

Résumé

Les S6 kinases phosphorylent les protéines ribosomales S6 et jouent un rôle essentiel dans le contrôle de la croissance des cellules animales. Deux gènes (*AtS6k1* et *AtS6k2*), organisés en tandem sur le chromosome III, codent ces protéines chez *Arabidopsis thaliana*. Leur fonction dans la croissance et/ou le développement n'a encore jamais été décrite.

Nous avons entrepris une démarche de type génétique inverse chez *A. thaliana*, afin d'obtenir des individus pour lesquels les gènes *AtS6k1* et *AtS6k2* ne sont pas fonctionnels. Un mutant d'insertion ADN-T a été caractérisé pour chacun des deux gènes, mais aucun phénotype n'a été identifié dans les conditions de culture testées, vraisemblablement du fait de la complémentarité mutuelle des fonctions des gènes *AtS6k1* et *AtS6k2*. L'unique double mutant disponible à ce jour (*A199*) n'est pas exploitable, du fait de sa génétique complexe. Deux stratégies ont alors été initiées, pour supprimer simultanément l'expression des deux gènes.

Nous avons tout d'abord entrepris une mutagenèse ciblée des gènes *AtS6 kinases* par les transposons *Ac/Ds* du maïs. À cette occasion, un nouveau marqueur d'excision, basé sur le défaut de germination et de déétiolement des mutants *hy2* a été mis au point. À ce jour, aucune insertion au *locus* des *AtS6 kinases* n'a été identifiée.

En parallèle, nous avons cherché à éteindre l'expression des deux gènes *AtS6k1* et *AtS6k2* par la technique de "gene silencing". L'expression d'un premier ARN interférent, ciblée à l'émergence des racines secondaires, n'a pas engendré de phénotype aberrant. Une seconde construction est en cours d'analyse.

Nous avons enfin initié la recherche de protéines co-purifiées avec *AtS6k2*, étiquetée par les épitopes TAP ou StrepII-HA. Plusieurs interacteurs putatifs ont été détectés après expression transitoire de la fusion protéique StrepII-HA-*AtS6k2* dans *N. benthamiana* et purification d'affinité via l'épitope StrepII. Ces résultats sont en cours de validation.

Abstract

The S6 kinases phosphorylate the S6 ribosomal proteins and are essential for the growth control of animal cells. In *Arabidopsis thaliana*, S6 kinases are encoded by two genes (*AtS6k1* and *AtS6k2*) organised in direct repeats on chromosome III. So far, their function for plant growth and/or development has not been described.

We have started a reverse genetic approach, in order to knock out the two *A. thaliana* S6 kinase genes. A T-DNA single mutant has been characterized for each gene. However, we did not detect mutant phenotypes in any of the growth conditions tested, probably because of functional redundancy between the *AtS6k1* and *AtS6k2* functions. Therefore, we started the analysis of the only available double mutant (*A199*). Unfortunately, due to its complex genetics behaviour, this mutant has not been informative and forced us to set up two alternative strategies to simultaneously suppress the expression of both genes.

First we have initiated a targeted tagging of the *S6 kinases* genes with the *Ac/Ds* maize transposons system. We have created a new excision marker, based on the defective germination and deetiolement of the *hy2* mutants. Up to now, no insertion at the *S6 kinases locus* could be identified.

In parallel, we have tried to silence posttranscriptionally both the *AtS6k1* and *AtS6k2* genes. Our first interfering RNA (RNAi) construct, which expression was targeted to the emerging secondary roots, did not yield any aberrant phenotype. A second construction is being analyzed.

Finally, we have initiated the purification of proteins interacting with an epitope-tagged *AtS6k2* protein. After the transient expression of the StrepII-HA-*AtS6K2* fusion protein in *Nicotiana benthamiana* and the affinity purification via the StrepII-tag, we have detected several putative interactors. These preliminary results are to be reproduced and validated.