ont donc été cultivées 11 jours sur différents ratio carbone/azote (C/N), d'après les conditions utilisées dans la littérature pour mimer des carences nutritionnelles (Gao et al. 2008). A l'inverse de la condition 15C/4N (1,5% saccharose et 4mM KNO₃), le ratio 0,5C/0,05N (0,05% saccharose et 0,05mM KNO₃) correspond à une carence en C et en N, la condition 0,5C/4N (0,05% saccharose et 4mM KNO₃) à une carence en sucre tandis que 15C/0,05N (1,5% saccharose et 0,05mM KNO₃) correspond à une carence en N. La longueur des racines primaires a été mesurée en utilisant le logiciel ImageJ, ce qui a permis d'établir la croissance racinaire résiduelle des mutants *loki* par rapport au WT, pour chaque condition testée. En comparant ainsi la croissance racinaire résiduelle des trois lignées *loki* par rapport au sauvage, on constate que la croissance racinaire des mutants atteint environ 60% de la croissance du WT pour les deux conditions carencées en sucre, qu'il y ait ou non de l'azote dans le milieu (*Figure 66*). Les mutants *loki* sont donc plus sensibles à la carence en sucre par rapport au sauvage. En revanche, la carence en N ne semble pas particulièrement affecter la croissance racinaire des mutants.

ii. Activité de TOR chez les mutants *loki*

Le but initial de cette étude étant d'identifier un potentiel nouvel acteur de la voie TOR chez les plantes, j'ai ensuite mesuré l'activité TOR dans les fonds mutants *loki* afin de déterminer si cette mutation agissait en amont ou en aval de TOR. Des plantules de 5 jours ont été transférées en milieu liquide carencé en sucre pendant 24 heures puis traitées pendant 5h avec du sucrose 1%, sans ou avec AZD 1μM. L'ajout de sucre permet de stimuler la phosphorylation de RPS6, c'est-à-dire l'activité de TOR, dans les différents génotypes (*Figure 67*) mais cette induction de TOR semble moins prononcée pour les mutants *loki* par rapport au WT. En contrôle, on constate que la stimulation induite par le sucre est bien réduite en présence d'AZD.

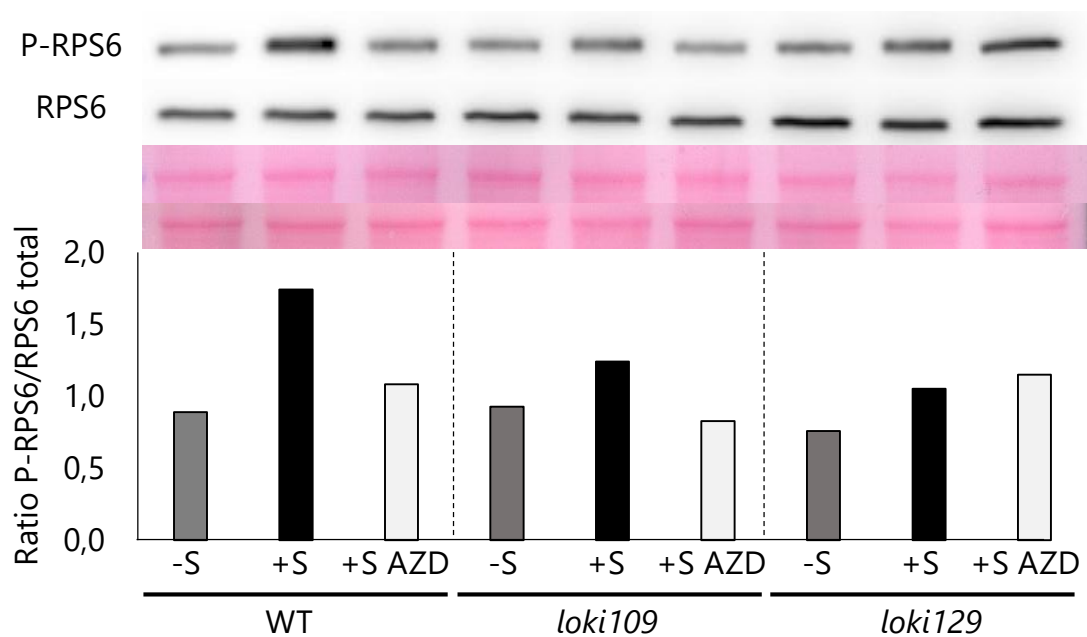


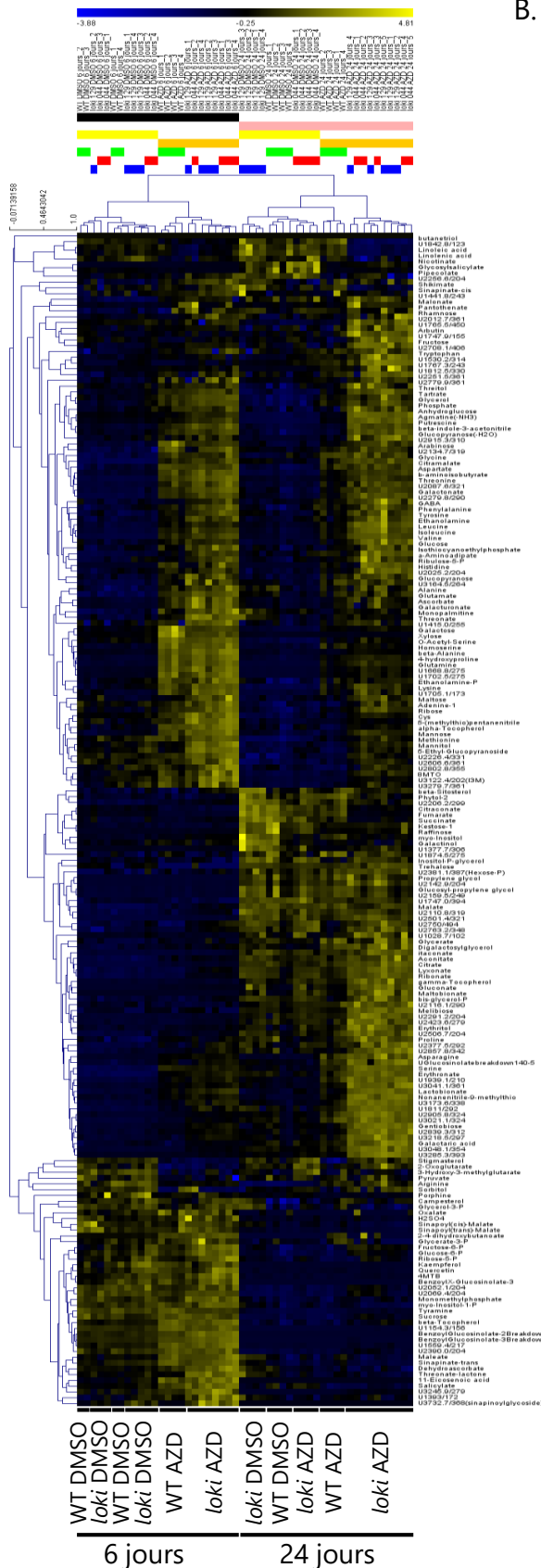
Figure 67: L'activité de TOR induite par le sucre est plus faible chez les mutants *loki*

Plantules cultivées *in vitro* pendant 5 jours sur milieu *Arabidopsis* puis transférées en milieu liquide carencé en sucre pendant 24h. Les plantules ont ensuite été traitées avec 1% sucrose (S) +/- AZD 1 μ M. Les anticorps primaires et secondaires ont été utilisés au 1/5000. Exposition: 8 sec pour RPS6 totale, 100sec pour P-RPS6. La coloration rouge Ponceau indique que les mêmes quantités d'échantillons ont été déposées. Les quantifications des signaux P-RPS6 et RPS6 ont été réalisées avec le logiciel ImageJ.

iii. Analyses métabolomiques

L'inhibition de la voie TORC1 conduit à de nombreuses variations métaboliques, notamment en acides aminés, en lipides et intermédiaires du cycle TCA ainsi qu'en composés de stockage comme les TAGs (Moreau et al. 2012; Ren et al. 2012; Caldana et al. 2013; Salem et al. 2018; Forzani et al. 2019). Pour déterminer si la mutation *loki* affecte également le métabolisme général de la plante, des analyses métabolomiques ont été réalisées sur les mutants *loki044* et *loki129*, cultivés sur DMSO (condition contrôle) ou 0,25µM d'AZD, pendant 6 ou 24 jours (stade auquel les amas sont bien développés). Les détails de l'analyse métabolomique et de la classification hiérarchique sont présentés dans la partie Matériels et méthodes. A 6 jours de culture, en condition DMSO, il ne semble pas y avoir de modifications métaboliques particulières entre les mutants *loki* et le WT (Figure 68, A). On notera cependant une tendance à l'augmentation de la teneur en glutamine au sein des mutants *loki* sur DMSO (Figure 68, B), teneur augmentant de 0,2µg/mg de matière fraîche chez le sauvage à 0,45µg/mg de matière fraîche chez les mutants *loki*. Dans le premier chapitre Résultats de ce manuscrit, nous avons vu que l'inhibition de TOR entraînait une accumulation de glutamine GS-dépendante. Ces résultats chez les mutants *loki* pourraient ainsi être mis en lien avec la plus faible stimulation par le sucre de l'activité TOR chez *loki* démontrée par le western-blot en Figure 67. A 6 jours de culture dans un contexte où TOR est inhibée, il semble y avoir quelques variations métaboliques plus marquées chez *loki* par rapport au WT sur AZD (Figure 68, A), notamment en Ribulose-5-P ou certains acides aminés tels que le tryptophane, l'histidine, la leucine ou l'isoleucine dont les teneurs semblent augmenter. Au bout de 24 jours de culture, la mutation *loki* ne semble pas provoquer d'importantes modifications au niveau des métabolites par rapport au WT (Figure 68, A). Concernant le profil métabolique des mutants *loki* sur AZD, de nombreuses variations métaboliques sont constatées par rapport aux plantules WT (Figure 68, A et B) en acides aminés (histidine, leucine, isoleucine), sucres (glucose, fructose) ou autres métabolites tels que le gluconate ou la putrescine, impliquée dans la réponse aux stress (Alet et al. 2011; Podlešáková et al. 2019). D'après l'analyse hiérarchique représentée en Figure 68, A, ces variations propres aux mutants *loki* sur AZD vont majoritairement dans le sens d'une accumulation de ces composés. Les intermédiaires du cycle de Krebs ne semblent pas modifiés dans le fond mutant *loki* sur AZD par rapport au WT. Concernant les teneurs en glutamine au bout de 24 jours, elle semblerait être légèrement supérieures dans le fond mutant *loki* sur AZD par rapport au sauvage. En conclusion de ces analyses, la mutation *loki* ne semble pas particulièrement affecter le métabolisme général de la plante. Cependant, dans un contexte où TOR est inhibée, la mutation *loki* affecte les réponses métaboliques de la

A.



B.

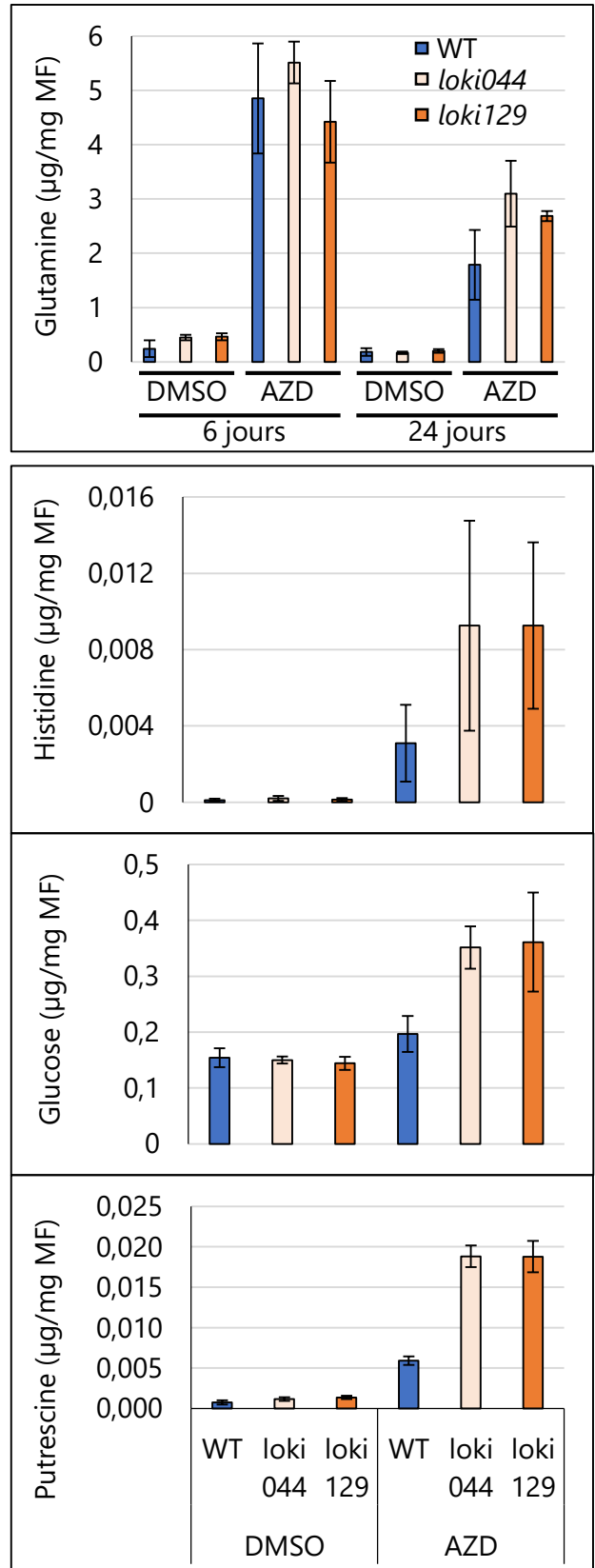


Figure 68: Les analyses métabolomiques des lignées *loki044* et *loki129* révèlent des perturbations à J+24 sur AZD

Plantules cultivées *in vitro* pendant 6 ou 24 jours sur un milieu *Arabidopsis* en présence de DMSO (contrôle) ou 0,25µM d’AZD. (A) Analyse groupée hiérarchique, (B) Quantifications de quelques métabolites à 6 jours et 24 jours pour la glutamine et à 24 jours pour l’histidine, le glucose et la putrescine.

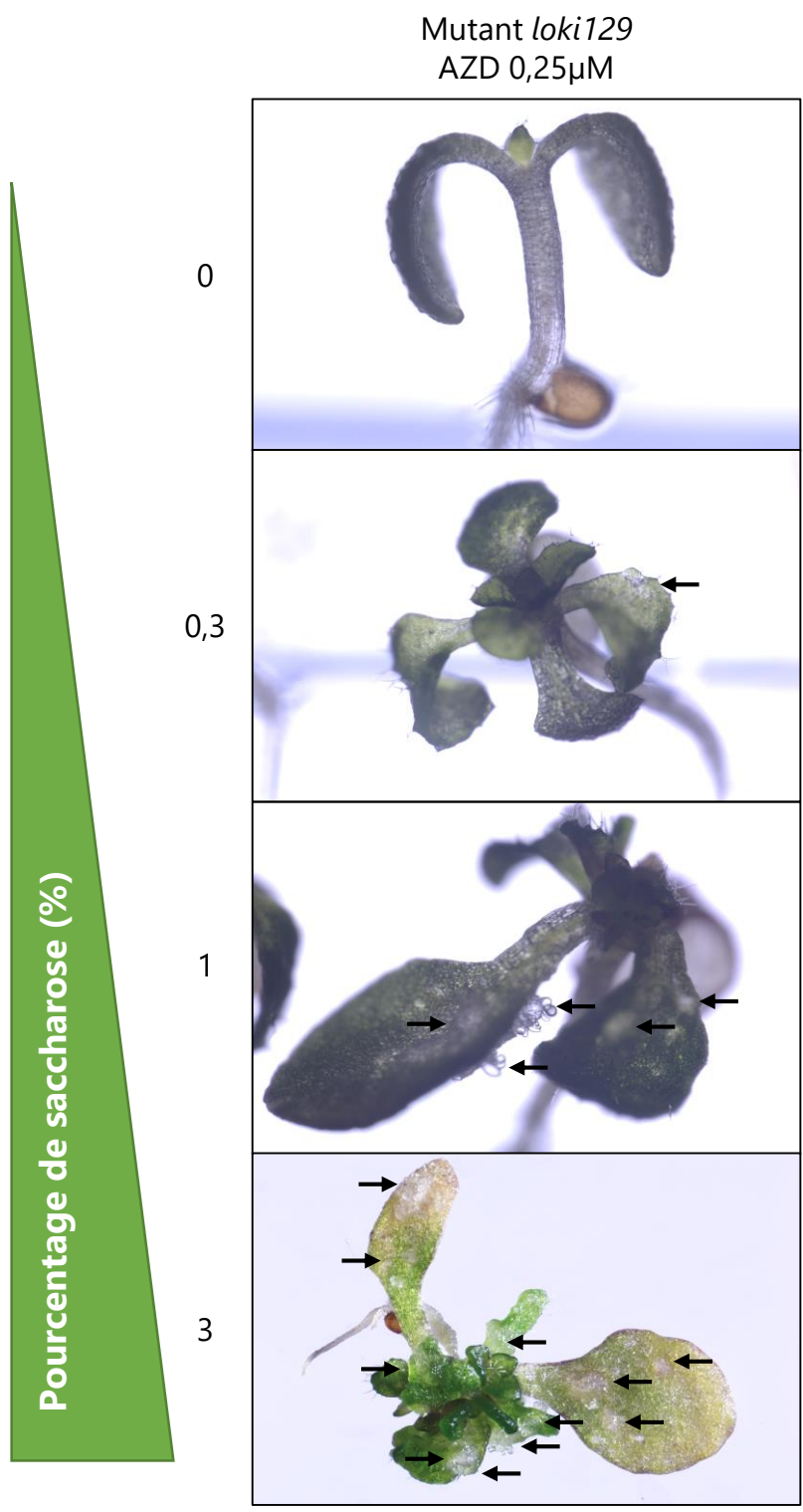


Figure 69: Le sucre stimule l'apparition des amas ectopiques sur AZD
Observations réalisées à J+24 à l'axiozoom. Les flèches indiquent les amas.

plante de manière TOR-dépendante, et ces variations sont d'autant plus marquées pour une longue inhibition de TOR.

3. Caractérisation des amas ectopiques dépendants de l'inhibition de TOR

a) Le rôle du sucre

Pour mieux comprendre les facteurs régulant l'apparition de ces amas ectopiques, j'ai cultivé les mutants *loki* sur un milieu Arabidopsis avec AZD et différents teneurs de saccharose à savoir 0/0,3/1/3% (Figure 69). Sur le milieu carencé en sucre, les plantules présentent une partie aérienne très réduite et aucun amas n'a été observé. En augmentant la teneur en sucre à 0,3%, la partie aérienne se développe davantage comparée à la condition carencée et quelques amas sont visibles. Pour 1% de sucre, la partie aérienne est plus grande que pour de faibles teneurs en sucre. Les amas sont également plus nombreux et plus gros. De même pour 3%, on observe de nombreux amas ectopiques sur la partie aérienne des mutants *loki*, mais ceux-ci sont encore plus volumineux pour cette condition. Ainsi, l'ajout de saccharose semble favoriser le développement de ces amas ectopiques dans un contexte où la kinase TOR est inhibée.

La question que nous nous sommes posée ensuite était de savoir si la nature du sucre pouvait impacter l'apparition de ces amas. J'ai donc cultivé les mutants *loki* sur AZD en présence de fructose, de glucose ou de saccharose, utilisé ici comme sucre contrôle. Des amas ont été observés sur les différentes sources de sucre testées, suggérant le fait que la nature du sucre n'influence pas le développement de ces amas, contrairement à la concentration. Ainsi, il semble y avoir une perception quantitative mais non qualitative du sucre, dans le développement de ces amas ectopiques, dépendant de l'inhibition de TOR.

b) L'inhibition de TOR est responsable du phénotype d'amas ectopiques dans le fond mutant *loki*

Nous avons vu en introduction de ce manuscrit que la kinase TOR est une protéine appartenant à la famille des PIKK tout comme les kinases PI3K. Chez les plantes, une seule protéine PI3K a été identifiée. Il s'agit de la kinase Vps34. Puisque TOR et la PI3K Vps34 sont des PIKKs et compte tenu du lien entre les voies PI3K-mTORC1 chez les animaux, nous avons étudié l'effet de différents inhibiteurs de PI3K sur les mutants *loki* pour déterminer si ces amas sont vraiment spécifiques de l'inhibition de TOR, ou plus généralement dépendants des PIKK ou même des PI3K. Pour répondre à cette question, j'ai cultivé des plantules sur DMSO (milieu contrôle négatif), AZD comme inhibiteur de TOR (milieu contrôle positif), LY294002 (LY, inhibiteur de TOR, des PIKK et de VPS34, la seule PI3K végétale), Autophinib (inhibiteur de Vps34 et de

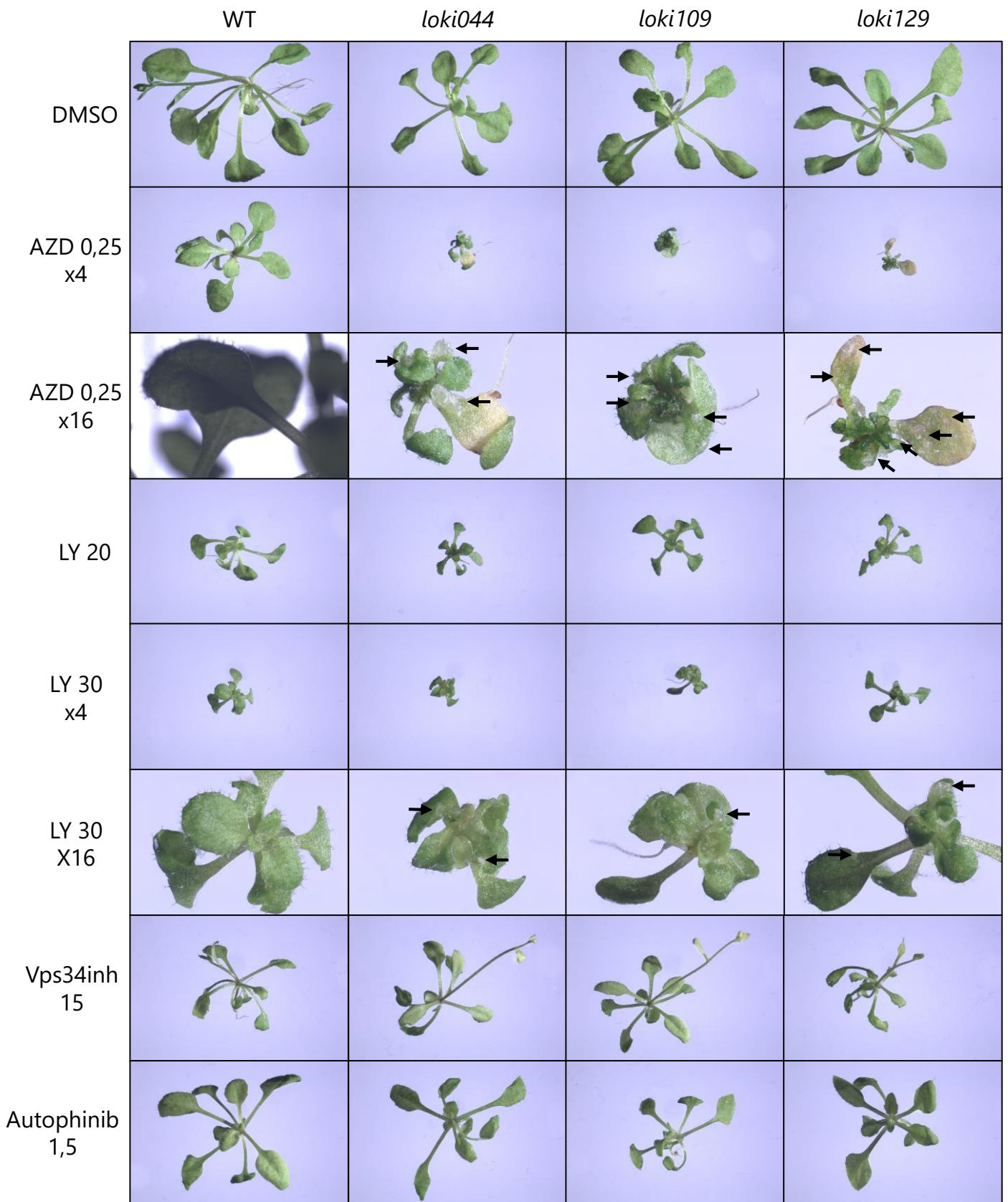


Figure 70: Les mutants *loki* ne présentent pas d'amas cellulaires en présence d'inhibiteurs de PI3K

*Plantules cultivées à J+24 in vitro sur 3% sucrose et observées à l'axiozoom. L'AZD est utilisé comme un inhibiteur spécifique de TOR. LY294002 (LY), Vps34inh et Autophinib sont des inhibiteurs de PI3K. Le LY semble induire quelques amas chez les mutants *loki* pour de fortes concentrations uniquement. Toutes les concentrations indiquées sont en μM . Les flèches indiquent les amas. Toutes les images ont été acquises au grossissement x4. AZD et LY30 ont également été acquises x16.*

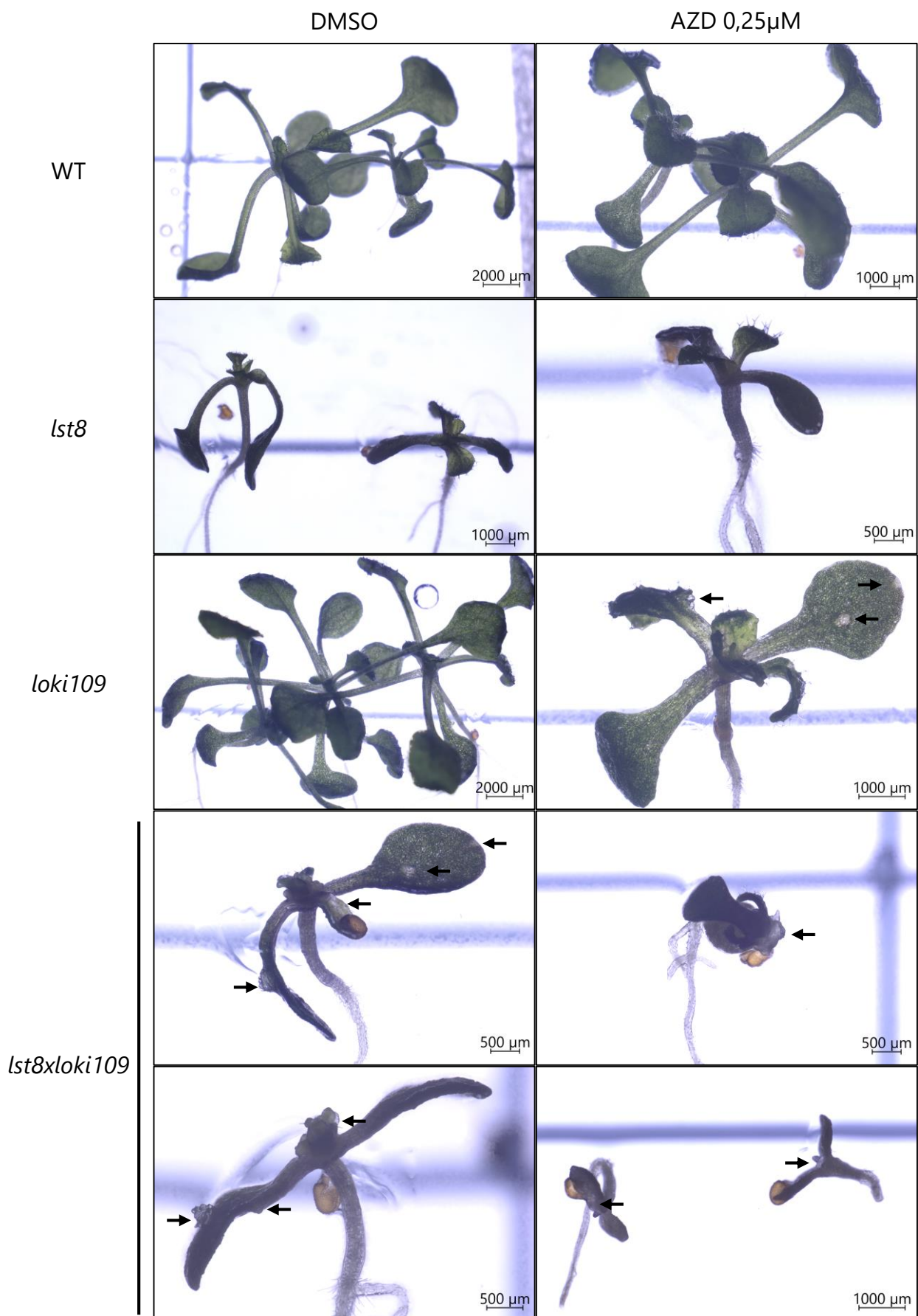


Figure 71: Les lignées résultant du croisement *lst8xloki* présentent des amas cellulaires ectopiques au niveau de leur partie aérienne sur DMSO

Plantules cultivées *in vitro* pendant 16 jours sur un milieu *Arabidopsis* 3% sucrose et en présence de DMSO (contrôle) ou 0,25 μ M d'AZD. Les flèches indiquent les amas cellulaires ectopiques. Observations réalisées à l'axiozoom.

l'autophagie) et Vps34inh (un inhibiteur spécifique de VPS34). Autophinib et Vps34inh ont été caractérisés chez les animaux mais des travaux préliminaires au laboratoire ont montré qu'ils agissaient également chez les plantes (I. Partouche, collaboration G. Panasyuk, INEM). Les observations réalisées à J+24 sont présentées en Figure 70. Comme attendu, les différents génotypes sur DMSO ont une partie aérienne bien développée, avec plusieurs feuilles vertes. Sur AZD, la partie aérienne des différents génotypes est réduite, surtout pour les mutants *loki*. Plusieurs amas volumineux sont observés sur les mutants pour cette condition. Sur LY, un inhibiteur également utilisé lors du crible initial, on constate également une diminution de la taille de la partie aérienne pour les différents génotypes. A 30µM, cette diminution est plus marquée qu'à 20µM. Ce qui est intéressant à noter pour cet inhibiteur, c'est que pour 20µM de LY les mutants *loki* ne présentent pas d'amas cellulaires mais à 30µM, quelques amas sont visibles. Ceux-ci sont plus petits que les amas observés sur AZD. Le fait que quelques amas se développent pour une forte concentration en LY laisse supposer qu'il s'agirait davantage d'un effet indirect et non spécifique du LY sur l'activité de TOR. A cette concentration, l'activité de TOR pourrait être limitée, ce qui expliquerait la présence de petits amas pour cette concentration. Il pourrait également s'agir d'un défaut de transport ou de stabilité du LY. Pour les inhibiteurs Vps34inh et Autophinib, différentes concentrations ont été testées. Bien que la croissance de la partie aérienne des plantes sauvages et mutantes soit limitée par la présence de ces inhibiteurs, aucun amas n'est visible dans ces conditions. Par ailleurs, on constate que les inhibiteurs de PI3K/VPS34 inhibent moins le développement de la partie aérienne des mutants que l'AZD, démontrant une hypersensibilité des mutants à l'inhibition de TOR. L'ensemble de ces observations suggèrent donc que le développement de ces amas ectopiques est dépendant de l'inhibition spécifique de TOR plutôt que des PI3K ou de VPS34.

Pour valider le fait que ce phénotype est bien dépendant de l'inhibition de TOR et qu'il ne s'agisse pas d'un effet collatéral dû au manque de spécificité de l'AZD lors de l'inhibition pharmacologique de TOR, les mutants *loki* ont été croisés avec le mutant *lst8* (composant du complexe TORC1). J'ai ensuite recherché dans cette descendance des doubles homozygotes *lokixlst8* par PCR. Les doubles homozygotes ont été mis en culture sur milieu Arabidopsis 3% sucrose en présence de DMSO ou d'AZD 0,25µM. Ces plantules ont été observées à l'axiozoom au bout de 16 jours de culture. Les résultats pour les croisements *lst8xloki109* sont présentés en Figure 71. Comme attendu, les contrôles sur DMSO correspondant aux plantules WT, *lst8* et mutant *loki109* ne présentent pas d'amas. Sur AZD, les plantules sauvages et *lst8* ne présentent pas non plus d'amas, contrairement au mutant *loki109*, servant de contrôle positif dans cette expérience. Comme attendu pour un effet spécifique de l'inhibition de TOR sur

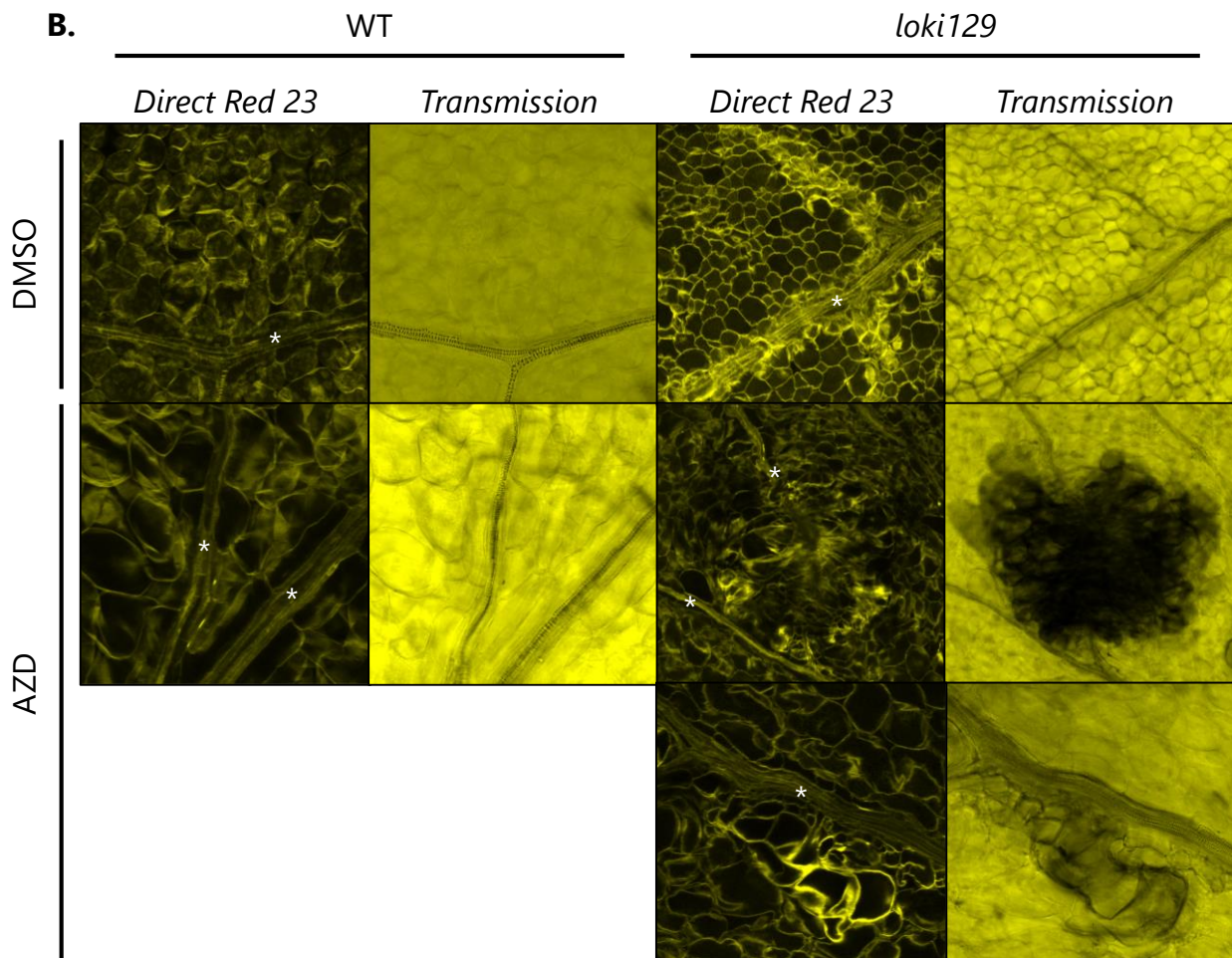
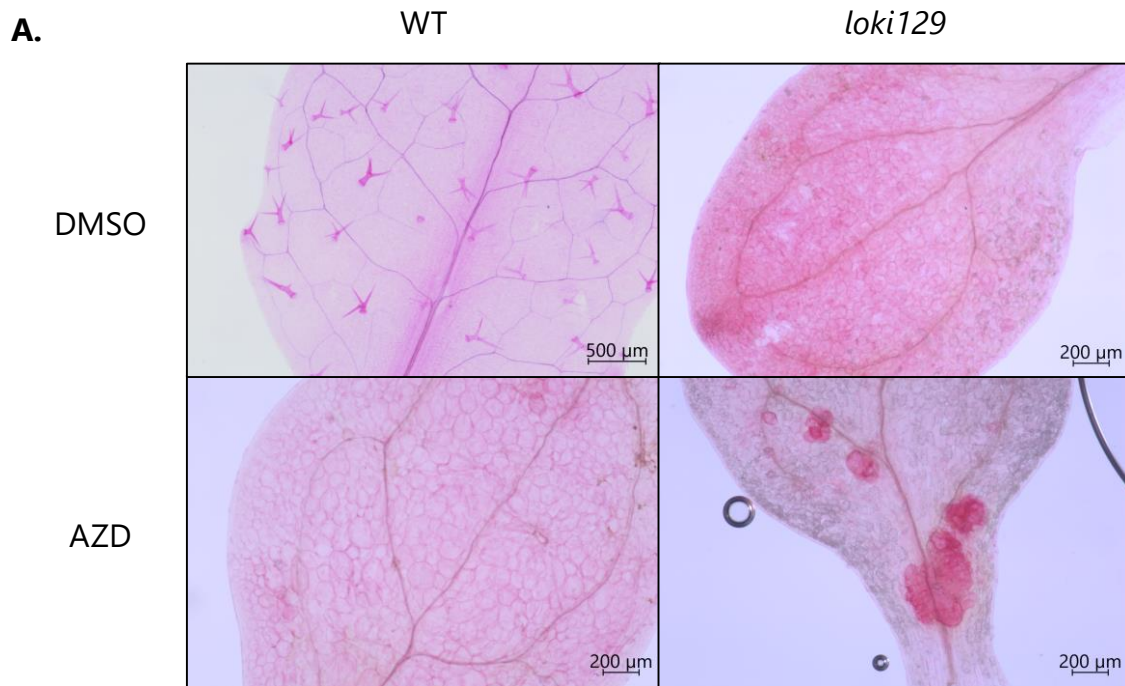


Figure 72: Les amas cellulaires ectopiques du mutant *loki* sur AZD sont situés au niveau des tissus vasculaires

Observations réalisées (A) à l'axiozoom, (B) au microscope confocal, à J+24. Les plantules ont été éclaircies avec une solution de ClearSee puis marquée au Direct Red 23, un marqueur de la paroi cellulaire. L'AZD a été utilisé à la concentration de 0,25μM. * localisent les tissus conducteurs.

l'apparition des amas cellulaires, les lignées résultant du croisement *lst8xloki109* présentent des massifs ectopiques au niveau de leur partie aérienne sur DMSO. TOR est donc bien responsable de ce phénotype chez les mutants *loki*. Sur AZD, les plantules *lst8xloki109* ont un développement général fortement réduit, indiquant une hypersensibilité à l'AZD, comme pour le mutant *lst8*.

c) Structure et organisation des amas

Pour mieux comprendre l'organisation de ces amas au sein des tissus des mutants *loki*, j'ai utilisé un protocole d'éclaircissement des plantules pour pouvoir colorer la paroi et visualiser l'agencement des cellules. Les plantules ont été cultivées 6 ou 24 jours sur DMSO ou 0,25µM d'AZD puis leurs parties aériennes ont été fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4%. J'ai ensuite traité les échantillons avec une solution d'éclaircissement (Clearsee, (Ursache et al. 2018)) et du Direct Red23, un marqueur de la cellulose (composant de la paroi végétale). Les observations réalisées à 6 jours ne semblent pas révéler de différence de développement entre le WT et *loki* sur DMSO ou AZD. En observant à l'axiozoom les parties aériennes des plantes cultivées 24 jours sur DMSO, on constate que la coloration est homogène sur l'ensemble de la feuille (*Figure 72, A*). Les cellules sont bien agencées entre elles et présentent une taille régulière. De même pour le WT sur AZD, les cellules sont rondes et organisées. En revanche, le mutant *loki129* sur AZD présente de grosses structures cellulaires anormales très colorées au niveau de sa partie aérienne. Ces structures sont de tailles différentes, suggérant des stades de développement différents entre ces amas. De plus, ces amas sont localisés au niveau des tissus conducteurs. Ce phénotype fait écho au développement des tumeurs chez les animaux, pour lesquels les cellules sécrètent des facteurs stimulant l'angiogenèse, pour récupérer davantage de nutriments pour leur croissance (Largo et al. 2020). Dans notre cas, les cellules de ces amas pourraient également se développer anormalement en prélevant des nutriments grâce aux tissus conducteurs. J'ai également observé ces échantillons au microscope confocal pour mieux appréhender l'organisation de ces amas (*Figure 72, B*). Les cellules WT sur DMSO et AZD sont de tailles régulières et agencées normalement entre elles et par rapport aux vaisseaux conducteurs, reconnaissables par leur structure allongée et annelée. Les cellules *loki* sur DMSO sont bien arrondies et régulières. Sur AZD, les cellules au sein de ces structures ectopiques sont de tailles et de formes différentes. Elles semblent être gonflées et désorganisées. On constate que la densité des amas est très importante, expliquant l'intensité de coloration constatée à l'axiozoom. Les petits amas, qui semblent correspondre à des premiers stades de développement, sont localisés au niveau des vaisseaux conducteurs et y semblent accrochés, notamment grâce à de

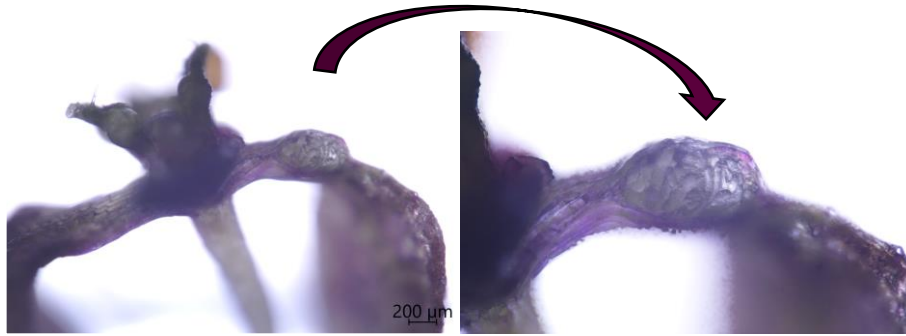


Figure 73: Amas cellulaires du mutant *loki* sur AZD de part et d'autre des feuilles
Observations réalisées à l'axiozoom sur la lignée loki044.

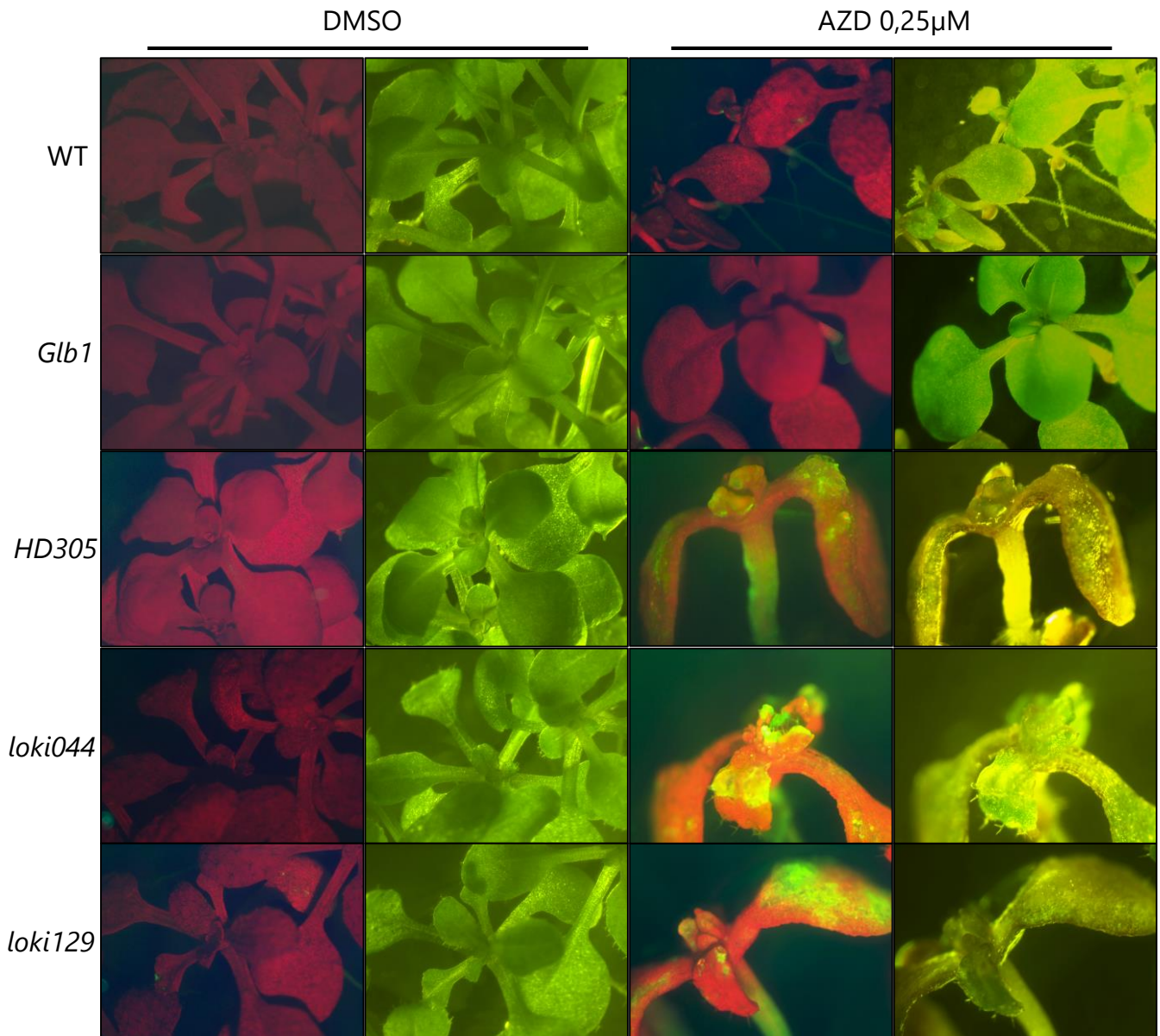


Figure 74: Les amas cellulaires sur AZD semblent être composés de cellules indifférenciées

Observation de l'autofluorescence de la chlorophylle à la loupe, avec un filtre longpass > 550nm. La chlorophylle fluorescence en rouge. Les amas ectopiques observés sur AZD 0,25μM pour les mutants HD305 et loki ont perdu cette fluorescence de la chlorophylle, suggérant une perte de différenciation des cellules. Les plantules WT et Glb1 correspondent aux contrôles négatifs de cette expérience, HD305 est un contrôle positif. Les colonnes 1 et 3 correspondent à l'autofluorescence de la chlorophylle, les colonnes 2 et 4 correspondent au visible.

petites cellules. Les amas ayant une taille plus importante sont localisés quant à eux de part et d'autre des vaisseaux. Hormis leur localisation au niveau des tissus conducteurs, l'organisation de ces amas paraît anarchique. Ces amas se développent donc au sein des feuilles et en grossissant, ils semblent ressortir des feuilles, ce qui expliquerait que certains gros amas sont visibles des deux côtés de la feuille (*Figure 73*). L'observation à la loupe de l'autofluorescence de la chlorophylle ne révèle pas de différence entre les plantules contrôles Col8 et *Glb1* ainsi que les plantules mutantes *HD305* et *loki* sur DMSO (*Figure 74*). Les feuilles de ces différents génotypes renvoient de la même manière l'autofluorescence de la chlorophylle, reconnaissable par la couleur rouge des plantules. Sur AZD, les plantules contrôles présentent une autofluorescence normale, comme observée sur DMSO. En revanche, pour les mutants *HD305* et les trois lignées *loki*, l'autofluorescence de la chlorophylle est impactée par l'inhibition de TOR. Ces plantules ont une perte de l'autofluorescence caractérisée par une décoloration localisée au niveau des amas ectopiques (*Figure 74*). Ces observations pourraient suggérer une perte de différenciation des cellules au cours du temps ou l'apparition de cellules indifférenciées. Compte tenu de l'ensemble de ces résultats, des analyses transcriptomiques ont été réalisées pour déterminer si ces amas présentent une identité cellulaire particulière. J'ai donc réalisé des microdissections laser de ces structures ectopiques (Sakai et al. 2018). Entre 4 et 10 amas de plantules *loki044* et *loki129* cultivées 24 jours sur 0,25µM d'AZD ont été récoltés, ainsi que des parties de feuilles cultivées sur AZD, mais sans amas, servant ici de contrôle. Les ARNs ont été extraits à l'aide d'un kit PICOPUR EXCILONE. Les ARNs ainsi obtenus présentaient une bonne intégrité et une concentration comprise entre 117 et 799pg/µL. Ces échantillons ont été analysés par la plateforme POPS à l'IPS2 Université Paris Saclay, en suivant un protocole dédié aux échantillons très peu concentrés. A partir de ces données préliminaires de RNAseq, nous avons identifié quelques gènes d'expression spécifique ou différentielle dans les amas. Pour le moment, il ne semble pas y avoir d'identité tissulaire particulière au niveau de ces gènes différentiels mais nous n'avons que deux répétitions assez variables. Il faudra d'autres analyses transcriptomiques tissus-spécifiques avant de pouvoir conclure avec une analyse statistiquement significative. De ce fait, ces résultats ne sont pas décrits plus en détails pour le moment.

La question qui s'est ensuite posée suite à ces observations était de savoir si ce phénotype résulte d'une division cellulaire anormale. Chez les plantes, les fortes divisions cellulaires ont majoritairement lieu au niveau des méristèmes et dépendent par conséquent de l'expression de gènes méristématiques tels que *CLAVATA (CLV)* et *WUSCHEL (WUS)*. Dans la littérature, il existe des lignées rapportrices de l'expression de ces gènes méristématiques comme dans l'étude de Pfeiffer et al., qui ont construit

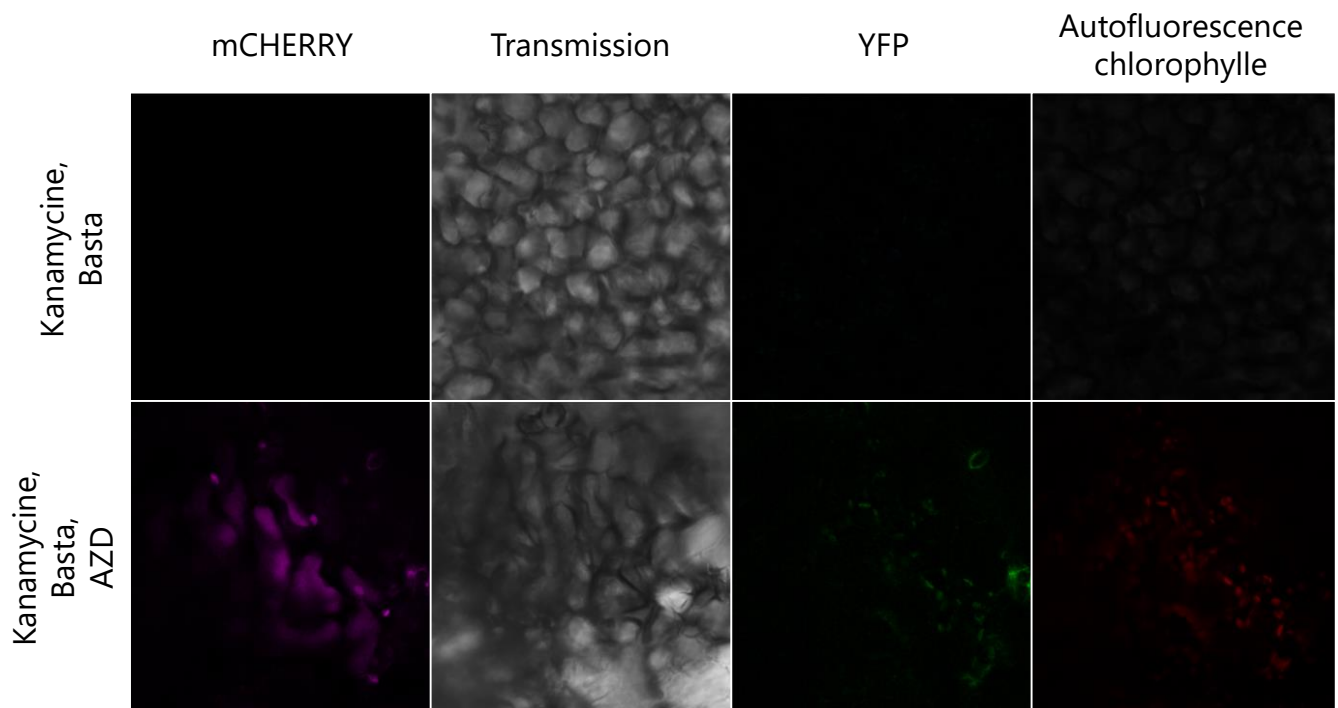


Figure 75: L'AZD semble induire une légère expression ectopique de *CLV3* au niveau des amas

*Observations au Microscope Confocal 710 sur les croisements *CLV3xWUSxloki129*. Les plantules ont été cultivées 24 jours sur milieu Arabidopsis 3% sucrose, sur une sélection Kanamycine (50mg/L), Basta (5,25mg/L) +/- AZD-8055 (0,25µM). Emission mCHERRY entre 550-650nm, YFP entre 470 et 530nm.*

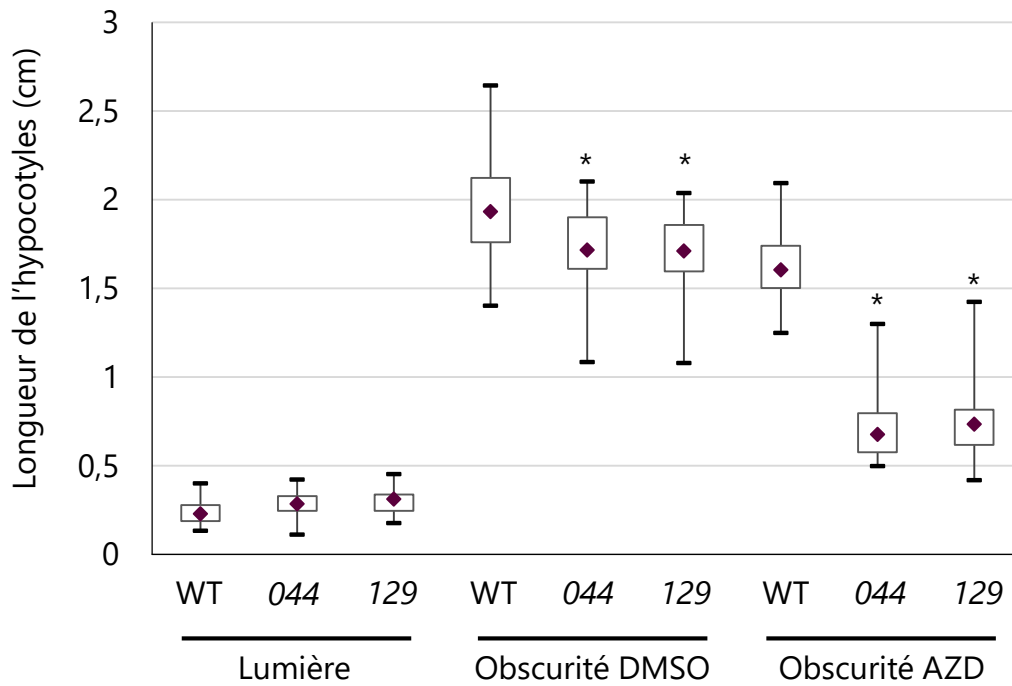
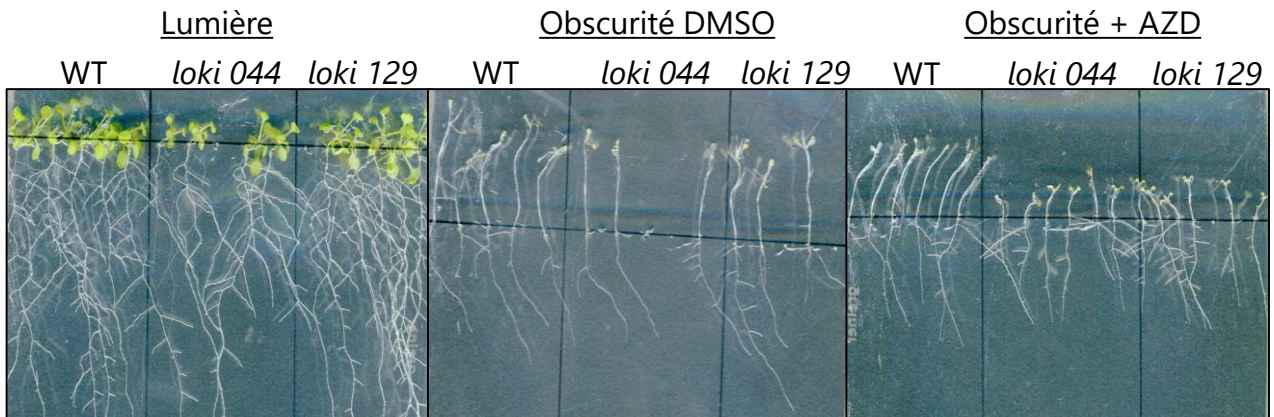


Figure 76: L'AZD inhibe la croissance des hypocotyles des mutants *loki*
 La longueur des hypocotyles a été mesurée à J+14. L'AZD a été utilisé à la concentration de 0,25 μ M. Les * représentent les différences significatives par rapport au WT. Test statistique de Kruskal & Wallis, pValue <0,05.

les lignées pCLV3::mCHERRY et pWUS::3xYFP et ont observé que l'inhibition de TOR réduisait l'expression de ces gènes rapporteurs (Pfeiffer et al. 2016). Nous disposons au laboratoire d'une lignée portant ces deux constructions (notée CLV3xWUS), qui a été croisée avec le mutant *loki 129*.

Une sélection sur Kanamycine (pour la construction pWUS) et Basta (pour la construction pCLV3) a permis d'identifier les plantes ayant la double construction CLV3xWUS. En les cultivant sur AZD, les plantules présentant des amas ont été identifiées comme étant de génotype CLV3xWUS*loki*. Ces amas ont été observés au microscope confocal pour déterminer si ces amas expriment des gènes méristématiques tels que *CLV3* ou *WUS*. Ces gènes sont normalement exprimés au niveau du méristème et ne devraient pas être exprimés au niveau des feuilles. En étudiant les rapporteurs mCHERRY et YFP, des signaux correspondants sont bien observés au niveau du méristème. Les feuilles de la lignée CLV3xWUS*loki* cultivée sur DMSO ne présentent aucun signal mCHERRY ou YFP (Figure 75). Pour les feuilles cultivées sur AZD, un faible signal mCHERRY est parfois observé dans les amas mais un fort bruit de fond parasite ce signal, rendant l'interprétation délicate. Ces résultats pourraient suggérer une expression de *CLV3* au niveau des amas mais cette observation devra être établie plus fermement en améliorant le niveau de détection.

4. Perturbation de la paroi cellulaire des mutants *loki*

L'analyse des croisements CLV3xWUS*loki* n'ayant pas révélé de forte expression ectopique de gènes méristématiques pouvant expliquer le phénotype d'amas, une seconde hypothèse a été émise. Plutôt qu'une division anormale des cellules, il pourrait s'agir d'un défaut pariétal, conduisant à des perturbations de l'élongation cellulaire et un gonflement des cellules. La culture de plantules à l'obscurité permet le développement des hypocotyles étiolés résultant uniquement des phénomènes d'élongation cellulaire et non de division (Gendreau et al. 1997). J'ai donc cultivé les mutants *loki* à l'obscurité pendant 14 jours, en présence ou en absence d'AZD. Les résultats sont présentés en Figure 76. Le contrôle lumière permet de vérifier que les hypocotyles sont bien de taille réduite au sein des mutants *loki* et que l'obscurité induit la croissance de l'hypocotyle. La culture à l'obscurité stimule l'élongation des hypocotyles des plantules sauvages et mutantes de manière assez similaire bien que les hypocotyles *loki* soient un peu plus courts que les sauvages. Par rapport à la longueur à la lumière, la croissance des hypocotyles WT à l'obscurité est huit fois supérieure tandis que celle des *loki* est environ 6 fois supérieure. Sur AZD, la croissance des hypocotyles est significativement réduite pour le WT et les mutants *loki* par rapport à la condition DMSO. Les mutants *loki* sont également significativement plus petits sur

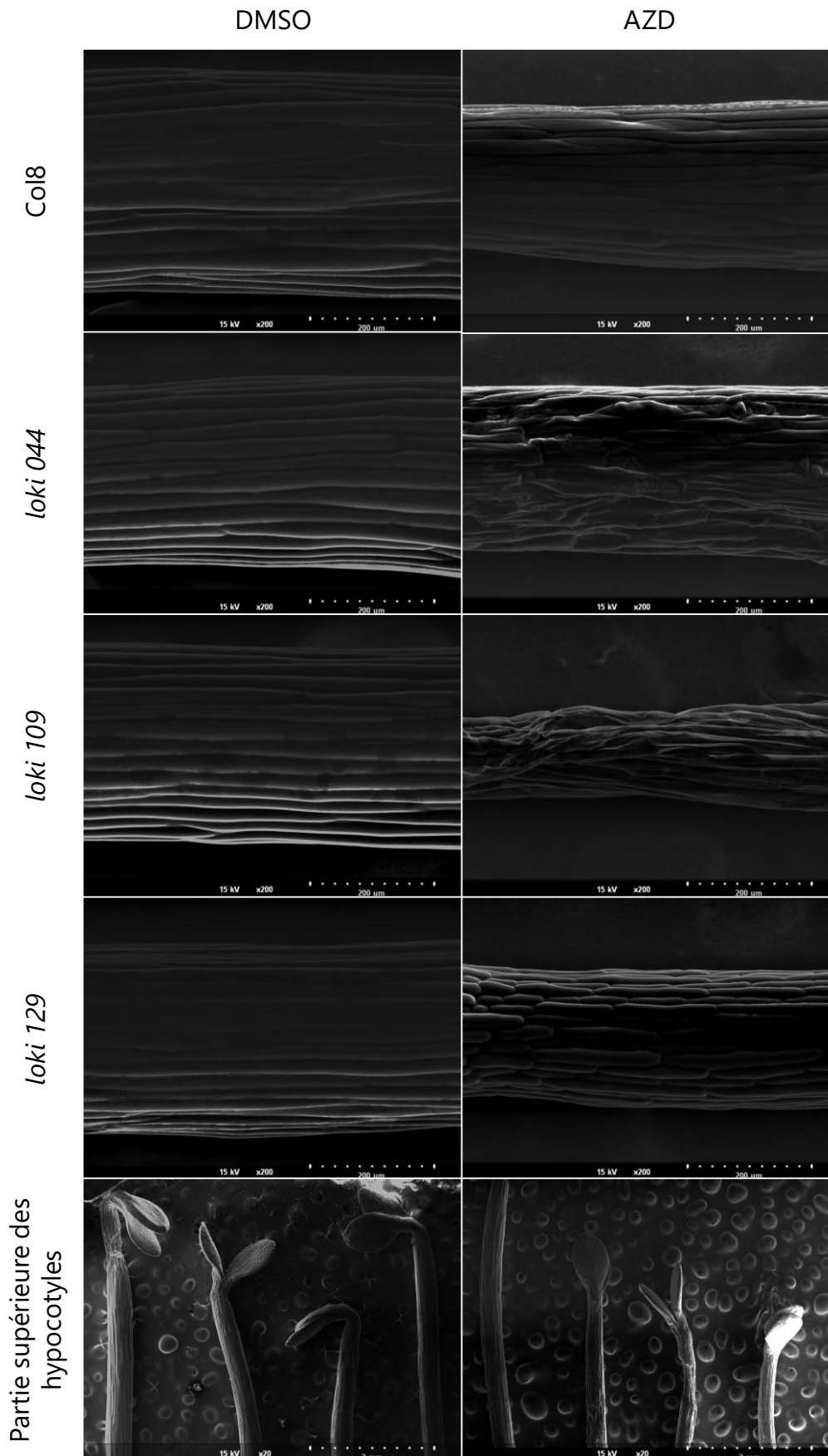


Figure 77: La structure des hypocotyles des mutants *loki* est désorganisée sur AZD

Observations au Microscope Electronique à Balayage (MEB) d'hypocotyles de 3 jours. AZD utilisé à la concentration de 0,25 μ M. Ordre des génotypes pour les images de la partie supérieure des hypocotyles: WT – 044 – 109 – 129.

AZD que le WT. En effet, la longueur des hypocotyles sauvages diminue d'environ 2 cm à 1,6 correspondant à une réduction de 20%. Les hypocotyles des mutants *loki* sont quant à eux réduits de 1,7 cm à 0,7 cm, ce qui correspond à une diminution de plus de 50% par rapport à la condition DMSO. L'AZD a donc un effet inhibiteur plus fort sur l'élongation des cellules de l'hypocotyle des mutants *loki*, ce qui peut sembler contradictoire avec un effet stimulateur sur les amas foliaires. On notera que les deux mutants *loki* présentent exactement le même comportement.

En étudiant ces hypocotyles au microscope électronique à balayage (MEB), on constate que les cellules sont bien ordonnées pour les différents génotypes sur DMSO (Figure 77). Sur AZD, l'épaisseur des hypocotyles est réduite pour les plantules sauvages et mutantes. De plus, la morphologie des cellules des hypocotyles *loki* semble perturbée en présence de l'inhibiteur de TOR. Ceci pourrait être dû soit à des défauts pariétaux propres au phénotype des mutants *loki* sur AZD, soit aux contraintes physiques exercées par le MEB et notamment au vide nécessaire à faire avant les observations. Toutefois, les hypocotyles sauvages sur AZD ne présentant pas ce phénotype, l'idée que le MEB serait responsable de cet aspect déformé des cellules serait compatible avec un défaut de rigidité de paroi, rendant les hypocotyles *loki* plus fragiles.

Dans la littérature, des mutants présentant des défauts au niveau de leur hypocotyle ont été décrits. C'est notamment le cas pour les mutants *quasimodo*. La protéine QUASIMODO1 est une glycosyltransférase liée à la membrane. Cette enzyme est impliquée dans la biosynthèse de pectine, le mutant *quasimodo1* présente d'importants défauts d'adhésion cellulaire (Bouton et al. 2002). QUASIMODO2 (QUA2) est une pectine méthyltransférase présente au niveau du Golgi, qui est nécessaire à la biosynthèse de pectine mais qui interviendrait également dans la biosynthèse de cellulose (Mouille et al. 2007; Du et al. 2020). De ce fait, le mutant *quasimodo2* présente également des hypocotyles réduits et d'importants défauts d'adhésion cellulaire, rendant la surface des hypocotyles irrégulière, avec des structures anormales. Le rouge de ruthénium est un colorant marquant l'espace intracellulaire en se fixant aux pectines, sa pénétration dans les tissus permet ainsi de visualiser de potentiels défauts d'adhésion cellulaire. J'ai donc analysé les défauts d'adhésion des mutants *loki* avec du rouge de ruthénium. Les plantules sauvages ne présentent aucune coloration des hypocotyles sur DMSO ou AZD, ce qui démontre une bonne intégrité pariétale et l'absence de défauts d'adhésion (Figure 78). Sur DMSO, les mutants *loki* peuvent présenter quelques zones légèrement teintées par le rouge de ruthénium au niveau de leur hypocotyle. Toutefois, cette coloration est beaucoup plus étendue et prononcée sur l'hypocotyle des mutants *loki* en présence d'AZD. Ces observations démontrent que les mutants *loki*, contrairement au WT, développent des défauts d'adhésion

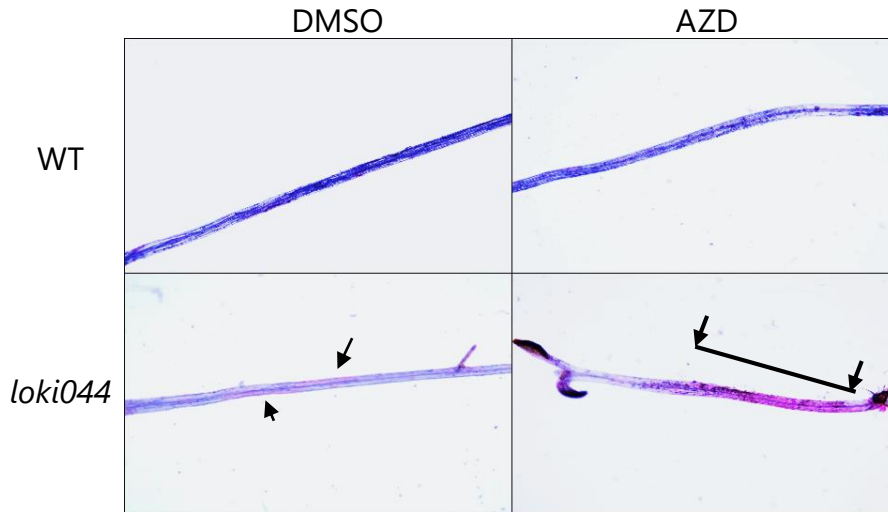


Figure 78: Les mutants *loki* présentent des défauts d'adhésion aggravés par l'inhibition de TOR

Observations réalisées à l'axiozoom. Coloration au rouge de ruthénium d'hypocotyles sauvage ou *loki044*. Les mutants *loki109* et *loki129* présentent un phénotype similaire. L'AZD a été utilisé à la concentration de $0,25\mu\text{M}$. Les flèches indiquent les zones colorées par le rouge de ruthénium.

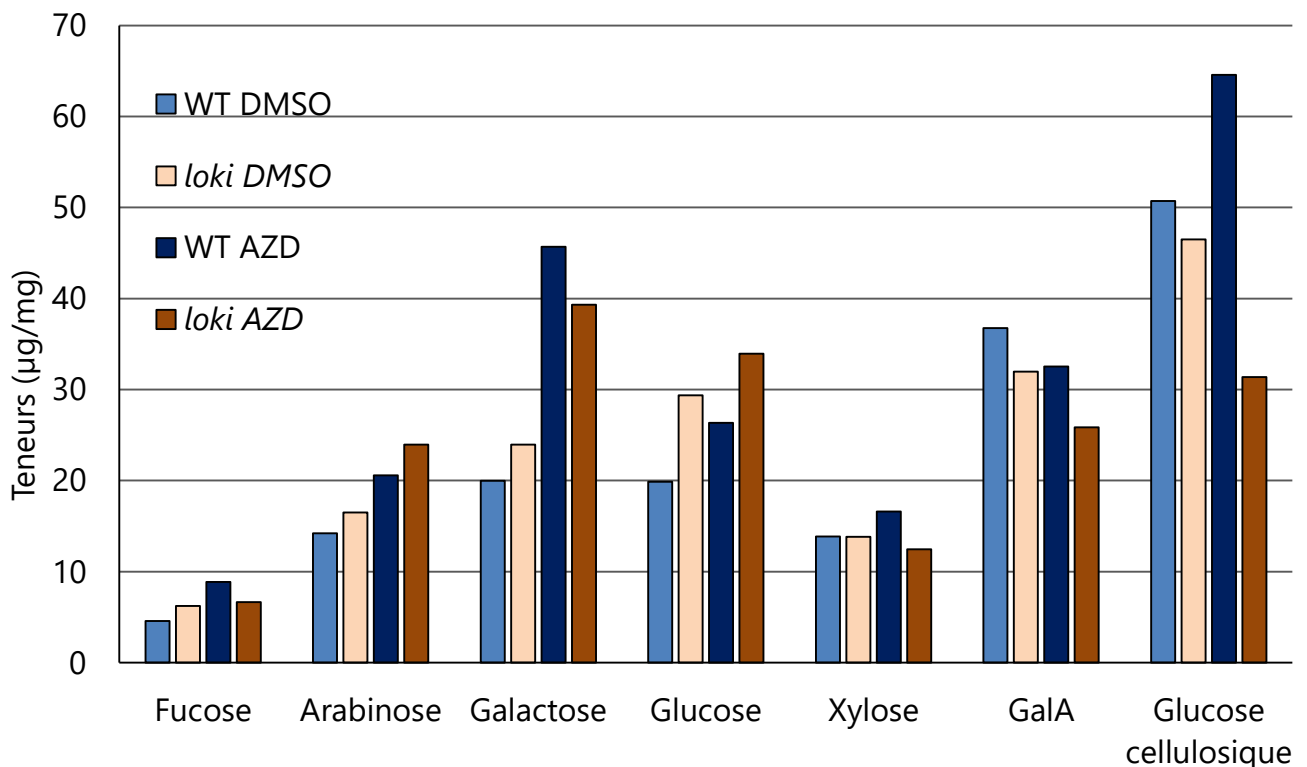


Figure 79: Analyse de la composition pariétale du mutant *loki*

Analyse réalisée sur des hypocotyles de 14 jours, correspondant au sauvage *Col8* et au mutant *loki129*. L'AZD a été utilisé à la concentration de $0,25\mu\text{M}$. 2 répétitions par condition. Les détails de l'analyse pariétale sont décrits dans le matériel et méthodes. GalA= acide galacturonique.

dépendants de l'inhibition de TOR. Puisque les mutants *quasimodo* présentent des défauts d'adhésion liés à des perturbations pariétales, une analyse de la paroi a donc été réalisée sur les hypocotyles des mutants *loki*. Les résultats sont présentés en Figure 79. Les teneurs en xylose ne paraissent pas être modifiées par la mutation *loki* ou le traitement AZD. L'arabinose et le glucose pariétaux semblent être augmentés par le traitement AZD aussi bien chez le WT et le mutant *loki129*. Pour le fucose, les teneurs sont doublées par le traitement AZD chez le WT tandis qu'aucune variation n'est constatée pour le mutant *loki*. De plus, le mutant *loki* accumule moins d'acide galacturonique (GalA) que le WT, et notamment sur AZD mais c'est principalement pour le glucose cellulosique que l'on observe la plus grande différence entre WT et mutant *loki*. Sur AZD, les teneurs en glucose cellulosique augmentent de 50 à 65µg/mg pour le WT, tandis que pour le mutant *loki*, cette teneur diminue de 48 à environ 32 µg/mg sur AZD. Cette analyse nous permet donc de conclure que le mutant *loki* présente quelques variations pariétales mineures sur DMSO par rapport au sauvage mais ces variations sont amplifiées sur AZD et majoritairement pour le glucose cellulosique. Ces résultats confirment donc l'hypothèse de défauts pariétaux dépendants de l'inhibition de TOR dans le fond mutant *loki*. Comme observé pour le mutant *quasimodo* (Du et al. 2020), ces résultats permettent donc d'expliquer la réduction de la longueur des hypocotyles des mutants *loki* sur AZD, leur coloration au rouge de ruthénium ainsi que leur fragilité.

5. Etude du lien potentiel entre LOKI et les V-ATPases

Différents éléments semblent lier la protéine LOKI à la régulation de l'activité des pompes à protons vacuolaires, les V-ATPases. Le premier est la présence du domaine Rav1p au sein de la protéine LOKI. Chez la levure *S.cerevisiae*, ce domaine ainsi que plusieurs répétitions WD40, sont également retrouvés dans la protéine RAV1. Cette protéine possède 30% d'homologie dans le domaine Rav1p avec la protéine LOKI et est un composant du complexe RAVE, avec les protéines RAV2 et Skp1p, qui participe à la régulation de l'assemblage de la V-ATPase (voir Introduction, C.1.b, complexe RAVE). Le sucre semble également jouer un rôle important chez les mutants *loki*, ce qui a été mis en évidence notamment par la sensibilité racinaire à la carence en saccharose *in vitro* et au développement des amas sucre-dépendant. Or, il est connu dans la littérature que le sucre régule l'activité des V-ATPases par leur assemblage/désassemblage. Enfin, chez les plantes, le mutant *det3*, un mutant de la sous-unité C du domaine V1 de la V-ATPase endosomale (Schumacher et al. 1999) présente des défauts pariétaux, notamment pour la biosynthèse de cellulose (Brüx et al. 2008) rappelant le phénotype du mutant *loki*. Compte tenu de ces différents

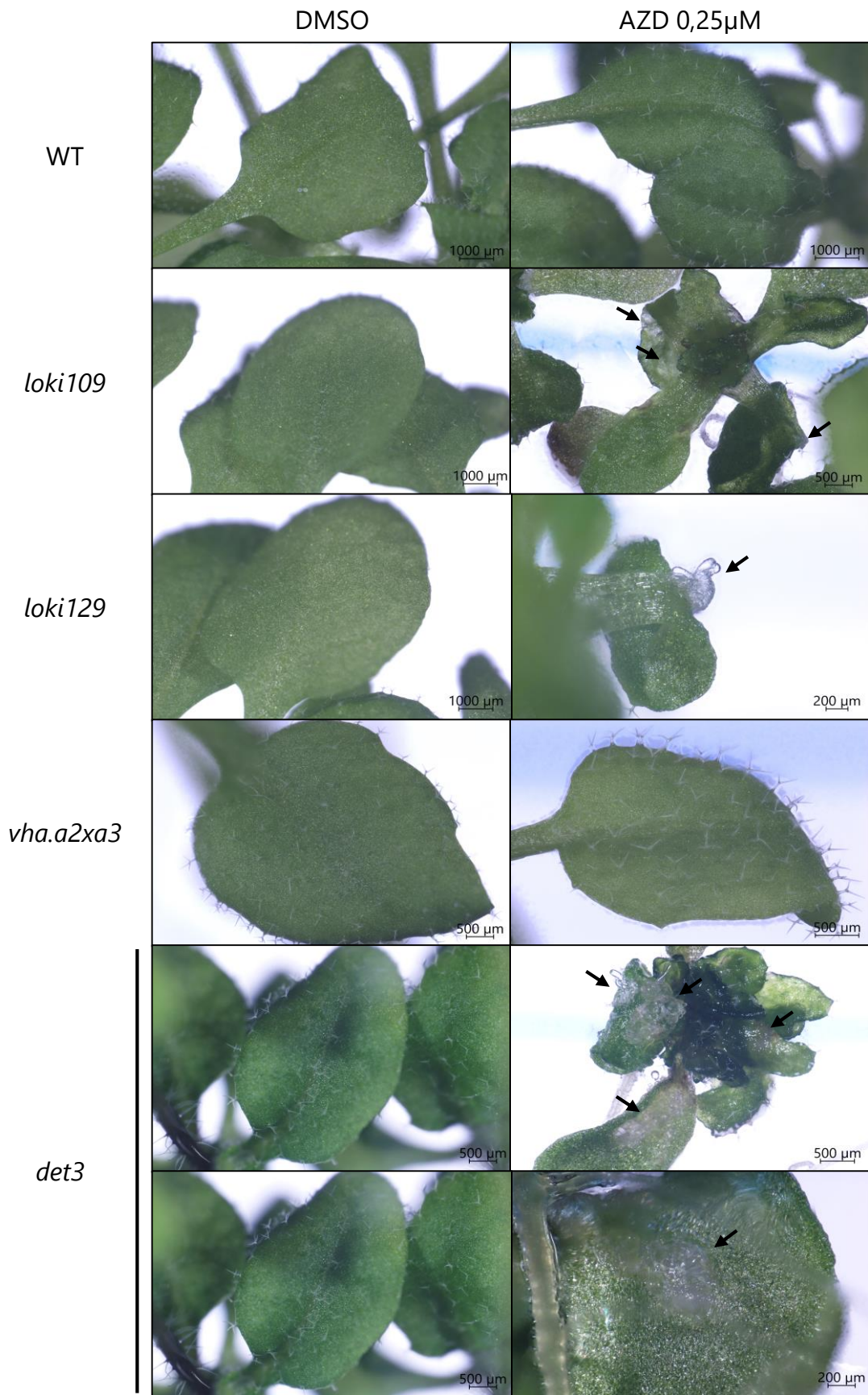


Figure 80: Le mutant *det3* présente des amas ectopiques sur AZD contrairement au double mutant *vha.a2xa3*

Observations réalisées à l'axiozoom à J+24. Les plantules ont été cultivées sur milieu *Arabidopsis* 3% saccharose. AZD utilisé à la concentration de 0,25 μ M. Les flèches indiquent les amas ectopiques.

éléments, j'ai donc posé l'hypothèse que la protéine LOKI pourrait être impliquée dans la régulation de la V-ATPase, de manière TOR-dépendante. Pour confirmer un lien entre LOKI et les V-ATPases, j'ai réalisé des analyses comparatives entre les mutants *loki* et deux mutants connus de la V-ATPase, *det3* et le double mutant *vha.a2xvha.a3* (*vha.a2xa3*), un mutant vacuolaire des deux isoformes de la sous-unité a du domaine V0 (Krebs et al. 2010).

a) Confirmation du phénotype d'amas ectopiques TOR-dépendant chez les mutants V-ATPases

Pour conforter l'hypothèse d'un lien entre LOKI et les V-ATPases, j'ai souhaité vérifier dans un premier temps si les mutants *det3* et *vha.a2xa3* présentaient le phénotype d'amas ectopiques sur AZD. J'ai cultivé ces mutants sur milieu Arabidopsis 3% sucrose, avec ou sans 0,25µM d'AZD pendant 24 jours. Sur le milieu contrôle DMSO, aucun amas n'a été observé pour les différents génotypes (*Figure 80*). Le mutant *det3* présente un développement limité, en accord avec la littérature (Schumacher et al. 1999). Comme attendu en présence d'AZD, les plantules *loki* présentent des amas cellulaires ectopiques au niveau de leur partie aérienne, contrairement aux plantules sauvages. En observant les mutants de V-ATPase connus, on constate que le double mutant *vha.a2xa3* ne développe pas d'amas malgré l'inhibition de TOR. Il présente donc un phénotype similaire aux plantules sauvages sur AZD. En revanche, des amas cellulaires semblables à ceux observés sur les mutants *loki* se développent sur la partie aérienne du mutant *det3* en présence d'AZD. Ceci conforte l'hypothèse d'un lien entre LOKI et les V-ATPases, et plus particulièrement la sous-unité C des V-ATPases du TGN puisque le double mutant *vha.a2xa3* ne présente pas ces amas. Chez la Levure, cette sous-unité C interagit avec le complexe RAVE.

Pour confirmer que ce phénotype observé chez le mutant *det3* est bien dépendant que de l'inhibition de TOR, j'ai cultivé ce mutant en présence des différents inhibiteurs de TOR et PI3K/VPS34 (LY, Vps34inh et Autophinib). Tout comme pour les mutants *loki*, le mutant *det3* ne présente pas d'amas cellulaire au niveau de sa partie aérienne en présence de ces inhibiteurs (résultats non montrés). La présence de ces amas dans le fond mutant *det3* est donc bien spécifique de l'inhibition de TOR. De plus, le développement de la partie aérienne de *det3* est hypersensible à l'AZD par rapport aux autres inhibiteurs utilisés, comme observé pour les mutants *loki* (*Figure 70*).

J'ai ensuite étudié l'organisation cellulaire de ces amas au sein du mutant *det3* à l'axiozoom et au microscope confocal avec du Direct Red 23 pour confirmer que le développement des amas de *det3* correspond bien à celui des *loki*. Les observations

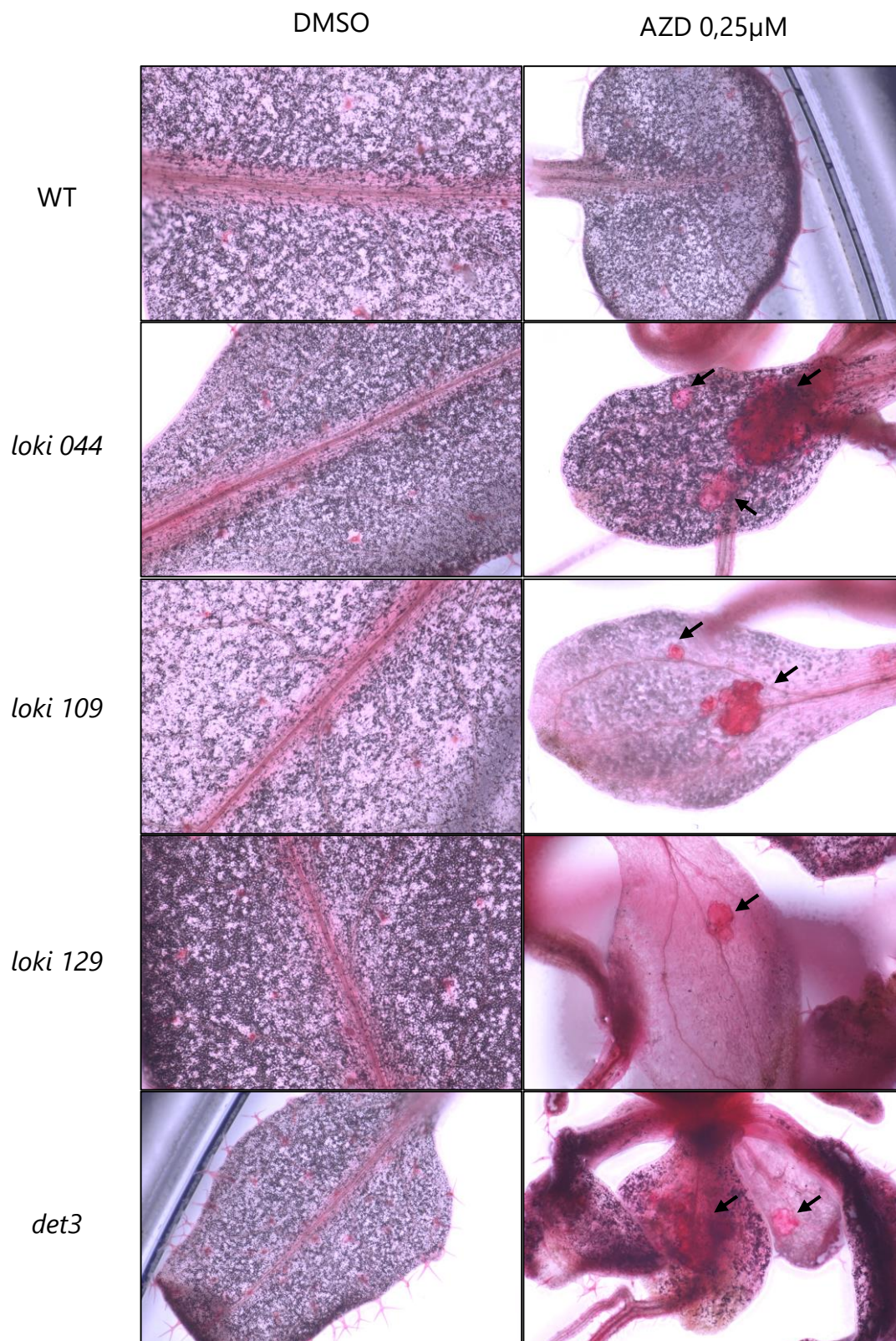


Figure 81: Les amas ectopiques sur AZD sont localisés au niveau des tissus vasculaires chez le mutant *det3* comme les mutants *loki*

Observations réalisées à l'axiozoom. Les plantules ont été cultivées 24 jours sur milieu *Arabidopsis* 3% saccharose puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) et incubées au Direct Red 23, un marqueur de la cellulose. AZD utilisé à la concentration de 0,25 μ M. Les flèches indiquent les amas. Grossissement x40 pour l'ensemble des images.

macroscopiques démontrent que les amas du mutant *det3* sur AZD sont localisés au niveau des tissus vasculaires comme chez les mutants *loki* (Figure 81). Au microscope confocal, les cellules du mutant *det3* sur DMSO sont bien organisées, rondes et de taille similaire, comme pour le WT et les mutants *loki* (Figure 82). Au bout de 24 jours sur AZD, les cellules composant les amas de *det3* sont désorganisées, de formes diverses et gonflées. Ces amas sont denses et localisés au niveau des tissus conducteurs témoignant d'un développement similaire à celui des amas des mutants *loki*. Ces observations confirment donc que les amas du mutant *det3* correspondent aux amas qui se développent sur les mutants *loki* lorsque la kinase TOR est inhibée.

b) Comparaison phénotypique entre les mutants *loki* et *det3*

Cultivés en serre, les mutants V-ATPases *det3* et *vha.a2xa3* ont un développement plus limité par rapport aux mutants *loki*, leur hauteur correspond environ à la moitié de la hauteur des plantes *loki*. Ainsi les mutants *loki* présentent un développement intermédiaire entre le WT et les mutants V-ATPases.

i. Etude de la sensibilité au stress salin

En régulant le pH cellulaire, les V-ATPases permettent l'activité de différents transporteurs et le stockage de microéléments, notamment dans la vacuole. C'est le cas du sodium (Na^+) ou des ions métalliques, qui sont stockés dans la vacuole pour limiter leur effet toxique, ou du nitrate (NO_3^-), qui peut également être stocké dans la vacuole grâce à un échangeur AtCLC, nécessitant un gradient de protons. L'inhibition de la V-ATPase va donc limiter ces différents transports et stockages, pouvant engendrer une certaine sensibilité à ces microéléments. Ainsi, le double mutant *vha.a2xa3* est hypersensible à la présence de Zinc (ZnCl_2) dans le milieu tandis que le mutant *det3* est hypersensible à la présence de NaCl (Krebs et al. 2010). Puisque les mutants *loki* et *det3* présentent le même phénotype d'amas cellulaire en présence d'AZD, j'ai donc comparé la réponse au stress salin de ces mutants. L'ensemble des géotypes ont été cultivés 11 jours en boîtes verticales contenant du milieu Arabidopsis et différentes concentrations de NaCl, 0-25-50 et 100mM. Les résultats obtenus pour l'ensemble des répétitions montrent une hypersensibilité de la croissance racinaire du mutant *det3* au stress salin, ce qui correspond aux données de la littérature. En revanche, les mutants *loki* présentent une réduction de la racine similaire à celle du sauvage pour les mêmes conditions, nous permettant de conclure que contrairement au mutant *det3*, les mutants *loki* ne sont pas hypersensibles au stress salin.

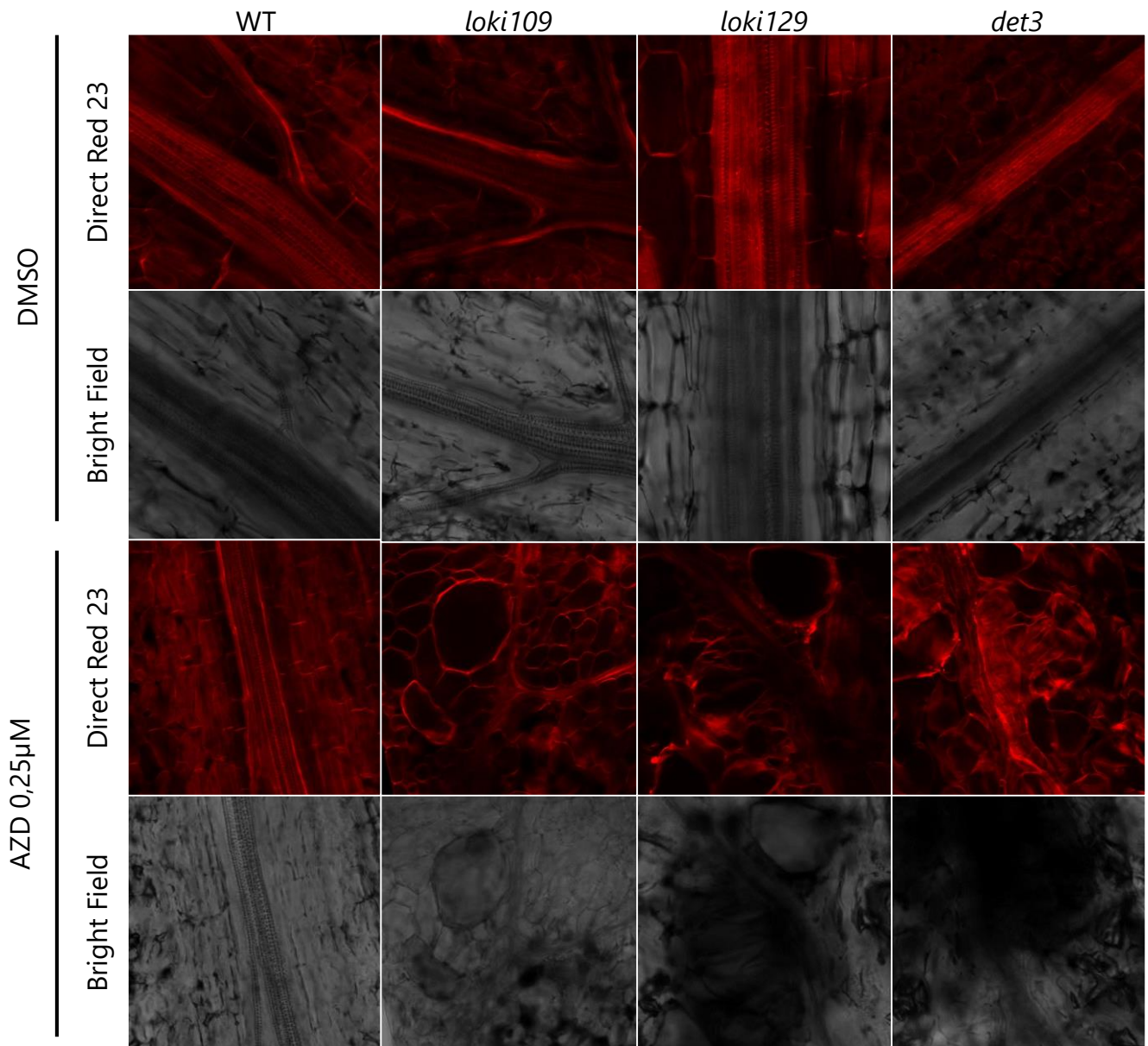


Figure 82: Les cellules composant les amas du mutant *det3* sur AZD sont désorganisées comme chez les mutants *loki*

Observations au Microscope Confocal SP5. Les plantules ont été cultivées 24 jours sur milieu Arabidopsis 3% saccharose puis fixées au PFA et incubées au Direct Red 23, un marqueur de la cellulose. AZD utilisé à la concentration de 0,25µM.

Grossissement x20, zoom2,5 pour l'ensemble des images.

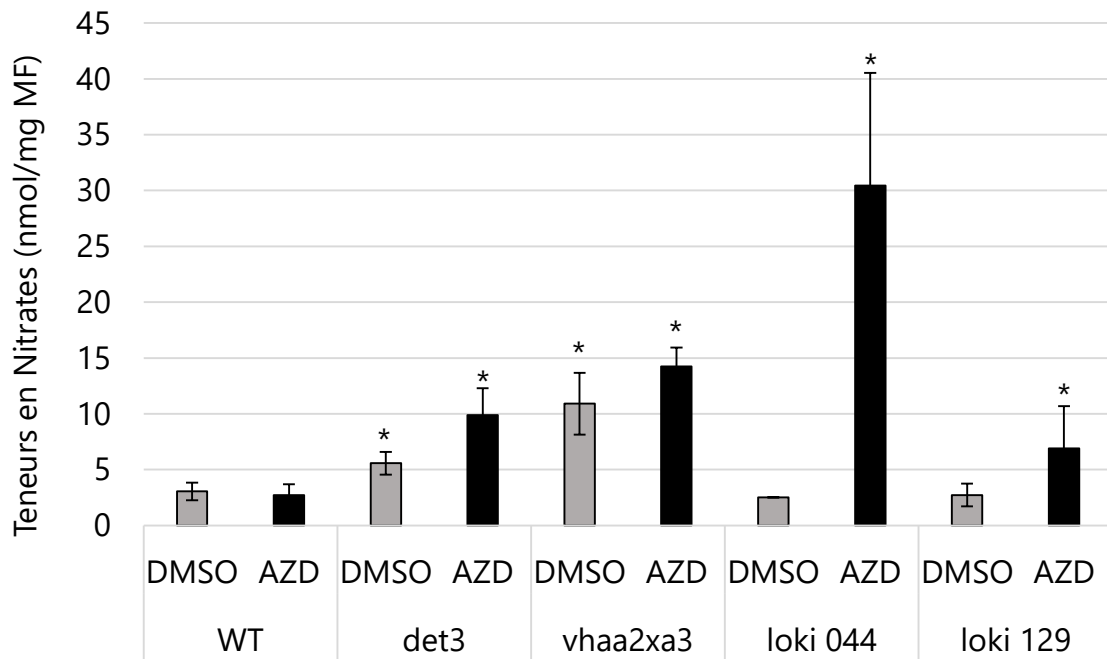


Figure 83: Dosage de nitrates au sein des mutants V-ATPase et *loki* en fonction de l'inhibition de TOR

*Dosage réalisé sur des plantules de 10 jours, provenant de deux expériences distinctes. Les * représentent les différences significatives par rapport à la condition WT. Test de Mann & Whitney, pValue <0,05.*

ii. Dosage nitrates

Il est rapporté dans la littérature que le double mutant *vha.a2xa3* présente une diminution du stockage des nitrates dans la vacuole liée à son défaut d'activité V-ATPase (Krebs et al. 2010). En contrepartie, pour limiter l'accumulation de NO_3^- dans le cytoplasme, son assimilation est stimulée comme en témoigne l'augmentation de 90% de l'activité NR et des teneurs en glutamine dans ce double mutant (Krebs et al. 2010). Pour rappel, l'azote est également un élément important pour la voie TOR et le mutant *lst8* accumule du nitrate et de la glutamine (Moreau et al. 2012). J'ai donc mesuré les teneurs en nitrates dans les mutants V-ATPases ainsi que les mutants *loki*. Dans une première série d'expériences où les plantules ont été cultivées 10 jours sur un milieu Arabidopsis sans AZD, j'ai observé une augmentation significative des teneurs en nitrates pour les mutants V-ATPases qui sont doublées par rapport au WT, mais les mutants *loki* ne présentaient aucune différence significative dans ces conditions. Il était assez surprenant que le double mutant *vha.a2xa3* accumule des nitrates par rapport à ce qui est connu dans la littérature. Une explication possible pourrait être liée à des conditions de culture différentes et au fait que dans cette expérience je n'ai pas mesuré les nitrates stockés dans la vacuole mais leur concentration globale. Il est intéressant de noter que les deux mutants V-ATPases utilisés présentent cette accumulation. La plupart des expériences réalisées lorsque TOR est inhibée montrent une aggravation du phénotype des mutants *loki*. J'ai donc réalisé deux expériences préliminaires pour mesurer les teneurs en nitrates dans ces différents mutants, cette fois dans un contexte où la kinase TOR est inhibée. Les résultats sont présentés en Figure 83. Ces premiers résultats confirment l'accumulation de nitrates observée chez les mutants *det3* et *vha.a2xa3* par rapport au WT en condition DMSO. Les teneurs en nitrates sont respectivement doublées et triplées dans ces mutants par rapport aux plantules sauvages. Les mutants *loki* testés pour cette expérience ne présentent pas de différence par rapport au WT DMSO, confirmant les résultats précédemment obtenus. En comparant les différents mutants au WT pour la condition AZD, on observe une augmentation significative des teneurs en nitrates pour l'ensemble des mutants étudiés. Les effectifs étant faibles, il serait nécessaire de refaire une troisième répétition pour valider ces résultats. Cependant, il semble que la teneur en nitrate augmente chez les mutants *loki* après inhibition de TOR.

iii. Défauts d'adhésion cellulaire

Suite aux défauts pariétaux relevés au sein des mutants *loki* et de ce qui est connu au sujet de *det3* dans la littérature, j'ai souhaité vérifier si le mutant *det3* présente également des défauts d'adhésion cellulaire. Les mutants *loki*, *det3* et le WT ont été

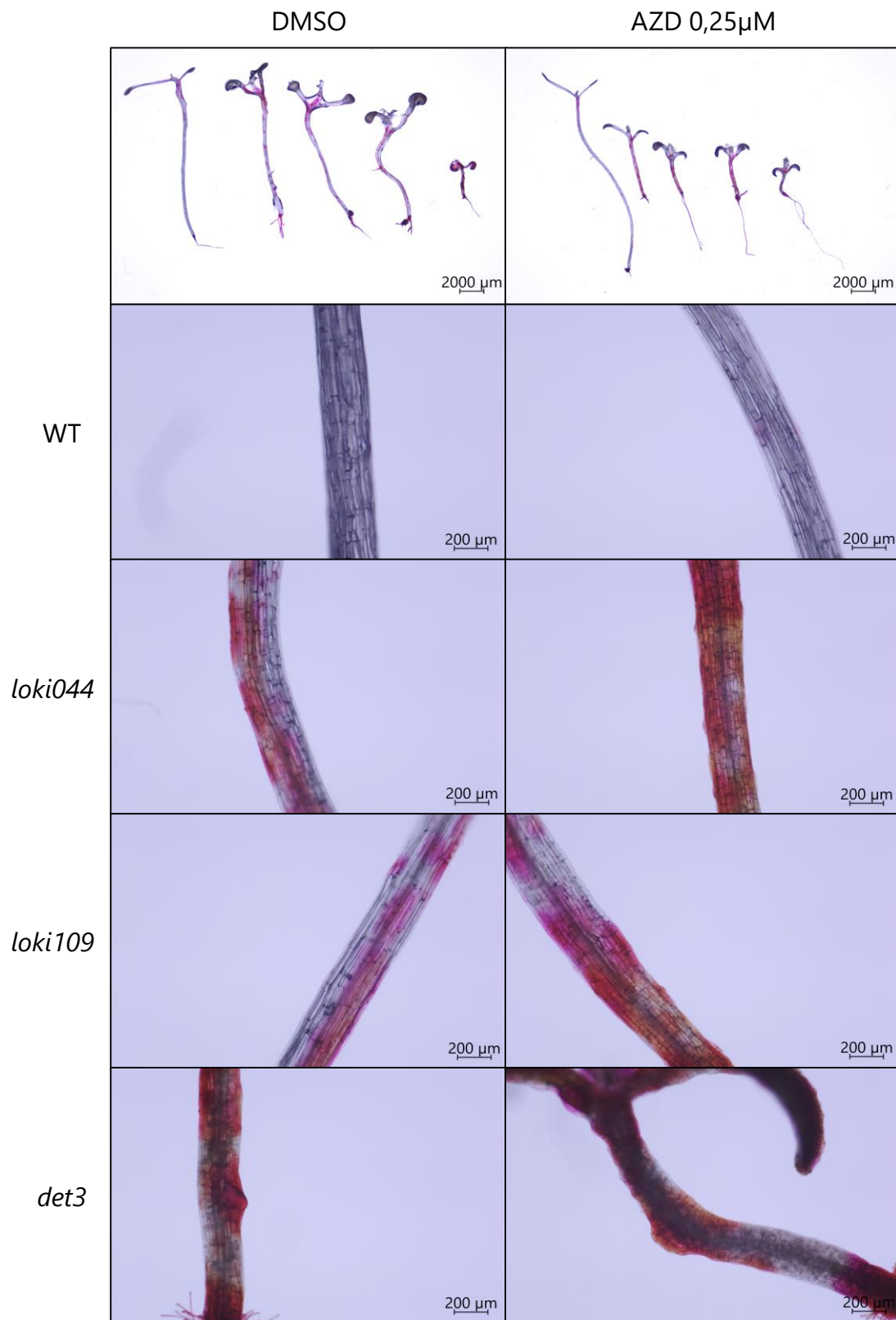


Figure 84: Les mutants *loki* et *det3* présentent des défauts d'adhésion, aggravés par l'inhibition de TOR

Observations réalisées à l'axiozoom sur des hypocotyles de 14 jours. Coloration au rouge de ruthénium d'hypocotyles dans l'ordre sauvage, *loki044*, *loki109*, *loki129* et *det3*. L'AZD a été utilisé à la concentration de 0,25 μ M.

cultivés 14 jours à l'obscurité et les hypocotyles ont ensuite été traités au rouge de ruthénium. Les résultats sont présentés en Figure 84. Comme observé précédemment en Figure 78, les plantules WT ne présentent aucune coloration rouge sur DMSO ou AZD et les mutants *loki* présentent des zones colorées plus étendues et plus intenses sur AZD, en lien avec l'aggravation des défauts pariétaux constatée suite à l'inhibition de TOR. Le mutant *det3* présente un hypocotyle très réduit à l'obscurité, dû à un défaut d'élongation cellulaire caractérisé (Schumacher et al. 1999; Brück et al. 2008). On observe également une coloration rouge des hypocotyles *det3* sur DMSO, témoignant d'importants défauts d'adhésion mentionnés dans l'étude de Schumacher et al. Dans cet article, les auteurs montrent en effet que les hypocotyles *det3* ont une surface très irrégulière, avec des cellules écrasées, ce qui explique la coloration au rouge de ruthénium observée dans cette expérience. Cette coloration paraît renforcée sur AZD. Ainsi, les mutants *loki* et *det3* semblent présenter des défauts d'adhésion cellulaire renforcés par l'inhibition de TOR.

iv. Sensibilité à l'inhibition de la biosynthèse de cellulose

Certains composants de la paroi cellulaire, ou des acteurs de leur biosynthèse, sont transportés à la paroi grâce au trafic cellulaire, nécessitant des V-ATPases fonctionnelles. Les aspects phénotypiques communs entre les mutants *loki* et *det3* suggèrent que LOKI pourrait être impliquée dans la régulation de l'activité des V-ATPases endosomales/réseau trans-golgien (TGN), affectant le transport de composés pariétaux. L'étude de Luo et al. de 2015 a montré que le mutant *det3* présente une élévation du pH du TGN et de l'endosome. Cette modification du pH entraîne une diminution de la motilité du réseau trans-golgien, ce qui se répercute sur le trafic intracellulaire. Ainsi, ce mutant *det3* présente des défauts de sécrétion pouvant affecter son développement. La cellulose est synthétisée par les complexes CesA, qui sont assemblés notamment au niveau du Golgi. Le réseau trans-golgien étant impacté dans le mutant *det3*, cela provoque une diminution de l'exocytose de CesA qui conduit à une diminution du taux de cellulose et donc aux défauts pariétaux observés. Par conséquent, ce mutant *det3* est hypersensible à l'inhibition de la biosynthèse de cellulose (Luo et al. 2015). Compte tenu du fait que le mutant *loki* présente une diminution des teneurs en glucose cellulosique aggravée par l'inhibition de TOR (Figure 79), j'ai étudié la sensibilité des mutants *loki* à l'inhibition de la biosynthèse de cellulose. Des plantules WT, *loki 044*, *loki 109*, *loki 129* et *det3* ont donc été cultivées à l'obscurité sur milieu Arabidopsis en présence de différentes concentrations d'isoxaben, un inhibiteur de la biosynthèse de cellulose. Les résultats correspondant à la longueur de l'hypocotyle et la croissance résiduelle par rapport à la condition contrôle méthanol

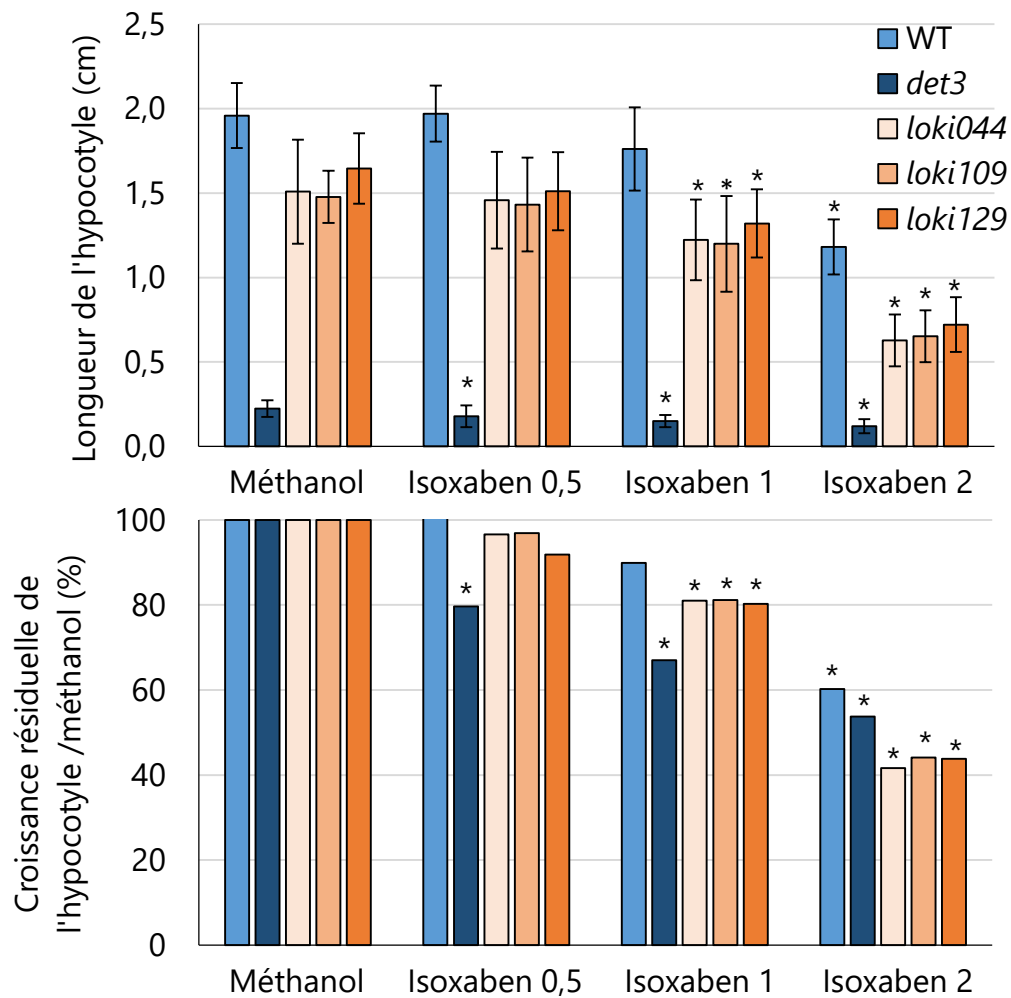


Figure 85: L'isoxaben réduit la croissance des hypocotyles des mutants *loki* et *det3*

Mesures des hypocotyles réalisées à 14 jours, sur différentes concentrations (nM) d'isoxaben, un inhibiteur de la biosynthèse de cellulose. Les * indiquent les différences significatives entre l'effet de l'isoxaben par rapport au méthanol par génotype. Test statistique de Kruskal & Wallis, pValue <0,05.

sont présentés en Figure 85. Les mutants, et principalement *det3*, ayant un développement limité par rapport au WT, les croissances résiduelles et les statistiques ont été calculées par génotype par rapport à la condition méthanol. Ainsi, on constate qu'à 0,5nM d'isoxaben, seule la longueur de l'hypocotyle du mutant *det3* est significativement réduite de 20%. Pour 1nM, les hypocotyles des trois lignées *loki* sont réduits de 20% par rapport au contrôle méthanol et *det3* présente une réduction de 30%. En augmentant la concentration d'isoxaben à 2nM, la croissance des hypocotyles des différents génotypes est significativement diminuée. Le WT présente une diminution de 40% à cette concentration, le mutant *det3*, environ 50% tandis que les mutants *loki* semblent les plus sensibles, avec une réduction de 60%. Le fait que la longueur des hypocotyles *loki* soit significativement diminuée dès 1nM d'isoxaben alors que le WT n'y est sensible qu'à partir de 2nM démontre que les mutants *loki* sont plus sensibles à cette inhibition de la biosynthèse de cellulose que le WT. Ces résultats permettent donc de confirmer à la fois l'hypersensibilité du mutant *det3* à l'inhibition de la biosynthèse de cellulose et montrent celle des mutants *loki*. Ceci laisse supposer que LOKI pourrait être impliquée dans la régulation de la V-ATPase endosomale et que sa mutation perturberait l'activité V-ATPase et le trafic cellulaire, conduisant à des défauts pariétaux.

v. Etude transcriptomique comparative entre les mutants *loki* et *det3*

Afin de comparer plus finement les réponses des mutants *loki* et *det3* à l'inhibition de TOR, une analyse transcriptomique par RNAseq a été réalisée sur des plantules cultivées 18 jours sur un milieu Arabidopsis contenant 3% de saccharose en présence de 0,25µM d'AZD ou DMSO, comme milieu contrôle.

Le nombre total de gènes analysés lors de cette étude s'élève à 12487 gènes. Les représentations en analyse hiérarchique globale (Figure 86) montrent que davantage de gènes sont différentiellement exprimés entre le mutant *det3* et le WT sur DMSO par rapport aux comparaisons *loki* vs WT. Les mutants *loki044* et *loki129* ont des profils très semblables, malgré le fait que l'insertion d'ADN-T soit située chez ces mutants de part et d'autre du domaine Rav1p. La moyenne des niveaux d'expression des gènes chez le mutant *loki* sur DMSO par rapport au WT montre des variations assez faibles pour les gènes différentiellement exprimés. En revanche, pour les plantules traitées à l'AZD, à la fois le nombre mais aussi les amplitudes de variation d'expression sont nettement plus importantes (Figure 86). Il en est de même pour le mutant *det3*. De plus, les profils transcriptomiques de gènes différentiellement exprimés présentent des similitudes très nettes et un recouvrement important entre les comparaisons *loki* vs WT

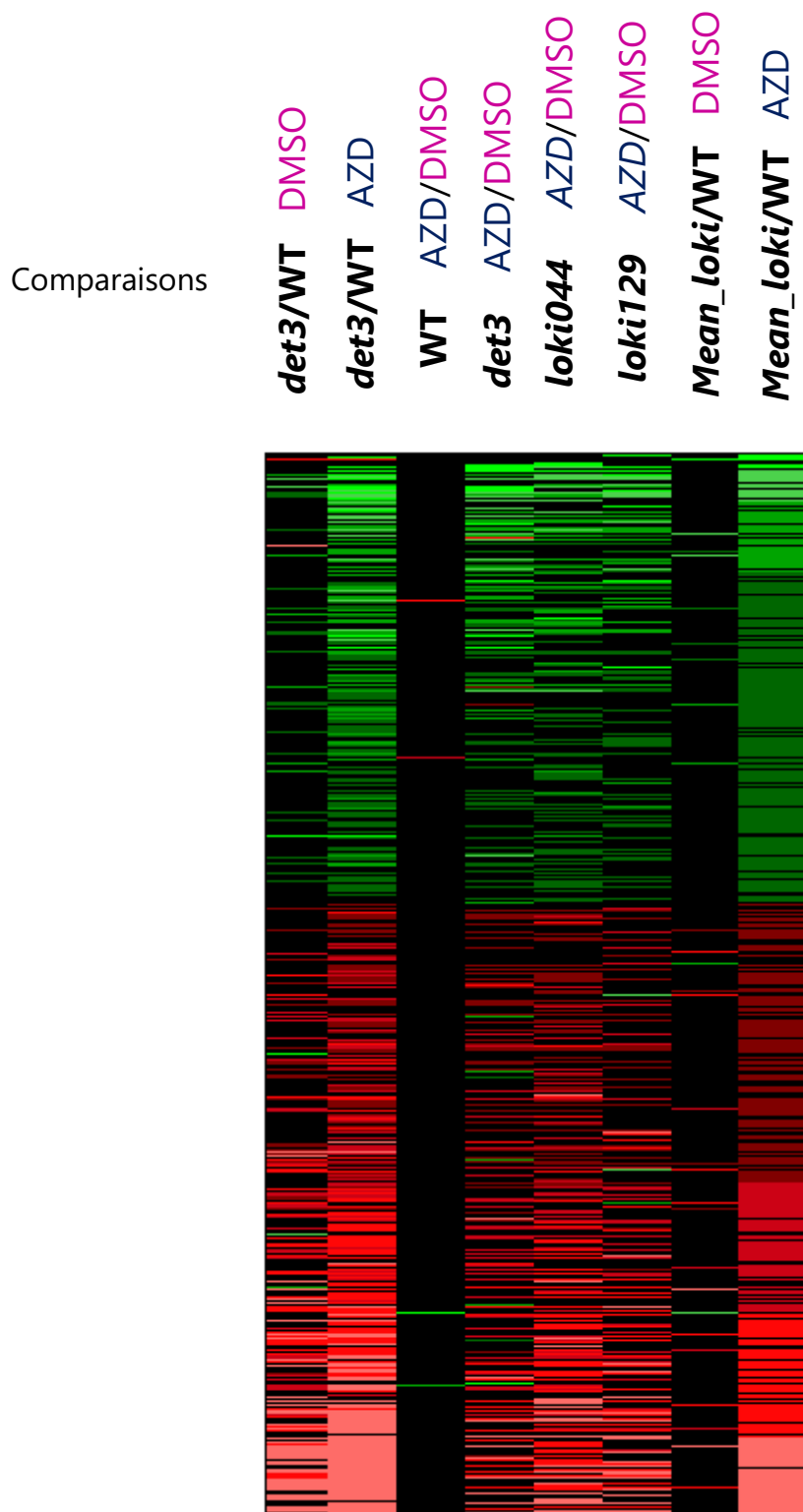


Figure 86: Regroupement hiérarchique des gènes différentiellement exprimés dans l'analyse transcriptomique

Analyse transcriptomique sur des plantules de 18 jours cultivées +/- AZD 0,25µM. Les gènes pour lesquels l'analyse statistique a montré une expression différentielle ($\text{Log}_2\text{FoldChange} < -0,5$ et $> 0,5$, $p\text{Value} < 0,1$) dans la comparaison entre la moyenne d'expression des deux allèles loki et l'expression chez le contrôle sauvage sur AZD ont été retenus. Sont représentés en rouge, les gènes stimulés et en vert, les gènes réprimés. L'intensité des couleurs indiquent des variations plus importantes. Les niveaux d'expression ont été déterminés en nombre de reads normalisés. Les détails de l'analyse transcriptome se trouvent dans la partie Matériel et Méthodes.

et *det3* vs WT. Ceci suggère une réponse semblable à l'AZD entre les mutants *det3* et *loki*.

J'ai ensuite comparé de manière générale le nombre de gènes différentiellement exprimés, et ce de manière significative ($p\text{Value} \leq 0,05$), entre les mutants et le sauvage WT sur DMSO. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Génotypes	Nombre total de gènes différentiellement exprimés	Log₂FoldChange ≥ 1 (Stimulation par rapport au WT)	Log₂FoldChange ≤ -1 (Répression par rapport au WT)
<i>det3</i>	2200	1208	184
<i>loki044</i>	54	31	19
<i>loki129</i>	1021	316	95

En absence d'inhibiteur, la mutation *det3* impacte davantage le profil transcriptomique que la mutation *loki*. Par rapport au WT, le mutant *loki044* semble d'ailleurs présenter des différences transcriptomiques plus modérées que le mutant *loki129*.

J'ai ensuite étudié le nombre de gènes dont l'expression est significativement modifiée ($p\text{Value} \leq 0,05$) en présence d'AZD par rapport à la condition DMSO. Les résultats sont présentés dans le tableau ci-dessous :

Génotype	Nombre total de gènes différentiellement exprimés	Log₂FoldChange ≥ 1 (Stimulation par l'AZD)	Log₂FoldChange ≤ -1 (Répression par l'AZD)
WT	117	43	33
<i>det3</i>	4338	835	783
<i>loki044</i>	4437	1244	521
<i>loki129</i>	3169	794	459

Seuls 117 gènes sont différentiellement exprimés chez le WT dans nos conditions sur AZD. Ces plantules sauvages présentent donc assez peu de variations quant à l'expression des gènes sur AZD contrairement aux mutants *loki* et *det3*, dont plus de 3000 gènes sont impactés par le traitement AZD. Ceci est en accord avec les résultats de la classification hiérarchique en Figure 86 et démontre donc un fort impact de l'inhibition de TOR sur ces mutants. De plus, l'AZD semble davantage stimuler l'expression des gènes des mutants *loki* par rapport à la condition DMSO, puisqu'un plus grand nombre de gènes est stimulé plutôt que réprimé en présence d'AZD.

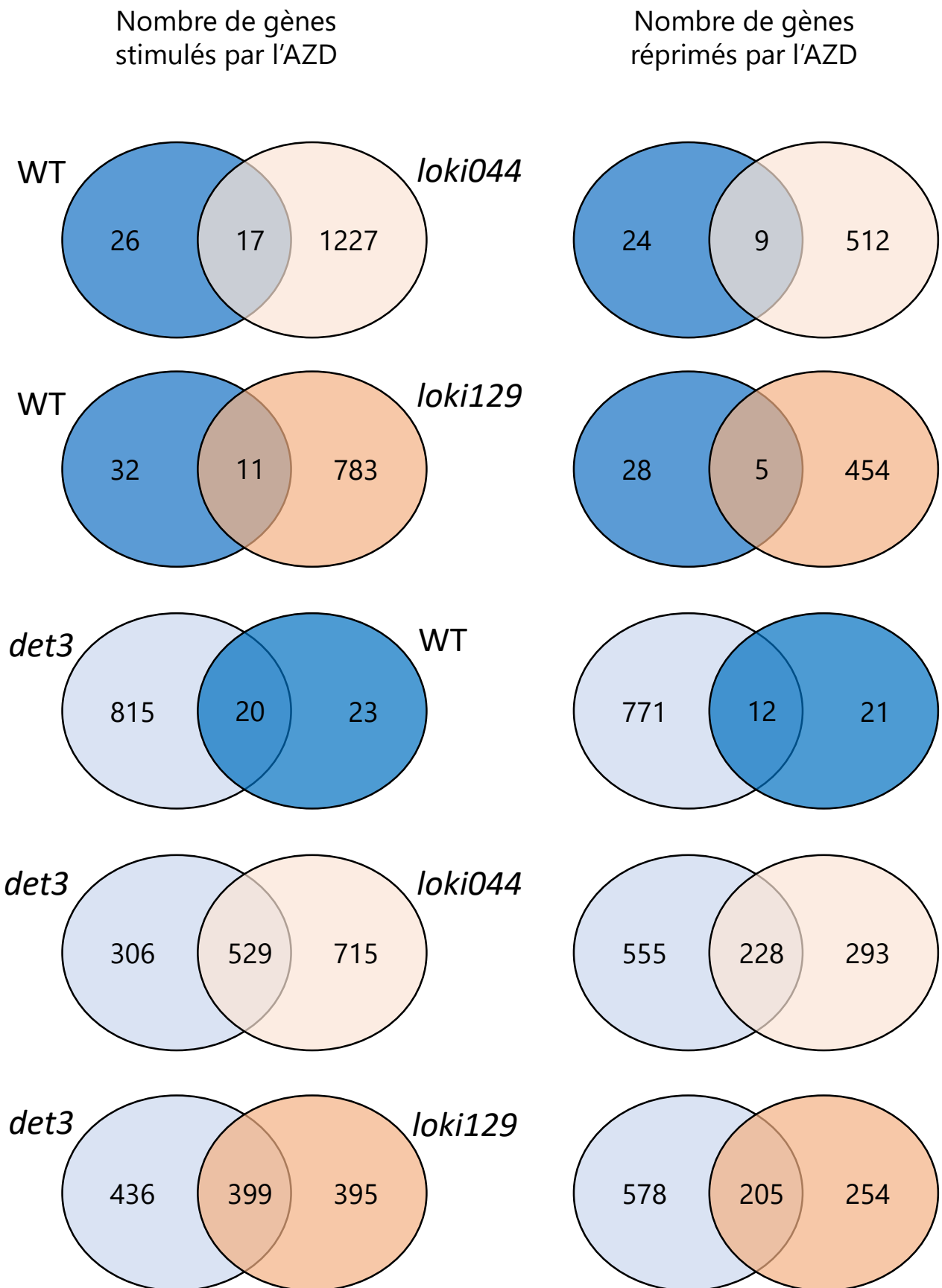


Figure 87: Diagrammes de Venn

Analyse transcriptomique sur des plantules de 18 jours cultivées +/- AZD 0,25 μ M. Le bleu foncé correspond au WT, le bleu clair au mutant *det3*, le beige au mutant *loki044* et l'orange à *loki129*. Le nombre de gènes correspond aux comparaisons AZD/DMSO pour les \log_2 FoldChange ≥ 1 (stimulation sur AZD) et ≤ -1 (répression sur AZD).

Pour le WT, le nombre de gènes différentiellement exprimés est plus faible que celui constaté dans la littérature (plus de 2500 gènes, Dong et al. 2015) mais nos conditions d'inhibition sont modérées (0,25µM d'AZD contre 2µM dans l'étude mentionnée). Toutefois, on retrouve des variations d'expression attendues après traitement à l'AZD comme une surexpression du gène *PRODH* (AT3G30775), codant pour une enzyme impliquée dans le catabolisme de la proline ou *SIP2* (AT3G57520), impliqué dans le catabolisme du raffinose. Ces gènes sont bien significativement induits par l'AZD, validant le fait que l'AZD impacte bien le sauvage dans nos conditions expérimentales. Il est également intéressant de noter que les mutants *loki* et *det3*, contrairement au WT sur AZD, ne présentent pas d'induction des gènes *PRODH* et *SIP2*. Ces mutants semblent donc avoir perdu cette régulation.

En comparant les gènes stimulés par l'AZD entre les différents génotypes étudiés (*Figure 87*), on constate que le WT (en bleu foncé sur les diagrammes de Venn) présente peu de gènes en commun avec les mutants *loki* et *det3*, ce nombre n'excédant pas 20 gènes en commun. Les mutants *loki* et *det3* répondent donc de manière différente à l'inhibition de TOR par rapport au sauvage. La comparaison entre le mutant *det3* et les mutants *loki* permet de mettre en évidence une certaine conservation dans cette réponse à l'AZD. 529 et 399 gènes sont respectivement conservés entre *det3* et *loki044*, et entre *det3* et *loki 129*, ce qui correspond environ pour chaque mutant à la moitié du nombre de gènes stimulés par l'AZD. Concernant les gènes réprimés par l'AZD, moins de la moitié des gènes réprimés chez le WT sont en commun avec les mutants. La comparaison entre les mutants révèle que plus de 200 gènes sont réprimés en commun entre *det3* et *loki*. Toutefois, plus de 550 gènes sont spécifiquement réprimés sur AZD dans le fond mutant *det3* sur 783.

Pour étudier l'implication dans les processus biologiques de ces différents gènes stimulés sur AZD, j'ai réalisé une analyse ontologique de répartition en classes fonctionnelles des gènes différentiellement exprimés pour les différents génotypes (*Figure 88*). Concernant le sauvage (*Figure 88, A*), les réponses à l'AZD correspondent à des réponses cellulaires et métaboliques et des réponses aux stress, impliquant notamment des signaux de transduction, des facteurs de transcription et des enzymes, pour adapter le développement de la plante. On constate également des modifications au niveau des composants cytoplasmiques et de la membrane plasmique. Concernant les mutants *loki* et *det3*, cette analyse révèle à nouveau un profil très conservé entre les mutants (*Figure 88, B, C et D*). Les gènes induits par la présence d'AZD sont liés à des réponses aux stress, des gènes codant pour des récepteurs cellulaires, des facteurs de transcription et différentes enzymes. Les mutants *loki* présentent également une stimulation de l'expression de différents transporteurs. Au niveau des composants

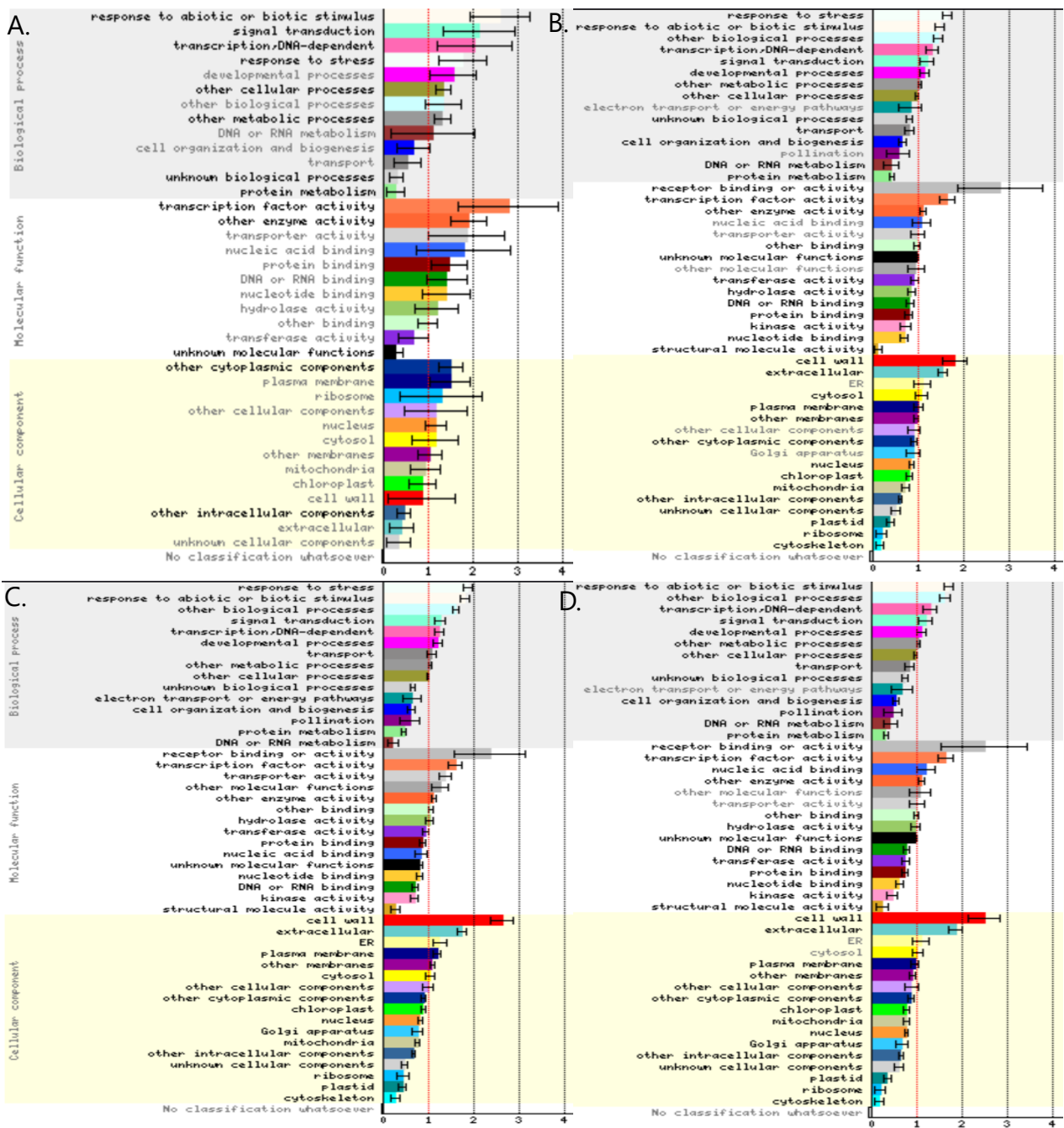


Figure 88: Analyse ontologique des processus biologiques régulés par l’AZD dans les mutants *loki* et *det3*

L’enrichissement dans les classes fonctionnelles pour chaque comparaison transcriptomique a été réalisé sur le site de l’Université de Toronto (BAR, classification super-viewer). Le rapport de la fréquence observée de ces classes sur la fréquence attendue dans le génome complet d’*Arabidopsis* est indiqué en abscisse. Analyse transcriptomique sur des plantules de 18 jours cultivées +/- AZD 0,25µM.

(A) WT, (B), mutant *det3*, (C) mutant *loki044*, (D) mutant *loki129*. Analyse réalisée pour les \log_2 FoldChange ≥ 1 (stimulation sur AZD) ayant une pValue < 0,05.

cellulaires, le profil entre les mutants *loki* et *det3* est également très similaire, avec majoritairement une stimulation de l'expression des gènes dont la fonction est associée à la paroi cellulaire, ce qui n'est pas retrouvé chez le WT sur AZD. Ce résultat est donc à mettre en lien avec les perturbations pariétales mesurées chez les mutants *loki* et *det3* et le phénotype d'amas cellulaires ectopiques observés chez ces mutants sur AZD. De plus, cette analyse révèle aussi des modifications de l'expression des gènes dont la fonction est associée au réticulum endoplasmique et à des composants extracellulaires.

En détaillant plus précisément l'expression de certains gènes, on se rend compte que les mutants *loki* et *det3* présentent des réponses similaires à l'inhibition de TOR par rapport au sauvage. De nombreux gènes sont ainsi stimulés ou réprimés par l'AZD dans ces fonds mutants contrairement au WT. De même, l'expression de gènes peut être induite ou limitée par l'AZD par rapport à la condition contrôle DMSO chez les mutants *loki* et *det3*, tandis qu'aucune différence significative n'est constatée pour le WT entre les conditions DMSO et AZD. Ces résultats confirmeraient donc l'existence d'un lien entre les protéines DET3 et LOKI. J'ai ensuite étudié plus en détails certaines catégories de gènes. Dans cette analyse, les gènes codant pour des acteurs de la voie TOR tels que *TOR*, *RAPTOR*, *YAK1* ou des sous-unités de *SnRK1*, ne semblent pas particulièrement affectés dans le fond mutant *loki* que ce soit en absence ou en présence d'AZD.

Comme l'aspect des amas cellulaires et leur formation pourraient être associés à la mise en place de territoires méristématiques caulinaires ectopiques, j'ai étudié l'expression de certains gènes méristématiques. Différents gènes homologues à *CLAVATA3* sont ainsi de deux à onze fois plus exprimés dans les fonds mutants *loki* et *det3* sur AZD par rapport au WT sur AZD. Cette stimulation est induite par le traitement AZD par rapport au traitement DMSO pour les mutants. Aucune variation n'est observée pour ces gènes pour le WT malgré l'ajout d'AZD. Cette induction sur AZD a été confirmée par une analyse RT-qPCR, démontrant également une stimulation de l'expression de *CLV3* par l'AZD, pour les mutants *det3* et les trois lignées *loki*. Ces résultats sont donc à mettre en lien avec les observations en microscopie confocale réalisées avec les mutants *CLV3xWUSxloki129* qui, malgré un fort bruit de fond, semblaient montrer une expression ectopique de *CLV3* dans les amas de ces lignées cultivées sur AZD. De plus, chez les mutants *loki* et *det3*, l'AZD induit une stimulation de l'expression du gène codant pour *WOX4*, trois à quatre fois supérieure à celle du WT. Le facteur de transcription *WOX4* est impliqué dans l'organisation du méristème vasculaire et son maintien, avec *WOX14*. Chez la tomate, la surexpression du gène *WOX4* conduit à d'importantes perturbations, notamment une réduction de la taille des éléments conducteurs et une déformation des cellules non vasculaires composant l'épiderme, le parenchyme, qui présentent une modification de leur morphologie et de

leur alignement. De l'ensemble de ces défauts résulte une inhibition importante du développement de la plante (Ji et al. 2010a; Ji et al. 2010b). Dans notre analyse, la variation de l'expression de ce gène est donc particulièrement intéressante compte tenu du phénotype observé sur AZD dans les mutants *loki* et *det3*, puisque les amas se développent au niveau des tissus vasculaires. Je me suis donc concentrée ensuite sur l'expression de gènes en lien avec les tissus vasculaires, aussi bien au niveau du développement de la vasculature que des protéines et composés exprimés au niveau de ces tissus. Plusieurs gènes de cette catégorie sont dérégulés par l'AZD dans les fonds mutants étudiés par rapport au WT. Des facteurs de transcription NAC, exprimés au niveau des tissus vasculaires, sont dérégulés par l'AZD dans les mutants. C'est également le cas du gène codant pour la spermine synthase *ACL5* (At5G19530), nécessaire pour le développement vasculaire, qui est deux à trois fois moins exprimé dans les mutants sur AZD que le WT. *ACL5* est exprimé dans les cellules pro-vasculaires et intervient notamment dans l'établissement des limites entre les régions veineuses et non veineuses au niveau de la partie aérienne, en lien avec le transport d'auxine (Clay and Nelson 2005). Dans cette étude de Clay and Nelson, le mutant *tkv* (correspondant à *ACL5*) présente des veines plus épaisses, dues à l'augmentation du nombre de cellules du xylème, du phloème et des cellules pro-cambiales. Dans les résultats du métabolome (Figure 68), nous avons constaté une augmentation de la teneur en putrescine dans les mutants *loki* sur AZD par rapport au WT. La putrescine permet notamment la biosynthèse de spermine (Database KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Le gène At5G07080, codant pour une enzyme qui convertit la putrescine, est deux à quatre fois moins exprimé dans les mutants sur AZD que le sauvage. Ainsi, les baisses de conversion de la putrescine, en plus de la spermine synthase, observées dans cette analyse transcriptomique peuvent expliquer en partie l'accumulation de putrescine observée dans l'analyse métabolomique.

De plus, le gène At4G32880, qui code pour un facteur de transcription nommé ATHB-8 appartenant à la famille homeodomain-leucine zippe, est deux fois moins exprimé dans les mutants *loki* et *det3* sur AZD par rapport au WT. Ce facteur de transcription régule positivement la différenciation des cellules vasculaires (Baima et al. 2001). Ceci pourrait être mis en lien avec la perte d'autofluorescence de la chlorophylle observée au niveau des amas en Figure 74. L'ensemble de ces modifications géniques au niveau des tissus vasculaires sont en accord avec le phénotype observé.

Les mutants *loki* et *det3* présentant des défauts pariétaux, notamment au niveau des teneurs en cellulose (Figure 79), j'ai également analysé plus particulièrement l'expression de gènes en lien avec la paroi dont la synthèse et le dépôt de cellulose. Plusieurs gènes codant pour des membres de la famille TBL (Trichome Birefringence-

like) sont stimulés par l'AZD au sein des mutants, contrairement au sauvage. Dans cette famille dont les gènes codent tous pour un domaine DUF231, TBR (At5G06700) est notamment impliqué dans la synthèse et le dépôt de la cellulose au niveau de la paroi. Une perte de TBR entraîne une baisse de cellulose au niveau de la paroi secondaire des trichomes (pour revue (Bischoff et al. 2010)). Ce gène-ci a tendance à être environ 1,6 fois moins exprimé sur AZD au sein des mutants *loki* par rapport au DMSO, tandis que l'expression au sein du WT ne varie pas significativement. Des gènes codant pour des protéines appartenant à la famille de la cellulose synthase ou similaires à la cellulose synthase sont également perturbés chez les mutants sur AZD. Certains gènes codant pour des protéines similaires à la cellulose synthase sont plutôt stimulés, comme At4G24000 qui est 17 à 25 fois plus exprimé dans les mutants sur AZD par rapport au sauvage. En revanche, d'autres membres de la famille de la cellulose synthase (AT4G18780 par exemple), sont plutôt réprimés par l'AZD chez *det3* et *loki044* par rapport au WT et à la condition DMSO. Ces modifications d'expression induite par l'AZD sont donc à mettre en lien avec les perturbations pariétales observées sur AZD chez les mutants *loki* et *det3*.

Enfin, compte tenu de notre hypothèse que la protéine LOKI pourrait être impliquée dans la régulation de la V-ATPase endosomale, j'ai également suivi l'expression de certains gènes liés aux V-ATPases. Comme attendu, le gène codant pour la sous-unité C de la V-ATPase est moins exprimé dans le mutant *det3* sur DMSO par rapport au WT mais également par rapport aux mutants *loki*. Des gènes codant pour différents types de pompes à protons sont perturbés sur AZD chez les mutants par rapport au WT, certains sont réprimés comme l'H⁺-ATPase11 (At5G62670), une ATPase de type AAA (At5G45720), une ATPase stimulée par le fer (At4G04770), ou encore une protéine 14-3-3 fixant l'H⁺-ATPase (At1G347660). L'expression du gène At3G15340, codant pour PPI2 (Proton Pump Interactor 2), est quant à elle stimulée par l'AZD dans les mutants.

Discussion et perspectives

Cette étude a pour but d'analyser un nouveau composant de la voie TOR chez *Arabidopsis*, identifié par un crible génétique. Les mutants ainsi sélectionnés pour leur sensibilité à l'AZD pourraient donc potentiellement être impactés dans la voie de signalisation de TOR. La mutation *loki*, non caractérisée dans la littérature jusqu'à présent, présente des défauts phénotypiques modérés dans des conditions de culture optimales. Cependant, le développement de ce mutant est réduit par rapport au sauvage en condition de carence en sucre (*Figure 66*). Il est connu que le sucre est un activateur de TOR. La sensibilité des mutants *loki* à la carence en sucre pourrait donc s'expliquer par une diminution de l'activité du complexe TORC1. En suivant l'activité de

TOR par western blot, il apparaît que l'induction de l'activité TOR chez ces mutants en réponse au sucre serait plus faible que pour le WT (*Figure 67*).

Dans un contexte où l'activité du complexe TORC1 est inhibée, soit par un traitement AZD-8055, soit dans le croisement *lst8xloki*, la mutation *loki* entraîne des fortes perturbations phénotypiques au niveau métabolique (*Figure 68*), pariétal (*Figure 79*), et transcriptomique (*Figure 86*), résultant notamment en l'apparition d'amas cellulaires ectopiques au niveau de la partie aérienne des plantules *in vitro*. La formation de ces amas est dépendante de la concentration en sucre mais pas de la qualité du sucre (*Figure 69*).

La protéine LOKI est composée de domaines WD40 (*Figure 61*), domaines retrouvés chez les protéines RAPTOR et LST8, permettant des interactions protéines-protéines. LOKI possède également un domaine Rav1p (*Figure 61*), domaine retrouvé au sein de la protéine RAV1 chez la Levure. Cette protéine RAV1 est un composant du complexe RAVE, régulateur du réassemblage de la V-ATPase chez la Levure, notamment par la sous-unité C du domaine V1 (Smardon et al. 2002; Smardon and Kane 2007). Ainsi, le mutant *rav1* de Levure présente une alcalinisation du pH vacuolaire, résultant d'un défaut d'activité V-ATPase (Smardon et al. 2014). En introduction, nous avons vu que la V-ATPase intervenait dans l'activation du complexe TORC1 chez les animaux et la Levure, notamment en réponse à certains acides aminés (Zoncu et al. 2011; Dechant et al. 2014; Takayama et al. 2018). Une étude sur l'interactome de la V-ATPase réalisée chez la souris démontre également une interaction entre la kinase S6K (notée RPS6KA3) et la sous-unité B du domaine V1 de la V-ATPase (notée ATP6V1B1) (Merkulova et al. 2015). Cette étude propose que cette kinase pourrait réguler la V-ATPase par phosphorylation, ce qui serait intéressant de vérifier expérimentalement. De même, il serait intéressant d'étudier si cette kinase pourrait intervenir dans la voie mTORC1. Ces différentes études réalisées chez les animaux et la Levure suggèrent/démontrent des régulations entre la voie TORC1 et les V-ATPases. Chez les plantes en revanche, aucun lien n'a pour le moment été démontré entre les V-ATPases et la voie TOR. En prenant en compte ces différents éléments, j'ai donc posé l'hypothèse que les mutants *loki* pourraient intervenir dans la régulation des V-ATPases de manière similaire au complexe RAVE chez la Levure, et ce, de manière TOR-dépendante. Un premier test préliminaire a été réalisé pour comparer le pH au sein des mutants *loki* par rapport au sauvage et aux mutants de V-ATPases endosomales *det3* et vacuolaires *vha.a2xvha.a3*. Du broyat des différents génotypes ont été déposés sur du papier pH. Suivant cette méthode, le WT Col8 a un pH de 5,8, les mutants *loki* présentent un pH compris entre 6,2 et 6,4 et les mutants *det3* et *vha.a2xvha.a3* ont des pH compris entre 6,2 et 6,6. Les résultats obtenus pour les mutants de V-ATPase connus sont en accord avec les

données dans la littérature (Krebs et al. 2010; Kriegel et al. 2015; Luo et al. 2015). Ces premiers résultats suggèrent donc que les mutants *loki* présentent un pH plus basique que les plantules sauvages, comme observé chez les mutants V-ATPases. Une mesure de pH plus précise permettra de valider ces résultats. Différentes techniques peuvent être envisagées, telles que l'utilisation de micro-sondes permettant de mesurer le pH dans un organe particulier, l'utilisation de rapporteurs de pH fluorescents (LysoSenseur), ou encore par la mesure du pH avec des marqueurs ratiométriques. De même, il serait intéressant de mesurer l'activité V-ATPase des mutants *loki* en présence ou en absence d'AZD.

Le mutant de la V-ATPase endosomale *det3* présente le même phénotype d'amas ectopiques que le mutant *loki* sur AZD, contrairement au double mutant vacuolaire *vha.a2xvha.a3* (Figure 80). Le fait que les mutants *loki* et *det3* se phénocopient dans un contexte où la kinase TOR est inhibée suggère que la formation des amas cellulaires ectopiques observés sur AZD est dépendante de la perte d'activité des V-ATPases du réseau trans-golgien. DET3 correspond à la sous-unité C de la V-ATPase. Ainsi, la protéine LOKI pourrait être impliquée dans la régulation des V-ATPases comme observé pour le complexe RAVE, mais cette régulation se ferait de manière TOR-dépendante. Il serait intéressant de croiser les différentes lignées *loki* avec le mutant *det3*, pour voir si le phénotype d'amas cellulaires est conservé, aggravé ou atténué dans ce croisement sur AZD.

En analysant plus en détails le comportement des mutants *loki* et *det3* en réponse à l'inhibition de TOR, les défauts observés chez les mutants *loki* sont retrouvés chez le mutant *det3*, parfois de manière aggravée, renforçant l'hypothèse d'une régulation de la V-ATPase endosomale par LOKI. Ainsi, l'analyse transcriptomique a révélé des profils similaires entre les mutants *loki* et *det3* sur AZD, par rapport au WT. Ces mutants sont plus impactés par l'inhibition de TOR que les plantules sauvages. Dans la littérature, il a été montré que l'inhibition de TOR entraîne d'importantes perturbations transcriptomiques (Moreau et al. 2012; Ren et al. 2012; Xiong et al. 2013; Forzani et al. 2019). Il est d'ailleurs assez surprenant que le WT ne présente que peu de variations sur AZD. Cependant, dans les différentes études démontrant ces modifications transcriptomiques lorsque TOR est inhibée, les auteurs ont utilisé généralement des mutants (mutant *lst8*, lignée TOR RNAi ou exprimant FKBP12, permettant d'utiliser la rapamycine comme inhibiteur). Ainsi, les conditions d'inhibition sont différentes par rapport à celles de notre expérience, au niveau du type d'inhibition, du temps d'inhibition et de la concentration d'inhibiteur, ce qui pourrait expliquer les résultats obtenus pour le WT sur AZD. Toutefois, le fait que l'expression de certains gènes connus varie en accord avec ce que l'on trouve dans les études publiées valide le fait

que le WT répond bien à l'AZD dans nos conditions de cultures. Cela nous permet de conclure que les mutants *loki* et *det3* sont donc plus fortement impactés par l'inhibition de TOR que le WT.

Parmi les catégories de gènes dont l'expression est modifiée par le traitement à l'AZD, de nombreux transcrits correspondant à des gènes de type SAUR (Small Auxin Upregulated mRNAs) sont réprimés par l'AZD dans les fonds mutants *loki* par rapport au WT. La voie de l'auxine pourrait ainsi être perturbée dans le fond *loki* en réponse à l'inhibition de TOR. Etudier la réponse de ces mutants à un traitement d'auxine en présence ou en absence d'AZD, combiné à un dosage d'auxine dans ces mêmes conditions permettrait de déterminer s'il existe des perturbations de cette voie hormonale. Si tel est le cas, ceci pourrait faire écho avec la théorie de la croissance acide, selon laquelle la paroi des cellules s'étend mieux à un pH acide (Rayle and Cleland 1992). Cette acidification passe par différentes protéines et la pompe à proton de la membrane plasmique, activée par l'auxine. Une étude récente publiée en 2021 montre que l'auxine induit l'activation de pompe à protons de la membrane plasmique via TMK1 et TMK4, des kinases transmembranaires, stimulant ainsi l'acidification du pH apoplastique (Lin et al., 2021). Dans le double mutant *tmk1-1xtmk4-1*, le pH est plus alcalin que dans le contrôle sauvage. Par ailleurs, la longueur des cellules composant l'hypocotyle de ce double mutant est réduite, phénotype corrélé au pH au sein de ce double mutant puisqu'à l'inverse, une acidification du pH augmente la longueur de ces cellules. Ainsi, TMK1 interagit et phosphoryle la pompe à protons de la membrane plasmique de manière auxine-dépendante, induisant l'acidification de l'apoplasme et l'élongation des cellules de l'hypocotyle. Au niveau de la partie aérienne, l'auxine stimule donc le développement, ce qui est à mettre en lien avec le fait que l'auxine stimule TOR comme nous l'avons vu dans la partie introductive de ce manuscrit (Cai et al. 2017; X. Li et al. 2017). A l'inverse, au niveau racinaire, l'auxine inhibe le développement des racines par l'alcalinisation du pH apoplastique (Li et al. 2021). Si la voie de signalisation de l'auxine est perturbée dans les fonds mutants *loki* et *det3* sur AZD, on peut penser que l'activité des pompes à protons de la membrane plasmique, en plus des V-ATPases endosomales, serait modifiée, impactant l'élongation cellulaire en plus du trafic cellulaire. Ceci pourrait donc conduire à d'importants désordres pariétaux, métaboliques et transcriptomiques dans un contexte où la kinase TOR est inhibée.

Cette analyse transcriptomique révèle également des variations de l'expression de gènes en lien avec *CLAVATA3*, un gène méristématique qui, en accord avec l'observation du croisement *CLV3xWUSxloki129*, pourrait suggérer l'existence d'une identité méristématique au niveau des parties aériennes de *loki* et *det3* sur AZD. Ainsi,

il serait intéressant d'analyser les divisions cellulaires dans les amas, par exemple avec des marqueurs de cycline. Différents gènes impliqués dans le développement et l'organisation des tissus vasculaires sont également dérégulés sur AZD chez les mutants *loki* et *det3*, notamment *WOX4*, impliqué dans l'organisation du méristème vasculaire, ou *ACL5*. Ces résultats sont à mettre en lien avec la localisation des amas ectopiques, retrouvés au niveau des tissus vasculaires des feuilles des mutants *loki* et *det3* sur AZD. Des gènes codant pour des acteurs intervenant dans la biosynthèse de la paroi cellulaire sont également perturbés. Or, les mutants présentent notamment des défauts pariétaux, aggravés par l'AZD, qui pourraient intervenir dans le phénotype d'amas observés, avec une diminution de l'adhésion cellulaire. Certains composants (comme les pectines) ou acteurs de la biosynthèse de la paroi cellulaire sont amenés à la paroi via le trafic cellulaire, tels que *CesA* (biosynthèse de cellulose). Il a été montré que le mutant *det3* présente des défauts pariétaux dus à des perturbations du trafic cellulaire engendrés par la baisse d'activité V-ATPase (Luo et al. 2015). Ainsi, si *LOKI* régule bien l'activité des V-ATPases endosomales, l'inhibition de *LOKI* pourrait affecter le transport et la biosynthèse de composés pariétaux. Au niveau transcriptomique, plusieurs gènes codant pour des protéines en lien avec la cellulose synthase sont dérégulés par l'AZD dans les mutants *loki* et *det3*, illustrés par la baisse de glucose cellulosique dans le mutant *loki129* (Figure 79). Pour confirmer cette hypothèse, il serait pertinent d'étudier l'intégrité de l'appareil de Golgi et de suivre le trafic cellulaire dans les mutants *loki*, avec ou sans AZD, en contrôlant la localisation d'une cible passant par le TGN, telle que *CesA*, fusionnée à la GFP. Une rétention au niveau du TGN permettrait de confirmer un défaut de trafic au sein des mutants *loki* résultant d'un défaut de l'activité des V-ATPases endosomales.

L'ensemble de ces résultats permettrait ainsi d'établir une régulation potentiellement TOR-dépendante entre la protéine *LOKI* et la V-ATPase endosomale, montrant un lien entre la voie TORC1 et les V-ATPases chez les plantes.

Discussion générale et perspectives

La protéine kinase TOR est très conservée au sein des eucaryotes. Sous la forme du complexe protéique TORC1, mais également TORC2 chez la Levure et les animaux, elle joue un véritable rôle de carrefour signalétique entre différents types de facteurs externes ou internes et les réponses de l'organisme, en termes de métabolisme ou de développement. Les nutriments, et plus particulièrement le sucre et l'azote, sous forme d'acides aminés, sont de bons activateurs de la kinase (m)TOR (Hara et al. 1998; Sancak et al. 2010; Orozco et al. 2020), stimulant ainsi la traduction, les divisions cellulaires et la croissance des organismes. Différents acteurs interviennent dans cette activation lysosomale de mTOR, dont les Rag-GTPases, RAGULATOR et la pompe à proton V-ATPase. L'hyperactivation de cette voie mTORC1 est impliquée dans des pathologies humaines telles que les cancers, le diabète, l'épilepsie ou encore dans des pathologies cardiaques, ce qui en fait une cible thérapeutique très étudiée en recherche médicale. Chez les plantes, il reste encore beaucoup à découvrir à propos de cette voie et c'est donc dans ce cadre que s'inscrit mon projet de thèse. Mon travail, divisé en deux axes, consistait d'une part à étudier les relations entre la voie TOR et le métabolisme azoté chez *Arabidopsis* et dans les cellules de mammifères, et d'autre part à identifier et caractériser un nouvel acteur potentiel de la voie TOR.

Relations entre la voie TORC1 et le métabolisme azoté chez *Arabidopsis*

L'étude concernant la voie TOR et le métabolisme azoté a permis de mettre en évidence des régulations du métabolisme azoté par la voie TOR, notamment la régulation positive du prélèvement d'ammonium en conditions non limitantes. Toutefois, le mutant *lst8*, contrairement au traitement AZD ou aux mutants *raptor*, ne présente pas de diminution du prélèvement d'ammonium, suggérant un processus LST8-indépendant. L'augmentation des teneurs en ammonium constatée lorsque l'activité du complexe TORC1 est inhibée pourrait être due à des phénomènes de recyclage de molécules azotées organiques. L'accumulation importante d'ammonium pouvant être toxique pour la plante (Jian et al. 2018), l'inhibition de TOR pourrait permettre de limiter le prélèvement d'ammonium par le système racinaire, afin de restreindre cet effet cytotoxique. Cette régulation n'étant pas retrouvée dans le mutant *lst8*, alors qu'il accumule de fortes teneurs en ammonium, est à mettre en lien avec le fait que ce mutant se développe encore moins bien que les mutants *raptor*. La forte accumulation d'ammonium réprimerait davantage le développement du mutant *lst8* comparé au mutant *raptor*, qui accumule moins d'ammonium. Une manière pour la plante de détoxifier l'ammonium est la synthèse de glutamine par la conversion d'un

ammonium et d'un glutamate en glutamine, réaction catalysée par la glutamine synthétase (GS). J'ai montré que les mutants du complexe TORC1 sont sensibles à la glutamine, limitant leur développement racinaire. En accord avec ces résultats, ces mutants se développent mieux que le sauvage en présence d'un inhibiteur de GS, le Glufosinate d'Ammonium (GA), composé de l'herbicide Basta, qui entraîne une accumulation d'ammonium (De Block et al. 1987). La croissance racinaire du mutant *lst8* semble d'ailleurs stimulée par la présence de GA, qui, de manière surprenante, diminue les teneurs en ammonium dans ce mutant, confirmant l'hypothèse que l'accumulation d'ammonium chez *lst8* participe à son défaut de croissance. Récemment une activité glutaminase a été mise en évidence chez *Arabidopsis* qui, comme chez les animaux, catalyse l'hydrolyse de glutamine en glutamate et ammonium (Kambhampati et al. 2021). Si le glufosinate inhibe cette activité en forte concentration de glutamine chez le mutant *lst8*, on pourrait s'attendre à une baisse des concentrations en ammonium.

L'inhibition de TOR provoque également l'accumulation d'acides aminés chez les organismes photosynthétiques (Moreau et al. 2012; Ren et al. 2012; Caldana et al. 2013; Jüppner et al. 2018; Salem et al. 2018; Forzani et al. 2019), particulièrement la glutamine, pour laquelle j'ai démontré l'implication de l'enzyme GS dans son accumulation TOR-dépendante. Ainsi, la voie TOR intervient dans la régulation de différentes étapes du métabolisme azoté et la perte de l'activité TOR induit des modifications métaboliques importantes, dont l'accumulation d'ammonium et de glutamine, pouvant expliquer en partie le défaut de croissance des mutants *raptor* et *lst8*. Pour déterminer plus précisément l'origine de ces accumulations, il serait intéressant de mesurer les flux de ces composés azotés au sein des tissus ou de réaliser des marquages en fonction de l'inhibition de TOR. Des analyses métabolomiques réalisées sur des plantules traitées à l'ammonium ^{15}N permettraient de vérifier si cet azote marqué est prélevé et incorporé ou non, en glutamine, glutamate et autres acides aminés, dans un contexte où le complexe TORC1 est inactif. Si le marquage ^{15}N des acides aminés est plus faible en présence d'AZD qu'en présence de DMSO, cela permettrait alors de valider l'hypothèse que l'inhibition de TOR réprime le prélèvement d'ammonium et que les accumulations de composés azotés observées proviennent du recyclage de l'azote organique. De même, comparer ces teneurs d'acides aminés ^{15}N entre les plantules sauvages et les mutants du complexe TORC1 pourrait aider à déterminer si la régulation du prélèvement d'ammonium est bien un processus LST8-indépendant, si les résultats entre les mutants *raptor* et *lst8* diffèrent.

L'inhibition de la Glutamine synthase par le Glufosinate d'Ammonium, composé actif d'un herbicide, agit sur les voies mTOR de lignées cancéreuses

Compte tenu de l'importance du métabolisme de la glutamine et de la voie mTORC1 dans les processus cancéreux (Csibi et al. 2014; Yuan et al. 2015; Lampa et al. 2017), j'ai mené une étude exploratoire en collaboration avec Mario Pende et Ganna Panasyuk de l'Institut Necker des Enfants Malades (INEM) pour étudier l'effet de l'inhibition de la biosynthèse de glutamine sur les voies mTOR et la division des cellules cancéreuses. En appliquant du Glufosinate d'ammonium sur différentes lignées cancéreuses, il ressort que l'inhibition de la GS par le GA impacte les voies mTOR de manière plus ou moins marquée selon la lignée étudiée. En effet, le GA ne semble pas affecter la lignée HeLa mais diminue la voie mTORC2 au sein de la lignée Hek293 à 6h de traitement et inhibe les voies mTORC1 et mTORC2 de la lignée Hepa1.6, ce qui illustre bien une différence de sensibilité entre lignées cellulaires. Des répétitions seront nécessaires pour valider définitivement ces résultats. De plus, il semble y avoir une variation de la réponse au GA au cours du temps. Pour un traitement relativement court (6h), on observe plutôt une diminution générale des voies mTOR dans les lignées sensibles au GA, tandis qu'à 24h de traitement, le GA semblerait les stimuler. Des études complémentaires permettraient de déterminer si cet effet « stimulateur » pourrait être dû au fait que les cellules contrôles cultivées en absence d'inhibiteur ont continué à se diviser, développant un stress lié à la densité cellulaire et à la limitation en nutriments contrairement aux cellules traitées dont la prolifération est diminuée. L'effet du GA pourrait également s'être dissipé après 24h de traitement, stimulant ainsi une réactivation de TOR et donc une reprise de la croissance. Dans ce cas, cela suggérerait que le GA, à travers l'inhibition de la biosynthèse de glutamine, a bien un effet inhibiteur sur les voies mTOR et la prolifération cellulaire, mais limité dans le temps. La glutamine activant mTORC1 notamment à travers sa translocation lysosomale indépendamment des Rag GTPases (Jewell et al. 2015), il serait pertinent d'étudier la localisation subcellulaire de mTOR en présence de GA. Ceci permettrait de déterminer si l'inhibition de la GS par le GA peut réguler l'activité de mTOR à travers sa localisation au sein des cellules. Enfin, de nombreuses études sont menées en recherche biomédicale pour développer des thérapies ciblant différents acteurs protéiques, ceci afin de lutter contre les phénomènes de résistance aux traitements anti-cancéreux (Tanaka et al. 2015; Magaway et al. 2019). Pour faire suite à l'étude exploratoire que j'ai réalisée à l'INEM, il serait intéressant d'étudier si les inhibiteurs de mTOR et de la GS que j'ai utilisés présentent un effet synergétique sur la division cellulaire. Chez Arabidopsis, j'ai transféré des plantules sur un milieu contenant de l'AZD avec ou sans Glufosinate. Les résultats préliminaires suggéraient une réduction plus importante de

la masse totale des plantules dans le cas où elles étaient cultivées en présence des deux inhibiteurs, comparées aux plantules traitées uniquement à l'AZD. Ces résultats seront à confirmer et à tester sur les cellules cancéreuses, en appliquant différentes doses de GA et de rapamycine ou d'AZD. Ainsi, en contrôlant l'action combinée de ces inhibiteurs sur les voies mTOR et différentes cibles métaboliques ainsi que sur la division des cellules, nous pourrions conclure si l'inhibition de la GS par le GA combinée à l'inhibition de mTOR pourrait réduire d'autant plus la capacité proliférative des cellules cancéreuses et peut-être avoir une utilité dans le traitement des maladies prolifératives.

La protéine LOKI, un potentiel régulateur des V-ATPases endosomales TOR-dépendant

La seconde partie de ma thèse était consacrée à la caractérisation d'un nouvel acteur de la voie TOR chez les plantes, issu d'un crible génétique. Le gène muté identifié suite à ce crible code pour une protéine dont la fonction n'est pas connue. Une RT-PCR a permis d'amplifier une séquence de 7kb avec des amorces conçues d'après la séquence prédite de ce gène, validant l'existence de ce transcrite chez *Arabidopsis*. Le mutant de ce gène, nommé *loki* (LOCALISED proliferation depending of TOR Kinase Inhibition) présente de légers défauts phénotypiques en condition contrôle, qui sont fortement aggravés par l'inhibition du complexe TORC1. Sur glutamine, la croissance racinaire des mutants *loki* décroît de manière dose-dépendante avec la concentration, témoignant d'une certaine sensibilité de ces mutants à la glutamine, comme observé pour les mutants du complexe TORC1. Ceci est à mettre en lien avec les résultats de l'analyse métabolomique révélant une tendance à l'augmentation des teneurs en glutamine dans les mutants *loki* DMSO de 6 jours (*Figure 68*). Toutefois, ces teneurs restent inférieures à celles obtenues chez les mutants *raptor* et *lst8*. Cette sensibilité des mutants *loki* à la glutamine est également cohérente avec une plus faible induction de l'activité TOR, également observée chez les mutants du complexe TORC1. De même, la sensibilité des mutants *loki* à la carence en sucre peut également être associée à une plus faible activité de TOR dans ce fond mutant.

Ainsi, dans un contexte où le complexe TORC1 est inhibé, d'importantes modifications métaboliques, pariétales et transcriptomiques sont constatées dans ce mutant *loki* sur AZD, par rapport au WT. Le mutant *loki* développe également des amas cellulaires ectopiques au niveau de sa partie aérienne, uniquement pour des conditions où la kinase TOR est inhibée. Le fait que les amas ectopiques soient localisés au niveau des tissus vasculaires, et que ce phénotype soit associé à des dérégulations de l'expression de certains gènes méristématiques tels que *CLAVATA3*, *WOX4*, ou impliqués dans

l'identité des tissus vasculaires tels que *WOX4*, *ACL5*, peut faire écho au phénomène d'angiogenèse observé notamment dans les processus cancéreux. Les perturbations de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse de la paroi (*TBL*, certains gènes codant pour des protéines de la famille de la cellulose synthase ou similaires à la cellulose synthase) peuvent être en lien avec le phénotype de ces amas ectopiques, c'est-à-dire des cellules gonflées, avec des défauts d'adhésion et des variations de la composition pariétale. La perte d'autofluorescence de la chlorophylle au niveau de ces structures cellulaires suggère quant à elle une perte de différenciation des cellules. L'analyse transcriptomique réalisée sur des amas microdisséqués au laser n'a pas révélé d'identité tissulaire particulière au niveau de ces structures. Toutefois, les quantités d'ARN extraites de ces échantillons étaient très faibles (de l'ordre du pg/μL) et ont nécessité un protocole d'amplification particulier en cours de développement, nommé « 3'seq » et basé sur un séquençage de la partie 3' des ARNm. Il pourrait être intéressant de refaire cette expérience avec davantage d'amas microdisséqués pour avoir de meilleures conditions d'amplification.

La protéine LOKI possède des domaines WD40, permettant des interactions protéines-protéines, en plus d'un domaine Rav1p, homologue au domaine retrouvé chez la protéine RAV1 de la Levure. Cette protéine RAV1 fait partie du complexe RAVE, impliqué dans la régulation de l'assemblage/réassemblage de la V-ATPase (Sardon et al. 2002; Sardon and Kane, 2007; Sardon et al. 2013). Chez les animaux et la Levure, l'activation lysosomale de mTORC1 passe par les acides aminés et par la V-ATPase mais ce lien entre la voie TOR et les V-ATPases n'est pas encore établi chez les plantes. Ainsi la présence de ces différents domaines au sein de la protéine LOKI suggérerait la possibilité d'une interaction entre les domaines WD40 de la protéine LOKI et la V-ATPase, permettant sa régulation. Le sucre est également un élément important pour la régulation de l'activité des V-ATPases. Ainsi, si LOKI est bien un régulateur de la V-ATPase, la perte de ce régulateur combinée à une carence en sucre devrait d'autant plus perturber l'activité de ces pompes à protons et le développement des plantules, ce qui pourrait expliquer la sensibilité des mutants *loki* à cette carence.

Dans un contexte où TOR est inhibée, le mutant de la V-ATPase endosomale *det3* présente un phénotype d'amas ectopiques similaire à celui des mutants *loki*, contrairement au double mutant de la V-ATPase vacuolaire *vha.a2xa3*. Cette observation m'a permis d'affiner mon hypothèse. La protéine LOKI pourrait réguler la V-ATPase endosomale et ce, de manière TOR-dépendante. Chez la souris, l'interactome de la V-ATPase démontre une interaction entre S6K et la sous-unité B de la V-ATPase (Merkulova et al. 2015). S6K phosphoryle cette sous-unité, ce qui pourrait intervenir dans sa régulation et pourrait potentiellement être dépendant de la voie mTORC1. La

détermination de l'interactome de LOKI ou de la V-ATPase chez Arabidopsis comme effectuée chez la souris dans l'étude de Merkulova et al. de 2015, pourrait valider une interaction entre LOKI, les composants de la voie TOR et des sous-unités de la V-ATPase endosomale. L'absence ou la présence d'AZD pourrait permettre d'affiner le rôle de la voie TOR dans cette potentielle régulation LOKI-V-ATPase chez Arabidopsis. Par ailleurs, un test préliminaire réalisé sur les trois lignées mutantes *loki* suggère une alcalinisation du pH comme observé pour les mutants V-ATPase et donc potentiellement un défaut d'activité V-ATPase. Il serait pertinent par la suite de valider ce premier résultat par une analyse de pH plus précise, par l'utilisation de micro-sondes ou de rapporteurs de pH fluorescents. La comparaison du pH dans le fond mutant *loki* avec ou sans AZD, permettrait de déterminer si l'activité des pompes à protons est d'autant plus perturbée par l'inhibition de TOR, ce qui renforcerait l'existence d'un lien entre TOR et les V-ATPases chez les plantes. Une mesure de l'activité des V-ATPases dans le fond mutant *loki* validerait également l'implication de la protéine LOKI dans la régulation de ces V-ATPases.

L'analyse comparative entre les mutants *loki* et *det3* démontre que le mutant *det3* phénocopie les mutants *loki* à plusieurs niveaux, mais ce mutant peut parfois présenter un phénotype aggravé, renforçant l'hypothèse d'une régulation de la V-ATPase endosomale par LOKI. Il serait intéressant d'étudier d'autres mutants de la V-ATPase endosomale pour conforter ces résultats, notamment le phénotype d'amas cellulaires en présence d'AZD.

Il existe également des pompes à protons au niveau de la membrane plasmique, qui permettent notamment la sortie de protons de la cellule vers l'apoplasme, participant ainsi à son acidification et l'élongation cellulaire (selon le principe de croissance acide). Des données récentes de la littérature pourraient suggérer un autre rôle de la voie TORC1 dans ce phénotype d'amas ectopiques, en lien avec les pompes à protons de la membrane plasmique. Chez la Levure, l'inhibition du complexe TORC1 diminue l'activité de Pma1, une pompe à protons de la membrane plasmique impliquée dans la sortie des protons hors de la cellule. Le complexe TORC1 participe donc à l'activation de Pma1 et cette activation passe par la protéine Sit4, le mutant *sit4* présentant un pH intracellulaire plus acide dû à la diminution de la sortie de protons (Mahmoud et al. 2017). La voie TORC1 est donc impliquée dans la régulation des pompes à protons chez la Levure. Par ailleurs, Pma2, une pompe à protons plasmalemmique de *Nicotiana glauca*, peut compléter un mutant *pma1* de Levure (d'Exaerde et al. 1995). Ces résultats conforteraient l'idée que chez la Levure et probablement chez les plantes, TORC1 pourrait activer les pompes à protons de la membrane plasmique. De plus, une étude très récente (Poster présenté lors du congrès EMBO TOR 2021 par Cecilia Primo,

Plasma membrane H⁺-ATPases promote TORC1 activation in tobacco BY-2 suspension cells) démontre que dans des suspensions cellulaires végétales, l'inhibition de la pompe à protons de la membrane plasmique induit une inhibition de TORC1. L'ensemble de ces études vont donc dans le sens d'un lien entre TORC1 et les pompes à protons chez la Levure et les plantes. L'emploi d'inhibiteurs de la pompe à protons permettrait de déterminer leur influence sur l'activité de TOR, en suivant l'état de phosphorylation de RPS6 chez *Arabidopsis*.

Ainsi, nous pouvons formuler une nouvelle hypothèse qui serait que la perte de la V-ATPase endosomale (défaut de régulation dans le mutant *loki* ou de l'activité dans le mutant *det3*) provoquerait une accumulation de protons dans le cytosol. Les pompes à protons de la membrane plasmique étant fonctionnelles, ces protons peuvent être évacués vers l'apoplasme pour réguler le pH intracellulaire et l'élongation cellulaire (Lin et al. 2021). En revanche, dans un contexte où le complexe TORC1 est inhibé, ces pompes à protons plasmémiques pourraient être inhibées, comme observé chez la Levure. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait mesurer chez les plantes l'activité de ces pompes à protons de la membrane plasmique, en présence ou en absence d'AZD et dans les fonds mutants *raptor* et *lst8*. Si tel est bien le cas, l'inhibition de TOR et donc de ces pompes à protons dans les fonds mutant *loki* et *det3* réprimerait l'extrusion des protons qui seraient alors accumulés au sein des cellules. En résulterait une réduction de l'élongation cellulaire illustrée par la réduction de la croissance des hypocotyles (réduits chez les mutants *loki* et *det3*) accompagnée potentiellement d'un gonflement des cellules et d'une perturbation du trafic trans-golgien lié au pH, impactant ainsi la composition de la paroi cellulaire. Cette hypothèse serait en accord avec les résultats obtenus pour les croisements *lst8xloki*, présentant un phénotype d'amas sans AZD. Pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de croiser des mutants connus de la pompe à protons de la membrane plasmique avec les mutants *det3* ou *loki* pour voir si ce croisement entraînerait le développement d'amas comme le croisement *lst8xloki*. Il serait également possible de vérifier si l'application d'un activateur de la pompe à proton tel que la Fusicoccine, pourrait supprimer le phénotype d'amas ectopiques des mutants *loki* et *det3* sur AZD.

Toutefois, en plus de ces deux hypothèses émises pour relier le rôle de la protéine LOKI à la voie TORC1 pour expliquer ce phénotype atypique, il restera encore à déterminer pourquoi ces amas cellulaires apparaissent au niveau des tissus vasculaires.

Le mot de la fin

Pour conclure, ces différentes parties de ma thèse m'ont permis d'étudier chez *Arabidopsis* une voie de signalisation bien connue chez la Levure et les animaux, la voie TORC1. Ce complexe étant très conservé au sein des eucaryotes, les données acquises chez ces organismes permettent de poser des hypothèses de régulations chez les plantes et ainsi de mieux comprendre cette voie cruciale au développement des organismes. Mais en découvrant de nouveaux acteurs de ces voies chez les plantes, cela permet également de découvrir de nouvelles molécules pouvant affecter ces acteurs, comme le glufosinate d'ammonium, utilisées chez les plantes, mais qui pourrait potentiellement l'être aussi pour des études en recherche biomédicale. De même, l'identification de la protéine LOKI chez les plantes et la compréhension de son rôle en lien avec les V-ATPases pourrait permettre de trouver des orthologues chez les animaux, qui pourraient être impliqués dans la régulation de la voie de signalisation TOR. Compte tenu du rôle des V-ATPases dans l'activation de mTORC1, la croissance cellulaire et la capacité de certains cancers à métastaser, identifier de nouveaux régulateurs des V-ATPases chez les animaux grâce aux études menées chez les plantes pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour de nombreuses pathologies, dont les cancers. L'utilisation du modèle végétal comme modèle pour la recherche biomédicale n'est donc pas à négliger. Comme je le disais en avant-propos de ce manuscrit, les plantes ont encore beaucoup de choses à nous apprendre !

Matériels et Méthodes

1. Matériels et Méthodes de la partie Résultats A.2. Effets de l'inhibition du métabolisme de la glutamine sur les voies mTOR de cellules cancéreuses

A) Cultures cellulaires

Différentes lignées cellulaires ont été utilisées, HEK293 (cellules embryonnaires rénales humaines immortalisées), Hepa1.6 (cellules hépatocytes murines cancéreuses) et HeLa (cellules utérines humaines cancéreuses). Ces cellules sont cultivées dans du milieu DMEM complet 1X (D-Glucose 4,5g/L, L-glutamine), sérum foetal bovin 10%, pénicilline + streptomycine 1%. Différents inhibiteurs ont été appliqués, l'AZD-8055 (100nM), TORIN2 (100nM), Glufosinate Ammonium (composé de l'herbicide Basta, 1-5-10-25 et 50mg/L), pendant 1h (traitement court), 6h (traitement intermédiaire) ou 24h (traitement long).

B) Western-Blot

1) Extraction protéique et dosage

Après extraction, les protéines totales sont dosées par la méthode de Bradford dont le principe repose sur la liaison du bleu de Coomassie avec les aminés aromatiques. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford. L'intensité de la coloration est mesurée par spectrophotométrie pour estimer la quantité de protéines totales dans l'échantillon. Une gamme étalon est réalisée avec du BSA de 0 à 15µg. Chaque échantillon est dosé deux fois, à raison de 1µL d'extrait protéique, 799µL d'H₂O et 200µL de Bradford. La densité optique est mesurée à 595nm.

2) Migration des protéines

Les protéines extraites sont chauffées 2 minutes à 95°C puis migrées sur un gel de polyacrylamide à 8% pour la partie dite de séparation et 5% pour la partie de concentration. Le tampon de migration utilisé est du MOPS1X comme décrit précédemment (Iershov et al. 2019).

3) Transfert, incubation et révélation

Après activation de la membrane PVDF avec de l'éthanol 100%, le montage Whatman-membrane-gel-Whatman est mis à transférer 15 minutes. La membrane est saturée dans du lait 3% PBST pendant 15 minutes, lavée avec la solution de TBST puis incubée avec l'anticorps primaire (Cell signaling, 1/2000 ou 1/5000 suivant les anticorps utilisés) sur une nuit à 4°C. Certains anticorps primaires sont dirigés contre la forme

phosphorylée de protéines telles que P-CAD, P-RPS6, d'autres sont dirigés contre la forme totale de la protéine, permettant de mettre en évidence une diminution de la quantité de protéine telles que la Cycline D1 ou HK2, ou encore permettent de mettre en évidence une différence de migration (shift) due à une modification de l'état de phosphorylation (4-EBP). La membrane est ensuite rincée trois fois au TBST pendant 5 minutes puis incubée avec l'anticorps secondaire (anticorps anti-lapin ou anti-souris couplé à la peroxydase, dilué au 1/5000) pendant 1h à température ambiante. Le blot est révélé avec un kit ECL (BioRad) qui repose sur la réaction d'oxydation permise par la peroxydase, ce qui émet de la lumière. Les signaux ont été mesurés par le logiciel ImageJ, avec l'option Analyse de gels, puis rapportés aux mesures obtenues pour la tubuline, utilisée comme témoin de charge. Cette normalisation permet ainsi d'obtenir un ratio normalisé. Deux répétitions pour chaque condition sont déposées par gel sauf pour les conditions Torin2 et AZD.

L'ensemble de ces expériences ont été réalisées à l'INEM (PARIS), en collaboration avec le Dr Ganna Panasyuk et le Dr Mario Pende.

2. Matériel et Méthode de la partie Résultats B. Caractérisation du mutant *Arabidopsis loki* présentant une prolifération cellulaire ectopique TOR-dépendante

A) Matériel végétal

Différentes lignées ont été utilisées pour cette étude, à savoir l'écotype sauvage Columbia Col8, le mutant *HD305* issu du crible génétique, les trois mutants d'insertion *loki* 044, 109 et 129 (At2G46560, respectivement SALK_044233, SALK_109847 et SALK_129764c), le mutant d'insertion de la V-ATPase endosomale *det3* (At1g12840, CS61160) et le double mutant de la V-ATPase vacuolaire, *vha.a2xvha.a3*, issu du croisement entre le mutant d'insertion *vha.a2* (At2G21410, mutant SALK_142642) et le mutant d'insertion *vha.a3* (At4g39080, mutant SALK_029786), réalisé par l'équipe de Mélanie Krebs (Krebs et al. 2010). Le double mutant *vha.a2xvha.a3* nous a été fourni par Sophie Filleur, I2BC (CNRS de Gif-sur-Yvette). D'autres lignées ont également été utilisées pour réaliser des croisements avec les mutants *loki*, tels que le mutant d'insertion *lst8-1* (At3g18140, SALK_02459) déjà caractérisé (Moreau et al. 2012) et les constructions pCLV3::mCHERRY et pWUS::3xYFP (Pfeiffer et al., 2016) qui nous ont permis de réaliser le croisement *CLVxWUSxloki129*.

Les graines sont stérilisées avec une solution de Bayrochlore et éthanol 96° pendant 10 minutes puis lavée deux fois à l'éthanol 96°. Les graines sont mises à sécher sous hotte sur la nuit avant semis sur boîte *in vitro*.

B) Cultures

Les cultures *in vitro* ont été réalisées en boîte de Petri carrées verticales contenant du milieu Arabidopsis composé de 0,05% MES, 2,5 mM KH_2PO_4 , 2mM MgSO_4 , 5mM KNO_3 , 1mM CaCl_2 , 1X de microéléments, 1% ou 3% saccharose (selon mention particulière). Le pH est ajusté entre 5,6-5,7. 0,5% de phytigel est ajouté pour solidifier le milieu. Après autoclave à 115°C, 5mM de fer citrate ammoniacal sont ajoutés.

Différents inhibiteurs de TOR et de PI3K ont été utilisés, l'AZD-8055 (Euromedex, S1555) et TORIN2 (Sigma, SML-1224-5MG) à 0,25 μM , LY294002 (Selleckchem, S1105) à 20 μM et 30 μM , Vps34in-1 (Euromedex, SE-S7980-25MG) utilisé à 10 μM et 15 μM , Autophinib (Sigma, SML-2632-25MG) utilisé à 1 μM et 1,5 μM , et l'Isoxaben (Sigma-Aldrich, 36138) utilisé à 0,5nM, 1nM et 2nM.

C) Conditions de culture in vitro

Après semis, les graines sont mises à stratifier 48h à 4°C. Elles sont ensuite transférées en chambre de culture à une température de 21°C avec une exposition lumineuse de 80 $\mu\text{ Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ et une photopériode de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Pour les expériences sur les amas ectopiques, les observations sont réalisées sur des cultures de J+18 après mise en culture (notamment pour les analyses transcriptomiques) ou J+24. Les mesures racinaires ont été faites à J+11.

Pour étudier la croissance de l'hypocotyle, les boîtes verticales sont placées 3h30 à la lumière en chambre de culture puis mises à l'obscurité. Les scans sont réalisés à J+14 sauf mention particulière.

D) Mesure des longueurs racinaires et des hypocotyles

Les longueurs de la racine primaire ou des hypocotyles des plantules ont été mesurées avec le logiciel ImageJ, en utilisant le plugin NeuronJ.

E) Cytologie et Imagerie

1) Coloration au rouge de ruthénium

Cette coloration pour visualiser les défauts d'adhésion a été effectuée sur des hypocotyles de plantules étioilées cultivées à l'obscurité pendant 14 jours. La solution de rouge de ruthénium a été préparée à 0,05% dans de l'eau. L'incubation est réalisée pendant une dizaine de minutes à température ambiante sous agitation puis les plantules sont rincées une fois à l'eau. L'observation est réalisée à l'axiozoom.

2) *Eclaircissement des plantules et coloration au direct red23*

Les parties aériennes des plantules cultivées 6 ou 24 jours +/- AZD ont été fixées dans du paraformaldéhyde (PFA) 4% puis mise sous vide pendant 1h. Après 3 rinçages de 5 minutes au PBS (13.7mM NaCl, 0.27mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 0.2mM KH₂PO₄) 1X, les échantillons ont été incubés à température ambiante avec une solution de ClearSee (Ursache et al. 2018) et Direct Red 23 (1% p/v) dilué au 1/100^{ème}. Les observations sont réalisées quelques jours après l'incubation.

3) *Observations cytologiques*

Les observations morphologiques des amas ont été réalisées en microscopie optique avec un stéréomicroscope à large champ de marque Zeiss (axiozoom), connecté à un ordinateur.

Les observations microscopiques (coloration des amas au Direct Red23 et constructions CLVxWUSx*loki129*) ont été réalisées sur des microscopes confocaux LEICA SP5 et 710. Les plantes issues du croisement CLV3xWUSx*loki129* ont été cultivées 24 jours sur un milieu Arabidopsis 3% sucrose, sur une sélection Kanamycine (50mg/L), Basta (5,25mg/L) +/- AZD-8055 (0,25µM) avant observations au microscope confocal. Emission mCHERRY entre 550-650nm et YFP entre 470 et 530nm.

L'ensemble de ces observations ont été réalisées sur la plateforme Observatoire du Végétal-Cytologie/imagerie de l'IJPB, à l'INRAE de Versailles.

F) *Mesure de l'activité de TOR par Western-Blot*

L'activité de la kinase TOR est estimée par western-blot où l'on suit l'état de phosphorylation de la protéine ribosomale RPS6, une cible indirecte de TOR (Dobrenel et al. 2016) . Pour chaque génotype et condition, une vingtaine de plantules de 5 jours, cultivées sur milieu Arabidopsis à 1mM KNO₃ et 0,3% sucrose, ont été transférées en milieu liquide Arabidopsis carencé en sucre. Après 24h, du milieu contenant 1% de sucre est ajouté, +/- 1µM d'AZD. Les plantules sont récoltées en début d'après-midi, au bout de 5h de traitement.

1) *Extraction protéique*

Les plantules sont broyées à sec et 400 mM de dithiothreitol (DTT) sont ajoutés extemporanément à du tampon Laemmli 1X (50mM Tris-HCl pH6.8, 2% SDS, 10% Glycérol, 0.0025% bleu de bromophénol). En fonction de la quantité de poudre obtenue lors du broyage des plantules, on ajoute entre 50 et 150 µL de cette solution. Les extraits protéiques sont mis à bouillir pendant 5 minutes puis centrifugés 5 minutes à 10000 rpm/min. Le surnageant est ensuite récupéré.

2) Dosage des protéines

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford comme décrit précédemment.

3) Western-blot

Migration des échantillons protéiques : Les protéines sont mises à migrer dans un gel d'acrylamide composé d'un gel de concentration à 5%, et d'un gel de séparation à 12%. Les échantillons sont préparés de sorte à faire migrer 20µg de protéines par puits. Ces échantillons sont incubés 5 minutes à 95°C avant dépôt dans les puits. La migration est effectuée à voltage constant (150 V) pendant environ 1h10 dans un tampon de migration 1X (25mM Tris, 192mM Glycine, 0,1% SDS).

Transfert, Incubation et révélation : Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF. Le tampon de transfert (1x Trans-blot® buffer de Biorad®, 20% éthanol) est préparé extemporanément. La membrane PVDF est activée par un bain d'éthanol absolu puis celle-ci est trempée dans le tampon de transfert. On effectue ensuite le montage avec du papier Whatman imbibé de tampon de transfert, la membrane PVDF, le gel migré et une nouvelle couche de papier Whatman imbibé. Ce montage est mis à transférer à voltage croissant jusqu'à 25V et ampérage constant à 2,5 A pendant 12 minutes. Après transfert, les membranes sont saturées dans une solution de PBS (13.7mM NaCl, 0.27mM KCl, 1mM Na₂HPO₄, 0.2mM KH₂PO₄) contenant 0,05% de Tween 20 et 5% de lait écrémé, sous agitation, pendant une heure à température ambiante.

Les membranes sont ensuite incubées sur la nuit avec les anticorps primaires anti-RPS6 phosphorylée (P-RPS6) ou anti-RPS6 totale (1/5000 dans la solution 5% Lait-PBS-T-0,05%) à 4°C et sous agitation.

Le lendemain, les membranes sont rincées quatre fois 15 minutes avec la solution 5% Lait-PBS-T-0,05% à température ambiante puis incubées 1h avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase (Anticorps anti-lapin Sigma® A0545 produit chez la chèvre, 1/5000 dans la solution 5% Lait-PBS-T-0,05%). Les membranes sont lavées quatre fois avec la solution PBS-T-0,05%. La révélation est effectuée avec un kit de détection Biorad® Clarity western ECL. Le principe de révélation repose sur une réaction d'oxydation. La solution du kit de détection contient du luminol, que la peroxydase oxyde, émettant de la lumière qui sera détectée par une caméra CCD (LAS 4000). Les western-blot ont été quantifiés sur ImageJ, avec l'option Analyse de gels.

Étape de coloration : Les membranes sont colorées avec une solution commerciale de rouge Ponceau pendant 20 minutes pour s'assurer que les mêmes quantités de protéines ont été déposées dans chaque puits et transférées correctement. Elles sont ensuite rincées pour éliminer le surplus et scannées.

G) Analyses métabolomiques

Les analyses métabolomiques ont été réalisées sur des plantules cultivées *in vitro* sur milieu Arabidopsis, récoltées en début de journée à J+6 et J+24. Quatre réplicats biologiques ont été analysés pour chaque lignée et condition. Les niveaux de métabolites ont été déterminés par une analyse globale après dérivatisation et injection dans un GC-MS comme décrit par Forzani et al. (2019). 40 à 50 mg d'échantillons congelés et broyés ont été remis en suspension dans 1 mL d'un mélange de Eau:Acétonitrile:Isopropanol (2:3:3) contenant du Ribitol à 4 mg/mL et extrait pendant 10 minutes à 4° C avec agitation à 1400 rpm dans un Thermomixer Eppendorf. La matière insoluble a été éliminée par centrifugation à 20 000 g pendant 5 minutes. 50 mL ont été prélevés et mis à sécher sur la nuit à 35°C dans un Speed-Vac. Les échantillons ont été conservés à 80°C ou immédiatement injectés. Trois tubes vierges ont subi les mêmes étapes que les échantillons. Un contrôle qualité a été effectué en mettant en commun un volume égal de chaque condition. Des échantillons ont été prélevés à -80°C, réchauffés 15 minutes avant ouverture et séchés au speed-vac à nouveau pendant 1,5 heure à 35°C avant d'ajouter 10 mL de 20 mg/mL de méthoxyamine dans la pyridine aux échantillons et la réaction a été effectuée pendant 90 min à 28°C sous agitation continue dans un thermomixeur Eppendorf. 90 mL de N-méthyl-N-triméthylsilyl-trifluoroacétamide (MSTFA) (Aldrich 394866-10x1mL) ont ensuite été ajoutés et la réaction continuée pendant 30 minutes à 37°C. Après refroidissement, 45 mL ont été transférés dans un flacon Agilent pour injection. Quatre heures après la dérivatisation, 1 mL de l'échantillon a été injecté en modes splitless et split (1:30) sur un chromatographe en phase gazeuse Agilent 7890A couplé à une masse Agilent 5977B spectromètre. La colonne était une Rxi-5SiIMS de Restek (30 m avec une colonne integraguard de 10 m). Le paquebot (Restek # 20994) a été changé avant chaque série de 24 analyses d'échantillons. La température de l'étuve était de 70°C pendant 7 minutes puis de 10°C/min à 330°C pendant 5 minutes (durée du parcours 38 min). Le débit constant d'hélium était de 0,7mL/minutes. Les températures étaient les suivantes : injecteur : 250°C, ligne de transfert : 290°C, source : 250°C et quadripôle 150°C. Cinq scans par seconde ont été acquis sur une plage de 50 à 600 Da. L'instrument a été réglé avec PFTBA avec les 69 m/z et 219 m/z d'intensités égales. Les échantillons ont été randomisés. Quatre contrôles de qualité différents ont été injectés au début et à la fin de l'analyse pour le suivi de la stabilité de la dérivatisation. Un mélange d'alcanes (C10, C12, C15, C19, C22, C28, C32, C36) a été injecté pour l'étalonnage RI externe. Cinq scans par seconde ont été acquis. L'injection en mode split avec un ratio de 1:30 a été systématiquement réalisée avec les conditions suivantes : 70°C pendant 2 minutes puis 30°C par min à 330°C pendant 5 minutes. Hélium débit

constant 1 mL/minute. Trois dérivations indépendantes du contrôle qualité ont été injectées au début, au milieu et à la fin de la série.

Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme de l'OV-Chimie/Métabolisme de l'IJPB, INRAE de Versailles, en collaboration avec Gilles Clément.

H) Dosage de nitrates

1) L'extraction

Par échantillon, 30mg de plantules de 10 jours ont été récoltés. 300µL d'eau miliQ sont ajoutés et le tout est agité 4 minutes. Les échantillons sont laissés 15 minutes sur glace puis centrifugés à 8°C 10 minutes, à 10 000 rpm. Le surnageant est ensuite déposé dans une plaque 96 puits à fond plat et directement dosé.

2) Dosage des nitrates

Le dosage est réalisé selon le principe de Miranda. Dans chaque puits d'une plaque 96 puits, 20µL d'échantillon + 80µL d'eau et 100µL de réactif de Miranda (Pour 200mL, HCL 12N 8,3 mL, Chlorure de vanadium 0,5 g, N-1-naphtylethylenediamine 0,01 g, Sulfanilamide 0,2 g) sont déposés. La plaque est mise à l'étuve 1h30 à 60°. La réaction colorimétrique est ensuite mesurée par spectrophotométrie à 540 nm.

Une gamme de NaNO₃ est réalisée pour une quantité allant de 0 à 16nmol/puits, répartie en 12 points.

Le principe du dosage d'ammonium et la mesure de transport est décrit dans l'article soumis pour publication.

I) Analyse pariétale

L'analyse de la composition pariétale a été effectuée par spectrométrie sur des hypocotyles de 14 jours.

800µL d'éthanol 96° sont ajoutés à 100 hypocotyles broyés. Les échantillons sont chauffés 10 minutes à 80°C, centrifugés 8 minutes à 12000 rpm et 800µL d'éthanol 96° sont ajoutés au culot. Les échantillons sont à nouveau chauffés 10 minutes à 80°C puis incubés 10 minutes à température ambiante avec 800µL d'acétone. Après centrifugation, cette même étape est répétée. Après la dernière centrifugation, le culot est mis à sécher sur la nuit. 400µL de TFA 2mM sont ajoutés à 1,5mg de poudre sèche. Les échantillons sont chauffés 1h puis centrifugés 5 minutes à 13000 rpm. 200 µL sont récupérés pour analyse (Echantillons TFA). 800µL d'éthanol 70° sont ajoutés au reste des échantillons. Après 5 minutes de centrifugation à 10000 rpm, 800µL d'éthanol 70° sont ajoutés au culot et une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 13000 permet de

recupérer un culot auquel on rajoute de l'acétone. Après une incubation à température ambiante pendant 10 minutes, une centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm, cette étape est répétée puis le surnageant est éliminé et le culot laissé à sécher sur la nuit. 63µL d'acide sulfurique à 72% sont ajoutés aux échantillons laissés ensuite sous agitation forte pendant 1h à 23°C. 690µL d'H₂O sont ajoutés et les échantillons sont à nouveau laissés sous agitation forte pendant 3h à 100°C. Après une centrifugation de 4 minutes à 10000 rpm, le surnageant est récupéré pour analyse. Ceux-ci sont d'abord dilués au 100ème, puis au 5^{ème} et 640µL de la seconde dilution sont ensuite analysés. Pour les Tubes TFA, 64µL sont mis à sécher pendant 1h. 640µL d'eau sont ajoutés puis 640µL sont prélevés puis analysés.

Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme de l'OV-Chimie/Métabolisme de l'IJPB, INRAE de Versailles, en collaboration avec Grégory Mouille.

J) Analyse RT-qPCR

1) Extraction d'ARN

L'extraction des ARN totaux est réalisée avec la méthode au Trizol® Reagent. Après broyage des échantillons végétaux, 1mL de Trizol® sont ajoutés à 50-100 mg de poudre végétale. Les échantillons sont incubés 5 minutes à température ambiante puis 200µl de chloroforme sont ajoutés. Après 15 secondes d'incubation, les échantillons sont incubés 3 min à température ambiante et centrifugés à 4°C pendant 15 min à 12 000g. La phase aqueuse supérieure contenant les ARNs totaux est ensuite récupérée et les ARNs sont précipités avec 0,5 ml d'isopropanol. Les échantillons sont incubés à 4°C 15 minutes à température ambiante puis centrifugés 15 min à 12 000g. Le culot d'ARN est lavé une fois avec 1mL d'éthanol 75%- RNase-free- froid pour 1mL de Trizol®. Après mélange, les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 7500 g et à 4°C. Le culot est à nouveau reprécipité dans 500 µL d'eau RNase-free. 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium RNase-free 3M – pH5.2 est ajouté ainsi que 2 volumes d'éthanol 100% froid. Les ARNs sont laissés 1h30 à -80°C pour précipitation puis une centrifugation de 15 minutes à 12000g et à 4°C est effectuée pour récupérer le culot qui est séché à température ambiante 1 à 2h. Le culot est repris dans 20µL d'eau RNase-free et conservé à - 80°C.

Les ARNs sont dosés au Nanodrop à 260 et 280nm et l'intégrité des ARNs est vérifiée sur gel d'agarose 1% TAE 0,5X.

2) Reverse Transcription

Un traitement DNase a été effectué pour éliminer toute trace d'ADN génomique dans les échantillons. La reverse transcription est ensuite effectuée sur 11µL d'échantillon,

pour lequel on ajoute 1µL d'Oligo DT et 0,5µL d'H₂O. Après une incubation de 5 minutes à 65°C, 4 µL de tampon de réaction 5X, 0,5 µL de Ribolock (inhibiteur de RNase), 2 µL de dNTPs 10mM et 1 µL de l'enzyme Reverse Transcriptase sont ajoutés aux échantillons, qui sont ensuite incubés 1 heure à 42 °C. Les ADNc ainsi obtenus sont ensuite dilués au 1/20^{ème}.

3) qPCR

2,5µL de la dilution d'ADN sont utilisés pour cette analyse qPCR, avec 2,35µL de Sybr Biorad et 0,15µL d'un mix d'amorces (20 µL Forward (10 µM) + 20 µL Reverse (10 µM) + 160 µL H₂O). Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau ci-dessous, *Actine* et *EF1* étant les gènes référents:

Gènes	Amorce sens (Forward) 5'->3'	Amorce antisens (Reverse) 5'->3'
<i>CLAVATA3</i> (AT2G27250)	ATGGAAAGTGAATGGGTTGGAGCAA	TTCTTGGCTGTCTTGGTGGGTC
<i>Actine</i> (AT3G18780)	GCCATCCAAGCTGTTCTCTC	CCCTCGTAGATTGGCACAGT
<i>EF1</i> (AT5G60390)	CTGGAGGTTTTGAGGCGGTA	CAAAGGGTGAAAGCAAGAAGA

La séquence des autres amorces est fournie dans le papier soumis pour publication.

4) RT-PCR

Pour contrôler l'expression du gène *LOKI* dans les plantes WT et les mutants *loki*, une RT-PCR a été effectuée sur les échantillons ayant servi pour les analyses RT-qPCR et transcriptomiques. L'amorce sens utilisée pour la partie Start de l'ADN c de *LOKI* a pour séquence 5'-CCTCTCCGGCAACTCAGATC-3', l'amorce antisens pour la fin de la partie 3' de l'ADNc de *LOKI* a pour séquence 5'-GAGCTAGAGTATCCCACACAACG-3'. Le gène *LOKI* ayant une grande taille (7kb), une DNA polymérase plus processive (Taq phusion) a été utilisée pour cette RT-PCR a une concentration finale de 0,02U/µL, un Tampon Phusion HF à 1X, les amorces sens et antisens chacune à 0,625µM et les dNTPs (25mM) utilisés à 200µM. 1,5µL d'ADNc dilué au 1/20^{ème} a été utilisé pour cette réaction. Le programme pour amplifier le gène *LOKI* est le suivant :

98°C pendant 30sec- [98°C pendant 10sec-Tm62°C pendant 30sec- 72°C pendant 3min]x35 cycles – 72°C pendant 8min puis fin de réaction à 4°C.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 1% TAE 0,5X contenant du bromure d'éthidium (BET) et migrés 20 minutes à 100 Volts. La révélation se fait sous lampe UV.

K) Analyse transcriptomique

Les analyses transcriptomiques ont été réalisées par séquençage de type ARN-seq et d'ARN extraits de trois réplicats biologiques indépendants, correspondant à des plantules cultivées 18 jours *in vitro* sur milieu Arabidopsis 3% sucrose, +/- AZD 0,25µM. Les ARNs totaux ont été extraits avec la méthode du Trizol® Reagent incluant un traitement à la DNase. La technologie de séquençage a utilisé un Illumina NexSeq500 (plateforme POPS, IPS2, Université Paris Saclay). La qualité des ARNs est contrôlée avec le kit « RNA clean and concentrator Zymo Research ». Les bibliothèques RNA-seq ont été réalisées par un protocole TruSeq Stranded (Illumina, Californie, États-Unis). Les échantillons d'ARN-seq ont été séquencés en single-end (SE) avec un dimensionnement de 260 pb et une longueur de lecture de 75 bases. Le nombre de reads par échantillon est fixé à 20M. l'obtention et l'analyse statistique des résultats de séquençage sont réalisées comme décrit précédemment (Forzani et al. 2019). Les données sont incorporées dans la base CATdb (Gagnot et al., Nucleic Acids Res. 2008 ; Zaag et al. NAR 2015) et transmises à la base de données Geomnibus (GEO) du NCBI.

Bibliographie

- Abdeen, Ashraf, and Brian Miki. 2009. 'The Pleiotropic Effects of the *Bar* Gene and Glufosinate on the *Arabidopsis* Transcriptome'. *Plant Biotechnology Journal* 7 (3): 266–82. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2008.00398.x>.
- Abu-Remaileh, Monther, Gregory A. Wyant, Choah Kim, Nouf N. Laqtom, Maria Abbasi, Sze Ham Chan, Elizaveta Freinkman, and David M. Sabatini. 2017. 'Lysosomal Metabolomics Reveals V-ATPase- and MTOR-Dependent Regulation of Amino Acid Efflux from Lysosomes'. *Science* 358 (6364): 807–13. <https://doi.org/10.1126/science.aan6298>.
- Adami, Alessandra, Begoña García-Álvarez, Ernesto Arias-Palomo, David Barford, and Oscar Llorca. 2007. 'Structure of TOR and Its Complex with KOG1'. *Molecular Cell* 27 (3): 509–16. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.040>.
- Ahn, Chang Sook, Hee-Kyung Ahn, and Hyun-Sook Pai. 2015. 'Overexpression of the PP2A Regulatory Subunit Tap46 Leads to Enhanced Plant Growth through Stimulation of the TOR Signalling Pathway'. *Journal of Experimental Botany* 66 (3): 827–40. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru438>.
- Ahn, Chang Sook, Jeong-A Han, Ho-Seok Lee, Semi Lee, and Hyun-Sook Pai. 2011. 'The PP2A Regulatory Subunit Tap46, a Component of the TOR Signaling Pathway, Modulates Growth and Metabolism in Plants'. *The Plant Cell* 23 (1): 185–209. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074005>.
- Alet, Analía I., Diego H. Sanchez, Juan C. Cuevas, Secundino del Valle, Teresa Altabella, Antonio F. Tiburcio, Francisco Marco, et al. 2011. 'Putrescine Accumulation in Arabidopsis Thaliana Transgenic Lines Enhances Tolerance to Dehydration and Freezing Stress'. *Plant Signaling & Behavior* 6 (2): 278–86. <https://doi.org/10.4161/psb.6.2.14702>.
- Anderson, Garrett H, Bruce Veit, and Maureen R Hanson. 2005. 'The Arabidopsis AtRaptor Genes Are Essential for Post-Embryonic Plant Growth'. *BMC Biology*, 11.
- Avila-Ospina, L., M. Moison, K. Yoshimoto, and C. Masclaux-Daubresse. 2014. 'Autophagy, Plant Senescence, and Nutrient Recycling'. *Journal of Experimental Botany* 65 (14): 3799–3811. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru039>.
- Baena-Gonzalèz, Elena and John Edward Lunn. 2020. 'SnRK1 and Trehalose 6-phosphate- two ancient pathways converge to regulate plant metabolism and growth'. *Curr Opin Plant Biol*, 55:52-59
- Baima, Simona, Marco Possenti, Antonella Matteucci, Ellen Wisman, Maria Maddalena Altamura, Ida Ruberti, and Giorgio Morelli. 2001. 'The Arabidopsis ATHB-8 HD-Zip Protein Acts as a Differentiation-Promoting Transcription Factor of the Vascular Meristems'. *Plant Physiology* 126 (2): 643–55. <https://doi.org/10.1104/pp.126.2.643>.
- Bar-Peled, Liron, Lynne Chantranupong, Andrew D. Cherniack, Walter W. Chen, Kathleen A. Ottina, Brian C. Grabiner, Eric D. Spear, Scott L. Carter, Matthew Meyerson, and David M. Sabatini. 2013. 'A Tumor Suppressor Complex with GAP Activity for the Rag GTPases That Signal Amino Acid Sufficiency to MTORC1'. *Science* 340 (6136): 1100–1106. <https://doi.org/10.1126/science.1232044>.
- Barrada, Adam, Meriem Djendli, Thierry Desnos, Raphael Mercier, Christophe Robaglia, Marie-Hélène Montané, and Benoît Menand. 2019. 'A TOR-YAK1 Signaling Axis Controls Cell Cycle, Meristem Activity and Plant Growth in Arabidopsis'. *Development* 146 (dev171298). <https://doi.org/10.1242/dev.171298>.
- Barrada, Adam, Marie-Hélène Montané, Christophe Robaglia, and Benoît Menand. 2015. 'Spatial Regulation of Root Growth: Placing the Plant TOR Pathway in a Developmental Perspective'. *International Journal of Molecular Sciences* 16 (8): 19671–97. <https://doi.org/10.3390/ijms160819671>.
- Bhattacharya, Bhaskar, Mohd Feroz Mohd Omar, and Richie Soong. 2016. 'The Warburg Effect and Drug Resistance'. *British Journal of Pharmacology* 173 (6): 970–79. <https://doi.org/10.1111/bph.13422>.

- Bischoff, Volker, Joachim Selbig, and Wolf-Rüdiger Scheible. 2010. 'Involvement of TBL/DUF231 Proteins into Cell Wall Biology'. *Plant Signaling & Behavior* 5 (8): 1057–59. <https://doi.org/10.4161/psb.5.8.12414>.
- Bloom, Arnold J, and Scott S Sukrapanna. 1992. 'Root Respiration Associated with Ammonium and Nitrate Absorption and Assimilation by Barley' 99: 8.
- Bolourian, Alireza, and Zahra Mojtahedi. 2020. 'Obesity and COVID-19: The MTOR Pathway as a Possible Culprit'. *Obesity Reviews* 21 (9). <https://doi.org/10.1111/obr.13084>.
- Bouton, Sophie, Edouard Leboeuf, Gregory Mouille, Marie-Thérèse Leydecker, Joël Talbotec, Fabienne Granier, Marc Lahaye, Herman Höfte, and Hoai-Nam Truong. 2002. 'QUASIMODO1 Encodes a Putative Membrane-Bound Glycosyltransferase Required for Normal Pectin Synthesis and Cell Adhesion in Arabidopsis'. *The Plant Cell* 14 (10): 2577–90. <https://doi.org/10.1105/tpc.004259>.
- Brace, E. J., Leah P. Parkinson, and Robert S. Fuller. 2006. 'Skp1p Regulates Soi3p/Rav1p Association with Endosomal Membranes but Is Not Required for Vacuolar ATPase Assembly'. *Eukaryotic Cell* 5 (12): 2104–13. <https://doi.org/10.1128/EC.00347-05>.
- Brunkard, Jacob O., Min Xu, M. Regina Scarpin, Snigdha Chatterjee, Elena A. Shemyakina, Howard M. Goodman, and Patricia Zambryski. 2020. 'TOR Dynamically Regulates Plant Cell–Cell Transport'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (9): 5049–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1919196117>.
- Brunn, Gregory J., Patrick Fadden, Timothy A.J. Haystead, and John C. Lawrence. 1997. 'The Mammalian Target of Rapamycin Phosphorylates Sites Having a (Ser/Thr)-Pro Motif and Is Activated by Antibodies to a Region near Its COOH Terminus'. *Journal of Biological Chemistry* 272 (51): 32547–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.51.32547>.
- Brüx, Angela, Tzu-Yin Liu, Melanie Krebs, York-Dieter Stierhof, Jan U. Lohmann, Otto Miersch, Claus Wasternack, and Karin Schumacher. 2008. 'Reduced V-ATPase Activity in the *Trans* -Golgi Network Causes Oxylin-Dependent Hypocotyl Growth Inhibition in *Arabidopsis*'. *The Plant Cell* 20 (4): 1088–1100. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058362>.
- Cai, Wenguo, Xiaojuan Li, Yanlin Liu, Yaowei Wang, Yue Zhou, Tongda Xu, and Yan Xiong. 2017. 'COP1 Integrates Light Signals to ROP2 for Cell Cycle Activation'. *Plant Signaling & Behavior* 12 (9): e1363946. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1363946>.
- Caldana, Camila, Yan Li, Andrea Lisse, Yi Zhang, Lisa Bartholomaeus, Alisdair R. Fernie, Lothar Willmitzer, and Patrick Giavalisco. 2013. 'Systemic Analysis of Inducible Target of Rapamycin Mutants Reveal a General Metabolic Switch Controlling Growth in *Arabidopsis Thaliana*'. *The Plant Journal* 73 (6): 897–909. <https://doi.org/10.1111/tpj.12080>.
- Cao, Pengfei, Sang-Jin Kim, Anqi Xing, Craig A Schenck, Lu Liu, Nan Jiang, Jie Wang, Robert L Last, and Federica Brandizzi. 2019. 'Homeostasis of Branched-Chain Amino Acids Is Critical for the Activity of TOR Signaling in Arabidopsis'. *ELife* 8 (December): e50747. <https://doi.org/10.7554/eLife.50747>.
- Capilla-Perez, Laia, Victor Solier, Virginie Portemer, Aurelie Chambon, Aurelie Hurel, Alexia Guillebaux, Daniel Vezon, Laurence Cromer, Mathilde Grelon, and Raphael Mercier. 2018. 'The HEM Lines: A New Library of Homozygous Arabidopsis Thaliana EMS Mutants and Its Potential to Detect Meiotic Phenotypes'. *Frontiers in Plant Science* 9 (September): 1339. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01339>.
- Castangs, Loren, Antonio Camargo, Delphine Pocholle, Virginie Gaudon, Yves Texier, Stéphanie Boutet-Mercey, Ludivine Taconnat, et al. 2009. 'The Nodule Inception-like Protein 7 Modulates Nitrate Sensing and Metabolism in Arabidopsis'. *The Plant Journal* 57 (3): 426–35. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03695.x>.
- Chang, Geng-Ruei, Ying-Ying Wu, Yi-Shin Chiu, Wen-Ying Chen, Jiunn-Wang Liao, Hong-Ming Hsu, Te-Hsin Chao, Siu-Wan Hung, and Frank Chiahung Mao. 2009. 'Long-Term Administration of Rapamycin Reduces Adiposity, but Impairs Glucose Tolerance in High-Fat Diet-Fed KK/HIJ Mice'. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 105 (3): 188–98. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2009.00427.x>.

- Chassé, Héloïse, Odile Mulner-Lorillon, Sandrine Boulben, Virginie Glippa, Julia Morales, and Patrick Cormier. 2016. 'Cyclin B Translation Depends on MTOR Activity after Fertilization in Sea Urchin Embryos'. Edited by Ilaria Corsi. *PLOS ONE* 11 (3): e0150318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150318>.
- Chen, Guan-Hong, Ming-Jung Liu, Yan Xiong, Jen Sheen, and Shu-Hsing Wu. 2018. 'TOR and RPS6 Transmit Light Signals to Enhance Protein Translation in Deetiolating *Arabidopsis* Seedlings'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (50): 12823–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1809526115>.
- Chen, Hui, Biao Ma, Yang Zhou, Si-Jie He, San-Yuan Tang, Xiang Lu, Qi Xie, Shou-Yi Chen, and Jin-Song Zhang. 2018. 'E3 Ubiquitin Ligase SOR1 Regulates Ethylene Response in Rice Root by Modulating Stability of Aux/IAA Protein'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (17): 4513–18. <https://doi.org/10.1073/pnas.1719387115>.
- Cheng, Haiying, Yiyu Zou, Jeffrey S. Ross, Kai Wang, Xuwen Liu, Balazs Halmos, Siraj M. Ali, et al. 2015. 'RICTOR Amplification Defines a Novel Subset of Patients with Lung Cancer Who May Benefit from Treatment with MTORC1/2 Inhibitors'. *Cancer Discovery* 5 (12): 1262–70. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0971>.
- Chresta, Christine M., Barry R. Davies, Ian Hickson, Tom Harding, Sabina Cosulich, Susan E. Critchlow, John P. Vincent, et al. 2010. 'AZD8055 Is a Potent, Selective, and Orally Bioavailable ATP-Competitive Mammalian Target of Rapamycin Kinase Inhibitor with *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Activity'. *Cancer Research* 70 (1): 288–98. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1751>.
- Clay, Nicole K., and Timothy Nelson. 2005. 'Arabidopsis *Thickvein* Mutation Affects Vein Thickness and Organ Vascularization, and Resides in a Provascular Cell-Specific Spermine Synthase Involved in Vein Definition and in Polar Auxin Transport'. *Plant Physiology* 138 (2): 767–77. <https://doi.org/10.1104/pp.104.055756>.
- Corradetti, Michael N., Ken Inoki, and Kun-Liang Guan. 2005. 'The Stress-Inducted Proteins RTP801 and RTP801L Are Negative Regulators of the Mammalian Target of Rapamycin Pathway'. *Journal of Biological Chemistry* 280 (11): 9769–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.C400557200>.
- Coschigano, Karen T, Rosana Melo-Oliveira, Jackie Lim, and Gloria M Coruzzi. n.d. 'Arabidopsis Gls Mutants and Distinct Fd-GOGAT Genes: Implications for Photorespiration and Primary Nitrogen Assimilation', 12.
- Couso, Inmaculada, María Esther Pérez-Pérez, Megan M. Ford, Enrique Martínez-Force, Leslie M. Hicks, James G. Umen, and José L. Crespo. 2020. 'Phosphorus Availability Regulates TORC1 Signaling via LST8 in *Chlamydomonas*'. *The Plant Cell* 32 (1): 69–80. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00179>.
- Crespo, J. L., T. Powers, B. Fowler, and M. N. Hall. 2002. 'The TOR-Controlled Transcription Activators GLN3, RTG1, and RTG3 Are Regulated in Response to Intracellular Levels of Glutamine'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (10): 6784–89. <https://doi.org/10.1073/pnas.102687599>.
- Crespo, José L., Sandra Díaz-Troya, and Francisco J. Florencio. 2005. 'Inhibition of Target of Rapamycin Signaling by Rapamycin in the Unicellular Green Alga *Chlamydomonas Reinhardtii*'. *Plant Physiology* 139 (4): 1736–49. <https://doi.org/10.1104/pp.105.070847>.
- Crespo, José L., and Michael N. Hall. 2002. 'Elucidating TOR Signaling and Rapamycin Action: Lessons from *Saccharomyces Cerevisiae*'. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (4): 579–91. <https://doi.org/10.1128/MMBR.66.4.579-591.2002>.
- Crozet, Pierre, Leonor Margalha, Ana Confraria, Américo Rodrigues, Cláudia Martinho, Mattia Adamo, Carlos A. Elias, and Elena Baena-González. 2014. 'Mechanisms of Regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 Protein Kinases'. *Frontiers in Plant Science* 5 (May). <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00190>.
- Csibi, Alfred, Sarah-Maria Fendt, Chenggang Li, George Pouligiannis, Andrew Y. Choo, Douglas J. Chapski, Seung Min Jeong, et al. 2013. 'The MTORC1 Pathway Stimulates Glutamine

- Metabolism and Cell Proliferation by Repressing SIRT4'. *Cell* 153 (4): 840–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.023>.
- Csibi, Alfredo, Gina Lee, Sang-Oh Yoon, Haoxuan Tong, Didem Ilter, Ilaria Elia, Sarah-Maria Fendt, Thomas M. Roberts, and John Blenis. 2014. 'The MTORC1/S6K1 Pathway Regulates Glutamine Metabolism through the EIF4B-Dependent Control of c-Myc Translation'. *Current Biology* 24 (19): 2274–80. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.007>.
- Dames, Sonja A. 2010. 'Structural Basis for the Association of the Redox-Sensitive Target of Rapamycin FATC Domain with Membrane-Mimetic Micelles'. *Journal of Biological Chemistry* 285 (10): 7766–75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.058404>.
- Davidson, Shawn M., Thales Papagiannakopoulos, Benjamin A. Olenchock, Julia E. Heyman, Mark A. Keibler, Alba Luengo, Matthew R. Bauer, et al. 2016. 'Environment Impacts the Metabolic Dependencies of Ras-Driven Non-Small Cell Lung Cancer'. *Cell Metabolism* 23 (3): 517–28. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.01.007>.
- De Block, M., J. Botterman, M. Vandewiele, J. Dockx, C. Thoen, V. Gosselé, N. Rao Movva, C. Thompson, M. Van Montagu, and J. Leemans. 1987. 'Engineering Herbicide Resistance in Plants by Expression of a Detoxifying Enzyme'. *The EMBO Journal* 6 (9): 2513–18. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1987.tb02537.x>.
- Dechant, Reinhard, Shady Saad, Alfredo J. Ibáñez, and Matthias Peter. 2014. 'Cytosolic PH Regulates Cell Growth through Distinct GTPases, Arf1 and Gtr1, to Promote Ras/PKA and TORC1 Activity'. *Molecular Cell* 55 (3): 409–21. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.002>.
- Deprost, Dorothée, Hoai-Nam Truong, Christophe Robaglia, and Christian Meyer. 2005. 'An Arabidopsis Homolog of RAPTOR/KOG1 Is Essential for Early Embryo Development'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 326 (4): 844–50. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.11.117>.
- Deprost, Dorothée, Lei Yao, Rodnay Sormani, Manon Moreau, Guillaume Leterreux, Maryse Nicolai, Magali Bedu, Christophe Robaglia, and Christian Meyer. 2007. 'The Arabidopsis TOR Kinase Links Plant Growth, Yield, Stress Resistance and mRNA Translation'. *EMBO Reports* 8 (9): 864–70. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401043>.
- Dettmer, Jan, Anne Hong-Hermesdorf, York-Dieter Stierhof, and Karin Schumacher. 2006. 'Vacuolar H⁺-ATPase Activity Is Required for Endocytic and Secretory Trafficking in Arabidopsis'. *The Plant Cell* 18 (3): 715–30. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037978>.
- DeYoung, M. P., P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi, and L. W. Ellisen. 2008. 'Hypoxia Regulates TSC1/2 MTOR Signaling and Tumor Suppression through REDD1-Mediated 14 3 3 Shuttling'. *Genes & Development* 22 (2): 239–51. <https://doi.org/10.1101/gad.1617608>.
- Di Como, C J, and K T Arndt. 1996. 'Nutrients, via the Tor Proteins, Stimulate the Association of Tap42 with Type 2A Phosphatases.' *Genes & Development* 10 (15): 1904–16. <https://doi.org/10.1101/gad.10.15.1904>.
- Dill, Patricia E, Ning Liang, and Mario Pende. 2015. 'New Insights into the Pathophysiology of the Tuberous Sclerosis Complex: Crosstalk of MTOR- and Hippo-YAP Pathways in Cell Growth'. *Rare Diseases* 3 (1): e1016701. <https://doi.org/10.1080/21675511.2015.1016701>.
- Dobrenel, Thomas, Eder Mancera-Martínez, Céline Forzani, Marianne Azzopardi, Marlène Davanture, Manon Moreau, Mikhail Schepetilnikov, et al. 2016. 'The Arabidopsis TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6'. *Frontiers in Plant Science* 7 (November). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01611>.
- Doerner Peter. 2000. 'Plant stem cells: The only constant thing is change'. *Current Biology*, 10:R826-R829
- Dong, Pan, Fangjie Xiong, Yumei Que, Kai Wang, Lihua Yu, Zhengguo Li, and Maozhi Ren. 2015. 'Expression Profiling and Functional Analysis Reveals That TOR Is a Key Player in Regulating Photosynthesis and Phytohormone Signaling Pathways in Arabidopsis'. *Frontiers in Plant Science* 6 (September). <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00677>.

- Dong, Yihan, Marleen Silbermann, Anna Speiser, Ilaria Forieri, Eric Linster, Gernot Poschet, Arman Allboje Samami, et al. 2017. 'Sulfur Availability Regulates Plant Growth via Glucose-TOR Signaling'. *Nature Communications* 8 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01224-w>.
- Dorrello N Valerio, Angelo Peschiaroli, Daniele Guardavaccaro, Nancy H Colburn, Nicholas E Sherman, Michele Pagano. 2006. 'S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth'. *Science*, 314(5798):467-71
- Dos D. Sarbassov, Siraj M Ali, Do-Hyung Kim, David A Guertin, Robert R Latek, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, and David M Sabatini. 2004. 'Rictor, a Novel Binding Partner of MTOR, Defines a Rapamycin-Insensitive and Raptor-Independent Pathway That Regulates the Cytoskeleton'. *Current Biology* 14 (14): 1296–1302. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.054>.
- Du, Juan, Alex Kirui, Shixin Huang, Lianglei Wang, William J. Barnes, Sarah N. Kiemle, Yunzhen Zheng, et al. 2020. 'Mutations in the Pectin Methyltransferase QUASIMODO2 Influence Cellulose Biosynthesis and Wall Integrity in Arabidopsis'. *The Plant Cell* 32 (11): 3576–97. <https://doi.org/10.1105/tpc.20.00252>.
- Düvel, Katrin, Jessica L. Yecies, Suchithra Menon, Pichai Raman, Alex I. Lipovsky, Amanda L. Souza, Ellen Triantafellow, et al. 2010. 'Activation of a Metabolic Gene Regulatory Network Downstream of MTOR Complex 1'. *Molecular Cell* 39 (2): 171–83. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.06.022>.
- Dyachok, Julia, Svetlana Earnest, Erica N. Iturraran, Melanie H. Cobb, and Elliott M. Ross. 2016. 'Amino Acids Regulate MTORC1 by an Obligate Two-Step Mechanism'. *Journal of Biological Chemistry* 291 (43): 22414–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.732511>.
- Eng, C. P., S. N. Sehgal, and Claude Vezina. 1984. 'Activity of Rapamycin (AY-22,989) against Transplanted Tumors.' *The Journal of Antibiotics* 37 (10): 1231–37. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.37.1231>.
- Exaerde, Alban de Kerchove d', Philip Supply, Jean-Pierre Dufour, Pierre Bogaerts, Denyse Thinès, André Goffeau, and Marc Boutry. 1995. 'Functional Complementation of a Null Mutation of the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Plasma Membrane H⁺-ATPase by a Plant H⁺-ATPase Gene'. *Journal of Biological Chemistry* 270 (40): 23828–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.40.23828>.
- Feng, Shuang, Yun Peng, Enhui Liu, Hongping Ma, Kun Qiao, Aimin Zhou, Shenkui Liu, and Yuanyuan Bu. 2020. 'Arabidopsis V-ATPase D2 Subunit Plays a Role in Plant Responses to Oxidative Stress'. *Genes* 11 (6): 701. <https://doi.org/10.3390/genes11060701>.
- Ferrari, S., H.R. Bandi, J. Hofsteenge, B.M. Bussian, and G. Thomas. 1991. 'Mitogen-Activated 70K S6 Kinase. Identification of in Vitro 40 S Ribosomal S6 Phosphorylation Sites.' *Journal of Biological Chemistry* 266 (33): 22770–75. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54634-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54634-2).
- Ferreira, Sonia, Emmanuel Moreira, Isabel Amorim, Conceição Santos, Paula Melo. 2019. 'Arabidopsis thaliana mutants devoid of chloroplast glutamine synthetase (GS2) have non-lethal phenotype under photorespiratory conditions'. *Plant Physiol Biochem*, 144:365-374
- Fingar, D. C. 2002. 'Mammalian Cell Size Is Controlled by MTOR and Its Downstream Targets S6K1 and 4EBP1/EIF4E'. *Genes & Development* 16 (12): 1472–87. <https://doi.org/10.1101/gad.995802>.
- Flannery, Andrew R., and Tom H. Stevens. 2008. 'Functional Characterization of the N-Terminal Domain of Subunit H (Vma13p) of the Yeast Vacuolar ATPase'. *Journal of Biological Chemistry* 283 (43): 29099–108. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803280200>.
- Forzani, Céline, Gustavo T. Duarte, Jelle Van Leene, Gilles Clément, Stéphanie Hugué, Christine Paysant-Le-Roux, Raphaël Mercier, Geert De Jaeger, Anne-Sophie Leprince, and Christian Meyer. 2019. 'Mutations of the AtYAK1 Kinase Suppress TOR Deficiency in Arabidopsis'. *Cell Reports* 27 (12): 3696-3708.e5. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.074>.
- Fukao, Yoichiro, and Ali Ferjani. 2011. 'V-ATPase Dysfunction under Excess Zinc Inhibits Arabidopsis Cell Expansion'. *Plant Signaling & Behavior* 6 (9): 1253–55. <https://doi.org/10.4161/psb.6.9.16529>.

- Gao, Peng, Zeyu Xin, and Zhi-Liang Zheng. 2008. 'The OSU1/QUA2/TSD2-Encoded Putative Methyltransferase Is a Critical Modulator of Carbon and Nitrogen Nutrient Balance Response in *Arabidopsis*'. Edited by Brian Dilkes. *PLoS ONE* 3 (1): e1387. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001387>.
- Gaudinier, Allison, Joel Rodriguez-Medina, Lifang Zhang, Andrew Olson, Christophe Liseron-Monfils, Anne-Maarit Bågman, Jessica Foret, et al. 2018. 'Transcriptional Regulation of Nitrogen-Associated Metabolism and Growth'. *Nature* 563 (7730): 259–64. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0656-3>.
- Gendreau, Emmanuel, Jan Traas, Thierry Desnos, Olivier Grandjean, Michel Caboche, Herman Höfte. 1997. 'Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*'. *Plant physiology*, 114:295-305
- Gent, Lucas, and Brian G. Forde. 2017. 'How Do Plants Sense Their Nitrogen Status?' *Journal of Experimental Botany* 68 (10): 2531–39. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx013>.
- Giehl, Ricardo F.H., Alberto M. Laginha, Fengying Duan, Doris Rentsch, Lixing Yuan, and Nicolaus von Wirén. 2017. 'A Critical Role of AMT2;1 in Root-To-Shoot Translocation of Ammonium in *Arabidopsis*'. *Molecular Plant* 10 (11): 1449–60. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2017.10.001>.
- Gingras, A.-C., S. P. Gygi, B. Raught, R. D. Polakiewicz, R. T. Abraham, M. F. Hoekstra, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 1999. 'Regulation of 4E-BP1 Phosphorylation: A Novel Two-Step Mechanism'. *Genes & Development* 13 (11): 1422–37. <https://doi.org/10.1101/gad.13.11.1422>.
- González, Asier, and Michael N Hall. 2017. 'Nutrient Sensing and TOR Signaling in Yeast and Mammals'. *The EMBO Journal* 36 (4): 397–408. <https://doi.org/10.15252/embj.201696010>.
- González, Asier, Mitsugu Shimobayashi, Tobias Eisenberg, David Adrian Merle, Tobias Pendl, Michael N. Hall, and Tarek Moustafa. 2015. 'TORC1 Promotes Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 via the AGC Kinase Ypk3 in *Saccharomyces Cerevisiae*'. Edited by Yanchang Wang. *PLOS ONE* 10 (3): e0120250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120250>.
- Guan, Peizhu. 2017. 'Dancing with Hormones: A Current Perspective of Nitrate Signaling and Regulation in *Arabidopsis*'. *Frontiers in Plant Science* 8 (September). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01697>.
- Gwinn, Dana M., David B. Shackelford, Daniel F. Egan, Maria M. Mihaylova, Annabelle Mery, Debbie S. Vasquez, Benjamin E. Turk, and Reuben J. Shaw. 2008. 'AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint'. *Molecular Cell* 30 (2): 214–26. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.003>.
- Hagiwara, Asami, Marion Cornu, Nadine Cybulski, Pazit Polak, Charles Betz, Francesca Trapani, Luigi Terracciano, Markus H. Heim, Markus A. Rüegg, and Michael N. Hall. 2012. 'Hepatic MTORC2 Activates Glycolysis and Lipogenesis through Akt, Glucokinase, and SREBP1c'. *Cell Metabolism* 15 (5): 725–38. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.03.015>.
- Haigis, Marcia C., Raul Mostoslavsky, Kevin M. Haigis, Kamau Fahie, Danos C. Christodoulou, Andrew J. Murphy, David M. Valenzuela, et al. 2006. 'SIRT4 Inhibits Glutamate Dehydrogenase and Opposes the Effects of Calorie Restriction in Pancreatic β Cells'. *Cell* 126 (5): 941–54. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.057>.
- Hara, Kenta, Kazuyoshi Yonezawa, Qing-Ping Weng, Mark T. Kozlowski, Christopher Belham, and Joseph Avruch. 1998. 'Amino Acid Sufficiency and MTOR Regulate P70 S6 Kinase and EIF-4E BP1 through a Common Effector Mechanism'. *Journal of Biological Chemistry* 273 (23): 14484–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.23.14484>.
- Hassanian, S. M., A. Ardeshirylajimi, P. Dinarvand, and A. R. Rezaie. 2016. 'Inorganic Polyphosphate Promotes Cyclin D1 Synthesis through Activation of MTOR/Wnt/ β -Catenin Signaling in Endothelial Cells'. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14 (11): 2261–73. <https://doi.org/10.1111/jth.13477>.
- Heitman, J, NR Movva, MN Hall. 1991. 'Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast'. *Science*, 23;253(5022):905-9

- Heitman, Joseph. 2015. 'On the Discovery of TOR As the Target of Rapamycin'. *PLOS Pathogens* 11 (11): e1005245. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005245>.
- Hinton, Ayana, Souad R. Sennoune, Sarah Bond, Min Fang, Moshe Reuveni, G. Gary Sahagian, Daniel Jay, Raul Martinez-Zaguilan, and Michael Forgac. 2009. 'Function of a Subunit Isoforms of the V-ATPase in PH Homeostasis and in Vitro Invasion of MDA-MB231 Human Breast Cancer Cells'. *Journal of Biological Chemistry* 284 (24): 16400–408. <https://doi.org/10.1074/jbc.M901201200>.
- Ho, Daniel W H, Lo K Chan, Yung T Chiu, Iris M J Xu, Ronnie T P Poon, Tan T Cheung, Chung N Tang, et al. 2017. 'TSC1/2 Mutations Define a Molecular Subset of HCC with Aggressive Behaviour and Treatment Implication'. *Gut* 66 (8): 1496–1506. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312734>.
- Holz, Marina K., Bryan A. Ballif, Steven P. Gygi, and John Blenis. 2005. 'MTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events'. *Cell* 123 (4): 569–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024>.
- Hu, Cheng-Jun, Li-Yi Wang, Lewis A Chodosh, Brian Keith, and M Celeste Simon. 2003. 'Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) and HIF-2 α in Hypoxic Gene Regulation'. *MOL. CELL. BIOL.* 23: 14.
- Iershov, Anton, Ivan Nemazanyy, Chantal Alkhoury, Muriel Girard, Esther Barth, Nicolas Cagnard, Alexandra Montagner, et al. 2019. 'The Class 3 PI3K Coordinates Autophagy and Mitochondrial Lipid Catabolism by Controlling Nuclear Receptor PPAR α '. *Nature Communications* 10 (1): 1566. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09598-9>.
- Imamura, Sousuke, Yasuko Kawase, Ikki Kobayashi, Toshiyuki Sone, Atsuko Era, Shin-ya Miyagishima, Mie Shimojima, Hiroyuki Ohta, and Kan Tanaka. 2015. 'Target of Rapamycin (TOR) Plays a Critical Role in Triacylglycerol Accumulation in Microalgae'. *Plant Molecular Biology* 89 (3): 309–18. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0370-6>.
- Ingargiola, Camille, Gustavo Turqueto Duarte, Christophe Robaglia, Anne-Sophie Leprince, and Christian Meyer. 2020. 'The Plant Target of Rapamycin: A Conduc TOR of Nutrition and Metabolism in Photosynthetic Organisms'. *Genes* 11 (11): 1285. <https://doi.org/10.3390/genes11111285>.
- Inoki, K. 2003. 'Rheb GTPase Is a Direct Target of TSC2 GAP Activity and Regulates MTOR Signaling'. *Genes & Development* 17 (15): 1829–34. <https://doi.org/10.1101/gad.1110003>.
- Inoki, Ken, Tianqing Zhu, and Kun-Liang Guan. 2003. 'TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival'. *Cell* 115 (5): 577–90. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00929-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00929-2).
- Janse van Rensburg, Henry Christopher, Wim Van den Ende, and Santiago Signorelli. 2019. 'Autophagy in Plants: Both a Puppet and a Puppet Master of Sugars'. *Frontiers in Plant Science* 10 (January): 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00014>.
- Jefferies, Kevin C, and Michael Forgac. 2009. 'Subunit H of the V-ATPase Inhibits ATP Hydrolysis by the Free V1 Domain by Interaction with the Rotary Subunit F', 19.
- Jewell, J. L., Y. C. Kim, R. C. Russell, F.-X. Yu, H. W. Park, S. W. Plouffe, V. S. Tagliabracci, and K.-L. Guan. 2015. 'Differential Regulation of MTORC1 by Leucine and Glutamine'. *Science* 347 (6218): 194–98. <https://doi.org/10.1126/science.1259472>.
- Ji, Jiabing, Rena Shimizu, Neelima Sinha, and Michael J. Scanlon. 2010. 'Analyses of WOX4 Transgenics Provide Further Evidence for the Evolution of the WOX Gene Family during the Regulation of Diverse Stem Cell Functions'. *Plant Signaling & Behavior* 5 (7): 916–20. <https://doi.org/10.4161/psb.5.7.12104>.
- Ji, Jiabing, Josh Strable, Rena Shimizu, Daniel Koenig, Neelima Sinha, and Michael J. Scanlon. 2010. 'WOX4 Promotes Procambial Development'. *Plant Physiology* 152 (3): 1346–56. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149641>.
- Ji, Yuanyuan, Qiang Li, Guosheng Liu, Gopalan Selvaraj, Zhifu Zheng, Jitao Zou, and Yangdou Wei. 2019. 'Roles of Cytosolic Glutamine Synthetases in Arabidopsis Development and Stress Responses'. *Plant and Cell Physiology* 60 (3): 657–71. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy235>.

- Jian, Shaofen, Qiong Liao, Haixing Song, Qiang Liu, Joe Eugene Lepo, Chunyun Guan, Jianhua Zhang, Abdelbagi M. Ismail, and Zhenhua Zhang. 2018. 'NRT1.1-Related NH_4^+ Toxicity Is Associated with a Disturbed Balance between NH_4^+ Uptake and Assimilation'. *Plant Physiology* 178 (4): 1473–88. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00410>.
- Jiang, Yu, and James R. Broach. 1999. 'Tor Proteins and Protein Phosphatase 2A Reciprocally Regulate Tap42 in Controlling Cell Growth in Yeast'. *The EMBO Journal* 18 (10): 2782–92. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2782>.
- Jüppner, Jessica, Umarah Mubeen, Andrea Leisse, Camila Caldana, Andrew Wiszniewski, Dirk Steinhauser, and Patrick Giavalisco. 2018. 'The Target of Rapamycin Kinase Affects Biomass Accumulation and Cell Cycle Progression by Altering Carbon/Nitrogen Balance in Synchronized *Chlamydomonas Reinhardtii* Cells'. *The Plant Journal* 93 (2): 355–76. <https://doi.org/10.1111/tpj.13787>.
- Kamada, Yoshiaki, Tomoko Funakoshi, Takahiro Shintani, Kazuya Nagano, Mariko Ohsumi, and Yoshinori Ohsumi. 2000. 'Tor-Mediated Induction of Autophagy via an Apg1 Protein Kinase Complex'. *Journal of Cell Biology* 150 (6): 1507–13. <https://doi.org/10.1083/jcb.150.6.1507>.
- Kambhampati, Shrikaar, Aga Pajak, Frédéric Marsolais. 2021. 'Evidence that class I glutamine amidotransferase, GAT1_2.1, acts as a glutaminase in roots of *Arabidopsis thaliana*'. *Plant Sci.*, 312
- Kane, Patricia M. 1995. 'Disassembly and Reassembly of the Yeast Vacuolar H^+ -ATPase in Vivo'. *Journal of Biological Chemistry* 270 (28): 17025–32. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)46944-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)46944-4).
- Kawasaki-Nishi, S., T. Nishi, and M. Forgac. 2001. 'Arg-735 of the 100-kDa Subunit a of the Yeast V-ATPase Is Essential for Proton Translocation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (22): 12397–402. <https://doi.org/10.1073/pnas.221291798>.
- Kiba, Takatoshi, and Anne Krapp. 2016. 'Plant Nitrogen Acquisition Under Low Availability: Regulation of Uptake and Root Architecture'. *Plant and Cell Physiology* 57 (4): 707–14. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw052>.
- Kim, Do-Hyung, Dos D. Sarbassov, Siraj M. Ali, Jessie E. King, Robert R. Latek, Hediye Erdjument-Bromage, Paul Tempst, and David M. Sabatini. 2002. 'mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex That Signals to the Cell Growth Machinery'. *Cell* 110 (2): 163–75. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00808-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00808-5).
- Kim, Dongjin. 2015. 'Arabidopsis Yak1 Protein (AtYak1) Is a Dual Specificity Protein Kinase'. *FEBS Letters*, 7.
- Kim, Dongjin, Valentine Otang Ntui, and Liming Xiong. 2016. 'Arabidopsis YAK1 Regulates Abscisic Acid Response and Drought Resistance'. *FEBS Letters* 590 (14): 2201–9. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12234>.
- Kim, Jeong Sig, Seung-Hyun Ro, Myungjin Kim, Hwan-Woo Park, Ian A. Semple, Haeli Park, Uhn-Soo Cho, et al. 2015. 'Sestrin2 Inhibits mTORC1 through Modulation of GATOR Complexes'. *Scientific Reports* 5 (1): 9502. <https://doi.org/10.1038/srep09502>.
- Kim, Sang Gyun, Gregory R. Hoffman, George Pouligiannis, Gwen R. Buel, Young Jin Jang, Ki Won Lee, Bo-Yeon Kim, et al. 2013. 'Metabolic Stress Controls mTORC1 Lysosomal Localization and Dimerization by Regulating the TTT-RUVBL1/2 Complex'. *Molecular Cell* 49 (1): 172–85. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.003>.
- Kluge, Christoph, Thorsten Seidel, Susanne Bolte, Shanti S Sharma, Miriam Hanitzsch, Beatrice Satiat-Jeunemaitre, Joachim Roß, Markus Sauer, Dortje Golldeck, and Karl-Josef Dietz. 2004. 'Subcellular distribution of the V-ATPase complex in plants cells, and in vivo localisation of the 100 kDa subunit VHA-a within the complex'. *BMC Cell Biology* 5 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-5-29>.
- Krapp, Anne. 2015. 'Plant Nitrogen Assimilation and Its Regulation: A Complex Puzzle with Missing Pieces'. *Current Opinion in Plant Biology* 25 (June): 115–22. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.010>.

- Kravchenko, Alena, Sylvie Citerne, Isabelle Jéhanno, Rakhmetkazhi I. Bersimbaev, Bruce Veit, Christian Meyer, and Anne-Sophie Leprince. 2015. 'Mutations in the Arabidopsis Lst8 and Raptor Genes Encoding Partners of the TOR Complex, or Inhibition of TOR Activity Decrease Abscisic Acid (ABA) Synthesis'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 467 (4): 992–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.10.028>.
- Krebs, M., D. Beyhl, E. Gorlich, K. A. S. Al-Rasheid, I. Marten, Y.-D. Stierhof, R. Hedrich, and K. Schumacher. 2010. 'Arabidopsis V-ATPase Activity at the Tonoplast Is Required for Efficient Nutrient Storage but Not for Sodium Accumulation'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (7): 3251–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913035107>.
- Kriegel, Anne, Zaida Andrés, Anna Medzihradsky, Falco Krüger, Stefan Scholl, Simon Delang, M. Görkem Patir-Nebioglu, et al. 2015. 'Job Sharing in the Endomembrane System: Vacuolar Acidification Requires the Combined Activity of V-ATPase and V-PPase'. *The Plant Cell* 27 (12): 3383–96. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00733>.
- Kuruville, F. G., A. F. Shamji, and S. L. Schreiber. 2001. 'Carbon- and Nitrogen-Quality Signaling to Translation Are Mediated by Distinct GATA-Type Transcription Factors'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (13): 7283–88. <https://doi.org/10.1073/pnas.121186898>.
- Kwiatkowska, Ewa, Martyna Wojtala, Agnieszka Gajewska, Mirosław Soszynski, Grzegorz Bartosz, Izabela Sadowska-Bartosz. 2016. 'Effect of 3-bromopyruvate acid on the redox equilibrium in non-invasive MCF-7 and invasive MDA-MB-231 breast cancer cells'. *J Bioenerg Biomembr*, 48(1):23-32
- Lampa, Michael, Heike Arlt, Timothy He, Beatriz Ospina, Jason Reeves, Bailin Zhang, Joshua Murtie, et al. 2017. 'Glutaminase Is Essential for the Growth of Triple-Negative Breast Cancer Cells with a Deregulated Glutamine Metabolism Pathway and Its Suppression Synergizes with MTOR Inhibition'. Edited by Ming Tan. *PLOS ONE* 12 (9): e0185092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185092>.
- Landolt-Marticorena, Carolina, Kelly M. Williams, Judy Correa, Weimin Chen, and Morris F. Manolson. 2000. 'Evidence That the NH₂ Terminus of Vph1p, an Integral Subunit of the V₀ Sector of the Yeast V-ATPase, Interacts Directly with the Vma1p and Vma13p Subunits of the V₁Sector'. *Journal of Biological Chemistry* 275 (20): 15449–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000207200>.
- Largo, Rene' D., Maximilian G. Burger, Oliver Harschnitz, Conny F. Waschkies, Andrea Grosso, Celeste Scotti, Alexandre Kaempfen, et al. 2020. 'VEGF Over-Expression by Engineered BMSC Accelerates Functional Perfusion, Improving Tissue Density and In-Growth in Clinical-Size Osteogenic Grafts'. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 8 (July): 755. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00755>.
- Lemaître, Thomas, Laure Gaufichon, Stéphanie Boutet-Mercey, Aurélie Christ, Céline Masclaux-Daubresse. 2008. 'Enzymatic and metabolic diagnostic of nitrogen deficiency in Arabidopsis thaliana Wassilekija accession'. *Plant Cell Physiol* 49(7):1056-65.
- Leone, Robert D., Liang Zhao, Judson M. Englert, Im-Meng Sun, Min-Hee Oh, Im-Hong Sun, Matthew L. Arwood, et al. 2019. 'Glutamine Blockade Induces Divergent Metabolic Programs to Overcome Tumor Immune Evasion'. *Science* 366 (6468): 1013–21. <https://doi.org/10.1126/science.aav2588>.
- Li, Jinmei, Gonghong Yan, Sichi Liu, Tong Jiang, Mingming Zhong, Wenjie Yuan, Shaoxian Chen, Yin Zheng, Yong Jiang, and Yu Jiang. 2017. 'Target of Rapamycin Complex 1 and Tap42-Associated Phosphatases Are Required for Sensing Changes in Nitrogen Conditions in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*: Npr1 Regulates TORC1'. *Molecular Microbiology* 106 (6): 938–48. <https://doi.org/10.1111/mmi.13858>.
- Li, Lanxin, Inge Verstraeten, Mark Roosjen, Koji Takahashi, Lesia Rodriguez, Jack Merrin, Jian Chen, et al. 2021. 'Cell Surface and Intracellular Auxin Signalling for H⁺ Fluxes in Root Growth'. *Nature* 599 (7884): 273–77. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04037-6>.
- Li, Xiaojuan, Wenguo Cai, Yanlin Liu, Hui Li, Liwen Fu, Zengyu Liu, Lin Xu, Hongtao Liu, Tongda Xu, and Yan Xiong. 2017. 'Differential TOR Activation and Cell Proliferation in *Arabidopsis* Root and

- Shoot Apexes'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (10): 2765–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618782114>.
- Liberman, Rachel, Sarah Bond, Mara G. Shainheit, Miguel J. Stadecker, and Michael Forgac. 2014. 'Regulated Assembly of Vacuolar ATPase Is Increased during Cluster Disruption-Induced Maturation of Dendritic Cells through a Phosphatidylinositol 3-Kinase/MTOR-Dependent Pathway'. *Journal of Biological Chemistry* 289 (3): 1355–63. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.524561>.
- Lin, Wenwei, Xiang Zhou, Wenxin Tang, Koji Takahashi, Xue Pan, Jiawei Dai, Hong Ren, et al. 2021. 'TMK-Based Cell-Surface Auxin Signalling Activates Cell-Wall Acidification'. *Nature* 599 (7884): 278–82. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03976-4>.
- Liu, Grace Y., and David M. Sabatini. 2020. 'MTOR at the Nexus of Nutrition, Growth, Ageing and Disease'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 21 (4): 183–203. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0199-y>.
- Liu, Jian, Yingbin Ji, Jun Zhou, and Da Xing. 2016. 'Phosphatidylinositol 3-Kinase Promotes V-ATPase Activation and Vacuolar Acidification and Delays Methyl Jasmonate-Induced Leaf Senescence'. *Plant Physiology* 170 (3): 1714–31. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00744>.
- Liu, Liping, Timothy P. Cash, Russell G. Jones, Brian Keith, Craig B. Thompson, and M. Celeste Simon. 2006. 'Hypoxia-Induced Energy Stress Regulates mRNA Translation and Cell Growth'. *Molecular Cell* 21 (4): 521–31. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.010>.
- Liu, Mali, Maureen Tarsio, Colleen M.H. Charsky, and Patricia M. Kane. 2005. 'Structural and Functional Separation of the N- and C-Terminal Domains of the Yeast V-ATPase Subunit H'. *Journal of Biological Chemistry* 280 (44): 36978–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505296200>.
- Liu, Yanlin, Xiaoli Duan, Xiaodi Zhao, Wenlong Ding, Yaowei Wang, and Yan Xiong. 2021. 'Diverse Nitrogen Signals Activate Convergent ROP2-TOR Signaling in Arabidopsis'. *Developmental Cell* 56 (9): 1283-1295.e5. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.03.022>.
- Liu, Yimo, and Diane C. Bassham. 2010. 'TOR Is a Negative Regulator of Autophagy in Arabidopsis Thaliana'. Edited by Karin Schumacher. *PLoS ONE* 5 (7): e11883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011883>.
- Loewith, Robbie, Estela Jacinto, Stephan Wullschleger, Anja Lorberg, José L. Crespo, Débora Bonenfant, Wolfgang Oppliger, Paul Jenoe, and Michael N. Hall. 2002. 'Two TOR Complexes, Only One of Which Is Rapamycin Sensitive, Have Distinct Roles in Cell Growth Control'. *Molecular Cell* 10 (3): 457–68. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(02)00636-6).
- Logusch, Eugene W., Daniel M. Walker, John F. McDonald, and John E. Franz. 1991. 'Inhibition of Plant Glutamine Synthetases by Substituted Phosphinothricins'. *Plant Physiology* 95 (4): 1057–62. <https://doi.org/10.1104/pp.95.4.1057>.
- Long, Xiaomeng, Yenshou Lin, Sara Ortiz-Vega, Kazuyoshi Yonezawa, and Joseph Avruch. 2005. 'Rheb Binds and Regulates the MTOR Kinase'. *Current Biology* 15 (8): 702–13. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.02.053>.
- Long, Xiaomeng, Sara Ortiz-Vega, Yenshou Lin, and Joseph Avruch. 2005. 'Rheb Binding to Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Is Regulated by Amino Acid Sufficiency'. *Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 23433–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500169200>.
- Lorenz, Michael C., and Joseph Heitman. 1995. 'TOR Mutations Confer Rapamycin Resistance by Preventing Interaction with FKBP12-Rapamycin'. *Journal of Biological Chemistry* 270 (46): 27531–37. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.46.27531>.
- Lothier, Jérémy, Laure Gaufichon, Rodnay Sormani, Thomas Lemaître, Marianne Azzopardi, Halima Morin, Fabien Chardon, Michèle Reisdorf-Cren, Jean-Christophe Avice, and Céline Masclaux-Daubresse. 2011. 'The Cytosolic Glutamine Synthetase GLN1;2 Plays a Role in the Control of Plant Growth and Ammonium Homeostasis in Arabidopsis Rosettes When Nitrate Supply Is Not Limiting'. *Journal of Experimental Botany* 62 (4): 1375–90. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq299>.

- Luo, Yu, Stefan Scholl, Anett Doering, Yi Zhang, Niloufer G. Irani, Simone Di Rubbo, Lutz Neumetzler, et al. 2015. 'V-ATPase Activity in the TGN/EE Is Required for Exocytosis and Recycling in Arabidopsis'. *Nature Plants* 1 (7): 15094. <https://doi.org/10.1038/nplants.2015.94>.
- Ma, Binyun, Dong Qian, Qiong Nan, Chang Tan, Lizhe An, and Yun Xiang. 2012. 'Arabidopsis Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) B Subunits Are Involved in Actin Cytoskeleton Remodeling via Binding to, Bundling, and Stabilizing F-Actin'. *Journal of Biological Chemistry* 287 (23): 19008–17. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.281873>.
- Magaway, Cedric, Eugene Kim, and Estela Jacinto. 2019. 'Targeting MTOR and Metabolism in Cancer: Lessons and Innovations'. *Cells* 8 (12): 1584. <https://doi.org/10.3390/cells8121584>.
- Mahfouz, M. M. 2006. 'Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN Interacts with RAPTOR, Which Regulates the Activity of S6 Kinase in Response to Osmotic Stress Signals'. *THE PLANT CELL ONLINE* 18 (2): 477–90. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.035931>.
- Mahmoud, Shima, María Dolores Planes, Marc Cabedo, Cristina Trujillo, Alessandro Rienzo, Marcos Caballero-Molada, Sukesh C. Sharma, Consuelo Montesinos, José Miguel Mulet, and Ramón Serrano. 2017. 'TOR Complex 1 Regulates the Yeast Plasma Membrane Proton Pump and PH and Potassium Homeostasis'. *FEBS Letters* 591 (13): 1993–2002. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12673>.
- Manolson, M.F., D Proteau, R.A. Preston, A Stenbit, B.T. Roberts, M.A. Hoyt, D Preuss, J Mulholland, D Botstein, and E.W. Jones. 1992. 'The VPH1 Gene Encodes a 95-KDa Integral Membrane Polypeptide Required for in Vivo Assembly and Activity of the Yeast Vacuolar H(+)-ATPase.' *Journal of Biological Chemistry* 267 (20): 14294–303. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)49711-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)49711-1).
- Manolson, M.F., B. Wu, D. Proteau, B.E. Taillon, B.T. Roberts, M.A. Hoyt, and E.W. Jones. 1994. 'STV1 Gene Encodes Functional Homologue of 95-KDa Yeast Vacuolar H(+)-ATPase Subunit Vph1p.' *Journal of Biological Chemistry* 269 (19): 14064–74. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36755-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36755-8).
- Marchive, Chloé, François Roudier, Loren Castaings, Virginie Bréhaut, Eddy Blondet, Vincent Colot, Christian Meyer, and Anne Krapp. 2013. 'Nuclear Retention of the Transcription Factor NLP7 Orchestrates the Early Response to Nitrate in Plants'. *Nature Communications* 4 (1): 1713. <https://doi.org/10.1038/ncomms2650>.
- Marjuki, Henju, Alex Gornitzky, Bindumadhav M. Marathe, Natalia A. Ilyushina, Jerry R. Aldridge, Gururao Desai, Richard J. Webby, and Robert G. Webster. 2011. 'Influenza A Virus-Induced Early Activation of ERK and PI3K Mediates V-ATPase-Dependent Intracellular PH Change Required for Fusion: ERK and PI3K Regulate V-ATPase Activity'. *Cellular Microbiology* 13 (4): 587–601. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01556.x>.
- Masclaux-Daubresse, Céline, Michèle Reisdorf-Cren, Karine Pageau, Maud Lelandais, Olivier Grandjean, Joceline Kronenberger, Marie-Hélène Valadier, Magali Feraud, Tiphaine Jouglet, and Akira Suzuki. 2006. 'Glutamine Synthetase-Glutamate Synthase Pathway and Glutamate Dehydrogenase Play Distinct Roles in the Sink-Source Nitrogen Cycle in Tobacco'. *Plant Physiology* 140 (2): 444–56. <https://doi.org/10.1104/pp.105.071910>.
- McGuire, Christina M., Michael P. Collins, GeHong Sun-Wada, Yoh Wada, and Michael Forgac. 2019. 'Isoform-Specific Gene Disruptions Reveal a Role for the V-ATPase Subunit A4 Isoform in the Invasiveness of 4T1-12B Breast Cancer Cells'. *Journal of Biological Chemistry* 294 (29): 11248–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.007713>.
- Menand, B., T. Desnos, L. Nussaume, F. Berger, D. Bouchez, C. Meyer, and C. Robaglia. 2002. 'Expression and Disruption of the Arabidopsis TOR (Target of Rapamycin) Gene'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (9): 6422–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.092141899>.
- Menon, Suchithra, Christian C. Dibble, George Talbott, Gerta Hoxhaj, Alexander J. Valvezan, Hidenori Takahashi, Lewis C. Cantley, and Brendan D. Manning. 2014. 'Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of MTORC1 at the Lysosome'. *Cell* 156 (4): 771–85. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.049>.

- Meo-Evoli, Nathalie, Eugènia Almacellas, Francesco Alessandro Massucci, Antonio Gentilella, Santiago Ambrosio, Sara C. Kozma, George Thomas, and Albert Tauler. 2015. 'V-ATPase: A Master Effector of E2F1-Mediated Lysosomal Trafficking, MTORC1 Activation and Autophagy'. *Oncotarget* 6 (29): 28057–70. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4812>.
- Merkulova, Maria, Teodor G. Păunescu, Anie Azroyan, Vladimir Marshansky, Sylvie Breton, and Dennis Brown. 2015. 'Mapping the H⁺ (V)-ATPase Interactome: Identification of Proteins Involved in Trafficking, Folding, Assembly and Phosphorylation'. *Scientific Reports* 5 (1): 14827. <https://doi.org/10.1038/srep14827>.
- Moison, Michael, Anne Marmagne, Sylvie Dinant, Fabienne Soulay, Marianne Azzopardi, Jérémy Lothier, Sylvie Citerne, et al. 2018. 'Three Cytosolic Glutamine Synthetase Isoforms Localized in Different-Order Veins Act Together for N Remobilization and Seed Filling in Arabidopsis'. *Journal of Experimental Botany* 69 (18): 4379–93. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery217>.
- Montané, Marie-Hélène, and Benoît Menand. 2013. 'ATP-Competitive MTOR Kinase Inhibitors Delay Plant Growth by Triggering Early Differentiation of Meristematic Cells but No Developmental Patterning Change'. *Journal of Experimental Botany* 64 (14): 4361–74. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert242>.
- Moreau, M., M. Azzopardi, G. Clement, T. Dobrenel, C. Marchive, C. Renne, M.-L. Martin-Magniette, et al. 2012. 'Mutations in the Arabidopsis Homolog of LST8/G L, a Partner of the Target of Rapamycin Kinase, Impair Plant Growth, Flowering, and Metabolic Adaptation to Long Days'. *THE PLANT CELL ONLINE* 24 (2): 463–81. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.091306>.
- Mouille, Grégory, Marie-Christine Ralet, Céline Cavelier, Cathlene Eland, Delphine Effroy, Kian Hématy, Lesley McCartney, et al. 2007. 'Homogalacturonan Synthesis in Arabidopsis Thaliana Requires a Golgi-Localized Protein with a Putative Methyltransferase Domain: Homogalacturonan Synthesis in Arabidopsis'. *The Plant Journal* 50 (4): 605–14. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2007.03086.x>.
- Mubeen, Umarah, Jessica Jüppner, Jessica Alpers, Dirk K. Hinch, and Patrick Gialvalisco. 2018. 'Target of Rapamycin Inhibition in *Chlamydomonas Reinhardtii* Triggers de Novo Amino Acid Synthesis by Enhancing Nitrogen Assimilation'. *The Plant Cell* 30 (10): 2240.1-2254. <https://doi.org/10.1105/tpc.18.00159>.
- Nanjareddy, Kalpana, Lourdes Blanco, Manoj-Kumar Arthikala, Xóchitl Alvarado-Affantranger, Carmen Quinto, Federico Sánchez, and Miguel Lara. 2016. 'A Legume TOR Protein Kinase Regulates *Rhizobium* Symbiosis and Is Essential for Infection and Nodule Development'. *Plant Physiology* 172 (3): 2002–20. <https://doi.org/10.1104/pp.16.00844>.
- Nicklin, Paul, Philip Bergman, Bailin Zhang, Ellen Triantafellow, Henry Wang, Beat Nyfeler, Haidi Yang, et al. 2009. 'Bidirectional Transport of Amino Acids Regulates MTOR and Autophagy'. *Cell* 136 (3): 521–34. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.044>.
- Nojima, Hiroki, Chiharu Tokunaga, Satoshi Eguchi, Noriko Oshiro, Sujuti Hidayat, Ken-ichi Yoshino, Kenta Hara, Noriaki Tanaka, Joseph Avruch, and Kazuyoshi Yonezawa. 2003. 'The Mammalian Target of Rapamycin (MTOR) Partner, Raptor, Binds the MTOR Substrates P70 S6 Kinase and 4E-BP1 through Their TOR Signaling (TOS) Motif'. *Journal of Biological Chemistry* 278 (18): 15461–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200665200>.
- Nukarinen, Ella, Thomas Nägele, Lorenzo Pedrotti, Bernhard Wurzinger, Andrea Mair, Ramona Landgraf, Frederik Börnke, et al. 2016. 'Quantitative Phosphoproteomics Reveals the Role of the AMPK Plant Ortholog SnRK1 as a Metabolic Master Regulator under Energy Deprivation'. *Scientific Reports* 6 (1): 31697. <https://doi.org/10.1038/srep31697>.
- Okosun, Jessica, Rachel L Wolfson, Jun Wang, Shamzah Araf, Lucy Wilkins, Brian M Castellano, Leire Escudero-Ibarz, et al. 2016. 'Recurrent MTORC1-Activating RRAGC Mutations in Follicular Lymphoma'. *Nature Genetics* 48 (2): 183–88. <https://doi.org/10.1038/ng.3473>.
- O'Leary, Brendan M., Glenda Guek Khim Oh, Chun Pong Lee, and A. Harvey Millar. 2020. 'Metabolite Regulatory Interactions Control Plant Respiratory Metabolism via Target of Rapamycin (TOR) Kinase Activation'. *The Plant Cell* 32 (3): 666–82. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00157>.

- Oot, Rebecca A, Patricia M Kane, Edward A Berry, and Stephan Wilkens. 2016. 'Crystal Structure of Yeast V₁ - ATP Ase in the Autoinhibited State'. *The EMBO Journal* 35 (15): 1694–1706. <https://doi.org/10.15252/embj.201593447>.
- Oot, Rebecca A., and Stephan Wilkens. 2010. 'Domain Characterization and Interaction of the Yeast Vacuolar ATPase Subunit C with the Peripheral Stator Stalk Subunits E and G'. *Journal of Biological Chemistry* 285 (32): 24654–64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.136960>.
- Orozco, Jose M., Patrycja A. Krawczyk, Sonia M. Scaria, Andrew L. Cangelosi, Sze Ham Chan, Tenzin Kunchok, Caroline A. Lewis, and David M. Sabatini. 2020. 'Dihydroxyacetone Phosphate Signals Glucose Availability to MTORC1'. *Nature Metabolism* 2 (9): 893–901. <https://doi.org/10.1038/s42255-020-0250-5>.
- Parry, R V, J C Turner, and P A Rea. 1989. 'High Purity Preparations of Higher Plant Vacuolar H⁺-ATPase Reveal Additional Subunits'. *Journal of Biological Chemistry* 264 (33): 20025–32. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)47213-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)47213-X).
- Pascale, Rosa Maria, Diego Francesco Calvisi, Maria Maddalena Simile, Claudio Francesco Feo, and Francesco Feo. 2020. 'The Warburg Effect 97 Years after Its Discovery'. *Cancers* 12 (10): 2819. <https://doi.org/10.3390/cancers12102819>.
- Pearce, Laura R., Xu Huang, Jérôme Boudeau, Rafał Pawłowski, Stephan Wullschleger, Maria Deak, Adel F. M. Ibrahim, Robert Gourlay, Mark A. Magnuson, and Dario R. Alessi. 2007. 'Identification of Protor as a Novel Rictor-Binding Component of MTOR Complex-2'. *Biochemical Journal* 405 (3): 513–22. <https://doi.org/10.1042/BJ20070540>.
- Pende, Mario, Sung Hee Um, Virginie Mieulet, Melanie Sticker, Valerie L Goss, Jurgen Mestan, Matthias Mueller, Stefano Fumagalli, Sara C Kozma, and George Thomas. 2004. 'S6K1 Δ /X/S6K2 Δ /X Mice Exhibit Perinatal Lethality and Rapamycin-Sensitive 5J-Terminal Oligopyrimidine MRNA Translation and Reveal a Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent S6 Kinase Pathway'. *MOL. CELL. BIOL.* 24: 13.
- Peng, Sheng-Bin, Xinji Li, Bill P. Crider, Zhiming Zhou, Per Andersen, Sue Jean Tsai, Xiao-Song Xie, and Dennis K. Stone. 1999. 'Identification and Reconstitution of an Isoform of the 116-KDa Subunit of the Vacuolar Proton Translocating ATPase'. *Journal of Biological Chemistry* 274 (4): 2549–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.4.2549>.
- Pfeiffer, Anne, Denis Janocha, Yihan Dong, Anna Medzihradzky, Stefanie Schöne, Gabor Daum, Takuya Suzuki, et al. 2016. 'Integration of Light and Metabolic Signals for Stem Cell Activation at the Shoot Apical Meristem'. *ELife* 5 (July): e17023. <https://doi.org/10.7554/eLife.17023>.
- Podlešáková, Kateřina, Lydia Ugena, Lukáš Spíchal, Karel Doležal, and Nuria De Diego. 2019. 'Phytohormones and Polyamines Regulate Plant Stress Responses by Altering GABA Pathway'. *New Biotechnology* 48 (January): 53–65. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.07.003>.
- Puente, Cindy, Ronald C. Hendrickson, and Xuejun Jiang. 2016. 'Nutrient-Regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-Induced Autophagy'. *Journal of Biological Chemistry* 291 (11): 6026–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.689646>.
- Pun, Raymund Y.K., Isaiah J. Rolle, Candi L. LaSarge, Bethany E. Hosford, Jules M. Rosen, Juli D. Uhl, Sarah N. Schmeltzer, et al. 2012. 'Excessive Activation of MTOR in Postnatally Generated Granule Cells Is Sufficient to Cause Epilepsy'. *Neuron* 75 (6): 1022–34. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.08.002>.
- Rayle, D L, and R E Cleland. 1992. 'The Acid Growth Theory of Auxin-Induced Cell Elongation Is Alive and Well.' *Plant Physiology* 99 (4): 1271–74. <https://doi.org/10.1104/pp.99.4.1271>.
- Rebsamen, Manuele, Lorena Pochini, Taras Stasyk, Mariana E. G. de Araújo, Michele Galluccio, Richard K. Kandasamy, Berend Snijder, et al. 2015. 'SLC38A9 Is a Component of the Lysosomal Amino Acid Sensing Machinery That Controls MTORC1'. *Nature* 519 (7544): 477–81. <https://doi.org/10.1038/nature14107>.
- Reidman, Sophie, Adiel Cohen, Martin Kupiec, and Ronit Weisman. 2019. 'The Cytosolic Form of Aspartate Aminotransferase Is Required for Full Activation of TOR Complex 1 in Fission Yeast'. *Journal of Biological Chemistry* 294 (48): 18244–55. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.010101>.

- Ren, M., P. Venglat, S. Qiu, L. Feng, Y. Cao, E. Wang, D. Xiang, et al. 2012. 'Target of Rapamycin Signaling Regulates Metabolism, Growth, and Life Span in Arabidopsis'. *The Plant Cell* 24 (12): 4850–74. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.107144>.
- Ren, Maozhi, Shuqing Qiu, Prakash Venglat, Daoquan Xiang, Li Feng, Gopalan Selvaraj, and Raju Datla. 2011. 'Target of Rapamycin Regulates Development and Ribosomal RNA Expression through Kinase Domain in Arabidopsis'. *Plant Physiology* 155 (3): 1367–82. <https://doi.org/10.1104/pp.110.169045>.
- Ribierre, Théo, Charlotte Deleuze, Alexandre Bacq, Sara Baldassari, Elise Marsan, Mathilde Chipaux, Giuseppe Muraca, et al. 2018. 'Second-Hit Mosaic Mutation in MTORC1 Repressor DEPDC5 Causes Focal Cortical Dysplasia–Associated Epilepsy'. *Journal of Clinical Investigation* 128 (6): 2452–58. <https://doi.org/10.1172/JCI99384>.
- Roustan, Valentin, Shiva Bakhtiari, Pierre-Jean Roustan, and Wolfram Weckwerth. 2017. 'Quantitative in Vivo Phosphoproteomics Reveals Reversible Signaling Processes during Nitrogen Starvation and Recovery in the Biofuel Model Organism *Chlamydomonas Reinhardtii*'. *Biotechnology for Biofuels* 10 (1): 280. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0949-z>.
- Sakai, Kaori, Ludivine Tacconnat, Nero Borrega, Jennifer Yansouni, Véronique Brunaud, Christine Paysant-Le Roux, Etienne Delannoy, et al. 2018. 'Combining Laser-Assisted Microdissection (LAM) and RNA-Seq Allows to Perform a Comprehensive Transcriptomic Analysis of Epidermal Cells of Arabidopsis Embryo'. *Plant Methods* 14 (1): 10. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0275-x>.
- Salem, Mohamed A., Yan Li, Krzysztof Bajdzienko, Joachim Fisahn, Mutsumi Watanabe, Rainer Hoefgen, Mark Aurel Schöttler, and Patrick Gialvalisco. 2018. 'RAPTOR Controls Developmental Growth Transitions by Altering the Hormonal and Metabolic Balance'. *Plant Physiology* 177 (2): 565–93. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01711>.
- Salem, Mohamed A., Yan Li, Andrew Wiszniewski, and Patrick Gialvalisco. 2017. 'Regulatory-Associated Protein of TOR (RAPTOR) Alters the Hormonal and Metabolic Composition of Arabidopsis Seeds, Controlling Seed Morphology, Viability and Germination Potential'. *The Plant Journal* 92 (4): 525–45. <https://doi.org/10.1111/tpj.13667>.
- Sancak, Yasemin, Liron Bar-Peled, Roberto Zoncu, Andrew L. Markhard, Shigeyuki Nada, and David M. Sabatini. 2010. 'Regulator-Rag Complex Targets MTORC1 to the Lysosomal Surface and Is Necessary for Its Activation by Amino Acids'. *Cell* 141 (2): 290–303. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.024>.
- Sancak, Yasemin, Timothy R. Peterson, Yoav D. Shaul, Robert A. Lindquist, Carson C. Thoreen, Liron Bar-Peled, and David M. Sabatini. 2008. 'The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to MTORC1'. *Science* 320 (5882): 1496–1501. <https://doi.org/10.1126/science.1157535>.
- Sarbassov, Dos D., Siraj M. Ali, Shomit Sengupta, Joon-Ho Sheen, Peggy P. Hsu, Alex F. Bagley, Andrew L. Markhard, and David M. Sabatini. 2006. 'Prolonged Rapamycin Treatment Inhibits MTORC2 Assembly and Akt/PKB'. *Molecular Cell* 22 (2): 159–68. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.03.029>.
- Sato, T, A Nakashima, L Guo, K Coffman, and F Tamanoi. 2010. 'Single Amino-Acid Changes That Confer Constitutive Activation of MTOR Are Discovered in Human Cancer'. *Oncogene* 29 (18): 2746–52. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.28>.
- Sautin, Yuri Y, Ming Lu, Andrew Gaugler, Li Zhang, and Stephen L Gluck. 2005. 'Phosphatidylinositol 3-Kinase-Mediated Effects of Glucose on Vacuolar H₂-ATPase Assembly, Translocation, and Acidification of Intracellular Compartments in Renal Epithelial Cells'. *MOL. CELL. BIOL.* 25: 15.
- Scaiola, Alain, Francesca Mangia, Stefan Imseng, Daniel Boehringer, Karolin Berneiser, Mitsugu Shimobayashi, Edward Stutfeld, Michael N Hall, Nenad Ban, Timm Maier. 2020. 'The 3.2 Å resolution structure of human mTORC2'. *Science Advances*

- Scarpin, M Regina, Samuel Leiboff, and Jacob O Brunkard. 2020. 'Parallel Global Profiling of Plant TOR Dynamics Reveals a Conserved Role for LARP1 in Translation'. *ELife* 9 (October): e58795. <https://doi.org/10.7554/eLife.58795>.
- Schalm, Stefanie S., and John Blenis. 2002. 'Identification of a Conserved Motif Required for MTOR Signaling'. *Current Biology* 12 (8): 632–39. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00762-5](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00762-5).
- Schaufelberger, Myriam, Florian Galbier, Aline Herger, Rita de Brito Francisco, Stefan Roffler, Gilles Clement, Anouck Diet, Stefan Hörtensteiner, Thomas Wicker, and Christoph Ringli. 2019. 'Mutations in the Arabidopsis ROL17/Isopropylmalate Synthase 1 Locus Alter Amino Acid Content, Modify the TOR Network, and Suppress the Root Hair Cell Development Mutant Lrx1'. *Journal of Experimental Botany* 70 (8): 2313–23. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery463>.
- Schepetilnikov, Mikhail, Maria Dimitrova, Eder Mancera-Martínez, Angèle Geldreich, Mario Keller, and Lyubov A Ryabova. 2013. 'TOR and S6K1 Promote Translation Reinitiation of UORF-Containing MRNAs via Phosphorylation of EIF3h'. *The EMBO Journal* 32 (8): 1087–1102. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.61>.
- Schepetilnikov, Mikhail, Joelle Makarian, Ola Srour, Angèle Geldreich, Zhenbiao Yang, Johana Chicher, Philippe Hammann, and Lyubov A Ryabova. 2017. 'GTP Ase ROP 2 Binds and Promotes Activation of Target of Rapamycin, TOR, in Response to Auxin'. *The EMBO Journal* 36 (7): 886–903. <https://doi.org/10.15252/emboj.201694816>.
- Schreiber, Katherine H., Sebastian I. Arriola Apelo, Deyang Yu, Jacqueline A. Brinkman, Michael C. Velarde, Faizan A. Syed, Chen-Yu Liao, et al. 2019. 'A Novel Rapamycin Analog Is Highly Selective for MTORC1 in Vivo'. *Nature Communications* 10 (1): 3194. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11174-0>.
- Schumacher, K., D. Vafeados, M. McCarthy, H. Sze, T. Wilkins, and J. Chory. 1999. 'The Arabidopsis Det3 Mutant Reveals a Central Role for the Vacuolar H⁺-ATPase in Plant Growth and Development'. *Genes & Development* 13 (24): 3259–70. <https://doi.org/10.1101/gad.13.24.3259>.
- Schumacher, Karin, and Melanie Krebs. 2010. 'The V-ATPase: Small Cargo, Large Effects'. *Current Opinion in Plant Biology* 13 (6): 724–30. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.07.003>.
- Sehgal, S. N., H. Baker, and Claude Vézina. 1975. 'Rapamycin (AY-22,989), a New Antifungal Antibiotic. II. Fermentation, Isolation and Characterization.' *The Journal of Antibiotics* 28 (10): 727–32. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.727>.
- Seol, JH, A Shevchenko, A Shevchenko, R J Deshaies. 2001. 'Skp1 forms multiple protein complexes, including RAVE, a regulator of V-ATPase assembly'. *Nat Cell Biol* 3(4):384-91
- Shaw, R. J., M. Kosmatka, N. Bardeesy, R. L. Hurley, L. A. Witters, R. A. DePinho, and L. C. Cantley. 2004. 'The Tumor Suppressor LKB1 Kinase Directly Activates AMP-Activated Kinase and Regulates Apoptosis in Response to Energy Stress'. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (10): 3329–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308061100>.
- Shaw, Reuben J, Nabeel Bardeesy, Brendan D Manning, Lyle Lopez, Monica Kosmatka, Ronald A DePinho, and Lewis C Cantley. 2004. 'The LKB1 Tumor Suppressor Negatively Regulates MTOR Signaling'. *Cancer Cell* 6 (1): 91–99. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.06.007>.
- Sipos, György, Jason H. Brickner, E.J. Brace, Linyi Chen, Alain Rambourg, Francois Kepes, and Robert S. Fuller. 2004. 'Soi3p/Rav1p Functions at the Early Endosome to Regulate Endocytic Trafficking to the Vacuole and Localization of Trans -Golgi Network Transmembrane Proteins'. *Molecular Biology of the Cell* 15 (7): 3196–3209. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-10-0755>.
- Smardon, Anne M., Heba I. Diab, Maureen Tarsio, Theodore T. Diakov, Negin Dehdar Nasab, Robert W. West, and Patricia M. Kane. 2014. 'The RAVE Complex Is an Isoform-Specific V-ATPase Assembly Factor in Yeast'. Edited by Sandra Lemmon. *Molecular Biology of the Cell* 25 (3): 356–67. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-05-0231>.
- Smardon, Anne M., and Patricia M. Kane. 2007. 'RAVE Is Essential for the Efficient Assembly of the C Subunit with the Vacuolar H⁺-ATPase'. *Journal of Biological Chemistry* 282 (36): 26185–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703627200>.

- Smardon, Anne M., Maureen Tarsio, and Patricia M. Kane. 2002. 'The RAVE Complex Is Essential for Stable Assembly of the Yeast V-ATPase'. *Journal of Biological Chemistry* 277 (16): 13831–39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200682200>.
- Sormani, Rodnay, Lei Yao, Benoît Menand, Najla Ennar, Cécile Lecampion, Christian Meyer, and Christophe Robaglia. 2007. 'Saccharomyces Cerevisiae FKBP12 Binds Arabidopsis Thaliana TOR and Its Expression in Plants Leads to Rapamycin Susceptibility'. *BMC Plant Biology* 7 (1): 26. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-26>.
- Soto-Burgos, Junmarie, and Diane C. Bassham. 2017. 'SnRK1 Activates Autophagy via the TOR Signaling Pathway in Arabidopsis Thaliana'. Edited by Marisa Otegui. *PLOS ONE* 12 (8): e0182591. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182591>.
- Soto-Burgos, Junmarie, Xiaohong Zhuang, Liwen Jiang, and Diane C. Bassham. 2018. 'Dynamics of Autophagosome Formation'. *Plant Physiology* 176 (1): 219–29. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01236>.
- Stracka, Daniele, Szymon Jozefczuk, Florian Rudroff, Uwe Sauer, and Michael N. Hall. 2014. 'Nitrogen Source Activates TOR (Target of Rapamycin) Complex 1 via Glutamine and Independently of Gtr/Rag Proteins'. *Journal of Biological Chemistry* 289 (36): 25010–20. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574335>.
- Sugimoto, Katsunori. 2018. 'Branching the Tel2 Pathway for Exact Fit on Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinases'. *Current Genetics* 64 (5): 965–70. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0817-9>.
- Sun, Xichao, Huan Chen, Peng Wang, Fanjun Chen, Lixing Yuan, and Guohua Mi. 2020. 'Low Nitrogen Induces Root Elongation via Auxin-Induced Acid Growth and Auxin-Regulated Target of Rapamycin (TOR) Pathway in Maize'. *Journal of Plant Physiology* 254 (November): 153281. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2020.153281>.
- Sze, Heven, John M Ward, Shoupeng Lai, and Imara Perera. 1992. 'VACUOLAR-TYPE H⁺-TRANSLOCATING ATPases IN PLANT ENDOMEMBRANES: SUBUNIT ORGANIZATION AND MULTIGENE FAMILIES', 14.
- Taira, Masakazu, Ulrika Valtersson, Brad Burkhardt, and Robert A. Ludwig. 2004. 'Arabidopsis Thaliana GLN2 -Encoded Glutamine Synthetase Is Dual Targeted to Leaf Mitochondria and Chloroplasts'. *The Plant Cell* 16 (8): 2048–58. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.022046>.
- Takahara, Terunao, and Tatsuya Maeda. 2012. 'TORC1 of Fission Yeast Is Rapamycin-Sensitive'. *Genes to Cells* 17 (8): 698–708. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2012.01618.x>.
- Takahashi, Tetsuya, Kenta Hara, Hitomi Inoue, Yoshitaka Kawa, Chiharu Tokunaga, Sujuti Hidayat, Ken-ichi Yoshino, Yoshikazu Kuroda, and Kazuyoshi Yonezawa. 2000. 'Carboxyl-Terminal Region Conserved among Phosphoinositide-Kinase-Related Kinases Is Indispensable for MTOR Function *in Vivo* and *in Vitro*: Role of Carboxyl-Terminal Region of MTOR'. *Genes to Cells* 5 (9): 765–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00365.x>.
- Takano, Hudson K., Roland Beffa, Christopher Preston, Philip Westra, and Franck E. Dayan. 2019. 'Reactive Oxygen Species Trigger the Fast Action of Glufosinate'. *Planta* 249 (6): 1837–49. <https://doi.org/10.1007/s00425-019-03124-3>.
- Takayama, Kazuya, Akihiko Muto, and Yutaka Kikuchi. 2018. 'Leucine/Glutamine and v-ATPase/Lysosomal Acidification via MTORC1 Activation Are Required for Position-Dependent Regeneration'. *Scientific Reports* 8 (1): 8278. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26664-2>.
- Tanaka, Kazuhiro, Takashi Sasayama, Yasuhiro Irino, Kumi Takata, Hiroaki Nagashima, Naoko Satoh, Katsusuke Kyotani, et al. 2015. 'Compensatory Glutamine Metabolism Promotes Glioblastoma Resistance to MTOR Inhibitor Treatment'. *Journal of Clinical Investigation* 125 (4): 1591–1602. <https://doi.org/10.1172/JCI78239>.
- Tanigawa, Mirai, and Tatsuya Maeda. 2017. 'An *In Vitro* TORC1 Kinase Assay That Recapitulates the Gtr-Independent Glutamine-Responsive TORC1 Activation Mechanism on Yeast Vacuoles'. *Molecular and Cellular Biology* 37 (14). <https://doi.org/10.1128/MCB.00075-17>.
- Tatebe, Hisashi, and Kazuhiro Shiozaki. 2017. 'Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways'. *Biomolecules* 7 (4): 77. <https://doi.org/10.3390/biom7040077>.

- Tcherkezian, J., M. Cargnello, Y. Romeo, E. L. Huttlin, G. Lavoie, S. P. Gygi, and P. P. Roux. 2014. 'Proteomic Analysis of Cap-Dependent Translation Identifies LARP1 as a Key Regulator of 5'TOP mRNA Translation'. *Genes & Development* 28 (4): 357–71. <https://doi.org/10.1101/gad.231407.113>.
- Thomsen, Hanne C, Dennis Eriksson, Inge S Møller, Jan K Schjoerring. 2014. 'Cytosolic glutamine synthetase: a target for improvement of crop nitrogen use efficiency?' *Trends Plant Sci*, 19(10):656-63
- Upadhyaya, Shivani, Shreya Agrawal, Anmol Gorakshakar, and Basuthkar Jagadeeshwar Rao. 2020. 'TOR Kinase Activity in *Chlamydomonas Reinhardtii* Is Modulated by Cellular Metabolic States'. *FEBS Letters* 594 (19): 3122–41. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13888>.
- Ursache, Robertas, Tonni Grube Andersen, Peter Marhavý, and Niko Geldner. 2018. 'A Protocol for Combining Fluorescent Proteins with Histological Stains for Diverse Cell Wall Components'. *The Plant Journal* 93 (2): 399–412. <https://doi.org/10.1111/tpj.13784>.
- Vallejo, Beatriz, Cecilia Picazo, Helena Orozco, Emilia Matallana, and Agustín Aranda. 2017. 'Herbicide Glufosinate Inhibits Yeast Growth and Extends Longevity during Wine Fermentation'. *Scientific Reports* 7 (1): 12414. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12794-6>.
- Van Leene, Jelle, Chao Han, Astrid Gadeyne, Dominique Eeckhout, Caroline Matthijs, Bernard Cannoot, Nancy De Winne, et al. 2019. 'Capturing the Phosphorylation and Protein Interaction Landscape of the Plant TOR Kinase'. *Nature Plants* 5 (3): 316–27. <https://doi.org/10.1038/s41477-019-0378-z>.
- Vidal, Elena A., José M. Alvarez, Viviana Araus, Eleodoro Riveras, Matthew D. Brooks, Gabriel Krouk, Sandrine Ruffel, et al. 2020. 'Nitrate in 2020: Thirty Years from Transport to Signaling Networks'. *The Plant Cell* 32 (7): 2094–2119. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00748>.
- Wang, Huamin, Xiaodong Wang, and Yu Jiang. 2003. 'Interaction with Tap42 Is Required for the Essential Function of Sit4 and Type 2A Phosphatases'. *Molecular Biology of the Cell* 14 (11): 4342–51. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0072>.
- Wang, Pengcheng, Yang Zhao, Zhongpeng Li, Chuan-Chih Hsu, Xue Liu, Liwen Fu, Yueh-Ju Hou, et al. 2018. 'Reciprocal Regulation of the TOR Kinase and ABA Receptor Balances Plant Growth and Stress Response'. *Molecular Cell* 69 (1): 100-112.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.002>.
- Wang, Rong, Tao Long, Abdirahman Hassan, Jin Wang, Yingyuan Sun, Xiao-Song Xie, and Xiaochun Li. 2020. 'Cryo-EM Structures of Intact V-ATPase from Bovine Brain'. *Nature Communications* 11 (1): 3921. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17762-9>.
- Wang, Shuyu, Zhi-Yang Tsun, Rachel L. Wolfson, Kuang Shen, Gregory A. Wyant, Molly E. Plovianich, Elizabeth D. Yuan, et al. 2015. 'Lysosomal Amino Acid Transporter SLC38A9 Signals Arginine Sufficiency to mTORC1'. *Science* 347 (6218): 188–94. <https://doi.org/10.1126/science.1257132>.
- Weisman, Ronit, and Mordechai Choder. 2001. 'The Fission Yeast TOR Homolog, Tor1+, Is Required for the Response to Starvation and Other Stresses via a Conserved Serine'. *Journal of Biological Chemistry* 276 (10): 7027–32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010446200>.
- Welker, Mark E., and George Kulik. 2013. 'Recent Syntheses of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway Inhibitors'. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 21 (14): 4063–91. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.04.083>.
- Whitton, Bradleigh, Haruko Okamoto, Graham Packham, and Simon J. Crabb. 2018. 'Vacuolar ATPase as a Potential Therapeutic Target and Mediator of Treatment Resistance in Cancer'. *Cancer Medicine* 7 (8): 3800–3811. <https://doi.org/10.1002/cam4.1594>.
- Wilms, Tobias, Erwin Swinnen, Elja Eskes, Laura Dolz-Edo, Alice Uwineza, Ruben Van Essche, Joëlle Rosseels, et al. 2017. 'The Yeast Protein Kinase Sch9 Adjusts V-ATPase Assembly/Disassembly to Control PH Homeostasis and Longevity in Response to Glucose Availability'. Edited by Adam L. Hughes. *PLOS Genetics* 13 (6): e1006835. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006835>.

- Wolfson, Rachel L., Lynne Chantranupong, Robert A. Saxton, Kuang Shen, Sonia M. Scaria, Jason R. Cantor, and David M. Sabatini. 2016. 'Sestrin2 Is a Leucine Sensor for the MTORC1 Pathway'. *Science* 351 (6268): 43–48. <https://doi.org/10.1126/science.aab2674>.
- Wullschleger, Stephan, Robbie Loewith, and Michael N. Hall. 2006. 'TOR Signaling in Growth and Metabolism'. *Cell* 124 (3): 471–84. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016>.
- Wurzinger, Bernhard, Ella Nukarinen, Thomas Nägele, Wolfram Weckwerth, and Markus Teige. 2018. 'The SnRK1 Kinase as Central Mediator of Energy Signaling between Different Organelles'. *Plant Physiology* 176 (2): 1085–94. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01404>.
- Xiong, Yan, Matthew McCormack, Lei Li, Qi Hall, Chengbin Xiang, and Jen Sheen. 2013. 'Glucose–TOR Signalling Reprograms the Transcriptome and Activates Meristems'. *Nature* 496 (7444): 181–86. <https://doi.org/10.1038/nature12030>.
- Xiong, Yan, and Jen Sheen. 2012. 'Rapamycin and Glucose-Target of Rapamycin (TOR) Protein Signaling in Plants'. *Journal of Biological Chemistry* 287 (4): 2836–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.300749>.
- Yang, Haijuan, Derek G. Rudge, Joseph D. Koos, Bhamini Vaidialingam, Hyo J. Yang, and Nikola P. Pavletich. 2013. 'MTOR Kinase Structure, Mechanism and Regulation'. *Nature* 497 (7448): 217–23. <https://doi.org/10.1038/nature12122>.
- Yang, Huirong, Jia Wang, Mengjie Liu, Xizi Chen, Min Huang, Dan Tan, Meng-Qiu Dong, et al. 2016. '4.4 Å Resolution Cryo-EM Structure of Human MTOR Complex 1'. *Protein & Cell* 7 (12): 878–87. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0346-6>.
- Yin, Yancun, Hui Hua, Minjing Li, Shu Liu, Qingbin Kong, Ting Shao, Jiao Wang, et al. 2016. 'MTORC2 Promotes Type I Insulin-like Growth Factor Receptor and Insulin Receptor Activation through the Tyrosine Kinase Activity of MTOR'. *Cell Research* 26 (1): 46–65. <https://doi.org/10.1038/cr.2015.133>.
- Yin, Zhangyuan, Hana Popelka, Yuchen Lei, Ying Yang, and Daniel J. Klionsky. 2020. 'The Roles of Ubiquitin in Mediating Autophagy'. *Cells* 9 (9): 2025. <https://doi.org/10.3390/cells9092025>.
- Yip, Calvin K., Kazuyoshi Murata, Thomas Walz, David M. Sabatini, and Seong A. Kang. 2010. 'Structure of the Human MTOR Complex I and Its Implications for Rapamycin Inhibition'. *Molecular Cell* 38 (5): 768–74. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.017>.
- Yuan, Lingqin, Xiugui Sheng, Adam K Willson, Dario R Roque, Jessica E Stine, Hui Guo, Hannah M Jones, Chunxiao Zhou, and Victoria L Bae-Jump. 2015. 'Glutamine Promotes Ovarian Cancer Cell Proliferation through the MTOR/S6 Pathway'. *Endocrine-Related Cancer* 22 (4): 577–91. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0192>.
- Yuan, Lixing, Dominique Loqué, Soichi Kojima, Sabine Rauch, Keiki Ishiyama, Eri Inoue, Hideki Takahashi, and Nicolaus von Wirén. 2007. 'The Organization of High-Affinity Ammonium Uptake in *Arabidopsis* Roots Depends on the Spatial Arrangement and Biochemical Properties of AMT1-Type Transporters'. *The Plant Cell* 19 (8): 2636–52. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.052134>.
- Zhang, Hanma, and Brian G Forde. n.d. 'Regulation of Arabidopsis Root Development by Nitrate Availability', 9.
- Zhang, Huiying, Xiangli Niu, Jia Liu, Fangming Xiao, Shuqing Cao, and Yongsheng Liu. 2013. 'RNAi-Directed Downregulation of Vacuolar H⁺-ATPase Subunit A Results in Enhanced Stomatal Aperture and Density in Rice'. Edited by Keqiang Wu. *PLoS ONE* 8 (7): e69046. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069046>.
- Zhang, Zhenzhen, Jia-Ying Zhu, Jeehee Roh, Chloé Marchive, Seong-Ki Kim, Christian Meyer, Yu Sun, Wenfei Wang, and Zhi-Yong Wang. 2016. 'TOR Signaling Promotes Accumulation of BZR1 to Balance Growth with Carbon Availability in Arabidopsis'. *Current Biology* 26 (14): 1854–60. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.05.005>.
- Zhou, Aimin, Yuanyuan Bu, Tetsuo Takano, Xinxin Zhang, and Shenkui Liu. 2016. 'Conserved V-ATPase c Subunit Plays a Role in Plant Growth by Influencing V-ATPase-Dependent Endosomal Trafficking'. *Plant Biotechnology Journal* 14 (1): 271–83. <https://doi.org/10.1111/pbi.12381>.

- Zhou, Aimin, Tetsuo Takano, and Shenkui Liu. 2018. 'The Role of Endomembrane-Localized VHA-c in Plant Growth'. *Plant Signaling & Behavior* 13 (1): e1382796. <https://doi.org/10.1080/15592324.2017.1382796>.
- Zoncu, Roberto, Liron Bar-Peled, Alejo Efeyan, Shuyu Wang, Yasemin Sancak, and David M. Sabatini. 2011. 'MTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H⁺-ATPase'. *Science* 334 (6056): 678–83. <https://doi.org/10.1126/science.1207056>.
- Zoncu, Roberto, Alejo Efeyan, and David M. Sabatini. 2011. 'MTOR: From Growth Signal Integration to Cancer, Diabetes and Ageing'. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (1): 21–35. <https://doi.org/10.1038/nrm3025>.

Annexe : Revue Ingargiola et al. 2020

Review

The Plant Target of Rapamycin: A Conductor of Nutrition and Metabolism in Photosynthetic Organisms

Camille Ingargiola ¹, Gustavo Turqueto Duarte ^{1,2} , Christophe Robaglia ³, Anne-Sophie Leprince ^{1,4} and Christian Meyer ^{1,*}

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB), INRAE, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, 78000 Versailles, France; camille.ingargiola@inrae.fr (C.I.); duarte.gst@gmail.com (G.T.D.); anne-sophie.leprince@inrae.fr (A.-S.L.)

² Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology, 14476 Potsdam, Germany

³ Laboratoire de Génétique et Biophysique des Plantes, Faculté des Sciences de Luminy, UMR 7265, CEA, CNRS, BIAM, Aix Marseille Université, 13009 Marseille, France; christophe.robaglia@univ-amu.fr

⁴ Faculté des Sciences et d'Ingénierie, Sorbonne Université, UFR 927, 4 Place Jussieu, 75252 Paris, France

* Correspondence: christian.meyer@inrae.fr

Received: 8 October 2020; Accepted: 27 October 2020; Published: 29 October 2020



Abstract: Living organisms possess many mechanisms to sense nutrients and favorable conditions, which allow them to grow and develop. Photosynthetic organisms are very diverse, from green unicellular algae to multicellular flowering plants, but most of them are sessile and thus unable to escape from the biotic and abiotic stresses they experience. The Target of Rapamycin (TOR) signaling pathway is conserved in all eukaryotes and acts as a central regulatory hub between growth and extrinsic factors, such as nutrients or stress. However, relatively little is known about the regulations and roles of this pathway in plants and algae. Although some features of the TOR pathway seem to have been highly conserved throughout evolution, others clearly differ in plants, perhaps reflecting adaptations to different lifestyles and the rewiring of this primordial signaling module to adapt to specific requirements. Indeed, TOR is involved in plant responses to a vast array of signals including nutrients, hormones, light, stresses or pathogens. In this review, we will summarize recent studies that address the regulations of TOR by nutrients in photosynthetic organisms, and the roles of TOR in controlling important metabolic pathways, highlighting similarities and differences with the other eukaryotes.

Keywords: target of rapamycin (TOR); plant; metabolism; photosynthetic organisms; nutrition; sugars; carbon; nitrogen; sulfur

1. Introduction

As early as 1826, the French physiologist Henri Dutrochet stated that biology is one and that there is not a clear demarcation line between animal and plant physiology. Therefore, in these early days he thought that one could learn a lot from plant physiology when studying animals (and vice versa). He was indeed right, but the animal and plant field have diverged in their approaches when studying physiology and cell biology [1].

During their evolution from the Last Eukaryotic Common Ancestor (LECA), plants have diverged from animals and other eukaryotes in many ways. They acquired multicellularity and the ability to live outside water independently from animals but their most prominent feature is probably their

ability to synthesize organic C molecules like sugars from light energy. This was made possible after the symbiotic acquisition of photosynthetic cyanobacteria that evolved into chloroplasts. Like yeasts, but unlike animals, plants are also able to synthesize organic N (for example amino acids, nucleotides or specialized metabolites) and S molecules from inorganic sources, which are found in their environment.

Finally, plants can produce new organs (for example leaves, roots or flowers) throughout their life due to continuous cell divisions in meristems that are located at the growing tips of roots and shoots, and from which most postembryonic structures are derived.

These characteristics allow plants to adapt to changing or adverse conditions from which they cannot escape. Nutrients availability, phytohormones, light intensity, pathogens, water or thermic stress are some of the numerous signals or constraints to which photosynthetic organisms are subjected. Therefore, plants and algae need to sense these different external or internal cues for adjusting their metabolism, growth and development to survive these sometimes harsh conditions (for a review see [2,3]).

In all eukaryotes since the LECA, conserved and ancient regulatory bricks allow the coupling of cell and tissue growth to the availability of nutrients and energy. These connections are essential to maintain cell homeostasis in between the assimilation and the use of nutrients, and must rely on efficient sensing mechanisms. One of the most central and conserved nutrient sensing pathway involves the Target of Rapamycin (TOR) kinase signaling cascade [4]. TOR is a central regulator of metabolism and growth processes in all eukaryotic cells, promoting anabolism in favorable conditions while inhibiting catabolism and protein degradation by autophagy and the proteasome pathway [5–8]. Furthermore, plant life depends on a close coupling of many environmental inputs (light and nutrients, but also abiotic or biotic stresses) with complex adaptive growth responses like root development or the switch from vegetative to reproductive growth. Given its roles in other eukaryotes, the TOR kinase appears as a good candidate to perform these connections between environmental cues and developmental processes.

In animals and yeast a wealth of studies have identified in the recent years multiple upstream regulators controlling TOR activity [6,9]. This interest in TOR was motivated by the fact that modifications of this kinase activity can cause cancers or metabolic diseases [5,10]. The TOR inducing or repressing factors include nutrients like sugars or amino acids, hormones like insulin or other signaling pathways.

The following review will emphasize how plant nutrients signaling affects the regulation of the TOR kinase and how TOR in turn controls many arms of plant metabolism. The plant and algae TOR signaling network has been recently reviewed in several excellent papers (for algae see [11,12]; for multicellular plants see for example [13–17]). Therefore, we will focus on the control of TOR activity in plants by nutrients, and the role of this kinase in regulating metabolic pathways, concentrating on C and N metabolisms.

2. The TOR Complex in Plants and Algae

TOR is a large Ser/Thr kinase protein, belonging to the Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase (PIKK) family that also comprises of the conserved ATM and ATR kinases (see [18,19] for reviews). In yeast and mammals, the TOR kinase is involved in two different complexes, TORC1 and TORC2, which differ by the partners of the TOR kinase [5,6]. In plants and green algae, only the TORC1 complex seems to be present, where TOR interacts with two protein partners, RAPTOR and LST8, which are well conserved among eukaryotes [4]. TOR and other PIKKinases need the TTT (Tel2-Tti1-Tti2) complex for their maturation and dimerization together with the R2TP (Pontin/RuvBL1-Reptin/RuvBL2-Spaghetti/Tah1-Pih1) complex and the HSP90 chaperone. Pontin-Reptin is an AAA+ ATPase-containing complex. In animals, it has been shown that deprivation of C and N nutrients lead to a decrease in ATP concentration and to an inhibition of the R2TP complex, which in turn will reduce the dimerization of the TORC1 complex and its kinase activity [20]. This mechanism thus provides a link between the sensing of energy supply and the regulation of the TORC1 activity. In the model plant *Arabidopsis*, all three components of the TTT complex

were found to interact with the LST8 protein together with Reptin-Pontin homologs [21] (Figure 1). Brunkard et al. [22] identified in *Arabidopsis* a *reptin* mutant that displays a higher transport of molecules through plasmodesmata, pores that allow communication between adjacent plant cells, together with a decreased TOR activity. Accordingly, it was observed by the same authors that TOR repress transport of macromolecules through plasmodesmata in *Arabidopsis*. Lower TOR activity was found in *reptin*, but also *sphaghetti* and *telo2 Arabidopsis* mutants. Similarly, *tli2* (*telo2* interacting protein2) mutants in maize have very reduced TOR activity [23].

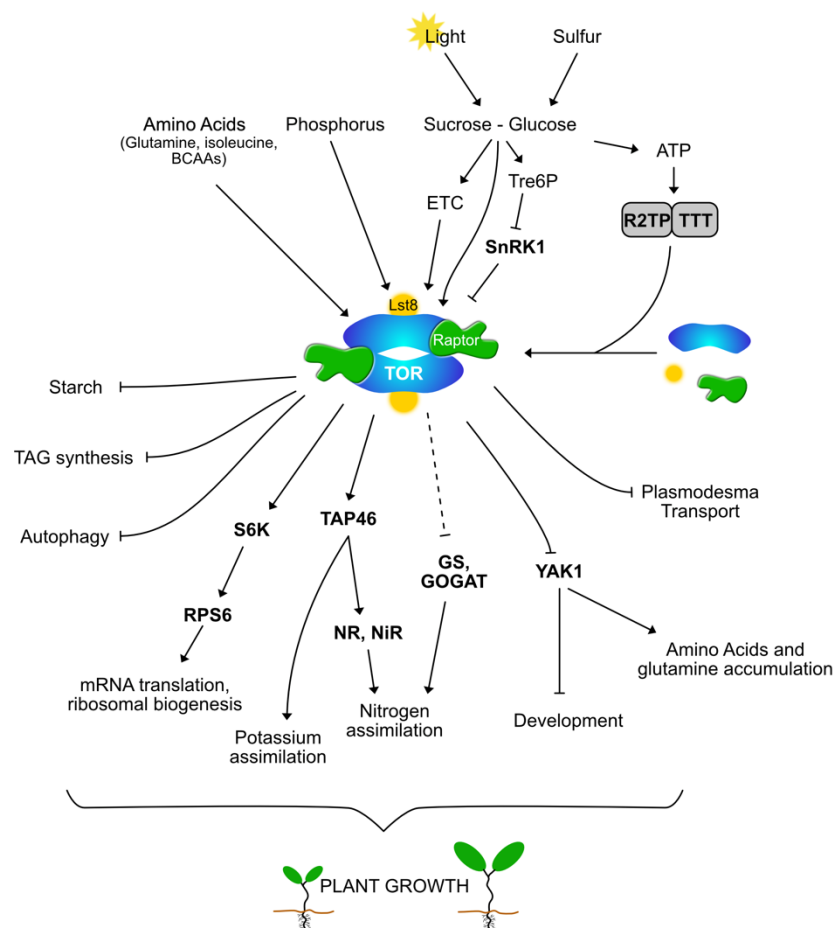


Figure 1. Regulations and outputs of the TOR signaling pathway in photosynthetic organisms: TOR is a conductor of nutritional and metabolic processes. **Legend:** The TOR (Target of Rapamycin) protein kinase is a central regulatory hub connecting various environmental and internal signals with the plant and algal metabolic and growth processes. This kinase is the heart of the evolutionary conserved TORC1 complex in which it interacts with LST8 (Lethal with Sec Thirteen protein 8) and RAPTOR (Regulatory-Associated Protein of TOR). The association of R2TP (Pontin/RuvBL1-Reptin/RuvBL2-Spaghetti/Tah1-Pih1), TTT (Tel2-Tti1-Tti2) complex and HSP90 chaperone allow the dimerization and stabilization of the TORC1 complex depending on ATP levels. Light and photosynthesis produce sugars, which, through the ETC (Electron Transport Chain), are known to stimulate TOR activity and to inhibit SnRK1 (Snf1-Related Kinase 1), the antagonist kinase of TOR. SnRK1 is activated by low energy and nutrient conditions and phosphorylates RAPTOR, inhibiting TOR activity. Phosphorus, sulfur, nitrogen and amino acids also stimulate TOR activity. In response to these signals, TOR acts on different targets like S6K (ribosomal protein S6 kinase), YAK1 (Yet another Kinase 1) or TAP46 (PP2A regulatory subunit TAP46) to regulate mRNA translation, nutritional and metabolic processes and in fine plant growth.

So far, only the TORC1 protein partners were identified in plants, and many other components of the animal TOR signaling pathways seem to be missing [24]. In *Arabidopsis*, *tor* mutants are lethal at an early stage of development [25], indicating that the TOR kinase plays an essential role in the embryo development. The TOR partners RAPTOR and LST8 are both encoded by two genes in *Arabidopsis*, respectively *RAPTOR1*, *RAPTOR2* and *LST8-1*, *LST8-2* [26–28]. Mutations in single *RAPTOR* or *LST8* genes, and even in the two *RAPTOR* genes, are viable but the mutants display development defects and an altered TOR signaling [26–30]. Structural and interaction studies have shown that LST8 binds the TOR kinase domain [27,31]. This binding is necessary to stabilize and fully activate TOR. Indeed, TOR activity in *Arabidopsis lst8* mutants does not respond any longer to sugar activation [32]. It has been shown in animals and yeast that RAPTOR interacts with the HEAT repeats of TOR and presents substrates to the kinase domain [31,33]. In yeast, the KOG1 (RAPTOR in yeast) protein is involved in the oligomerization of inactive TORC1 complexes in hollow helices after glucose removal [34].

Contrary to yeast and mammals, *Arabidopsis* is relatively insensitive in most growth conditions to rapamycin, the first discovered TOR inhibitor [25,35]. However, rapamycin seems to inhibit growth of *Arabidopsis* plantlets [36] or cells [21] in liquid culture, maybe because hypoxia enhances the action of rapamycin in plants [37].

Other mTOR inhibitors like AZD-8055 (AZD) or TORIN2, which interfere with ATP binding, can inactivate TOR activity in plants [35,38]. Unlike plants, the unicellular green alga *Chlamydomonas* is sensitive to rapamycin, which has a strong effect on growth and metabolism [39,40].

Recently phosphoproteomic and interactomic analyses in *Arabidopsis* [21] or *Chlamydomonas* [40,41] have identified both plant-specific and conserved TOR targets and interactors. These studies provide further evidence that there is no clear phosphorylation consensus motif for the TOR kinase, except maybe for a Pro at position +1 and possibly a Gly at position –1 relative to the phosphorylated Ser/Thr residue. TOR is known to be a major regulator of the different steps of mRNA translation in eukaryotes [4,8]. Accordingly, many of the identified TOR targets are related to the control of translation, including LARP1 (La-Related Protein 1), components of the translation initiation complex and RPS6 (Ribosomal Protein S6). It was already known that *Arabidopsis* RPS6 was phosphorylated by S6 kinase (S6K) on C-terminal Ser residues [33] and RPS6 phosphorylation was later shown to be induced by sugar in a TOR-dependent manner after a phosphoproteomic analysis of the ribosomal fraction in *Arabidopsis* [42]. Interestingly, the decrease in C-terminal RPS6 phosphorylation is always among the most robust output of TOR inactivation, and this dephosphorylation is conserved among eukaryotes [21,40,43,44]. As a consequence, RPS6 phosphorylation is an excellent output for TOR activity in plants that can be monitored by a specific phosphoantibody like in other eukaryotes [42,43].

The dual specificity Tyr/Ser YAK1 kinase, an ortholog of the yeast YAK1 (Yet Another Kinase1) and of the animal DYRK1a, has recently been identified as a strong suppressor of the *lst8* mutation and as a direct TOR substrate in *Arabidopsis* [21,32]. Mutations in YAK1 were also identified in a screen for resistance to TOR inhibitors, and shown to control the SIAMESE-related cyclin-dependent kinase inhibitors [45]. These convergent results suggest that activation of YAK1 is a major contributor to the effects of TOR inhibition on growth and metabolism.

3. SnRK1 and TOR in Plants: An Intricate Reciprocal Interaction

The regulations and roles of TOR are less known in plants compared to yeast or animals. Generally, when the environmental conditions are favorable, the TORC1 complex is activated and stimulates anabolic reactions like mRNA translation, cellular growth and plant development (for a summary see [46] and Figure 1) and inhibits catabolic process like autophagy [47]. Moreover, TOR seems to participate to the responses to biotic and abiotic stresses like the regulation of cold acclimation [4]. Indeed, mutation of the *THADA* conserved gene involved in cold acclimation results in a low TOR activity [48]. In response to stress, TORC1 is often inhibited, which leads to stimulated autophagy [49]. In plants, this TOR inactivation partly depends on the activation of SnRK1 (Snf1-related kinase 1),

an antagonist kinase of TOR [49,50]. SnRK1 is the ortholog of the AMP-activated kinase (AMPK) in animals and of the sucrose non-fermenting 1 kinase (Snf1) in yeast. SnRK1 interacts with the *Arabidopsis* TORC1 complex and inhibits its activity by phosphorylating the RAPTOR protein like in other eukaryotes [44]. In line with these findings, it was recently observed that the two SnRK1 catalytic subunits interact with the RAPTOR protein [21]. Furthermore, the reciprocal regulation was finally identified in fission yeast and animals. It was indeed recently shown that TOR phosphorylates a conserved residue on AMPK to inhibit its activity [51]. Interestingly this Ser residue is conserved in all eukaryotes including *Arabidopsis* (Ser283 in SnRK1/Kin11 catalytic subunit).

Even if plant components of both the SnRK1 and TOR complexes differ from the ones found in animals and yeast, the overall organization and interactions between these two mega complexes seem to have been conserved throughout evolution. A very recent paper describes a dual role for the SnRK2 kinases, plant specific members of the SnRK kinase family, in both inactivating SnRK1 in optimal growth conditions (and hence activating TOR) while activating SnRK1 in response to ABA [52]. Finally, it is tempting to hypothesize that all these complex kinase complexes could be tethered together to allow reciprocal and intertwined cross-regulations, which would limit their activation and maintain equilibrium within the cell.

4. The Sweet Side of TOR: Sugars as Regulatory Factors and Outputs

With the advent of methods allowing one to measure TOR activity in plants, it became possible to explore the regulations of this kinase by nutrient signals. These methods are the same as the ones used in the animal or yeast fields, and are mainly based on the detection of S6K activation by a TOR-dependent phosphorylation. This phosphorylation can be monitored directly by using a phospho-specific S6K antibody [36] or by a shift in electrophoretic mobility following phosphorylation of a HA-tagged S6K expressed in plants [21]. The S6K activation can also be detected by measuring RPS6 phosphorylation using a specific phospho-antibody [42,43]. The higher level of the ribosomal protein RPS6, together with the robustness, linearity and amplitude of its phosphorylation by TOR/S6K, facilitates the detection of phosphoRPS6 in plant extracts. Conversely, S6K is expressed at lower levels but has the advantage of being a direct TOR substrate.

It then became quickly obvious that, like in other eukaryotes, plant TOR activity is strongly and robustly induced by sugars (sucrose, glucose or fructose) and, consistently, highly repressed by sugar starvation [36,42,53]. In *lst8* mutants, TOR activity is reduced but also insensitive to the addition of sucrose to starved *Arabidopsis* seedlings. Surprisingly, the suppression by mutations of the YAK1 kinase of most of the phenotypic and metabolic defects in the *lst8* mutant does not restore induction of TOR activity by sugars [32]. When activated by sugars, TOR promotes the synthesis of proteins and nucleotides needed for cell growth and division [5,8,16]. Thus, TOR serves as an intermediate for the regulation of organismal growth by sugars.

Sugars are not only nutrients but are also signaling molecules in plants [54–56]. They could act on TOR activity through new or already identified sugar signaling routes, which include hexokinase, Trehalose-6 Phosphate (Tre6P) or the production of ATP in mitochondria (Figure 1). In animal cells hexokinase II binds to mTORC1 upon glucose starvation to inhibit its downstream signaling and thus promote autophagy [57]. In plants, it was also shown that hexokinase participates in the sensing of glucose [58]. Another important signaling route involves the production of Tre6P that signals sucrose levels and inhibits the activity of SnRK1, possibly by repressing the activation of this kinase by upstream SNAK kinases [59]. Inhibition of SnRK1 would thus result in TOR activation in response to sucrose and Tre6P. Similarly, the rise in ATP levels triggered by glycolysis and mitochondrial respiration could result in an increase of TOR activity through the activation of the ATPase Reptin/Pontin complex as described above [19]. Xiong et al. [60] suggested that glucose activates TOR through glycolysis and mitochondria but independently from hexokinase or hormone signaling. However, in the *Arabidopsis* sugar-starved cell, the simultaneous addition of sucrose and of the auxin antagonist PEO-IAA repressed the induction of TOR activity as measured by S6K phosphorylation [21]. Finally, it is known in animals

that the Rag GTPases pathway is involved in signaling glucose availability (and amino acid, see below) to mTORC1 by recruiting and activating the TORC1 complex at the lysosomal surface [5,9].

The relative contribution of these signaling elements to the sugar-dependent TOR activation in plants and algae remains to be precisely determined. These different signaling pathways could act independently but it is plausible that they act together and in a coordinated way to strengthen and stabilize the TOR activation signal, or in some instances to adapt sugar induction to the needs of specific tissues. Indeed, the activation of TOR by sugars may have different targets and roles in source leaves exporting sucrose or in sink tissues like roots or actively dividing meristems. The former are autotrophic for C whereas the latter need exogenous sugars for metabolism, cell division and growth. As mentioned earlier, TOR controls the communication between plant cells via plasmodesmata (PD), which are involved in the transport of macromolecules and nutrients [22]. Coherently, sugar-activated TOR seems to repress the functioning of PD to allow active phloem loading of sucrose in the phloem of photosynthetic source leaves against the gradient of sugar concentration. This process will allow sucrose transport from source to sink tissues. Conversely, TOR is less active in young sink leaves to allow a free circulation of sugars through active PD. The previous observation that phloem transport is faster in *lst8* mutants is in favor of this model [27].

In plants, the meristems are structured cell proliferation zones that persist through the life of plants and produce new organs. The activation of TOR seems to be a major effector of the stimulation of both shoot and root meristems by sugars [60–63]. In sugar-fed *Arabidopsis* roots TOR phosphorylates the transcription factor E2F, which activates cell cycling [60]. The WUSCHEL protein is needed to activate and maintain the stem cell niche in the shoot apical meristem and its expression is induced by light but also by sugars in the dark [61]. These two pathways of meristem activation are not completely similar but both seem to require TOR activity since WUSCHEL expression is no longer light- or sugar-inducible after treatment with TOR inhibitors. Growth in the apical shoot meristems is stopped in the dark but cell proliferation can be reactivated by exogenous sugars in a TOR-dependent manner [61,64]. Similarly, sugar induces callus proliferation through the activation of TOR [65]. The ErbB-3 Binding Protein 1 (EBP1) is a regulator of cell proliferation in meristems that is to some extent controlled by TOR in *Arabidopsis* [66,67]. A recent paper analyzed in more depth the mechanism by which sugars control EBP1 of the EBP1 control by TOR and demonstrated that EBP1 is induced by sugar partly through the activation of TOR [68]. This sugar–TOR regulatory axis seems to control other important biological outputs. Indeed, it was recently shown that glucose activated TOR regulates the circadian clock by shortening its period [69] and the alternative splicing of the splicing factor AtRS31 [70].

TOR also regulates the expression of many genes involved in sugar metabolism as exemplified by the transcriptomic analysis of *Arabidopsis* treated by TOR inhibitors [38,71], silenced for TOR expression [42,60,67,72] or of TORC1 mutants [27,30,32]. Conditional silencing of the *Arabidopsis* TOR gene generally leads to an accumulation of soluble sugars, amino acids, tri-acyl glycerol (TAG) and starch [67,71,72]. Similarly, inhibition of TOR in algae results in higher levels of TAG and starch, which are molecules of interest for the production of biofuels [39,73] (and see [11,12] for reviews). Interestingly, beta-amylase, which is involved in starch degradation, was identified as a TOR substrate [21].

In summary the stimulation of TOR by sugars seems to be a major signaling channel for the regulation of a vast array of diverse biological processes. It is plausible that sugars were among the primeval nutrients used by the first living cells, but also ancient signaling molecules that can convey information through TOR activation allowing cell growth and division. During the evolution of multicellular plants and animals, and with the appearance of developmental transitions and connected organs, this simple primordial regulatory loop could have been enriched by building connections to hormonal and tissue-specific signaling pathways.

5. Nitrogen Regulations of TORC1

A wealth of data on the regulations of TORC1 activity by inorganic and organic nitrogen sources is already available in yeast or animals [74–77]. For example in yeast TOR controls the transcriptional response to the nitrogen (N) source, and the activity of TOR is modulated by the quality and quantity of N supply [74,75]. However, despite the important roles of N nutrients and of their metabolism in plants, much less is known in photosynthetic organisms [15] (Figure 1).

In plants, N is an essential macroelement. Different indispensable molecules, such as nucleic acids, proteins, phytohormones and some components of the cellular wall, contain N that is therefore a limiting factor for plant growth [78,79]. Deprost et al. [67] studied the effect of TOR expression on root growth in the function of the nitrate environment. At standard nitrate concentration, root and shoot growth were positively correlated to the level of TOR expression in silenced or overexpressing *Arabidopsis* plants. Moreover at high nitrate concentrations, plants overexpressing TOR also displayed longer roots compared to wild-type plants. Since at the same time TOR overexpression conferred resistance to high KCl concentration, it was concluded that TOR is involved in resistance to osmotic stress.

In higher plants, N is taken by the root system and assimilated in the shoot and/or the root depending on the species. Different enzymes are involved in this process: Nitrate (NR) and Nitrite (NiR) Reductases, Glutamine Synthetase (GS) and Glutamine Oxoglutarate Aminotransferase (GOGAT) [79,80]. N assimilation is important for the plant, but it is also expensive in energy and therefore subject to regulations at different levels [81].

In yeast cells, TORC1 regulates the activity of the PP2A phosphatase complexes by controlling their association with the inhibitory beta-type subunit TAP42. The inactivation of TOR by N starvation or poor-quality sources triggers the disassociation of TAP42, the dephosphorylation of sequestering proteins and the subsequent release of transcription factors activating N assimilation [74,75,82]. TAP46 is the plant ortholog of the yeast TAP42 protein and a component of the PP2A complex that has also been shown to be a target of TOR in plants. Overexpression of TAP46 led to increased activity of NR and NiR [83], demonstrating the implication of TAP46 and TORC1 in the regulation of plant NR and NiR activities. Moreover, mutation in *LST8* increased NR and NiR, but repressed GS activities in response to long days when compared to the wild type controls [27]. Conversely, in *Chlamydomonas* TOR inhibition led to higher GS and GOGAT activities [84]. These authors also studied the link between TOR, N uptake and assimilation in *Chlamydomonas* by supplying a ¹⁵N labeled N source [84]. This allowed one to estimate the contribution of external N to the accumulation of amino acids observed after TOR inhibition, and which origin was debated. ¹⁵N incorporation into amino acids was found to be higher in cells treated by rapamycin. Therefore, a higher N assimilation seems to be the cause for the build-up of amino acids. The authors also found that ammonium uptake was higher after TOR inhibition by rapamycin. Furthermore, a phosphoproteomic study revealed that TOR activity is repressed by N starvation in *Chlamydomonas*, which may explain why N starvation induces the accumulation of TAG in algae [73,85]. Similarly, a recent study highlighted a link between low N conditions, auxin, TOR and root elongation in maize [86]. The authors suggested that low N conditions trigger an increase of shoot to root auxin transport, resulting in its accumulation in the root tip and in the upregulation of the TOR pathway. As a consequence, cell proliferation and root growth are increased, which allow the root to forage for more N in the soil.

In conclusion, it appears that in N autotrophic organisms like plants, algae and yeasts, the TORC1 complex is involved in the regulation of N metabolism. Inorganic N sources like nitrate or ammonium are first assimilated in Gln and Glu, which are subsequently used as organic N donors by transaminases for the synthesis of most other amino acids [87–89]. As stated above, a genetic or pharmacologic inhibition of TOR leads to the accumulation of amino acids like Gln and Asn, which are typically used for transport and storage of N in photosynthetic organisms [27,30,32,38,71,90]. In *Chlamydomonas* this amino acid accumulation is dampened by C limitation [84]. Interestingly, mutations in the YAK1 kinase, which partially suppress the decreased growth of *lst8* mutants, also strongly reduce Gln accumulation [32]. This amino acid accumulation observed after TOR inhibition could be the result

of a decreased level of mRNA translation [91,92] or of an increase in autophagy, which degrades proteins [11,30,49,93]. However, as described above, Mubeen et al. [84] showed that this increase in amino acid is, for some part, the result of an increased assimilation of exogenous N since amino acid accumulation was reduced when cells were starved for nutrients and was insensitive to either inhibitors of translation or proteolysis [84].

Little information is available about the sensing of amino acids in plants [89,94], although they are known to be potent inducers of TOR in yeast and animals [10,77]. However, recently several studies reported regulations of TORC1 by amino acids in photosynthetic organisms. O'Leary et al. [95] demonstrated that Ile or Gln activate TOR in mature leaves of *Arabidopsis*. Activated TOR then diminishes night respiration and stimulates plant growth by promoting protein synthesis. Furthermore, two serendipitous approaches showed that in plants, like in other eukaryotes, branched chain amino acids activate the TOR kinase. First, it was already known that inhibition of TOR suppresses the *lrx1* (leucine-rich repeat extensin 1) mutation, which affects the development of root hairs [96]. Another suppressor of *lrx1* was recently identified as isopropylmalate synthase 1 (IPMS1), an enzyme involved in Leu biosynthesis, mutation of which resulted in the accumulation of Val and to a reduced sensitivity towards TOR inhibitors like AZD8055 [97]. In another study, the causal mutation of the *Arabidopsis eva1* mutant (ER, vacuole and actin 1) affected in vacuole morphogenesis, was also identified as an Asp/Asn change in the IPMS1 sequence [98]. As in the previous study this resulted in the build-up of Val and other branched-chain amino acids (BCAA) and in TOR activation. Accordingly, TOR inhibitors also suppressed the consequences of the *eva1* mutation on vacuolar morphogenesis. Therefore, the stimulation of TOR activity by amino acid seems to be a conserved hallmark of this kinase in eukaryotic organisms. In animals and yeast, TORC1 is recruited to the lysosomal/vacuolar surface by activated RagGTPases and the Ragulator complex [8,10,77]. Given the recent results, which now provide clear and independent evidence for the activation of plant TOR by BCAA, it can be anticipated that a similar mechanism may be operating in plants. However, this should now be demonstrated in future studies.

6. TOR Sulfur, Phosphate and Potassium

The first studies on plant nutrition showed that they need a source of C and N to grow and develop, but also of other macronutrients like sulfur, phosphate and potassium. Therefore, a consequence of one nutrient being in limited amount is a reduction of growth, but also of the assimilation of other nutrients [4]. The TOR pathway is well positioned to integrate the different nutrient availabilities signals, and to regulate the nutrient-specific metabolic arms.

In yeast, TOR regulates potassium homeostasis through the control of the plasma membrane proton pump [99], and the proton influx into the cells that is coupled to nutrient uptake was identified as a TORC1 activation signal [100]. The control of the potassium uptake by TOR was recently illustrated in *Arabidopsis* where it was shown that inhibition of TOR reduces potassium uptake in a TAP46-dependent manner [101].

In *Chlamydomonas*, an original study showed that P starvation induced autophagy and decreased TOR activity, which was measured by following RPS6 phosphorylation [102]. This drop in TOR activity seems to be linked to a decrease in LST8 protein abundance caused by P limitation. Therefore, P availability also regulates the TORC1 signaling pathway and the PSR1 (Pi Starvation Response 1) transcription factor was shown to be involved in this process. In an attempt to identify new components of the TOR signaling pathway in *Chlamydomonas*, Couso et al. [103] performed a screen for hypersensitivity to rapamycin. By this approach, they identified sensitive mutants carrying defects in VIP1 a conserved inositol hexakisphosphate (InsP6) kinase that produces InsP7 and InsP8. These mutants displayed an accumulation of storage lipids, a hallmark of the response of algae to nutrient starvation. Interestingly, VIP1 was also identified as a TOR substrate in *Arabidopsis* [21]. These findings uncover an interaction between TOR, InsP signaling and the storage of carbon reserves.

Like for the other plant macronutrient, and as expected to maintain cellular homeostasis, S availability also regulates the TOR signaling pathway. Indeed, S is an essential macronutrient for plants, which is taken up from the soil as sulfate and is needed for the synthesis of sulfur-containing molecules like Cys, Met or glucosinolates, defense-linked compounds. Inorganic S is ultimately incorporated in Cys that is used to synthesize the other S-containing molecules [104]. Recent data have provided good evidence that the availability of S is sensed through the activity of sulfite reductase (SiR), a chloroplastic enzyme reducing sulfite into sulfide [105]. Indeed, *sir* mutants have diminished levels of glucose/sucrose and consistently of TOR activity. Glucosinolates are S-containing defense metabolites derived from amino acids that, after conversion upon cell damage, give rise to an array of active compounds against pests and attackers. Malinovsky et al. [106] found that 3-hydroxypropylglucosinolate (3-OHPGSL) inhibits root development in *Arabidopsis*, but also in other plants. Interestingly this glucosinolate also affected yeast growth, which can explain why these compounds protect plants against various pests, and overexpression of TOR activity or mutations in the *Raptor2/5g* gene interfered with *Arabidopsis* responses toward 3-OHPGSL. Therefore, the biological effects of this class of compounds could be partly explained by an inhibition of the conserved TOR signaling pathway.

7. Conclusions and Future Prospects

The analysis of the recent findings on the cross-talks between the TOR and nutrient signaling pathways thus clearly suggests that this kinase is a central and crucial integrator of trophic information that controls many facets of S, N, C, P and K metabolism. Indeed, in recent years, the plant and algal TOR fields have been blooming and have borne splendid fruits. It is now clear that TOR is activated in favorable conditions by nutrients like sugars or BCAA, and that this activation results in the stimulation of growth and anabolic metabolism. Conversely, nutrient or energy limitation activates the antagonist SnRK1 kinase that inhibits TOR to promote energy saving and nutrient remobilization. It will now be of interest to determine if the regulation triggered by other nutrients like P in *Chlamydomonas* [102] are also conserved in multicellular photosynthetic organisms. In plants, which produce new organs throughout their lives, the sensing of nutrients is a strong driver of topical organ growth and of developmental plasticity through morphological adaptations. For example, N starvation reduces the shoot and stimulates root growth [86] but this adaptation is often nutrient specific: for example P limitation results in different adaptations in root morphology than N [107]. Similarly, leaf growth allows the plants to acquire more (or less when needed) light, and thus energy, and to avoid shade.

In the future, it will be uttermost interesting to determine if and how TOR is involved in these adaptive growth patterns, and genetic screens will be invaluable tools to gain further knowledge. Interestingly, a very recent report showed that the sea anemone *Nematostella vectensis* also produces new tentacles throughout its life cycle in a nutrient-regulated manner and under the control of TOR [108]. This could suggest a convergent evolution during the independent acquisition of multicellularity by plants and early animals, which rewired the primordial TOR signaling pathway to promote organ inception in a nutrient-driven manner.

The molecular determinants involved in the activation of TORC1 by amino acids, like Rag GTPases and the LAMTOR/Ragulator complex start to be quite well understood in animal and yeast cells [10,77,109]. On the contrary, the mechanisms by which sugars activate TORC1 are less clear. The molecular actors of the TOR-linked nutrient signaling pathways will have to be better identified in plants and algae. This goal could be better achieved due to a wider use of genetic screens and other genetic approaches, like genome wide association mapping, which could target the TOR signaling pathway and activity. Similarly, the control by TOR of nutrient and energy metabolism need to be better understood in photosynthetic organisms. Combinatory and integrated multi-omics analyses may help in further unveiling the entangled relations between TOR and metabolism. One difficulty is that TOR is both controlled by nutrients and a controller of many metabolic pathways utilizing these nutrients. These finely tuned regulations and equilibriums with antagonistic kinases are clearly needed to maintain homeostatic regulations of nutrients within the cell. Indeed, deregulation of TOR

activity levels has a profound impact on the accumulation of either C or N compounds (for examples see [27,29,30,71,72,97,110]).

Finally, it is clear that a better understanding of the precise mechanisms linking nutrient assimilation or metabolism and plant growth, through the ancient TOR signaling pathway, would certainly help in the design of more nutrient-efficient and stress-resilient crops.

Author Contributions: All authors contributed to the writing and revision of the paper. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: C.I. is supported by a Ph.D. grant from the Fondation de la Recherche Médicale (FRM ECO201806006346) and G.T.D. by a grant from the AgreeSkills+ EU fellowship program (FP7-609398). Our work is partly supported by a French State grant (Saclay Plant Sciences, ANR-17-EUR-0007, EUR SPS-GSR) managed by the French National Research Agency under an Investments for the Future program (reference n° ANR-11-IDEX-0003-02).

Acknowledgments: We thank our colleagues in our Institutes for fruitful discussions and advices and Florent DOBE for his help in drawing the Figure. The authors apologize to all researchers whose relevant work could not be cited or discussed due to space limitation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dutrochet, H. *L'Agent Immédiat du Mouvement Vital Chez les Végétaux et Chez les Animaux*; Nabu Press: Paris, France, 1826.
2. Ingram, G.; Waites, R. Keeping it together: co-ordinating plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2006**, *9*, 12–20. [[CrossRef](#)]
3. Wolters, H.; Jürgens, G. Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nat. Rev. Genet.* **2009**, *10*, 305–317. [[CrossRef](#)]
4. Dobrenel, T.; Caldana, C.; Hanson, J.; Robaglia, C.; Vincentz, M.; Veit, B.; Meyer, C. TOR Signaling and Nutrient Sensing. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2016**, *67*, 261–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Albert, V.; Hall, M.N. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2015**, *33*, 55–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Dibble, C.C.; Manning, B.D. Signal integration by mTORC1 coordinates nutrient input with biosynthetic output. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 555–564. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Rousseau, A.; Bertolotti, A. An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature* **2016**, *536*, 184–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Liu, G.Y.; Sabatini, D.M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2020**, *21*, 183–203. [[CrossRef](#)]
9. Efeyan, A.; Comb, W.C.; Sabatini, D.M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways. *Nature* **2015**, *517*, 302–310. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Saxton, R.A.; Sabatini, D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **2017**, *169*, 361–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Pérez-Pérez, M.E.; Couso, I.; Crespo, J.L. The TOR Signaling Network in the Model Unicellular Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biomolecules* **2017**, *7*, 54. [[CrossRef](#)]
12. Pancha, I.; Chokshi, K.; Tanaka, K.; Imamura, S. Microalgal Target of Rapamycin (TOR): A Central Regulatory Hub for Growth, Stress Response and Biomass Production. *Plant Cell Physiol.* **2020**, *61*, 675–684. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Shi, L.; Wu, Y.; Sheen, J. TOR signaling in plants: conservation and innovation. *Development* **2018**, *145*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rodriguez, M.; Parola, R.; Andreola, S.; Pereyra, C.; Martínez-Noël, G. TOR and SnRK1 signaling pathways in plant response to abiotic stresses: Do they always act according to the “yin-yang” model? *Plant Sci.* **2019**, *288*, 110220. [[CrossRef](#)]
15. Wu, Y.; Shi, L.; Li, L.; Fu, L.; Liu, Y.; Xiong, Y.; Sheen, J. Integration of nutrient, energy, light, and hormone signalling via TOR in plants. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 2227–2238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Brunkard, J.O. Exaptive Evolution of Target of Rapamycin Signaling in Multicellular Eukaryotes. *Dev. Cell* **2020**, *54*, 142–155. [[CrossRef](#)]

17. Ryabova, L.A.; Robaglia, C.; Meyer, C. The Target of Rapamycin kinase in photosynthetic organisms: roles and regulations. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 2211–2338. [[CrossRef](#)]
18. Templeton, G.W.; Moorhead, G.B. The phosphoinositide-3-OH-kinase-related kinases of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Rep.* **2005**, *6*, 723–728. [[CrossRef](#)]
19. Sugimoto, K. Branching the Tel2 pathway for exact fit on phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases. *Curr. Genet.* **2018**, *64*, 965–970. [[CrossRef](#)]
20. Kim, S.G.; Hoffman, G.R.; Poulogiannis, G.; Buel, G.R.; Jang, Y.J.; Lee, K.W.; Kim, B.Y.; Erikson, R.L.; Cantley, L.C.; Choo, A.Y.; et al. Metabolic stress controls mTORC1 lysosomal localization and dimerization by regulating the TTT-RUVBL1/2 complex. *Mol. Cell* **2013**, *49*, 172–185. [[CrossRef](#)]
21. Van Leene, J.; Han, C.; Gadeyne, A.; Eeckhout, D.; Matthijs, C.; Cannoot, B.; De Winne, N.; Persiau, G.; Van De Slijke, E.; Van de Cotte, B.; et al. Capturing the phosphorylation and protein interaction landscape of the plant TOR kinase. *Nat. Plants* **2019**, *5*, 316–327. [[CrossRef](#)]
22. Brunkard, J.O.; Xu, M.; Scarpin, M.R.; Chatterjee, S.; Shemyakina, E.A.; Goodman, H.M.; Zambryski, P. TOR dynamically regulates plant cell-cell transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 5049–5058. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Garcia, N.; Messing, J. TTT and PIKK Complex Genes Reverted to Single Copy Following Polyploidization and Retain Function Despite Massive Retrotransposition in Maize. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Tatebe, H.; Shiozaki, K. Evolutionary Conservation of the Components in the TOR Signaling Pathways. *Biomolecules* **2017**, *7*, 77. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Menand, B.; Desnos, T.; Nussaume, L.; Berger, F.; Bouchez, D.; Meyer, C.; Robaglia, C. Expression and disruption of the *Arabidopsis* TOR (target of rapamycin) gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 6422–6427. [[CrossRef](#)]
26. Deprost, D.; Truong, H.; Robaglia, C.; Meyer, C. An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *326*, 844–850. [[CrossRef](#)]
27. Moreau, M.; Azzopardi, M.; Clément, G.; Dobrenel, T.; Marchive, C.; Renne, C.; Martin-Magniette, M.L.; Taconnat, L.; Renou, J.P.; Robaglia, C.; et al. Mutations in the *Arabidopsis* homolog of LST8/GβL, a partner of the target of Rapamycin kinase, impair plant growth, flowering, and metabolic adaptation to long days. *Plant Cell* **2012**, *24*, 463–481. [[CrossRef](#)]
28. Anderson, G.; Veit, B.; Hanson, M. The *Arabidopsis* AtRaptor genes are essential for post-embryonic plant growth. *BMC Biol.* **2005**, *3*, 12. [[CrossRef](#)]
29. Salem, M.A.; Li, Y.; Wiszniewski, A.; Giavalisco, P. Regulatory-associated protein of TOR (RAPTOR) alters the hormonal and metabolic composition of *Arabidopsis* seeds, controlling seed morphology, viability and germination potential. *Plant J.* **2017**, *92*, 525–545. [[CrossRef](#)]
30. Salem, M.A.; Li, Y.; Bajdzienko, K.; Fisahn, J.; Watanabe, M.; Hoefgen, R.; Schöttler, M.A.; Giavalisco, P. RAPTOR Controls Developmental Growth Transitions by Altering the Hormonal and Metabolic Balance. *Plant Physiol.* **2018**, *177*, 565–593. [[CrossRef](#)]
31. Aylett, C.H.; Sauer, E.; Imseng, S.; Boehringer, D.; Hall, M.N.; Ban, N.; Maier, T. Architecture of human mTOR complex 1. *Science* **2016**, *351*, 48–52. [[CrossRef](#)]
32. Forzani, C.; Duarte, G.T.; Van Leene, J.; Clément, G.; Huguet, S.; Paysant-Le-Roux, C.; Mercier, R.; De Jaeger, G.; Leprince, A.S.; Meyer, C. Mutations of the AtYAK1 Kinase Suppress TOR Deficiency in *Arabidopsis*. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 3696–3708.e3695. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mahfouz, M.M.; Kim, S.; Delauney, A.J.; Verma, D.P. *Arabidopsis* TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *Plant Cell* **2006**, *18*, 477–490. [[CrossRef](#)]
34. Prouteau, M.; Desfosses, A.; Sieben, C.; Bourgoint, C.; Lydia Mozaffari, N.; Demurtas, D.; Mitra, A.K.; Guichard, P.; Manley, S.; Loewith, R. TORC1 organized in inhibited domains (TOROIDS) regulate TORC1 activity. *Nature* **2017**, *550*, 265–269. [[CrossRef](#)]
35. Montané, M.H.; Menand, B. ATP-competitive mTOR kinase inhibitors delay plant growth by triggering early differentiation of meristematic cells but no developmental patterning change. *J. Exp. Bot.* **2013**, *64*, 4361–4374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Xiong, Y.; Sheen, J. Rapamycin and glucose-target of rapamycin (TOR) protein signaling in plants. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 2836–2842. [[CrossRef](#)]

37. Deng, K.; Yu, L.; Zheng, X.; Zhang, K.; Wang, W.; Dong, P.; Zhang, J.; Ren, M. Target of Rapamycin Is a Key Player for Auxin Signaling Transduction in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 291. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Dong, P.; Xiong, F.; Que, Y.; Wang, K.; Yu, L.; Li, Z.; Ren, M. Expression profiling and functional analysis reveals that TOR is a key player in regulating photosynthesis and phytohormone signaling pathways in Arabidopsis. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 677. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Crespo, J.; Díaz-Troya, S.; Florencio, F. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 1736–1749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Roustan, V.; Weckwerth, W. Quantitative Phosphoproteomic and System-Level Analysis of TOR Inhibition Unravel Distinct Organellar Acclimation in. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1590. [[CrossRef](#)]
41. Werth, E.G.; McConnell, E.W.; Couso Lianez, I.; Perrine, Z.; Crespo, J.L.; Umen, J.G.; Hicks, L.M. Investigating the effect of target of rapamycin kinase inhibition on the *Chlamydomonas reinhardtii* phosphoproteome: from known homologs to new targets. *New Phytol.* **2019**, *221*, 247–260. [[CrossRef](#)]
42. Dobrenel, T.; Mancera-Martínez, E.; Forzani, C.; Azzopardi, M.; Davanture, M.; Moreau, M.; Schepetilnikov, M.; Chicher, J.; Langella, O.; Zivy, M.; et al. The Arabidopsis TOR Kinase Specifically Regulates the Expression of Nuclear Genes Coding for Plastidic Ribosomal Proteins and the Phosphorylation of the Cytosolic Ribosomal Protein S6. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Enganti, R.; Cho, S.K.; Toperzer, J.D.; Urquidi-Camacho, R.A.; Cakir, O.S.; Ray, A.P.; Abraham, P.E.; Hettich, R.L.; von Arnim, A.G. Phosphorylation of Ribosomal Protein RPS6 Integrates Light Signals and Circadian Clock Signals. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 2210. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Nukarinen, E.; Nägele, T.; Pedrotti, L.; Wurzinger, B.; Mair, A.; Landgraf, R.; Börnke, F.; Hanson, J.; Teige, M.; Baena-Gonzalez, E.; et al. Quantitative phosphoproteomics reveals the role of the AMPK plant ortholog SnRK1 as a metabolic master regulator under energy deprivation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 31697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Barrada, A.; Djendli, M.; Desnos, T.; Mercier, R.; Robaglia, C.; Montané, M.H.; Menand, B. A TOR-YAK1 signaling axis controls cell cycle, meristem activity and plant growth in. *Development* **2019**, *146*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Ryabova, L.A.; Robaglia, C.; Meyer, C. Target of Rapamycin kinase: central regulatory hub for plant growth and metabolism. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 2211–2216. [[CrossRef](#)]
47. Bassham, D.C.; Crespo, J.L. Autophagy in plants and algae. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 679. [[CrossRef](#)]
48. Dong, Y.; Teleman, A.A.; Jedmowski, C.; Wirtz, M.; Hell, R. The Arabidopsis THADA homologue modulates TOR activity and cold acclimation. *Plant Biol.* **2019**, *21*, 77–83. [[CrossRef](#)]
49. Soto-Burgos, J.; Bassham, D.C. SnRK1 activates autophagy via the TOR signaling pathway in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0182591. [[CrossRef](#)]
50. Baena-González, E.; Hanson, J. Shaping plant development through the SnRK1-TOR metabolic regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2017**, *35*, 152–157. [[CrossRef](#)]
51. Ling, N.X.Y.; Kaczmarek, A.; Hoque, A.; Davie, E.; Ngoei, K.R.W.; Morrison, K.R.; Smiles, W.J.; Forte, G.M.; Wang, T.; Lie, S.; et al. mTORC1 directly inhibits AMPK to promote cell proliferation under nutrient stress. *Nat. Metab.* **2020**, *2*, 41–49. [[CrossRef](#)]
52. Belda-Palazón, B.; Adamo, M.; Valerio, C.; Confraria, A.; Ferreira, L.; Margalha, L.; Rodrigues, A.; Meyer, C.; Rodriguez, P.L.; Baena-González, E. A dual function of SnRK2 kinases in the regulation of SnRK1 and plant growth. *Nat. Plant* **2020**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Díaz-Granados, V.H.; López-López, J.M.; Flores-Sánchez, J.; Olguin-Alor, R.; Bedoya-López, A.; Dinkova, T.D.; Salazar-Díaz, K.; Vázquez-Santana, S.; Vázquez-Ramos, J.M.; Lara-Núñez, A. Glucose modulates proliferation in root apical meristems via TOR in maize during germination. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *155*, 126–135. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Smeekens, S.; Ma, J.; Hanson, J.; Rolland, F. Sugar signals and molecular networks controlling plant growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2010**, *13*, 274–279. [[CrossRef](#)]
55. Figueroa, C.M.; Lunn, J.E. A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. *Plant Physiol.* **2016**, *172*, 7–27. [[CrossRef](#)]
56. Sakr, S.; Wang, M.; Dédaldéchamp, F.; Perez-Garcia, M.D.; Ogé, L.; Hamama, L.; Atanassova, R. The Sugar-Signaling Hub: Overview of Regulators and Interaction with the Hormonal and Metabolic Network. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Roberts, D.J.; Tan-Sah, V.P.; Ding, E.Y.; Smith, J.M.; Miyamoto, S. Hexokinase-II positively regulates glucose starvation-induced autophagy through TORC1 inhibition. *Mol. Cell* **2014**, *53*, 521–533. [[CrossRef](#)]

58. Moore, B.; Zhou, L.; Rolland, F.; Hall, Q.; Cheng, W.H.; Liu, Y.X.; Hwang, I.; Jones, T.; Sheen, J. Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* **2003**, *300*, 332–336. [[CrossRef](#)]
59. Baena-González, E.; Lunn, J.E. SnRK1 and trehalose 6-phosphate—Two ancient pathways converge to regulate plant metabolism and growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2020**, *55*, 52–59. [[CrossRef](#)]
60. Xiong, Y.; McCormack, M.; Li, L.; Hall, Q.; Xiang, C.; Sheen, J. Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature* **2013**, *496*, 181–186. [[CrossRef](#)]
61. Pfeiffer, A.; Janocha, D.; Dong, Y.; Medzihradsky, A.; Schöne, S.; Daum, G.; Suzaki, T.; Forner, J.; Langenecker, T.; Rempel, E.; et al. Integration of light and metabolic signals for stem cell activation at the shoot apical meristem. *Elife* **2016**, *5*, e17023. [[CrossRef](#)]
62. Ahmad, Z.; Magyar, Z.; Bögre, L.; Papdi, C. Cell cycle control by the target of rapamycin signalling pathway in plants. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 2275–2284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Caldana, C.; Martins, M.C.M.; Mubeen, U.; Urrea-Castellanos, R. The magic ‘hammer’ of TOR: the multiple faces of a single pathway in the metabolic regulation of plant growth and development. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 2217–2225. [[CrossRef](#)]
64. Mohammed, B.; Biloei, S.F.; Dóczy, R.; Grove, E.; Railo, S.; Palme, K.; Ditengou, F.A.; Bögre, L.; López-Juez, E. Converging Light, Energy and Hormonal Signaling Control Meristem Activity, Leaf Initiation, and Growth. *Plant Physiol.* **2018**, *176*, 1365–1381. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lee, K.; Seo, P.J. Arabidopsis TOR signaling is essential for sugar-regulated callus formation. *J. Integr. Plant Biol.* **2017**, *59*, 742–746. [[CrossRef](#)]
66. Horváth, B.M.; Magyar, Z.; Zhang, Y.; Hamburger, A.W.; Bakó, L.; Visser, R.G.; Bachem, C.W.; Bögre, L. EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *EMBO J.* **2006**, *25*, 4909–4920. [[CrossRef](#)]
67. Deprost, D.; Yao, L.; Sormani, R.; Moreau, M.; Leterreux, G.; Nicolai, M.; Bedu, M.; Robaglia, C.; Meyer, C. The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* **2007**, *8*, 864–870. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Lokdarshi, A.; Papdi, C.; Pettkó-Szandtner, A.; Dorokhov, S.; Scheres, B.; Magyar, Z.; von Arnim, A.G.; Bögre, L.; Horváth, B.M. ErbB-3 BINDING PROTEIN 1 Regulates Translation and Counteracts RETINOBLASTOMA RELATED to Maintain the Root Meristem. *Plant Physiol.* **2020**, *182*, 919–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Zhang, N.; Meng, Y.; Li, X.; Zhou, Y.; Ma, L.; Fu, L.; Schwarzländer, M.; Liu, H.; Xiong, Y. Metabolite-mediated TOR signaling regulates the circadian clock in. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 25395–25397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Riegler, S.; Servi, L.; Fuchs, A.; Godoy Herz, M.A.; Kubaczka, M.G.; Venhuizen, P.; Schweighofer, A.; Simpson, C.; Brown, J.W.S.; Christian Meyer, C.; et al. Light remote control of alternative splicing in roots through TOR kinase. *BioRxiv* **2018**. [[CrossRef](#)]
71. Ren, M.; Venglat, P.; Qiu, S.; Feng, L.; Cao, Y.; Wang, E.; Xiang, D.; Wang, J.; Alexander, D.; Chalivendra, S.; et al. Target of rapamycin signaling regulates metabolism, growth, and life span in Arabidopsis. *Plant Cell* **2012**, *24*, 4850–4874. [[CrossRef](#)]
72. Caldana, C.; Li, Y.; Leisse, A.; Zhang, Y.; Bartholomaeus, L.; Fernie, A.R.; Willmitzer, L.; Giavalisco, P. Systemic analysis of inducible target of rapamycin mutants reveal a general metabolic switch controlling growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **2013**, *73*, 897–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Imamura, S.; Kawase, Y.; Kobayashi, I.; Sone, T.; Era, A.; Miyagishima, S.Y.; Shimojima, M.; Ohta, H.; Tanaka, K. Target of rapamycin (TOR) plays a critical role in triacylglycerol accumulation in microalgae. *Plant Mol. Biol.* **2015**, *89*, 309–318. [[CrossRef](#)]
74. Broach, J.R. Nutritional control of growth and development in yeast. *Genetics* **2012**, *192*, 73–105. [[CrossRef](#)]
75. Weisman, R. Target of Rapamycin (TOR) Regulates Growth in Response to Nutritional Signals. *Microbiol. Spectr.* **2016**, *4*. [[CrossRef](#)]
76. Wolfson, R.L.; Sabatini, D.M. The Dawn of the Age of Amino Acid Sensors for the mTORC1 Pathway. *Cell Metab.* **2017**, *26*, 301–309. [[CrossRef](#)]
77. González, A.; Hall, M.N. Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *EMBO J.* **2017**, *36*, 397–408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

78. Malamy, J.E. Intrinsic and environmental response pathways that regulate root system architecture. *Plant Cell Environ.* **2005**, *28*, 67–77. [[CrossRef](#)]
79. Krapp, A.; David, L.C.; Chardin, C.; Girin, T.; Marmagne, A.; Leprince, A.S.; Chaillou, S.; Ferrario-Méry, S.; Meyer, C.; Daniel-Vedele, F. Nitrate transport and signalling in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 789–798. [[CrossRef](#)]
80. O'Brien, J.A.; Vega, A.; Bouguyon, E.; Krouk, G.; Gojon, A.; Coruzzi, G.; Gutiérrez, R.A. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Mol. Plant* **2016**, *9*, 837–856. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Vidal, E.A.; Alvarez, J.M.; Araus, V.; Riveras, E.; Brooks, M.D.; Krouk, G.; Ruffel, S.; Lejay, L.; Crawford, N.M.; Coruzzi, G.M.; et al. Nitrate in 2020: Thirty Years from Transport to Signaling Networks. *Plant Cell* **2020**, *32*, 2094–2119. [[CrossRef](#)]
82. Beck, T.; Hall, M.N. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **1999**, *402*, 689–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Ahn, C.S.; Ahn, H.K.; Pai, H.S. Overexpression of the PP2A regulatory subunit Tap46 leads to enhanced plant growth through stimulation of the TOR signalling pathway. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 827–840. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Mubeen, U.; Jüppner, J.; Alper, J.; Hinch, D.K.; Giavalisco, P. Target of Rapamycin Inhibition in *Chlamydomonas reinhardtii* Triggers de Novo Amino Acid Synthesis by Enhancing Nitrogen Assimilation. *Plant Cell* **2018**, *30*, 2240–2254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Roustan, V.; Bakhtiari, S.; Roustan, P.J.; Weckwerth, W. Quantitative in vivo phosphoproteomics reveals reversible signaling processes during nitrogen starvation and recovery in the biofuel model organism. *Biotechnol. Biofuels* **2017**, *10*, 280. [[CrossRef](#)]
86. Sun, X.; Chen, H.; Wang, P.; Chen, F.; Yuan, L.; Mi, G. Low nitrogen induces root elongation via auxin-induced acid growth and auxin-regulated target of rapamycin (TOR) pathway in maize. *J. Plant Physiol.* **2020**, *254*, 153281. [[CrossRef](#)]
87. Lam, H.M.; Coschigano, K.T.; Oliveira, I.C.; Melo-Oliveira, R.; Coruzzi, G.M. The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1996**, *47*, 569–593. [[CrossRef](#)]
88. Galili, G.; Amir, R.; Fernie, A.R. The Regulation of Essential Amino Acid Synthesis and Accumulation in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2016**, *67*, 153–178. [[CrossRef](#)]
89. Dinkeloo, K.; Boyd, S.; Pilot, G. Update on amino acid transporter functions and on possible amino acid sensing mechanisms in plants. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2018**, *74*, 105–113. [[CrossRef](#)]
90. Lee, D.Y.; Fiehn, O. Metabolomic response of *Chlamydomonas reinhardtii* to the inhibition of target of rapamycin (TOR) by rapamycin. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *23*, 923–931. [[CrossRef](#)]
91. Sormani, R.; Yao, L.; Menand, B.; Ennar, N.; Lecampion, C.; Meyer, C.; Robaglia, C. Saccharomyces cerevisiae FKBP12 binds *Arabidopsis thaliana* TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biol.* **2007**, *7*, 26. [[CrossRef](#)]
92. Díaz-Troya, S.; Pérez-Pérez, M.E.; Pérez-Martín, M.; Moes, S.; Jenő, P.; Florencio, F.J.; Crespo, J.L. Inhibition of protein synthesis by TOR inactivation revealed a conserved regulatory mechanism of the BiP chaperone in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 730–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Liu, Y.; Bassham, D. TOR is a negative regulator of autophagy in Arabidopsis thaliana. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e11883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Gent, L.; Forde, B.G. How do plants sense their nitrogen status? *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 2531–2539. [[CrossRef](#)]
95. O'Leary, B.M.; Oh, G.G.K.; Lee, C.P.; Millar, A.H. Metabolite Regulatory Interactions Control Plant Respiratory Metabolism via Target of Rapamycin (TOR) Kinase Activation. *Plant Cell* **2020**, *32*, 666–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Leiber, R.; John, F.; Verhertbruggen, Y.; Diet, A.; Knox, J.; Ringli, C. The TOR pathway modulates the structure of cell walls in Arabidopsis. *Plant Cell* **2010**, *22*, 1898–1908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Schaufelberger, M.; Galbier, F.; Herger, A.; de Brito Francisco, R.; Roffler, S.; Clement, G.; Diet, A.; Hörtensteiner, S.; Wicker, T.; Ringli, C. Mutations in the Arabidopsis ROL17/isopropylmalate synthase 1 locus alter amino acid content, modify the TOR network, and suppress the root hair cell development mutant lrx1. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 2313–2323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Cao, P.; Kim, S.J.; Xing, A.; Schenck, C.A.; Liu, L.; Jiang, N.; Wang, J.; Last, R.L.; Brandizzi, F. Homeostasis of branched-chain amino acids is critical for the activity of TOR signaling in Arabidopsis. *Elife* **2019**, *8*, e50747. [[CrossRef](#)]

99. Mahmoud, S.; Planes, M.D.; Cabedo, M.; Trujillo, C.; Rienzo, A.; Caballero-Molada, M.; Sharma, S.C.; Montesinos, C.; Mulet, J.M.; Serrano, R. TOR complex 1 regulates the yeast plasma membrane proton pump and pH and potassium homeostasis. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 1993–2002. [[CrossRef](#)]
100. Saliba, E.; Evangelinos, M.; Gournas, C.; Corrillon, F.; Georis, I.; André, B. The yeast H⁺-ATPase Pma1 promotes Rag/Gtr-dependent TORC1 activation in response to H⁺-coupled nutrient uptake. *Elife* **2018**, *7*, e31981. [[CrossRef](#)]
101. Deng, K.; Wang, W.; Feng, L.; Yin, H.; Xiong, F.; Ren, M. Target of rapamycin regulates potassium uptake in Arabidopsis and potato. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *155*, 357–366. [[CrossRef](#)]
102. Couso, I.; Pérez-Pérez, M.E.; Ford, M.M.; Martínez-Force, E.; Hicks, L.M.; Umen, J.G.; Crespo, J.L. Phosphorus Availability Regulates TORC1 Signaling via LST8 in Chlamydomonas. *Plant Cell* **2020**, *32*, 69–80. [[CrossRef](#)]
103. Couso, I.; Evans, B.S.; Li, J.; Liu, Y.; Ma, F.; Diamond, S.; Allen, D.K.; Umen, J.G. Synergism between Inositol Polyphosphates and TOR Kinase Signaling in Nutrient Sensing, Growth Control, and Lipid Metabolism in Chlamydomonas. *Plant Cell* **2016**, *28*, 2026–2042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Takahashi, H.; Kopriva, S.; Giordano, M.; Saito, K.; Hell, R. Sulfur assimilation in photosynthetic organisms: molecular functions and regulations of transporters and assimilatory enzymes. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2011**, *62*, 157–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Dong, Y.; Silbermann, M.; Speiser, A.; Forieri, I.; Linster, E.; Poschet, G.; Allboje Samami, A.; Wanatabe, M.; Sticht, C.; Teleman, A.A.; et al. Sulfur availability regulates plant growth via glucose-TOR signaling. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 1174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Malinovsky, F.G.; Thomsen, M.F.; Nintemann, S.J.; Jagd, L.M.; Bourguine, B.; Burow, M.; Kliebenstein, D.J. An evolutionarily young defense metabolite influences the root growth of plants via the ancient TOR signaling pathway. *Elife* **2017**, *6*, e29353. [[CrossRef](#)]
107. Giehl, R.F.; von Wirén, N. Root nutrient foraging. *Plant Physiol.* **2014**, *166*, 509–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
108. Ikmi, A.; Steenbergen, P.J.; Anzo, M.; McMullen, M.R.; Stokkermans, A.; Ellington, L.R.; Gibson, M.C. Feeding-dependent tentacle development in the sea anemone *Nematostella vectensis*. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 4399. [[CrossRef](#)]
109. Mutvei, A.P.; Nagiec, M.J.; Hamann, J.C.; Kim, S.G.; Vincent, C.T.; Blenis, J. Rap1-GTPases control mTORC1 activity by coordinating lysosome organization with amino acid availability. *Nat Commun.* **2020**, *11*, 1416. [[CrossRef](#)]
110. Jüppner, J.; Mubeen, U.; Leisse, A.; Caldana, C.; Wiszniewski, A.; Steinhauser, D.; Giavalisco, P. The target of rapamycin kinase affects biomass accumulation and cell cycle progression by altering carbon/nitrogen balance in synchronized *Chlamydomonas reinhardtii* cells. *Plant J.* **2018**, *93*, 355–376. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Titre : Étude de la voie de signalisation de la kinase TOR (Target Of Rapamycin) chez *Arabidopsis thaliana* et applications médicales

Mots clés : Plantes, Kinase TOR, Azote, Glutamine, Métabolisme, Cancer

Résumé : La protéine kinase TOR (Target Of Rapamycin) est conservée au sein des eucaryotes. Elle forme deux complexes, TORC1 et TORC2 chez les animaux et la Levure mais seul le complexe TORC1 a été identifié chez les organismes photosynthétiques. La voie TORC1 est essentielle au développement des organismes puisqu'elle permet de réguler finement de nombreux processus biologiques (traductions des ARNm, divisions cellulaires, métabolisme) en fonction de facteurs endogènes ou exogènes variés (nutriments, hormones, stress). La voie TORC1 est notamment impliquée dans la perception de l'environnement nutritionnel azoté chez la Levure et les animaux mais cet aspect est peu étudié chez les organismes photosynthétiques. Compte tenu de l'importance du métabolisme azoté chez les plantes, la première partie de mon projet de thèse a porté sur les régulations du métabolisme azoté par le complexe TORC1 chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. J'ai ainsi montré que l'activité de TOR répond aux variations de l'alimentation azotée. L'inhibition de TOR diminue le prélèvement d'ammonium par la plante pour des conditions non limitantes, suggérant que la voie TORC1 régulerait les transporteurs d'ammonium à faible affinité. Chez la Levure et les mammifères, la glutamine a un rôle prédominant dans l'activation de TORC1. J'ai ensuite étudié les connexions entre TORC1 et le métabolisme de la glutamine, en utilisant du Glufosinate d'Ammonium (GA), composant actif d'herbicide ciblant la Glutamine Synthétase (GS). Il en ressort que les mutants du complexe TORC1 (*lst8* et *raptor*) sont résistants à l'inhibition de la GS au niveau racinaire. Des analyses métabolomiques ont montré que l'inhibition de TOR conduit à une accumulation de glutamine dans les tissus de la plante, qui semble être GS-dépendante. En complément de cette première partie, j'ai mené une étude à l'Institut Necker des Enfants Malades (INEM), en collaboration avec le Dr Ganna Panasyuk et le Dr Mario Pende. Lors de cancer, le métabolisme de la glutamine peut être dérégulé. L'objectif de cette collaboration était d'étudier l'effet du GA sur les voies TOR dans différentes lignées cancéreuses. Le GA semble avoir un effet sur la voie mTORC2 pour certaines lignées cancéreuses, notamment hépatiques. Le dernier objectif de ma thèse consistait à caractériser un nouveau composant de la voie TOR chez les plantes, qui avait été identifié par un crible génétique. Ce mutant a une sensibilité différente à l'AZD, un inhibiteur de TOR, et présente des amas cellulaires ectopiques au niveau de sa partie aérienne. Ces amas sont dépendants de l'inhibition de TOR et de la présence de sucre. Le gène muté responsable de ce phénotype a été identifié par séquençage et code pour une protéine dont la fonction n'est pas connue mais dont l'orthologue chez la Levure serait impliqué dans la régulation de l'ATPase vacuolaire V-ATPase. Mon travail a consisté à caractériser ce mutant appelé *loki* (LOCALISED proliferation depending on TOR Kinase Inhibition) et ses amas. Des observations histologiques montrent que ces amas sont denses et composés de cellules gonflées et désorganisées. Leur localisation au niveau des tissus vasculaires suggère que l'apport en nutriment de ces amas pourrait être similaire à l'angiogenèse observée dans les processus cancéreux. Des analyses métabolomiques et transcriptomiques ont été réalisées pour comprendre ce phénotype et déterminer l'origine précise de ces cellules. Des analyses pariétales démontrent également des défauts de la composition de la paroi cellulaire, notamment en cellulose, conduisant à des défauts d'adhésion cellulaire chez ce mutant. En comparant *loki* à des mutants connus, j'ai mis en évidence qu'un mutant affecté dans la V-ATPase présente aussi des amas ectopiques lorsque TOR est inhibé, suggérant donc un lien entre la voie TOR et les V-ATPases chez les plantes.

Title : Study of the TOR (Target Of Rapamycin) kinase signalling pathway in *Arabidopsis thaliana* and medical applications

Keywords : Plants, TOR Kinase, Nitrogen, Glutamine, Metabolism, Cancer

Abstract : The TOR (Target Of Rapamycin) protein kinase is conserved in eukaryotes. It forms two complexes, TORC1 and TORC2 in animals and yeast, but only the TORC1 complex has been identified in photosynthetic organisms. The TORC1 pathway is essential for the development of organisms because it allows a precise regulation of many biological processes (mRNA translation, cell divisions, metabolism) in response to various endogenous or exogenous factors (nutrients, hormones, stress). The TORC1 pathway is particularly involved in the perception of nitrogen nutrients in yeast and animals, but this aspect is poorly studied in photosynthetic organisms. Given the importance of nitrogen nutrition in plants, the first part of my thesis project focused on the regulation of nitrogen metabolism by the TORC1 complex in the model plant *Arabidopsis thaliana*. I have shown that the activity of TOR responds to variations in the nitrogen supply. Inhibition of TOR decreases ammonium uptake by the plant in non-limiting conditions, suggesting that the TORC1 pathway regulates low affinity ammonium transporters. In yeast and mammals, glutamine has a predominant role in the activation of TORC1. I then studied the connections between TORC1 and glutamine metabolism by using Glufosinate-Ammonium (GA), the active component of herbicides targeting Glutamine Synthetase (GS). It appears that mutants of the TORC1 complex (*lst8* and *raptor*) are resistant to inhibition of GS at the root level. Metabolomic analyses have shown that inhibition of TOR leads to an accumulation of glutamine in plant tissues, which appears to be GS-dependent. In addition, I conducted a study at the Institut Necker des Enfants Malades (INEM), in collaboration with Dr Ganna Panasyuk and Dr Mario Pende. In cancer, the glutamine metabolism can be deregulated.

The goal of this collaboration was to study the effect of GA on the TOR pathways in different cancer lines. GA appears to have an effect on the mTORC2 pathway in particular for hepatic cancerous cell lines. The last objective of my thesis was to characterize a new component of the TOR pathway in plants, which had been identified by a genetic screen. This mutant has a different sensitivity to AZD, a TOR inhibitor, and exhibits ectopic cell clusters on its aerial part. These cell clusters are dependent on the inhibition of TOR and the presence of sugar. The causal gene mutation responsible for this phenotype was identified by sequencing. It encodes a protein whose exact function is not known but an orthologous protein in yeast is known to be involved in the regulation of the vacuolar V-ATPase. My work consisted in characterizing this mutant called *loki* (LOCALISED proliferation depending on TOR Kinase Inhibition) and the nature of the ectopic cell clusters. Histological observations showed that these clusters are dense and composed of swollen and disorganized cells. Their localization in vascular tissue suggests that the nutrient supply of these cell clusters may be similar to the angiogenesis seen in cancerous processes. Metabolomic and transcriptomic analyses were performed to understand this phenotype and determine the precise origin of these cells. Further analyses also revealed defects in the composition of the cell wall leading to defects in cell adhesion. By comparing *loki* to known mutants, I demonstrated that a mutant affected in V-ATPase also exhibits ectopic clusters when TOR is inhibited, thus suggesting a link between the TOR pathway and V-ATPases in plants.