



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG



ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

Unité de recherche :

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

UPR CNRS 2357

THÈSE de Doctorat

présentée par :

Sabrina JUNG – ROMEO

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : Sciences du Vivant

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Caractérisation de MSI2 et MSI3 : deux sous-unités du CRL4 et potentiels régulateurs chromatiniens chez *Arabidopsis thaliana*

soutenue le 22 Juillet 2014 devant le jury composé de :

M. Pascal GENSHIK

M. Crisanto GUTIERREZ

M. François ROUDIER

Mme Anne-Catherine SCHMIT

Directeur de thèse

Rapporteur externe

Rapporteur externe

Rapporteur interne

	REMERCIEMENTS	1
	ABREVIATIONS	2
	<i>INTRODUCTION</i>	
I.	La protéolyse ubiquitine-dépendante	8
1	L'ubiquitinylation	8
1.1	L'ubiquitine	8
1.1.1	Fixation de l'ubiquitine	9
1.2	Les protéines « ubiquitine-like »	9
1.3	Les principaux acteurs de l'ubiquitinylation : les enzymes	10
1.3.1	Les E1 : activation de l'ubiquitine	10
1.3.2	Les E2 : conjugaison de l'ubiquitine	10
1.3.3	Les E3 : liaison de l'ubiquitine au substrat	10
1.3.3.1	Les E3 ligases à domaine HECT	11
1.3.3.2	Les E3 ligases à domaine « RING finger »	12
1.3.3.2.1	Les E3 ligases de type CRL	13
1.3.3.2.1.1	<i>Le complexe APC (« Anaphase promoting complexe » ou Cyclosome</i>	13
1.3.3.2.1.2	<i>Le complexe SCF ou CRL1</i>	15
1.3.3.2.1.3	<i>Le complexe VBC</i>	16
1.3.3.2.1.4	<i>Le complexe CUL3-BTB ou CRL3</i>	17
1.3.3.2.1.5	<i>Le complexe CUL4-DDB1 ou CRL4</i>	18
II.	Les mécanismes de régulation de la protéolyse ubiquitine-dépendante	19
1	La reconnaissance et la dégradation par le protéasome	19
1.1	La monoubiquitinylation	19
1.2	La polyubiquitinylation	20
1.3	Le protéasome 26S	21
1.3.1	Composition du protéasome 26S	21
1.3.2	Le mécanisme de dégradation par le 26S	21
2	La régulation de la réaction d'ubiquitinylation	22
2.1	Régulation des principaux acteurs de l'ubiquitinylation	22
2.2	Régulation par modification du substrat	24
2.3	Régulation par débiquitinylation	24
III.	Rôles des complexes CUL4-DDB1^{DCAF}	25
1	Rôle dans la réparation de l'ADN	25
2	Rôle dans la photomorphogenèse	28
3	Régulateur du cycle cellulaire	30
4	Rôle dans la régulation chromatinienne	32
IV.	Les DCAF	36
1	Une multitude de DCAF	36
2	Une protéine à domaine DWD : WDR55	37
3	Une autre classe de DCAF : les MSI (<i>Multicopy Suppressor of IRA1</i>)	38

3.1	MSI 1	38
3.2	MSI4 (FVE) – MSI5	39
V.	Description du projet de recherche	39

RESULTATS

I.	Les MSI : Caractérisation fonctionnelle des gènes <i>MSI2</i> et <i>MSI3</i> d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	42
1	Etude la régulation transcriptionnelle	42
1.1	Expression des gènes de la famille MSI d'après les données protéiques de « microarray »	42
1.2	L'expression des gènes <i>MSI</i> est cycle cellulaire dépendante	43
1.3	Etude des profils d'expression des gènes <i>MSI2</i> et <i>MSI3</i> <i>in planta</i>	44
1.4	E2Fa-DPa contrôle l'expression des gènes <i>MSI2</i> et <i>MSI3</i> <i>in planta</i>	46
2	Etude la localisation sub-cellulaire et de la régulation post-traductionnelle	47
2.1	Etude de la compartimentation cellulaire des protéines <i>MSI</i> <i>in planta</i>	47
2.2	Etude de la régulation post-traductionnelle	48
3	Etude de la fonction des gènes <i>MSI2</i> et <i>MSI3</i>	51
3.1	Un nouvel outil : anticorps anti-MSI3 et anti-MSI4	51
3.2	Mise en évidence du complexe CRL4 ^{MSI2/MSI3}	52
3.2.1	Tests d'interaction en système hétérologue	53
3.2.2	Tests d'interaction basés sur des techniques de microscopie	54
3.2.3	Tests d'interaction basés sur des techniques biochimique <i>in situ</i>	55
4	Identification de substrats de complexes CRL4^{MSI}	58
4.1	Identification des partenaires de la protéine CUL4	29
4.2	Identification des partenaires des protéines MSI	61
4.2.1	Réalisation d'un crible double hybride dans la levure avec MSI2 et MSI3	61
4.2.2	Réalisation d'une expérience de TAP-Tag avec MSI3 et MSI4	62
5	Génétique inverse	63
5.1	Identification de mutants d'insertion T-DNA ou transposon	63
5.2	Caractérisation phénotypique des mutants knock-out	65
5.2.1	Etude de la floraison	66
5.2.2	Etude de la taille des rosettes	67
5.2.3	Variation des gènes du cycle cellulaire dans les mutants <i>msi</i>	68
5.2.4	Sélection d'un quadruple mutant <i>msi2-msi3-msi4-msi5</i>	70
II.	Autre DCAF : WDR55	70

DISCUSSION / PERSPECTIVES

1	MSI2 et MSI3, deux protéines à motif WDxR, interagissent-elle avec DDB1a pour former des complexes de type CRL4 ?	107
2	Les fonctions des gènes MSI 2 et MSI 3 ne sont pas redondantes avec celles des gènes MSI 1 ou MSI 4/MSI 5 dans la plante.	109
3	Les protéines MSI sont-elles capables de réguler différents mécanismes de modification de la structure chromatinienne ?	112

MATERIEL ET METHODES

I.	Matériel	117
1	Plantes et cultures cellulaires végétales	117
1.1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	117
1.2	Culture in vitro d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	117
1.3	<i>Nicotiana benthamiana</i>	117
1.4	Milieux, antibiotiques et méthode de stérilisation	118
2	Micro-organismes	118
2.1	Souches d' <i>Escherichia coli</i> utilisées pour le clonage	118
2.2	Souche d' <i>Agrobactéria tumefaciens</i> utilisée pour la transformation de matériel végétal et infiltration pour expression transitoire	119
2.3	Souche de bactérie utilisée pour la production de protéines	119
2.4	Souches de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilisée pour le test double hybride	119
2.5	Milieux et antibiotiques	120
3	Vecteurs	121
3.1	Vecteur de clonage	121
3.2	Vecteurs d'expression	122
4	Les anticorps anti-MSI3 et anti-MSI4	125
II.	Méthodes	125
1	Techniques relatives aux plantes	125
1.1	Analyse des extraits d'ADN d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	125
1.1.1	Le génotypage par PCR	125
1.1.2	Extraction d'ADN génomique	125
1.1.3	La PCR : Polymerase Chain Reaction	125
1.2	Analyse des extraits d'ARN d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	127
1.2.1	La RT-qPCR	127
1.2.1.1	Extraction d'ARN végétaux totaux	127
1.2.1.2	La RT-PCR	127
1.2.1.3	La q PCR	127
1.3	Analyse des extraits protéiques d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	128
1.3.1	« Western-blot »	128
1.3.1.1	Extraction des protéines totales végétales	128
1.3.1.2	Séparation et détection des protéines en SDS-Page	128
1.3.2	Chromatographie par gel-filtration	129
1.3.3	Co-Immunoprécipitation	130
1.3.4	Extraction d'histones	131
1.4	Techniques d'analyse microscopique	132
1.4.1	Analyse des pointes racinaires par microscopie confocale	132
1.4.2	Coloration GUS (β -glucuronidase)	132
1.4.3	BiFC	133
2	Techniques relatives aux bactéries	133

2.1	Préparation de bactéries TOP10 compétentes	133
2.2	Préparation d'agrobactéries GV3101 compétentes	134
2.3	Transformation des bactéries par choc thermique	134
2.4	Transformation des bactéries par électroporation	135
2.5	Analyse des clones bactériens	135
3	Techniques relatives aux levures	135
3.1	Transformation des levures par l'acétate de lithium	135
3.2	Test d'interaction en double hybride	136
3.3	Crible double hybride	137

<i>BIBLIOGRAPHIE</i>	138
-----------------------------	-----

ANNEXES

Remerciements

Je tiens à remercier Pascal Genschik de m'avoir accueillie dans son équipe et de m'avoir dirigée pendant mes quatre années de thèse, ainsi que Marie-Claire Criqui qui m'a supervisée tout au long de ces quatre années et avec qui j'ai mené à bien ce projet.

Je remercie Crisanto Gutierrez, François Roudier et Anne-Catherine Schmit de me faire l'honneur de juger mon travail de thèse.

Je remercie tous les membres de l'IBMP, aussi bien le personnel administratif que technique :

- Les jardiniers pour avoir pris soin de mes plantes durant ces quatre années et d'avoir toujours trouvé une solution pour mes tests de floraison lorsque j'envahissais une logette entière
- Malek pour tous les séquençages de mes nombreux clonages en tout genre et ton aide en qPCR
- Les microscopistes et les informaticiens pour votre bonne humeur quotidienne
- Danièle et Lisiane pour nos nombreuses discussions de tout et de rien
- Laurence M. sans qui le magasin ne tournerait pas et, sans qui, nous serions abandonnés
- Nicolas pour la production des protéines, leur purification et tes conseils en gel-filtration
- Le team newsletter et plus largement la commission communication, mais aussi tous les autres que je n'aurais pas cité.

Je tiens à remercier les membres du « 4ème » et plus particulièrement les personnes de mon labo, anciens et présents, le 612, mais aussi les anciens membres expatriés au 626, ainsi que les « drôles de dames » de Montpellier, pour votre soutien, vos discussions et nos franches rigolades. Merci Esther pour tes conseils avisés, d'être toujours là quand on a besoin et de penser à nos estomacs. Merci Kinda pour ton soutien durant mon master mais aussi durant cette thèse, merci Sandra pour tes conseils, merci Alexis, Benoit, Thomas R., Patrick, Jean-Michel, pour vos conseils en tout genre, merci Thomas P. pour ta science et ta mémoire qui m'impressionne toujours autant. Katia ma première voisine de paillasse, aujourd'hui à Montpellier. Thibaut mon premier stagiaire, j'espère que je ne t'ai pas trop fait souffrir et je te souhaite bonne chance pour ton master et pour ta future thèse, j'espère qu'elle sera aussi enrichissante que la mienne. Sans oublier bien sûr Yves, mister Ubi, toujours avec le sourire. Jean-Luc pour nos discussions protéines et bien sûr, aviation. Merci à tous ceux que je n'ai pas cité.

Je remercie affectueusement toute ma famille, mes parents et ma grand-mère pour m'avoir donnée la chance de faire de longues études. Jonathan pour ton amour et ton soutien indéfectible tout au long de ces années, merci de me supporter tous les jours surtout en cette période de rédaction. Merci à Annie, J-P, Mathieu, Angèle (pardon Andrée !), Marie etc... Merci à mes amis plus particulièrement Laurence comme on dit à plusieurs on est plus fort.

A mon papa

ABBREVIATIONS

3-AT	3-Amino-1,2,4- Triazol
A	Ampères
ABA	Acide Abscissique
ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
APC/C	Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome
Arg	Arginine
ARN	Acide Ribo-Nucléique
ASK	Arabidopsis SKP1 like protein
ATG8, 12	Autophagy 8, 12
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BET	Bromure d'Ethydium
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
BTB	Bric à Brac, Tramtrack and Broad
°C	Degré Celsius
C	Cystéine
CaCl₂	Calcium Chloride
c-à-d	C'est-à-dire
CAND1	Cullin Associated and Neddylation – Dissociated 1
CAF	Chromatin Assembly Factor
CDC	Cell Cependent Cycle
CDD	COP10, DDB1a et DET1
CDH	Cerevisiae Dim1 Homologous1
CHR	Chromatin Remodeling
CDK	Cycline-Dependent Kinase
CFP	Cyan Fluorescent protein
CKI	Cyclin Kinase Inhibitors
CLF	CURLY LEAF
CLRC	Ubiquitin ligase complex localization to heterochromatin
COP	Constitutive Photomorphogenesis
CP	Core Particle
CRL	Cullin-Ring E3 Ligase
CSA	Cockayne syndrome A
CSN	Cop9 signalosome
C-ter	Carboxy-terminale

CUL	Cullin
DCAF	DDB1-CUL4-Associated Factors
DDB	Damaged DNA Binding protein
DIC	Differential interference Contrast
dNTP	désoxyriboNucléotide TriPhosphate
DO	Densité Optique
DTT	DiThioThréitol
DUB	DeUbiquitine
DWD	DDB1-binding WD40
EBF	Ethylene Response factor
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
ENaC	Epithelial Na Channel
ESC	Extra Sex Combs
E(z)	Enhancer of zeste
FIE	Fertilization Independent Endosperm
FIS	Fertilization Independent Seed
FLC	Flowering Locus C
g	gramme(s)
<i>g</i>	Force centrifuge relative
GGR	Global Genome Repair
GFP	Green Fluorescent Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GUS	GlucUronic acide (X-Gluc)
h	heure(s)
H	Histones
H	Histidine
HECT	Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1- pipérazine éthane sulfonique
HDAC	Histone Deacétylase
HFR1	Long Hypocotyl in Far-Red
His	Histidine
HP	Heterochromatin protein
HOAc	Acide acétique

HUB1	Homologous to ubiquitin 1
HY5	Long Hypocotyl 5
HYH	HY5 homologue
K	Lysine
KCl	Chlorure de potassium
KDa	Kilo Dalton
KOAc	Acétate de potassium
KRP	Kip Related Protein
L	Litre
LAF1	Long after Far-Red Light 1
LB	Luria-Bertani
LiAc	Acétate de Lithium
LHP1	Like Heterochromatin Protein 1
LHY	Late Elongated Hypocotyl 1
LRR	Leucine Rich Repeat
Lys	Lysine
M	Molaire
MADS	MCM-Agamous-Deficiens-SRF
MATH	Meprin And Traff Homology
MCM	MiniChromosome Maintenance protein complex
MDM2	Murine Double Minute2
MDMX	MDM2 related protein
me1, 2 ou 3	Mono-, di- ou tri-methylation
MEL26	Maternal Effect Lethality
MET	MethylTransférase
MgCl₂	Chlorure de Magnésium
min	minute(s)
m	milli
MS	Mursashigh et Skoog
MSI	Multicopy Suppressor of IRA 1
MUB	Membrane anchored Ubiquitin-fold
NaCl	Chlorure de Sodium
NaOH	Hydroxyde de Sodium
NEDD	Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated

NER	Nucleotide Excision Repair
Ni	Nickel
NP	Nonidet
N-ter	N-terminal
pb	paire de bases
PcG	Polycomb Groupe
PCNA	Proliferation Cellular Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	PolyEthylène Glycol
%	Pourcentage
PHD	Plant Homeo Domain
Phe	Phenylalanine
PRC	Polycomb Repressive Complex
p/v	poids/volume
PVDF	PolyFluorure De Vinylidène
RBX	Ring BoX
RFP	Red Fluorescent Protein
RB	RetinoBlastoma
RBR	RB-Related
RING	Really Interesting New Gene
RITS	RNAi-induced transcriptional silencing
RP	Regulatory Particle
RPN	Regulatory Particle Non-ATPase
RT	Rétro-Transcription
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RUB	Related Ubiquitin like
s	seconde(s)
SDS	DodécylSulfate de Sodium
SDS-Page	SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
SKP	S-Phase Kinase-Associated Protein
SOCS-box	Suppressor of Cytokine Signalling protein
SPA	Suppressor of PhyA
SPRF	Single Protein Ring Finger
Su(z)	Suppressor of zeste

TAE	Tris-Acétate-EDTA
TBS	Tris Buffered Saline
TCA	Acide Trichloroacétique
TCP	Transcription Coupled Repair
T-TBS	Triton-TBS
TE	Tris-EDTA
TIR1	Transport Inhibitor Resistant
TOC1	Timing of Cab Expression
Trp	Tryptophane
Tyr	Tyrosine
Ub	Ubiquitine
UBA	Ubiquitin Activating enzyme
Ubc	Ubiquitin conjugating
UBL	Ubiquitin like
UBP	Ubiquitin specific Processing enzymes
UCH	Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase
UFM	Ubiquitin-fold modifier 1
URM	Ubiquitin related modifier 1
UV	Ultra Violet
v/v	volume/volume
V	Volts
VHL	Von Hippel Lindau
XP	Xeroderma Pigmentosum
XPC	Xeroderma Pigmentosum complementation group C
YFP	Yellow Fluorescent Protein
YPD	Yeast extract-Peptone-Dextrose
μ	Micro-

INTRODUCTION

A travers cette introduction, je vous propose de parcourir l'état actuel des connaissances dont nous disposons sur un système de dégradation des protéines par la machinerie de protéolyse ubiquitine et protéasome/26S-dépendante. Je commencerai par une introduction générale sur la protéolyse ubiquitine-dépendante, puis je détaillerai plus amplement chaque acteur de cette voie.

Dans un deuxième temps, je vous détaillerai plus particulièrement les E3 ubiquine ligases de la famille des CULLIN pour me focaliser finalement sur les différents rôles du complexe CUL4-DDB1. Je terminerai par un état des connaissances sur la famille des gènes MSI (Multicopy Suppressor of IRA1) qui ont fait l'objet de ma thèse de doctorat.

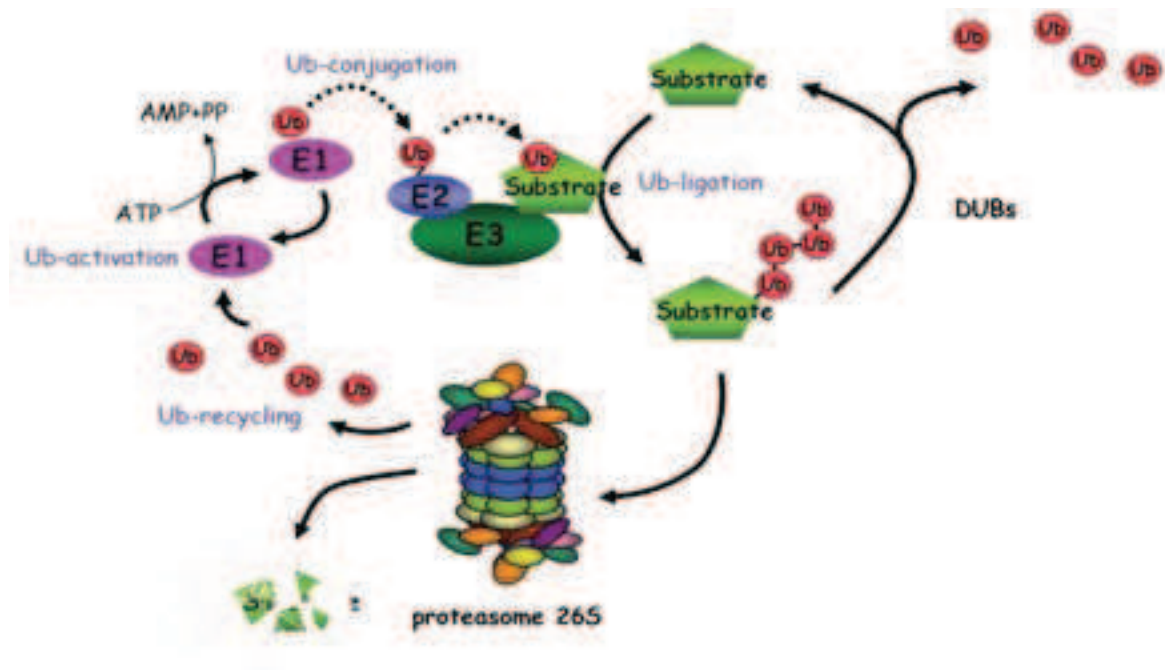


Figure 1 : Mécanisme général de la protéolyse ubiquitine et protéasome 26S-dépendante

La protéolyse ubiquitine-dépendante débute par l'activation de l'ubiquitine de manière ATP-dépendante par l'enzyme E1 (ou enzyme d'activation), suivie de son transfert sur une enzyme E2 (ou enzyme de conjugaison) et finalement l'attachement de l'ubiquitine sur la protéine cible avec l'aide d'une enzyme E3 (ou ubiquitine ligase). La protéine cible marquée par l'ubiquitine (sous forme de chaîne ou non) est soit reconnue par le protéasome/26S et dégradée par un processus ATP-dépendant, soit reconnue par des enzymes de dé-ubiquitinylation (DUB). L'ubiquitine est alors recyclée.



Figure 2 : Structure 3D de l'Ubiquitine de plante.

Les 7 lysines (K) pouvant être utilisées pour la formation des chaînes de poly-ubiquitine sont montrées en rouge. Les feuillettes β sont présentés en vert et les hélices α en bleu. La glycine C-terminale (G76) utilisée pour établir la liaison covalente entre l'ubiquitine et le résidu lysine de la protéine cible est aussi indiquée (Hua et Vierstra, 2011).

I. La protéolyse ubiquitine dépendante

La régulation de la stabilité des protéines par la protéolyse ubiquitine-dépendante participe au contrôle de nombreux processus physiologiques et développementaux chez tous les eucaryotes (Ciechanover et al., 2000 ; Smalle and Vierstra, 2004). Dans ce système de régulation, plusieurs acteurs participent à différentes étapes.

1. L'ubiquitinylation

Le mécanisme d'ubiquitinylation d'une protéine repose sur une réaction en chaîne conduisant à la fixation d'une petite protéine de 76 aa, appelée ubiquitine, sur une protéine cible : le substrat. Trois enzymes différentes participent à la conjugaison de l'ubiquitine. Tout d'abord, l'enzyme d'activation (E1) transfère l'ubiquitine libre sur une enzyme de conjugaison appelée E2. Une fois, l'ubiquitine activée, celle-ci est liée au substrat sur une Lysine à l'aide d'une enzyme de liaison à l'ubiquitine ou E3. Les protéines cibles ou substrats sont alors modifiées par mono-ubiquitinylation ou poly-ubiquitinylation. Le substrat poly-ubiquitinylé est dirigé vers le protéasome 26S, siège de sa dégradation. L'ubiquitine retrouve sa liberté afin d'entrer dans un nouveau cycle d'ubiquitination (**Figure 1** ; Hersko et Ciechanover 1992 ; 1998 ; Kornitzer et Ciechanover 2000 ; Weissmann 2001 ; Smalle et Vierstra 2004 ; Hua et Vierstra 2011).

1.1 L'ubiquitine

L'ubiquitine est un petit polypeptide « ubiquitaire » c'est-à-dire hautement conservé chez toutes les espèces eucaryotes. Goldstein la découvrit en 1975 comme une hormone peptidique (Goldstein et al., 1975). En 1978, Ciechanover et Hersko découvrirent un polypeptide de 76 acides aminés impliqué dans un système de dégradation des protéines ATP-dépendant (Prix Nobel de Chimie 2004). L'équipe de Wilkinson identifia ce polypeptide comme l'ubiquitine en 1980 (Wilkinson et al., 1980).

La production d'ubiquitine commence par la synthèse d'un précurseur sous forme de polyubiquitine ou en fusion avec une protéine ribosomale. Une maturation du produit de

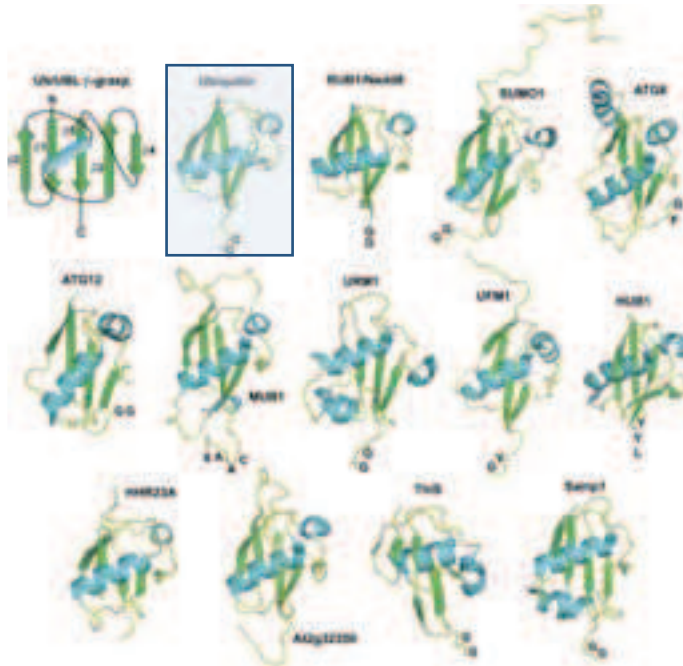


Figure 3 : Structure 3D des Ub et Ub-like chez les procaryotes et les eucaryotes. La première illustration de la série est une représentation schématique des arrangements des feuillettes β et hélices α dans un ordre $\beta\beta\alpha\beta\beta$ appelée « β -grasp » car les feuillettes β empoignent littéralement l'hélice α souvent unique. A l'exception de MUB1 et HUB1, le bras libre de l'extrémité C-terminale se termine avec le résidu glycine (d'après Vierstra, 2012).

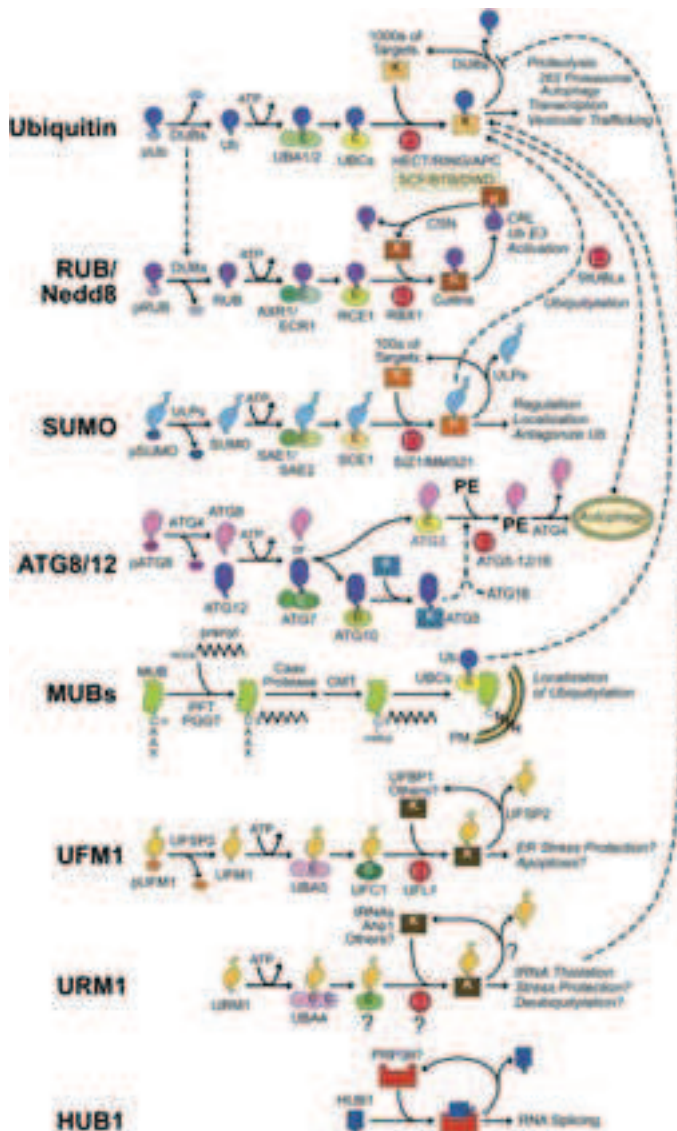


Figure 4 : Représentation schématique de l'enzymologie, des cibles et des fonctions des Ub et UBL.

Les noms des protéines des différents composants identifiés sont indiqués en respectant la nomenclature utilisée chez *Arabidopsis thaliana*. Les points d'interrogations indiquent qu'une telle activité devrait exister mais que la protéine n'a pas été identifiée (d'après Vierstra, 2012).

traduction donnera l'ubiquitine libre (Callis et al. 1995). Sa structure 3D permet de mettre en évidence une structure globulaire « Ub-Fold » avec 5 feuillets β et une hélice α (**Figure 2**). De nombreuses liaisons hydrogènes participent à sa grande stabilité, ce qui la protège de la protéolyse et incite à son recyclage. Elle peut établir des liaisons covalentes avec les acteurs de la protéolyse ubiquitine dépendante et les substrats grâce à une glycine se trouvant en son extrémité C-terminale.

1.1.1 Fixation de l'ubiquitine

L'ubiquitine se fixe sur une lysine de la protéine cible en utilisant sa glycine terminale, elle peut aussi établir d'autres liaisons avec une ou plusieurs molécules d'ubiquitine afin de former différents types de chaînes de polyubiquitine (Peng et al., 2003). L'ubiquitine possède 7 lysines internes dont les positions sont conservées : Lys6, Lys11, Lys27, Lys33, Lys48 et Lys 63.

Les différents types d'ubiquitinylation ainsi que leur mécanisme de régulation seront détaillés dans le chapitre 2.

1.2 Les protéines « ubiquitine-like »

L'ubiquitine ainsi que les ubiquitine-like se caractérisent par leur structure « Ub-Fold ». Souvent, elles présentent de petites séquences identiques à l'ubiquitine et possèdent une taille variant entre 72 et 186 acides aminés (**Figure 3**). Chez les plantes, ces ubiquitin-like incluent couramment HUB1 « Homology of Ub1 », RUB1 « related to Ub1 » aussi nommé NEDD8, SUMO1 « Small Ub-like Modifier », ATG8 « Autophagy 8, ATG12, MUB 1 « Membrane anchored ubiquitin-fold proteins », UFM1 « ubiquitin-fold modifier1 », URM1 « Ubiquitin-related modifier1 », mais aussi plusieurs assortiments de protéines qui présentent un repliement structural similaire.

La plupart de ces ubiquitin-like empruntent une cascade de réaction enzymatique de type E1, E2 et E3 tout comme l'ubiquitine, mais l'enzyme E3 n'est pas toujours présente ou identifiée. Cependant comparée à l'ubiquitine, la fixation de plusieurs de ces protéines sur leurs protéines cibles n'aboutit pas directement à leur dégradation par le protéasome 26S mais

plutôt à une régulation de leur activité (**Figure 4**). Les cas particulier de RUB1/NEDD8 seront discutés en paragraphe 2.1.

1.3 Les principaux acteurs de l'ubiquitinylation : les enzymes E1, E2 et E3

1.3.1 Les enzymes E1 : activation de l'ubiquitine

L'activation de l'ubiquitine est la première étape de la cascade de conjugaison, elle s'effectue par l'enzyme monomérique E1 via une réaction intramoléculaire ATP-dépendante (Hersko et al. 1980, 1981). Elle agit sur l'ubiquitine en s'y liant par une liaison thio-ester avec une de ses cystéines conservées. La spécificité du substrat cible n'est que très faiblement impactée par les enzymes E1, et celles-ci peuvent être utilisées par de nombreuses enzymes E2. Chez *Arabidopsis thaliana*, seuls deux gènes codant pour des enzymes E1 sont connus : UBA1 et UBA2, tandis qu'un seul a été identifié chez *Saccharomyces cerevisiae* (Bachmair et al., 2001 ; Vierstra, 2003).

1.3.2 Les enzymes E2 : conjugaison de l'ubiquitine

Une fois l'ubiquitine activée par l'enzyme E1, celle-ci est transportée par l'enzyme E2 vers l'enzyme de liaison de l'ubiquitine nommée E3 via une réaction de transestérification. Ces enzymes ont comme point commun de présenter un domaine conservé Ubc « ubiquitin-conjugating », de 150 acides aminés formant le cœur catalytique, au sein duquel se trouve le site de liaison à l'ubiquitine. De plus, les enzymes E1 comme les E2 ont été identifiées chez toutes les espèces. Alors que les enzymes E1 ne participent pas à la reconnaissance spécifique des protéines cibles, les enzymes E2 possèdent une spécificité d'interaction avec les enzymes E3, augmentant ainsi considérablement le nombre de gènes codant pour elles. Les enzymes E2 sont environ au nombre de 45 chez *Arabidopsis thaliana* et de 13 chez *S.cerevisiae* (Bachmair et al., 2011 ; Vierstra, 2003)

1.3.3 Les enzymes E3 : liaison de l'ubiquitine au substrat

Les enzymes E3 représentent le dernier maillon intervenant dans la cascade d'ubiquitinylation et sont responsables de l'identification spécifique des substrats. Les E3

peuvent être regroupées en 2 classes : les enzymes monomériques à domaine HECT « Homologous to E6-AP C-terminus » et les enzymes E3 à motif « RING (Really Interesting New Gene) finger », en fonction du mécanisme de transfert de l'ubiquitine vers la protéine cible. Dans le cas des enzymes E3 à domaine HECT, l'ubiquitine est prise en charge physiquement par une cystéine de l'enzyme avant transfert sur la protéine cible. Alors que les enzymes E3 à motif « RING finger » permettent de rapprocher le substrat et l'ubiquitine portée par l'enzyme E2. Il existe plusieurs types d'enzymes E3 à motif « RING finger » : les enzymes monomériques et celles qui agissent sous forme de complexe multiprotéique (Jackson et al. 2000). Parmi les complexes multiprotéiques, ceux possédant une sous-unité à domaine Culline sont les plus étudiées et 4 d'entre eux ont été caractérisés chez *Arabidopsis thaliana*, le complexe VBC n'existant pas chez *Arabidopsis thaliana* (**Figure 5**). Il est important de noter que ces complexes jouent tous un rôle essentiel chez la plante. L'inactivation individuelle de chacun de ces complexes par mutagenèse conduit à une létalité gamétophytique ou embryonnaire chez la plante modèle *Arabidopsis*.

1.3.3.1 Les E3 ligases à domaine HECT

Les E3 ligases à domaine HECT sont des enzymes monomériques, définies à l'origine par la présence d'un domaine conservé de 350 acides aminés en C-terminal de la protéine appelé domaine HECT (Herschko and Ciechanover, 1998). Ce domaine contient le site de liaison au complexe Ub-E2 ainsi qu'une cystéine conservée qui accepte l'ubiquitine, ce qui permettra de former une liaison thio-ester avec l'enzyme E3 avant d'ubiquitinyler le substrat (**Figure 5**). Les E3 ligases à domaine HECT font généralement plus de 100 kDa. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, deux E3 ligases à domaine HECT ont une taille de 405 kDa (Bates et Vierstra, 1999). Le domaine N-terminal contient plusieurs motifs d'interaction protéine-protéine tel que le motif WW, le domaine « RING-finger, ou encore un domaine « coiled-coil ». Une des E3 à domaine HECT la mieux caractérisée chez l'Homme est NEDD4 « Neuronal precursor cell expressed developmentally downregulated 4 », contenant des motifs WW. Ces motifs vont lui permettre de reconnaître ses principaux substrats qui sont les sous-unités du canal sodique ENaC « Epithelial Na Channel » (Abriel et Staub, 2005).

Alors que chez la levure et chez l'homme, il existe respectivement une et plus de 50 E3 ligases à domaine HECT, chez *Arabidopsis thaliana* on en dénombre 7 (Downes et al, 2003).

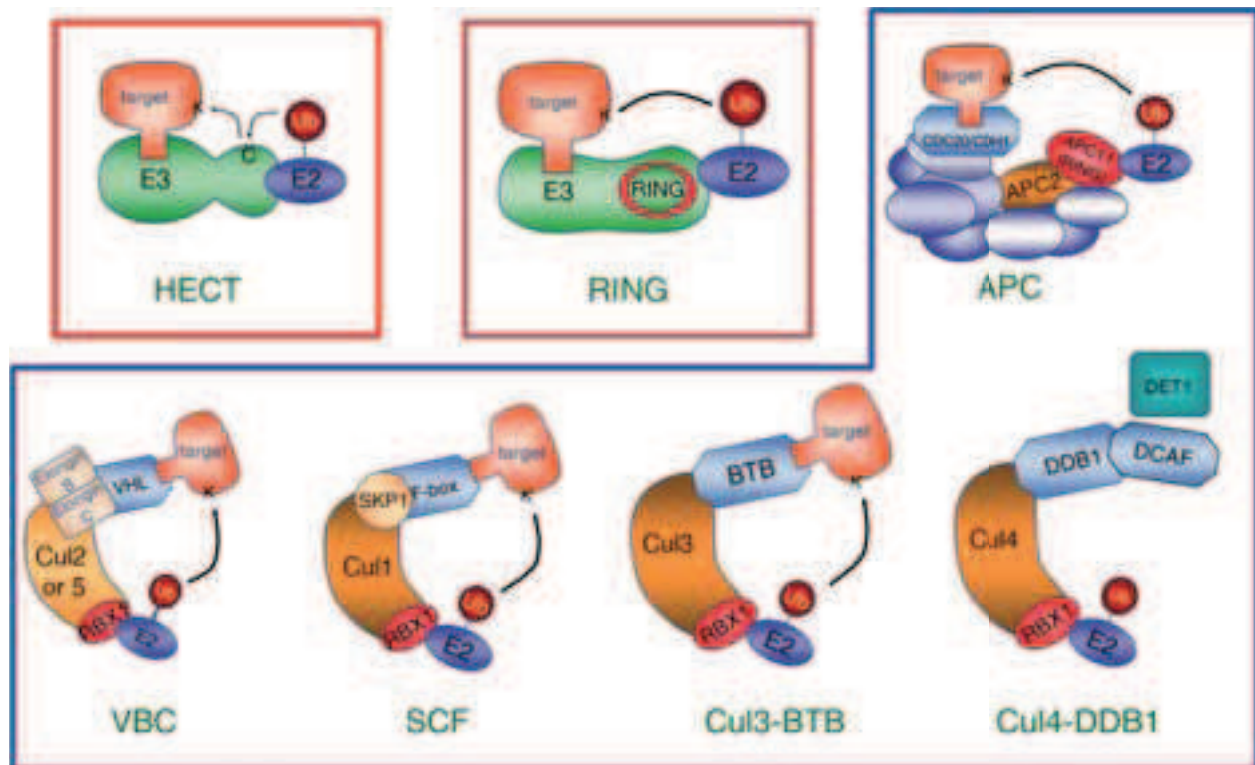


Figure 5 : Organisation des différentes ubiquitine E3 ligases

Les E3s ligases à domaine HECT (encadré rouge) prennent en charge physiquement la protéine cible et forment une liaison covalente avec l'ubiquitine (Ub). Les E3s ligases à domaine « RING Finger » (encadré brun) permettent de rapprocher l'enzyme E2 qui a fixé l'Ub et la protéine cible pour transférer l'ubiquitine directement sur la cible. La dernière classe regroupe les E3s à domaine « RING Finger » de type multimérique. Ces complexes sont architecturés autour des différentes protéines à domaine CULLINE, jouant le rôle de charpente, ils sont nommés CRL pour CULLIN-RING Ligase. La sous-unité APC2 du complexe multiprotéique APC/C est phylogénétiquement reliée aux protéines CULLINES.

Parmi les exemples récents, on peut citer *UPL5* qui ubiquitine un facteur de transcription WRKY53 conduisant à sa dégradation par le protéasome 26S. WRKY53 joue un rôle dans le contrôle de la sénescence foliaire (Miao and Zentgraf, 2010).

1.3.3.2 Les E3 ligases à domaine « RING finger »

Les E3 ligases à domaine « RING finger » sont librement définies comme une collection de polypeptides supportant un motif de signature RING finger. Ce motif est formé d'une séquence consensus C3HC4 ou CX2CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX2CX(4-48)CX2C où les résidus cystéine (C) et histidines (H) fixent les ions Zinc (Borden, 2000). Ce motif a été décrit pour la première fois en 1993 comme un module participant aux interactions protéine-protéine ou protéine-acide nucléique (Lovering et al., 1993). Comme illustré sur la figure 5, l'enzyme E2 va interagir avec ce motif et ainsi cet ensemble participe au processus d'ubiquitylation du substrat sans passer par une liaison covalente de l'ubiquitine sur l'enzyme E3.

Les travaux de Lovering et al., 1993 ont permis d'identifier une ubiquitine-E3 ligase à domaine « RING finger », appelée AO7, capable d'ubiquitylation *in vitro* en présence d'enzymes E1 et E2. Cette caractérisation a permis d'identifier d'autres protéines à domaine « RING finger », capables elles-aussi d'ubiquitylation E2-dépendante (Lorick et al., 1999). Cependant, il paraît impossible d'affirmer que toutes les protéines présentant un domaine « RING finger » possèdent une activité E3 ligase. Un grand nombre de gènes codant pour des protéines présentant le motif « RING-finger » a été mis en évidence dans les différents génomes séquencés, mais lesquelles sont capables d'ubiquitylation reste à définir. Deux classes de E3s ligases à domaine « RING finger » peuvent être définies :

- la première est constituée des E3 ligases présentant uniquement le domaine « RING finger », elles sont appelées SPRF ou « Single Protein Ring Finger ».
- la deuxième classe est constituée d'E3 ligases se présentant sous forme de complexes multimériques où la protéine à domaine «RING-finger » ne constitue qu'une sous-unité. Les plus étudiées de ces E3 ligases sont celles contenant le domaine Culline. Ces E3 ligases sont construites autour de la protéine CULLINE ; véritable charpente moléculaire de ces complexes, sur laquelle viennent se greffer deux modules fonctionnels : un module de reconnaissance spécifique de la protéine cible et un module catalytique qui contient la

protéine à domaine « RING finger ». Ce dernier accueille l'enzyme E2 portant l'ubiquitine active. Chez les eucaryotes, les CULLINES ont été identifiées au nombre de 6 (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4, CUL5 et CUL7), ainsi que des CULLINES-like (APC2). Chacune est la base de complexes multimériques formés de plusieurs sous-unités appelés CRL ou « Cullin Ring Ligases » (Dias et al, 2002 ; Willems et al, 2004 ; Petroski et Deshaies 2005). Parmi ces complexes, plusieurs ont été identifiés, caractérisés et classés en fonction de la CULLINE qu'ils renferment.

1.3.3.2.1 Les E3 ligases de type CRL

1.3.3.2.1.1 Le complexe APC/C ou « Anaphase Promoting Complex/Cyclosome »)

L'APC/C est le plus grand complexe E3 ligase décrit actuellement. Chez les vertébrés, il est composé de 12 sous-unités (Peters, 2002), alors que chez les levures, 13 sous-unités ont été décrites (Yoon et al., 2002). Les fonctions individuelles de chaque sous-unité ne sont pas encore toutes connues, toutefois un modèle structural de son organisation a été proposé (Thornton et al., 2006). Le module catalytique minimal du complexe APC/C comprend la sous-unité APC2, un membre éloigné de la famille des CULLINES (Zachariae et al., 1998) et la sous-unité APC11 qui possède le motif « RING –finger ». Le complexe APC/C contient aussi trois sous-unités essentielles possédant des répétitions du domaine d'interaction protéine-protéine TPRs (tetratricopeptide repeat) : APC3/CDC27, APC8/CDC23 et APC6/CDC16. APC3/CDC27 est impliquée dans la liaison avec la sous-unité activatrice CDH1 « Cerevisiae Dim1 Homologous1 » (Vodemaier et al., 2003 ; Kraft et al., 2005). La phosphorylation de ces sous-unités durant la mitose est nécessaire à l'activation du complexe APC/C (Rudner et Murray, 2000 ; Kraft et al., 2003). En plus de ces composants majeurs, le complexe APC/C nécessite des protéines co-activatrices telles que CDC20 –FIZZY ou CDH1/FIZZY-RELATED, qui active le complexe APC/C durant le cycle cellulaire. CDC20 active le complexe APC/C en début de mitose tandis que CDH1 prend le relais en fin de mitose jusqu'à la transition G1/S (Glutzer et al., 1991 ; Fang et al., 1998 ; Peters, 2006). Ces cofacteurs font partie d'une famille de protéines qui possèdent en leur partie C-terminale, sept répétitions du type WD40 (Page et Hieter, 1999). D'autres motifs plus particuliers ont été caractérisés dans les cibles du complexe APC/C : la D-box (RXXLXXXN) présente

majoritairement dans les substrats APC^{CDC20} (Pfleger et Kirschner, 2000) et la KEN-box (KENXXXN/D) plus spécifiquement reconnue par le complexe APC^{CDH1} (Leismann et Lehner, 2003).

Durant la dernière décennie, beaucoup d'attention a été portée sur le rôle du complexe APC/C dans la régulation du cycle cellulaire. Comme son nom l'indique, l'APC/C est principalement requis pour induire la progression et la sortie de la mitose en jouant sur la protéolyse des différents régulateurs du cycle cellulaire, tels que PDS1/SECURINE et la cycline B. La dégradation de PDS/SECURINE est requis pour la séparation des chromatides sœurs (Uhlmann et al., 2000 ; Yanagida, 2000), alors que la dégradation des cyclines mitotiques B déclenche la chute de l'activité kinase CDK1 « Cyclin dependent Kinase 1 ». Ceci induit les événements nécessaires à la sortie de la mitose comme le désassemblage du fuseau mitotique, la décondensation des chromosomes mais aussi la cytokinèse et la reformation de l'enveloppe nucléaire (Murray et Kirschner, 1989 ; Luc et al., 1991 ; Gallant et Nigg, 1992 ; Surana et al., 1993).

Plusieurs autres protéines participant à la régulation du cycle cellulaire sont des cibles du complexe APC/C chez les levures et les mammifères. Parmi elles, on peut citer la protéine kinesine XKID impliquée dans le mouvement des chromosomes (Funabiki et Murray, 2000 ; Levesque et Compton, 2001), deux protéines moteurs (KIP1 et CIN8) (Gordon et Roof, 2001 ; Hildebrandt et Hoyt, 2001) et la protéine associée au fuseau mitotique ASE1 sont impliqués dans la formation du fuseau central et la cytokinèse. Le complexe APC/C reste actif durant la phase G1 afin de restreindre l'accumulation des cyclines mitotiques, mais son inactivation est nécessaire à l'entrée en phase S (Imiger et Nasmyth, 1997). Plusieurs mécanismes participent à l'inactivation du complexe APC/C. L'inhibiteur EMI1 « Early Mitotic Inhibitor 1 » s'associe au complexe APC/C en phase S et G2. Au cours de la mitose, l'APC/C est la cible d'un mécanisme de surveillance appelé SAC « Spindle Assembly Checkpoint » qui assure l'entrée en anaphase uniquement lorsque tous les chromosomes sont attachés au fuseau mitotique.

Chez *Arabidopsis thaliana*, toutes les sous-unités du complexe APC/C sont codées par des gènes uniques, sauf APC3/CDC27 (Capron et al., 2003). Sur la base d'homologie de séquence, huit activateurs de l'APC/C ont été identifiés : cinq CDC20 (Kevei et al., 2011) et trois CCS52/CDH1 (Tarayre et al., 2004). Plus récemment, plusieurs inhibiteurs de l'APC/C

ont été finalement identifiés grâce à des techniques de protéomique (Iwata et al., 2011 ; Heymann et al., 2011 ; Eloy et al., 2012). Plusieurs travaux ont non seulement démontré l'importance du complexe APC/C dans la régulation du cycle cellulaire chez les plantes (Genschik et al., 1998 ; Cebolla et al., 1999 ; Criqui et al., 2000 ; Kwee et Sunderasan, 2003) mais également son implication dans l'endoreduplication via l'activateur CDH1 chez *Medicago* et *Arabidopsis thaliana* (Cebolla et al., 1999 ; Marrocco et al., 2009).

1.3.3.2.1.2 Le complexe SCF ou CRL1

Le complexe SCF, le mieux caractérisé parmi les E3 ligases (Cardozo et Pagano, 2004), est constitué de 4 polypeptides qui, associés, possèdent une activité E3 ubiquitine ligase. Le complexe SCF a été initialement identifié dans la levure comme étant un régulateur clé de la transition G1/S du cycle cellulaire. L'entrée en phase S est strictement contrôlée par le « checkpoint » appelé le point START chez la levure. Au niveau moléculaire, il s'agit de l'inhibiteur SIC1 qui restreint l'activité kinase CDK. Ce verrou est levé grâce à l'activité de polyubiquitinylation du complexe SCF^{CDC4}. Le nom du complexe SCF basé sur le nom de trois de ses sous-unités : SKP1 « S-phase Kinase-associated Protein 1 », CDC53 (ou CULLINE 1) et protéine « F-box », appelée ainsi en raison de la protéine initialement décrite : la Cycline F (Bai et al, 1996). La quatrième sous-unité, RBX1 « Ring-BOX protein 1 » ou ROC1 « Regulator Of Cullin1 » contient un domaine « RING-finger » (Kamura et al., 1999 ; Ohta et al., 1999 ; Seol et al., 1999 ; Skowyra et al., 1999). Le complexe de base des SCF comporte les sous-unités SKP1, CULLINE 1 et RBX1. La diversité de ces complexes provient des différentes protéines « F-box » recrutées (Lechner et al., 2006).

La partie C-ter de la protéine CULLINE 1 interagit avec la sous-unité catalytique RBX1 et sa partie N-ter avec la sous-unité SKP1 qui fait le lien, via le motif F-box d'environ 40 acides aminés à majorité hydrophobe de la protéine « F-box » qui forment le module de reconnaissance spécifique des substrats (Skowyra et al., 1997). Des analyses génomiques montrent que les eucaryotes contiennent de nombreux complexes SCF ; ce nombre est croissant avec la complexité de l'organisme. Alors que la levure possède un gène SKP1, *Arabidopsis thaliana* compte 21 gènes codant pour SKP1 appelés ASK « Arabidopsis SKP1 like protein. La CULLIN1 et RBX1 sont quant à eux codés par des gènes uniques (Lechner et al., 2002 ; Liu et al., 2004 ; Takahashi et al., 2004). *Arabidopsis thaliana* comporte pas moins de 700 gènes codant pour des protéines « F-box » (Gagne et al. 2002), soit 10 fois plus que

chez l'homme. Cette diversité provient de la partie C-terminale qui contient un autre domaine d'interaction protéine-protéine spécifique de la reconnaissance des substrats. Ces différents domaines permettent d'établir différentes familles : des répétitions « WD40 », des LRR « Leucine Rich Repeat » ou encore des « Kelch repeat » (Andrade et al., 2001 ; Cenciarelli et al., 1999 ; Kuroda et al., 2002). Couplés à la présence de sous-unités CULLIN1 et ASKs distinctes, Arabidopsis a ainsi le potentiel de générer une collection quasi infinie de sous-types de complexes SCF, chacun ayant des spécificités propres et/ou de régulation (Liu et al., 2004 ; Takahashi et al., 2004). Ces hypothèses impactent directement la biologie des plantes et ont rapidement été étayées par l'accumulation de données expérimentales démontrant que des protéines F-box spécifiques sont impliquées dans une multitude d'activités, telles que les réponses hormonales, la défense contre des pathogènes, la division cellulaire ou encore le développement floral et la viabilité du pollen (Lechner et al. 2006 ; Shiu et Bleekert, 2001 ; Dharmasiri et al., 2005 ; Gusti et al., 2009 ; Santner et Estelle 2010 ; Zhao et al., 2012). La plupart des cibles des complexes SCF ont besoin d'être phosphorylées avant d'être reconnues par la F-box (Jackson et al., 2000). En conséquence, on peut penser que le rôle d'un bon nombre de protéine kinase de plantes est de moduler la reconnaissance des cibles par les protéines F-box, reliant ainsi des deux superfamilles de protéines dans la régulation protéolytique.

1.3.3.2.1.3 Le complexe VBC

Le complexe VBC est constitué de plusieurs sous-unités, dont trois sont à l'origine de son nom : la protéine VHL (« Von Hippel Lindau »), et les protéines Elongine B et C (Kamura et al., 1999). Dans le cas du complexe VBC, le rôle de charpente moléculaire du complexe n'est pas assuré par la CULLINE 1 mais par la CULLINE 2 ou 5. La partie C-terminale des CULLINE 2 ou 5 interagit avec RBX1 alors que du côté N-terminal, les protéines Elongine B et C prennent la place de la protéine SKP1. L'Elongine C établit la liaison avec la CULLINE alors que l'Elongine B établit une liaison avec la protéine VHL via un domaine appelé SOCS-box (« Suppressor Of Cytokine Signalling protein »). Le rôle de VHL peut être assimilé à celui des « F-box » du SCF, en recrutant les substrats cibles (**Figure 5**).

Contrairement aux autres complexes E3 ligases, le complexe VBC a été décrit uniquement chez les animaux. De plus, alors que l'on dénombre plus de 50 protéines à domaines « F-box » chez les animaux, une seule protéine VHL a été identifiée.

1.3.3.2.1.4 Le complexe CUL3-BTB ou CRL3

Le complexe CUL3-BTB est basé sur la CULLINE3 la plus conservée parmi tous les génomes eucaryotes. A nouveau, le module catalytique RBX1 interagit avec l'extrémité C-terminale de CUL3. La partie N-terminale interagit avec la protéine BTB/POZ « Bric-a-brac ; Tamtrack and Broad Complex/Pox Virus et Zing Finger » qui est décrit comme le module de reconnaissance spécifique des cibles du complexe (Furukawa et al., 2003 ; Xu et al., 2003 ; Pintard et al., 2003). Ces BTB possèdent un 2ème domaine d'interaction protéine-protéine, PID « Phosphotyrosine Interaction Domain » en amont et/ou en aval du domaine BTB. Des analyses de séquences ont mis en évidence 208 protéines à domaine BTB chez l'homme, seulement 3 chez la levure, 141 chez la drosophile et 80 chez *Arabidopsis thaliana*. Des études ont aussi permis d'identifier plus d'une douzaine de domaine protéiques différents qui peuvent s'associer, parfois en combinaison avec le domaine BTB (Stogios et al., 2005). Certaines protéines sont présentes dans tous les génomes eucaryotes comme les MATH « Metrin And Traf Homology domains, alors que d'autres sont spécifiques des métazoaires (comme les Kelch domaines) ou des plantes (comme le domaine NPH3) (Genschik et al., 2013). Il est à noter que seule une partie de toutes les protéines identifiées à domaines BTB servent d'adaptateurs au CRL3. Alors que la plupart des eucaryotes n'ont qu'un seul gène CULLINE3, *Arabidopsis thaliana* en compte 2 : *CUL3A* et *CUL3B* qui présentent 88% d'homologies (Figuroa et al., 2005). Du fait de cette forte conservation de séquences, les deux CUL3 d'*Arabidopsis* possèdent des fonctions redondantes. Il en résulte que, chez les plantes, on observe une létalité embryonnaire uniquement lorsque les deux gènes sont mutés (Thomann et al., 2005). De par la diversité des protéines BTB pouvant s'associer à la CUL3A ou CUL3B pour former un complexe CUL3-E3 ligase (Dieterle et al., 2005, Weber et al., 2005, Gingerich et al., 2005), les complexes CUL3-BTB sont forcément impliqués dans une multitude de rôles biologiques (Genschik et al., 2013). Parmi ces rôles, on peut citer la régulation de la biosynthèse de certaines hormones végétales et leur signalisation. En effet, le mutant nul *eto1* mais aussi une réduction de la fonction de CUL3 résultent tous deux en une stabilisation d'ACS5 (« ACC Synthase 5 »), une enzyme catalysant l'étape limitante dans la biosynthèse de l'éthylène (Wang et al., 2004 ; Thomann et al., 2009). En plus de ce rôle dans la régulation de la biosynthèse d'éthylène, les CRL3s sont aussi impliqués dans le contrôle de la signalisation de l'ABA (Abscissic acid). Le génome d'*Arabidopsis* code pour 6 membres

de la famille des MATH-BTB appelées (BPM1-6) (Weber et al., 2005), qui interagissent tous avec une sous-classe de facteurs de transcriptions à Homeobox-leucine zipper (HD-ZIP) (Lechner et al., 2011), incluant ATHB6, un régulateur négatif de la réponse ABA (Himmelbach et al., 2002). Le complexe CUL3-BPM agit sur l'ubiquitinylation et le turn-over d'ATHB6, mais ce processus est ralenti en présence d'ABA, affectant certaines réponses de l'ABA, particulièrement lors de la fermeture des stomates (Lechner et al., 2011).

1.3.3.2.1.5 Le complexe CUL4-DDB1 ou CRL4

Ce complexe E3 est architecturé autour de la CULLINE 4, protéine conservée au cours de l'évolution, dont plusieurs orthologues se retrouvent dans différentes espèces. Chez *Saccharomyces pombe*, *Cearnobditiselegans*, *Drosophila* et *Arabidopsis*, un seul gène code pour CUL4 tandis que chez les mammifères, on retrouve deux paralogues *CUL4A* et *CUL4B*, possédant 80% d'identité. Ceci entraîne des difficultés dans les analyses génétiques menant à la caractérisation fonctionnelle du gène *CUL4*. Chez la souris, selon la région délétée du gène *CUL4A* on observera une létalité embryonnaire ou non. D'autant plus que *CUL4B* peut dans certains cas compléter ce phénotype. *CUL4A* et *CUL4B* peuvent ainsi avoir des fonctions redondantes (Kopanja et al., 2011), cependant *CUL4B* participe à l'inactivation du chromosome X chez l'homme. Plusieurs patients présentant une déficience mentale, liée à l'inactivation du chromosome X, ont des mutations dans le gène *CUL4B* (Zou et al., 2007, Tarpey et al., 2007, 2009).

Les E3 ligases contenant la protéine CUL4 forment la grande famille des CRL4 (« Cullin4-Ring E3 Ligase ») structurée autour de trois sous-unités principales (**Figure 6**): CUL4, le cœur du complexe, ROC1/RBX1, la protéine à domaine RING-Finger et DDB1 « Damaged DNA Binding protein 1 », protéine hautement conservée, d'environ 130 kDa. DDB1 est un adaptateur du substrat (Bernhardt et al. 2006, Chen et al., 2006 ; Lee et al., 2008 ; Wang et al., 2008 ; Zhang et al., 2008). La protéine CUL4 interagit avec ROC/RBX1 via son extrémité C-terminale. RBX1 va alors recruter l'enzyme E2 portant l'ubiquitine active afin de former un module catalytique. L'architecture même du complexe CRL4 se modifie afin de positionner la protéine cible en regard de l'enzyme E2 et faciliter ainsi le transfert de l'ubiquitine sur le substrat (Zheng et al., 2002 ; Angers et al., 2006 ; Li et al., 2006). L'extrémité N-terminale, quant à elle, fixe la sous-unité DDB1. Grâce à des études cristallographiques, plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine ont pu être mis en évidence (Scrima et al., 2008).

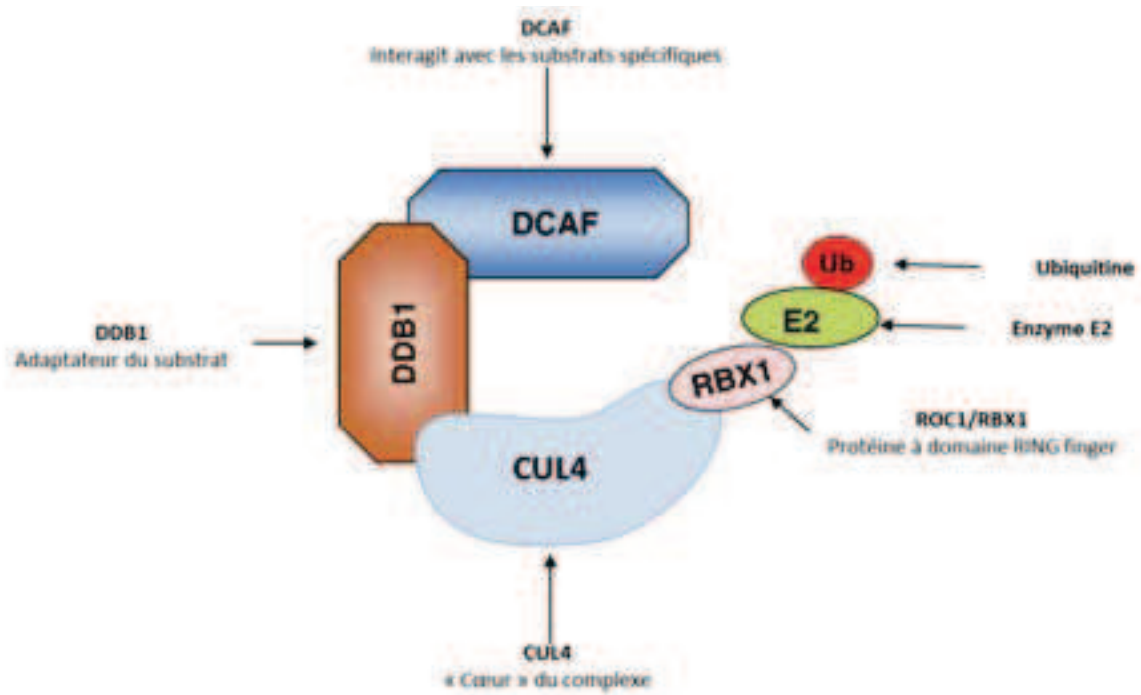


Figure 6 : Architecture des complexes CUL4-DDB1

Le complexe CUL4 comprend trois sous-unités de base. Comme les autres membres de la famille des CULLINES, la partie C-terminale de CUL4 interagit avec une petite protéine à domaine « RING-finger », qui recrute l'enzyme E2, RBX1, alors que la partie N-terminale de CUL4 se lie à la sous-unité DDB1 « Damaged DNA Binding protein 1 ». DDB1 est capable d'interagir avec une large variété de protéines appelées DCAF « DDB1 CUL4 Associated Factor », servant de récepteur et recrutant les protéines cibles qui vont être ubiquitinylées (Adapté de Sugawara, 2009).

Parmi ces domaines, l'un est capable d'interagir avec CUL4 et l'autre avec des protéines à domaine WD40. Des analyses protéomiques puis bioinformatiques ont permis d'identifier des protéines appelées DWD « DDB1-binding WD40 » ou DCAF « DDB1-CUL4-associated factors » (Lee et al., 2008). Une grande partie de ces DCAF renferment un ou deux domaines WD40 se terminant par WDxR, qui participent à leur reconnaissance par DDB1. Il a été montré à plusieurs reprises par des expériences de mutagenèse que le résidu arginine de ce motif est nécessaire, mais pas suffisant, à la mise en place de l'interaction (Angers et al., 2006).

Arabidopsis thaliana possède tous les gènes codant pour le complexe CUL4. Chez les plantes, une mutation perte de fonction CUL4 entraîne une létalité embryonnaire, de même, qu'une simple réduction occasionne de nombreux défauts du développement (Bernhardt et al., 2006 ; Chen et al., 2006 ; Dumbliauskas et al., 2011). A la différence des mammifères, *Arabidopsis thaliana* possède deux paralogues nommés *DDB1a* et *DDB1b*. Comme dans le cas d'un mutant nul *cul4*, une double mutation affectant le gène *DDB1a* et le gène *DDB1b* résulte également en une létalité embryonnaire. A ce jour, on compte plus d'une centaine de protéines à domaine WD40 chez *Arabidopsis*. Leur alignement a permis d'identifier un ou deux motifs conservés de 16 acides aminés appelé « DWD-box ». Ce motif participe à l'interaction avec DDB1 formant ainsi le module de reconnaissance spécifiques des substrats (Lee et al., 2008 ; Zhang et al., 2008). Toutes ces données suggèrent l'existence *in vivo* d'une grande variété de complexes CUL4-DDB1^{DCAF/DWD}-E3 ligases, pouvant être impliqués dans une multitude d'aspects du développement des organismes qui seront abordés dans le chapitre III : Rôles des complexes CUL4-DDB1^{DCAF}.

II. Les mécanismes de régulation de la protéolyse ubiquitine-dépendante

1. La reconnaissance et la dégradation par le protéasome 26S

1.1 La Monoubiquitinylation

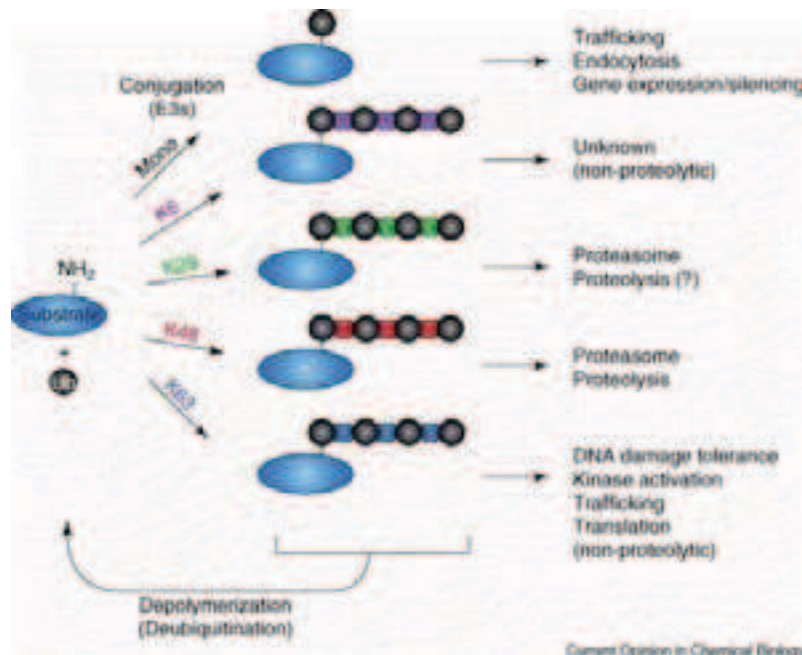


Figure 7 : Les différentes chaînes d'ubiquitine et leurs fonctions

Un code couleur a été assigné entre les molécules d'ubiquitine et les différents types de chaînes d'ubiquitine/polyubiquitines formées. La position de la lysine par rapport à l'ubiquitine servant à construire la chaîne est indiquée sur les flèches à gauche. A droite, les fonctions correspondantes aux différentes chaînes de polyubiquitines sont indiquées (d'après Pickart et Fushman, 2004).

Dans la plupart des cas décrits, l'ubiquitine modifie un résidu lysine interne de la protéine cible. De récentes études ont montré que l'ubiquitine pouvait être conjuguée sur d'autres résidus comme une liaison ester sur une sérine ou une thréonine mais aussi par une liaison thio ester sur le groupe –SH d'une cystéine (Cadwell et Coscoy, 2005 ; Vosper et al., 2009). Dans certains des cas cités, l'ubiquitinylation sur un résidu autre qu'une lysine a été forcée par la mutation de toutes les lysines du substrat, suggérant que la lysine reste le résidu préféré de l'ubiquitine, mais que d'autres résidus peuvent être ubiquitinylés. L'ubiquitine peut aussi modifier le groupe α -NH₂ de la région N-terminale de la protéine cible.

La monoubiquitinylation a été décrite dans la gestion du trafic cellulaire, l'endocytose ainsi que dans l'expression ou le « silencing » des gènes (**Figure 7**).

Chez *Arabidopsis thaliana*, la monoubiquitinylation de l'histone H2B est la plus étudiée. Cette monoubiquitinylation est aussi une marque épigénétique associée globalement à la chromatine active appelée CS1 (Grimanelli et Roudier, 2013). Les marques H2BUb comme les modifications H3K9me3 et H3K36me3 sont distribuées tout le long des gènes transcrits et sont vraisemblablement associées à l'élongation de la transcription. Elles influent sur la capacité des gènes à moduler leur expression durant la photomorphogenèse (Bourbousse et al., 2012), mais aussi sur la régulation de la composition de la cuticule en jouant sur le remodelage de la chromatine (Menard et al., 2014). Certaines études tendent à penser que chez *Arabidopsis*, à l'image de la drosophile et des mammifères, l'histone H2A est monoubiquitinylée par le complexe PRC1 « Polycomb Repressive Complex 1 » et plus particulièrement par AtBMI1A/B et RING 1A/B, sous-unités du PRC1, pour stabiliser les marques répressives H3K27me3, et joue un rôle dans le maintien de l'identité cellulaire en assurant une répression transcriptionnelle stable (Molitor and Shen, 2013 ; Calonje et al., 2014).

1.2 La Polyubiquitinylation

La chaîne la plus étudiée est celle qui s'établit entre la glycine terminale et la Lys 48 de l'ubiquitine. Les substrats portant cette chaîne sont reconnus par le protéasome 26S et participent à leur dégradation. Les chaînes de polyubiquitine à partir de la Lys63 sont également très étudiées. Cependant, à la différence des chaînes ubiK48, elles ne constituent pas un signal de dégradation mais participent plutôt à des processus tels que la réparation

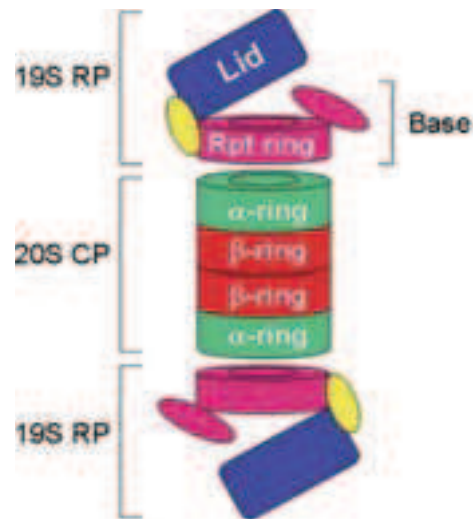


Figure 8 : Les sous-unités du protéasome 26S

Le protéasome 26S est constitué d'un complexe catalytique principal 20S central, et de deux sous-unités 19S entourant ce complexe catalytique. Le complexe 20S est composé de quatre anneaux de 7 sous-unités α (vert) ou β (rouge), à l'intérieur desquels la protéolyse a lieu. Le complexe 19S ou coiffe, est formé de deux parties différentes appelées base (violet) et couvercle (bleu) qui permettent la reconnaissance et la dénaturation des protéines cibles polyubiquitinylées (d'après Xie et al., 2010).

post-répliquative de l'ADN, l'endocytose ou la régulation de la traduction. Les chaînes formées à partir des Lys6 ou Lys29 sont moins étudiées et leurs rôles exacts restent encore à définir. Ces chaînes de polyubiquitinylation suivent la même cascade enzymatique E1, E2 et E3. Il est à noter que le type de liaison semble être défini par l'enzyme E2, expliquant ainsi le nombre important de ces enzymes chez les eucaryotes.

1.3 Le protéasome 26S

Une fois ubiquitinylées, les protéines sont dirigées vers le protéasome 26S, où elles sont dégradées. Afin d'être reconnues par celui-ci, les protéines cibles doivent porter au moins 4 résidus d'ubiquitine à partir de la Lys48 (K48 sur la **figure 7**) pour permettre la dégradation des substrats.

1.3.1 Composition du protéasome 26S

Chez les eucaryotes, le protéasome 26S est un complexe de 2 MDa, à activité protéolytique (Smalle et al., 2004) (**Figure 8**). Il est composé d'un complexe 20S ou CP « Core Particle » et d'un complexe 19S comportant deux parties distinctes : la base « Base », formée de six sous-unités, et le couvercle « Lid » formé de 9 protéines, le tout est aussi appelé « coiffe ». Le couvercle est responsable de la reconnaissance et de la déubiquitinylation de la protéine cible, tandis que la base permet de dénaturer le substrat afin de lui permettre de rentrer dans le tunnel central du complexe 20S. Celui-ci est composé de quatre anneaux de sept sous-unités chacun, deux anneaux externes formés de sous-unités de type α , et deux anneaux internes formés de sous-unités de type β . Le protéasome 26S se dessine alors en un tunnel renfermant l'activité protéolytique. Les protéines cibles y sont dégradés en peptides de taille variable (Glickman et al., 1998 ; Glickman et Ciechanover, 2002).

1.3.2 Le mécanisme de dégradation par le 26S

L'activité protéolytique située dans la partie 20S étant difficile d'accès, les protéines cibles doivent être reconnues et modifiées afin de faciliter leur pénétration dans le tunnel. Ce rôle est tenu par la coiffe via les sous-unités RPN1 « Regulatory Particle Non-ATPase » et RPN10 du couvercle qui peuvent se lier à l'ubiquitine et seraient capable de reconnaître ainsi les chaînes

de polyubiquitines (Elsasser et al., 2002). Les sous-unités RPN11 et RPN13 vont alors déubiquitinyler les cibles (Verma et al., 2002 ; Yao et Cohen, 2002). Le substrat est ainsi linéarisé, seule forme à pouvoir se faufiler entre les sous-unités α du complexe 20S (Groll et al., 1997). Cette action nécessite la dénaturation du substrat, ce qui pourrait être le rôle de la « base » (Braun et al., 1999). L'entrée dans le tunnel est quand-à-elle encore mal comprise. La protéine, une fois entrée, est réduite en peptides de taille variable. L'hydrolyse des protéines cibles est réalisée grâce aux différentes activités protéolytiques (chymotrypsine, « peptidylglutamyl peptide hydrolyzing », trypsine) du complexe 20S (Rivett, 1989). Le mécanisme de relargage des peptides générés reste inconnu à ce jour.

2. La régulation de la réaction d'ubiquitylation

Faisant intervenir un nombre important de partenaires, la voie de l'ubiquitylation nécessite une régulation complexe pouvant se faire à différentes étapes, au niveau de la cascade enzymatique mais aussi dans la régulation de la dégradation des protéines cibles après leur ubiquitylation.

2.1 Régulation des principaux acteurs de l'ubiquitylation

Toutes les enzymes de la cascade enzymatique déterminent l'ubiquitylation des substrats à l'exception de l'enzyme E1 qui est constitutivement active. Cette régulation intervient au niveau de la transcription des gènes *E2* ou *E3* mais aussi au niveau des modifications post-traductionnelles de ces enzymes, de leur association avec d'autres protéines régulatrices ou bien encore lors d'un changement de leur localisation subcellulaire.

i- Dans le cas de la régulation transcriptionnelle, la protéine à domaine « F-box » humaine du complexe SCF^{SKP2} est un bon exemple. Ce gène présente une régulation transcriptionnelle cycle cellulaire dépendante et les transcrits s'accumulent à la transition G1/S. Une des cibles du complexe SCF^{SKP2} est l'inhibiteur p27 de l'activité kinase cycline dépendante CDK (**Figure 13**). L'ubiquitylation de p27 puis sa dégradation par le protéasome permettra l'activation de la CDK en G1/S (Liu et al., 2004 ; Zhao et al., 2003). Chez les plantes, les 21 gènes *ASK* présentent une expression spatio-temporelle différentielle au cours du développement et peuvent ainsi servir d'exemple de ce type de régulation.

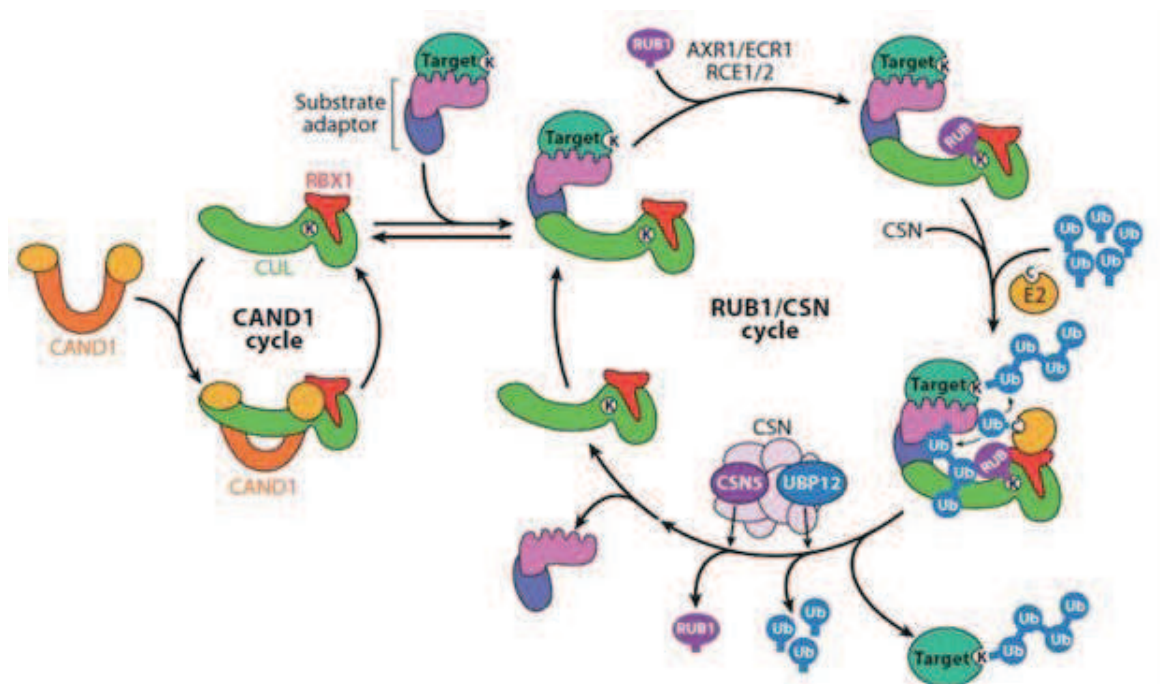


Figure 9 : Régulation des E3 ligases de type CRL.

L'activité des complexes CRL est régulée par CAND1 et la RUBylation/dé-RUBylation de la sous-unité culline (CUL) par RUB1-CSN. Le premier cycle appelé CAND1 décrit la dynamique des protéines cullines séquestrées en partie par la protéine CAND1. La protéine CAND1 s'enroule autour du complexe CUL/RBX1 en bloquant ainsi les extrémités N- et C-terminales indispensables pour échauffer un complexe CRL actif. Le deuxième cycle appelé RUB1/CSN illustre l'activation du complexe CRL par sa RUBylation. Les adaptateurs (ou récepteurs) de substrats recrutent spécifiquement leurs cibles puis s'associent à un pool de protéine culline pour les soustraire au cycle CAND1. Grâce à l'action des enzymes E1 (AXR1/ECR1), E2 (RCE1/2) et E3, RUB1 est attachée sur une lysine (K) à l'extrémité C-terminale de la sous-unité culline activant ainsi le complexe CRL. L'ubiquitinylation du substrat peut alors avoir lieu. Au cours de ce processus, les 8 sous-unités du complexe COP9/Signalosome (CSN) s'associent également au complexe CRL. L'action de dé-RUBylation par CSN5 et de dé-ubiquitinylation par UBP12 ; une dé-ubiquitinase, permet le recyclage des protéines RUB1, Ub et des récepteurs de substrats. Cette dissociation permet à la protéine culline associée à RBX1 de ré-intégrer le cycle CAND1 (Adapté de Hua et Vierstra, 2011).

ii- Parmi les modifications post-traductionnelles des complexes E3 ligases, on peut citer la protéine CDH1, activatrice de l'APC/C. Lorsque celle-ci est phosphorylée par l'activité CDK, le complexe APC/C^{CDH1} est inactif. Elle ne pourra se lier au complexe que si elle est préalablement déphosphorylée par la phosphatase CDC14 (Zachariae et al., 1998).

iii- La relocalisation de certains complexes E3 ligases peut aussi influencer la dégradation des substrats. L'enzyme E3 ligase MDM2 ne reconnaît sa protéine cible MDMX que lorsque celle-ci est localisée dans le noyau. La protéine MDMX, un régulateur de P53, est normalement localisée dans le cytoplasme. En cas de lésions de l'ADN, MDMX est phosphorylée, et de ce fait est re-localisée dans le noyau. MDM2 va alors l'ubiquitinyler et la diriger vers le protéasome, lieu de sa dégradation (LeBron et al., 2006).

iiii- L'activité des E3 ligases de types CRL est régie par l'état de neddylation/rubylation. La protéine NEDD8/RUB1 est conjuguée sur un résidu lysine conservé à l'extrémité C-terminale des Cullines par un mécanisme similaire à celui de l'ubiquitinylation. Il implique l'action en cascade de 3 types d'enzymes : E1, E2 et E3-like. RUB1 est activée par l'hétérodimère AXR1-ECR1 et sa conjugaison se fait par l'enzyme E2-like, RCE1 chez *Arabidopsis thaliana*. La fixation de RUB1 sur la Culline est facilitée par la sous-unité RBX1, agissant comme une E3-like (Gray et al., 2002) (**Figure 9**). La régulation de l'ubiquitinylation est aussi assurée par un autre régulateur des E3, le complexe COP9 signalosome (CSN), découvert chez les plantes en tant que répresseur de la photomorphogenèse (Hardtke et Deng, 2000). Ce complexe catalyse le clivage entre la Culline et les protéines NEDD8/RUB1, entraînant une inhibition du complexe E3 (Lyapina et al., 2001). Le signalosome aurait un autre rôle de protection des sous-unités des complexes en l'absence de leurs substrats (Schwechheimer, 2004) présentant ainsi un rôle antagonisme entre les deux activités.

iiiii- Un dernier type de régulation de l'activité des complexes E3 repose sur l'identification d'un récepteur de l'auxine : la protéine « F-box » TIR1 (Dharmasiri et al., 2005). Il s'agit du premier exemple de régulation d'une E3 ligase par fixation d'une molécule « signal » directement sur le complexe SCF^{TIR1} pour l'activer. La présence d'auxine stimule ainsi la dégradation des répresseurs Aux/IAA et permet l'expression des gènes régulés par les facteurs de transcription ARF (Dharmasiri et al., 2005, Tan et al., 2007).

2.2 Régulation par modification du substrat

De nombreux substrats de la voie d'ubiquitinylation doivent être modifiés pour être reconnus par les enzymes ubiquitine E3 ligase. La modification la plus couramment rencontrée est la phosphorylation notamment pour les substrats reconnus par le complexe SCF. On peut citer le cas de l'inhibiteur SIC1 des complexes cycline/CDK, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire chez la levure. Lors de la transition G1/S, l'inhibiteur SIC1 est phosphorylé sur plusieurs résidus et devient ainsi un substrat pour le complexe SCF^{CDC4} (Verma et al., 1997 ; Sedgwick et al., 2006).

A l'inverse, la phosphorylation peut aussi protéger le substrat en bloquant sa reconnaissance par l'enzyme E3. C'est le cas notamment d'ACS5, une enzyme clé de la biosynthèse de l'éthylène chez *Arabidopsis* (Wang et al., 2004 ; Christians et al., 2009).

Le contrôle de la reconnaissance des substrats peut aussi se faire grâce à d'autres modifications post-traductionnelles, telles que la N-glycosylation ou l'hydroxylation de certains acides aminés. La N-glycosylation intervient dans le transport réticulo-endoplasmique et l'hydroxylation intervient dans la dégradation du facteur de transcription HIF1 α (Kim et Kaelin. 2003 ; Yoshida et al., 2006).

2.3 Régulation par déubiquitinylation

Tout comme les animaux et les levures, les plantes contiennent une famille de DUB (Weissmann, 2001 ; Wing, 2003). Ces enzymes génèrent des molécules d'ubiquitine libres à partir des produits initiaux, recyclent les Ubiquitines durant la conjugaison de l'ubiquitine, et/ou inversent les effets de l'ubiquitinylation. Chez *Arabidopsis thaliana*, au moins 30 gènes ont été identifiés comme codant pour des potentiels DUB. Cette collection inclut deux ubiquitine carboxy terminal hydrolase (UCH) qui utilisent trois résidus catalytiques formés d'une cystéine, une histidine et un acide aspartique, 27 protéases ubiquitine spécifiques et la sous-unité RPN11, contenue dans le « couvercle » du protéasome 26S (Yan et al., 2003). Elles reconnaissent la partie proximale de l'ubiquitine et enlèvent tous les acides aminés ou peptide qui sont attachés à la partie C-terminale de la glycine. Les DUB sont impliqués dans plusieurs

processus chez les animaux et les levures, suggérant que ces enzymes ont des cibles spécifiques. Une possibilité intéressante serait que certaines de ces DUB pourraient aussi réguler la demi-vie des protéines en inversant la réaction d'ubiquitylation. Deux familles de DUB d'*Arabidopsis thaliana* présentent des rôles dans la réparation des dommages aux protéines (*AtUBP1* et *AtUBP2*) (Yan et al., 2003), mais aussi dans le recyclage des chaînes d'ubiquitine libre (*AtUBP14*) (Doelling et al., 2002). De récentes études ont permis de montrer que UCH1 et UCH2, les 2 ubiquitine carboxy terminale hydrolase d'*Arabidopsis thaliana* pouvaient participer à la réponse à l'auxine (Yang et al., 2004).

III. Rôles des complexes *CUL4-DDB1*^{DCAF}

Les analyses *in silico* ont permis d'identifier 119 protéines à motif DWD (pour 297 protéines à domaine WD40). A ce jour, la majorité de ces DCAF n'ont pas encore de fonctions connues chez *Arabidopsis* (Guo et al., 2013). Dans ce chapitre, je vais décrire les fonctions majeures attribuées au complexe CUL4 dans les modèles animaux et plantes :

- participation au processus de reconnaissance et de réparation de l'ADN après mutation par les UV, décrit comme le rôle historique de CUL4)
- rôle régulateur dans la photomorphogenèse
- rôle régulateur du cycle cellulaire
- rôle dans les fonctions chromatinienne

D'autres rôles ont été décryptés pour certaines DCAF notamment dans la réponse au stress impliquant la voie de signalisation par la phytohormone ABA « Abscissic Acid ». Ces résultats ne sont pas décrits dans ce manuscrit.

1. Rôle dans la réparation de l'ADN

DDB1 et DDB2 sont des composants majeurs du complexe UV-DDB « Ultraviolet-Damaged DNA-Binding protein complex » initialement identifié dans des cellules humaines. Les lésions induites par les UV sont des dimères de pyrimidine ; les CPD (cyclobutane pyrimidinone dimer) sont produits majoritairement et les 6-4PP (6-4 pyrimidine-pyrimidone ;

Kunz et al., 2006) sont des photoproduits mineurs. Afin de contrer ces dommages, les plantes et une majorité des métazoaires mettent en œuvre deux mécanismes différents de réparation :

1 - La photoréactivation est catalysée par des photolyases qui utilisent l'énergie de la lumière grâce à un chromophore sensible au spectre UV-A et bleu. Ce système de réparation rapide assure une conversion des dimères de pyrimidine en monomères de manière efficace sans passer par une étape d'excision du brin d'ADN (Jiang et al., 1997 ; Nakajima et al., 1998 ; Sancar et al., 2004). Ce mécanisme existe chez les plantes et les animaux à l'exception des mammifères placentaires qui n'utilisent que la voie NER.

2 - La voie de réparation appelée NER pour « Nucleotide Excision Repair » fonctionne indépendamment de la lumière et nécessite l'intervention de plus de trente protéines pour éliminer les lésions de l'ADN (Schuck et al., 2008). Cinq étapes successives ont été décrites dans cette voie de réparation : la reconnaissance de la lésion, puis l'ouverture de pré-incision, l'excision sur le brin endommagé d'un segment de plusieurs nucléotides encadrant la lésion, la polymérisation et pour finir la ligation du nouveau brin synthétisé. Plusieurs mutations affectant différents composants de la voie de réparation NER ont été décrites chez l'homme conduisant à des maladies autosomales récessives. Par exemple, les patients atteints d'une maladie rare appelée Xeroderma pigmentosum (XP), qui résulte d'un défaut dans ce processus de réparation, présentent une hypersensibilité aux UV et ont une forte prédisposition à développer un cancer de la peau induit généralement par les rayonnements solaires.

Dans cette voie de réparation NER, on distingue généralement deux mécanismes qui opèrent différemment dans la reconnaissance de la lésion ;

1. La voie de réparation TCR ou « Transcription Coupled Repair » agit dans les zones transcrites du génome via une action sur l'ARN polymérase II.

2. La voie de réparation GGR ou « Global Genome Repair » scanne les régions non transcrites du génome. Dans ce cas, les lésions sont reconnues par un mécanisme de surveillance qui fait intervenir les complexes DDB1-DDB2 et XPC-RAD53 qui recrutent les protéines essentielles à l'initiation de la réparation. Le complexe DDB1-DDB2 agit essentiellement dans la reconnaissance des dimères de pyrimidine *in vivo*. De fait, des cellules déficientes en DDB2 présentent une réduction importante de leur capacité à réparer des

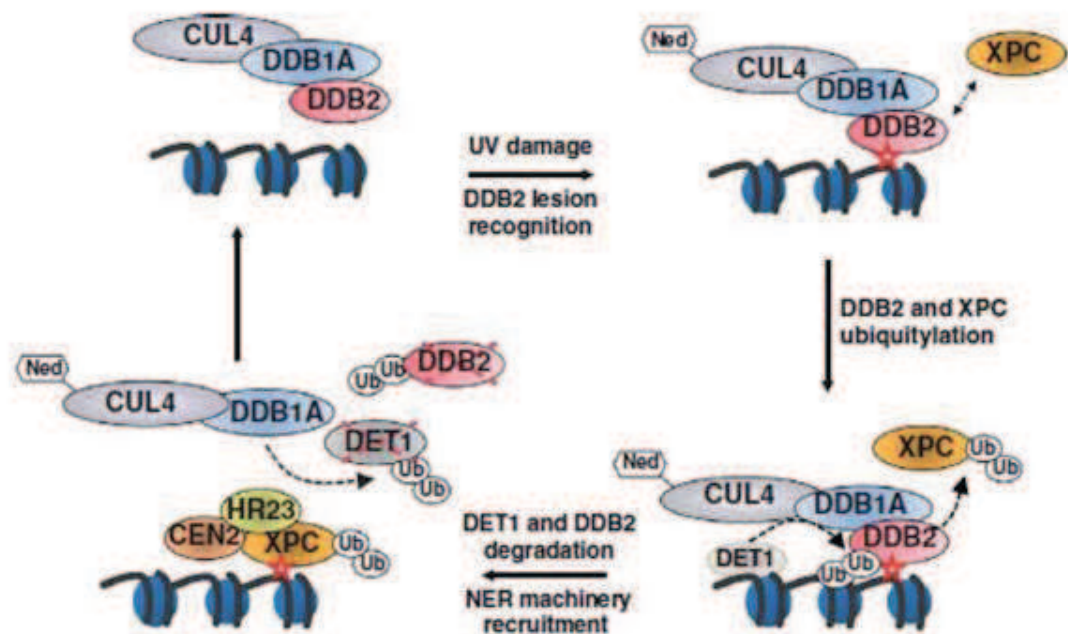


Figure 10 : Mécanisme de réparation de l'ADN chez les plantes suite à un stress UV.

La protéine DDB2 reconnaît et se lie spécifiquement aux photoproduits générés par les UV (indiqués avec une étoile rouge) entraînant le complexe CUL4 activé par Neddylaton/Rubylation sur le site endommagé de l'ADN. Chez les animaux, XPC est recrutée puis poly-ubiquitinylée par le complexe CUL4-DDB1^{DDB2}, afin d'améliorer sa liaison à l'ADN sur le site endommagé. La protéine DDB2 est elle-même ubiquitinylée puis dégradée par un mécanisme CUL4-DDB1 et DET1 dépendant. DET1 est un interactant de DDB1 et devient à son tour une cible du complexe E3 ligase CUL4-DDB1 pour la poly-ubiquitinylation puis sa dégradation. La protéolyse de DDB2 et DET1 implique leur éviction de la chromatine facilitant ainsi le recrutement de la machinerie NER, qui est initié par la liaison au facteur XPC-HR23-CEN2 (ou RAD4-RAD23-CEN2 chez les plantes) au site de la lésion. Il a été montré que DET1 est capable de se lier à l'histone H2B. Cependant son mode d'action reste à déterminer (Castells et al., 2011).

lésions de type CPD. De plus, l'origine de la maladie de patients atteints de Xeroderma pigmentosum (XP-E) est due à une mutation ponctuelle du gène DDB2 (Rapic-Otrin et al., 2003). DDB2 possède à la fois un domaine de liaison à l'ADN et un domaine WD40 portant le motif WDxR caractéristique des DCAF. *In vivo*, DDB1-DDB2 est associé au complexe CUL4A-RBX1 et CUL4B-RBX1. D'un point de vue mécanistique, la protéine DDB1 agit comme adaptateur capable de lier l'enzyme E3 ligase (CUL4) à un module de détection de photoproduits induits par les UV (DDB2). Ainsi le complexe spécialisé dans la reconnaissance de dimères de pyrimidine est également doté d'une activité E3 ubiquitin ligase. Ces observations ont permis d'établir un lien entre la protéolyse ubiquitine/protéasome-dépendante et la réparation NER dans les cellules humaines (Groisman et al., 2003).

La cible du complexe CUL4-DDB1^{DDB2} est une protéine essentielle à l'initiation de la réparation, appelée XPC (« Xeroderma Pigmentosum Complementation group C »). Lorsque l'organisme est soumis à des irradiations de type UV, l'activation du complexe CUL4^{DDB2} entraîne l'ubiquitylation non seulement de XPC mais également du module DDB2. L'ubiquitylation des histones H2A, H3 et H4 à proximité de la lésion décelée par le complexe CUL4^{DDB2} a également été reportée (Kapetanaki et al., 2006). L'ubiquitylation du récepteur DDB2 entraîne son détachement de l'ADN puis sa dégradation via le protéasome (El-Madhy et al., 2006). A l'inverse, la polyubiquitylation de la protéine XPC n'affecte en rien sa capacité de liaison à l'ADN et la protéine semble même protégée de la dégradation par le protéasome, probablement grâce à son association avec RAD53 (Wang et al., 2004). On peut donc conclure que le module XPC-RAD53 requiert l'assistance du complexe DDB1-DDB2 pour localiser les dimères de pyrimidine sur la chromatine et pour permettre son recrutement sur les lésions de manière ubiquitine-dépendante. Le mécanisme moléculaire qui opère lors de l'échange intermoléculaire n'est cependant pas bien compris. La mono-ubiquitylation des histones H2A, H3 et H4 dans ce processus de réparation est également un élément important. L'ubiquitylation *in vitro* des histones par le complexe CUL4^{DDB2} a montré une instabilité du nucléosome pouvant aboutir à une perte partielle d'histones. Ce mécanisme est supposé favoriser le recrutement de la machinerie de réparation NER en affectant la structure de la chromatine (Wang et al., 2006 ; **Figure 10**).

Lorsque l'organisme ne subit pas d'irradiation aux UV, le complexe CUL4^{DDB2} est maintenu inactif sous sa forme dé-neddylée et par son association avec le complexe COP9 signalosome (complexe CSN). Cette association est immédiatement rompue par un mécanisme encore inconnu dès l'exposition aux UV engendrant la neddylation donc l'activation du complexe CUL4^{DDB2}.

Alors que le complexe CUL4-DDB1^{DDB2} est impliqué dans la reconnaissance de lésions de type GGR, un complexe similaire où DDB2 est remplacée par la protéine à domaine WD40 et WDxR, CSA « Cockayne Syndrome A » est impliqué dans la reconnaissance de lésions de type TCR. Chez l'homme, l'altération de la fonction CSA entraîne une maladie similaire à Xeroderma pigmentosum, appelée Cockayne syndrome. Cette maladie entraîne non seulement une hypersensibilité aux UVs mais aussi une neurodégénérescence précoce (Bootsma et al., 1995, Cleaver et al., 2009). A la différence du complexe CUL4-DDB1^{DDB2}, le complexe CUL4-DDB1^{CSA} participe à la reconnaissance de la lésion sans former de lien direct avec l'ADN endommagé. Le complexe CUL4-DDB1^{CSA} reconnaît en partenariat avec CSB « Cockayne Syndrome B », l'ARN polymérase II dont la progression est stoppée par la lésion. La protéine CSB fonctionne comme une protéine de remodelage de la chromatine de la famille SWI/SNF. Les données expérimentales actuelles indiquent que la protéine CSB est le substrat du complexe CUL4-DDB1^{CSA}. Tous deux participent au recrutement des complexes de la voie de réparation NER et assurent le redémarrage de la transcription (Fousteri et al., 2006).

Chez *Arabidopsis thaliana*, on trouve des homologues de tous les gènes codant pour les sous-unités du complexe CUL4-DDB1^{DDB2}. Ce complexe peut s'assembler *in vivo* comme chez les animaux, et participe au maintien de l'intégrité du génome (Molinier et al., 2008). Un homologue de CSA a également été décrit chez *Arabidopsis*. Il intervient dans les processus de réparation de l'ADN (Biedermann et Hellmann, 2010).

2. Rôle dans la photomorphogenèse

La lumière est une source d'énergie, indispensable à la croissance des végétaux. Elle est également considérée comme un facteur environnemental régulant, de différentes manières, le développement des plantes. En effet, les plantules qui poussent en présence de lumière possèdent une morphologie très différente de celles qui se développent à l'obscurité. Une

plantule qui se développe à l'obscurité est étiolée, c'est-à-dire dépourvue de chlorophylle. Lorsqu'elle germe à l'obscurité, l'hypocotyle est très allongé et les cotylédons ont l'allure d'un crochet ; ce type de morphogenèse est appelé skotomorphogenèse. Par contre, une plantule qui se développe à la lumière présente un hypocotyle court et un verdissement des feuilles, on parle alors de photomorphogenèse (**Figure 11**) Ainsi la lumière module l'expression d'une grande variété de gènes, comme les gènes de la photosynthèse. Ces réponses des plantes à la lumière ont servi de base pour des cribles génétiques réalisés avec *Arabidopsis*. Ainsi des mutants présentant un hypocotyle allongé à la lumière sont appelés hy « pour hypocotyle », tandis que des mutants dont l'hypocotyle est court à l'obscurité et dont les chloroplastes sont bien formés sont appelés *cop* « constitutive photomorphogenesis » ou *det* « de-etiolated » ou encore *fus* (pour *fusca*) (Strickland et al., 2006).

Les protéines issues de la famille des gènes *COP/DET/FUS* appartiennent à trois complexes majeurs, impliqués dans l'ubiquitylation et la dégradation de régulateurs positifs de la photomorphogenèse (Osterlund et al., 2000 ; Holm et al., 2002 ; Yi et Deng, 2005). Ces complexes sont : le COP9 signalosome (CSN), le complexe COP1 et le complexe CDD « COP10, DDB1A et DET1 ».

COP1, caractérisée la première fois chez *Arabidopsis*, comme étant un régulateur négatif de la photomorphogenèse des plantes, est une RING E3 ligase de 76kDa contenant trois domaines d'interactions protéine-protéine : une région N-terminale RING-finger, un domaine coiled-coil et une répétition de 7 WD40 en sa région C-terminale. COP1, en tant qu'ubiquityne E3 ligase, peut ubiquityler des facteurs permettant l'initiation de la photomorphogenèse (Saijo et al., 2003 ; Yi et Deng, 2005). Parmi lesquels, au moins quatre facteurs de transcription : HY5 « Long Hypocotyl 5 », HYH « HY5 homologue », LAF1 « Long After Far-red light 1 » et HFR1 « long Hypocotyl in Far-Red 1 ». Par exemple, en condition d'obscurité, COP1 sera localisé dans le noyau et va ubiquityler HY5 afin de permettre sa dégradation par le protéasome 26S et réprimer ainsi la photomorphogenèse (**Figure 12**). De plus COP1 est une DCAF qui s'associe également avec le complexe CUL4-DDB1 (Lau et Deng, 2012). DET1 est un autre régulateur dans cette voie, dont la mutation chez *Arabidopsis* conduit à un phénotype de photomorphogenèse à l'obscurité (Pepper et al., 1994). Chez les animaux, DET1 régule l'ubiquitylation conduisant à la dégradation du facteur de transcription c-jun (Wertz et al., 2004). Chez les plantes, une interaction génétique entre COP1 et DET1 a pu être

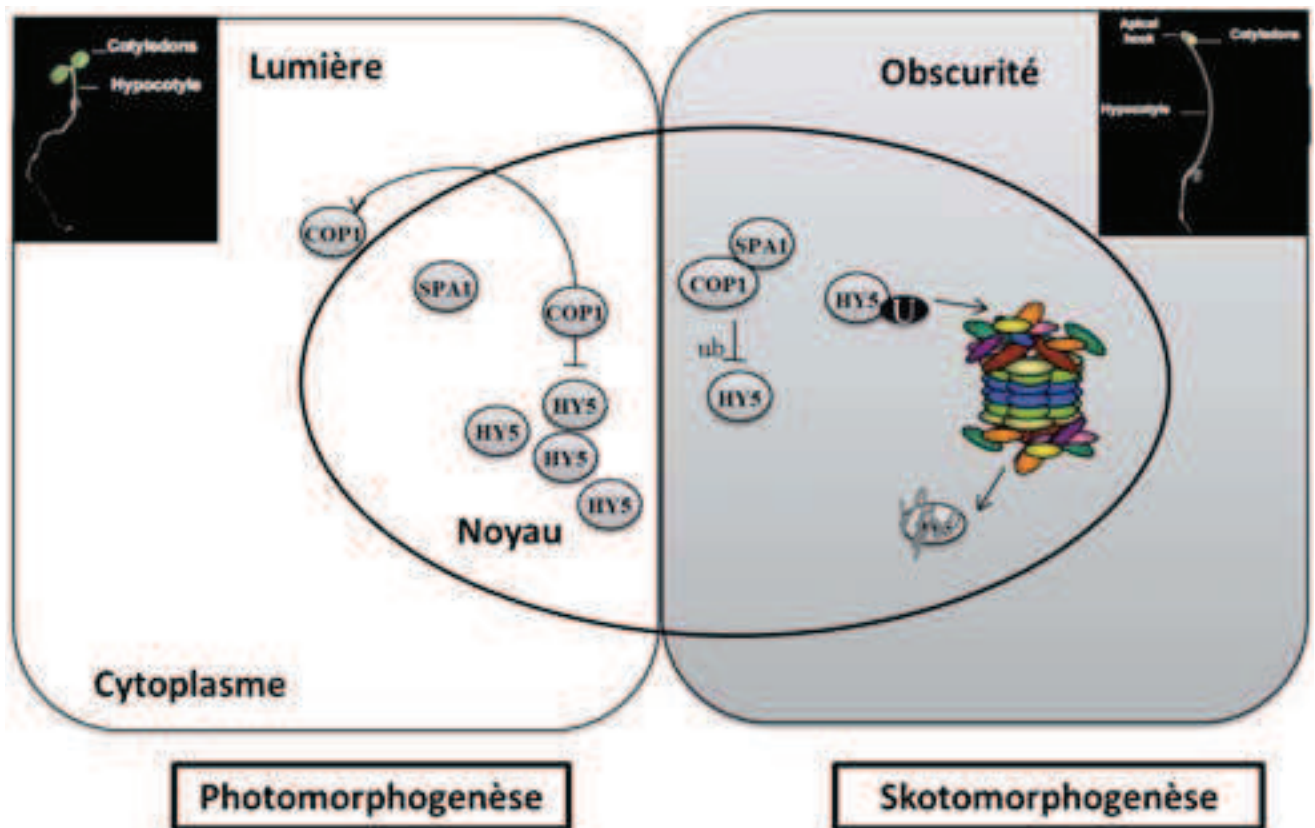


Figure 11 : Modèle simplifié de la photomorphogénèse chez les plantes.

En condition d'obscurité, COP1 « Constitutive Photomorphogenic 1 »/SPA1 ; une ubiquitine E3 ligase présente dans le noyau cible, entre autre, le facteur de transcription HY5 « Long Hypocotyl 5 ». Sa polyubiquitylation entraîne sa dégradation par le protéasome 26S et supprime la photomorphogénèse.

En présence de lumière, les photorécepteurs sont activés et participent à l'inactivation de COP1/SPA1 notamment par expulsion de COP1. Les facteurs de transcription tels que HY5, LAF1 et HFR1 peuvent s'accumuler et permettre la photomorphogénèse (Adapté de Xu et al., 2014).

mise en évidence sans pour autant qu'aucun lien physique n'est pu être démontré (Chen et al., 2006 ; Lau et Deng, 2012). Etant donné leur rôle important dans la même voie biologique, c'est à dire réprimant la photomorphogenèse chez les plantes, ils sembleraient que ces deux protéines fassent parti de complexes CUL4-DDB1-E3 ligase distincts (Chen et al., 2010). Ainsi, chez *Arabidopsis*, il existe un complexe CUL4-DDB1 renfermant les sous-unités COP1 et SPA1 (Chen et al., 2010) dont le mécanisme d'action n'est pas encore entièrement défini (**Figure 12**). DET1, pour sa part, appartient au complexe CDD siégeant au sein d'un complexe d'environ 350 kDa (Schroeder et al., 2002).. Il a ainsi été établi que DDB1 et DET1 qui interagissent physiquement, s'associaient également aux protéines COP10, CUL4 et RBX1 afin de former un complexe CRL4 impliqué dans la régulation des réponses à la lumière (Bernhardt et al., 2006 ; Lau et Deng, 2012) (**Figure 12**). COP10 est une enzyme E2-like, déjà connue pour être impliqué dans la répression de la photomorphogenèse en absence de lumière (Suzuky et al., 2002). Plus récemment, un nouveau partenaire du CDD a été identifié et nommé DDA1 « DET1-DDB1 Associated1 ». DDA1 a d'abord été identifiée dans les cellules humaines agissant comme un régulateur positif des complexes CRL4 (Olma et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, les travaux récents de Irigoyen et al., 2014 ont montré que DDA1 permet la reconnaissance de cibles spécifiques du CRL4 en jouant le rôle d'adaptateur au substrat incluant le complexe CDD, en particulier dans les mécanismes de régulation de la réponse à l'ABA « ABscissic Acid ». Le rôle de DDA1 dans la photomorphogenèse reste cependant à clarifier.

Le CSN est un complexe intervenant dans l'activation des enzymes CULLINE-E3 ligases par son action de dé-neddylation/dé-rubylation (Lyapina et al., 2001, Schwechheimer et al., 2001). Il est composé de 8 sous-unités dont 6 appartenant à la famille des protéines COP/DET/FUS (Wei et al., 1994, Serino et Deng, 2003). Les mutants *csn* présentent le même phénotype que les mutants *cop/det/fus*, ce qui peut s'expliquer par son rôle dans la régulation de la photomorphogenèse via l'activation des enzymes CUL4-E3 ligase (décrits ci-dessus). Ceci est en accord avec des expériences *in vivo*, notamment par coimmunoprecipitation, qui ont permis de montrer l'existence d'une interaction entre le complexe CSN et les complexes CDD et COP1 (Yanagawa et al., 2004). Les mécanismes d'action de ces différents complexes dans cette voie de régulation restent à ce jour le sujet de nombreux travaux.

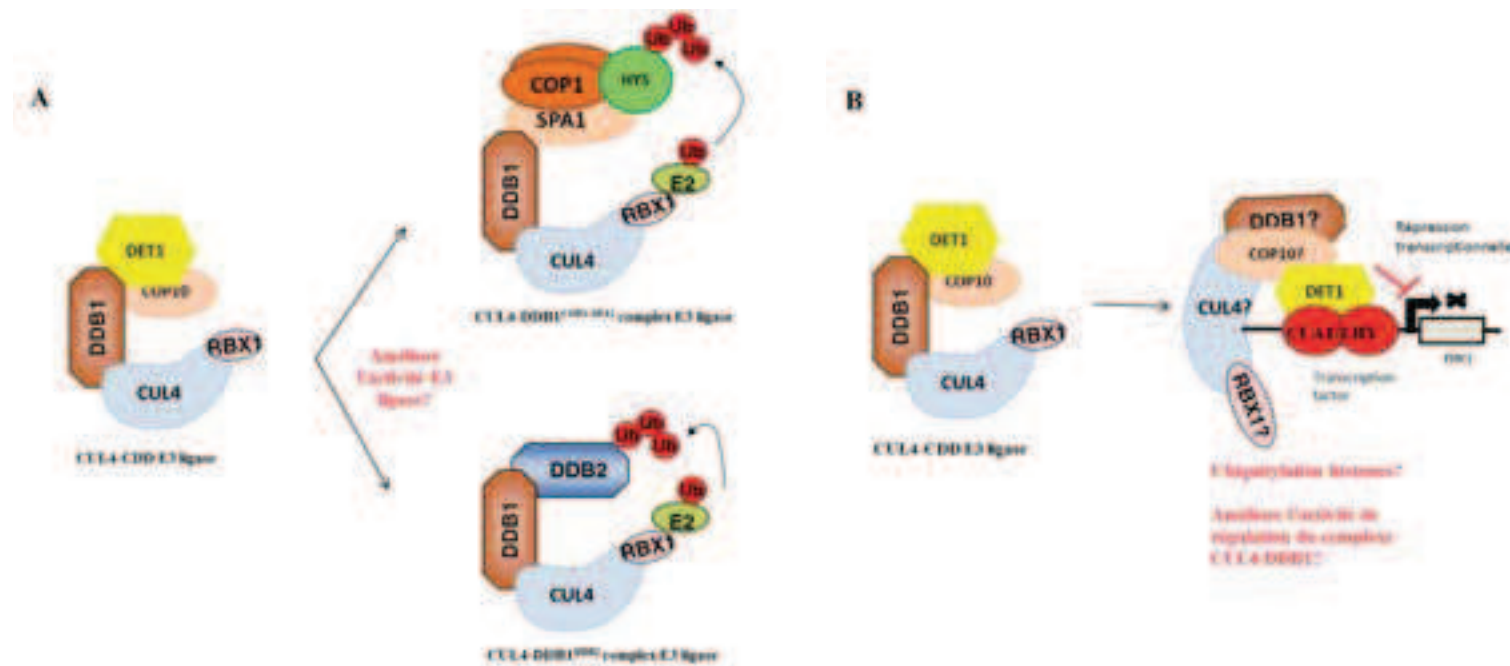


Figure 12 : Rôles du complexe E3 ligase CUL4-CDD chez les plantes.

DET1 (De-Etiolated) et COP10 (un variant d'enzyme E2 ne possédant pas d'activité de conjugaison) s'associent à DDB1 pour former le complexe CDD. Comme DDB1 est l'adaptateur des complexes de type CUL4-DDB1, l'interaction avec les protéines DET1 et COP10 formera un complexe multimérique CUL4-CDD ligase. D'après la littérature, l'activité E3 ligase du complexe CUL4-CDD a été décrite pour deux modes d'action principalement. **A** – DET1, dans le contexte du complexe CUL4-CDD, a été décrite comme étant indispensable pour renforcer l'activité E3 ligase de certains complexes CUL4-DDB1. Cette activité met en jeu COP10 capable de promouvoir *in vitro* l'activité de conjugaison d'enzymes E2. CUL4-CDD est capable d'activer le complexe CUL4-DDB1^{COP1-SPA1} ce qui explique sa présence lors de la dégradation du facteur de transcription HY5 par exemple. CUL4-CDD est aussi impliqué dans le fonctionnement du complexe CUL4-DDB1^{DDB2} lors de la réparation de l'ADN après une exposition aux UV. Il a été montré que DET1 est impliqué dans la poly-ubiquitinylation puis la dégradation de DDB2. **B**. DET1, et par extension CUL4-CDD, possède une fonction de co-répresseur transcriptionnel. DET1 ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN mais est capable d'interagir avec deux facteurs de transcription de la famille MYB : CCA1 « Circadian Clock Associated 1 » et LHY « Late Elongated Hypocotyl1 ». CCA1 et LHY contrôlent le rythme circadien chez les plantes en inactivant dans la journée les gènes du soir comme TOC1 « Timing of Cab Expression ». DET1 s'associe au promoteur du gène TOC1, de manière CCA1/LHY1 dépendante, ce qui conduit à sa répression transcriptionnelle. L'action du complexe CUL4-CDD au niveau de la chromatine peut s'expliquer par l'ubiquitinylation des histones puisqu'il a été reporté que DET1 est capable d'interagir avec les histones H2B. Il se peut aussi que CUL4-CDD participe au renforcement de l'action d'autre complexes CUL4-DDB1 ligases qui agissent au niveau de la chromatine (adapté de Lau et Deng, 2012).

3. Régulateur du cycle cellulaire

L'intégrité du génome est maintenue par les mécanismes de reconnaissance et de réparation des lésions mais implique également la duplication fidèle du génome. La phase S du cycle est donc essentielle afin d'éviter une propagation des mutations et une défaillance des systèmes permettant une seule duplication de l'ADN pouvant modifier la ploïdie des cellules et engendrer une instabilité génomique. Le complexe ORC « Origin Recognition Complex », composé des protéines ORC1-6, reconnaît les origines de réplication et s'y fixe de manière constitutive tout au long du cycle cellulaire, à l'exception de la sous-unité ORC1, dégradée durant la phase S dans les cellules de mammifère (Li et DePamphilis, 2002). A la transition M-G1, le complexe ORC, alors lié à la chromatine, recrute Cdc6 « Cell Division Cycle 6 » et CDT1 « CDC10-Dependent transcript 1 » qui vont faciliter le chargement des hélicases MCM « MiniChromosome Maintenance » 2-7 sur la chromatine (Nishitani et al., 2002 ; Machida et al., 2005). Cette étape permet de former le complexe pré-répliatif (PréRC) appelée « licensing » et permet de rendre l'ADN compétent pour la réplication. Il a été montré que la régulation de CDT1 par dégradation ou inactivation en phase S est indispensable afin d'éviter une ré-initiation de la réplication au cours d'un même cycle.

Chez *C. elegans*, la CUL4 joue un rôle dans l'initiation de la réplication via la régulation de la stabilité de CDT1 (Kim et al., 2007). Chez les mammifères, deux complexes E3 ligase indépendants cohabitent, le complexe CUL4^{CDT2} et le complexe SCF^{SKP2}. Tous deux sont capables d'ubiquityler CDT1 et de la diriger vers la dégradation par le protéasome 26S (Li et al., 2003, Nishitani et al., 2006). Cependant, seul le complexe CUL4 semble être requis pour la protéolyse de CDT1 en réponse aux lésions induites par l'ADN mais aussi au cours de la phase S (Higa et al., 2003, Hu et al., 2004, Takeda et al., 2005). Cette régulation implique aussi d'autres facteurs, en premier lieu, la protéine CDT1 possède un domaine d'interaction protéine-protéine qui lui permet d'interagir avec PCNA « Proliferating Cell Nuclear Antigen », une protéine connue pour augmenter la processivité des ADN polymérases. En présence de lésions de l'ADN et en fin de phase S, c'est PCNA qui permet la reconnaissance de CDT1 par le complexe CUL4-DDB1 au niveau de la chromatine (Hu et al., 2006, Nishitani et al., 2006, Senga et al., 2006). Au niveau moléculaire, CDT1 interagit avec PCNA qui recrute CDT2, une protéine DCAF à domaine WD40 (Jin et al., 2006) au sein du complexe

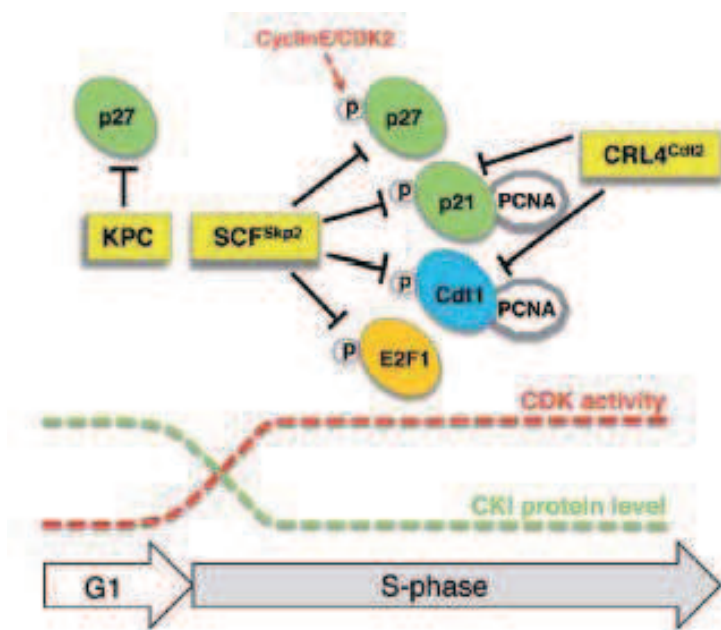


Figure 13 : CUL4-DDB1 et la régulation du cycle cellulaire.

Une régulation stricte de la transition G1/S est fondamentale pour tous les eucaryotes. Chez les levures et les métazoaires, il a été montré que la dégradation des inhibiteurs (CKI) des kinases cyclines dépendantes est indispensable pour obtenir un niveau d'activité CDK suffisant pour assurer l'entrée en phase S. Chez les métazoaires, la dégradation des CKI p27^{KIP} et p21^{CIP} est assurée par trois ubiquitine E3 ligases différentes. Le complexe SCF^{SKP2} reconnaît les substrats phosphorylés et participe à la dégradation de p27^{KIP} et p21^{CIP}. KPC est une ubiquitine E3 ligase de type RING-finger qui permet l'ubiquitinylation de P27^{KIP} dans le cytoplasme. Enfin, le complexe CRL4^{CDT2} est en charge du contrôle du niveau d'accumulation de p21^{CIP} ainsi que de CDT1 (replication licensing factor). Dans les deux cas, la reconnaissance des substrats par CRL4^{CDT2} est PCNA dépendante et le recrutement se fait sur la chromatine (Genschik et al., 2013).

CUL4-DDB1, via le motif PIP-box (Jin et al., 2006). La réplication, une fois achevée, CDT1 est dégradé afin d'empêcher toute ré-initiation de la réplication.

L'analyse du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier deux homologues de *CDT1*, *CDT1a* et *CDT1b*. *CDT1a*, le plus proche homologue du gène *CDT1* de levure, joue un rôle dans la réplication de l'ADN et sa régulation implique la voie de la protéolyse ubiquitine-dépendante (Castellano et al., 2004). Cependant, aucun motif de type PIP-box dans la séquence de *CDT1a* n'a pu être identifié chez les plantes. De plus, à ce jour, il n'existe aucune évidence de la présence d'un homologue de *CDT2* chez les plantes qui pourrait indiquer la présence d'un complexe CUL4^{CDT2} associé à la reconnaissance et l'ubiquitylation de CDT1a (**Figure 13**).

Au cours du cycle cellulaire, les chromosomes doivent être précisément copiés durant la phase S puis condensés en mitose. Plusieurs études suggèrent que cette activité contrôlée par le cycle cellulaire soit en partie due à des modifications de la chromatine comme l'activité changeante de la méthyltransférase PR-SET7/SET8, responsable de la marque H4K20me1 impliquée dans la compaction de l'ADN en G2/M (Brustel et al., 2011). Cette mono-méthylation est régulée par le complexe CUL4-DDB1^{CDT2}. En effet, PR-SET7/SET8 est dégradée par le complexe E3 CUL4-DDB1^{CDT2} durant la phase S mais également après irradiation aux UV dépendant de l'interaction Set8-PCNA (Abbas et Dutta, 2011). La dégradation de PR-Set8 en phase S préserve l'intégrité du génome en empêchant une compaction anormale de l'ADN en phase de synthèse d'ADN (Centore et al., 2010). La marque H4K20me1 est aussi associée chez les mammifères aux origines de réplication de l'ADN, ou elle pourrait jouer un rôle dans la sélection de ces sites, la dégradation de PR-SET7/SET8 par un complexe CUL4-DDB1 en phase S empêcherait donc la ré-réplication (Tardat et al., 2010).

4. Rôle dans la régulation chromatinienne

Dans le noyau des cellules eucaryotes, les nucléoprotéines participent non seulement au compactage du support de l'information génétique, mais aussi à la régulation de l'expression de l'ADN (Köhler et Hurt, 2010). L'unité fondamentale de l'organisation de la chromatine est

Type de modifications post-transcriptionnelle	Acide aminé impliqué	Transcription	
		Activée	Réprimée
Acétylation	K	H3K4	
Méthylation	K, R	H3K4	H3K9
		H3K36	H3K27
			H4K20
			H4R3
Phosphorylation	S, T	H3S10	
		H3S28	
		H3T11	
Ubiquitylation	K	H2BK146	H2AK119

Figure 14 : Récapitulatif des principales marques de modifications post-transcriptionnelles connues des histones sur des sites particuliers et leurs effets sur la transcription.

le nucléosome. Chaque nucléosome est constitué d'un octamère d'histones contenant deux exemplaires de chacune des histones (e.g H2A, H2B, H3 et H4) autour duquel s'enroule 146-147 pb d'ADN. Les nucléosomes créent ainsi une barrière physique autour de l'ADN et leur organisation confère une conformation ouverte ou fermée de la chromatine. Cette organisation influe sur l'ensemble des activités catalytiques utilisant l'ADN comme support : réplication, transcription, réparation ou recombinaison. Il en résulte que toutes les modifications, qui agissent sur les interactions entre les histones et l'ADN, peuvent moduler ces processus cellulaires fondamentaux. Les mécanismes qui influencent la dynamique de la chromatine sont classés en 3 catégories : (i) remodelage de la chromatine ATP-dépendant, (ii) méthylation de l'ADN et (iii) modifications covalentes des histones.

L'extension amino-terminale des histones est la cible de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles qu'acétylation, phosphorylation, méthylation, ubiquitinylation, sumoylation mais aussi ribosylation, pouvant affecter leurs charges, l'accessibilité à l'ADN et les interactions protéine-protéine avec le nucléosome. Chaque type de modification post-traductionnelle s'effectue sur un type particulier d'acide aminé. Par exemple, l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitinylation ciblent des résidus Lysine (K) et la phosphorylation des résidus Sérine (S) (Ridgway et al., 2002) (**Figure 14**). Le nombre et le type de modification des histones forment le code des histones qui est traduit en un état transcriptionnel de la chromatine favorable à l'activation ou la répression de l'expression des gènes.

Une action directe du complexe CRL4 par monoubiquitinylation des histones H2A, H3 et H4 a été démontrée lors de la réparation de l'ADN après irradiations aux UV chez les mammifères. Dans ce cas précis, l'ubiquitinylation des histones a uniquement lieu à proximité de la lésion de l'ADN décelée par DDB1-DDB2 (voir paragraphe 3-1 page 25). Cette modification locale de la chromatine facilite le processus cellulaire de réparation sans agir sur le contrôle de l'expression génique.

Toutefois, plusieurs laboratoires ont pu démontrer que le complexe CRL4 exerce également un rôle régulateur sur l'activité de différentes méthyltransférases qui déposent des marques répressives ou activatrices sur le génome pour moduler l'expression génique. Ces différents exemples sont décrits dans la suite de ce paragraphe.

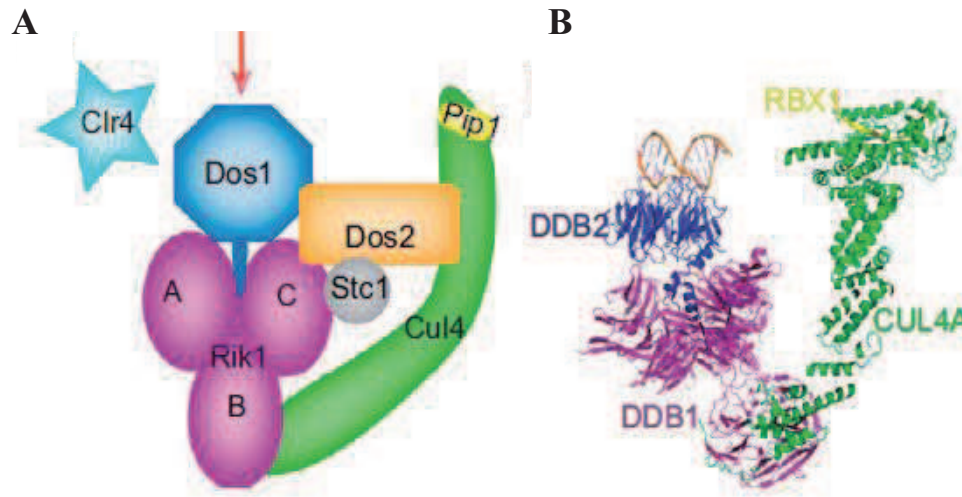


Figure 15 : Comparaison des complexes CRLC et CRL4.

A. Diagramme schématique montrant la structure du complexe CLRC de *S. pombe*. Les protéines Dos1, Rik1, Cul4 et Pip1 sont les sous-unités qui révèlent des homologies de structure et de fonction avec les protéines DCAF, DDB2, CUL4 et RBX1 du complexe CRL4 des eucaryotes supérieurs. La protéine Clr4 possède une activité H3K9 méthyltransférase. Les protéines Dos2 et Stc1 ne possèdent aucune similarité avec les composants des ubiquitine E3 ligases mais se retrouvent au cœur du complexe. La protéine Stc1 est impliquée dans la méthylation H3K9 RNAi-dépendante et permet de lier le complexe CRLC au complexe RITS (RNAi-induced transcriptional silencing). La flèche indique la position du site potentiel de reconnaissance de la cible par ce complexe CRLC.

B. Structure du complexe CRL4^{DDB2} humain. Les protéines équivalentes dans les deux complexes sont indiquées avec le même code couleur (Kuscu et al., 2014).

L'étude de maladie humaine appelée X-LMR (X-linked Mental Retardation) a permis d'établir un lien entre la fonction d'ubiquitylation du complexe CRL4 et un changement de l'état chromatinien affectant la régulation de l'expression génique dans les neurones. Les travaux publiés par Higa et al., en 2006 ont permis de caractériser une protéine appelée WDR5 comme étant un *bona fide* récepteur de type DCAF capable d'interagir avec DDB1 et qui co-immunoprécipite avec tous les composants du complexe CRL4. Cette protéine WDR5 a également été identifiée comme étant une sous-unité d'un complexe H3K4 méthyltransférase appelé SET1/MLL « Mixed-Lineage-Leukemia ». Les histones H3 peuvent être mono-(me1), di-(me2) ou tri-méthylés (me3) sur la lysine K4. La marque H3K4me3 fait partie des régulations épigénétiques activatrices. Elle est associée aux promoteurs des gènes activement transcrits. L'inactivation de WDR5 entraîne une perte des marques H3K4me1 et H3K4me3 principalement. Lorsque la protéine WDR5 s'associe au complexe CRL4B dans le noyau, elle devient un substrat pour l'activité E3 ligase (Nakagawa et Xiong, 2011a). Le complexe CRL4B participe ainsi à l'homéostasie de la protéine WDR5. Ce mécanisme est essentiel pour établir un profil d'expression génique normale dans les neurones associé à leur différenciation (Nakagawa et Xiong, 2011b). Le complexe CRL4B empêche ainsi une augmentation aberrante des marques H3K4me3 qui créent un environnement chromatinien permissif probablement responsable de maladie X-LMR lorsque le gène CUL4B est inactivé par mutation.

Saccharomyces pombe est un autre modèle qui a permis de révéler un lien entre l'activité ubiquitine ligase d'un complexe CRL4 et la formation des zones d'hétérochromatine par méthylation des histones H3 sur la lysine K9 (H3K9me). Chez *Saccharomyces pombe*, la méthylation répressive H3K9 est déposée par son unique méthyltransférase appelée Clr4 « Cryptic Loci Regulator 4 » (Higa et Zhang, 2007). Clr4 fait partie d'un grand complexe multiprotéique nommé CLRC « Clr4 methyltransferase complex » qui comprend également une protéine CULLIN Cul4, une protéine RING-finger Pip1, Rik1 une protéine homologue à DDB1 ainsi que deux protéines appelées Dos1 et Dos2. Des analyses structurales indiquent une organisation similaire entre Rik1, Cul4, Pip1 et Dos 1 et le complexe E3 ligase CRL4 (**Figure 15**). Par analogie, Rik1 assume les fonctions de DDB1 et Dos1 est une DCAF impliquée dans la reconnaissance des cibles du complexe CLRL (Li et al., 2007 ; Buscaino et al., 2012, Kuscu et al., 2014). Des analyses biochimiques et génétiques ont montré que le complexe CLRC possède une activité ubiquitine ligase indispensable à la formation

d'hétérochromatine. Cependant les cibles de ce complexe CRLC n'ont pas encore été identifiées. Chez *Neurospora crassa*, les protéines DDB1 et Cul4 forment un complexe avec l'histone méthyltransférase appelée DIM-5. DIM-5 initie la tri-méthylation sur H3K9 qui sera reconnue par HP1 « Heterochromatin protein 1 » pour former l'hétérochromatine dans les régions péricentromériques et télomériques. Ce complexe est aussi nécessaire pour la méthylation de l'ADN (Freitag et al., 2004 ; Cao et al., 2014).

Dans le modèle humain, une corrélation entre l'activité CRL4 et le dépôt de marques répressives a également été décrite dans plusieurs cas. Les travaux de Higa et al., 2006 cités précédemment pour l'identification de protéines DCAF chez l'homme ont également permis d'identifier la protéine EED « **E**mbryonic **E**ctoderm **D**evelopment », homologue de Esc « **E**xtra **s**ex **c**omb » du complexe PcG (Polycomb Group Protein) de drosophile dans les complexes formés par CUL4B. L'identification de EED comme potentielle DCAF suggérerait un lien entre le complexe CRL4B et le complexe Polycomb de type 2. Les mécanismes moléculaires qui permettraient de comprendre l'action régulatrice du complexe CRL4B sur le dépôt des marques répressives n'ont pas été clarifiés et aucun rôle biologique pour cette interaction n'a été proposé par les auteurs.

Par leur rôle inhibiteur, les complexes Polycomb ont été désignés par le terme PRC pour « **P**olycomb **R**epressive **C**omplex ». Les complexes PRC protéines forment de larges complexes multimériques qui établissent et maintiennent les modifications post-traductionnelles des histones. On distingue deux complexes PRC : PRC1 et PRC2 (Schwartz et Pirrota, 2007 ; Marguron et Reinberg, 2011). Le complexe PRC2 est responsable de la tri-méthylation de l'histone H3 sur la lysine 27 (H3K27me3). La marque H3K27me3 est associée par exemple à l'inactivation du chromosome X ainsi qu'à l'empreinte génomique parentale. Le complexe PRC2 est composé de 4 sous-unités protéiques principales : E(z) (Enhancer of zeste), Su(z)12 (Suppressor of zeste 12), ESC (Extra Sex Combs) et MSI1 (Multicopy Suppressor of IRA1). Le PRC1 est composé, chez la Drosophile, par dRING, Ph « **P**olyhomeotic », Pc « **P**olycomb » et Psc « **P**osterior sex combs » (Margueron et Reinberg, 2011). Le paradigme propose que les complexes PRC agissent de manière séquentielle ; tout d'abord le complexe initiateur PRC2 pose ses marques sur H3K27me3. Cette marque épigénétique permet le recrutement du complexe PRC1 qui catalyse la monoubiquitinylation

de H2AK119 (H2A119ub) qui maintient la répression des gènes cibles par compaction de la chromatine (Schwartz and Pirrotta, 2007 ; Shuettengruber et Cavalli, 2009 ; Bratzel, 2010).

Les protéines du complexe PRC2 ont également été identifiées en partenariat avec le complexe CRL4 par des techniques de co-immunopurification de CUL4B dans des cellules HeLa ou d'autres lignées de cellules cancéreuses (Hu et al., 2012). Le lien entre les complexes PRC2 et CRL4 implique les sous-unités RbAp46/RbAp48 pour l'un et DDB1 pour l'autre. Dans ce partenariat, le complexe CRL4B pourrait être impliqué dans la répression transcriptionnelle grâce à la mono-ubiquitination de l'histone H2A en position K119, un rôle habituellement attribué au complexe PRC1. Cette hypothèse a été testée par déplétion de CUL4B et le résultat indique une diminution non seulement des marques H2AK119ubi mais aussi la perte des marques H3K27me3. Cette expérience valide l'hypothèse d'une collaboration étroite entre les 2 activités pour la répression transcriptionnelle qui favorise la prolifération cellulaire et la tumorigenèse *in vitro* et *in vivo*.

Plus récemment, ces mêmes auteurs ont revisité le rôle du complexe CRL4B dans la tumorigenèse. Les mêmes outils de purification par affinité ont permis de révéler que CUL4B interagissait non seulement avec des sous-unités du complexe PRC2 mais également avec SUV39H1, une histone méthyltransférase (SUV39H1), la protéine HP1 (« Heterochromatin Protein 1 ») et une DNA méthyltransférase 3A (DNMT3A ; Yang et al., 2013). Les auteurs démontrent que la monoubiquitinylation H2AK119 catalysée par CRL4B facilite la triméthylation de l'histone H3 en lysines K9 (H3K9me3) ainsi que la méthylation de l'ADN. Ces marques épigénétiques sont toutes deux impliquées dans la formation d'un état chromatinien répressif. Le rôle de CRL4B lors de la prolifération cellulaire, l'invasion et la tumorigenèse est expliqué par la répression transcriptionnelle au niveau de certains loci comme IGFBP3 (« Insulin-like growth factor binding protein ») ; une protéine à propriété antiproliférative, pro-apoptique et suppresseur de l'invasion de tumeurs chez l'Homme. L'analyse par ChIP du gène IGFBP3 révèle qu'un complexe CRL4B/SUV39H/HP1/DNMT3A peut être détecté au niveau de son promoteur du gène. Les mécanismes moléculaires qui assurent l'échafaudage d'un tel complexe restent à élucider.

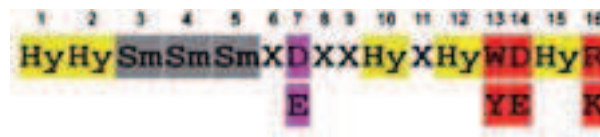


Figure 16 : Structure du motif DWD caractéristique des DCAF.

Les 16 acides aminés conservés du motif DWD ont permis de répertorier la totalité des protéines de type DCAF parmi les protéines portant un domaine WD40 chez Arabidopsis et le riz. Les acides aminés hydrophobes (Hy) sont représentés en jaune, les petits acides aminés (Sm) sont représentés en gris, l'acide aminé acide conservé en position 7 est indiqué en rose et finalement le motif WDxR est indiqué en rouge. (d'après Lee et al., 2008).

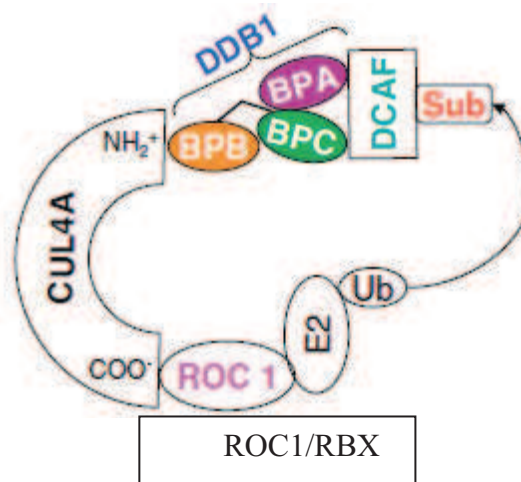


Figure 17 : Architecture du complexe CUL4-DDB1.

Représentation schématique de l'organisation du complexe CUL4. La structure de la protéine DDB1 est détaillée. La structure 3D est organisée en triple hélice appelée BPA, BPB et BPC. Les protéines DCAF s'associent à DDB1a/b via ses hélices BPA et BPC (d'après Iovine et al., 2011).

IV. Les DCAF

1. Une multitude de DCAF

Les DCAF, pour DDB1-CUL4 Associated factors, sont des protéines à domaine WD40 (Jin et al., 2006 ; Angers et al., 2006 ; Higa et al., 2006 ; He et al., 2006). La plupart des protéines WD40 associées à CUL4-DDB1 chez les animaux contiennent un motif conservé dans la répétition de WD40 requis pour l'interaction. Ce motif, nommé DWD box (aussi appelé WDxR ou DxR) est constitué de 16 acides aminés parmi lesquels 4 sont très conservés : Asp-7 (ou Glu), Trp-13 (ou Tyr), Asp-14 (ou Glu) et Arg-16 (ou Lys) (**Figure 16**). Plusieurs autres positions sont occupées par des résidus ayant des propriétés similaires, incluant des résidus hydrophobes aux positions 1, 2, 10, 12 et 15 ainsi que des petits résidus aux positions 3, 4 et 5 (He et al., 2006). L'arginine en position 16 est essentielle pour le maintien de l'interaction avec DDB1. En effet, la protéine DDB2 ne peut plus interagir avec DDB1 chez des patients atteints de Xeroderma pigmentosum où l'arginine en position 16 de DDB2 a été muté en histidine (Shiyanov et al., 1999). DDB2 s'attache à DDB1 via deux de ces structures en hélices : BPA et BPC « seven-bladed β -propeller domain » (**Figure 17**).

Des protéines contenant ce motif conservés DWD ont été détectées dans plusieurs espèces incluant l'homme, la souris, la drosophile, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Arabidopsis* suggérant un rôle très conservé chez les eucaryotes (He et al., 2006). Des études *in silico* chez *Arabidopsis thaliana* ont permis de trouver 85 protéines WD40 putatives et 101 domaines DWD (Lee et al., 2008) (**Figure 18**). Ces DCAF putatives sont impliquées dans une multitude de rôles différents dans tous les organismes confondus, intervenant dans le cycle cellulaire (CDT2), photomorphogénèse (COP10, SPA1, SPA4), la réparation à l'ADN (DDB2) et bien d'autres non caractérisés à ce jour.

2. Une protéine à domaine DWD : WDR55

Parmi ces protéines à domaine DWD, chez *Arabidopsis thaliana*, il existe une protéine WDR55 existant sous deux formes : WDR55.1 et WDR55.2. La protéine WDR55 est essentielle pour la gamétogénèse et l'embryogénèse. WDR55 appartient à la famille des protéines à motif WDR, elle contient le motif conservé WDxR. En collaboration avec l'équipe

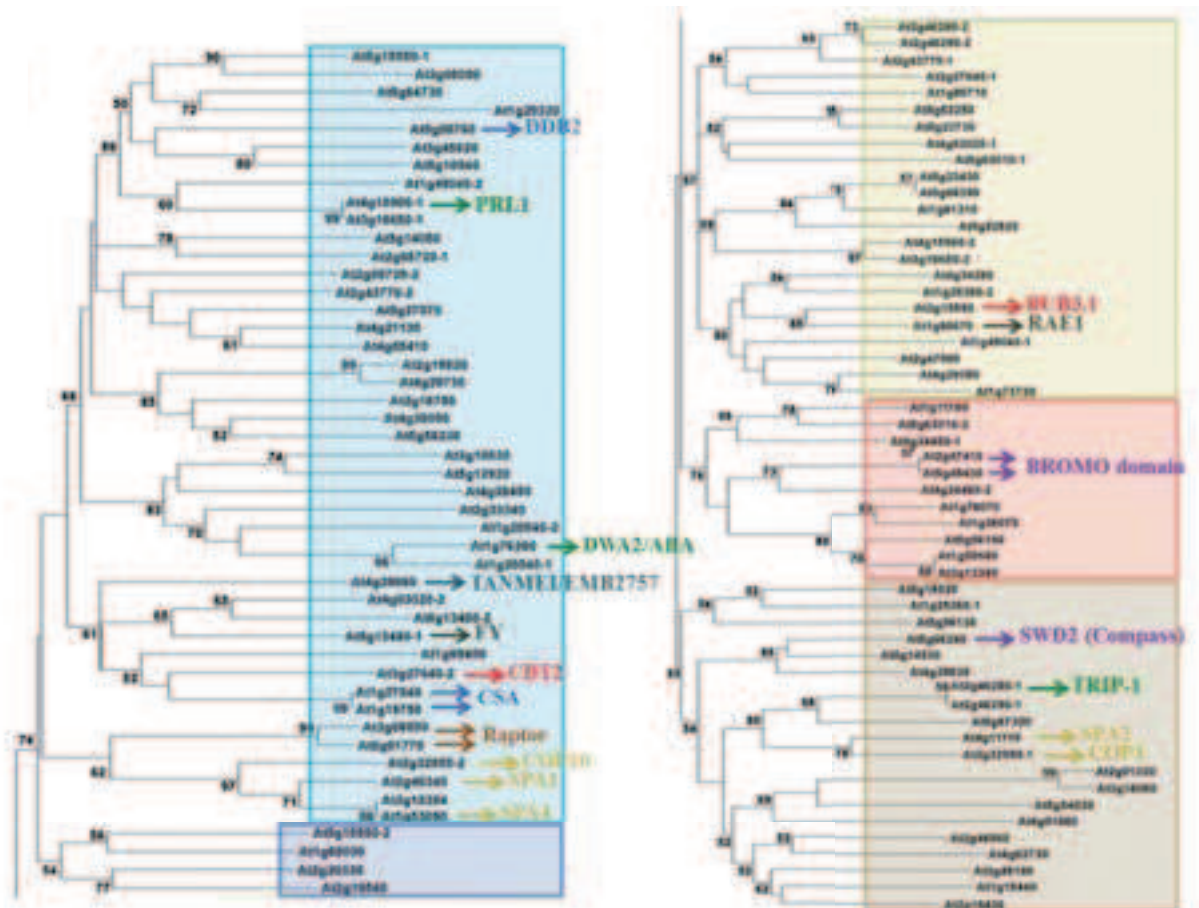


Figure 18 : Arbre phylogénétique enraciné des 85 putatives protéines DCAF basé sur le motif DWD chez *Arabidopsis thaliana* (d'après Lee et al., 2008). Les DCAF, dont la fonction est connue à ce jour, sont indiquées. Les DCAF peuvent être impliquées dans le cycle cellulaire (en rouge), dans la réparation à l'ADN (en bleu), dans la photomorphogénèse (en jaune), liés à la chromatine (en violet) et enfin, liée à la régulation hormonale (en vert). En haut à gauche, nouvelles DCAF découvertes récemment non prédites comme telles.

du Dr. Paul Grini de l'Université d'Oslo, nous avons pu montrer que WDR55 interagissait avec DDB1a, suggérant qu'un putatif complexe E3 CUL4-DDB1^{WDR55} régulait le développement de l'embryon ou de l'albumen (Bjerkan et al., 2012). De plus, un mutant *wdr55* présente un phénotype souvent associé avec un dérèglement lié à l'auxine suggérant que WDR55 peut jouer un rôle dans le contrôle hormonal de développement de la plante et est donc importante pour la croissance végétative (Bjerkan et Grini, 2013).

3. Un autre classe de DCAF : les MSI (Multicopy Suppressor of IRA1)

Parmi les différentes DCAF identifiées par le laboratoire de P. Genschik et le laboratoire de X.W Deng par analyse bio-informatique, les protéines MSI (Multicopy Suppressor of IRA1) forment, chez *Arabidopsis thaliana*, une petite famille de 5 membres nommés MSI 1 à MSI 5 (**Figure 19**) comportant un ou deux sous-motifs WDxR.

3.1 MSI 1

MSI 1, considéré comme le membre fondateur de la famille est, de loin, le plus étudié et le mieux compris. Chez la drosophile, *MSI 1* connu sous le nom de p55 est impliqué dans un complexe Polycomb PRC2 qui agit sur la répression de l'expression des gènes par addition de la marque répressive H3K27 sur la chromatine. Chez la levure, MSI1 s'associe à deux autres protéines afin de former le complexe CAF-1 (Chromatin Assembly Factor 1). Ce complexe joue un rôle dans le maintien d'un état constitutivement inactif de l'hétérochromatine (Kaufman et al., 1997). La fonction de ce complexe semble être conservée chez tous les eucaryotes, comme des études le suggèrent sur les plantes (Hennig et al., 2003). En effet, il a été décrit que *MSI 1* faisait partie d'un complexe PRC2 comprenant MEDEA (MEA), FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE) et FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED2 (FIS2) et ayant un rôle dans l'initiation et la progression normale et correcte du développement de la graine (Köhler et al., 2003). Au sein du laboratoire, des études menées par Eva Dumbliauskas ont permis de montrer que *MSI 1* pouvait interagir physiquement avec DDB1 et ainsi faire partie d'un complexe CUL4 (Dumbliauskas et al., 2011). Si le rôle majeur de *MSI 1* est établi au sein du complexe PRC2 en permettant de maintenir la répression de l'allèle mâle du gène MEDEA dans l'albumen, cette empreinte paternelle de MEDEA est perdue dans des mutants hypomorphes *cul4*. Par ailleurs, ces

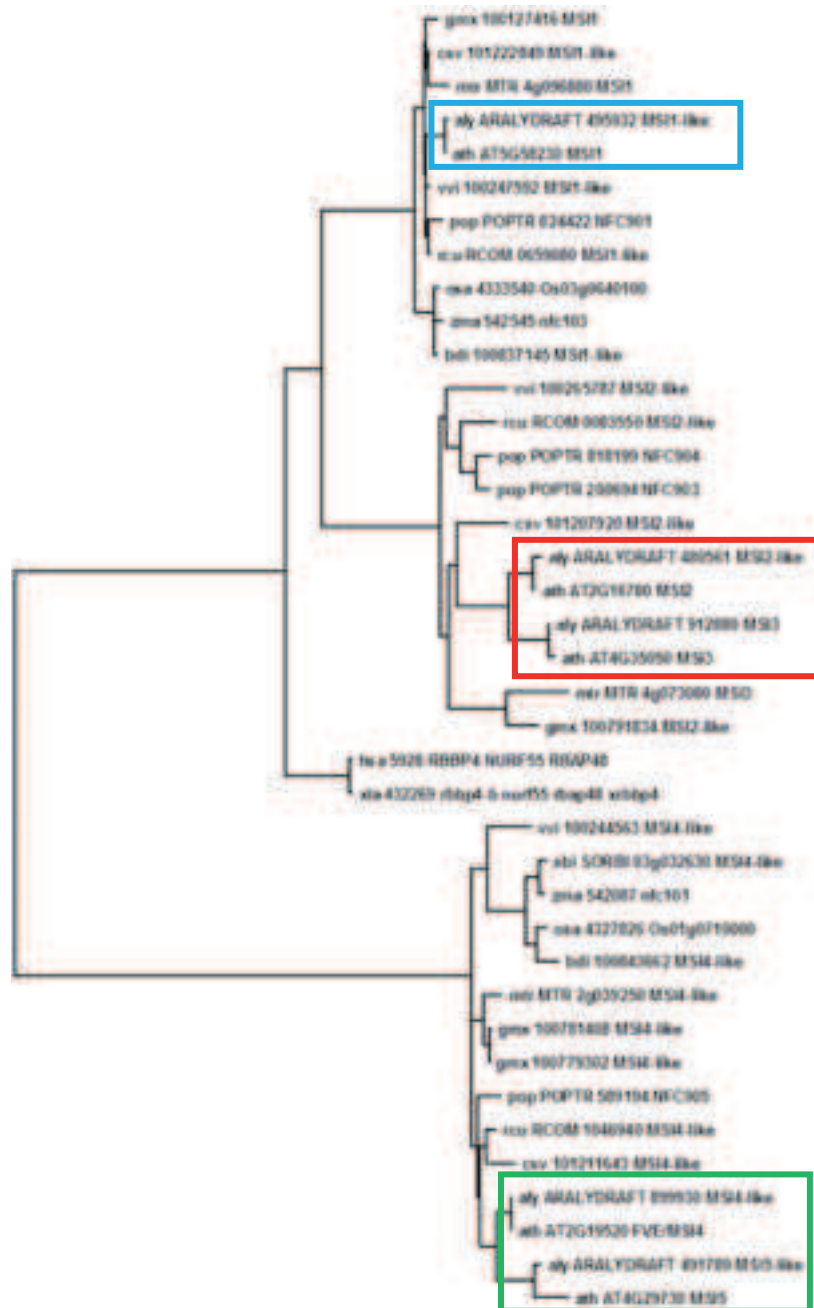


Figure 19A : Arbre phylogénétique de la famille des protéines MSI chez les plantes supérieures incluant les séquences des protéines MSI humaine et du Xénope.

Dans le cadre bleu *AtMSI 1*, dans le cadre rouge *AtMSI 2* et *AtMSI 3*, dans le cadre vert *AtMSI 4* et *AtMSI 5*. The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) a été utilisé afin d'identifier les homologues. Toutes les séquences protéiques ont été alignées en utilisant www.phylogeny.fr, et l'arbre phylogénétique a été dessiné en utilisant TreeView.

aly: *Arabidopsis lyrata*, *ath*: *Arabidopsis thaliana*, *bdi*: *Brachypodium distachyon*, *csv*: *Cucumis sativus*, *gmh*: *Glycine max*, *hsa* : *Homo Sapiens*, *mtr*: *Medicago truncatula*, *osa*: *Oryza sativa* *pop*: *Populus trichocarpa*, *rcu*: *Ricinus communis*, *vvi*: *Vitis vinifera*, *xla* : *Xenopus laevis*, *zma*: *Zea mays*

mutants présentent aussi le phénotype *fis*, montrant ainsi une implication directe du complexe CRL4^{MSI1} dans la régulation épigénétique PRC2-dépendante de MEDEA (Dumbliauskas et al., 2011). Plus récemment, il a été montré que MSI1 pouvait établir le lien entre le PRC2 et le PRC1 par son interaction avec LHP1 « Like Heterochromatin Protein 1 ». Cette interaction causant une boucle de rétrocontrôle positive afin de recruter le complexe PRC2 sur la chromatine qui porte la marque H3K27me3 (Derkacheva et al., 2013). En plus de son implication directe dans la coordination des complexes Polycomb, *MSI 1* joue un rôle essentiel dans le contrôle de l'initiation de la floraison (Hennig et al., 2013). En effet, il agit durant la photopériode afin de réguler l'expression de CONSTANS (CO), un activateur de floraison, en conditions de jours longs (Steinbach et Hennig, 2014).

3.2 *MSI 4 (FVE) – MSI5*

MSI 4, aussi connu sous le nom de *FVE*, forme avec *MSI 5*, un clade dans cette famille multi-génique. Tout comme *MSI 1*, *MSI 4* participe à la régulation de l'expression du gène *FLC*, acteur majeur de l'initiation de la floraison (Sheldon et al., 1999). Des études au sein du laboratoire ont permis de montrer que *MSI 4* était bien une DCAF et qu'elle interagissait physiquement mais aussi génétiquement avec la CUL4. Le motif WDxR de *MSI 4* quant à lui, est nécessaire à la fonction de *MSI 4* dans la régulation de l'initiation de la floraison. (Pazhouhandeh et al., 2011). MSI4/FVE a été montré pouvant former un complexe protéique de haut poids moléculaire, environ 1000 kDa (Jeon et al., 2011). Plus récemment, il a été montré que *MSI 4* et *MSI 5* agissaient de manière redondante. En effet, *MSI 5* peut partiellement agir avec *FVE* dans la répression du gène *FLC*. Tous les deux peuvent aussi interagir avec une histone déacetylase HDAC6 afin d'agir collaborativement avec un complexe CLF-PRC2 qui dépose des marques répressives H3K27me3 sur le gène *FLC* (Gu et al., 2011).

V. Description du projet de recherche.

Le laboratoire où j'ai effectué ma thèse de doctorat travaille sur l'implication de la protéolyse ubiquitine dépendante dans différents processus physiologiques, chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. L'équipe s'intéresse principalement aux rôles des complexes



Figure 19B : Alignement des MSI chez *Arabidopsis thaliana*.

Les séquences des MSI d'*Arabidopsis thaliana* ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW.

Les cadres bleu représentent les motifs WD40, le cadre rouge représente le motif WD40 incluant le domaine WDxR (cadre rouge foncé).

CULLIN-E3 ligases dans la signalisation hormonale, le cycle cellulaire, les mécanismes de réparation de l'ADN, l'épigénétique ou la floraison (Potuschak et al., 2003, Wild et al., 2012, Thomann et al., 2009, Marocco et al., 2012, Molinier et al., 2008, Dumbliauskas et al., 2011, Pazhouhandeh et al., 2011). Mon projet de recherche consiste plus particulièrement à étudier le rôle de *MSI2* et *MSI3* chez les plantes.

Au contraire de *MSI 1* et *MSI 4/MSI 5* qui ont des rôles bien définis à l'heure actuelle, *MSI 2* et *MSI 3* restent encore des gènes à fonctions inconnues. Le laboratoire s'intéressant à la régulation du cycle cellulaire, un microarray effectué sur des plantes surexprimant E2Fa et DPa, facteurs de transcription nécessaires au passage de la phase G1 à la phase S durant le cycle cellulaire, a attiré l'attention et a permis de montrer que dans ces plantes, MSI3 était surexprimé (Vlieghe et al., 2003). Cette observation est soutenue par la présence dans la région promotrice des gènes *MSI 2* et *MSI 3* d'un site potentiel de liaison à E2Fa (Vlieghe et al., 2003). Inversement, lorsque l'on inhibe l'action de RBR, qui inhibe le facteur de transcription E2Fa/DPa, on observe une augmentation de l'expression de MSI2 et MSI3 (Ramirez-Parra et al., 2003).

Ces données préliminaires suggèrent un rôle pour *MSI 2* et *MSI 3* dans la régulation du cycle cellulaire, leur conférant une spécificité d'action distincte des autres MSI. Tout d'abord, j'ai confirmé ces données de bioinformatiques par des données quantifiées *in vivo*. J'ai ensuite étudié ces protéines *in vivo* par différentes techniques : localisation sub-cellulaire, profil d'expression, étude d'interactions. Enfin, par des études de génétique inverse, j'ai essayé de comprendre quel était le rôle de *MSI 2* et *MSI 3* au sein de la plante et si celles-ci avaient des fonctions redondantes ou non avec les autres membres de la famille MSI.

RESULTATS

J'ai séparé ce chapitre des résultats en deux parties :

- I. Les MSI : cette partie regroupe mon projet principal de thèse dont la publication est en préparation.

- II. Autre DCAF : WDR55 : cette partie est basée sur un travail réalisé en collaboration avec P. Grini qui a fait l'objet d'une publication en 2012 dans The Plant Cell pour laquelle je suis 2^{ème} auteur.
Bjerkan, K. N., **Jung-Roméo, S.**, Genschik, P., & Grini, P. E. (2012). Arabidopsis WD REPEAT DOMAIN55 Interacts with DNA DAMAGED BINDING PROTEIN1 and Is Required for Apical Patterning in the Embryo. The Plant Cell vol. 24 no. 3 1013-1033

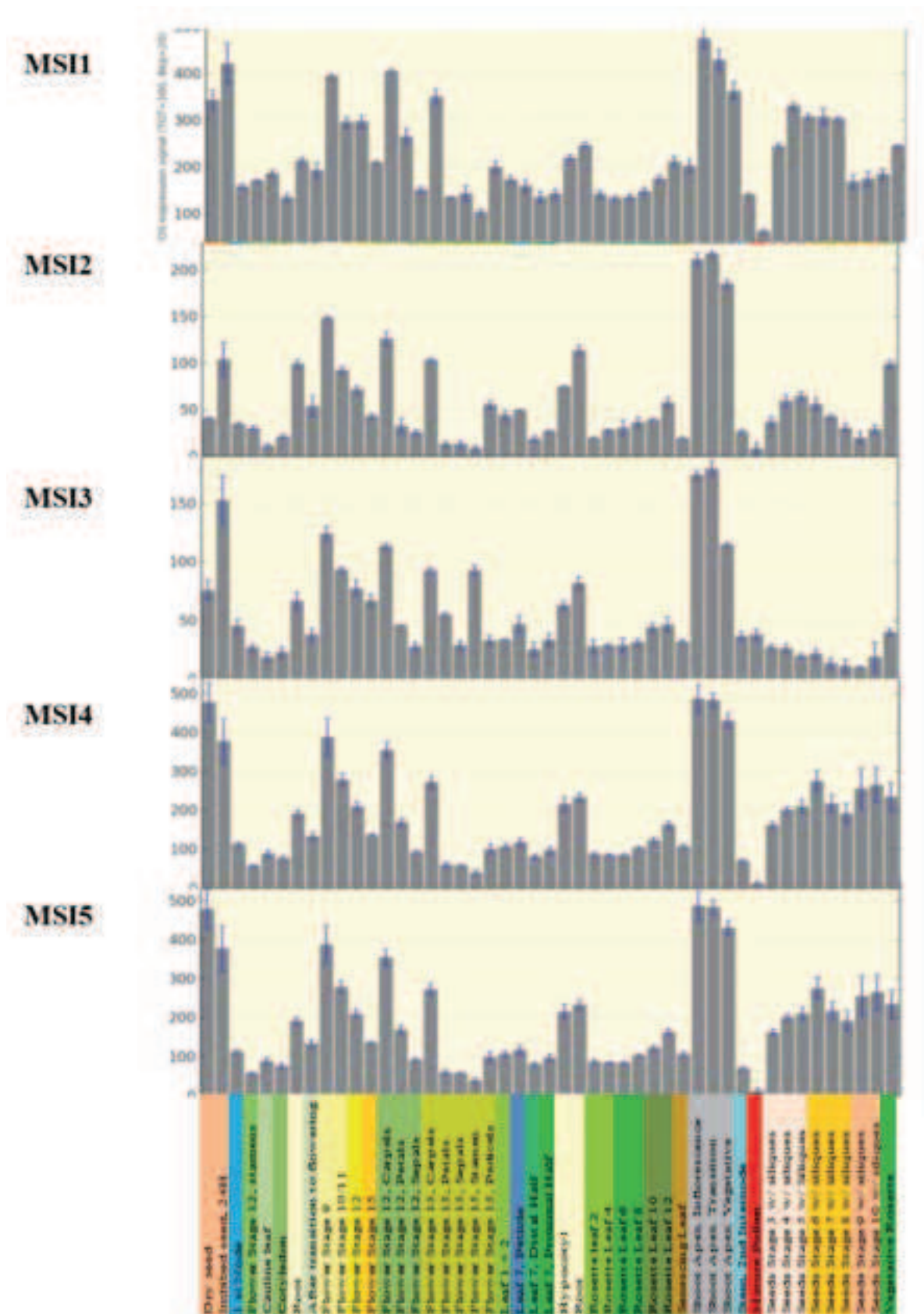


Figure 20 : Profils d'expression des gènes MSI prédits par e-FPBrowser.

Les résultats d'analyses transcriptomiques des gènes d'*Arabidopsis* obtenus par « microarray » sont disponibles sur le site du TAIR eFP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca> ; Winter et al., 2007). Ils sont basés sur les données de publication Schmid et al., 2005 et Brady et al., 2007. La valeur du niveau absolu d'expression est représentée sur l'ordonnée de chaque diagramme. Le nom des tissus analysés est indiqué sous le diagramme.

I. Les MSI : Caractérisation fonctionnelle des gènes MSI 2 et MSI 3 d'*Arabidopsis thaliana*

1. Etude de la régulation transcriptionnelle

1.1 Expression des gènes de la famille MSI d'après les données publiques de « microarray »

Les données d'expression des gènes d'*Arabidopsis* issues d'analyses transcriptomiques (microarray) sont disponibles sur le site eFP Browser (<http://bbc.botany.utoronto.ca>; Winter et al., 2007) et sont basées sur la publication « Gene expression map of *Arabidopsis* development » Schmid et al. (2005). La **Figure 20** résume les informations disponibles concernant les profils d'expression pour l'ensemble des gènes de la famille MSI au cours du développement d'*Arabidopsis*. Les 5 diagrammes permettent la comparaison des profils d'expression des gènes *MSI 1*, *MSI 2*, *MSI 3*, *MSI 4* et *MSI 5*. L'échelle placée à gauche indique la valeur du niveau absolu d'expression.

De manière globale, on constate que les profils d'expression des gènes *MSI 2* à *MSI 5* sont très similaires et révèlent quelques pics d'expression notamment dans les zones de prolifération du méristème apical. Le gène *MSI1* présente une expression plus uniforme dans les tissus testés. Il est intéressant de noter que tant les profils d'expression que les valeurs absolues d'expression mesurées sont uniformes et spécifiques aux trois clades définis par comparaison de séquences (**Figure 19**). Dans les parties racinaires, les valeurs maximales d'expression de *MSI 1*, *MSI 4* et *MSI 5* sont comprises entre 285 et 390 en valeur absolue d'expression alors que celles de *MSI 2* et *MSI 3* sont plus faibles et comprises entre 72 et 130 en valeur absolue d'expression. Dans les parties aériennes, les valeurs maximales d'expression de *MSI 1*, *MSI 4* et *MSI 5* sont comprises entre 243 et 487 en valeur absolue d'expression alors que celle de *MSI 2* et *MSI3* sont comprises entre 30 et 217 en valeur absolue d'expression.

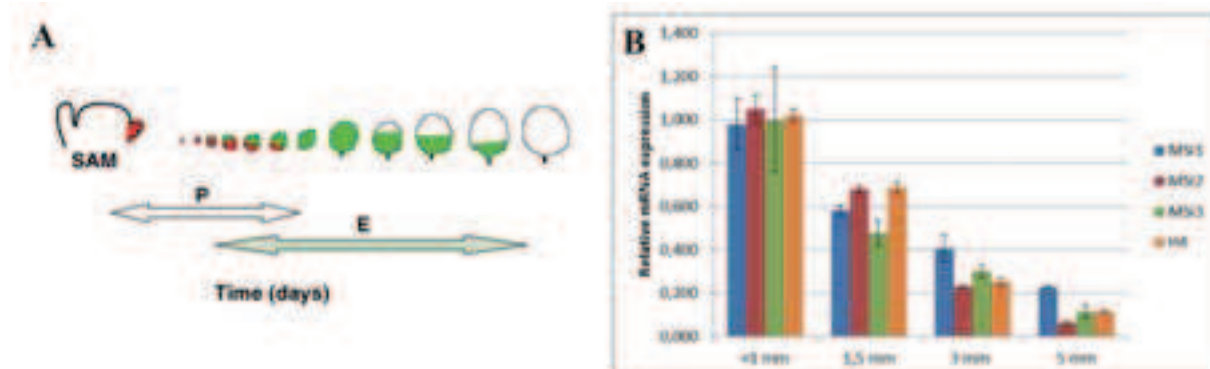


Figure 21 : Expression relative des gènes MSI dans des feuilles en croissance.

A : Représentation schématique de la croissance des feuilles d'Arabidopsis (Skiryts et al., 2010).

Ce schéma illustre le développement de la feuille en partant d'un primordium foliaire jusqu'à l'obtention d'une feuille mature. Au début, la croissance foliaire est exclusivement alimentée par une prolifération cellulaire. Ceci est indiqué par la coloration rouge sur la feuille et par la flèche blanche P sur l'échelle du temps. Puis les cellules sortent de la phase de division cellulaire pour entrer dans une phase d'élongation cellulaire. Ceci est indiqué en couleur verte sur les feuilles et par la flèche verte E sur l'échelle du temps. Ce phénomène commence dans la partie apicale de la feuille pour s'étendre jusqu'à la base. Ces deux phénomènes se succèdent pour aboutir à une feuille de taille mature indiquée en blanc sur le schéma.

B : Quantification de l'expression relative des gènes MSI1, MSI2, MSI3 et H4 par RT-qPCR.

Le niveau d'expression relative des gènes MSI 1, MSI 2, MSI 3 est représenté, respectivement en bleu foncé, rouge, et vert. L'expression relative du gène Histone H4 est utilisée comme marqueur de cellules en prolifération. Les feuilles de taille indiquée ont été prélevées sur des plantules Col0 cultivées *in vitro*. Les gènes de référence Actine et GAPDH sont utilisés pour la normalisation. Les diagrammes indiquent la moyenne de l'expression relative pour chaque échantillon et la moyenne calculée de l'écart-type de trois réplicats.

Pour les gènes *MSI 2* et *MSI 3*, l'accumulation des transcrits est la plus importante dans les méristèmes apicaux (végétatifs ou d'inflorescence), dans les jeunes boutons floraux puis dans les carpelles par comparaison aux feuilles de rosette par exemple. Une expression plus soutenue dans ces zones de prolifération pourrait signifier une fonction en lien avec la régulation du cycle cellulaire.

1.2 L'expression des gènes *MSI* est cycle cellulaire dépendante

Afin de confirmer ces résultats d'analyses transcriptomiques par des données expérimentales, j'ai réalisé une étude de quantification des transcrits en utilisant comme modèle la croissance de la feuille dont la description a fait l'objet de nombreuses publications (Donnelly et al., 1999; Granier et al., 2002 ; Savaldi-Goldstein et al., 2007 ; Boyes et al., 2001 ; Beemster et al., 2005 ; Skirycs et al., 2010). A partir du moment où le primordium foliaire émerge du méristème apical caulinaire, sa croissance lui permet de former une feuille mature dont la taille est définie. La croissance globale des feuilles est la résultante de la division cellulaire et de l'expansion cellulaire. Chez *Arabidopsis*, durant les premiers jours, cette croissance est uniquement due à la prolifération cellulaire et elle est représentée en rouge sur la **Figure 21A**. Pour des plantes Col0 cultivées *in vitro*, cela correspond à des feuilles de taille inférieure ou égale à 1 mm. Au-delà de cette taille, certaines cellules quittent le cycle cellulaire mitotique et entrent dans un processus d'élongation (Donnelly et al., 1999). Ce phénomène opère d'abord à l'extrémité apicale de la feuille pour atteindre finalement la base de la feuille et il est représenté en vert sur la **Figure 21A**. A la fin de ce processus, la feuille a atteint sa taille définitive, ce qui correspond à une taille de 5 à 5,5 mm pour les plantules Col0 cultivées *in vitro*. La transition de la division vers l'expansion cellulaire est souvent associée à la transition d'un cycle mitotique vers l'endocycle (Beemster et al., 2005 ; Breuer et al., 2010).

La quantification des transcrits par RT-qPCR a été réalisée à partir d'ARN totaux extraits de feuilles de taille croissante, allant de ≤ 1 mm à 5 mm, qui ont été prélevées sur des plantules Col0 cultivées *in vitro*. Pour cette expérience, seule la 3^{ème} paire de feuille a été prélevée par plante. Les résultats présentés en **Figure 21B**, montrent la quantification des transcrits *MSI1*, *MSI2* et *MSI3* réalisée sur des feuilles de ≤ 1 mm, 1,5 mm, 3 mm et 5 mm.

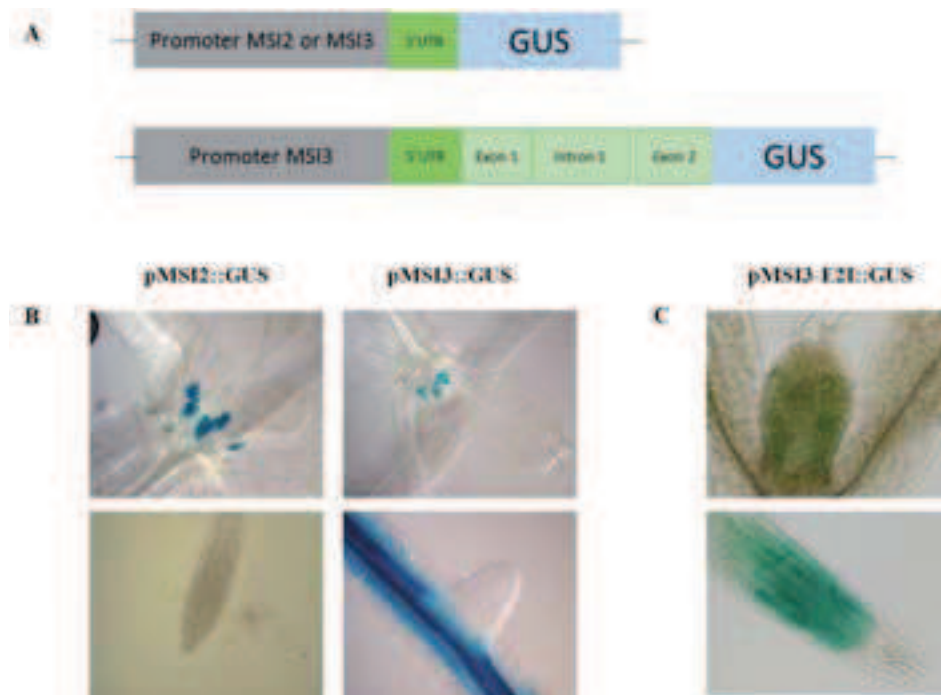


Figure 22 : Profil d'expression des gènes MSI2 et MSI3 *in planta*.

A : Schéma des constructions générées. Le promoteur de MSI2 ou de MSI3 ainsi que le promoteur de MSI3 suivi des 2 premiers exons et du 1^{er} intron sont fusionnés au gène rapporteur GUS en 3'.

B : Coloration histochimique des plantes exprimant pMSI2::GUS et pMSI3::GUS

Les lignées rapportrices pMSI2::GUS et pMSI3::GUS ont servi à définir le profil d'expression des gènes correspondants chez des plantules d'*Arabidopsis*. Après fixation à l'acétone, les plantules transgéniques âgées de 10 jours et cultivées *in vitro* ont été incubées en présence de X-Gluc durant une nuit. Les observations ont été réalisées à l'aide d'un microscope NIKON E800 avec un objectif $\times 20$. Les images du haut et du bas représentent respectivement l'activité GUS détectée dans les stipules et dans le tissu vasculaire des racines. Ces images sont représentatives de 5 lignées transgéniques indépendantes analysées pour chaque construction.

C : Coloration histochimique de plantes exprimant pMSI3-Exon1-Intron1-Exon2MSI3::GUS.

Les lignées rapportrices de fusion transcriptionnelle pMSI3::GUS incluant le premier intron du gène MSI3 flanqué des séquences des exons 1 et 2 ont servi à définir le rôle de ces séquences supplémentaires dans le profil d'expression du gène MSI3. Après fixation à l'acétone, les plantules transgéniques âgées de 10 jours et cultivées *in vitro* ont été incubées en présence de X-Gluc durant une nuit. Les images du haut et du bas représentent l'activité GUS détectée respectivement dans la première paire de feuille en formation et le méristème apical de la racine primaire. Ces images sont représentatives de 20 lignées transgéniques indépendantes analysées pour chaque construction.

J'ai intégré la quantification des transcrits d'un gène *H4* (At5g59690) qui sert de gène contrôle de l'activité de division cellulaire puisque l'analyse du promoteur de ce gène a permis d'établir une expression préférentielle dans les méristèmes chez *Arabidopsis* (Atanassova et al., 1992).

L'analyse des résultats de la **Figure 21B**, montre clairement une corrélation entre l'expression des gènes *MSI1*, *MSI2* et *MSI3*, à l'image du gène *H4*, et la taille des feuilles. L'ensemble des gènes testés présente une expression qui chute progressivement lorsque la taille des feuilles augmente. Ceci indique une expression préférentielle dans les cellules en prolifération. Ces résultats corroborent parfaitement l'analyse transcriptomique disponible sur le site du TAIR (<http://www.arabidopsis.org>). On peut noter, cependant, que cette expression ne s'annule jamais puisqu'il persiste toujours un niveau basal d'expression dans les feuilles matures.

1.3 Etude des profils d'expression des gènes *MSI2* et *MSI3* in planta

Afin de définir la localisation tissulaire de l'expression des gènes *MSI 2* et *MSI 3* dans les plantules d'*Arabidopsis*, des lignées de fusion transcriptionnelle pMSI2 ::GUS et pMSI3 ::GUS exprimant le gène rapporteur *uidA* codant pour la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle des promoteurs endogènes *MSI2* et *MSI3* ont été utilisées. La taille du promoteur pour le gène *MSI2* est de 1700 pb et celle pour le gène *MSI3* et de 1700 paires de base. Les séquences promotrices amplifiées incluent la séquence 5'UTR dans les 2 cas (**Figure 22A**). Une vingtaine de plantules transgéniques indépendantes a été sélectionnée pour chaque construction à étudier. Parmi celles-ci, j'ai sélectionné les lignées pour lesquelles le test de ségrégation en présence de glufosinate indique une insertion du T-DNA à un unique locus. Pour chaque lignée testée, les plantules ont été cultivées *in vitro* sur du milieu MS pendant 10 jours puis elles ont été colorées pour mettre en évidence l'activité GUS en utilisant le substrat X-Gluc en suivant le protocole décrit dans la partie « Matériel et Méthodes ». Les photographies des plantules représentatives du profil d'expression du gène GUS en fonction du promoteur testé sont représentées en **Figure 22B**.

Alors que les résultats présentés précédemment indiquent clairement une expression des gènes *MSI* dans les zones de prolifération de la plante, aucune plante transgénique

analysée ne présente un tel profil de coloration. La **Figure 22B** indique que les sites d'activité GUS mis en évidence par cette technique sont exclusivement les stipules dans la zone arienne et le tissu vasculaire dans les racines des plantes transgéniques. Ce résultat en totale contradiction avec nos attentes peut s'expliquer de plusieurs manières. Le vecteur binaire utilisé pour la transformation des plantes par insertion du T-DNA a été mis hors de cause puisque d'autres membres du laboratoire l'avaient testé et ont pu réaliser des analyses de promoteur en fusion avec le gène rapporteur GUS. Nous avons également exclu des problèmes au moment du clonage de la séquence du promoteur puisque le séquençage complet des promoteurs amplifiés par PCR dans le vecteur de destination n'a révélé aucune erreur par mutation de nucléotide ou perte de séquences. La dernière hypothèse que nous avons voulu tester était le choix des séquences régulatrices à mettre en amont du gène rapporteur GUS. Dans le modèle végétal, il a été reporté que des séquences importantes pour la régulation de l'expression d'un gène ne se trouvent pas uniquement dans les zones proximale et distale du promoteur. Les séquences en aval de l'ATG dont notamment le premier intron peuvent aussi influencer l'expression de certains gènes (Rose et Last, 1997). Cette hypothèse n'a été testée expérimentalement qu'avec le gène *MSI3*. La séquence insérée en amont du gène rapporteur GUS incluait ainsi le promoteur de 1700 pb, la séquence du premier intron flanqué de part et d'autre par les séquences de l'exon 1 et de l'exon 2. La séquence de l'exon 2 permet de réaliser une fusion traductionnelle avec le gène GUS. Après sélection d'une trentaine de lignées transgéniques indépendantes, la coloration GUS a été réalisée comme décrit précédemment. Les photographies des plantules représentatives du profil d'expression du gène GUS pour les 20 lignées indépendantes analysées sont représentées en **Figure 22C**. Dans la racine primaire, la zone du méristème présente la couleur la plus intense. Cette coloration se prolonge sur une courte distance dans le tissu vasculaire de la racine. Au niveau de la partie aérienne, on observe une coloration plus faible dans la première paire de feuille en formation. Ces résultats sont cette fois-ci en parfaite adéquation avec les analyses de données publiques de « microarray » et avec nos analyses de RT-qPCR c.à.d une expression du gène *MSI3* dans les cellules en prolifération. Comme ces plantes ont été obtenues tardivement au cours de ma thèse, elles seront utilisées ultérieurement pour illustrer l'expression spatio-temporelle du gène *MSI3 in planta* au cours du développement d'*Arabidopsis*.

1.4 E2Fa/DPa contrôle l'expression des gènes MSI 2 et MSI 3

Des études menées conjointement dans deux laboratoires ont permis de dresser une liste de gènes cibles du facteur de transcription hétérodimérique E2Fa/DPa chez *Arabidopsis* (Ramirez-Parra et al., 2003 ; Vandepoele et al., 2005). Ce facteur de transcription est un acteur majeur de régulation du cycle cellulaire dans les modèles animaux et plantes puisqu'il contrôle l'expression des gènes nécessaires à la transition G1/S et à la réplication de l'ADN en phase S. La première étude a mis à profit la séquence complète du génome d'*Arabidopsis* pour répertorier l'ensemble des gènes contenant la séquence consensus (TTTCCCGCC) capable de lier directement le facteur de transcription E2F/DP. Des séquences putatives ont été trouvées dans le 5'UTR des gènes *MSI 2* et *MSI 3* grâce au logiciel (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>). La stratégie de la deuxième étude est basée sur l'identification par « microarray » des gènes dont l'expression est induite dans des plantes exprimant de manière ectopique E2Fa/DPa sous contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur par comparaison aux plantes contrôles Col0. Les gènes *MSI2* et *MSI3* ont été identifiés comme de possibles cibles directes du facteur E2Fa/DPa par les 2 études.

Afin de confirmer ces résultats, j'ai mené une étude de quantification des transcrits par RT-PCR quantitative dans des plantules E2Fa/DPa^{OE}. Il faut noter que les plantes transgéniques p35S::DPa sont morphologiquement identiques aux plantes contrôles non transformées alors que l'analyse des plantes 35S::E2Fa montrent une prolifération cellulaire plus soutenue dans les cotylédons et l'hypocotyle. Ce phénotype est accentué et généralisé dans les plantes E2Fa/DPa^{OE} qui sont bloquées dans leur développement (De Veyler et al., 2002). Les résultats présentés en **Figure 23**, montrent la quantification des transcrits réalisée sur 3 plantules indépendantes E2Fa/DPa^{OE} âgées de 10 jours. La valeur relative de tous les transcrits analysés a été ramenée à une valeur de 1 pour le contrôle Col0. Cette expérience permet de comparer les niveaux d'expression de l'ensemble des gènes de la famille MSI. De manière globale, on observe que l'expression ectopique du facteur de transcription E2Fa/DPa affecte non seulement *MSI2* et *MSI3* mais également les autres membres de la famille. Cependant, le niveau d'expression du gène *MSI3* est toujours supérieur aux autres MSI pour l'ensemble des plantules analysées. Ce résultat est donc en parfaite adéquation avec les résultats publiés montrant que non seulement les gènes *MSI2/3* sont exprimés dans les cellules

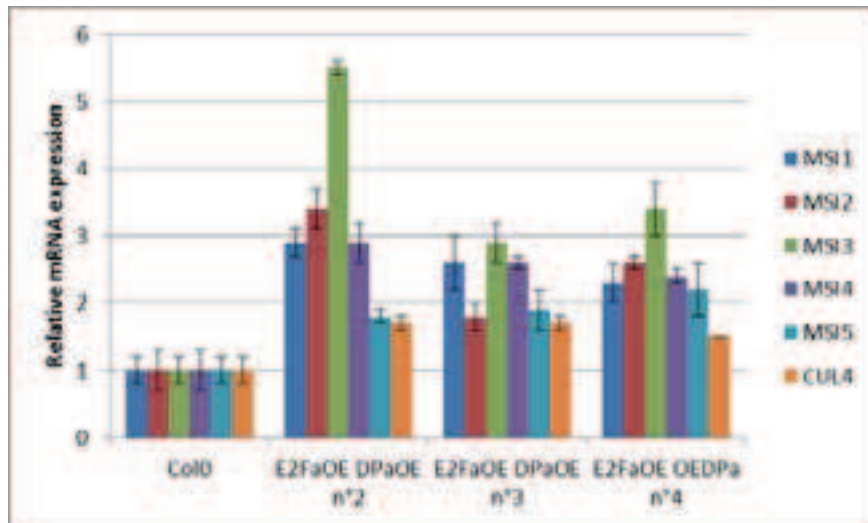


Figure 23 : Niveaux relatifs d'expression des gènes MSI dans des plantes surexprimant E2Fa/DPa^{OE}.

Le niveau d'expression relative des gènes MSI 1, MSI 2, MSI 3, MSI 4, MSI 5 et CUL4 est représenté, respectivement en bleu foncé, rouge, vert, violet, bleu clair et orange. Pour Col0, les niveaux d'expression ont été ramenés à une valeur de 1 après normalisation par rapport aux gènes de références Actine et GAPDH. Trois plantes E2Fa/DPa^{OE} indépendantes, âgées de 10 jours, exprimant E2Fa et DPa sous contrôle du promoteur 35S ont été analysées. Le graphique montre la moyenne de l'expression relative mesurée par RT-qPCR. La moyenne a été effectuée sur 3 réplicats. Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

en prolifération mais que leur expression est contrôlée par le facteur de transcription E2Fa/DPa ce qui sous-entend une expression régulée de manière cycle cellulaire dépendante. Des expériences de « ChIP » (*Chromatin Immuno Precipitation*) permettront de vérifier l'association de E2Fa sur les promoteurs des gènes *MSI2* et *MSI3*.

2. Etude de la localisation subcellulaire et de la régulation post-traductionnelle

2.1 Etude de la compartimentation cellulaire des protéines MSI in planta

Une étape incontournable dans la compréhension de la fonction d'une protéine est de connaître sa localisation subcellulaire. Notre approche expérimentale envisage une fonction en lien avec le complexe CRL4 puisque les protéines MSI sont répertoriées comme potentielles DCAF. Chez *Arabidopsis*, le profil d'expression du gène *CUL4* ainsi que la localisation de la protéine ont été publiés (Chen et al., 2006). La protéine CUL4 est détectée dans tous les tissus de la plante. À l'échelle de la cellule, elle est exclusivement détectée dans le compartiment nucléaire. Les auteurs ont réalisé cette étude à l'aide de fusion traductionnelle avec des protéines fluorescentes à l'extrémité amino-terminale de la protéine CUL4 soit à l'aide d'un système transitoire par bombardement de cellules d'oignons, soit par transformation stable de plantes d'*Arabidopsis*. Ce résultat indique que le signal NLS de type bipartite mis en évidence à l'extrémité N-terminale de la protéine CUL4 est fonctionnel.

Pour ma part, j'ai commencé l'étude de la localisation sub-cellulaire des protéines MSI en utilisant un système de transformation transitoire et stable. Des études menées au laboratoire avaient montré que la protéine MSI4 en fusion traductionnelle avec la GFP ou une étiquette « FLAG » restait fonctionnelle quel que soit l'orientation de la fusion : N- ou C-terminale (Pazhouhandeh et al., 2011). Il en est de même pour la protéine MSI1 (Derkacheva et al., 2013).

Pour la transformation transitoire, des feuilles de *Nicotiana benthamiana* ont été infiltrées avec des suspensions d'agrobactéries contenant les vecteurs binaires avec les séquences cDNA des MSI en fusion traductionnelle avec l'eGFP sous le contrôle du promoteur, fort et constitutif, p35S du virus de la mosaïque du chou-fleur. Les observations réalisées au microscope confocal sur les cellules de revêtements de l'épiderme sont présentées

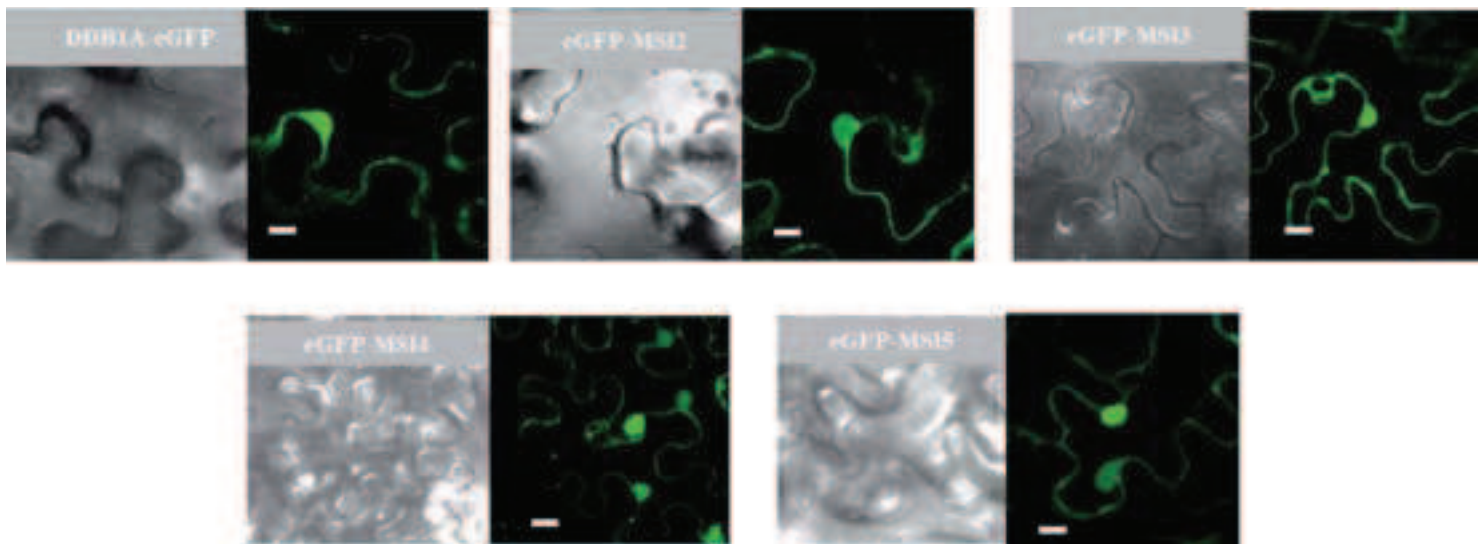


Figure 24 : Localisation sub-cellulaire des protéines DDB1A, MSI 2, MSI 3, MSI 4 et MSI5 en expression transitoire. L'expression des constructions DDB1a-GFP, GFP-MSI2, GFP-MSI3, GFP-MSI4 et GFP-MSI5 est sous contrôle du promoteur p35S. 48h après l'infiltration des feuilles de *Nicotiana benthamiana* avec les agrobactéries, les cellules de l'épiderme de feuille sont observées au microscope confocal LSM700 avec un objectif x63 à immersion à huile. Pour chaque construction testée, une image représentative du signal fluorescent (à droite) et une image en DIC (à gauche) sont présentées. Echelle = 5µm.

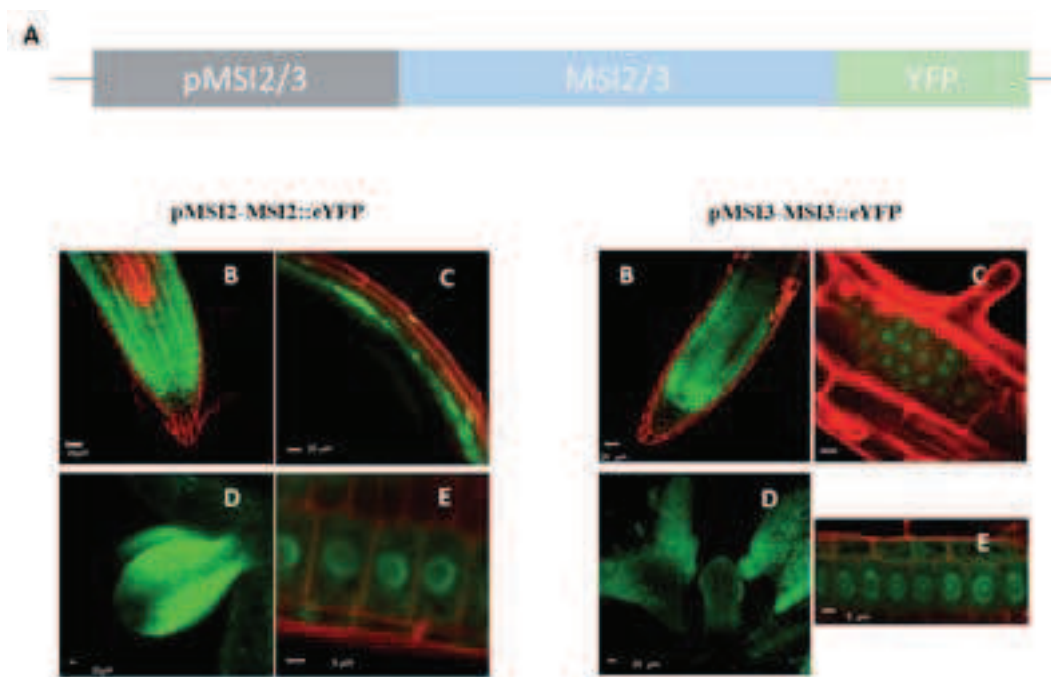


Figure 25 : Localisation sub-cellulaire et profil d'expression des gènes MSI2 et MSI3

Les plantules transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant les constructions pMSI2-MSI2::eYFP ou pMSI3-MSI3::eYFP ont été cultivées *in vitro* (A). Les observations ont été réalisées au microscope confocal LSM 700 avec un objectif à immersion à huile x63 (pour B, C et E) ou un objectif à immersion à eau x10 (pour D) sur des plantules âgées de 10 jours. Pour chaque construction testée, les résultats de l'observation du signal YFP sont représentés dans la pointe de racine primaire (B), dans un primordium de racine (C), dans la première paire de feuilles (D) et dans des noyaux de cellules de la pointe de racine (E). Pour les clichés B, C et E, une coloration à l'iodure de propidium qui marque la paroi a été rajoutée.

en **Figure 24**. Toutes les fusions eGFP-MSI testées présentent une localisation nucléaire mais aussi cytoplasmique (**Figure 24**). Ces images sont représentatives de l'ensemble des cellules qui émettent un signal fluorescent par limbe de feuille infiltrée et observée au microscope. Comme la protéine DDB1 est l'adaptateur indispensable pour recruter les protéines DCAF dans le complexe CRL4, j'ai également étudié sa localisation en fusion traductionnelle eGFP-DDB1a. Le résultat présenté sur la **Figure 24** montre pour DDB1a la même localisation nucléaire et cytoplasmique que celle des protéines MSI.

L'expression transitoire présente certaines limites dues à l'expression ectopique des protéines souvent très forte dans des systèmes hétérologues (ici des cellules de tabac). J'ai donc souhaité confirmer ces résultats de localisation sub-cellulaire en réalisant des transformations stables d'*Arabidopsis*. Au lieu d'utiliser le promoteur p35S, j'ai choisi de créer des constructions chimériques placées sous le contrôle du promoteur endogène. Pour créer ces constructions, l'amplification par PCR de l'ADN génomique couvre la séquence promotrice jusqu'à la fin du dernier exon à l'exception du codon STOP (**Figure 25A**). Les lignées transgéniques sélectionnées d'*A. thaliana* pMSI2-MSI2::eYFP et pMSI3-MSI3::eYFP ont permis de visualiser la localisation sub-cellulaire des protéines de fusion MSI2-eYFP et MSI3-eYFP dans différents tissus de la plante. Les résultats présentés dans la **Figure 25B** indiquent que les fusions MSI2-eYFP et MSI3-eYFP sont localisées dans le noyau mais également dans le cytoplasme. Les résultats de localisation, par transformation transitoire et transformation stable, sont donc similaires.

L'expression dans les cellules végétales de ces constructions pMSI2-MSI2::eYFP et pMSI3-MSI3::eYFP permet également de suivre la distribution spatio-temporelle des protéines en fusion dans les plantules à différents stades de développement. L'analyse de ces lignées complète l'information fournie par la lignée pMSI3-E1-I1-E2 :GUS et décrite en paragraphe 1-3. Dans les jeunes plantules de 10 jours cultivées *in vitro*, le signal fluorescent est principalement détecté dans les zones de prolifération : méristème de la racine principale, primordium de racine, primordium foliaire et très jeune feuille (**Figure 25 B, C, D et E**). Nous pouvons cependant noter que le signal des protéines de fusion est détecté de manière homogène dans toutes les cellules de la pointe racinaire (**Figure 25B**), suggérant que si ces protéines sont exprimées de manière cycle cellulaire dépendant elles semblent stables (ce que nous avons confirmé ci-dessous, voir Chapitre 2.2).

L'analyse des séquences de toutes les protéines MSI par recherche de signaux d'adressage nucléaire par le programme « PSORT II » révèle uniquement un motif consensus NLS pour MSI4 et MSI5 à l'extrémité N-terminale (<http://psort.hgc.jp/form2.html>) pouvant expliquer cette localisation nucléaire, cependant MSI1, MSI2, MSI3 ne comportent aucun motif consensus NLS. Le poids moléculaire moyen des protéines MSI oscille entre 48 et 56 kDa et entre 75 et 83 kDa lorsqu'elles sont en fusion traductionnelle avec l'eGFP. On peut donc exclure un phénomène de diffusion passive puisque le poids moléculaire d'exclusion du pore nucléaire est estimé de l'ordre de 60 kDa. La protéine DDB1a a un poids moléculaire bien supérieur de 121 kDa. Comme pour les protéines MSI 1, MSI 2 et MSI 3, l'analyse de sa séquence ne révèle aucun motif consensus NLS répertorié. Comme DDB1a et les protéines MSI sont localisées dans le noyau, ce résultat implique soit la présence d'un motif NLS inhabituel donc non identifiable par les algorithmes, soit le transport vers le noyau nécessite l'association à une protéine chaperonne à identifier.

En conclusion, nous pouvons dire que les protéines CUL4, DDB1a et MSI2 à 5 sont toutes localisées dans le noyau. Du fait de la localisation essentiellement nucléaire de CUL4, ceci est un pré requis pour des protéines qui participent à l'échafaudage de complexes : CRL4.

2.2 Etude de la régulation post-traductionnelle

Dans le modèle animal, il a été décrit que les protéines DCAF qui recrutent normalement le substrat vers le complexe CRL4 pouvaient elles-mêmes devenir substrat de ce complexe pour être polyubiquitinylées et finalement dégradées par le protéasome 26S. Ceci a été reporté pour la protéine WDR5 (Nakagawa et Xiong, 2011) une protéine DCAF importante pour le développement des neurones ainsi que pour les protéines DDB2 et CSA, les protéines DCAF impliquées dans les mécanismes de réparation des lésions induites sur l'ADN par les UV (El-Mahdy et al., 2006 ; Groisman et al., 2006). Dans le modèle végétal, il a également été démontré que les protéines DDB2 et CSA étaient des protéines instables et que leur dégradation impliquait le protéasome 26S (Molinier et al., 2008 ; Biedermann et Hellmann, 2010).

La stabilité des protéines MSI2 et MSI3 a été testée en présence de l'inhibiteur de synthèse des protéines : le cycloheximide (CHX). La demi-vie d'une protéine peut-être mesurée par quantification relative par Western-blot après traitement avec cet inhibiteur. Le traitement a été réalisé soit sur des disques de feuilles de *Nicotiana benthamiana* exprimant transitoirement la construction GFP-MSI3 sous contrôle du promoteur p35S après infiltration avec une suspension d'agrobactéries (**Figure 26**) soit sur des plantules de 10 jours cultivées *in vitro* de la lignée transgénique pMSI2-MSI2::eYFP exprimant la fusion MSI2-eYFP sous le contrôle de son propre promoteur (**Figure 27**). Avant de commencer le traitement, on s'assure de l'expression homogène de chacune des protéines par observation du signal émis par la GFP ou la YFP sous microscope à épifluorescence ou une loupe binoculaire équipée pour l'observation de la fluorescence.

Les échantillons ont été incubés dans un milieu MS liquide contenant le CHX solubilisé dans l'éthanol à une concentration 100 μ M finale. Un contrôle a également été réalisé dans les mêmes conditions en remplaçant la solution de CHX par de l'éthanol. Des prélèvements ont été réalisés à intervalle de temps réguliers pour en extraire les protéines totales. Pour réaliser le Western-blot, 10 μ g de protéines totales ont été déposés par puits. La stabilité des protéines a été visualisée à l'aide de l'anticorps monoclonal anti-GFP^{HRP} (anti Green Fluorescent Protein-Horseradish Peroxidase, Miltenyi Biotec) conjugué à la peroxidase et dilué au 1/5000^{ème}. L'anticorps anti-tubuline est utilisé comme témoin de charge.

Comme le montre la **Figure 26**, la quantité de protéines eGFP-MSI3 est stable au cours du temps en présence ou en absence d'inhibiteur CHX sur une période de 3 heures. La **Figure 27** montre que la quantité de protéine MSI2-eYFP est également stable au cours du temps en présence ou en absence d'inhibiteur. Afin de déterminer l'implication de la voie de dégradation spécifique des protéines par le protéasome 26S dans la dégradation de la protéine d'intérêt, on utilise un inhibiteur du protéasome 26S, le MG132, combiné à un traitement CHX. Dans notre cas, j'ai choisi de ne pas traiter les plantes au MG132, dans la mesure où celles-ci sont stables, suggérant qu'elles ne sont pas des substrats directs du complexe CRL4.

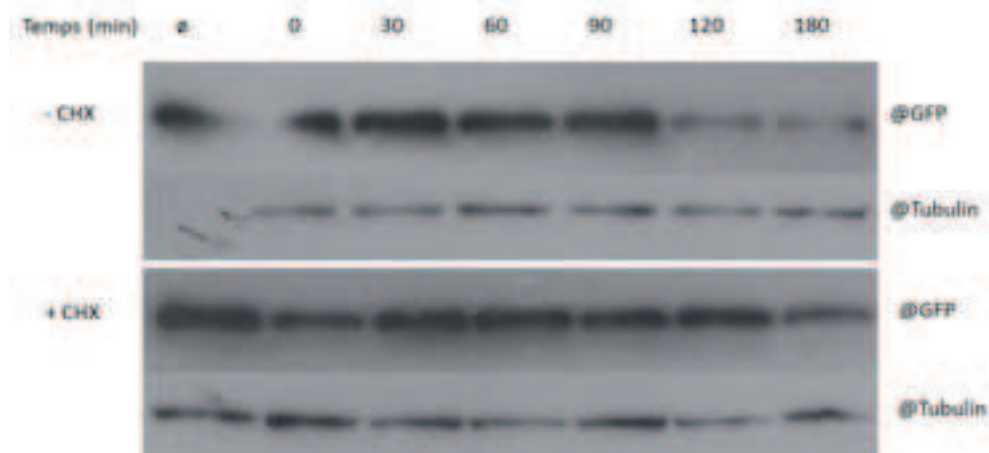


Figure 26 : Analyse de la stabilité de la protéine GFP-MSI3 en présence de cycloheximide.

Le système d'expression transitoire par agro-infiltration de feuilles de *N.benthamiana* a permis de suivre par Western blot la stabilité de la protéine de fusion GFP-MSI3 en présence de cycloheximide (+ CHX) ou en absence de cycloheximide (- CHX). 48h après agroinfiltration, des disques de feuilles exprimant la protéine de fusion ont été incubés dans un milieu MS liquide en présence de 100 μ M de CHX et les prélèvements ont été effectués toutes les 30 min. Le contrôle sans cycloheximide est réalisé en présence d'éthanol. La première piste correspond au contrôle sans traitement (ø). Le point 0 a été prélevé 10 minutes après l'infiltration sous vide. 10 μ g de protéines totales sont déposés par piste et les immunoblots sont incubés avec un anticorps dirigé contre la GFP et la tubuline. La tubuline sert de contrôle de charge et le signal détecté est en accord avec la quantité totale de protéines détectées après coloration au bleu de Coomassie (résultats non présentés).



Figure 27 : Test de la stabilité de la protéine YFP-MSI2 en présence de cycloheximide.

Des plantules transgéniques exprimant la construction pMSI-MSI2::YFP sont utilisées pour suivre par Western blot la stabilité de la protéine de fusion YFP-MSI2 en présence de cycloheximide (+ CHX) ou en absence de cycloheximide (- CHX). Des jeunes plantules cultivées *in vitro* de 10 jours ont été incubées dans un milieu MS liquide en présence de 100 μ M de CHX et les prélèvements ont été effectués toutes les 30 min. Le contrôle sans cycloheximide a été réalisé en rajoutant l'éthanol. La piste ø correspond au contrôle sans traitement. Le point 0 a été prélevé 10 minutes après l'infiltration sous vide. 10 μ g de protéines totales ont été déposés par piste et les immunoblots ont été incubés avec un anticorps dirigé contre la GFP et la tubuline. La tubuline sert de contrôle de charge et le signal détecté est en accord avec la quantité totale de protéines révélées après coloration au bleu de Coomassie (résultats non présentés).

3. Etude de la fonction des gènes MSI 2 et MSI3

3.1 Un nouvel outil : anticorps anti-AtMSI3 et anti-AtMSI4

A mon arrivée au laboratoire, des anticorps polyclonaux dirigés contre la protéine CUL4 et la protéine DDB1a/b d'*Arabidopsis* étaient déjà disponibles (Bernhardt et al., 2006 ; Dumbliauskas et al., 2011). Pour élargir la gamme des outils indispensables à l'étude du complexe CRL4 impliquant les protéines MSI, j'ai lancé la production d'anticorps dirigés contre les protéines MSI3 et MSI4. Ce choix a été dicté par le résultat des comparaisons de séquences des membres de la famille. Les protéines MSI2 et MSI3 présentent un tel degré de similarité (82,41%, **Figure 19B**) qu'il me paraissait improbable de pouvoir élaborer spécifiquement des anticorps polyclonaux capables de différencier les 2 protéines. J'ai donc préféré cibler 2 protéines MSI appartenant à 2 clades différents de la famille.

La première étape consistait à réaliser le clonage des séquences complètes des ADNc dans un vecteur d'expression bactérien pour produire la totalité de la protéine. En effet, la comparaison de séquence ne permet pas de cibler une région spécifique peu conservée entre les 2 protéines. J'ai pu profiter de l'aide technique de la plateforme de production et de purification des protéines de l'IBMP pour obtenir une protéine recombinante étiquetée avec un tag 6xHis suffisamment pure et en quantité suffisante pour aller à la deuxième étape. Chaque protéine recombinante a servi à immuniser 2 lapins sur la plateforme de production d'anticorps de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire à Illkirch / Strasbourg. Les sérums pré-immuns et du quatrième (dernier) prélèvement après immunisation ont été testés par Western blot. Les résultats, non présentés dans ce mémoire, indiquaient une reconnaissance de la protéine purifiée, d'une protéine d'un poids moléculaire attendu dans un extrait de plantes Col0 et l'absence du signal correspondant dans des extraits protéiques des mutants KO correspondants. Comme il existait de nombreux signaux aspécifiques, j'ai procédé à une purification des différents anticorps polyclonaux à l'aide de colonnes d'affinité avec la protéine native fixée sur une résine HIS Trap pour MSI3 et MSI4. Les résultats des tests d'affinité et de spécificité de reconnaissance des anticorps polyclonaux purifiés pour @MSI3 et @MSI4 sont présentés sur la **Figure 28**. Le premier encadré indique l'unique signal révélé pour chacun des anticorps pour un extrait protéique de plantules Col0.

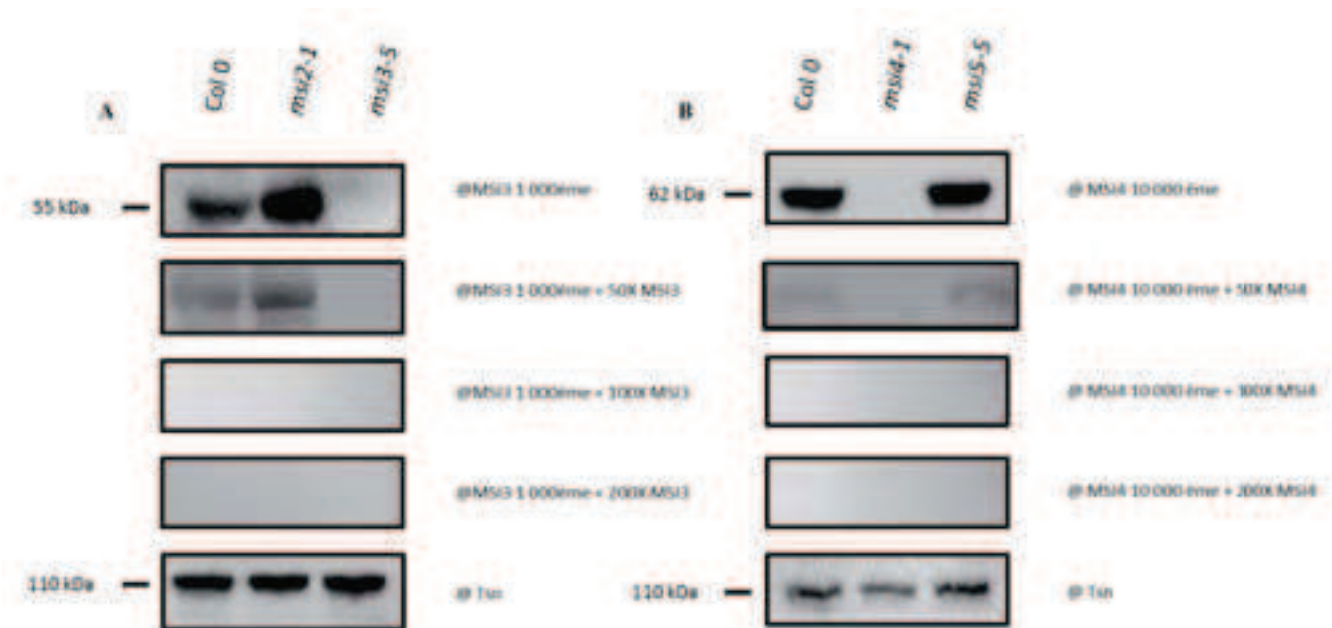


Figure 28 : Test de la spécificité des anticorps dirigés contre les protéines MSI3 et MSI4.

- A. **Test de compétition pour valider la spécificité des anticorps anti-MSI3.** 10 µg de protéines totales extraites de plantes Col0, d'un mutant KO *msi2-1* et d'un mutant KO *msi3-5* ont été analysés par Western-blot. La première ligne présente les résultats de l'incubation avec l'anticorps @MSI 3 dilué au 1000^{ème}. Les 3 lignes suivantes présentent les résultats du test de compétition effectué avec un excès molaire de protéines MSI3 purifiées de 50× à 200× par rapport à l'anticorps. La dernière ligne présente un contrôle de charge en utilisant un anticorps @Tsn (AntiTUDOR-SN).
- B. **Test de compétition pour valider la spécificité des anticorps anti-MSI4.** 10 µg de protéines totales extraites de plantes Col0, d'un mutant KO *msi4-1* et d'un mutant KO *msi5-5* ont été analysés par Western-blot. La première ligne présente les résultats de l'incubation avec l'anticorps @MSI 4 dilué au 10 000^{ème}. Les 3 lignes suivantes présentent les résultats du test de compétition effectué avec un excès molaire de protéines MSI4 purifiées de 50× à 200× par rapport à l'anticorps. La dernière ligne présente un contrôle de charge en utilisant un anticorps @Tsn (anti TUDOR-SN).

Les encadrés intermédiaires montrent le résultat des tests de compétition réalisés pour les 2 anticorps avec un excès molaire de 50 à 200 fois plus de protéines natives. Le but de ce test de compétition est de masquer tous les paratopes des anticorps par l'antigène qui a servi à les élaborer. On peut remarquer que le signal de reconnaissance est perdu dès une compétition avec un excès molaire de 100 fois. Le premier encadré indique également l'absence du signal pour le mutant nul correspondant : *msi3-5* pour l'anticorps anti-MSI3 et *msi4-1* pour l'anticorps MSI4. Ce résultat indique clairement l'absence de réaction croisée avec la protéine de même clade ; l'anticorps anti-MSI3 ne reconnaît pas MSI2 et l'anticorps anti-MSI4 ne reconnaît pas MSI5. L'ensemble de ces résultats nous a permis de démontrer que les anticorps polyclonaux produits étaient hautement spécifiques des protéines MSI3 ou MSI4. J'ai également pu définir les conditions d'utilisation de ces anticorps. L'anticorps @MSI3 est utilisable à une dilution de 1 :1000 et l'anticorps @MSI4 est utilisable à une dilution de 1 :10 000. Grâce à ces anticorps polyclonaux, nous avons maintenant de nouveaux outils qui pourront être exploités pour mettre en évidence des complexes CRL4 impliquant des protéines MSI.

Au cours de ma thèse, je me suis rendue compte que l'anticorps dirigé contre la protéine DDB1a/b n'était pas exploitable pour un certain nombre d'expérimentation. J'ai donc décidé de produire également un nouvel anticorps polyclonal dirigé contre DDB1a. La production de la protéine entière en système hétérologue n'a pas été possible donc j'ai réalisé le clonage de 3 fragments d'ADNc de 1000 pb chacun. Le choix des fragments d'ADN amplifiés et clonés a été fait en se basant sur la structure cristallographique disponible de la protéine DDB1 humaine (Li et al., 2006). Grâce à cette information, nous avons pu exclure les sites de liaisons occupés au sein du complexe. L'étape de production de protéine est franchie et j'attends les sérums après immunisation des lapins pour caractériser leur spécificité.

3.2 Mise en évidence du complexe CRL4^{MSI2/MSI3}

Le complexe CRL4 dans le modèle végétal a fait l'objet de nombreuses études publiées à ce jour. La présence de différentes protéines DCAF dans ce complexe a été explorée et démontrée. Les techniques expérimentales mises en œuvre couvrent toute la palette des techniques qui visualisent l'interaction directe entre deux partenaires protéiques ou qui permettent de purifier le complexe *in planta* et de révéler la présence des différents



Figure 29 : Tests d'interaction par double hybride dans la levure. Les levures AH109 coexprimant les constructions indiquées dans les colonnes de gauche sont cultivées sur milieu non sélectif (-LW), sur milieu sélectif sans histidine (-LWH) et sur milieu sélectif sans histidine contenant 2,5 mM de 3AT un inhibiteur compétitif de l'enzyme HIS3 de levure (-LWH 2,5mM 3AT). Les levures sont d'abord cultivées en milieu liquide pour obtenir une DO600nm de 0.6. Le test en goutte est réalisé après dilution en cascade d'un facteur 10. Les levures sont observées après 3 jours de culture à 30°C.

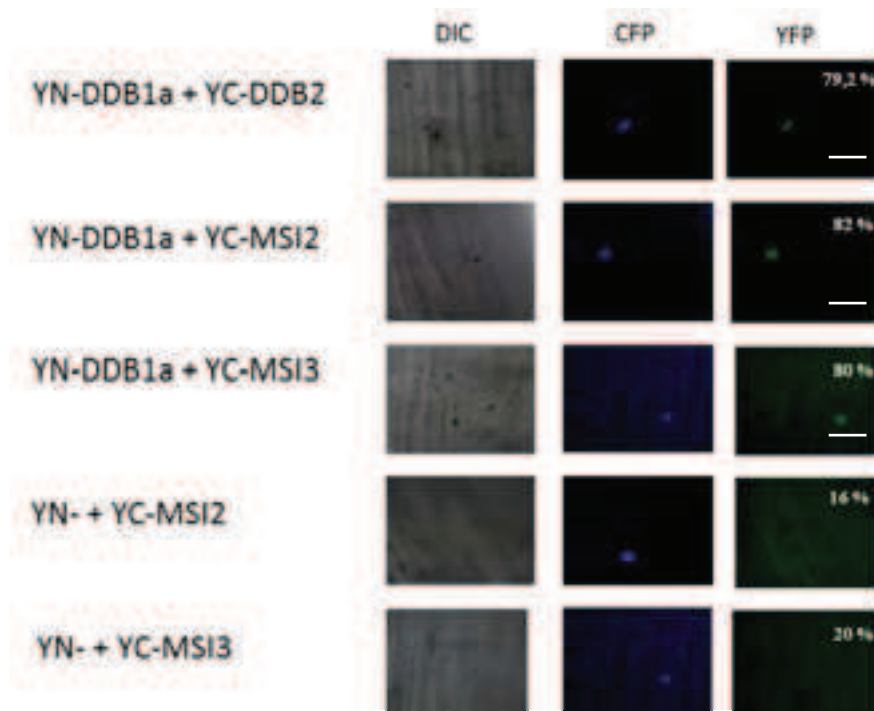


Figure 30 : Test d'interaction par la technique BiFC.

Les différentes combinaisons de plasmides permettant l'expression des séquences amino-terminales (YN-) ou carboxy-terminales (YC-) de la protéine fluorescente YFP en fusions avec les protéines à tester sont indiquées à gauche. Après bombardement, les cellules d'hypocotyles de moutarde sont observées au microscope à épifluorescence. L'expression de CRFP2 fusionnée à la CFP a systématiquement été incluse afin d'identifier les cellules transformées. Les images ont été prises 20H après bombardement à l'aide de filtres spécifiques CFP (au centre) ou YFP (à droite). A gauche, sont présentées les images de DIC. La fluorescence de la protéine YFP reconstituée est uniquement détectée dans les noyaux ; c'est le compartiment cellulaire où ont lieu les interactions. Le résultat pour chaque combinaison testée est exprimé en %. Chaque photographie est représentative du résultat observé par combinaison de constructions testées. Echelle = 40 µm.

composants d'un complexe. Dans notre laboratoire, nous avons publié la présence des protéines DDB2, de MSI1 et MSI4 dans différents complexes CRL4 avec CUL4 *in planta* par co-immunoprécipitation (Molinier et al., 2008 ; Dumbliuskas et al., 2011 ; Pazhouhandeh et al., 2011). Nous avons également montré que MSI1 et MSI4 interagissaient directement avec DDB1a par double hybride dans la levure et par BiFC (Bimolecular Fluorescent Complementation). L'étude de la protéine ATCSA a également démontré son interaction directe avec DDB1a et sa présence dans un complexe avec CUL4 (Biedermann et Hellmann, 2010). Enfin, l'étude publiée par Lee et al., en 2008 a décrit la co-immunoprécipitation de plusieurs protéines DCAF avec la protéine CUL4 *in planta*. Parmi la liste des protéines DCAF testées figurait MSI3. Sur la base de cet ensemble de résultats, j'ai exploité plusieurs approches expérimentales afin de montrer l'existence de complexes CRL4^{MSI2} et CRL4^{MSI3} chez *Arabidopsis*.

3.2.1 Tests d'interaction en système hétérologue

J'ai commencé par l'utilisation de la technique du double hybride dans la levure qui est basée sur la reconstitution d'un facteur de transcription chimérique (GAL4) chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour tester l'interaction de l'adaptateur de substrat DDB1a et le récepteur de substrat (MSI2 ou MSI3) *in vivo*. Chaque partenaire est fusionné soit au domaine DBD (DNA Binding Domain), soit au domaine AD (Activation Domain) du facteur de transcription GAL4. L'interaction des protéines testées permet la reconstitution du facteur de transcription qui pourra se lier aux éléments GAL4-UAS du promoteur et ainsi activer la transcription des gènes rapporteurs (Fields et Song, 1989). Les souches de levures que nous utilisons sont auxotrophes par rapport à l'histidine et à l'adénine ; les gènes rapporteurs sont le gène *HIS3* et le gène *ADE2* et leur expression permet de lever l'auxotrophie. J'ai utilisé l'interaction DDB1a-DDB2 comme contrôle positif et la **Figure 29** montre effectivement que les levures sont capables de se développer sans histidine quelle que soit l'orientation de la fusion des 2 protéines DDB1 et DDB2. L'interprétation et l'utilisation de cette technique dans le cas des protéines MSI2 et MSI3 est toutefois plus difficile car j'observe un phénomène d'auto-activation pour les deux protéines en fusion avec le domaine BD et même pour MSI2 en fusion avec le domaine AD (**Figure 29**). Afin de limiter cette auto-activation, j'ai rajouté dans le milieu du 3-AT à une concentration finale de 2.5 mM. Cette concentration est

recommandée pour s'affranchir du phénomène d'auto-activation sans perturber les interactions mêmes faibles des partenaires testés. Le 3-AT est un inhibiteur compétitif de l'enzyme HIS3 de levures (Fields, 1993; Durfee et al., 1993). Dans ces conditions, après plusieurs essais, je n'ai pas pu observer l'interaction entre DDB1a et MSI2 ou MSI3 (**Figure 29**).

3.2.2 Tests d'interaction basés sur des techniques de microscopie

En parallèle de cette étude en système hétérologue, j'ai également testé des techniques qui permettent de montrer l'interaction protéine-protéine dans la cellule végétale. La technique disponible au laboratoire et couramment utilisée est la technique BiFC encore appelée « split YFP » basée sur la visualisation de la fluorescence. Cette approche permet la reconstitution fonctionnelle d'une protéine fluorescente YFP lorsque les protéines en fusion traductionnelle l'une avec la partie N-ter de YFP (YN) et l'autre avec la partie C-ter de YFP (YC) interagissent. Dans le laboratoire, nous utilisons la transformation transitoire par biolistique de cellules d'hypocotyles de moutarde qui ont germé à l'obscurité. La transformation se fait par bombardement à l'aide de billes d'or enrobées d'ADN plasmidique correspondant aux constructions *YN-DDB1a*, *YC-MSI2*, *YC-MSI3* ou *YN- θ* placées sous contrôle du promoteur p35S. 20h après bombardement, les hypocotyles de moutarde sont observés au microscope à épifluorescence (**Figure 30**). Le signal YFP est comptabilisé uniquement dans les cellules qui expriment également une fluorescence CFP, un contrôle de transformation des cellules. Pour chaque expérience, j'ai observé et comptabilisé un minimum de 50 cellules CFP positives. L'interaction entre les protéines DDB1 et DDB2 sert de contrôle positif et montre près de 80% (n=53) de cellules avec une fluorescence YFP. Dans 82% (n=50) des cas, un signal YFP est observé en épi-fluorescence lorsque DDB1a est mis en présence de MSI 2 et ce chiffre est de 80% (n=50) lorsque DDB1a est mis en présence de MSI3. Les contrôles négatifs mettant en œuvre MSI 2 ou MSI 3 avec un vecteur vide *YN- θ* montrent un signal YFP reconstitué et souvent plus faible respectivement dans 16% (n=48) et 20 % (n=45) des cas, rendant les données obtenues exploitables. Grâce à cette technique, j'ai pu mettre en évidence une interaction directe entre DDB1a et MSI 2 ou MSI 3 avec la même efficacité que DDB1a et DDB2 dans les cellules végétales.

Au cours de ma thèse, l'institut s'est équipé avec la technologie nécessaire pour réaliser des expériences de FRET-FLIM pour étudier des interactions protéine-protéine (Chen et al., 2003). Le FRET-FLIM est basé sur le temps de demi-vie d'un donneur (protéine fusionnée à la GFP ou YFP) en présence ou absence d'un accepteur (protéine fusionnée à la RFP). On peut calculer la distance entre la protéine en fusion avec un tag YFP et celle en fusion avec un tag RFP. Cette distance est évaluée en pourcentage (%) de FRET-FLIM. On considère qu'il y a interaction entre deux protéines lorsque celles-ci ont un pourcentage de FRET-FLIM compris entre 5 et 30%. J'ai réalisé des expériences sur des feuilles agro-infiltrées de *Nicotiana benthamiana*, pour exprimer de manière transitoire sous contrôle du promoteur p35S les combinaisons DDB1a-mRFP / MSI2:eYFP et DDB1a-mRFP / MSI3 :eYFP . Ces expériences sont restées infructueuses, suggérant que le modèle *Nicotiana benthamiana* n'était pas le plus adapté. Des plantes transgéniques d'*Arabidopsis* exprimant à la fois p35S :DDB1a-mRFP et pMSI2-MSI2:eYFP ou pMSI3-MSI3 :eYFP sont en cours de génération et devraient permettre de répondre à cette question.

3.2.3 Tests d'interaction basés sur des techniques biochimiques in situ

Ce dernier volet est dédié aux techniques biochimiques que j'ai mises en œuvre pour déceler la présence des protéines MSI2 et MSI3 dans un complexe impliquant également CUL4. Les techniques de co-immunoprécipitation consistent à partir d'un extrait cellulaire, et grâce à un anticorps spécifique d'immunoprécipiter une protéine d'intérêt ainsi que ses partenaires. L'analyse par Western-blot permet de révéler les différents protagonistes connus (Phizicky et Fields, 1995). Lors de ma thèse, j'ai effectué ces expériences sur différents tissus : feuilles agro-infiltrées de *Nicotiana benthamiana*, plantules transgéniques d'*Arabidopsis thaliana* et suspension de cellules en culture d'*Arabidopsis*.

Pour démarrer ce travail, je me suis basée sur les conditions expérimentales de co-IP publiées par Derrien et al., 2012. Le premier test a été réalisé avec le tampon d'extraction appelé EB, et décrit dans le matériel et méthodes, pour solubiliser les protéines extraites de feuilles de *Nicotiana benthamiana* exprimant de manière transitoire les constructions p35S::4xmyc-DDB1a (obtenues de Fredy Barnèche, Laboratoire de C.Bowler ENS, Paris) et p35S ::GFP-MSI2 ou MSI3 après agro-infiltration. Dans ce premier essai dont les conditions

	Constructions	35S:myc-DDB1a ou 35S: DDB1a-eGFP				
Extraits totaux de protéines ; tampon dénaturant	Tampon d'extraction utilisé	EB2	EB NP40 0,5%	EB	EB NaCL 300 mM	Différents CHAPS
	DO d'infiltration et nombre de jours d'incubation	DO =1 ou DO = 0,7				
		J1 ou J2				
	Anticorps utilisés pour l'IP et / ou l'immunoblot	anti myc Roche ou anti GFP Invitrogen				
		anti DDB1a				
	Type et % de gels	SDS-page 8%				
Les protéines sont détectées	Résultats	Ne permet pas de visualiser la protéine DDB1a par immunoblot				Meilleurs résultats obtenus avec CHAPS 3

Figure 31 : Récapitulatif des différents tests d'extraction de DDB1a exprimée de manière transitoire dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*. Les constructions testées sont extraites de feuilles de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrées avec différents tampons. Les extraits obtenus sont d'une part déposés sur gel SDS-Page afin d'être visualiser par immunoblot directement, et d'autre part immunoprécipités afin d'enrichir l'extrait puis déposés sur gel SDS-Page pour visualisation par immunoblot.

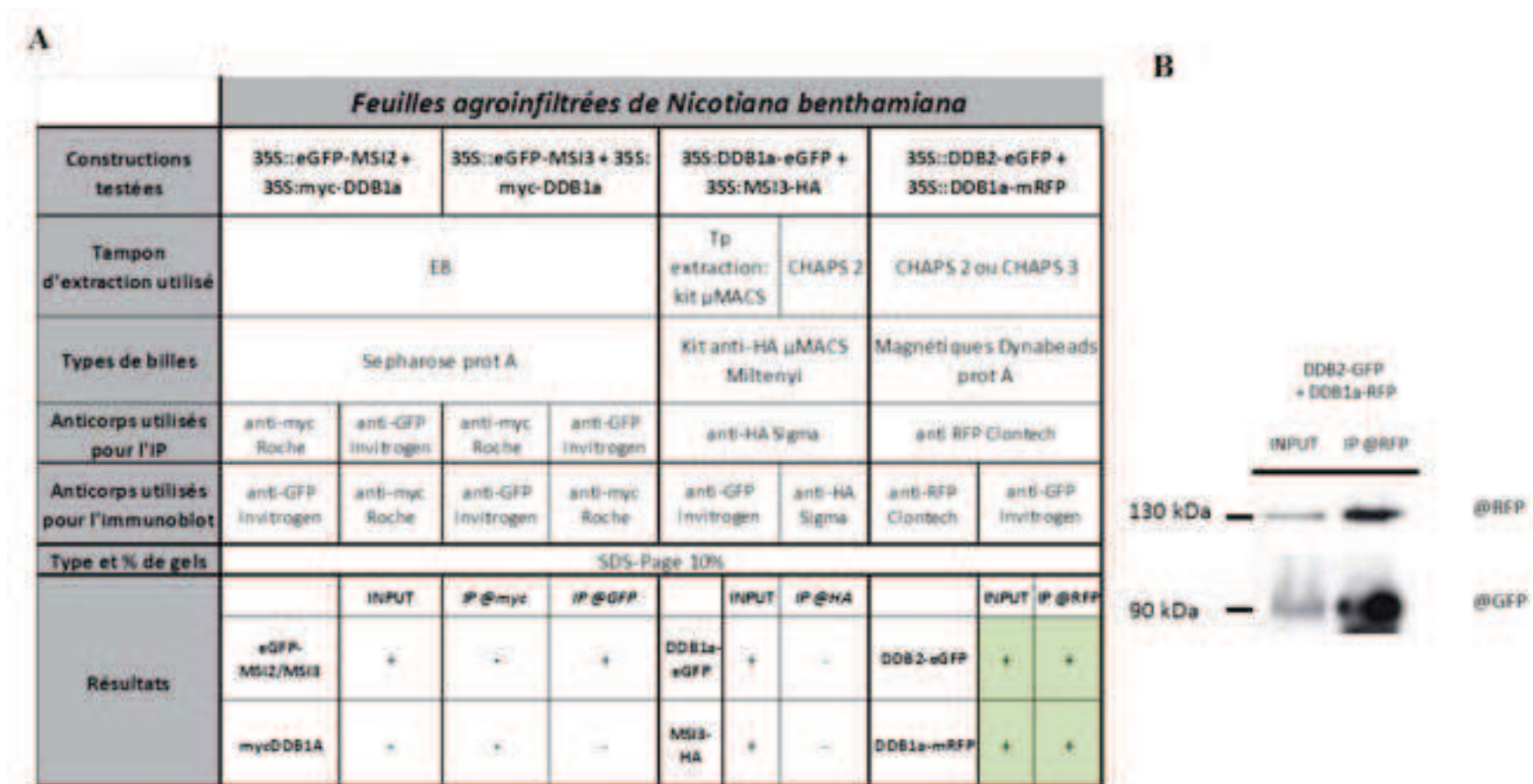


Figure 32 :

- A. Résultats des co-IP réalisées à partir de feuilles de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrées et exprimant les constructions indiquées.** Le type de tampon, l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation, pour l'immunoblot, le type et le pourcentage de gels utilisés sont indiqués. Pour chaque condition testée, le résultat est indiqué, ' + ' signifiant la présence d'un signal à la taille attendue sur l'immunoblot, ' - ' l'absence de signal.
- B. Immunoblot de co-IP réalisées à partir de feuilles de *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrées co-exprimant les constructions 35S ::DDB2-eGFP et 35S ::DDB1a-mRFP.** Immunoblot réalisé à partir d'extrait de *Nicotiana benthamiana* après immunoprécipitation de la construction 35S ::DDB1a-mRFP par l'anticorps RFP utilisé au 1000^{ème}. 2 volumes d'INPUT sont chargés pour 1 volume d'extrait après IP. L'anticorps anti-RFP Clontech est utilisé au 2000^{ème} et l'anticorps anti-GFP est utilisé au 5000^{ème}.

expérimentales sont résumées en **Figure 32A**, je n'ai pas pu visualiser la présence de DDB1a dans l'extrait avant co-IP. Ceci implique que la protéine n'a pas été solubilisée et j'ai essayé de modifier la composition de ce tampon pour améliorer ce point. Les modifications apportées sont rassemblées dans le « matériel et méthodes ». J'ai principalement changé la nature du détergent en remplaçant le détergent NP40 par du CHAPS. Le détergent non-ionique NP40 est classiquement utilisé pour lyser les cellules et solubiliser les protéines. Le CHAPS est un détergent non-dénaturant recommandé pour solubiliser les protéines membranaires. L'utilisation d'un tampon contenant 0,1% de CHAPS permet de solubiliser DDB1a après expression transitoire dans des feuilles de *N. benthamiana* (**Figure 31**). L'utilisation de ce tampon modifié m'a également permis de montrer par co-IP, l'interaction entre DDB1a-eGFP et DDB2-mRFP lorsque les deux protéines sont exprimées de manière transitoire dans les feuilles de *N. benthamiana* (**Figure 32B**). L'interaction forte et démontrée entre ces deux protéines nous sert de contrôle positif. Par contre, les expériences menées dans les mêmes conditions ne me permettent pas de démontrer par co-IP une interaction entre DDB1a-eGFP et MSI3-HA.

Un travail similaire a été mené à l'aide de plantes transgéniques d'*Arabidopsis* en exploitant tout d'abord les lignées p35S::MSI2-eGFP ou p35S::MSI3-eGFP et les anticorps polyclonaux dirigés contre les protéines CUL4 et DDB1a/b disponibles au laboratoire. Les différentes combinaisons d'anticorps utilisés pour les expériences de co-IP ne m'ont pas permis de montrer l'interaction de MSI2-eGFP ou MSI3-eGFP ni avec DDB1a/b ni avec CUL4. Les résultats sont résumés en **Figure 33A**. Dans les derniers tests réalisés avec les plantes transgéniques d'*Arabidopsis*, j'ai exploité les plantes pMSI2::MSI2-eYFP / *msi2-1*(-/-) et pMSI3::MSI3-eYFP / *msi3-5*(-/-) décrites dans le paragraphe 2-1. Dans les deux cas, nous avons généré les plantes transgéniques en transformant un mutant homozygote nul correspondant. La description de ces mutants d'insertion T-DNA se trouve dans le paragraphe 4-1. L'utilisation de ces plantes permet d'éviter les phénomènes de compétition entre la protéine endogène et la version en fusion avec la eYFP. Cette compétition peut être en défaveur de la protéine modifiée par la fusion par rapport à sa liaison au complexe. L'analyse de ces plantes en microscopie a également révélé une accumulation préférentielle des protéines dans les tissus en prolifération (**Figure 25**). Pour réaliser les expériences de co-IP, j'ai donc choisi de prélever uniquement les pointes de racines de plantules de 10 jours cultivées *in vitro* en boîtes de Petri verticales. Les résultats décrits en **Figure 33B** indiquent

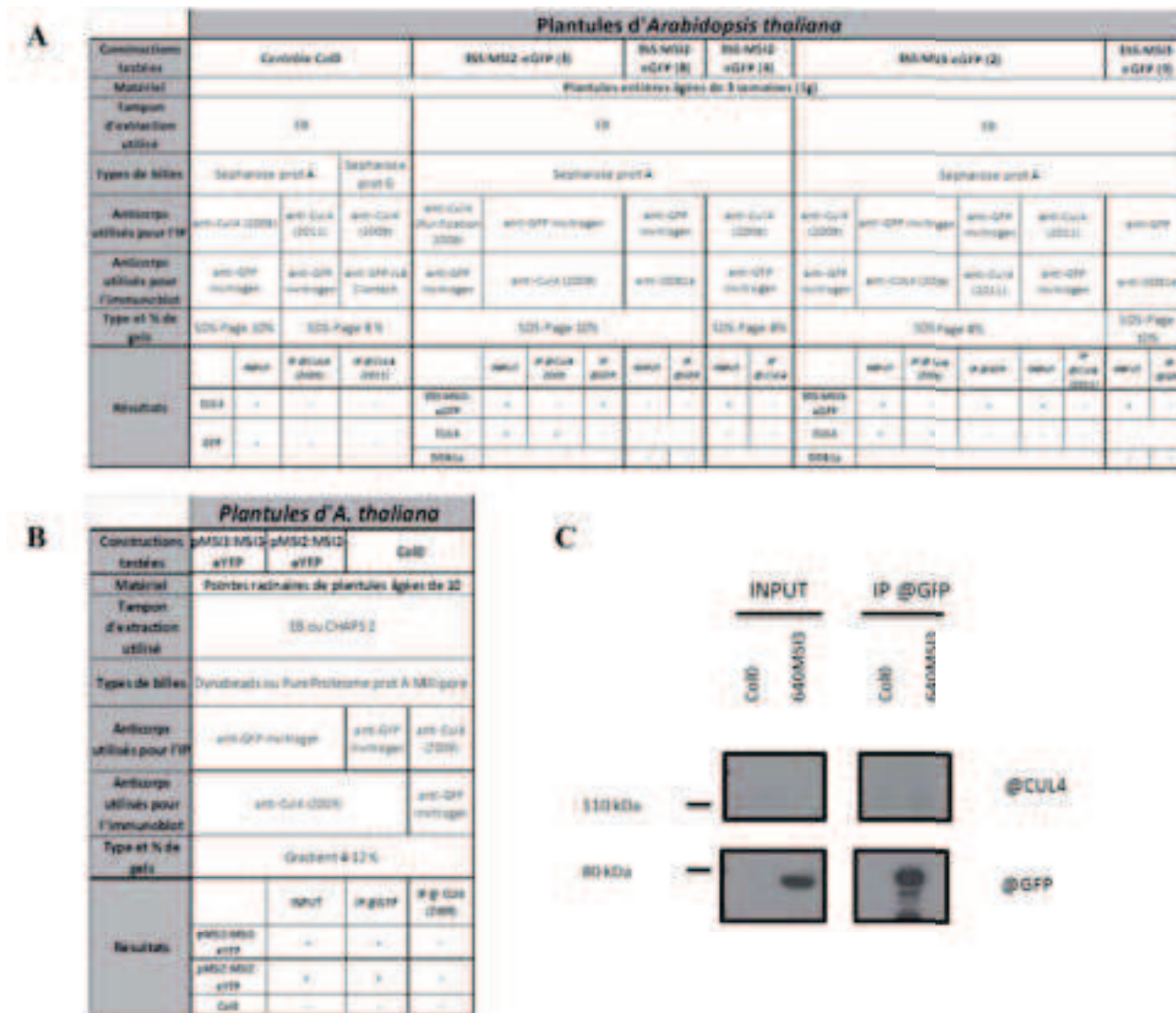


Figure 33 :

- A. Résultats des co-IP réalisées à partir de plantules d' *Arabidopsis thaliana* âgées de 3 semaines.** Le type de tampon, l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation, pour l'immunoblot, le type et le pourcentage de gels utilisés sont indiqués. Pour chaque condition testée, le résultat est indiqué, ' + ' signifiant la présence d'un signal à la taille attendue sur l'immunoblot, ' - ' l'absence de signal.
- B. Résultats des co-IP réalisées à partir de pointes racinaires de plantules d' *Arabidopsis thaliana* âgées de 10 jours.** Le type de tampon, l'anticorps utilisé pour l'immunoprécipitation, pour l'immunoblot, le type et le pourcentage de gels utilisés sont indiqués. Pour chaque condition testée, le résultat est indiqué, ' + ' signifiant la présence d'un signal à la taille attendue sur l'immunoblot, ' - ' l'absence de signal.
- C. Immunoblot de co-IP réalisées à partir de pointes racinaires de plantules d' *Arabidopsis thaliana* exprimant pMS13-MS13:eYFP.** Immunoblot réalisé à partir d'extract d' *Arabidopsis thaliana* après immunoprécipitation de pMS13-MS13:eYFP par l'anticorps anti-GFP utilisé au 1000ème. 2 volumes d'INPUT sont chargés pour 1 volume d'extract après IP. L'anticorps anti-GFP est utilisé au 2000ème et l'anticorps anti-Cul4 est utilisé au 2500ème.

que les protéines en fusion MSI2-eYFP et MSI3-eYFP sont bien détectables avant et après co-IP mais il est impossible de déceler la protéine CUL4 (**Figure 33C**). Ce résultat suggère soit une expression faible de la protéine CUL4 dans ce tissu soit une versatilité des anticorps @CUL4 dont nous disposons.

Comme j'ai préparé des anticorps dirigés spécifiquement contre les protéines MSI3, j'ai réalisé une dernière étude par co-IP en utilisant une suspension de cellules d'*Arabidopsis* en culture. L'étude du profil d'expression des gènes *MSI 2* et *MSI 3* indique une expression corrélée à la prolifération cellulaire (**Figure 25**). Une culture de cellules d'*Arabidopsis* me semblait être un bon modèle représentatif de cellules indifférenciées qui se multiplient. Les cellules ont été prélevées au bout de 4 jours de culture c.à.d des cellules en phase exponentielle de croissance. Les différents tampons d'extractions de protéines testés dans le cadre de cette étude ainsi que les résultats obtenus sont présentés dans la **Figure 34A**. Après une phase de mise au point, j'ai enfin pu obtenir un résultat positif en travaillant sur les protéines MSI 3 et CUL4 non étiquetées. La **Figure 34B** illustre le résultat de la co-immunoprécipitation réalisée soit avec l'anticorps @MSI3 qui révèle la présence de CUL4, soit avec l'anticorps @CUL4 qui révèle la présence de MSI 3. Cette expérience est la seule qui m'ait permis de montrer *in situ* la présence de MSI 3 dans un complexe impliquant aussi CUL4. Un tel résultat s'explique uniquement dans la configuration d'un complexe CRL4.

L'étude des protéines MSI 1 et MSI 4 réalisée dans deux laboratoires différents, a permis de montrer leur appartenance à un complexe de haut poids moléculaire. Les deux études ont mis en œuvre une stratégie de gel filtration par chromatographie d'exclusion. Dans le cas de l'expérience réalisée avec MSI 4, la protéine est présente dans un complexe de 1000 kDa (Jeon et al., 2011) mais les auteurs n'ont pas encore identifié les autres protéines du complexe. Dans le cas de l'expérience réalisée avec MSI 1, la protéine est présente dans un complexe de 650 kDa (Köhler et al., 2003). Cette étude était menée dans le cadre du complexe Polycomb PRC2 auquel MSI 1 est associé et non dans le cadre d'un complexe CRL4 donc on ne peut savoir si CUL4 en fait partie.

J'ai voulu tirer profit de l'expérience acquise en biochimie des protéines et de mes résultats de mise au point de tampon de solubilisation des protéines MSI 2, MSI 3, DDB1a, afin de réaliser également une étude par gel filtration focalisée cette fois-ci sur les protéines



Figure 35 : Gel-filtration d'un extrait total de protéines issues de boutons floraux de lignées exprimant pMSI3-MSI3 ::eYFP. Le blot supérieur représente le Western-blot de chaque fraction issue de la gel-filtration. Un volume égal de chaque fraction après précipitation au TCA a été séparé sur un gel SDS-PAGE 10% et soumis à une analyse avec un anticorps @GFP Clontech dilué au 2000ème. Chaque fraction a été colorée au bleu de Coomassie (blot inférieur). La colonne HiPrep 16/60 Sephacryl S-300 HR a été préalablement calibrée avec des marqueurs de taille connue.

MSI 2, MSI 3 et CUL4. En outre une telle étude permettra également l'identification d'autres partenaires. La première expérience a été réalisée avec un extrait protéique de suspension de cellules en cultures d'*Arabidopsis* et a permis de montrer que MSI 3 se présentait sous trois formes. J'ai pu visualiser deux complexes de 1 000 kDa et 700 kDa respectivement ainsi que la forme monomérique. L'analyse par immunoblot a permis de montrer que CUL4 était également présente dans les fractions correspondantes de ce complexe de 1 000 kDa. Ces résultats préliminaires sont présentés en annexe 2. Ce résultat positif m'a encouragé à refaire un deuxième essai en utilisant un extrait protéique provenant de boutons floraux fermés de plantes pMSI3::MSI3-eYFP / *msi3-5*(-/-). Les résultats préliminaires de cette deuxième expérience sont présentés en **Figure 35**. Chaque fraction de 1 mL récoltée a été précipitée au TCA et repris dans 30 µL de tampon Laemmli 4X. Une analyse par Western-blot a été réalisée sur 15 µL d'extrait précipité pour chaque fraction. L'immunoblot a été révélé en utilisant l'anticorps monoclonal anti-GFP JL8 (Clontech) dilué au 2 000ème. On peut observer que la protéine MSI3 est présente sous trois formes qui sont les mêmes que celles identifiées dans l'expérience réalisée avec des cellules d'*Arabidopsis* en culture. Ces résultats devront être confirmés ainsi que la présence des protéines CUL4, DDB1a/b et RBX1 dans les fractions de très haut poids moléculaire vérifiées.

Toutes ces expériences ont permis de montrer la présence d'un complexe $CRL4^{MSI2/MSI3}$ dans des cellules en prolifération suggérant une spécificité d'action de ce complexe.

4. Identification de substrats des complexes $CRL4^{MSI}$

Dans ce paragraphe, je vais décrire les résultats obtenus par la mise en œuvre de deux techniques couramment employées pour mettre en évidence des interactions protéine-protéine et au final identifier des protéines appartenant à un complexe : i- recherche de partenaire de la protéine d'intérêt par la mise en évidence d'interactions binaires recherchées à partir d'une banque d'ADNc grâce au crible double hybride dans la levure et ii- une méthode de purification par affinité appelée TAP-tag pour « Tandem Affinity Purification ». Dans la première partie, nous nous sommes intéressés au complexe CRL4 en recherchant les protéines capables d'échafauder un complexe autour de CUL4 chez *Arabidopsis*. Naïvement nous avons espéré identifier par cette approche un grand nombre de DCAF, dont les protéines

MSI. Dans un deuxième temps, nous avons cherché plus spécifiquement à identifier les protéines capables d'interagir avec les protéines MSI 2 et MSI 3, potentiellement des protéines du complexe CRL4 et les substrats éventuels.

4.1 Identification des partenaires de la protéine CUL4

Dans le modèle humain, l'identification d'une partie des protéines DCAF associées au complexe CRL4 a été possible grâce à la mise en œuvre de technique d'immunopurification (IP) à l'aide d'anticorps dirigés contre la protéine CUL4 et à partir d'extraits protéiques de cellules en culture suivie d'une analyse par spectrométrie de masse (He et al., 2006 ; Higa et al., 2006).

Pour caractériser le complexe CRL4 d'*Arabidopsis*, nous avons utilisé une méthode de purification en condition native par affinité dite TAP « Tandem Affinity Purification ». Cette méthode nécessite la fusion d'une étiquette ou tag soit en N- ou C- terminal de la protéine d'intérêt. Cette étiquette correspond à deux tags séparés par un site de clivage par une protéase spécifique. Les protéines qui s'associent avec la protéine de fusion seront récupérées par TAP et analysées par spectrométrie de masse (Puig et al., 2001). Pour réaliser cette expérience, nous avons fait appel à la plate-forme dirigée par Geert De Jaeger à l'institut du VIB de Ghent (Belgique). L'équipe de Geert De Jaeger a développé cette technologie pour le modèle végétale et a notamment prouvé l'efficacité de cette technique dans l'établissement d'un interactome du cycle cellulaire chez *Arabidopsis thaliana* (Van Leene et al., 2007). Le système est basé sur l'expression de la protéine en fusion de manière stable dans des cellules d'*Arabidopsis* en culture. La lignée de cellules d'*Arabidopsis* en culture a été établie par Menges et Murray (2002) et correspond à l'écotype Landsberg erecta. Nous avons choisi de faire l'expérience avec l'expression de la protéine CUL4 en fusion N-terminale avec le tag GS développé spécialement pour le modèle végétal (Van Leene et al., 2008). L'expression de la construction est sous contrôle du promoteur fort et constitutif du CaMV, p35S. Le tag GS combine 2 domaines de liaison des protéines G aux IgG et un peptide de liaison à la streptavidine séparés par deux sites de clivages par la protéase du virus de la gravure du tabac (ou TEV). Les services de la plateforme ont généré une lignée stable exprimant la protéine en fusion et ont réalisé 2 expériences de TAP-tag. Les résultats des 2 expériences sont reportés

dans la **Figure 36**. Mis à part la protéine RPN7, toutes les autres protéines ont été identifiées dans les 2 expériences ce qui augmente l'indice de confiance pour les résultats obtenus. Parmi les protéines capables d'interagir avec CULLINE 4, nous pouvons distinguer différentes catégories d'interactants :

- 1 – des sous-unités du complexe CRL4 : RBX1
- 2 – des régulateurs du complexe CRL4 : CAND1 et CSN1
- 3 – des sous-unités du protéasome : RPN7
- 4 – des récepteurs de substrat de type DCAF : CSA1 et AT4G03020

De manière surprenante, la sous-unité DDB1a ou DDB1b qui est l'adaptateur du substrat n'a pas pu être identifié par cette expérience de TAP-tag. Malgré l'absence de DDB1, la majeure partie des partenaires co-purifiés sont connus pour interagir avec le complexe CRL4. De plus, deux protéines identifiées par bioinformatique comme étant de potentielles DCAF chez *Arabidopsis* sont également co-purifiées. Cette expérience valide ainsi la liste des protéines DCAF établie sur la base du motif WDxR. Toutefois cette expérience, n'a pas permis d'identifier un nombre suffisant de DCAF pour en faire le répertoire et nous ne pouvons donc pas nous prononcer sur la présence des MSI au sein de complexes CRL par cette approche.

Dans cette expérience de TAP-tag, même si la protéine tag-CUL4 s'accumule en grande quantité puisque le transgène est contrôlé par le promoteur p35S, elle sera en compétition avec la protéine endogène. Cette protéine endogène n'étant pas modifiée, elle sera certainement privilégiée dans l'échafaudage de complexes CRL4. De ce fait, les protéines purifiées par TAP risquent d'être à la limite de la détection par spectrométrie de masse et ainsi de ne pas apparaître dans la liste des interactants. Le dernier point à discuter est la fusion N-terminale du tag GS. Ce choix a été fait car la protéine CUL4 pour être fonctionnelle ne tolère pas de fusion à l'extrémité carboxy-terminale où se situe le site de neddylation indispensable pour avoir un complexe CRL4 actif. Il faut se rappeler ici que l'extrémité C-terminale est en contact avec la protéine RBX1 qui a été identifiée dans cette expérience de TAP-tag. L'extrémité N-terminale de la protéine est en contact avec la protéine DDB1. Il se peut donc que la présence du tag à cette extrémité fragilise la liaison avec l'adaptateur de substrat. Ceci peut expliquer l'absence de la protéine DDB1 dans la liste des interactants.

AT number	Protein name	Nm-TAP1	Nm-TAP2	Total 2exp
AT5G44210	CUL4		1	1
AT5G20570	HRT1, ROC1, RBX1	1	1	2
AT1G15860	calcium ion binding	1	1	2
AT1G27040	ATCSA-1	1	1	2
AT2G02560	CAND1	1	1	2
AT3G61140	CSN1	1	1	2
AT4G03020	transducin family protein / WD-40 repeat family protein	1	1	2
AT4G24820	26S proteasome regulatory subunit, putative (RPN7)	0	1	1

Figure 36 : Identification des partenaires associés au complexe CRL4 en utilisant la protéine CUL4 comme appât dans des expériences de purification biochimique par affinité (TAP-tag). La protéine CUL4 est exprimée dans une culture cellulaire d'*Arabidopsis* en fusion N-Terminale avec un tag permettant la purification par « Tandem Affinity Purification » des protéines associées (Service de la plate-forme du VIB/Gent ; <http://www.psb.ugent.be/tap-platform>). La construction est placée sous contrôle du promoteur p35S. Les protéines ainsi purifiées ont été identifiées à l'aide de techniques MALDI-TOF-TOF-MS. La protéine « appât » CUL4 est représentée en couleur verte et les protéines associées en couleur noire.

AT number	Protein name
AT1G12080.2	Vacuolar calcium-binding protein-like protein
AT2G03550.1	carboxylesterase
AT5G35230.1	PHD finger family protein
AT5G22760.1	PHD finger family protein
AT5G51110.1	transcriptional coactivator/ pterin dehydratase
AT1G07320.1	RPL4 ou 50S ribosomal protein L4
AT3G15400.1	ATA20 ou protein anther 20
AT1G34010.1	unknown protein
AT1G13190.1	RNA recognition motif (RRM)-containing protein (mRNA surveillance pathway)
AT2G49100.1	LHCB4.3 ou Light-harvesting complex II chlorophyll a/b binding protein 4

Figure 37 : Identification de partenaires associés aux protéines MSI2 et MSI3 en réalisant un crible double hybride dans la levure.

Deux banques de cDNA ont été exploitées pour réaliser le criblage par double hybride dans la levure. La première banque de cDNA exploitée a été générée avec des ARNm extraits des tissus végétatifs aériens de plantules de 3 semaines (Clontech, *Arabidopsis thaliana* MATCHMAKER cDNA library, FL4000AB). La deuxième banque de cDNA exploitée a été générée avec des ARNm extraits d'inflorescences incluant les méristèmes d'inflorescence, les méristèmes floraux et les boutons floraux jusqu'aux stades 8/9 (ABRC, Horwitz and MA, *Arabidopsis thaliana*, cDNA library, CD4-30) Les interactants identifiés et confirmés par les cribles en utilisant MSI2 et MSI3 comme appât respectivement sont présentés ainsi que leurs annotations, basées sur leur structure ou prédiction de fonction.

4.2 Identification des partenaires des protéines MSI

4.2.1 Réalisation d'un crible double hybride dans la levure avec MSI 2 et MSI 3

Le principe du double hybride a déjà été rappelé dans le paragraphe 3-2. Cette technique est basée sur la capacité des domaines de liaison à l'ADN (BD) et d'activation de la transcription (AD) du facteur de transcription Gal4 de levure à fonctionner de manière indépendante. Ce crible double hybride dans la levure a été effectué avec l'appui de Herfried Eisler, un chercheur post-doctorant au sein du laboratoire. Les banques d'ADNc testées pour rechercher des partenaires des protéines MSI 2 et MSI 3 sont représentatives l'une des transcrits de feuilles de rosettes de plantules âgées de 3 semaines et l'autre des transcrits d'inflorescence comprenant les méristèmes floraux et les boutons floraux à des stades précoces. D'après l'analyse des profils d'expression des gènes *MSI 2* et *MSI 3* que j'ai discutés dans le paragraphe 1, les transcrits MSI2/3 sont présents dans certains de ces tissus riches en cellules en prolifération et il paraît fort probable que leur substrat le soit aussi. Pour réaliser le crible double hybride dans la levure, les protéines appâts (*MSI 2* soit *MSI 3*) sont exprimées en fusion avec le domaine BD et les protéines « proies » sont exprimées en fusion avec le domaine AD. Le résultat des deux cribles est présenté dans la **Figure 37**. Dans les deux cas, la liste des interactants est relativement courte. Ceci est lié au phénomène d'auto-activation que j'ai mentionné précédemment en paragraphe 3-2 qui impose de travailler avec une stringence plus élevée des milieux sélectifs. L'expérience réalisée avec la protéine *MSI 3* n'a pas permis l'identification de candidats intéressants. Par contre, l'expérience réalisée avec la protéine *MSI2* a permis d'identifier deux candidats intéressants : AT5G35210 et AT5G22760. Ces gènes codent pour deux protéines de type PHD ou « Plant Homeo Domain ». L'intérêt de ces deux partenaires de la protéine *MSI 2* identifiées par crible double hybride en levure sera discuté dans le paragraphe suivant.

A

AT number	Protein Name	Nm TAP-1	Nm TAP-2	Total/2exp	Average Protein Score
AT4G35250	MSI3	1	1	2	1215
AT5G22700	PHD finger family protein	1	1	2	134
AT5G18620	CHR17 chromatin remodeling factor17	1	1	2	90
AT5G35210	metalloendopeptidases,zinc ion binding,DNA binding	1	1	2	50

(*) In the first experiment, a unique peptide for CHR17 was sequenced, resulting in a higher score for CHR17 than for CHR11, therefore we can conclude that CHR17 is present - no unique peptides were found for CHR11 in the first experiment. In the second experiment, it was impossible to distinguish between CHR17 or CHR11, no unique peptides were found, so either one of them, or both may be present.

B

AT number	Protein Name	Nm TAP-1	Nm TAP-2	Total/2exp	Average Protein Score
AT2G19520	MSI4	1	1	2	814
AT1G69830	AMY3	1	1	2	435
AT3G42170	BED zinc finger, hAT family dimerisation domain	1	1	2	603
AT1G06410	TP57	1	1	2	409
AT3G09670	Tudor/PWWP/MBT superfamily protein	1	1	2	401
AT2G05830	NagB/RpA/CoA transferase-like superfamily protein	1	1	2	190
AT3G54760	dentin sialophosphoprotein-related	1	1	2	178
HIS4	Histone H4	1	1	2	113
AT5G63110	HDA6, AXE1, ATHDA6, RTS1, RPD3B, SIL1 histone deacetylase 6	1	1	2	83
AT1G43800	Plant steroyl-acyl-carrier-protein desaturase family protein	1	1	2	104
AT5G40340	Tudor/PWWP/MBT superfamily protein	1	1	2	51
AT3G27860	Tudor/PWWP/MBT superfamily protein	1	1	2	62
HIS1	Histone H2A	1	1	2	55
AT2G37605	SWIRM/MSM2 domain superfamily protein	1	1	2	61
AT3G44310	NIT1	1		1	98
AT5G26210	AL4 alfin-like 4	1		1	46

Figure 38 : Identification des partenaires associés aux protéines MSI3 (A) et MSI4 (B) par purification biochimique par affinité (TAP-tag). Les protéines MSI3 ou MSI4 sont exprimées dans une culture cellulaire d'Arabidopsis en fusion N-Terminale avec un tag permettant la purification par « Tandem Affinity Purification » des protéines associées (Service de la plate-forme du VIB/Gent ; <http://www.psb.ugent.be/tap-platform>). La construction est placée sous contrôle du promoteur p35S. Les protéines ainsi purifiées ont été identifiées à l'aide de techniques MALDI-TOF-TOF-MS. En A et en B, la protéine qui sert « d'appât » est représentée en couleur verte et les protéines associées en couleur noire. La couleur rouge indique la présence de protéines fréquemment identifiées par cette approche et pouvant donc correspondre à des contaminants.

4.2.2 Réalisation d'une expérience TAP-tag avec MSI 3 et MSI4

A l'image de l'expérience décrite pour la protéine CUL4, des expériences de TAP-tag ont également été réalisées en utilisant les protéines MSI 3 et MSI 4 en fusion N-terminale avec le tag GS. En raison du coût d'une telle expérience sur cette plate-forme, l'expérience n'a pas été répétée avec la protéine MSI2. Les résultats de TAP-tag sont présentés sur la **Figure 38**.

Pour la protéine MSI3, la technique TAP-tag a permis d'établir qu'elle pouvait interagir avec les produits des gènes suivants :

- AT5G22760 : protéine PHD
- AT5G35210 : protéine PHD. Ces deux partenaires avaient été identifiés par le crible double hybride réalisé dans la levure en utilisant MSI2 comme appât.
- AT5G18620 : protéine CHR « Chromatin Remodeling Factor » : CHR11 et CHR17

Pour la protéine MSI4, le nombre de candidats identifiés par la technique TAP-tag est beaucoup plus important. Parmi les candidats intéressants on peut noter les produits des gènes suivants:

- AT3G09670, AT3G27860, AT5G40340 : TUDOR family
- AT5G63110 : HDA6, Histone Deacétylase 6 qui interagit avec MSI4 (Gu et al., 2012).
- HISTONE H4
- AT5G26210 : AL4 ou « Alfin-like 4 » protéine à domaine PHD
- AT2G35605 : Une protéine nucléaire de la famille SWIB/MDM2

D'autres candidats sont plutôt inattendus et pourrait correspondre à de faux positifs

- AT1G06410 : TPS7 code pour une enzyme impliquée dans la biosynthèse de tréhalose
- AT1G69830 : AMY3 « Alpha-amylase-like 3 » code pour une alpha-amylase localisée dans les plastides.
- AT1G06410 : TPS7, une enzyme trehalose-6-phosphate synthase. Notons toutefois qu'un membre de cette famille TPS1 est un régulateur du temps de floraison (Wahl et al., 2013)

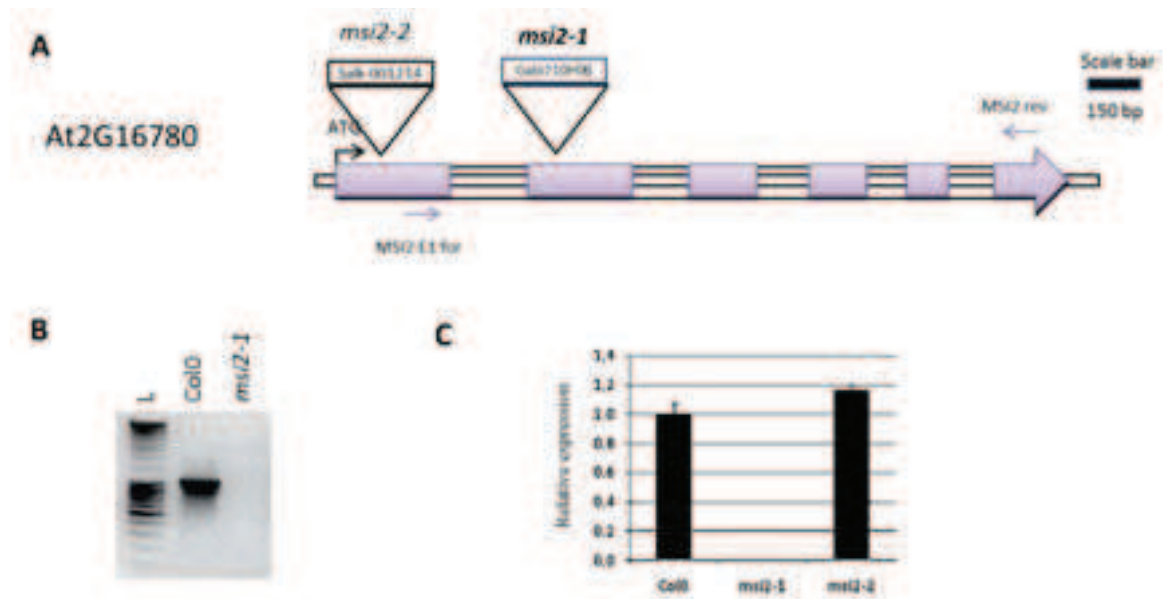


Figure 39 : Identification de mutants KO dans le gène *MSI2*. **A.** Représentation schématique de *MSI2* avec les mutants d'insertion T-DNA, *msi2-1* and *msi2-2*, les boîtes colorées représentent les exons. **B.** RT-PCR sur *msi2-1* en utilisant des primers spécifiques (indiqués sur la figure A) **C.** Expression relative du gène *MSI2* dans *msi2-1* et *msi2-2* dans des plantules de 10 jours. Le graphique représente l'expression relative et l'écart-type calculé de trois réplicats. L'expérience a été répétée trois fois et la plus représentative est présentée. Le niveau d'ARNm de *MSI2* dans col0 a été ramené à 1 après normalisation par rapport à l'ACTINE et GAPDH.

On peut noter tout d'abord que dans les deux cas, des partenaires différents ont été mis en évidence. Cela peut témoigner de rôles spécifiques dans la plante pour ces deux protéines appartenant à deux clades différents de la famille MSI. Il faut noter également que la recherche d'interactants par crible double hybride en levure ou par TAP-tag ne permet pas de révéler la présence de la protéine DDB1, l'adaptateur de substrat du complexe CRL4 qui interagit directement avec les protéines DCAF.

Ces résultats ont été obtenus avec une suspension de cellules en culture c'est à dire des cellules indifférenciées qui prolifèrent. Il s'agit pour la suite de ce travail de confirmer ces interactions et de préciser si l'interaction est spécifique à une seule protéine MSI ou si plusieurs protéines de la famille MSI peuvent interagir avec les mêmes interactants identifiés. Ensuite il faudra préciser le rôle régulateur *in planta* de ces interactions en identifiant les cibles au niveau chromatinien et comprendre le rôle du complexe CRL4 dans cette régulation.

5. Etude de la fonction par génétique inverse

5.1 Identification de mutants d'insertion T-DNA ou Transposon

La caractérisation des phénotypes de mutants de type perte de fonction pour les gènes *MSI 1* et *MSI 4* ont été un élément déterminant dans l'identification de leurs fonctions respectives. L'identification de mutants nuls ou perte de fonction pour les gènes *MSI 2*, *MSI 3* et *MSI 5* a été un objectif prioritaire dès le début de mon travail de thèse. Tous les mutants présentés dans ce manuscrit sont référencés et décrits sur le site du SALK (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). L'ensemble des collections de mutants T-DNA/Transposons sont disponibles grâce à deux centres de gestion et de stockage des graines : l'ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) et le NASC (Nottiggham Arabidopsis Stock Center).

Pour le gène *MSI 2* (At2g1678), j'ai sélectionné 2 lignées de mutant d'insertion T-DNA. La première provenait de la collection Gabi-Kat (GABI_710H06) et a été nommée *msi2-1* et la deuxième provenait de la collection Salk (SALK_001214) et a été nommée *msi2-2*. Ces deux collections ont été établies en utilisant l'écotype Columbia (Col-0). Les T-DNA sont localisés respectivement dans le 2^{ème} exon et dans le 1^{er} exon du gène (**Figure 39A**). Les

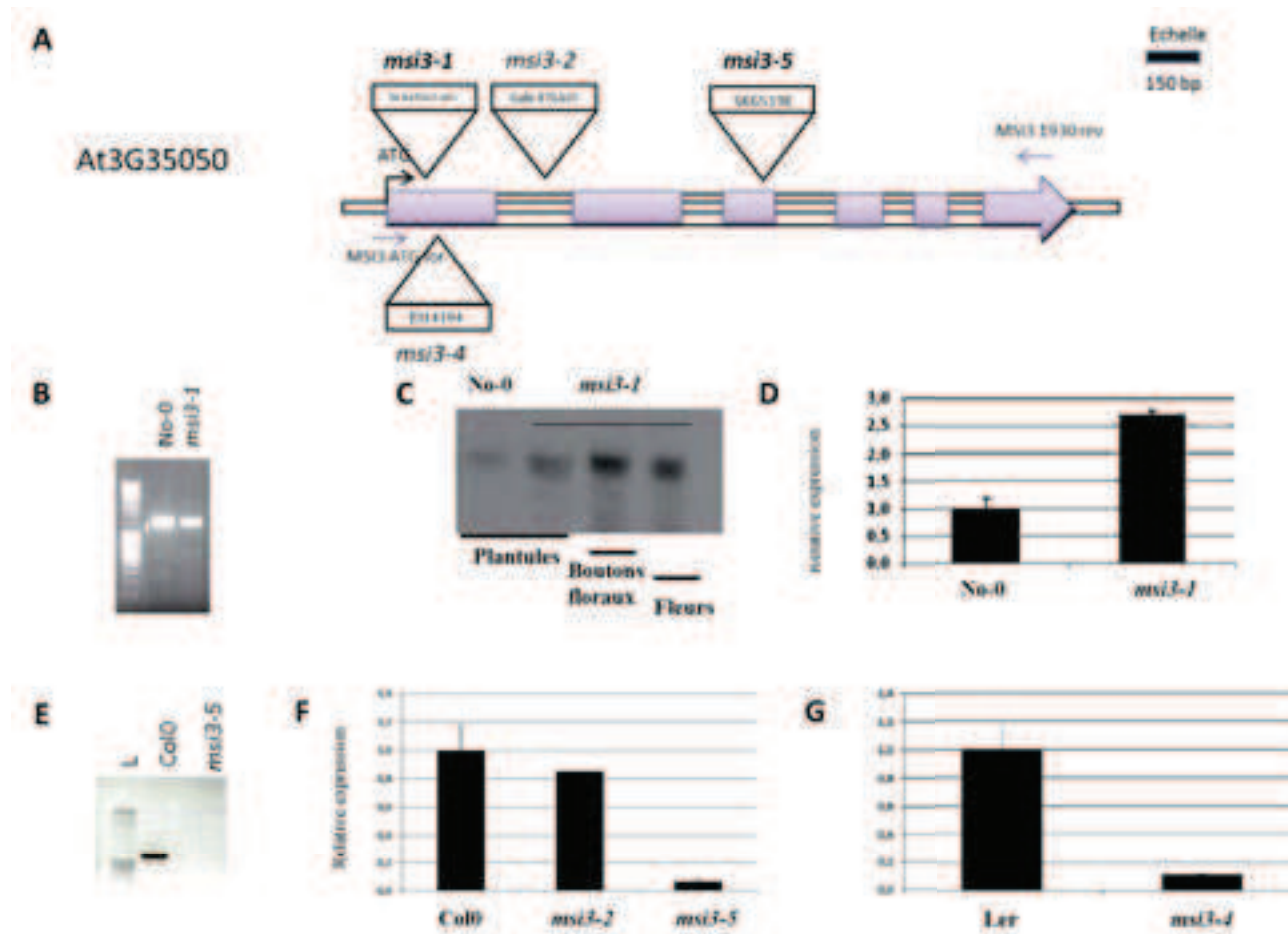


Figure 40 : Identification de mutants KO dans le gène *MSI3*. **A.** Représentation schématique du gène *MSI3* avec tous les mutants d'insertion T-DNA testés, les boîtes colorées représentent les exons. **B.** RT-PCR réalisées avec les cDNA du mutant *msi3-1* et des plantules sauvages en utilisant des primers spécifiques indiqués sur la figure A. **C.** Northern blot réalisé avec des plantules, boutons floraux et fleurs de *msi3-1* révélé par une sonde dirigée contre le gène *MSI3*. **D.** Expression relative du gène *MSI3* dans le mutant *msi3-1* dans des plantules de 10 jours où le niveau d'ARNm de *MSI3* dans No-0 a été ramené à 1 après normalisation par rapport à l'ACTINE et GAPDH. **E.** RT-PCR réalisées avec les cDNA du mutant *msi3-5* et des plantules sauvages en utilisant des primers spécifiques indiqués sur la figure A. **F.** Expression relative du gène *MSI3* dans les mutants *msi3-5* et *msi3-2* dans des boutons floraux. Le niveau d'ARNm de *MSI3* dans Col0 a été ramené à 1 après normalisation par rapport à l'ACTINE et GAPDH. **G.** Expression relative du gène *MSI3* dans le mutant *msi3-4* dans des boutons floraux. Le niveau d'ARNm de *MSI3* dans Ler a été ramené à 1 après normalisation par rapport à l'ACTINE et GAPDH. Pour les Figures D, F et G, les graphiques représentent l'expression relative et l'écart-type calculé de trois réplicats. Les expériences ont été répétées trois fois et le résultat le plus représentatif est présenté ici.

graines des 2 lignées d'insertion que j'ai réceptionnées étaient à l'état hétérozygote. Dans les 2 cas, j'ai réussi à obtenir des lignées homozygotes. Cette étape a permis de vérifier l'absence d'une insertion T-DNA supplémentaire dans le génome lors des tests de ségrégations. Pour quantifier les transcrits, j'ai réalisé des analyses moléculaires par RT-PCR et par RT-qPCR. Les résultats présentés en **Figures 39B et 39C** démontrent que le mutant *msi2-1*(-/-) est un « bona fide knock-out » puisque l'expression du gène *MSI 2* est nulle dans de jeunes plantules. C'est cette lignée *msi2-1* que j'ai choisie pour la suite des expériences.

Pour le gène *MSI 3* (At4g35050), un mutant d'insertion était déjà disponible à mon arrivée au laboratoire. Ce mutant d'insertion d'un transposon (Ds) provient de la collection RIKEN (RATM15-2931-1, écotype Nossen). Cette lignée avait été choisie car l'insertion ciblait le premier exon. L'analyse moléculaire de ce mutant appelé *msi3-1*, par RT-PCR, par Northern-blot et par RT-qPCR révèle un niveau d'accumulation élevé de transcrits tronqués par rapport au contrôle No-0 (**Figure 40B, 40C et 40D**). Ne disposant pas d'anticorps @MSI3, à ce moment-là, pour vérifier si ces transcrits pouvaient être fonctionnels, j'ai préféré commander et analyser d'autres mutants d'insertion. Les 3 autres mutants que j'ai commandés sont les suivants : *msi3-2* (collection Gabi-Kat, GABI_870A03, écotype Col-0) avec une insertion dans l'intron 2, *msi3-5* (collection Saskatoon, SK6519, écotype Col-0) avec une insertion T-DNA dans l'exon 3 et *msi3-4* (collection Enhancer Trap, ET14194, écotype Laer) avec une insertion dans l'exon 1 (**Figure 40A**). Pour l'ensemble des mutants qui ciblent le gène MSI3, j'ai pu obtenir des plantes homozygotes pour chacune des insertions. La **figure 40F** présente les résultats de quantification des transcrits par RT-qPCR pour le mutant *msi3-2* et indique une baisse peu significative des transcrits MSI 3. La **Figure 40G** présente les résultats des expériences de RT-qPCR pour la lignée *msi3-4*. Cette quantification des transcrits indique que l'expression du gène MSI3 n'est pas totalement annulée. De plus, ce mutant *msi3-4* provient d'une collection créée avec l'écotype Laer. J'ai donc continué l'étude par la lignée *msi3-5*. La **Figure 40 (E et F)** présente les résultats de l'étude par RT-PCR et par RT-qPCR pour la lignée *msi3-5*. L'amplification RT-PCR ne décèle aucun transcrit de taille complète et la quantification par RT-qPCR détecte une expression résiduelle de 10% qui correspond à des transcrits tronqués donc non fonctionnels. Cette analyse permet de montrer que le mutant *msi3-5* (-/-) est un mutant nul. C'est cette lignée *msi3-5* que j'ai choisie pour la suite des expériences.

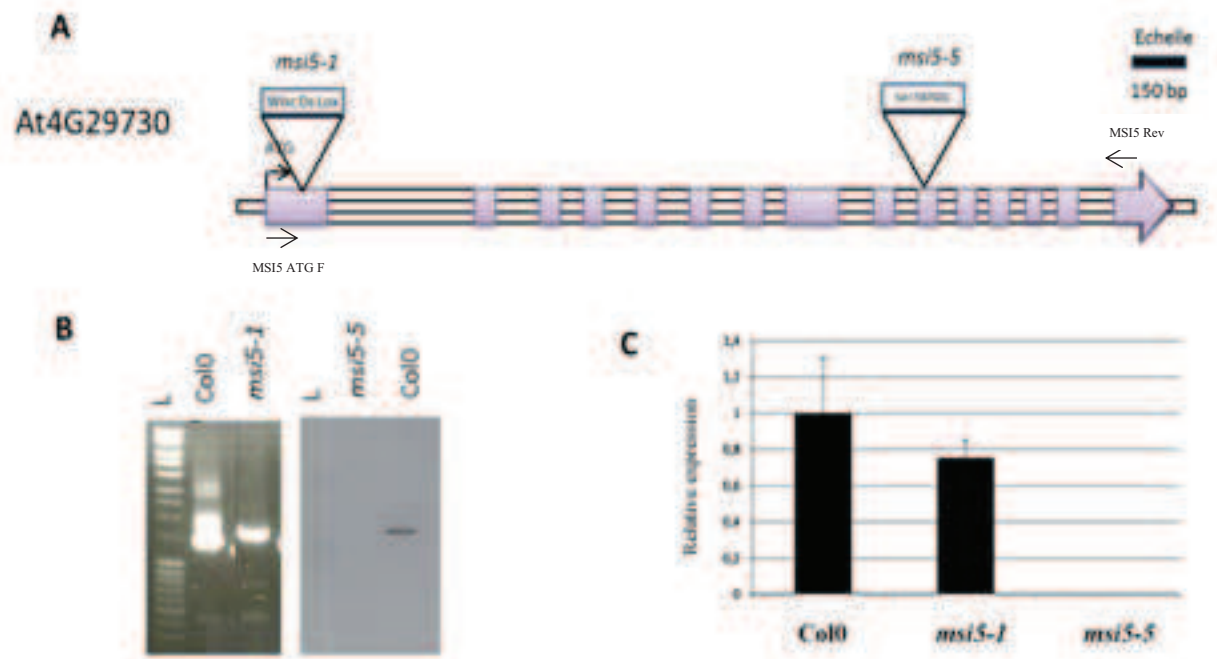


Figure 41 : Identification de mutants KO dans le gène *MSI5*. **A.** Représentation schématique du gène *MSI5* avec tous les mutants d'insertion T-DNA testés, les boîtes colorées représentent les exons. **B.** RT-PCR réalisées avec les cDNA de plantules des mutants *msi5-1* et *msi5-5* et des plantules sauvages en utilisant des primers spécifiques indiqués sur la figure A. **C.** Expression relative du gène *MSI5* dans les mutants *msi5-1* et *msi5-5* dans des plantules âgées de 10 jours. Le graphique représente l'expression relative et l'écart-type calculé de trois répliques. L'expérience a été répétée trois fois et le résultat le plus représentatif est présenté ici. Le niveau d'ARNm de *MSI5* dans col0 a été ramené à 1 après normalisation par rapport à l'ACTINE et GAPDH.

Pour le gène *MSI 5* (At4g29730), un mutant d'insertion était déjà disponible à mon arrivée au laboratoire. Ce mutant d'insertion de transposon (Ds) provient de la collection WISCONSIN (WiscDsLox453-456H3, écototype Col-0). Cette lignée avait été choisie car l'insertion ciblait le premier exon. L'analyse moléculaire de ce mutant appelé *msi5-1*, par RT-PCR et par RT-qPCR révèle un niveau d'accumulation légèrement inférieur de transcrits tronqués par rapport au contrôle Col-0 (**Figure 41B et C**). J'ai commandé 4 autres lignées. J'ai réussi à confirmer l'insertion uniquement pour la lignée appelée *msi5-5* provenant de la collection Syngenta (SAIL567_G01, écototype Col-0) et pour laquelle le T-DNA est inséré dans l'exon 10 (**Figure 41A**). J'ai quantifié les transcrits sur les plantes homozygotes en réalisant des analyses moléculaires par RT-PCR et par RT-qPCR. Les résultats présentés en **Figures 41 B et 41C** démontrent que le mutant *msi5-5*(-/-) est un mutant nul puisque l'on ne détecte plus l'expression du gène *MSI 5* et c'est cette lignée *msi5-5* que j'ai choisie pour la suite des expériences.

5.2 Caractérisation phénotypique des mutants knock-out

L'utilisation des collections de mutants d'*Arabidopsis* accessibles au public m'ont permis d'identifier les mutants nuls pour les gènes *MSI 2*, *MSI 3* et *MSI 5* dans le fond génétique Col-0. Nous disposions déjà au laboratoire du mutant nul *msi4-1* qui a été identifié dans la collection établie par Syngenta (SAIL_1167_E05, écototype Col-0). Nous avons enfin demandé l'autorisation d'exploiter le mutant d'insertion T-DNA *msi1-1* identifié et caractérisé dans le laboratoire de W. Gruissem. Il s'agit également d'un mutant provenant de la collection Syngenta donc de l'écotype Col-0. Nous avons donc réussi à identifier un mutant d'insertion nul pour chacun des 5 gènes MSI dans le même fond génétique Col-0. L'étude des 5 gènes de la famille MSI par génétique inverse indique que seul le mutant *msi1-1* ne peut être maintenu à l'état homozygote. L'analyse des siliques révèle que 50% seulement des embryons sont capables de se développer pour former des graines matures. La perte de fonction du gène *MSI 1* entraîne une létalité embryonnaire lorsque l'allèle *msi-1* est transmis par le gamétophyte femelle (Köhler et al., 2003 ; Guitton et Berge, 2005). Tous les autres mutants d'insertion ciblant les gènes *MSI 2*, *MSI 3*, *MSI 4* et *MSI 5* sont viables à l'état homozygote. L'absence individuelle de l'expression de ces gènes n'entrave ni le développement des gamètes mâles et femelles, ni le développement embryonnaire. La fertilité de chaque lignée est normale. J'ai

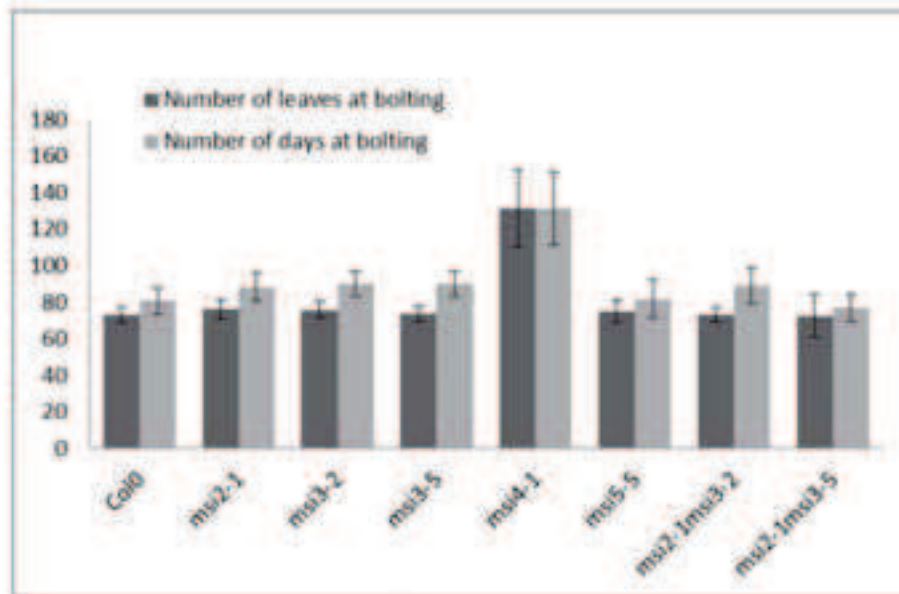
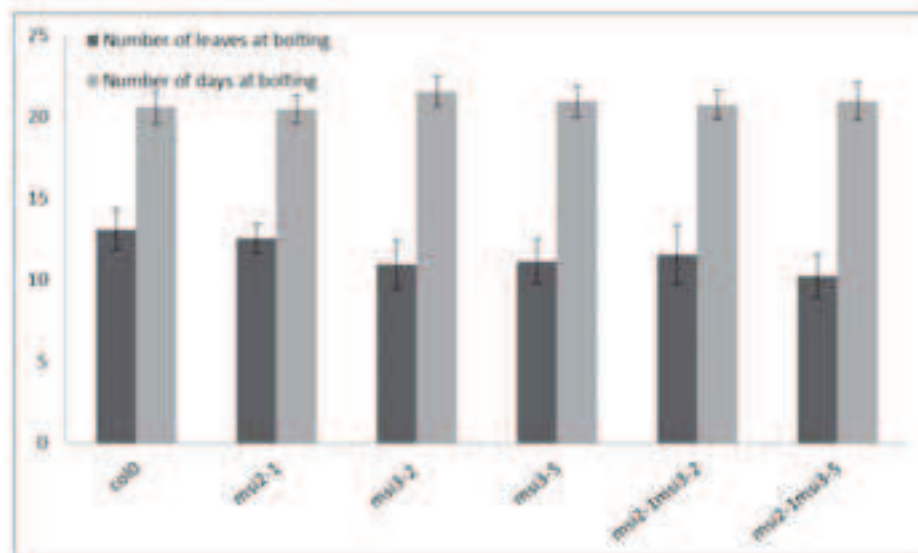
A**B**

Figure 42 : Tests de floraison en condition de culture de jours courts (A) et de jours longs (B).

Les semis de graines des différents génotypes testés ont été réalisés dans les mêmes conditions de culture que celles utilisées pour la croissance des plantes. Le test en jours courts est réalisé avec une photopériode de 8h jour/16h nuit et le test en jours longs avec une photopériode de 16h jour/ 8h nuit, à une température de 21°C le jour et 18°C la nuit. Dans les 2 cas, le nombre de feuilles de rosette au moment de la floraison a été comptabilisé ainsi que le nombre de jours nécessaires pour voir la première hampe florale apparaître. Pour chaque génotype testé, l'analyse statistique a été réalisée avec 40 plantes.

donc réalisé des croisements entre les mutants *msi2-1* et *msi3-5* ainsi que *msi4-1* et *msi5-5* pour établir des lignées qui seront des doubles mutants pour tester la redondance fonctionnelle au sein des clades définis par l'analyse bio-informatique (**Figure 19**). Dans les 2 cas, j'ai pu obtenir des doubles mutants homozygotes : *msi2-1* (-/-)/*msi3-5* (-/-) et *msi4-1* (-/-)/*msi5-5*(-/-) indiquant un développement normal des gamètes mâles et femelles ainsi qu'un développement embryonnaire normal. Aucune des combinaisons testées ne présente un phénotype similaire à celui du mutant *msi1-1*.

Ce résultat m'a amené à m'intéresser à un autre phénotype qui a été décrit pour le mutant nul *msi4-1* (Pazhouhandeh et al., 2011) et un mutant hypomorphe *msi1* (Bouveret et al., 2006) présente un phénotype de retard de la floraison par rapport à une plante contrôle.

5.2.1 Etude de la floraison

La transition de la croissance végétative vers la floraison est un phénomène complexe et hautement régulé. De nombreuses voies de signalisation intégrant des signaux endogènes et exogènes (ou environnementaux), convergent pour assurer l'expression des intégrateurs floraux que sont les gènes *SOC1* (Suppressor of CO1), *FT* (Flowering Locus T) et *LFY* (Leafy) qui contrôlent la floraison chez *Arabidopsis* (Suarez –Lopez et al., 2001 ; Valverde et al., 2004). J'ai déjà mentionné le phénotype du mutant nul *msi4-1* qui présente un retard important de la floraison par rapport aux plantes Col-0 (Pazhouhandeh et al., 2011). Le gène *MSI4/FVE* fait partie d'une voie de signalisation dite « voie autonome » et participe à l'établissement de marques répressives sur le locus FLC, un répresseur majeur de la floraison. Le gène *MSI 1* participe également au contrôle de la floraison puisque des plantes exprimant une construction anti-sens du gène *MSI 1* présentent un retard de la floraison alors que des plantes exprimant de manière ectopique le gène *MSI 1* ont une floraison précoce (Bouveret et al., 2006). Le gène *MSI 1* est nécessaire pour établir des marques génétiques activatrices sur le gène *SOC1* (Bouveret et al., 2008) favorisant ainsi une expression forte de *SOC1* pour permettre l'induction de la floraison. Plus récemment, il a également été montré que *MSI 1* contrôle l'expression du gène *CO* (Constance) impliquant un rôle de MSI1 dans la voie de contrôle de la floraison par la photopériode (Steinbach et Hennig, 2014).

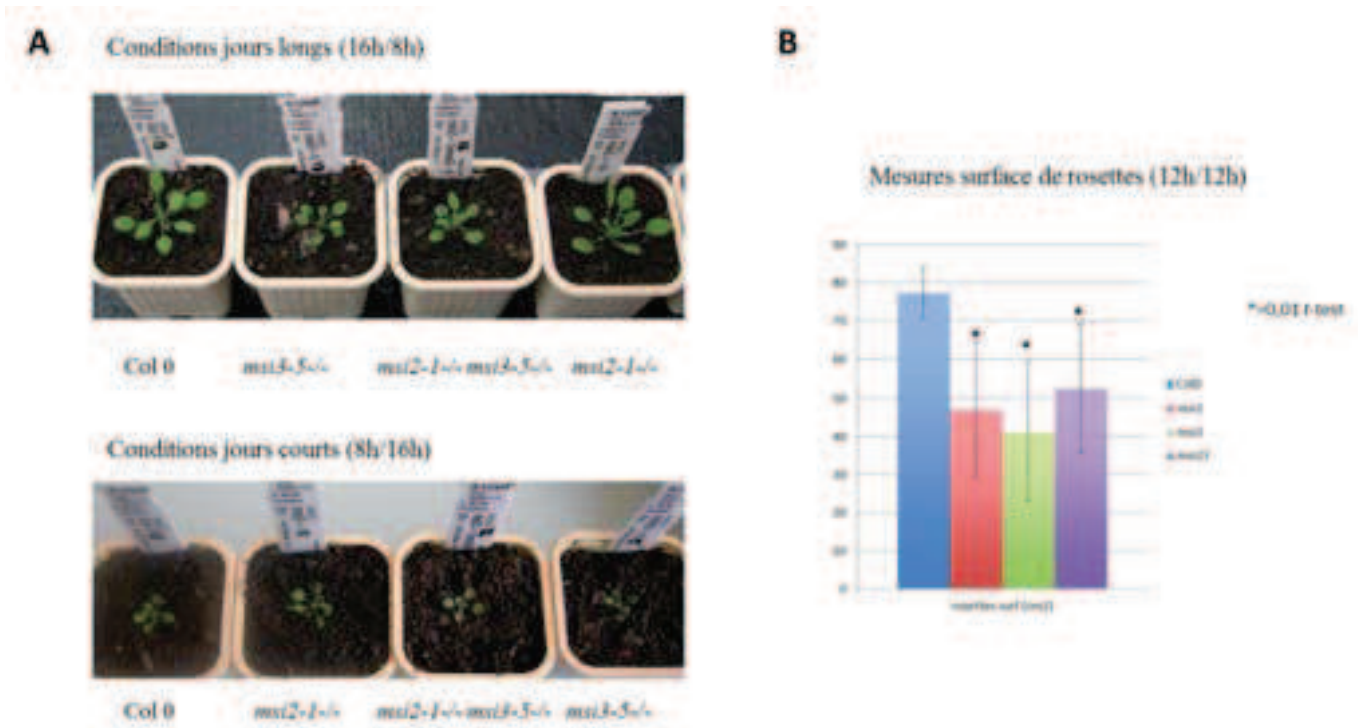


Figure 43 : Analyse du phénotype des mutants *msi2-1* et *msi3-5*.

A. Observation de plantules de 3 semaines cultivées en serre (IBMP) dans des conditions de culture de jours longs et de jours courts. Les photographies sont représentatives de la surface de rosette observée pour le contrôle Col-0, le mutant *msi2-1*, le mutant *msi3-5* et le double mutant *msi2-1/msi3-5*.

B. Mesure de la surface de rosettes. Les plantes sont cultivées avec une photopériode 12h jour/12h nuit sur la plate-forme de phénotypage de Montpellier. La surface de chaque rosette est mesurée sur des plantes de 30 jours. Pour chaque génotype testé, l'analyse statistique est réalisée avec 24 plantes. Les astérisques indiquent que les différences observées sont significatives ($t = 0,01$).

Pour tester un éventuel rôle des gènes *MSI 2* et *MSI 3* dans le contrôle de la floraison, j'ai réalisé la culture des différents génotypes dans les serres de l'IBMP, soit en condition de culture dite de « jours longs » (16H jour / 8H nuit), soit en condition de culture dite de « jours courts » (8H jour / 16H nuit). Pour suivre la transition de la phase de croissance végétative vers la floraison, j'ai mesuré le nombre de feuilles formées au niveau de la rosette au moment de la floraison et j'ai également comptabilisé le nombre de jours nécessaires pour voir la première hampe florale se former. Les résultats sont présentés sur la **Figure 42**. Les plantes *Arabidopsis Col0* servent de référence pour paramétrer le temps de floraison par rapport à la photopériode. Le mutant *msi4-1* dont le gène est impliqué dans la voie autonome de contrôle de la floraison présente un retard de floraison dans les conditions jours courts mais aussi jours longs comme cela a été publié par notre laboratoire (Pazhouhandeh et al., 2011). Les résultats de la **Figure 42** indiquent que ni les simples mutants *msi2* ou *msi3* ni les doubles mutants *msi2/msi3* ne présentent une modification du temps de floraison en condition de culture de jours courts ou longs par rapport à Col-0.

Ces résultats indiquent que les gènes *MSI 2* et *MSI 3*, à l'inverse des gènes *MSI 1* et *MSI 4*, ne participent pas à la régulation des voies de contrôle de la floraison chez *Arabidopsis*.

5.2.2 Etude de la taille des rosettes

Le suivi des plantes cultivées en serre en photopériode de jours courts ou longs m'a également permis d'observer la taille des rosettes et la taille des feuilles de ces rosettes pour les différents génotypes. Les photographies de la **Figure 43A** sont représentatives du phénotype observé par génotype et par condition de culture. La croissance des feuilles des mutants *msi2-1* et *msi3-5* ainsi que du double mutant *msi2/msi3* en condition de culture « jours courts » ne présente aucune différence notable par rapport à une plante sauvage Col0 (**Figure 43A**). Cependant, en condition de culture « jours longs », seuls les mutants *msi3-2* et *msi3-5* présentent une surface de feuilles de rosette plus petite par rapport au contrôle Col-0. Les mutants *msi2-1* présentent une surface de feuilles de rosette similaire aux plantes contrôle. Il est assez surprenant de voir que la surface des feuilles de rosette du double mutant *msi2/msi3* est intermédiaire entre le génotype du mutant *msi3* et la plante contrôle Col-0.

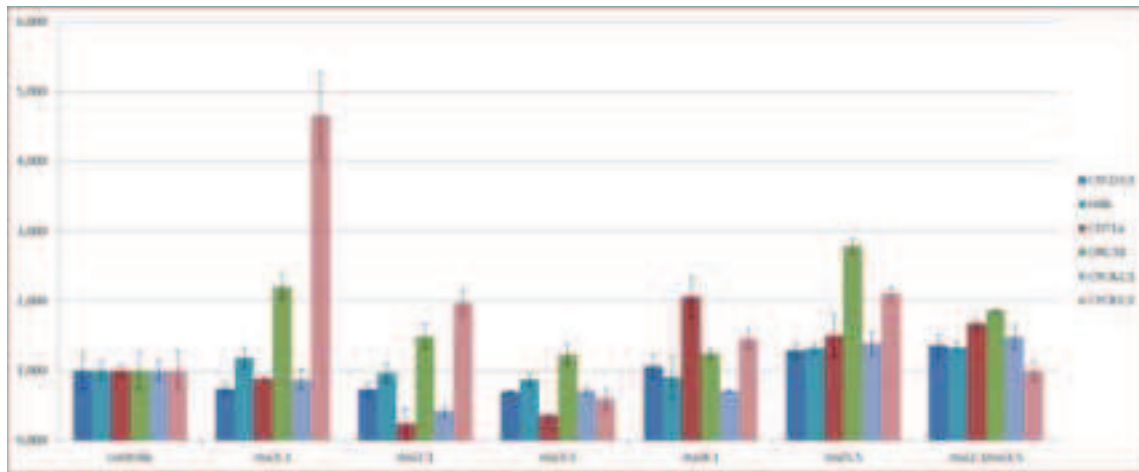


Figure 44 : Quantification par RT-qPCR de l'expression de gènes régulateurs du cycle cellulaire dans des feuilles de 1mm.

La quantification de l'expression relative de gènes de référence, exprimés en phase G1/S (CYCD3 ;1), en phase S (H4b, CDT1a, ORC1b), à la transition S/G2 (CYCA2 ;1) et à la transition G2/M (CYCB1 ;1), a été réalisée par RT-qPCR. Les ARN totaux ont été extraits de feuilles de 1mm issues des génotypes *promCycB1-DboxcycB1::GUS* (contrôle), *msil-1*, *msil-2*, *msil-3-5*, *msil-4-1*, *msil-5-5* et *msil-1msil-3-5*. Les diagrammes indiquent la moyenne de l'expression relative et la moyenne calculée de l'écart-type de trois réplicats pour les différents gènes. Les gènes de référence ACTINE et GAPDH ont été utilisés pour la normalisation.

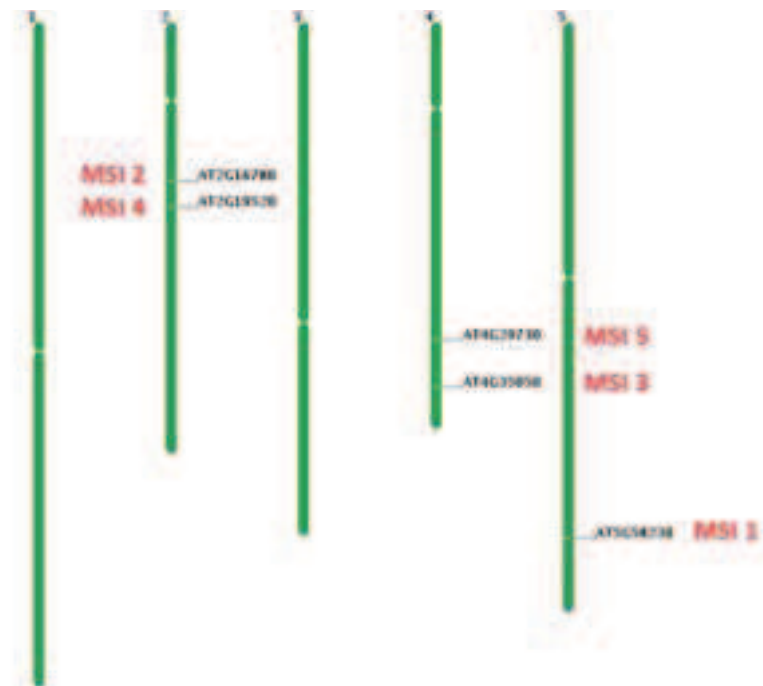


Figure 45 : Cartographie chromosomique de la position des gènes *MSI* sur les cinq chromosomes d'*Arabidopsis thaliana*.

(Figure 43A). Afin de réaliser une étude statistique de ce phénotype dans un environnement contrôlé, les mêmes expériences ont été réalisées sur une plate-forme de phénotypage au **Laboratoire d'Ecophysiologie des Plantes sous Stress Environnementaux (LEPSE)** de Montpellier). Idéalement les expériences auraient dû se faire en condition de culture jours longs or la photopériode imposée par le service en charge de la plate-forme est intermédiaire à celle que j'ai testée : elle est de 12h jour /12h nuit. La taille mesurée de la surface de la rosette des plantes contrôle par rapport aux mutants permet toutefois de confirmer que la surface des rosettes des mutants *msi3-5* est inférieur au contrôle Col0. Cependant, cette étude a également révélé une réduction significative au niveau statistique de la croissance des feuilles du mutant *msi2-1* et du double mutant *msi2/msi3* dans ces conditions (Figure 43B). Ce phénotype ne peut être attribué à un retard de germination, car ces génotypes germent de manière homogène et comparable à Col-0.

Il faut toutefois noter que la comparaison des plantes à des stades ultérieurs de développement notamment après la floraison ne permet plus de distinguer les plantes *msi3-5* des plantes Col-0. La taille des hampes florales et la taille des fleurs sont similaires dans tous les génotypes testés. En conclusion les mutants *msi2/3* présentent un phénotype subtil de retard de croissance des feuilles compensé au cours du développement des plantes et qui n'est pas observé en conditions de cultures en jours courts.

5.2.3 Variations des gènes du cycle cellulaire dans les mutants *msi*.

Comme indiquée dans le paragraphe 1-2, la croissance des feuilles de rosette chez *Arabidopsis* est sous le contrôle d'abord de la prolifération cellulaire puis de l'élongation cellulaire avant d'atteindre la taille définitive de la feuille mature. Comme les gènes *MSI 2* et *MSI 3* sont plus fortement exprimés dans des cellules en prolifération, on peut faire l'hypothèse que les protéines MSI 2 et MSI 3 assurent une fonction dans le contrôle de la prolifération cellulaire dans les feuilles de rosette.

En vue de mieux caractériser le phénotype observé pour les mutants *msi3-5*, il faudra évaluer plusieurs caractéristiques à l'échelle de la rosette et/ou des feuilles de rosette : aire, longueur des pétioles, aire du lobe d'une feuille donnée. Au niveau d'une feuille donnée, il

faudra comptabiliser le nombre de cellules par surface, mesurer la taille des cellules de revêtements de l'épiderme et suivre le degré de ploïdie ; autant de paramètres qui permettront d'évaluer la contribution du phénomène de division cellulaire mitotique par rapport au processus d'endoréplication dans le phénotype du mutant *msi3-5*. Faute de temps, ces analyses n'ont pas pu être réalisées au cours de ma thèse.

J'ai cependant quantifié par RT-qPCR l'expression de plusieurs gènes marqueurs des différentes phases du cycle cellulaire pour estimer les perturbations potentielles de leur expression dans des feuilles de 1 mm (Xu et al., 2012). En effet, le cycle cellulaire mitotique chez les eucaryotes est un processus hautement régulé dans lequel une séquence ordonnée d'évènements conduit à la division cellulaire. Le cycle cellulaire consiste en quatre phases distinctes : la phase G1, la phase S (où la réplication de l'ADN a lieu), la phase G2 et la phase M (où les cellules se divisent en deux pour donner deux cellules filles). Le bon déroulement de ce cycle cellulaire est très important pour la croissance et le développement des organes chez la plante. Pour cette expérience, j'ai choisi de travailler avec des feuilles de 1 mm de longueur. Il a été démontré qu'à ce stade de développement, les cellules de la feuille sont activement en division cellulaire. J'ai réalisé le prélèvement des feuilles 5 et/ou 6 pour des plantes des différents génotypes cultivées *in vitro* pendant 14 jours. Les plantes contrôles sont les plantes transgéniques exprimant la construction *promCycB1,1::DboxcycB1-GUS*. Les gènes marqueurs des différentes phases du cycle cellulaire sont les suivants. Le gène *CYCD3 ;1* sert de marqueur de phase G1/S. Les gènes *H4b*, *CDT1a*, *ORC1* et *PCNA2* servent de marqueur de la phase S. Le gène *CYCA2;1* sert de marqueur S/G2 et le gène *CYCB1;1* sert de marqueur G2/M (Doerner et al., 1996 ; Shaul et al., 1996). La **figure 44** présente les résultats de la quantification par RT-qPCR. Les valeurs ont été normalisées par rapport aux valeurs mesurées dans les plantes contrôle *promCycB1,1::DboxcycB1-GUS*. Même si l'interprétation de cette expérience unique est difficile et contestable, on peut quand même constater que pour le mutant *msi3-5*, on observe une diminution de la quantité d'une grande partie des gènes testés. Cette observation va de pair avec le phénotype de croissance ralentie des feuilles de rosette de ce mutant, plus marqué que pour *msi2-1*. Ceci tendrait à privilégier l'hypothèse d'un cycle cellulaire mitotique affecté aboutissant à des feuilles de rosette plus petites car moins de cellules sont produites. De manière surprenante, le double mutant *msi2/msi3* ne semble pas présenter ce phénotype moléculaire.

5.2.4 Sélection d'un quadruple mutant *msi2-msi3-msi4-msi5*.

L'identification des mutants nuls *msi2* et *msi3* ainsi que le double mutant *msi2/msi3* ne m'ont pas permis de révéler clairement par génétique inverse la fonction assurée par les gènes *MSI 2* et *MSI 3* au sein de cette petite famille multigénique de 5 membres. L'étude du profil d'expression des 5 gènes MSI ne permet pas d'exclure la possibilité d'une redondance fonctionnelle de sorte que les protéines MSI 1, MSI 4 et MSI 5 pourraient remplir les fonctions de MSI2 et MSI3 dans le double mutant *msi2/msi3*. En vue de répondre à cette question, j'ai commencé à réaliser des croisements pour générer *in fine* le quadruple mutant *msi2/msi3/msi4/msi5*.

La **figure 45** indique la position de chaque gène de la famille sur les 5 chromosomes d'*Arabidopsis*. Il se trouve que les gènes *MSI 2* et *MSI 4* sont localisés sur le chromosome 2 et à une distance génétique estimée à moins de 10 cM. Les gènes *MSI 3* et *MSI 5* sont localisés sur le chromosome 4 et également à une distance génétique estimée inférieure à 10 cM. Dans les deux cas, cela implique une réduction de la ségrégation des 2 caractères non indépendants lorsqu'on réalise le croisement entre les deux lignées puisque les événements de recombinaison sont nécessaires. De plus, pour obtenir les quadruples mutants, je n'ai pas pu utiliser les doubles mutants *msi2/msi3* et *msi4/msi5* que j'ai générés. Pour l'heure, l'obtention du quadruple mutant est en cours.

II. Autre DCAF : WDR55

Cet article rapporte les résultats obtenus en collaboration avec le laboratoire de Paul Grini de la faculté des Mathématiques et des Sciences Naturelle d'Oslo. Paul Grini s'intéresse à la régulation génétique des organismes supérieurs, en se focalisant sur l'empreinte parentale qui est un exemple de ce type de régulation. Cela les a conduits à s'intéresser à une protéine nommée WDR55 existant sous deux formes : WDR55.1 et WDR55.2 chez *A. thaliana*. Elles jouent un rôle dans le développement gamétophytique et embryonnaire. Ces protéines présentent plusieurs domaines WD40 ainsi que les motifs WDxR caractéristique de la famille

des DCAF. Mon travail a consisté à démontrer l'interaction de ces 2 DCAF avec le complexe CRL4 (résultats présentés en figure 9 du papier). Pour cela, j'ai mis en œuvre 3 techniques permettant de montrer les interactions protéines-protéines *in vivo* : la co-immunoprécipitation, le split YFP (BiFC) et la technique de FRET-FLIM. J'ai ainsi pu montrer l'interaction entre les protéines WDR55 et DDB1a par BiFC, FRET-FLIM (Figure 9 du papier) mais aussi par co-immunoprécipitation (données non publiées). Plusieurs essais de co-immunoprécipitation ne m'ont pas permis de démontrer la présence de la protéine CUL4 dans le complexe.

***Arabidopsis* WD REPEAT DOMAIN55 Interacts with DNA DAMAGED BINDING PROTEIN1 and Is Required for Apical Patterning in the Embryo**

Katrine N. Bjerkan,^a Sabrina Jung-Roméo,^b Gerd Jürgens,^{c,d} Pascal Genschik,^b and Paul E. Grini^{a,1}

^a Department of Molecular Biosciences, University of Oslo, N-0316 Oslo, Norway

^b Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 2357, Conventionné avec l'Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

^c Center for Plant Molecular Biology, University of Tübingen, D-72076 Tuebingen, Germany

^d Department of Cell Biology, Max Planck Institute for Developmental Biology, D-72076 Tuebingen, Germany

CUL4-RING ubiquitin E3 ligases (CRL4s) were recently shown to exert their specificity through the binding of various substrate receptors, which bind the CUL4 interactor DNA DAMAGED BINDING PROTEIN1 (DDB1) through a WDxR motif. In a segregation-based mutagenesis screen, we identified a WDxR motif-containing protein (WDR55) required for male and female gametogenesis and seed development. We demonstrate that WDR55 physically interacts with *Arabidopsis thaliana* DDB1A in planta, suggesting that WDR55 may be a novel substrate recruiter of CRL4 complexes. Examination of mutants revealed a failure in the fusion of the polar cells in embryo sac development, in addition to embryo and endosperm developmental arrest at various stages ranging from the zygote stage to the globular stage. *wdr55-2* embryos suggest a defect in the transition to bilateral symmetry in the apical embryo domain, further supported by aberrant apical embryo localization of DORNROESCHEN, a direct target of the auxin response factor protein MONOPTEROS. Moreover, the auxin response pattern, as determined using the synthetic auxin-responsive reporter *ProDR5:GREEN FLUORESCENT PROTEIN*, was shifted in the basal embryo and suspensor but does not support a strong direct link to auxin response. Interestingly, the observed embryo and endosperm phenotype is reminiscent of CUL4 or DDB1A/B loss of function and thus may support a regulatory role of a putative CRL4^{WDR55} E3 ligase complex.

INTRODUCTION

The making of a plant seed is a coordinated effort of transcriptional programs in the different organisms that constitute a seed (Berger et al., 2006). Seed development also requires tight developmental control of male and female gametophytes and their products to secure double fertilization and establish parent-of-origin-specific cues and expression states (Nowack et al., 2010). In *Arabidopsis thaliana*, our understanding of the transcriptional networks that shape and orchestrate plant reproduction has been greatly enhanced in the postgenome era and involves different levels of transcriptionally based regulation, including the various roles of chromatin, and the distribution of hormone gradients (reviewed in Nawy et al., 2008; Berger and Chaudhury, 2009; Sundberg and Østergaard, 2009; De Smet et al., 2010; Ge et al., 2010). However, the levels of regulatory proteins are also regulated by proteolysis, and, like in other

eukaryotes, a major route is through the UBIQUITIN-26S proteasome (UPS)-dependent pathway (Vierstra, 2009). More than 5% of the *Arabidopsis* proteome consists of components of the UPS pathway (Smalle and Vierstra, 2004), and accumulating data suggest its targets to be major regulators in processes ranging from photomorphogenesis to hormone signaling and pathogen response (Vierstra, 2009). With growing evidence of proteolytic and nonproteolytic roles of ubiquitylation, this regulation system thus rivals the role of transcription as the foremost regulatory mechanism (Smalle and Vierstra, 2004; Dreher and Callis, 2007).

The ubiquitylation machinery consists of three enzymes: a ubiquitin-activating enzyme (E1), a ubiquitin-conjugating enzyme (E2), and a ubiquitin-protein ligase (E3) (Hershko and Ciechanover, 1998). The ubiquitin-protein ligase is responsible for the specificity of protein targeting, and all eukaryotes have a large number of E3 ubiquitin ligases, belonging to two major families: the HECT family and the RING family (Jackson and Xiong, 2009). In *Arabidopsis*, more than 1400 genes potentially encode components of E3 ubiquitin ligases (Vierstra, 2009). The RING family of E3 ligases can be subdivided into either monomeric RING E3s or multimeric RING E3s that scaffold on cullin proteins and are called cullin-RING E3 ligases (CRLs) (Petroski and Deshaies, 2005; Jackson and Xiong, 2009). Among the different CRLs, the composition of CUL4-based E3 ligases (CRL4s) was only recently identified (Higa and Zhang, 2007).

¹ Address correspondence to p.e.grini@imbv.uio.no.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Paul E. Grini (p.e.grini@imbv.uio.no).

 Some figures in this article are displayed in color online but in black and white in the print edition.

 Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.111.089425

Orthologs of CUL4 are found in fission yeast, worms, flies, plants, and mammals (Chen et al., 2006). As its orthologs, *Arabidopsis* CUL4 interacts with the RING E3 ligase RING-BOX 1/REGULATOR OF CULLINS 1 (RBX1/ROC1) and the adaptor protein DNA DAMAGED BINDING PROTEIN1 (DDB1) (Bernhardt et al., 2006; reviewed in Biedermann and Hellmann, 2011) and is involved in important processes, such as light-dependent growth regulation, modulation of chromosomal structure, and DNA repair.

Mutation of *Arabidopsis* CUL4 affects embryo and endosperm development and leads to recessive seed abortion as well as a small decrease in male and female gametophyte transmission, indicating that CUL4 is essential for seed development (Dumbliuskas et al., 2011). *Arabidopsis* has two DDB1 paralogs sharing more than 90% protein identity: DDB1A and DDB1B, both interacting with CUL4 (Schroeder et al., 2002). *ddb1a ddb1b* double mutants have shown a critical requirement for DDB1 function both in embryo development as well as gametophyte development or function (Bernhardt et al., 2010; Dumbliuskas et al., 2011). DDB1 proteins are adaptors that bridge CUL4 to the substrate receptors referred to as DDB1-CUL4 associated factor (DCAF) proteins (Angers et al., 2006; He et al., 2006; Higa et al., 2006; Lee et al., 2008). Many DCAFs consist of WD40 proteins carrying a WDxR signature that is necessary for efficient DDB1 binding (He et al., 2006). Interestingly, two DCAFs, DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 (DCAF1) and MULTICOPY-SUPPRESSOR OF IRA1, which have both been shown to interact with DDB1, have been recently reported to play crucial roles in embryogenesis and the latter also in gametogenesis (Lee et al., 2008; Zhang et al., 2008; Dumbliuskas et al., 2011).

Here, we provide data supporting that WDR55 is required for gametophyte development and function as well as embryo and endosperm development. WDR55 carries a signature WDxR motif and was shown to interact with DDB1A proteins in plant cells. Our results suggest that a WDR55-DDB1 complex is involved in the establishment of bilateral symmetry in the *Arabidopsis* embryo and may support a first link to CUL4-mediated regulation of this process.

RESULTS

Isolation of Mutant Alleles

A screen based on the distorted segregation of a transposon-borne NPTII marker conferring resistance to kanamycin was used to identify mutants affected in male and female gametophyte development. The mutant line *dsg3127* showed reduced transmission through the male and female gametophyte and during self-fertilization (Table 1) and was thus selected for further studies. Using a Vectorette PCR (see Methods), the 5' and 3' ends of the DsG transposon were found to reside in the second exon of the gene *At2g34260* (Figure 1A; see Supplemental Table 1 online). This gene encodes a WD40 repeat protein, and we termed it *WDR55* due to its high similarity to the WD repeat protein 55 family (WDR55, IPR017422; see Supplemental Figure 1A online). The mutant line *dsg3127* was accordingly named *wdr55-1*. The insertion leads to a truncated protein with two predicted stop codons immediately after the insertion site (Figure

1B; see Supplemental Table 1 online). Two splice variants, WDR55.1 and WDR55.2, were verified by cloning and sequencing (data not shown), and the DsG element insertion site in *wdr55-1* corresponds to the N-terminal sequence of the longer splice variant WDR55.1, whereas the coding sequence of the shorter splice form WDR55.2 is unaffected by *wdr55-1* insertion (Figures 1B and 1C).

We further analyzed putative alleles of *wdr55-1* from the sequence indexed SALK T-DNA insertion database (see Supplemental Table 1 online). In the T-DNA line WISCDLSOX430F06, both T-DNA borders were found to reside in exon 13 (of 14 total) in *WDR55.1*, corresponding to exon 10 (of 11 total) in *WDR55.2* (Figure 1; see Supplemental Table 1 online). We named this allele *wdr55-2*. A stop codon (TGA) is formed in the T-DNA, two amino acids downstream of the insertion site of the left border sequence of the T-DNA. For both splice variants, this predicts a truncated protein missing the last 47 amino acids (Figures 1B and 1C; see Supplemental Table 1 online).

WDR55 Encodes a WD40 Repeat Protein

WDR55 encodes a WD40 repeat protein (WDR). The best-characterized protein in this family, and the first to have its structure elucidated, is the G β subunit of the heterotrimeric G proteins. The G β subunit adopts a β -propeller fold, which is a symmetrical structure made up of repeats each consisting of a small four-stranded antiparallel β -sheet. Each propeller blade contains the first three strands of one repeat and the last strand in the next (Smith et al., 1999). The WD repeat-containing domains and their implied propeller structure are predicted to act as coordinators for reversible multidomain complex assemblies by supplying a rigid platform or scaffold where a surface for various protein-protein interactions has evolved (Yu et al., 2000).

WDR55.1 has five WD40 repeats predicted by SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) (Figure 1B). We further compared WDR55 to the determined structure of the WD40 protein AGB1, which was chosen due to its sequence similarity to WDR55, using PyMOL (<http://www.pymol.org/>), to check for the presence of other WD repeats than the ones predicted by SMART. The similarities between WDR55 and AGB1 were restricted to the WD40 repeats, which determine the propeller blades of AGB1, indicating the importance of conservation of these sequence domains for the three dimensional structure. We could identify seven possible blades, and, although blades one and seven were not complete in terms of number of β -sheets, a direct alignment of the WD repeats is indicative of a seven-repeat WDR structure (see Supplemental Figure 1B online).

A common feature among WDR proteins is that they have a proposed propeller structure and no enzymatic activity. Some WDR proteins have additional known functional domains, such as the DWD-box (DDB1 binding WD40 box). WDR55 contains a submotif of the DWD-box, named the WDxR motif (Zhang et al., 2008). Both the DWD box and the WDxR motif are signatures for potential substrate receptors of the CUL4 E3 ubiquitin ligases referred to as putative DCAFs (DDB1-CUL4 associated factor). WDxR facilitates assembly with DDB1 and CUL4 proteins, whereas other parts of DCAF bind to proteins to be targeted for ubiquitination (Angers et al., 2006; He et al., 2006).

Table 1. Transmission of the Mutant Alleles *wdr55-1* and *wdr55-2*

Genotype of Cross	Ecotype	Mutant Line	SM ^a	%SM ^R (N) ^b	SD	T ^c	TE ^d	Δ% ^e
<i>wdr55-1</i> +/- self	Ler	<i>dsg3127</i>	Km	55.6 (7412)	5.18	0.74	0.00	74.85
<i>wdr55-1</i> +/- self	Col	<i>dsg3127</i>	Km	50.2 (998)	2.59	0.67	0.02	73.87
<i>wdr55-2</i> +/- self	Col	<i>WiscDslox430F06</i>	BASTA	57.7 (1103)	5.00	0.77	0.01	73.89
Wild type × <i>wdr55-1</i> +/-	Ler	<i>dsg3127</i>	Km	29.5 (1000)	2.96	0.59	0.42	29.08
Wild type × <i>wdr55-1</i> +/-	Col	<i>dsg3127</i>	Km	21.1 (1167)	5.83	0.42	0.27	36.64
Wild type × <i>wdr55-2</i> +/-	Col	<i>WiscDslox430F06</i>	BASTA	38.9 (848)	12.05	0.78	0.64	18.15
<i>wdr55-1</i> +/- × wild type	Ler	<i>dsg3127</i>	Km	39.2 (1624)	3.57	0.78	0.64	17.81
<i>wdr55-1</i> +/- × wild type	Col	<i>dsg3127</i>	Km	44.9 (958)	3.83	0.90	0.81	9.28
<i>wdr55-2</i> +/- × wild type	Col	<i>WiscDslox430F06</i>	BASTA	44.7 (1555)	4.75	0.89	0.81	9.59

All crosses are female × male.

^aSelection marker (SM), kanamycin (Km), and BASTA.

^bPercentage of SM-resistant (SM^R) plants in progeny. N is the number of individuals counted.

^cTransmission of the mutant allele (T) calculated as T(observed)/T(expected).

^dTransmission efficiency.

^eFrequency of defective male or female gametophytes (Δ%) as expected from transmission efficiency (TE). $D = 0.5(1 - TE) \times 100$. TE was calculated according to Howden et al. (1998).

Finally, WDR55.1 contains a signature WDR55 domain encompassing all seven predicted WD repeats. WDR55 is unique in *Arabidopsis* but is conserved throughout eukaryotes with highest sequence similarity to plant orthologs (Figure 1D; see Supplemental Figure 1A online). The closest metazoan homolog is found in *Nematostella vectensis* (UniprotID: A7RNE8, 42% identity).

Outside the regions of the protein occupied by the WD propellers, no functional domains or repeat structures could be identified. This fits well with the predictions from DISOPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred/>) that a structured region occurs in the N-terminal part of the protein, whereas the C-terminal regions (after the WD repeats) of both WDR55.1 and WDR55.2 are unstructured (see Supplemental Figures 1C and 1D online). Disordered protein regions have no stable structures without their partner molecules, and due to this flexibility, they may be more adaptable for interaction with multiple partners with high specificity but low affinity (Dunker et al., 2001; Ishida and Kinoshita, 2008).

WDR55 Splice Variants Are Present throughout the *Arabidopsis* Life Cycle

Various public expression databases report that *WDR55* is expressed throughout the *Arabidopsis* life cycle and also in most tissues (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>; www.genevestigator.com). To confirm these findings and investigate the abundance of the two splice variants, we performed real-time quantitative PCR with primers specific for the two splice variants. Both splice variants were present in all tissues examined, with highest abundance in roots (Figures 2A and 2B). Similarly, both splice forms could be detected throughout seed development (see Supplemental Figures 2A and 2B online).

Using a *WDR55* promoter β-glucuronidase (GUS) fusion construct (*ProWDR55:GUS*), expression in most tissues could be verified using three independent single locus transgenic lines (see Supplemental Figures 2C to 2Q online). A thorough analysis of male and female gametophyte stages revealed prominent *ProWDR55:GUS* expression throughout embryo sac development (Figures 2C to 2F), and expression could also be found in

the embryo proper until 2 d after pollination (DAP) (see Supplemental Figures 2C and 2D online). Only low levels of *ProWDR55:GUS* expression in the seed could be detected at later developmental stages, but a prominent GUS signal accumulated in the cotyledons of the mature embryo (see Supplemental Figure 2F online) and persisted in the cotyledons and roots after germination, and subsequently in leaves, buds, and flowers (see Supplemental Figures 2G to 2R online). Similarly, *ProWDR55:GUS* expression was detected during pollen development from meiosis up to the second pollen mitosis (Figures 2G to 2N). At mature (three nucleate) stages, there was no evident GUS signal (Figures 2J and 2N).

WDR Mutants Show Transmission Failure

Next, we performed a thorough analysis of *wdr55* on the genetic and morphological level. Adult heterozygous *wdr55* plants were indistinguishable from the wild type. Transmission of the *wdr55-1* allele was analyzed in successive generations F3 to F10 and showed a stable segregation of 55.6% ($n = 7412$; Table 1) during self-fertilization. No lines homozygous for the transposon containing *NPTII* were detected among more than 14 sublines analyzed, and no homozygous plants were identified by genotyping using the *DsG* transposon and gene-specific primers. To determine which sex of the gametophyte generation was affected in *wdr55-1*, reciprocal crosses were performed. The transmission of the *wdr55-1* allele was reduced through the male gametophyte (29.5%, $n = 1000$) and to a lesser extent through the female gametophyte (39.2%, $n = 1624$) (Table 1), thus suggesting that the *wdr55-1* mutation impairs male and female development or function.

The *wdr55-2* allele segregated 57.7% BASTA-resistant progeny in selfed plants ($n = 1103$; Table 1), suggesting similar effects as observed in *wdr55-1*. However, only a slight reduction in male and female transmission of the *wdr55-2* allele could be observed in the progeny of reciprocal crosses (Table 1). To determine whether the gametophyte effect in *wdr55-1* was ecotype specific (*wdr55-1* is in Landsberg *erecta* [Ler], whereas *wdr55-2* is in the

Columbia [Col] accession), we introgressed *wdr55-1* into Col (crossed six times). Col-introgressed *wdr55-1* displayed even more reduced transmission through the male gametophyte, but segregation through the female gametophyte was slightly increased (Table 1).

***wdr55-1* Affects Polar Nuclei Fusion**

In *wdr55-1*, a weak effect on embryo sac development was expected based on transmission data (Table 1). Close inspection of unfertilized siliques 3 d after emasculation (DAE) revealed a modest frequency of unfused polar nuclei in *wdr55-1* embryo sacs (29%, $n = 101$) compared with wild-type *Ler* (5%, $n = 53$; Figure 3; see Supplemental Table 2 online). The frequency of unfused polar nuclei decreased at 4 DAE, suggesting a delay in polar nuclei migration and karyogamy (16%, $n = 55$; Table 2). Upon hand-pollination of female *wdr55-1* 3 DAE, the frequency of unfused polar nuclei at 2 DAP decreased further compared with *Ler* controls (7%, $n = 92$ and 4%, $n = 57$, respectively; Table 2, Figure 3). Finally, no unfused polar nuclei were found in 4 DAE pollinated siliques at 2 DAP (see Supplemental Table 2 online), suggesting that the fusion of polar nuclei to form the diploid central cell nucleus is delayed in the *wdr55-1* mutant in the *Ler* background. A similar delay was not observed in the Col-introgressed *wdr55-1* allele (see Supplemental Table 2 online) or in the *wdr55-2* allele, suggesting that ecotype-specific modifiers influence the penetrance of the *wdr55-1* phenotype. This supports the observation that all crosses involving a maternal *Ler* partner showed a slight delay in polar nuclei fusion compared with Col (see Supplemental Table 2 online). Furthermore, these observations are in line with the observed increased maternal transmission of the *wdr55-1* allele in the Col background (Table 1).

The antipodal cells undergo programmed cell death (PCD), and the timing of this event has been suggested to be in part regulated by the presence of a functional central cell (Gross-Hardt et al., 2007; Kägi et al., 2010). We therefore inspected PCD

of *wdr55-1* antipodal cells by means of whole-mount microscopy. We found no strict correlation between polar cell fusion and antipodal degeneration in *wdr55-1* (Figure 3B). In 2 DAE embryo sacs, when approximately half of the mutant polar nuclei were unfused, compared with most being fused in the wild-type control (59 and 3% unfused, $n = 100$ and 39, respectively), a relatively similar frequency of antipodal cells was observed in the mutant and in the wild type (11 and 18%, $n = 100$ and 39, respectively), suggesting that antipodal PCD in *wdr55-1* is similar to the wild type. Notably, all antipodals observed in the mutant were correlated with unfused polar nuclei.

A simple hypothesis derived from these experiments would be that if polar nuclei were given the time to fuse properly, the *wdr55-1* mutation in *Ler* would segregate as the wild type (i.e., in a 1:1 ratio). To investigate this, *wdr55-1* siliques were pollinated with *Ler* 4 DAE and the progeny seeds were selected for the transmission of the mutation. Surprisingly, the transmission was not restored to the hypothetical 1:1 ratio (50%) but actually decreased (26.6%, $n = 143$) compared with the *wdr55-1* siliques pollinated 3 DAE (39.2%, $n = 1624$; Table 1). This may suggest that *wdr55* is also involved in other processes affecting the timing or specification of the egg apparatus.

We further examined the role of WDR55 in the female gametophyte by ectopically expressing WDR55 splice variants under the control of the promoter of the ubiquitously expressed cell cycle regulator *CDKA;1* (Nowack et al., 2006; Dissmeyer et al., 2007). More than half of the recovered *pCDKA;1* overexpression lines displayed a variable albeit high frequency of undeveloped seeds at 2 DAP (see Supplemental Figure 3A online). Closer inspection of representative *ProCDK:WDR55.1* lines at the wild-type octant embryo stage (see Supplemental Figures 3A and 3B online) revealed uniform arrest of 49 to 80% of the female gametophytes before the first mitotic division ($66\% \pm 22\%$, $n = 122$; see Supplemental Figure 3C online). Similarly, *ProCDK:WDR55.2* lines inspected at the early globular stage of embryogenesis (see Supplemental Figure 3D online) displayed arrest at the one-nucleate embryo sac stage, in a few cases allowing up to

Figure 1. (continued).

(A) to (D) Diagrams of WDR55 with insertional mutants, *wdr55-1* and *wdr55-2* (A), diagrams of the splice forms WDR55.1 (B) and WDR55.2 (C), indicating truncated proteins resulting from T-DNA insertion, and alignment of WDR55 plant orthologs (D).

(A) An 8-bp target site duplication occurred at the insertion site of the DsG element in the DsG line *wdr55-1*. Two copies of the T-DNA were inserted in reverse orientation into the same loci in *wdr55-2*. The vertical dashed lines highlight the difference between the two splice forms. Intron 3 in the genomic sequence is part of the 5' untranslated region (UTR) of WDR55.2. The WDR55.2 transcriptional start site includes 22 bp of the 3' end of WDR55.1 intron 3. Purple boxes, exons; white boxes, introns; yellow line, WDR55 transcribed region.

(B) WDR55.1 contains five annotated WD40 motifs and is affected by both *wdr55-1* and *wdr55-2* insertion. *wdr55-1* results in a protein that is truncated to 34 amino acids. The *wdr55-2* mutant results in a protein that is truncated to 306 amino acids, missing the last 47 amino acids. White boxes with WD indicate annotated WD40 motifs; purple boxes, not annotated.

(C) WDR55.2 contains four annotated WD40 motifs and is only affected by *wdr55-2*. The insertion results in a truncated protein of 247 amino acids that is missing the last 47 amino acids. Blue vertical lines indicate the position of the DsG element for the *wdr55-1* mutant and the T-DNA for the *wdr55-2* mutant. Dashed box indicates position of the partial DWD motif.

(D) WDR55 plant homologs were identified using WU-BLAST software and aligned using ClustalW2 software. Conservation is marked in black, and the conserved amino acid is indicated in capital letters below the alignment. Residues conserved across most species are indicated in lowercase letters and numbers. Light gray marks the less conserved residues. Gaps are indicated with dashed lines. WD-repeats identified by SMART are indicated by blue lines. Red lines indicate putative additional WD-repeats identified by PyMOL. The DWD motif is marked by red and a green-boxed area, where the green-boxed area is the WDxR motif. At, *Arabidopsis*; Vv, *Vitis vinifera*; Mt, *Medicago truncatula*; Pt, *Populus trichocarpa*; Gh, *Gossypium hirsutum*; Zm, *Zea mays*; Os, *O. sativa*; Pp, *Physcomitrella patens*; Ol, *Ostreococcus lucimarinus*. aa, amino acids.

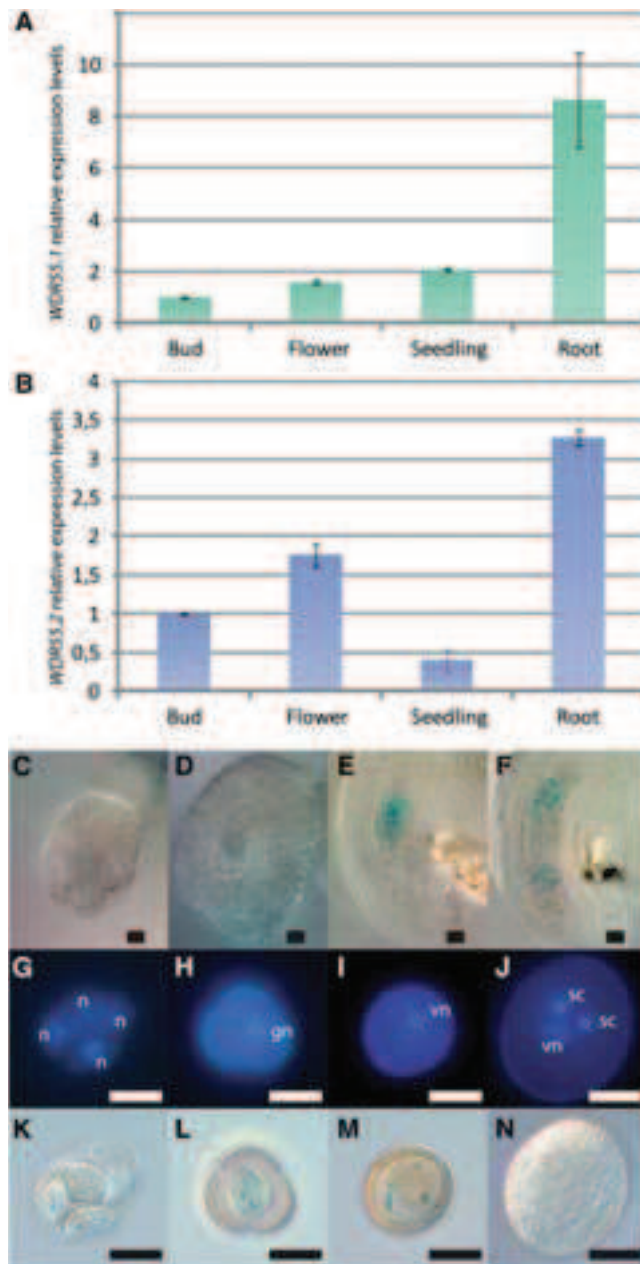


Figure 2. WDR55 Is Expressed in Various Tissues and in the Female and Male Gametophyte.

(A) to (N) Expression of *WDR55* in various tissues by means of real-time PCR of *WDR55.1* (A) and *WDR55.2* (B) and micrographs showing *WDR55* expression using a GUS promoter reporter construct during female gametophyte development ([C] to [F]) and male gametophyte development ([G] to [N]).

(A) and (B) Relative mRNA levels of the splice variants *WDR55.1* (A) and *WDR55.2* (B) in buds, flowers, seedlings, and roots in wild-type *Arabidopsis* Col. The graph shows the average relative expression and SD calculated from the three independent biological replicas. *WDR55* transcript levels were normalized to *ACTIN11* levels.

(C) to (F) *ProWDR55:GUS* is expressed with increasing strength throughout embryo sac development from meiosis (C), one-nucleate embryo sac

two mitotic divisions ($45\% \pm 13\%$, $n = 84$; see Supplemental Figure 3F online). Moreover, *ProCDK:WDR55.2* lines also resulted in a variable frequency of aberrant seeds with underdeveloped endosperm (see Supplemental Figure 3E online), suggesting that *ProCDK:WDR55.2* is less detrimental to embryo sac development than the longer *WDR55.1* splice form.

The WDR55 Level Is Crucial for Pollen Function

The transmission efficiency of *wdr55-1* in pollen (Table 1) and *WDR55* expression at early stages of male gametogenesis (Figures 2K to 2N) suggest that *WDR55* is required for male gametophyte development or function. However, upon inspection of whole-mount 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)-stained pollen of *wdr55-1* heterozygous plants, no obvious phenotype could be detected, as all mature pollen contained a vegetative cell and two sperm cells (see Supplemental Figure 4A online). Furthermore, *wdr55-1* was crossed to *quartet*, which is deficient in the separation of microspores after meiosis and thus allows tetrad analysis (Preuss et al., 1994), without revealing any observable phenotype (see Supplemental Figures 4B and 4C online). All pollen could be shown to be viable using Alexander's Stain (Alexander, 1969; see Supplemental Figure 4D online; $n = 342$). Finally, to investigate if sperm cell fate is disturbed in *wdr55-1* pollen, we introduced the germ line markers *ProH3.3:H3.3-RFP* (for red fluorescent protein) and *ProDUO:DUO-RFP* (Rotman et al., 2005; Ingouff et al., 2007; Brownfield et al., 2009). Both markers were uniformly expressed in sperm cells of pollen from heterozygous *wdr55-1* plants (see Supplemental Figures 4E to 4H online), and mature *wdr55-1* pollen were thus by our criteria indistinguishable from those of the wild type. Considering the reduced transmission of the mutant allele, *WDR55* is therefore suggested to be required for male gametophyte function, such as pollen tube growth, guidance, or fertilization. We therefore compared wild-type and *wdr55-1* pollen tube germination in vitro (see Supplemental Figures 4I and 4J online). The overall germination rate in the mutant was moderately lower than in the wild type (71%, $n = 402$; and 80%, $n = 406$, respectively). We further compared the frequency of germinating pollen with short tubes (tube span less than one pollen diameter) between the wild type and mutant. The frequency of germinating pollen with short tubes in the mutant was reminiscent of the wild type frequency, and no obvious difference in pollen tube morphology could be observed

(D), four-nucleate embryo sac (E), and mature seven-celled embryo sac (F).

(G) to (J) The developmental stages of GUS-stained pollen visualized by DAPI. Development from after meiosis, showing a tetrad of haploid cells (G), which are released as uninucleate pollen (H). After asymmetric division to form the two-nucleate stage (I) with one vegetative cell and one generative cell, the generative cell then divides to form two sperm cells (J). gn, generative nucleus; n, nucleus; sc, sperm cell; vn, vegetative nucleus.

(K) to (N) The fusion construct *ProWDR55:GUS* demonstrated weak expression from meiosis (K) up to the two-nucleate stage (M) of pollen development. Note, no expression in mature pollen (N).

Bar = 5 μ m.

Table 2. Embryo Development Arrests in *wdr55-1* and *wdr55-2* Alleles

Genotype of Cross	Total	Wild Type	Developed Seed Late Arrest	Developed Seed Early Arrest	Collapsed Undeveloped
Self					
<i>wdr55-1</i> 3–14 DAP	784	73.9%	0.0%	13.9%	12.2%
<i>wdr55-2</i> 8–12 DAP	548	77.2%	17.9%	0.6%	4.4%
Col 8–12DAP	340	98.5%	0.3%	0.6%	0.6%
Ler 14 DAP	131	96.2%	0.8%	3.1%	0.0%
Cross to the wild type					
<i>wdr55-1</i> × Ler 7–14 DAP	187	87.2%	0.0%	4.8%	8.0%
<i>wdr55-2</i> × Col 7 DAP	83	96.4%	0.0%	0.0%	3.6%
Complementation cross					
<i>wdr55-1</i> × <i>wdr55-2</i> 8–14 DAP	286	80.8%	6.6%	1.8%	10.8%
<i>wdr55-2</i> × <i>wdr55-1</i> 8–14 DAP	167	83.8%	11.4%	0.6%	4.2%

Embryo phenotype count for *wdr55-1* and *wdr55-2* showing percentage of total counts in four classes: wild-type development, developed seed late arrest, developed seed early arrest, and undeveloped seeds that have not been fertilized. All crosses are female × male.

(see Supplemental Figure 5K online). Albeit not fully explaining the *wdr55-1* male transmission deficiency, our results hint at a requirement for WDR55 in pollen tube germination.

In our expression analysis, *ProWDR55:GUS* displayed a modest level of expression during the early microspore stages but could not be detected in the mature pollen grain (Figure 2). This may suggest that fine-tuning of the WDR55 level is crucial for pollen function. This hypothesis was supported by analyzing pollen development in *ProCDK:WDR55.1* and *ProCDK:WDR55.2* lines. Two out of six *ProCDK:WDR55.1* lines examined and four out of nine *ProCDK:WDR55.2* lines checked displayed high frequencies of aborted pollen (see Supplemental Figures 5A to 5H online). In *ProCDK:WDR55.1* lines, meiosis appeared to be affected, producing early-stage abortions in microspores (see Supplemental Figures 5I to 5L online). No meiotic defects were detected in *ProCDK:WDR55.2* lines, but microsporogenesis appeared to be hampered already in the first microspore mitosis (see Supplemental Figures 5M to 5P online).

WDR55 Is Required for Embryo and Endosperm Development

Since the gametophyte lethality in *wdr55* alleles is not fully penetrant, we expected homozygous *wdr55-1/wdr55-1* plants to segregate from a self-cross. However, no homozygous plants could be identified by genotyping experiments for either allele. Since the reduced transmission rates of the mutant alleles cannot be explained by gametophyte failure alone, the genetic analyses of both alleles therefore suggest that WDR55 is also required post fertilization (Table 1).

We investigated the requirement of WDR55 in the developing embryo and endosperm by inspecting cleared whole-mount preparations of heterozygous hand-pollinated *wdr55-1* and *wdr55-2* compared with the wild type at 1 to 12 DAP. In the wild type, the embryo develops through a series of invariant cell divisions, resulting in a fully differentiated bent-cotyledon embryo (Figure 4). The wild-type endosperm proliferates through syncytial nuclear divisions in parallel with the developing embryo and is gradually consumed by it (Figure 4). In siliques from heterozygous *wdr55-1* and *wdr55-2*, however, a significant fraction of the seeds were arrested in development (14 and

18%, respectively; Table 2). To rule out gametophyte maternal effects, *wdr55-1* and *wdr55-2* were crossed as females to wild-type plants. No significant seed abortion was observed in these crosses (Table 2), in agreement with our genetic data (Table 1), suggesting aborted seeds to be homozygous *wdr55*.

In *wdr55-1*, the first three to four endosperm nuclear divisions as well as the initial asymmetric division of the zygote appeared to occur normally up to 2 DAP (Figure 4). However, subsequent development of the proembryo and the embryo suspensor was not observed in the affected class after this stage. Similarly, the endosperm did not progress beyond the fourth syncytial division and seemed to start to degenerate in the syncytial state 4 DAP (Figure 4). Concurrent with the embryo and endosperm arrest, no further development or elongation of the ovule integuments were observed (Figure 4).

In *wdr55-2*, we observed wild-type progression in embryo and endosperm development up to the embryo mid-globular stage 4 DAP (Figure 4). In wild-type globular embryos, the cotyledon primordia initiate at 5 DAP and are clearly recognizable in the 6 DAP heart-stage embryo (Figure 4). Syncytial endosperm divisions continue, and endosperm domains are visible at 5 DAP, with peripheral endosperm nuclei lining the endothelium of the inner integuments. *wdr55-2* embryos, however, remained in the globular state up to 8 DAP (Figure 4). In contrast with the wild type, no initiation of cotyledon primordia could be observed, from 5 throughout 8 DAP (Figure 4). Endosperm development was also delayed, and syncytial endosperm nuclei were enlarged and reduced in number and appeared disorganized compared with the wild type (Figure 4). Cellularization was not observed up to 8 DAP, and the endosperm did not appear to degenerate. Most *wdr55-2* seeds still appeared to be viable at 12 DAP, and these embryos were comparable in size with 6 DAP wild-type heart stage embryos but entirely lacked the organized cell division pattern and a distinguished bilateral symmetry in the apical region (Figure 4). However, upon silique ripening, further development of the mutant seeds was not supported.

Taken together, WDR55 is required for the early stages of embryo and endosperm development, as evidenced by the arrest of the *wdr55-1* proembryo at 2 DAP, as well as the involvement of WDR55 in the establishment of bilateral symmetry in the transition from the globular to the heart embryo stage.

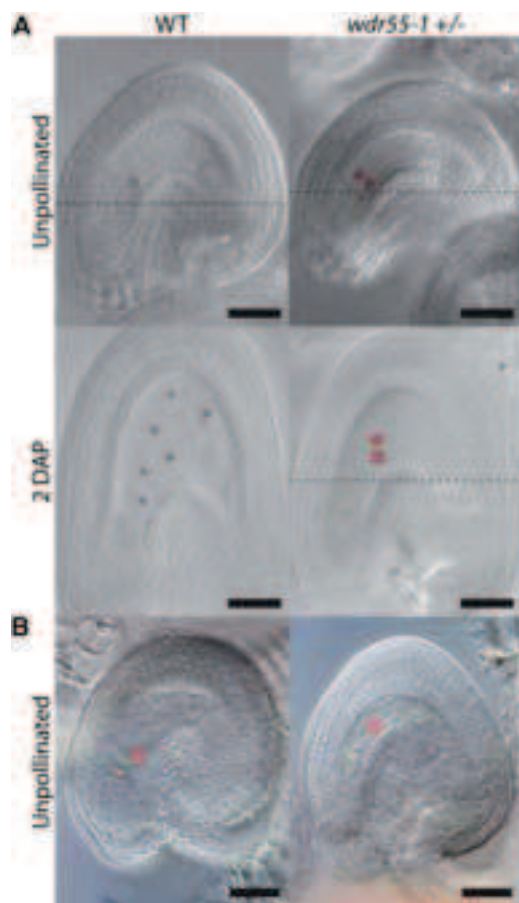


Figure 3. Polar Nuclei Fusion Is Delayed in the *wdr55-1* Embryo Sac.

(A) and (B) Light micrographs showing the embryo sac phenotype in unpollinated wild-type (WT) Ler and *wdr55-1* ovules and ovules 2 DAP in Ler wild type and in *wdr55-1* crossed to wild-type Ler. The light micrograph with a dotted line in (A) represents two focal planes that were assembled using Adobe Photoshop. Pink coloration indicates central cell nuclei, purple color shows developed endosperm nuclei, red color marks unfused polar nuclei, antipodal cells are marked green, and the egg cell nucleus is shown in yellow. Bars = 20 μ m.

(A) Fused polar nuclei (central cell nucleus) in the wild type (left) compared with *wdr55-1* ovules showing unfused polar nuclei in unpollinated ovules 2 DAE and also at a lower percentage in pollinated ovules 2 DAP. Unpollinated ovules were examined and crossed 3 DAE.

(B) Wild-type female gametophyte (left) with fused polar cells (central cell nucleus) and degenerated antipodal cells and *wdr55-1* female gametophyte (right) displaying unfused polar cells and visible antipodal cells.

Both *wdr55* Splice Forms Are Required for Embryo Development

Due to the phenotypic divergence between the *wdr55* alleles, we performed reciprocal genetic complementation crosses and inspected the resulting siliques directly. As expected, *wdr55-1* and *wdr55-2* did not complement each other and are therefore allelic (Table 2). Interestingly, closer inspection using whole-mount cleared preparations revealed that the reciprocal crosses of the two alleles gave rise to the same embryo phenotype of

wdr55-2. This finding further supports the zygotic requirement of *WDR55*, since one copy of the weaker allele *wdr55-2* is sufficient to sustain embryo development up to the globular stage, regardless of its parental contribution (Table 2, Figure 5).

Next, we performed molecular complementation using the genomic sequence of *WDR55* and 1283 bp of the upstream promoter region (see Methods for details). This construct was transformed directly into heterozygous *wdr55-1* and selected for the presence of both the rescue construct and the *wdr55-1* allele. In the T2 generation, several lines were found to be *wdr55-1* homozygous, indicating full rescue of both the seed and the gametophyte deficiency in *wdr55-1* plants (see Supplemental Table 3 online). We further crossed a line homozygous for *wdr55-1* and the rescue transgene to a heterozygous *wdr55-2* plant. *wdr55-1 wdr55-2* seeds are lethal without the rescue transgene (Figure 5), but *trans*-homozygous plants were identified in the resulting progeny by genotyping (five of 16 plants investigated), indicating that both *wdr55-1* and *wdr55-2* are complemented by the *WDR55* transgene.

To investigate whether the two *WDR55* splice forms have specific roles in gametophyte or embryo development, we designed splice variant-specific rescue constructs containing the 1326-bp *WDR55* promoter fused to the *WDR55* long or short splice form cDNA sequence. The constructs were transformed separately into heterozygous *wdr55-1* and selected for the presence of a splice form rescue construct and the *wdr55-1* allele. No homozygous *wdr55-1* plants were obtained in subsequent generations, indicating that both splice forms or regulatory sequences not present in our transgenes are required for embryo and endosperm development.

We further compared the effect of the single splice variant rescue constructs on the transmission of *wdr55-1*. The overall effect of all *WDR55.1* rescue construct lines on *wdr55-1* transmission was not significantly different from that of the *wdr55-1* controls (Figure 5B). However, six transgenic lines with elevated transmission were rechecked in the T3 generation and seemed to have a stable higher transmission of $\sim 64.9\%$ ($n = 1279$; $SD \pm 0.8$), indicating that *WDR55.1* can partially rescue the gametophyte transmission defect in *wdr55-1*. Furthermore, the homozygous embryo phenotype in the same outlier lines was partially rescued and arrested at the globular stage, similar to the phenotype observed in *wdr55-2* (Figure 5C; 19% [$n = 1423$; $SD \pm 4.3$] out of a total of 24.7% defective seeds [$n = 1423$; $SD \pm 4$]). This may suggest that *WDR55.1* is sufficient for embryo development up to the globular stage. However, both *WDR55* splice forms appear to be required to complete seed development. Surprisingly, the shorter splice variant, *WDR55.2*, led to a decrease in *wdr55-1* transmission (Figure 5B). We did not further inspect the possible phenotypic basis of this effect, but since the *WDR55.2* transcript is not physically interrupted by the *wdr55-1* mutation, and we have seen that overexpression of *WDR55.2* induces gametophyte failure (see Supplemental Figures 4 and 5 online), one could speculate that a strict requirement for correct levels of *WDR55.2* may be needed.

Embryo Patterning Is Disturbed in *wdr55* Mutants

The observed phenotype in *wdr55-2* embryos suggests a defect in the transition to bilateral symmetry in the apical embryo

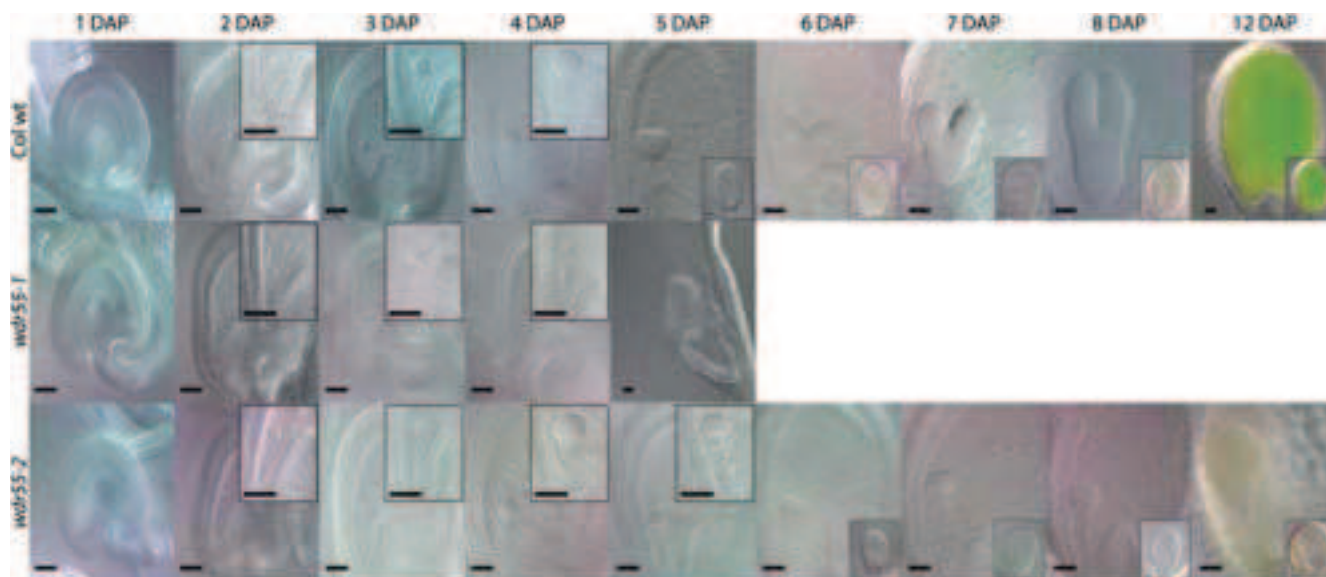


Figure 4. *wdr55-1* and *wdr55-2* Have Arrested Embryo Development.

Light micrographs showing the embryo and endosperm phenotype for *wdr55-1* (middle panel) and *wdr55-2* (bottom panel) compared with wild-type (wt) Col (top panel) at 1 to 8 and 12 DAP. Insets at 2 to 5 DAP show embryo detail. Insets at 5 to 12 DAP show whole seed. Top panel: The wild-type Col embryo and endosperm develops from the zygote (1 to 2 DAP), to the early globular stage (3 to 4 DAP), to the heart stage (5 to 7 DAP), to the torpedo stage (8 DAP), and then through to the bent cotyledon stage (12 DAP). Middle panel: The *wdr55-1* $-/-$ embryo and endosperm appear to develop normally up to 2 DAP with three to four endosperm nuclear divisions and the initial asymmetric division of the zygote, but then arrests at around 3 DAP, after which the seed starts to collapse (4 to 5 DAP). Bottom panel: The *wdr55-2* $-/-$ embryo and endosperm develop normally up to the mid-globular stage (4 DAP), but the embryo is then delayed in development and does not initiate the cotyledon primordial throughout the stages investigated (5 to 8 and 12 DAP). The endosperm is also delayed and does not appear to have cellularized by 8 DAP. Bars = 20 μ m. [See online article for color version of this figure.]

domain (i.e., cotyledon specification). Defects in the breakage of radial symmetry are associated with transcription factors like *DORNROSCHE* (*DRN*)/*DORNROSCHE*-LIKE (Chandler et al., 2007) or genes relating to auxin signaling or transport (Friml et al., 2003). The transcriptional auxin responses required for axialization are mediated by the auxin response factor (ARF) protein MONOPTEROS (MP) and the AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (AUX/IAA) protein IAA12/BODENLOS (Jenik et al., 2007). *DRN* has been shown to be directly regulated by MP in response to auxin, in cotyledon tips from the embryo heart stage and onwards, and, in early heart stage *mp* embryos, *DRN* is not downregulated in the shoot apical meristem (SAM) region (Cole et al., 2009).

We investigated the expression pattern of a *ProDRN:GFP* (for green fluorescent protein) transgene in developing *wdr55-2* embryos. In the wild type, *DRN:GFP* accumulates in the cotyledon initials in the apical part of the globular embryo and remains symmetrically localized throughout the embryo heart stage. A weak signal can be observed at the bent cotyledon stage in addition to accumulation in the shoot meristem (Figures 6A to 6F; Cole et al., 2009). However, *ProDRN:GFP* expression in globular stage *wdr55-2* $-/-$ embryos is present in the entire apical domain and appears to be weaker than in wild-type embryos (Figure 6G), similar to the situation at early wild-type stages before polarized localization (Cole et al., 2009). In subsequent stages, *DRN:GFP* localizes to the upper tier of the apical domain of the mutant embryos (Figures 6H and 6I), and occasionally

nonsymmetric localization to one of the cotyledon initials could be observed (Figure 6J). At later stages, localization to the cotyledon initials was observed sporadically (Figure 6K), but the majority of mutant embryos failed to downregulate *ProDRN:GFP* expression in the SAM domain and possessed uniform localization in the entire uppermost tier (Figure 6L). This strongly supports our findings that WDR55 is required to break radial symmetry and establish bilateral symmetry in the apical embryo domain.

We therefore inspected the auxin response pattern in *wdr55-2* embryos using the synthetic auxin-responsive reporter *ProDR5:GFP* (Ulmasov et al., 1997; Ottenschlager et al., 2003). In the wild type, the basal auxin maxima are restricted to the upper suspensor and hypophysis in the embryo proper (Figures 6M to 6Q) (Friml et al., 2003; Ottenschlager et al., 2003). *ProDR5:GFP* expression in the mutant largely resembles that in the wild type but appears somewhat more variable and is basally expanded in the suspensor and variably reduced in the hypophysis (Figures 6R to 6X). Whereas auxin accumulation was only rarely observed in basal suspensor cells in the wild type, this was the most frequent situation in the mutant (Figures 6R, 6S, and 6U). Auxin maxima in the hypophyseal region were in most cases weak (Figures 6R and 6V) but ranged from virtually absent (Figures 6R and 6V) to a prominent signal (Figures 6S and 6T). These results do not support a strong link to the auxin response. However, an indirect relationship between WDR55 action and auxin response cannot be ruled out.

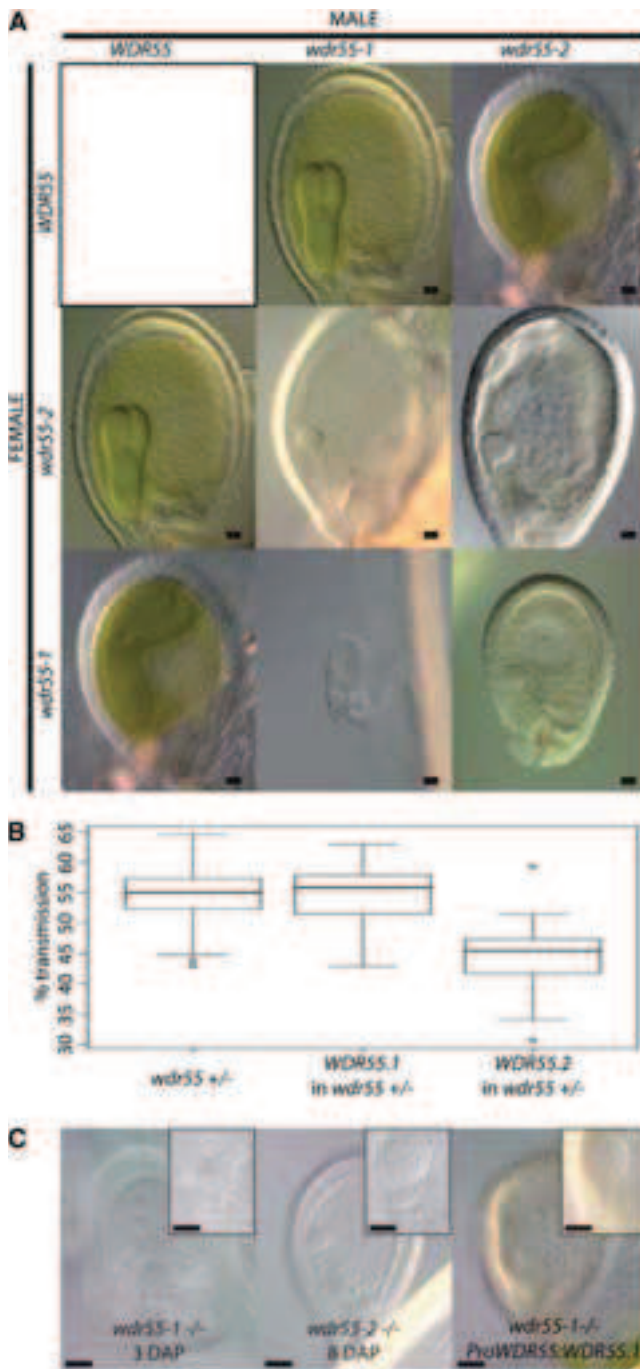


Figure 5. Complementation Cross between *wdr55-1* and *wdr55-2* and Splice Variant Complementation of *wdr55-1*.

Light micrographs of phenotypes resulting from complementation crosses between *wdr55-1* and *wdr55-2* (A), box plot representation of the effect of splice variant-specific (*WDR55.1* and *WDR55.2*) complementation on *wdr55-1* segregation (B), and light micrographs of *WDR55.1* splice variant complementation of the *wdr55-1* phenotype (C). Reciprocal crosses between *wdr55-1* and *wdr55-2* give a *wdr55-2* phenotype both when used as mother and father (A). When using the cDNA sequence of the two splice variants, *WDR55.1* and *WDR55.2*,

We further investigated endosperm development using specific marker lines. *ProFIS2:FIS2-GUS* (Luo et al., 1999) was used as an early endosperm marker in *wdr55-1* and *wdr55-2*. Arrested endosperm nuclei in *wdr55-1/wdr55-1* seeds expressed the marker (Figures 7A and 7B); however, a fraction of the mutant seeds did not show uniform expression as found in the wild type (Figure 7A), but expression was confined to the chalazal endosperm region (Figure 7C) or even appeared to be lost (Figure 7D; 20% of the cases as opposed to 6% in the wild type [$n = 86$ and 82 , respectively]). Mutant seeds in heterozygous *wdr55-2* siliques also displayed a similar *ProFIS2:FIS2-GUS* expression pattern (see Supplemental Figure 6 online). *ProFIS2:FIS2-GUS* expression in micropylar endosperm and peripheral endosperm nuclei was lost after four to five syncytial divisions and remained in the chalazal endosperm region, as also seen in the wild type (Luo et al., 1999), thus suggesting a functional chalazal endosperm in the *wdr55-2* endosperm. Similar results were also observed using a *ProKS117:GFP* marker (Sørensen et al., 2001). *ProKS117:GFP* marks the early stages of syncytial endosperm development and is regarded as a marker of endosperm identity (Ungu et al., 2008). Although delayed compared with the wild-type endosperm, a uniform *ProKS117:GFP* expression pattern could be observed in the *wdr55-2* endosperm at both the early and late stages of embryo development (see Supplemental Figure 6 online).

WDR55 Localizes to the Nucleus and the Cytoplasm

The lack of bilateral symmetry and the abnormal expression of a direct target of the ARF MP suggest that WDR55 may function in the nucleus, possibly by targeting components of the auxin regulatory pathway (see Discussion). However, WDR55 from Medaka was recently reported to be localized to the nucleolus and to the cytoplasm (Iwanami et al., 2008). To clarify the subcellular localization of *Arabidopsis* WDR55, C-terminal GFP fusion constructs of both WDR55 splice forms under the control of the cauliflower mosaic virus 35S promoter (*Pro35S*) were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* for infiltration of tobacco (*Nicotiana tabacum*) leaves. Inspection of leaves 2 to 4 d

under the control of their endogenous promoter to separately complement the *wdr55-1* segregation phenotype on kanamycin selection plates, neither rescues the phenotype completely and *WDR55.2* seems to have a negative effect on the transmission (B). The box plot values indicated are as follows: the smallest observation (sample minimum), lower quartile, median (in bold) upper quartile, and the largest observation (sample maximum). Observations considered outliers are indicated by small circles. For the box plot, 26 observations of segregating *wdr55-1* lines were used, and a total of 6280 seedlings were counted on kanamycin selection. For the *WDR55.1* splice variant in the *wdr55-1* background, 31 observations from individual transformants were used and a total of 5964 seedlings were counted on kanamycin selection. For the *WDR55.2* splice variant in the *wdr55-1* background, 26 observations from individual transformants were used and a total of 4066 seedlings were counted on kanamycin selection. Complementation of *wdr55-1* by the splice variant *WDR55.1* resulted in a *wdr55-2* phenotype in the *wdr55-1* background (C). Insets are magnified versions of the embryo region from the respective seed shown. Bar = 20 μ m. Inset bars = 10 μ m.

[See online article for color version of this figure.]

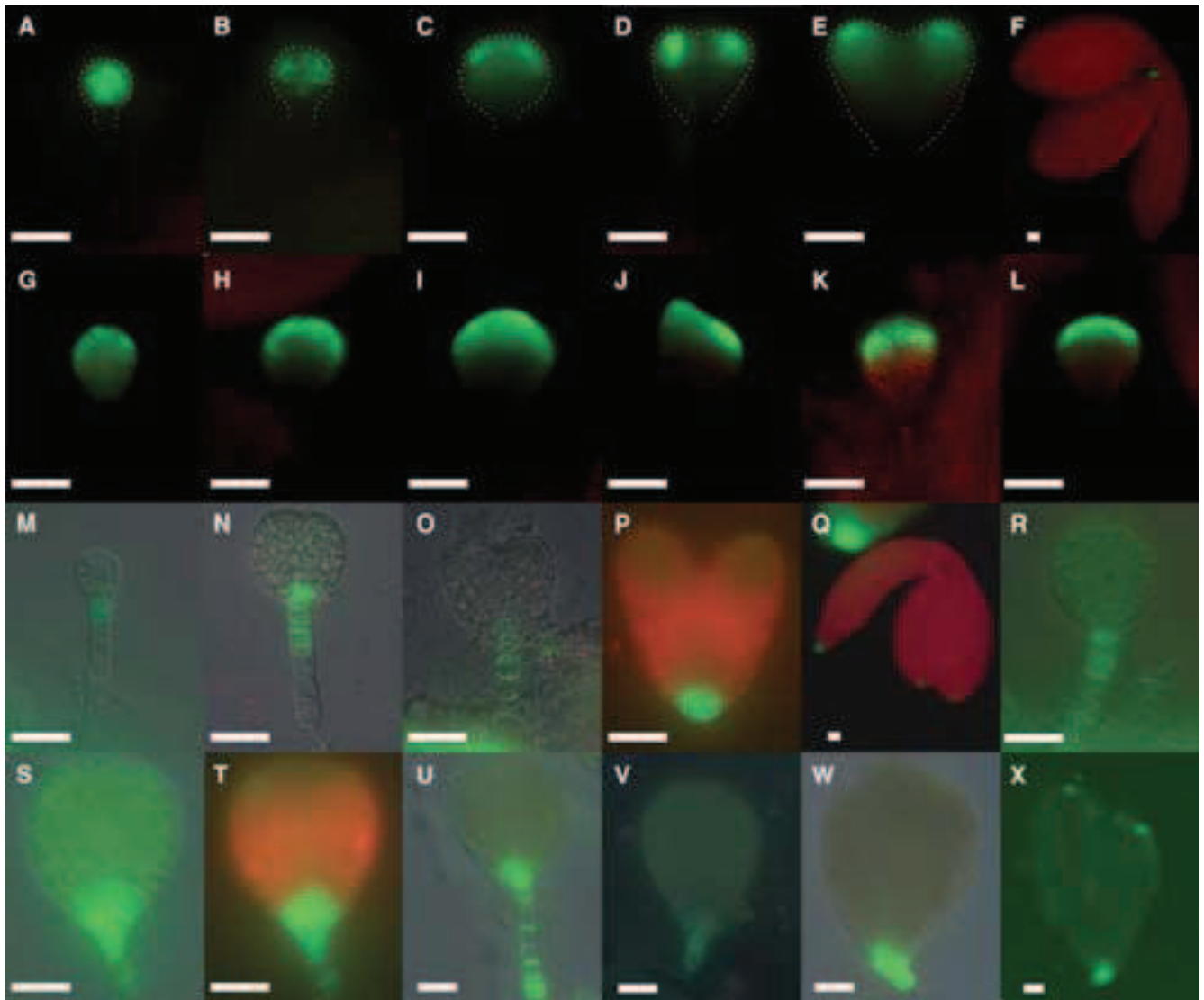


Figure 6. *ProDRN:GFP* and *ProDR5:GFP* Expression in the *wdr55-2* $-/-$ Embryo.

(A) to (X) Fluorescence micrograph of *ProDRN:GFP* and *ProDR5:GFP* expression in wild-type ([A] to [F] and [M] to [Q]) and *wdr55-2* ([G] to [L] and [R] to [X]) embryos. *ProDRN:GFP* ([A] to [L]) and *ProDR5:GFP* ([M] to [X]). Bars = 20 μ m.

(A) to (C) In the wild-type preglobular stage, DRN is localized to the entire embryo proper (A) and then shifts apically (B) to be localized to the upper apical region where it marks the precotyledons (C).

(D) and (E) At the wild-type heart stage, expression is localized to the cotyledons.

(F) Wild-type bent cotyledon stage with DRN localized in the SAM.

(G) Expression in globular stage *wdr55-2* $-/-$ embryos appears as in early wild-type stages before DRN is localized to the precotyledons (Cole et al., 2009), although expression is weak in the mutant.

(H) and (I) Expression is reduced to the upper layer of the *wdr55-2* $-/-$ embryo but does not mark precotyledons.

(J) and (K) *wdr55-2* $-/-$ embryos showing occasional asymmetric localization (J) and symmetric localization (K) of DRN.

(L) Strong DRN expression also in the apical central domain in the *wdr55-2* $-/-$ embryo.

(M) to (O) *ProDR5:GFP* expression in the wild-type marks basal auxin maxima restricted to the upper suspensor and hypophysis in the embryo proper.

(P) A strong signal in the hypophyseal region is maintained at the heart stage and at the bent cotyledon stage marks the cotyledon tips and the root tip (Q).

(R) to (U) In *wdr55-2*, *ProDR5:GFP* expression expands toward the basal end of the suspensor. Expression in the hypophyseal region is weak, absent, or partly absent ([R], [V], and [W]) or in other cases strongly expressed ([S] and [T]).

(X) In rare cases, a moderately strong *ProDR5:GFP* signal is found in the apical region. *wdr55-2* mutant embryos were inspected in stages corresponding to 9 to 12 DAP.

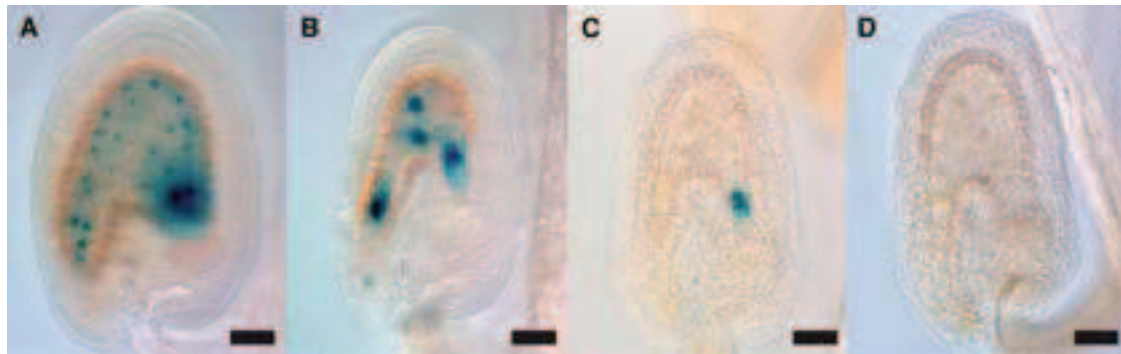


Figure 7. Endosperm Marker Has Ectopic Expression in *wdr55-1*.

Light micrographs of the early endosperm marker *ProFIS2:GUS* in the *wdr55-1* $-/+$ background. The expression of *ProFIS2:GUS* is shown in wild-type ovules 2 DAP (**A**) and in *wdr55-1* $-/+$ ovules 2 DAP (**B**) and 3 DAP (**C**) and (**D**). Bars = 20 μ m.

(**A**) In the wild type, *ProFIS2:GUS* is expressed in the endosperm from fertilization until about five rounds of nuclear divisions.

(**B**) to (**D**) *ProFIS2:GUS* is expressed in the *wdr55-1* $-/-$ endosperm after fertilization (**B**), but ectopic expression (**C**) or absence of expression in visible endosperm (**D**) was also observed.

[See online article for color version of this figure.]

after infiltration revealed a strong nuclear signal for both the long and the short splice forms (Figures 8A and 8D). Although weaker than the nuclear signal, both fusion proteins also appeared to be localized to the cytoplasm (Figures 8B and 8E). To distinguish true cytoplasmic localization, we incubated small pieces of the infiltrated leaves in 0.8 M mannitol for 2 h (Gagne and Clark, 2010). Upon treatment, neither the *Pro35S:WDR55.1-GFP* nor the *Pro35S:WDR55.2-GFP* signals were present in the extracellular space. The observed signals rather followed the cell wall-detached vacuoles, creating cytoplasmic strands marked by the GFP signal (Figures 8C and 8F). We also designed constructs for overexpression of *Pro35S:WDR55-GFP* in *Arabidopsis*. Upon inspection of seedling roots from transformed plants, *Pro35S:WDR55.1-GFP* was observed in both the nucleus and the cytoplasm (Figures 8G to 8I). Thus, in infiltrated tobacco leaves as well as in *Arabidopsis* roots, the nuclear localization of the fusion proteins appeared to mark the entire nucleus in contrast with nucleolar localization of its Medaka homolog (Iwanami et al., 2008).

WDR55 Interacts with *Arabidopsis* DDB1A in Plant Cells

The presence of a signature WDxR motif suggests that WDR55 is a potential substrate receptor of the CUL4 E3 ubiquitin ligase complex. To test this possibility, we investigated the interaction between DDB1A/DDB1B and WDR55.1/WDR55.2 in reciprocal yeast two-hybrid assays, using both DDB1 and WDR55 as prey and bait. No interaction was detected upon repeated testing (see Supplemental Figure 7 online). Nevertheless, it is noteworthy that protein interactions between DCAFs and DDB1-related protein in yeast are often weak and sometimes difficult to detect (Molinier et al., 2008; Dumbiauskas et al., 2011). Therefore, we performed bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments to investigate a physical interaction between WDR55.1/WDR55.2 and DDB1A in plant cells. Plasmids YC-WDR55.1/YC-WDR55.2 and YN-DDB1A were cobombarded into etiolated mustard (*Sinapis alba*) hypocotyls. A strong yellow fluorescent protein

(YFP) signal was observed in the nucleus of cells (72.5%, $n = 40$) coexpressing YC-WDR55.1 and YN-DDB1A and of cells (80%, $n = 42$) coexpressing YC-WDR55.2 and YN-DDB1A (Figure 9). These data are similar to those obtained with cells transformed with the positive control YC-DDB2 + YN-DDB1A as previously reported (Figure 9A) (Molinier et al., 2008). Only a weak fluorescence signal was observed in <30% of the cells after bombardment with the negative control plasmid combinations YC-WDR55.1 + YN-empty vector (Figure 9A) and YC-WDR55.2 + YN-empty vector (29%, $n = 55$; and 22%, $n = 55$, respectively; Figure 9A).

To further support the interaction between WDR55.1 and DDB1A, we performed fluorescence resonance energy transfer (FRET) assays (Levitt et al., 2009). Visual inspection of DDB1A-GFP and RFP-WDR55.1 proteins transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* plants showed colocalization of the proteins in the nuclear domain (Figure 9B). Cotransformed DDB1A-GFP and RFP-WDR55.1 revealed a mean FRET value of 7.2%, which was significantly higher than for the negative control using RFP alone (Figure 9C). As a positive control, we used DDB2, which is known to be a strong DDB1A interactor (Molinier et al., 2008), showing a similar level of interaction as between DDB1A-GFP and RFP-WDR55.1. These results indicate that WDR55 interacts with DDB1A and suggest that this protein might act as a CRL4 substrate recruiter. However, our attempts to immunoprecipitate CUL4 together with WDR55.1 remained unsuccessful; thus, further experimental approaches are required to determine whether WDR55.1 acts in the frame of a CRL4 complex.

DISCUSSION

WDR55 Is a WD40 Protein with a Conserved WDxR Motif and Interacts with DDB1

WD40 proteins in *Arabidopsis* have been classified into 143 distinct families, and WDR55 was designated into its own class with no paralogs but with orthologs in other species like

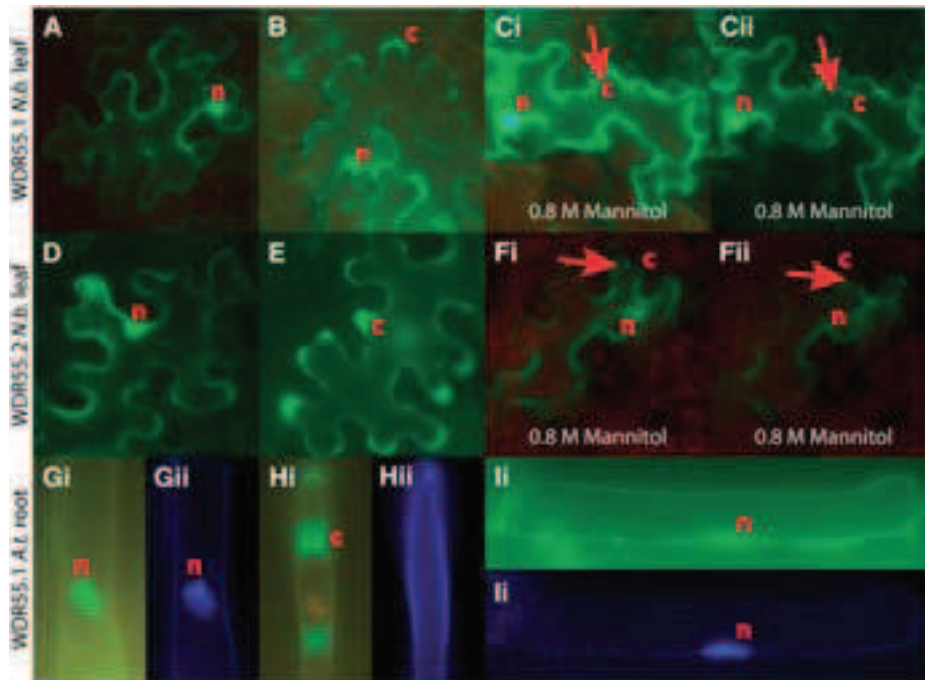


Figure 8. WDR55 Is Localized to the Nucleus and the Cytoplasm.

Fluorescent micrograph showing subcellular localization of WDR55.1-YFP and WDR55.2-YFP fusion protein in transfected tobacco (N.b.) leaf ([A] to [Fii]) and of WDR55.1-GFP and WDR55.2-GFP in transgenic *Arabidopsis* (A.t.) root ([Gi] to [Iii]). c, cytoplasm; n, nucleus.

(A) to (C) WDR55.1-YFP fusion protein in tobacco leaf. WDR55.1 is shown to be localized to the nucleus (A) and to the cytoplasm (B). When treated with 0.8 M mannitol for 2 h, the subcellular localization to the cytoplasm is demonstrated as strings marked by arrows that move as the vacuoles shrink upon UV exposure ([Ci] and [Cii]).

(D) to (F) WDR55.2-YFP fusion protein in tobacco leaf. WDR55.2 is shown to be localized also to the nucleus (D) and the cytoplasm (E) in the tobacco leaf. Upon 0.8 M mannitol treatment, the vacuoles shrink and cytoplasm localization is confirmed as GFP expression contracts with the plasma membrane ([Fi] and [Fii]; arrows).

(G) to (I) WDR55.1-GFP fusion protein in *Arabidopsis* root hair ([G] and [H]), while (J) shows WDR55.1-GFP fusion protein in an *Arabidopsis* root cell. Also, nuclear localization can be observed in *Arabidopsis* root hairs and root cells by GFP expression ([Gi] and [Ji]) with DAPI staining to confirm nuclear identity ([Gii] and [Jii]). Cytoplasmic localization can also be observed in root hair by the GFP around vacuoles (Hi), and the DAPI staining shows that there is no visible nucleus in this hair (Hii).

Drosophila melanogaster (CG14722) or *Homo sapiens* (WDR55) (van Nocker and Ludwig, 2003). Some WD40 proteins contain a conserved 16-amino acid DDB1 binding WD40 (DWD) motif, and 85 *Arabidopsis* and 78 rice (*Oryza sativa*) proteins containing this motif have been identified in silico (Lee et al., 2008). Rice WDR55 has a perfect match with the 16-amino acid DWD motif, where the corresponding sequence in *Arabidopsis* WDR55 differs in position seven, since a Lys residue has substituted an Asp/Glu residue conserved in other WDR55 homologs. Site-directed mutagenesis of the DWD box at position seven in the DCAF DDB2 results in a substantially reduced DDB2-CUL4A association (He et al., 2006). The *Arabidopsis* Information Resource ecotype polymorphism search (<http://www.Arabidopsis.org/>) does not report any polymorphisms within the WDR55 potential DWD, and *Arabidopsis lyrata* also has the Lys in position seven, suggesting that this position is conserved within the Brassicaceae. The conserved amino acid WDxR stretch of the DWD box may thus be sufficient for DDB1 physical interaction and in silico identification of putative CUL4 E3 ligase substrate modules, rendering the substrate receptor family of *Arabidopsis*

CRL4 protein much broader than previously anticipated (Zhang et al., 2008). Indeed, the previously reported DCAF1 carries only the WDxR motif in the WDR region and interacts with DDB1 both in humans and *Arabidopsis* (Angers et al., 2006; Zhang et al., 2008). Mutation of the WDxR motif of *Arabidopsis* DCAF MSI4 decreases its interaction with DDB1 and affects the function of the protein in the regulation of flowering time (Pazhouhandeh et al., 2011). Moreover, a point mutation in the WDxR motif of human DDB2, a DCAF involved in nucleotide excision repair, leads to the genetic disorder xeroderma pigmentosum, complementation group E (Chu and Chang, 1988), while in *Arabidopsis*, the WDxR is also important for the function of the protein in DNA repair (Castells et al., 2011). Our finding that WDR55 interacts with DDB1 in planta further suggests that the WDxR motif is most likely sufficient for DDB1 interaction. This is the first report showing that a member of the WDR55 protein family may act as part of a CRL4 complex and given the conservation of the WDxR motif in WDR55 metazoan orthologs, a similar function may be assigned to WDR55 orthologs.

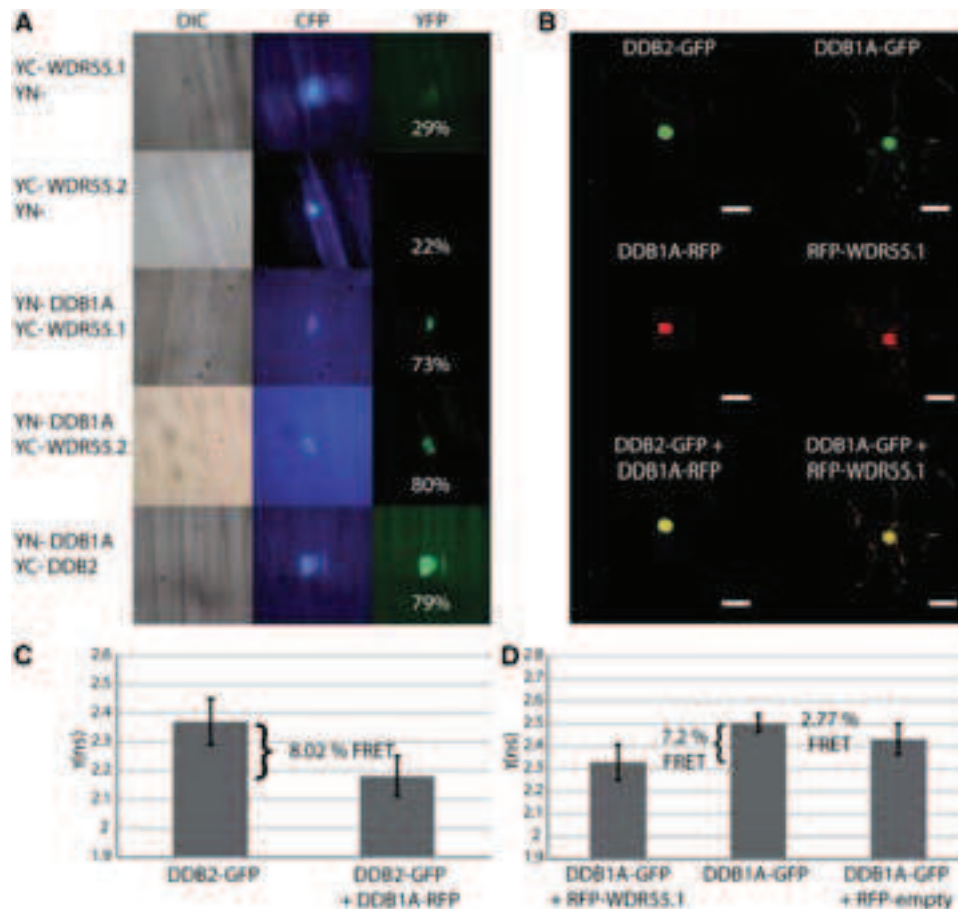


Figure 9. WDR55 Interacts with DDB1A in the Nuclei of Plant Cells.

(A) BiFC of YN-DDB1A/YC-WDR55. Different combinations of plasmids expressing the indicated YN- and YC-fusion proteins were bombarded into hypocotyls of dark-grown *S. alba* seedlings. A transfection control *CPRF2* expressing a fused CFP targeted to the nucleus was systematically included to identify transformed cells (middle panels). Images were recorded 20 h after bombardment via CFP- (middle panels) and YFP-specific (right panels) filters. Differential interference contrast (DIC) images are shown (left panels). Reconstitution of functional YFP as detected by YFP fluorescence occurs only in the nucleus with WDR55.1, WDR55.2, and DDB2 (used here as a positive control). Percentages in the YFP panel indicate the frequency of cells observed with YFP signal.

(B) Confocal images showing the subcellular localization of DDB2-GFP, DDB1A-GFP, and RFP-WDR55.1 protein fusions transiently expressed by the cauliflower mosaic virus 35S promoter in transformed tobacco cells. *N. benthamiana* plants were infiltrated with *Agrobacteria* harboring the different plasmids. The two fusion proteins colocalize mainly in the nucleus. Bars = 10 μ m.

(C) and **(D)** FRET analysis showing that DDB1A-GFP interacts with RFP-WDR55.1 in the nuclei of *N. benthamiana* cells in agroinfiltrated leaves. Bars represent mean fluorescence lifetime (τ , in nanoseconds [ns] $\pm$ se) of DDB1A-GFP alone or together with RFP-WDR55.1, or DDB2-GFP alone or together with DDB1A-RFP as positive control. Mean FRET values are indicated above the bars. The percentages indicate the relative change in fluorescence lifetime mediated by GFP-RFP fusion protein interactions compared with a single fluorescent protein.

WDR55 Is Required for Gametogenesis

Previous reports have attributed various biological functions to WDR55 proteins in eukaryotes. Mice homozygous for *wdr55^{tm1Matn}* are embryonic lethal and die before embryonic day (E) 9.5 but can be maintained as heterozygotes without any obvious defects (Youngren et al., 2005). The Medaka (*Oryzias latipes*) WDR55 ortholog was identified in a screen for defective thymus development and is required for development of multiple organs (Iwanami et al., 2008). Defects in WDR55 cause the accumulation of incompletely processed rRNA precursors and may be a nucleolar mod-

ulator of rRNA synthesis and cell cycle progression in Medaka (Iwanami et al., 2008). Zebra fish null mutants are also thymus defective and have reduced organ size (Amsterdam et al., 2004; Iwanami et al., 2008). Interestingly, the medaka WDR55 mRNA appears to be maternally provided in the early zygote (Iwanami et al., 2009).

We show that *Arabidopsis* WDR55 is essential for seed development and is involved in both male and female gametogenesis. In line with our findings, WDR55 was expressed throughout embryo sac development, at early stages of pollen maturation, and in early stages of embryo development. As found for several

other gametophytic mutations (Chen and McCormick, 1996; Park et al., 1998; Grini et al., 1999; Colombo et al., 2008), *wdr55-1* is only partially penetrant. However, the segregation distortion observed for the allele *wdr55-1* indicates a significant defect in both gametophytes, causing a reduction in the transfer of the mutation to the progeny. Interestingly, the *wdr55-2* allele truncates only the unstructured region protein after the last WD40 repeat, and this may explain some of the differences in allelic strength of *wdr55-1* and *wdr55-2*.

No obvious pollen phenotype could be observed upon direct inspection or using various cell fate markers. However, we did observe a moderate reduction in pollen tube germination in the mutant, suggesting a requirement of WDR55 in pollen tube formation. It is unlikely that WDR55 is required for the final events of fertilization, such as release of sperm cells or karyogamy. In such a case, a phenotype in the female gametophyte or in seed development would result, and this was not the case. Overexpression of either WDR55 splice forms, however, resulted in strong defects both in progamic pollen development and in female gametophyte development, suggesting that WDR55 plays an important role in gametogenesis and that the protein level may be regulated. However, effects of titration of the DDB1 proteins cannot be excluded, and further experiments will be needed to elucidate WDR55 function in the male gametophyte.

A modest frequency of unfused polar cells was observed in *wdr55-1* embryo sacs. Several genes required for central cell fusion have previously been identified (Pagnussat et al., 2005; Portereiko et al., 2006b), including a heterodimer pair of MADS box AGAMOUS-LIKE (AGL) transcription factors, AGL61/DIANA and AGL80 (Portereiko et al., 2006a; Bemer et al., 2008; Steffen et al., 2008), the splice factors LACHESIS (LIS) and CLOTHO (Gross-Hardt et al., 2007), and genes with mitochondrial function (León et al., 2007; Kági et al., 2010; Tan et al., 2010). Interestingly, *LIS* encodes a seven-repeat WDR protein predicted to be a CRL4 substrate receptor based on the presence of two WDxR motifs (Zhang et al., 2008). *LIS* is involved in preventing accessory cells from adopting a gametic cell fate, and its homolog in yeast, PRP4, is associated with the U4/U6 spliceosome complex (Gross-Hardt et al., 2007). In this respect, mutant WDR55 central cells support PCD of accessory antipodal cells and may therefore reflect a general delay in polar cell fusion as previously observed in SLOW WALKER mutants (Shi et al., 2005; Li et al., 2009).

DDB1A and *DDB1B* have been shown by double mutant analyses to be required for successful transmission through the male and female gametophyte (Bernhardt et al., 2010; Dumbliauskas et al., 2011), consistent with a possible function of the DDB1A binding WDR55 as a CRL4 substrate receptor. Interestingly, in reciprocal crosses using a homozygous mutant background of either *ddb1a* or *ddb1b*, a male requirement was found for *DDB1A*, whereas *DDB1B* was required for passage through the female gametophyte (Dumbliauskas et al., 2011). *CUL4* mutants, however, show only a weak male and female gametophyte transmission failure (Dumbliauskas et al., 2011). One explanation for this could be carryover of *CUL4* protein and that sufficient *CUL4* is present after meiosis for gametogenesis to occur. An alternative scenario would be that, in gametogen-

esis, *Arabidopsis* WDR55 acts in a DDB1-dependent but *CUL4*-independent manner, as has recently been proposed for the mammalian WD40 protein Cdh1 (Lv et al., 2010). However, it is noteworthy that mice homozygous mutant for *Cul4A* are male infertile and defective in meiosis (Kopanja et al., 2011; Yin et al., 2011). Thus, further work will clarify whether *Arabidopsis* *CUL4* is required for WDR55 function in gametogenesis.

WDR55 Is Required for Seed and Endosperm Development

Analysis of both *wdr55-1* and *wdr55-2* mutant lines suggested that WDR55 is required for embryo and endosperm development from 2 DAP and is involved in setting up apical bilateral symmetry in the transition from the globular to the heart stage embryo. We observed arrested embryo development, which often accompanied by a reduced number of endosperm nuclei, as early as in the zygote stage. No embryo stages later than the globular stage could be observed in *wdr55-2* mutant seeds. The embryo undergoes an invariant pattern of cell differentiation; however, no major difference in the cell division pattern could be observed in mutant embryos, although they were severely delayed. Interestingly, both *cul4* and *ddb1* mutants display a globular arrest phenotype (Bernhardt et al., 2010; Dumbliauskas et al., 2011). Thus, WDR55 loss of function in embryogenesis, at least in part, phenocopies the *CUL4*- and *DDB1A/B*-deficient embryo phenotype and may suggest that a *CUL4*^{WDR55} complex is involved in embryo development.

In wild-type seeds, the endosperm undergoes three rounds of nuclear division before the first division of the zygote (Berger, 1999). In most *wdr55* seeds, however, only a few endosperm division rounds could be observed. Interestingly, *cul4* null mutants also display underdeveloped endosperm with large nuclei and nucleoli reminiscent of those in the *wdr55* endosperm (Dumbliauskas et al., 2011). The underdeveloped *wdr55* endosperm may also contribute to the observed embryo arrest phenotype as a consequence of an endosperm defect or failure in the crosstalk between embryo and endosperm (Nowack et al., 2010). Endosperm identity in *wdr55* seeds appeared to be preserved, as evidenced by *ProKS117:GFP* and *ProFIS2:FIS2-GUS* marker expression, although *ProFIS2:FIS2-GUS* was deregulated or even absent in a fraction of *wdr55-1* endosperm. Notably, *FIS2* is imprinted and only expressed from the maternal genome due to DNA METHYLTRANSFERASE1-mediated paternal silencing and activation of the maternal allele by removal of DNA methylation by the DNA glycosylase DEMETER (Jullien et al., 2006). A role for metazoan CRL4 substrate receptors in DNA methylation has been demonstrated previously (Xu et al., 2010), and *FIS2* is part of the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). Thus, its deregulation also indirectly influences chromatin modification by H3K27 methylation (Hennig and Derkacheva, 2009).

At present, we can only speculate about how such a putative *CUL4*-*DDB1*^{WDR55} ubiquitin ligase complex may regulate seed development and embryo bilateral symmetry. An alternative hypothesis would be that a WDR55-DDB1 complex acts independently of *CUL4*, as recently described for a mammalian WD40 protein interacting with DDB1 (Lv et al., 2010), or that WDR55 can even function in both *CUL4*-dependent and -independent mechanisms. CRL4s act mainly at the chromatin

level in fungi, metazoans, and *Arabidopsis*, regulating DNA damage responses and heterochromatin silencing and mediating Polycomb histone methylation (Jia et al., 2005; Wysocka et al., 2005; Higa et al., 2006; Molinier et al., 2008; Jackson and Xiong, 2009; Xu et al., 2010; Dumbliuskas et al., 2011; Pazhouhandeh et al., 2011). Some of these functions require nonproteolytic ubiquitination by CRL4s. For instance, CUL4^{DDB2} modifies histones H2A, H3, and H4 during UV-damaged DNA repair (Kapetanaki et al., 2006; Wang et al., 2006). Recent work in *Arabidopsis* also revealed that CRL4s functionally interact with PRC2 to participate in epigenetic regulation by histone tail modification (Dumbliuskas et al., 2011; Pazhouhandeh et al., 2011). Thus, the mode of action of WDR55 together with DDB1 and eventually CUL4 in the regulation of embryo and endosperm development may not necessarily require proteolytic events.

Auxin is a major player in the polarization of the embryo and is transported toward the incipient cotyledon primordium in a basal to apical direction in the lateral protoderm (De Smet et al., 2010). DRN is a member of the AP2-type transcription factor family, which contributes to auxin transport and perception in the *Arabidopsis* embryo. After the division of the zygote, the protein is associated with apical cell fate and marks the position of incipient leaf primordia (Chandler et al., 2008, 2011; Cole et al., 2009). In *wdr55-2*, polarization and accordingly initiation of leaf primordia appears to be blocked and, consequently, DRN:GFP primordial localization also failed.

DRN is a direct target of MP, an ARF regulated by CRL1-mediated UPS degradation of the AUX/IAA BODENLOS (Chandler et al., 2008; Cole et al., 2009; De Smet et al., 2010). An involvement of CRL4s in the auxin regulation pathway has not been demonstrated until now, and our data do not support a role of WDR55 in this process. However, another putative DCAF, LRS1, might play such a role, as the *lrs1-1* mutant is defective in lateral root development and displays auxin accumulation during lateral root primordium development and lateral root meristem emergence (Lee et al., 2010). Further investigations on WDR55 and its interacting DDB1 partner will be crucial to clarify its function in seed and gametophyte development.

METHODS

Plant Material and General Procedures

The *wdr55-1* allele was isolated as line *dsg3127* in a segregation distortion screen for mutants affected in male or female gametophyte transmission from populations of Dissociator (Ds)-transposed insertion lines in *Arabidopsis thaliana* in the *Ler* ecotype. The other plant lines used, SALK034787, SALK063054, and *wdr55-2* (WiscDsLox430F06), were in the Col-0 ecotype and are T-DNA insertion mutants that were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (Alonso et al., 2003). The insertions in these lines were verified by PCR using gene-specific primers and primers against the insert (T-DNA or DsG element). Primer sequences used can be found in Supplemental Table 4 online.

Seeds were surface-sterilized using ethanol, bleach, and Tween 20 before germination on Murashige and Skoog media (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 2% Suc (MS-2). To select for *wdr55-1* plants, 50 μ g/L kanamycin was added to the media, and for *wdr55-2*, 100 μ M BASTA was used. All plants were stratified on MS-2 plates at 4°C overnight before being incubated at 18°C for ~12 d until germination. The

seedlings were then transferred to soil and grown at 18°C under long-day conditions (16 h). Constructs made during this study were transformed into Col, *Ler*, or the *wdr55-1* mutant using *Agrobacterium tumefaciens* strain C58-pGV2260 or GV3101-pMP90-RK by the floral dip method (Clough and Bent, 1998), and transformants were selected for by the appropriate resistance encoded in the inserted T-DNA.

Molecular Cloning and DNA Work

To isolate genomic DNA from plants for genotyping, a quick protocol was followed, where a buffer (50 mL of 1 M Tris HCl, pH 7.2, 60 mL of 5 M NaCl, and 100 g Suc in 1 liter double-deionized water) was added to a tissue sample (e.g., a leaf) and homogenized. Then, 1.5 μ L of this material was used in a 50- μ L PCR reaction. For other purposes, such as amplifying genomic sequences for cloning, the Aqua Pure Genomic DNA isolation kit from Bio-Rad was used according to the manufacturer's instruction manual.

For the Vectorette PCR, genomic DNA from the DsG line *wdr55-1* was isolated and digested using restriction enzymes that have *Bam*HI-compatible sites (i.e., *Bcl*I [Promega] and *Bgl*II [TaKara]). Vectorettes were made to ligate onto the ends of the fragments after the restriction digest by mixing the TopL strand and the restriction enzyme-specific bottom strand (see Supplemental Table 4B online for sequence) (Devon et al., 1995). The vectorettes were then ligated onto the end of the fragments from the restriction digest from the DsG line using T4 ligase. Two rounds of nested PCR was performed using the vectorette primers vec-1 and vec-2 and the 5' and 3' end nested primers of the DsG element: Ds 5-1 and Ds 5-2, and Ds 3-1 and Ds 3-2. The PCR products were isolated from the gel using the Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System Kit from Promega. The isolated DNA fragments were cloned using TOPO TA cloning technology (Invitrogen) and sequenced.

The TOPO TA cloning technology was used according to the manufacturer's instructions. The vectors used for cloning fragments were pCR-4TOPO or pCR-2.1-TOPO. In addition, the TOPO Gateway vector pCR8 was used to clone a genomic fragment later to be used as an entry clone in a Gateway reaction.

Constructs were made using Gateway technology (Invitrogen) according to the Invitrogen Gateway Technology Manual Version E (2003). The DNA fragments were amplified using primers with *att* sites (i.e., *attB1* and *attB2*) (see Supplemental Table 4B online). The donor vector used in all construct design was pDONR/Zeo by Invitrogen. Primers used for creating donor vectors for WDR55.1 and WDR55.2 were *attB1* SP/WDR55.1 and *attB2* ASP/WDR55.1, and *attB1* SP/WDR55.2 and *attB2* ASP/WDR55.2, respectively, where cDNA from wild-type Col was used as template. These donor vectors were recombined with pGBKT7 and pADN (for yeast two-hybrid screen, verification, and direct mating), pK7WG2, pK7WGF2 (for transformation and subcellular localization in *Arabidopsis*), and pEarlygate101 (for transfection and subcellular localization in tobacco [*Nicotiana tabacum*]), MN27 (for overexpression in *Arabidopsis*), and a modified MN27 vector where the *CDKA*;1 promoter was replaced with the *WDR55* promoter (for splice variant-specific rescue). For GUS expression studies, the *WDR55* promoter region up to the next gene (1283 bp) was amplified using the primers SP At2g34260 Promoter Gateway and ASP At2g34260 Promoter Gateway, and the resulting entry clone was recombined with the destination vector pMDC162 (see Supplemental Table 4B online).

The genomic sequence of *WDR55* and the corresponding 1283-bp upstream promoter region were amplified using the primers TOPO SP/At2g34260 rescue and TOPO ASP/At2g34260 rescue, and the fragment was cloned into the TOPO Gateway vector pCR8 by the TOPO TA cloning technology. The resulting entry clone was recombined with the destination vector pMDC123 by Gateway technology (for complementation of the *wdr55-1* mutant).

To test the interaction of DDB1A and DDB1B with WDR55, they were cloned into both pGBKT7 and pADN. A Gateway vector was obtained for DDB1A (CG104978) from the ABRC, while a pda clone (pda20340) was obtained from the RIKEN Bio Research Centre for DDB1B. The primers attB1 SP/DDB1B and attB2 ASP/DDB1B were used to create the entry clone.

Subcellular Localization and Overexpression Constructs

Subcellular localization was performed by making both N- and C-terminal GFP fusion constructs with both splice variants WDR55.1 and WDR55.2 and transforming these into *Arabidopsis* Col ecotype. The GFP vectors used were pK7FWG2 and pK7WGF2. GFP was inspected in leaf and root cells under a Zeiss Axioplan Imaging2 microscope system.

To verify fusion, tissues from the subcellular expression lines were harvested and RNA was extracted using a Spectrum Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich). RT-PCR was performed using primers situated in the gene and in the GFP sequence to verify fusion after transcription. The controls were cDNA from wild-type Col. For WDR55.2 N-GFP, primers EGFP 625F and Trans 400sp were used. For WDR55.1 and WDR55.2, Egfp-pK7FWG2 and Trans 200asp primers were used. For the control, ASP At2g34260 RT PCR 5 and SP At2g34260 RT-PCR 5 primers were used. Primer sequences are presented in Supplemental Table 4B online.

For subcellular localization using the tobacco infiltration protocol, the short and long splice variant cDNA was recombined with the vector pEarlyGate101, which creates a C-terminal GFP fusion construct. These were then transformed into *Agrobacterium* (C58), mixed with *Agrobacterium* harboring the helper construct P19, and infiltrated into *Nicotiana benthamiana* leaves. The leaves were inspected under UV light after 2 to 4 d. Some small pieces of the infiltrated leaves were also incubated in 0.8 M mannitol for 2 h. This treatment results in the expulsion of water from the cell, which causes the plasma membrane to detach from the cell wall and the vacuoles to shrink, allowing for detection of extracellular proteins.

Complementation Analysis

A complementation construct was made to rescue the phenotype in the DsG line *wdr55-1*, which contained the genomic sequence of WDR55, its promoter region and the 3' untranslated region. This product is 3902 bp and ranged from position 35031 to 38932 on the BAC F13P17 (GI: 201971539). A splice variant-specific complementation construct was made to investigate the role of the two splice variants. The constructs were made by excising the *CDKA1* promoter from the Gateway vector MN27 with the restriction enzymes *AscI* and *XhoI* and replacing it with the promoter region of *WDR55* (SP pAt2g34260-*AscI*-2 and ASP pAt2g34260-*XhoI*-2). Ligation of DNA using T4 ligase was performed according to the manufacturer's instructions and took place at 4 to 14°C overnight. cDNA from the two splice variants of *WDR55* in the pDONR/Zeo vector was then recombined into the modified MN27 vector containing the *WDR55* promoter by Gateway recombination.

Total RNA Isolation and cDNA Synthesis

RNA was isolated from various tissues from wild-type *Arabidopsis* ecotype Col plants using the Spectrum Plant Total RNA kit according to the manufacturer's instructions, except all centrifugation was performed at 4°C and RNA was eluted in 50 µL. The tissue was harvested in liquid nitrogen in tubes prefilled with ceramic beads (MagNA Lyser Green Beads) and then homogenized with a MagNA Lyser (Roche Applied Science). The isolated RNA was treated with DNase I (Sigma-Aldrich) before cDNA synthesis using oligo(dT) and the reverse transcriptase enzyme SuperScript III, in the SuperScript III first-strand synthesis system for RT-PCR (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was then purified using the QIAquick PCR purification

kit (Qiagen) and eluted in 30 µL. The cDNA concentration was measured on a NanoDrop 1000 spectrophotometer.

Real-Time Quantitative PCR Analysis

Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed on cDNA from wild-type Col to determine the expression level of the gene of interest in different tissues relative to a reference tissue, using expression of *ACTIN11* as a control. Three plants were harvested as one biological replica, and three biological replicas were used in total unless otherwise specified. Equipment required was the LightCycler 480 instrument and LightCycler Multiwell Plate 96 available from Roche Applied Science. The primers (see Supplemental Table 4B online) used to detect WDR55.1 were RP_At2g34260_54# and LP_At2g34260_54#, which give an amplicon of 78 bp. The primers used to detect *WDR55.2* were ASP RT PCR WDR55.2 and SP RT PCR WDR55.2, giving a 166-bp product. Primers for *ACTIN11* were ACT11-77-LP and ACT11-77-RP, giving a product of 100 bp. The primers spanned introns to exclude amplification of genomic sequence, and the product for *WDR55.2* was verified to give one band by running the real-time qPCR product on a 1% agarose gel. Primer concentration was between 0.2 and 1 µM. Setup of the master mix and cDNA dilution series and running of the real-time qPCR were performed according to the instructions in the SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) manual (RR041A v.050614) from TaKaRa Bio. To determine efficiency, both biological and technical replicas were used. Technical replicas were produced by making a dilution series with concentrations of 100, 50, 20, and 5 ng. The relative expression ratios were calculated according to a model described by Pfaffl (2001).

Histology and Imaging

Embryos and endosperms were viewed by directly mounting seeds in clearing solution (8:2:1 chloral hydrate:deionized water:glycerol). After ~2 h of incubation at room temperature, embryo and endosperm development could be viewed under the microscope.

To visualize pollen nuclei under UV radiation, an anther was mounted on a slide in 15 µL staining buffer (2.5 µg/mL DAPI solution, 50 mM NaPO₄, pH 7.2, 5% DMSO, 0.01 Tween 20) and covered with a cover slide. The preparations were sealed with clear nail polish and stored at 4°C for 1 to 5 h before being visualized under the microscope by exciting with a 365/12-nm band-pass filter and recording emission using a 397-nm long-pass filter.

Alexander stain was made with 10 mL ethanol (95%), 1 mL malachite green (1% in 95% ethanol), 5 mL fuchsin acid (1% in water), 0.5 mL Orange G (1% in water), 5 g phenol, 5 g chloral hydrate, 2 mL glacial acetic acid, 25 mL glycerol, and 50 mL water. Anthers were mounted directly in the stain on a slide and covered with a cover slide. The slides were sealed with clear nail polish before being visualized under light microscopy. Alexander stain stains live pollen pink and dead pollen green or not at all.

GFP and YFP were visualized in various tissues by mounting the tissue in water on a slide with a cover slide and viewing directly under the microscope. For GFP, a 450- to 490-nm band-pass filter was used for excitation, and emission was recorded with a 515- to 565-nm band-pass filter. YFP was visualized using excitation with a 500/20-nm band-pass filter, and emission was measured with a 535/30-nm band-pass filter.

Histochemical GUS assays were performed by incubating the sampled tissue in substrate staining solution [0.05 M NaPO₄, 0.1% Triton X-100, 2 mM K₄Fe(CN)₆·3H₂O, 2 mM K₃Fe(CN)₆, and 2 mM X-Gluc] in the dark at 37°C, usually overnight. When staining the embryo sac, which has eight cell layers, the time of incubation was often longer or the X-Gluc concentration was increased. The substrate was then removed and 50% ethanol was added before slides were prepared with the materials mounted in a clearing solution (8:2:1 chloral hydrate:deionized water:glycerol) and incubated for 1 h at 4°C before inspection for GUS. Stained tissue could be stored at 4°C in 50% ethanol for later use.

For pollen tube germination assays, pollen grains (1 d after anthesis) were gently applied to plates containing pollen germination medium [18% Suc, 0.01% boric acid, 5 mM CaCl₂, 5 mM Ca(NO₃)₂, 5 mM MgSO₄, and 0.5% phytoagar]. The plates were covered, placed in a humidified plastic box, and kept at 22°C for up to 10 h before observation.

A Zeiss Axioplan Imaging2 microscope system equipped with Nomarski optics, epifluorescence attachment, and cooled liquid crystal display imaging facilities was used for examining GFP, YFP, and DAPI under UV and for differential interference contrast light microscopy. Some sporophytic tissues were examined using the stereo light microscope Leica WILD MZ8, and images were captured using a Nikon Coolpix 995 camera.

Protein Interaction Studies

The yeast two-hybrid system from Clontech was used to test full-length At2G34260 cDNA against a library of cDNA clones created from Col wild-type flowers and buds and recombined into pGADT7-Rec. To make a bait construct, full-length *WDR55.1* cDNA was cloned in frame with the lexA DNA binding domain (vector pGBKT7) using Gateway technology. The bait construct was tested for autoactivation as described by the manufacturer (Clontech) and then transformed into the yeast strain Y187. To verify possible interacting partners by direct mating, the full-length sequence of the candidate genes was cloned into Gateway-compatible pGADT7 and transformed into yeast strain AH109. Mating was performed directly with the original bait construct and also with pGBKT7-*WDR55.2* in Y187. The candidate genes were also cloned into pGBKT7 and *WDR55* into pADN to test for interactions in both directions. The negative controls used were BD (binding domain) and *Lam* in pGBKT7. Media used were SD/-Leu/-Trp (-L/-W for short), SD/-Leu/-Trp/-His (triple dropout for short), and SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/ X-a-Gal (quadruple dropout for short).

For BiFC, the *DDB1A*, *WDR55.1*, and *WDR55.2* coding sequences were cloned into the split YFP destination vectors by recombination (Invitrogen) to yield the YN-DDB1A, YC-*WDR55.1*, and YC-*WDR55.2* constructs. The YC-DDB2 construct, which was used as a positive control, was described by Molinier et al. (2008). The YN-, YC-, and *Pro35: CPRF2-CFP* vectors and split YFP experiments were performed as described by Stolpe et al. (2005). Images were recorded 20 h after bombardment with a Nikon fluorescent stereomicroscope E800 equipped with a ×40 water immersion optic using CFP- and YFP-specific filters. Images were assembled using Adobe Photoshop and Adobe Illustrator software.

For fluorescence lifetime imaging microscopy, *WDR55.1*, *DDB1A*, and *DDB2* coding sequences were cloned by recombination into destination vectors: *WDR55.1* in pB7WGR2, *DDB1A* in pB7RWG2 and pB7FWG2, and *DDB2* in pB7FWG2 (Ghent plasmids collection; <http://bccm.belspo.be/index.php>) to obtain RFP-*WDR55.1*, *DDB1A*-GFP, *DDB1A*-RFP, and *DDB2*-GFP constructs. The different constructs were transformed into *Agrobacterium* and infiltrated into *N. benthamiana* leaves together with the silencing suppressor P19. Two days after infiltration, the lifetime of the fluorescent fusion proteins was measured in the epidermal cells of infiltrated leaves either with *DDB2*-GFP or *DDB1A*-GFP alone or together with *DDB1A*-RFP or RFP-*WDR55.1* using a LIFA frequency domain fluorescence lifetime imaging system (Lambert Instruments).

Sequencing and Bioinformatics

Sequencing was performed using an ABI 3730 high-throughput capillary electrophoresis sequencer by the ABI lab at the Departments of Biology and Molecular Biosciences at the University of Oslo. Sequences were processed using ContigExpress and Vector NTI Advance™ v.10 software (Invitrogen) and using the BLAST engine provided by the National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Plant homologs were identified using WU-BLAST software

(<http://www.Arabidopsis.org/wublast/index2.jsp>). Alignments were performed using ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>) and formatted using GeneDoc software (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). WD40 repeats were predicted using SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) and PyMOL (<http://www.pymol.org>).

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the GenBank/EMBL data libraries under the following accession numbers: *WDR55.1* (At2g34260.1, NP_565782.1), *WDR55.2* (At2g34260.2, NP_973596.1), *DDB1A* (At4g05420, NP_192451.1), *DDB1B* (At4g21100, NP_193842.1), and *CUL4* (At5g46210, NP_568658.1).

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Bioinformatics Analysis of *WDR55*.

Supplemental Figure 2. *WDR55* Is Expressed during Early and Late Embryo Development and in Various Sporophytic Tissues.

Supplemental Figure 3. Overexpression of *WDR55* Results in Arrest at the One-Nucleate Stage of Embryo Sac Development.

Supplemental Figure 4. Pollen Development and Pollen Tube Germination in *wdr55-1*.

Supplemental Figure 5. Overexpression of *WDR55* Results in Various Developmental Defects in Pollen.

Supplemental Figure 6. *FIS2:GUS* and *KS117:GFP* in *wdr55-2* Endosperm.

Supplemental Figure 7. Direct Mating of *WDR55.1* with *DDB1A* and *DDB1B* in a Yeast Two-Hybrid Experiment Reveals No Interaction.

Supplemental Table 1. Insertion Details for Mutant Lines of *WDR55*.

Supplemental Table 2. Delayed Fusion of Polar Nuclei in *wdr55-1* (*Ler*) Embryo Sacs.

Supplemental Table 3. Genomic Rescue of *wdr55-1*.

Supplemental Table 4. Primer List.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Birgit Schwab and Gottfried Martin for the generation of the AcDs starter lines and Ueli Grossniklaus and Venkatesan Sundaresan for making the Ds launch pads available. We also thank Barbara M. Gloeckle for making the pollen germination assay work. We thank Roy Falleth, Charles Albin-Amiot, and Solveig Hauge Engebretsen for technical assistance and our colleagues Reza Shirzadi and Ellen Dehnes Andersen for careful reading and comments. This work was supported by a Norwegian Research Council FUGE Young Investigator Starting Grant to P.E.G.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

K.N.B., S.J.-R., G.J., P.G., and P.E.G. designed the research. K.N.B., S.J.-R., and P.E.G. performed the research. K.N.B., S.J.-R., G.J., P.G., and P.E.G. analyzed the data. K.N.B., G.J., P.G., and P.E.G. wrote the article.

Received July 23, 2011; revised February 9, 2012; accepted March 5, 2012; published March 23, 2012.

REFERENCES

- Alexander, M.P. (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Stain Technol.* **44**: 117–122.
- Alonso, J.M., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653–657.
- Amsterdam, A., Nissen, R.M., Sun, Z., Swindell, E.C., Farrington, S., and Hopkins, N. (2004). Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 12792–12797.
- Angers, S., Li, T., Yi, X., MacCoss, M.J., Moon, R.T., and Zheng, N. (2006). Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* **443**: 590–593.
- Bemer, M., Wolters-Arts, M., Grossniklaus, U., and Angenent, G.C. (2008). The MADS domain protein DIANA acts together with AGAMOUS-LIKE80 to specify the central cell in *Arabidopsis* ovules. *Plant Cell* **20**: 2088–2101.
- Berger, F. (1999). Endosperm development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 28–32.
- Berger, F., and Chaudhury, A. (2009). Parental memories shape seeds. *Trends Plant Sci.* **14**: 550–556.
- Berger, F., Grini, P.E., and Schnittger, A. (2006). Endosperm: An integrator of seed growth and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 664–670.
- Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., Dubin, M.J., Benvenuto, G., Bowler, C., Genschik, P., and Hellmann, H. (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **47**: 591–603.
- Bernhardt, A., Mooney, S., and Hellmann, H. (2010). *Arabidopsis* DDB1a and DDB1b are critical for embryo development. *Planta* **232**: 555–566.
- Biedermann, S., and Hellmann, H. (2011). WD40 and CUL4-based E3 ligases: lubricating all aspects of life. *Trends Plant Sci.* **16**: 38–46.
- Brownfield, L., Hafidh, S., Borg, M., Sidorova, A., Mori, T., and Twell, D. (2009). A plant germline-specific integrator of sperm specification and cell cycle progression. *PLoS Genet.* **5**: e1000430.
- Castells, E., Molinier, J., Benvenuto, G., Bourbonousse, C., Zabulon, G., Zalc, A., Cazzaniga, S., Genschik, P., Barneche, F., and Bowler, C. (2011). The conserved factor DE-ETIOLATED 1 cooperates with CUL4-DDB1DDB2 to maintain genome integrity upon UV stress. *EMBO J.* **30**: 1162–1172.
- Chandler, J.W., Cole, M., Flier, A., Grewe, B., and Werr, W. (2007). The AP2 transcription factors DORNROSCHE and DORNROSCHE-LIKE redundantly control *Arabidopsis* embryo patterning via interaction with PHAVOLUTA. *Development* **134**: 1653–1662.
- Chandler, J.W., Cole, M., Jacobs, B., Comelli, P., and Werr, W. (2011). Genetic integration of DORNROSCHE and DORNROSCHE-LIKE reveals hierarchical interactions in auxin signalling and patterning of the *Arabidopsis* apical embryo. *Plant Mol. Biol.* **75**: 223–236.
- Chandler, J.W., Cole, M., and Werr, W. (2008). The role of DORNROSCHE (DRN) and DRN-LIKE (DRNL) in *Arabidopsis* embryonic patterning. *Plant Signal. Behav.* **3**: 49–51.
- Chen, H., Shen, Y., Tang, X., Yu, L., Wang, J., Guo, L., Zhang, Y., Zhang, H., Feng, S., Strickland, E., Zheng, N., and Deng, X.W. (2006). *Arabidopsis* CULLIN4 forms an E3 ubiquitin ligase with RBX1 and the CDD complex in mediating light control of development. *Plant Cell* **18**: 1991–2004.
- Chen, Y.C., and McCormick, S. (1996). sidecar pollen, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. *Development* **122**: 3243–3253.
- Chu, G., and Chang, E. (1988). *Xeroderma pigmentosum* group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* **242**: 564–567.
- Clough, S.J., and Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Cole, M., Chandler, J., Weijers, D., Jacobs, B., Comelli, P., and Werr, W. (2009). DORNROSCHE is a direct target of the auxin response factor MONOPTEROS in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **136**: 1643–1651.
- Colombo, M., Masiero, S., Vanzulli, S., Lardelli, P., Kater, M.M., and Colombo, L. (2008). AGL23, a type I MADS-box gene that controls female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant J.* **54**: 1037–1048.
- De Smet, I., Lau, S., Mayer, U., and Jürgens, G. (2010). Embryogenesis - The humble beginnings of plant life. *Plant J.* **61**: 959–970.
- Devon, R.S., Porteous, D.J., and Brookes, A.J. (1995). Splinkerettes—Improved vectorettes for greater efficiency in PCR walking. *Nucleic Acids Res.* **23**: 1644–1645.
- Dissmeyer, N., Nowack, M.K., Pusch, S., Stals, H., Inzé, D., Grini, P.E., and Schnittger, A. (2007). T-loop phosphorylation of *Arabidopsis* CDKA1 is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue. *Plant Cell* **19**: 972–985.
- Dreher, K., and Callis, J. (2007). Ubiquitin, hormones and biotic stress in plants. *Ann. Bot. (Lond.)* **99**: 787–822.
- Dumbliuskas, E., Lechner, E., Jaciubek, M., Berr, A., Pazhouhandeh, M., Alioua, M., Cognat, V., Brukhin, V., Koncz, C., Grossniklaus, U., Molinier, J., and Genschik, P. (2011). The *Arabidopsis* CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting. *EMBO J.* **30**: 731–743.
- Dunker, A.K., et al. (2001). Intrinsically disordered protein. *J. Mol. Graph. Model.* **19**: 26–59.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R., and Jürgens, G. (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**: 147–153.
- Gagne, J.M., and Clark, S.E. (2010). The *Arabidopsis* stem cell factor POLTERGEIST is membrane localized and phospholipid stimulated. *Plant Cell* **22**: 729–743.
- Ge, X., Chang, F., and Ma, H. (2010). Signaling and transcriptional control of reproductive development in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **20**: R988–R997.
- Grini, P.E., Schnittger, A., Schwarz, H., Zimmermann, I., Schwab, B., Jürgens, G., and Hülskamp, M. (1999). Isolation of ethyl methane-sulfonate-induced gametophytic mutants in *Arabidopsis thaliana* by a segregation distortion assay using the multimarker chromosome 1. *Genetics* **151**: 849–863.
- Gross-Hardt, R., Kägi, C., Baumann, N., Moore, J.M., Baskar, R., Gagliano, W.B., Jürgens, G., and Grossniklaus, U. (2007). LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* **5**: e47.
- He, Y.J., McCall, C.M., Hu, J., Zeng, Y., and Xiong, Y. (2006). DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev.* **20**: 2949–2954.
- Hennig, L., and Derkacheva, M. (2009). Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players? *Trends Genet.* **25**: 414–423.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425–479.
- Higa, L.A., and Zhang, H. (2007). Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Div.* **2**: 5.
- Higa, L.A., Wu, M., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H. (2006). CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat. Cell Biol.* **8**: 1277–1283.
- Howden, R., Park, S.K., Moore, J.M., Orme, J., Grossniklaus, U., and Twell, D. (1998). Selection of T-DNA-tagged male and female game-

- tophytic mutants by segregation distortion in *Arabidopsis*. *Genetics* **149**: 621–631.
- Ingouff, M., Hamamura, Y., Gourgues, M., Higashiyama, T., and Berger, F. (2007). Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. *Curr. Biol.* **17**: 1032–1037.
- Ishida, T., and Kinoshita, K. (2008). Prediction of disordered regions in proteins based on the meta approach. *Bioinformatics* **24**: 1344–1348.
- Iwanami, N., et al. (2008). WDR55 is a nucleolar modulator of ribosomal RNA synthesis, cell cycle progression, and teleost organ development. *PLoS Genet.* **4**: e1000171.
- Iwanami, N., Okada, M., Hoa, V.Q., Seo, Y., Mitani, H., Sasaki, T., Shimizu, N., Kondoh, H., Furutani-Seiki, M., and Takahama, Y. (2009). Ethylnitrosourea-induced thymus-defective mutants identify roles of KIAA1440, TRRAP, and SKIV2L2 in teleost organ development. *Eur. J. Immunol.* **39**: 2606–2616.
- Jackson, S., and Xiong, Y. (2009). CRL4s: The CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Trends Biochem. Sci.* **34**: 562–570.
- Jenik, P.D., Gillmor, C.S., and Lukowitz, W. (2007). Embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **23**: 207–236.
- Jia, S., Kobayashi, R., and Grewal, S.I. (2005). Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Ctr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nat. Cell Biol.* **7**: 1007–1013.
- Jullien, P.E., Kinoshita, T., Ohad, N., and Berger, F. (2006). Maintenance of DNA methylation during the *Arabidopsis* life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell* **18**: 1360–1372.
- Kägi, C., Baumann, N., Nielsen, N., Stierhof, Y.D., and Gross-Hardt, R. (2010). The gametic central cell of *Arabidopsis* determines the lifespan of adjacent accessory cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 22350–22355.
- Kapetanaki, M.G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D.C., Hsieh, C.L., Rapić-Otrin, V., and Levine, A.S. (2006). The DDB1-CUL4AADD2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**: 2588–2593.
- Kopanja, D., Roy, N., Stoyanova, T., Hess, R.A., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P. (2011). Cul4A is essential for spermatogenesis and male fertility. *Dev. Biol.* **352**: 278–287.
- Lee, I., Ambaru, B., Thakkar, P., Marcotte, E.M., and Rhee, S.Y. (2010). Rational association of genes with traits using a genome-scale gene network for *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotechnol.* **28**: 149–156.
- Lee, J.H., Terzaghi, W., Gusmaroli, G., Charron, J.-B.F., Yoon, H.-J., Chen, H., He, Y.J., Xiong, Y., and Deng, X.W. (2008). Characterization of *Arabidopsis* and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell* **20**: 152–167.
- León, G., Holuigue, L., and Jordana, X. (2007). Mitochondrial complex II is essential for gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **143**: 1534–1546.
- Levitt, J.A., Matthews, D.R., Ameer-Beg, S.M., and Suhling, K. (2009). Fluorescence lifetime and polarization-resolved imaging in cell biology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **20**: 28–36.
- Li, N., Yuan, L., Liu, N., Shi, D., Li, X., Tang, Z., Liu, J., Sundaresan, V., and Yang, W.C. (2009). SLOW WALKER2, a NOC1/MAK21 homologue, is essential for coordinated cell cycle progression during female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**: 1486–1497.
- Luo, M., Bilodeau, P., Koltunow, A., Dennis, E.S., Peacock, W.J., and Chaudhury, A.M. (1999). Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 296–301.
- Lv, X.B., Xie, F., Hu, K., Wu, Y., Cao, L.L., Han, X., Sang, Y., Zeng, Y.X., and Kang, T. (2010). Damaged DNA-binding protein 1 (DDB1) interacts with Cdh1 and modulates the function of APC/CCdh1. *J. Biol. Chem.* **285**: 18234–18240.
- Molinier, J., Lechner, E., Dumbliuskas, E., and Genschik, P. (2008). Regulation and role of *Arabidopsis* CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *PLoS Genet.* **4**: e1000093.
- Murashige, T., and Skoog, T. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473–497.
- Nawy, T., Lukowitz, W., and Bayer, M. (2008). Talk global, act local: patterning the *Arabidopsis* embryo. *Curr. Opin. Plant Biol.* **11**: 28–33.
- Nowack, M.K., Grini, P.E., Jakoby, M.J., Lafos, M., Koncz, C., and Schnittger, A. (2006). A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis. *Nat. Genet.* **38**: 63–67.
- Nowack, M.K., Ungu, A., Bjerkan, K.N., Grini, P.E., and Schnittger, A. (2010). Reproductive cross-talk: Seed development in flowering plants. *Biochem. Soc. Trans.* **38**: 604–612.
- Ottenschläger, I., Wolff, P., Wolverton, C., Bhalerao, R.P., Sandberg, G., Ishikawa, H., Evans, M., and Palme, K. (2003). Gravity-regulated differential auxin transport from columella to lateral root cap cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 2987–2991.
- Pagnussat, G.C., Yu, H.J., Ngo, Q.A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C.S., Capron, A., Xie, L.F., Ye, D., and Sundaresan, V. (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* **132**: 603–614.
- Park, S.K., Howden, R., and Twell, D. (1998). The *Arabidopsis thaliana* gametophytic mutation gemini pollen1 disrupts microspore polarity, division asymmetry and pollen cell fate. *Development* **125**: 3789–3799.
- Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A., and Genschik, P. (2011). MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 3430–3435.
- Petroski, M.D., and Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 9–20.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: e45.
- Portereiko, M.F., Lloyd, A., Steffen, J.G., Punwani, J.A., Otsuga, D., and Drews, G.N. (2006a). AGL80 is required for central cell and endosperm development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1862–1872.
- Portereiko, M.F., Sandaklie-Nikolova, L., Lloyd, A., Dever, C.A., Otsuga, D., and Drews, G.N. (2006b). NUCLEAR FUSION DEFECTIVE1 encodes the *Arabidopsis* RPL21M protein and is required for karyogamy during female gametophyte development and fertilization. *Plant Physiol.* **141**: 957–965.
- Preuss, D., Rhee, S.Y., and Davis, R.W. (1994). Tetrad analysis possible in *Arabidopsis* with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science* **264**: 1458–1460.
- Rotman, N., Durbarry, A., Wardle, A., Yang, W.C., Chaboud, A., Faure, J.E., Berger, F., and Twell, D. (2005). A novel class of MYB factors controls sperm-cell formation in plants. *Curr. Biol.* **15**: 244–248.
- Schroeder, D.F., Gahrtz, M., Maxwell, B.B., Cook, R.K., Kan, J.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Chory, J. (2002). De-etiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Curr. Biol.* **12**: 1462–1472.
- Shi, D.Q., Liu, J., Xiang, Y.H., Ye, D., Sundaresan, V., and Yang, W.C. (2005). SLOW WALKER1, essential for gametogenesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 protein involved in 18S ribosomal RNA biogenesis. *Plant Cell* **17**: 2340–2354.
- Smalle, J., and Vierstra, R.D. (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 555–590.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., and Neer, E.J. (1999). The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **24**: 181–185.
- Sørensen, M.B., Chaudhury, A.M., Robert, H., Bancharel, E., and

- Berger, F.** (2001). Polycomb group genes control pattern formation in plant seed. *Curr. Biol.* **11**: 277–281.
- Steffen, J.G., Kang, I.H., Portereiko, M.F., Lloyd, A., and Drews, G.N.** (2008). AGL61 interacts with AGL80 and is required for central cell development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **148**: 259–268.
- Stolpe, T., Süsslin, C., Marrocco, K., Nick, P., Kretsch, T., and Kircher, S.** (2005). In planta analysis of protein-protein interactions related to light signaling by bimolecular fluorescence complementation. *Protoplasma* **226**: 137–146.
- Sundberg, E., and Østergaard, L.** (2009). Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**: a001628.
- Tan, X.Y., Liu, X.L., Wang, W., Jia, D.J., Chen, L.Q., Zhang, X.Q., and Ye, D.** (2010). Mutations in the *Arabidopsis* nuclear-encoded mitochondrial phage-type RNA polymerase gene RPOTm led to defects in pollen tube growth, female gametogenesis and embryogenesis. *Plant Cell Physiol.* **51**: 635–649.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**: 1963–1971.
- Ungu, A., Nowack, M.K., Reymond, M., Shirzadi, R., Kumar, M., Biewers, S., Grini, P.E., and Schnittger, A.** (2008). Natural variation in the degree of autonomous endosperm formation reveals independence and constraints of embryo growth during seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **179**: 829–841.
- van Nocker, S., and Ludwig, P.** (2003). The WD-repeat protein superfamily in *Arabidopsis*: conservation and divergence in structure and function. *BMC Genomics* **4**: 50.
- Vierstra, R.D.** (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 385–397.
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y.** (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol. Cell* **22**: 383–394.
- Wysocka, J., Swigut, T., Milne, T.A., Dou, Y., Zhang, X., Burlingame, A.L., Roeder, R.G., Brivanlou, A.H., and Allis, C.D.** (2005). WDR5 associates with histone H3 methylated at K4 and is essential for H3 K4 methylation and vertebrate development. *Cell* **121**: 859–872.
- Youngren, K.K., et al.** (2005). The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* **435**: 360–364.
- Xu, H., Wang, J., Hu, Q., Quan, Y., Chen, H., Cao, Y., Li, C., Wang, Y., and He, Q.** (2010). DCAF26, an adaptor protein of Cul4-based E3, is essential for DNA methylation in *Neurospora crassa*. *PLoS Genet.* **6**: e1001132.
- Yin, Y., et al.** (2011). The E3 ubiquitin ligase Cullin 4A regulates meiotic progression in mouse spermatogenesis. *Dev. Biol.* **356**: 51–62.
- Yu, L., Gaitatzes, C., Neer, E., and Smith, T.F.** (2000). Thirty-plus functional families from a single motif. *Protein Sci.* **9**: 2470–2476.
- Zhang, Y., Feng, S., Chen, F., Chen, H., Wang, J., McCall, C., Xiong, Y., and Deng, X.W.** (2008). *Arabidopsis* DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 forms a nuclear E3 ubiquitin ligase with DDB1 and CUL4 that is involved in multiple plant developmental processes. *Plant Cell* **20**: 1437–1455.

A

CG14722-NP_65111.3(Dm)
Agap_AGAP008286-XP_001689008.1(Ag)
wdr55-NP_080740.2(Mm)
wdr55-NP_001017932.1(Rn)
WDR55-NP_060176.2(Hs)
WDR55-NP_535212.2(Clf)
WDR55-NP_001014873.1(Bt)
wdr55-NP_001003871.1(Dr)
AT2G34260-NP_565782.1(At)
Os07g46620-NP_001060533.1(Os)
Y44F5A.1-NP_497851.1(Ce)
PFE1310c-XP_001351819.1(Pf)

CG14722-NP_65111.3(Dm)
Agap_AGAP008286-XP_001689008.1(Ag)
wdr55-NP_080740.2(Mm)
wdr55-NP_001017932.1(Rn)
WDR55-NP_060176.2(Hs)
WDR55-NP_535212.2(Clf)
WDR55-NP_001014873.1(Bt)
wdr55-NP_001003871.1(Dr)
AT2G34260-NP_565782.1(At)
Os07g46620-NP_001060533.1(Os)
Y44F5A.1-NP_497851.1(Ce)
PFE1310c-XP_001351819.1(Pf)

CG14722-NP_65111.3(Dm)
Agap_AGAP008286-XP_001689008.1(Ag)
wdr55-NP_080740.2(Mm)
wdr55-NP_001017932.1(Rn)
WDR55-NP_060176.2(Hs)
WDR55-NP_535212.2(Clf)
WDR55-NP_001014873.1(Bt)
wdr55-NP_001003871.1(Dr)
AT2G34260-NP_565782.1(At)
Os07g46620-NP_001060533.1(Os)
Y44F5A.1-NP_497851.1(Ce)
PFE1310c-XP_001351819.1(Pf)

CG14722-NP_65111.3(Dm)
Agap_AGAP008286-XP_001689008.1(Ag)
wdr55-NP_080740.2(Mm)
wdr55-NP_001017932.1(Rn)
WDR55-NP_060176.2(Hs)
WDR55-NP_535212.2(Clf)
WDR55-NP_001014873.1(Bt)
wdr55-NP_001003871.1(Dr)
AT2G34260-NP_565782.1(At)
Os07g46620-NP_001060533.1(Os)
Y44F5A.1-NP_497851.1(Ce)
PFE1310c-XP_001351819.1(Pf)

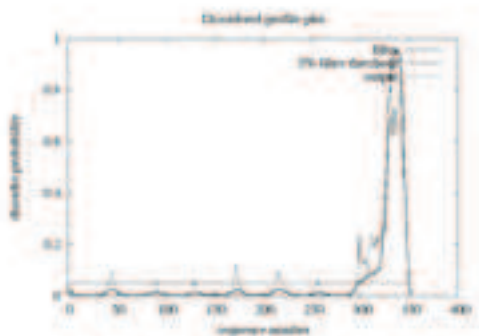
CG14722-NP_65111.3(Dm)
Agap_AGAP008286-XP_001689008.1(Ag)
wdr55-NP_080740.2(Mm)
wdr55-NP_001017932.1(Rn)
WDR55-NP_060176.2(Hs)
WDR55-NP_535212.2(Clf)
WDR55-NP_001014873.1(Bt)
wdr55-NP_001003871.1(Dr)
AT2G34260-NP_565782.1(At)
Os07g46620-NP_001060533.1(Os)
Y44F5A.1-NP_497851.1(Ce)
PFE1310c-XP_001351819.1(Pf)



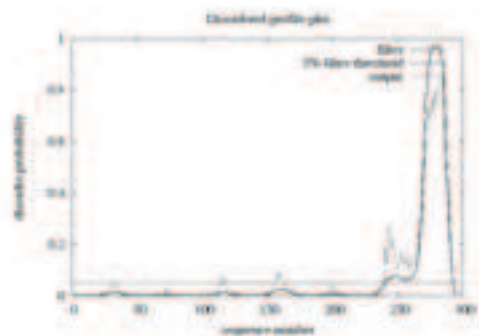
B



C



D



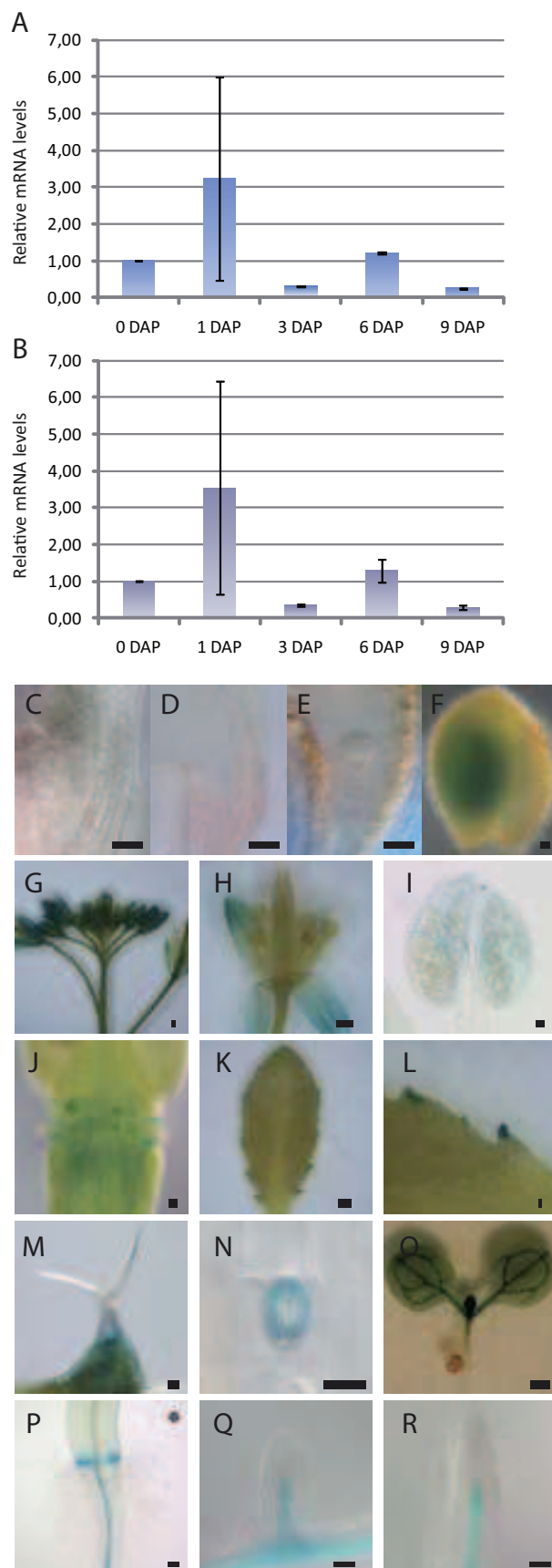
Supplemental Figure 1: Bioinformatics analysis of WDR55.

Supplemental Figure 1: Bioinformatics analysis of WDR55.

A-D An alignment of homologues of WDR55 from common model organisms **(A)**, a multiple sequence alignment of possible WD40 repeats in WDR55.1 **(B)** and output from DISOPRED for WDR55.1 **(C)** and for WDR55.2 **(D)**.

(A) WDR55 is conserved across species and the proteins used in this alignment are derived from HomoloGene at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/>) and were NP_060176.2 (*Homo sapiens*), XP_535212.2 (*Canis lupus familiaris*), NP_001014873.1 (*Bos Taurus*), NP_080740.2 (*Mus musculus*), NP_001017932.1 (*Rattus norvegicus*), NP_001003871.1 (*Danio rerio*), NP_650111.3 (*Drosophila melanogaster*), XP_001689008.1 (*Anopheles gambiae*), NP_497851.1 (*Caenorhabditis elegans*), NP_565782.1 (*Arabidopsis thaliana*), NP_001060533.1 (*Oryza sativa*), and XP_001351819.1 (*Plasmodium falciparum*). **(B)** The amino acid sequence of WDR55.1 was used in BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) against the PDB (Protein Data Bank) protein database to identify a protein with known structure with sequence similarity. This identified AGB1, which was then compared in PyMOL to identify the structure corresponding to the sequence similarity with WDR55.1. The similarities between WDR55.1 and AGB1 were restricted to the propeller blades of AGB1, indicating that this sequence is important for the three dimensional structure. Blade 1 and 7 aligned with three beta sheets of the AGB1 instead of four. The five WD40 repeats predicted by SMART and the two new proposed WD40 repeats aligned together using Jalview (www.jalview.org) show similarity, indicating repeating units in the protein sequence of WDR55.1. **(C)** The WDR55.1 protein sequence appears to be unstructured after about 290 aa according to DISOPRED. **(D)** The WDR55.2 protein sequence appears to be unstructured after about 240 aa according to DISOPRED.

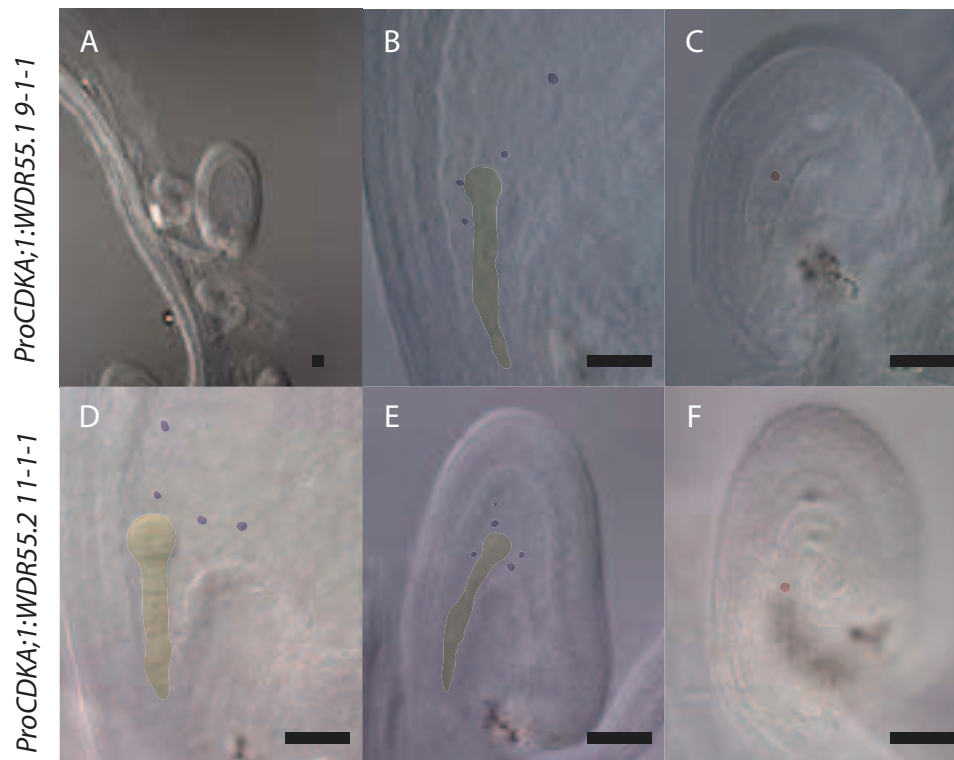
The sequences for the model organism homologue alignment was obtained from HomoloGene and was performed using ClustalW2 and formatted using GeneDoc software (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). The alignments of the WD40 repeats were performed in Jalview and the sequences were obtained from predicted WD40 repeats from SMART and from possible 40 bp sequences between two predicted WD40 repeats and 40 bp after the last predicted WD40 repeat. DISOPRED predicts unstructured regions of a protein (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/disopred/>). Additional alignments showing conservation in other eukaryotes can be found at the OMA browser where a Mafft Multiple Sequence Alignment of 58 group members has been performed (<http://omabrowser.org/cgi-bin/gateway.pl> OMA group 66989). Additional green plant orthologs can be found at Phytozome (<http://www.phytozome.net/>).



Supplemental Figure 2: *WDR55* is expressed during early and late embryo development and in various sporophytic tissues.

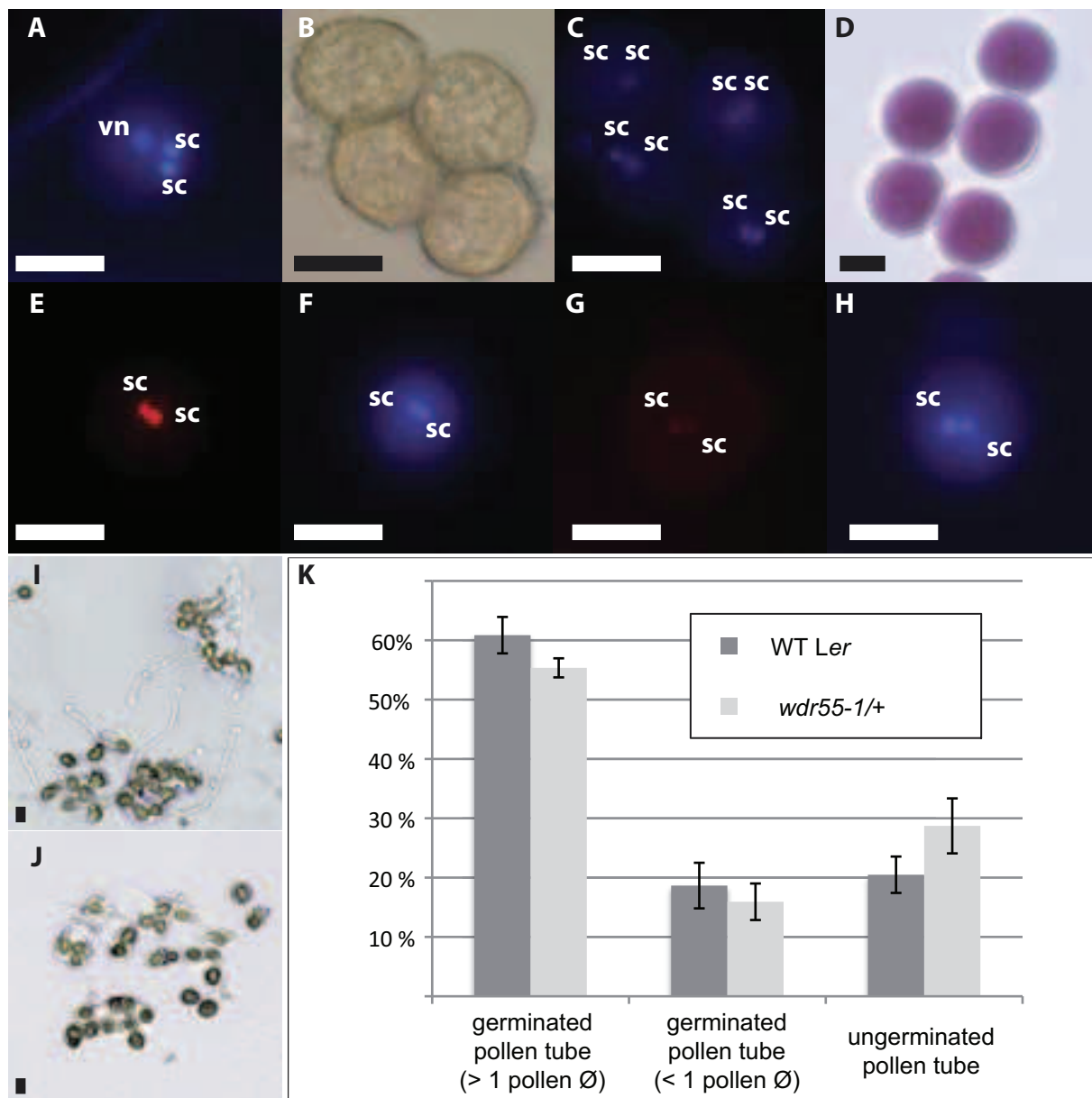
A-B Real-time qPCR showing relative *WDR55* levels during embryo development at stages 0, 1, 3, 6, 9 and 12 DAP for the splice variants *WDR55.1* (**A**) and *WDR55.2* (**B**). Two biological replica were used per DAP stage with 6-7 siliques for 0 DAP, 5-6 for 1 DAP, 4-5 for 3 DAP, and 3 siliques for 6, 9 and 12 DAP. Three wild-type manually crossed Col plants were used per biological replica to obtain the siliques. Error bars on graphs are standard deviations between the two biological replicas.

C-R Light micrographs of *ProWDR55:GUS* expression during embryo development at 1, 2, 3 and 12 DAP (**C-F**), and *ProWDR55:GUS* expression in various tissues; buds (**G**), open flowers (**H**), anther (**I**), in the floral abscission zone (**J**), in leaves and at the base of trichomes (**K-M**), in guard cells (**N**), vascular tissue of seedling (**O**), at the transition from hypocotyls to root (**P**), in lateral roots (**Q**) and in the root tip (**R**). Scale bar for C-F, I-J, L-N and P-R is 20 μ m. Scale bar for G-H, K and O is 280 μ m. DAP- days after pollination.



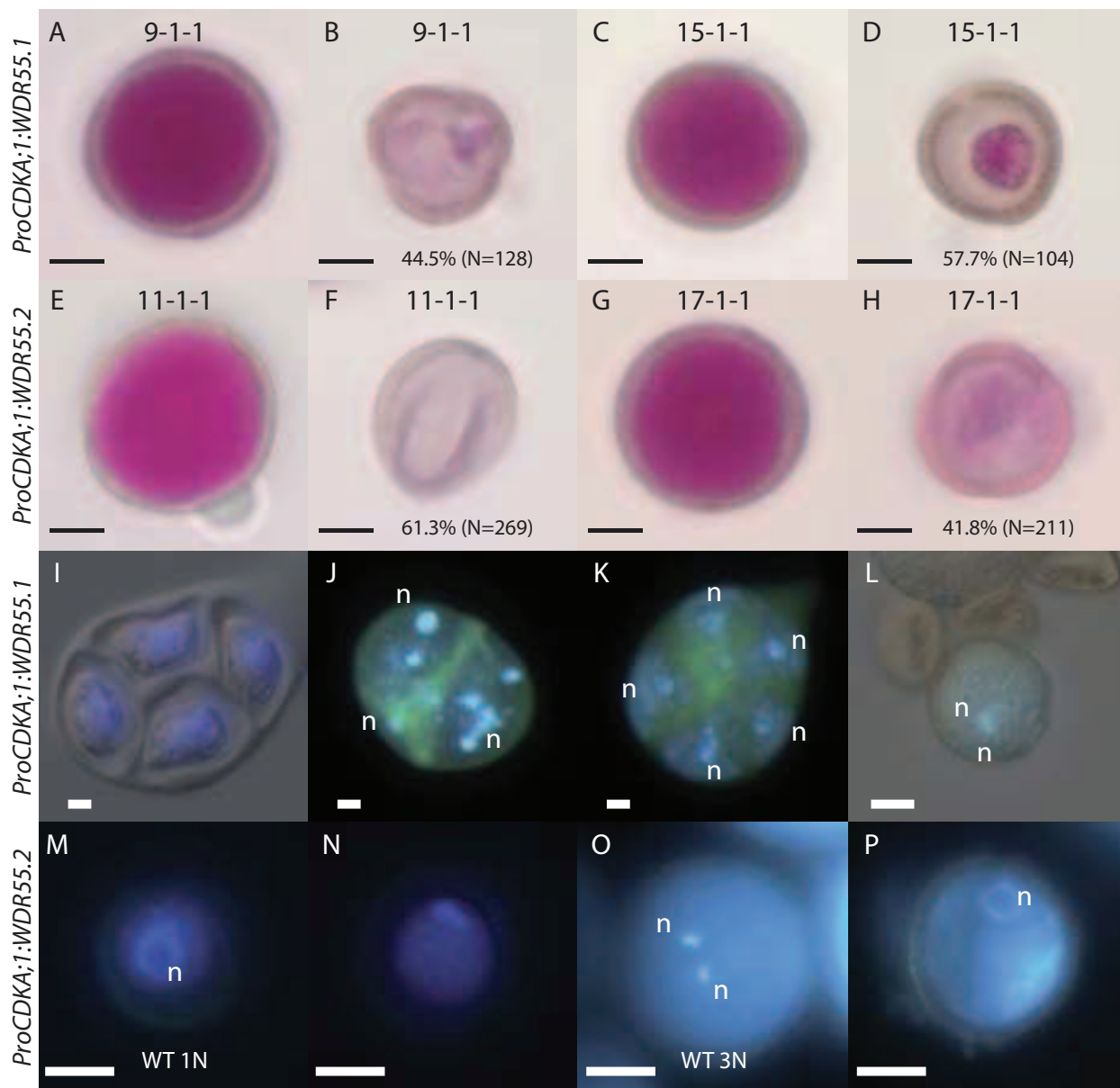
Supplemental Figure 3: Overexpression of *WDR55* results in arrests at the one-nucleate stage of embryo sac development.

A-F Light micrographs of ovules overexpressing *WDR55.1* (**A-C**) and *WDR55.2* (**D-F**) under the *CDKA;1* promoter. Overexpression of the *WDR55.1* splice form results in two classes of ovules; ovules developing normally (**A-B**), and ovules where the embryo sac is arrested before the first mitotic division (**A,C**). Overexpression of *WDR55.2* also results in some ovules developing normally (**D**), but also produce smaller seeds with underdeveloped endosperm (**E**) and ovules where the embryo sac arrests before the first mitotic division (**F**). Yellow coloring- embryo, purple coloring- developed endosperm, pink coloring- arrested embryo sac nuclei. Scale bar is 20 μ m.



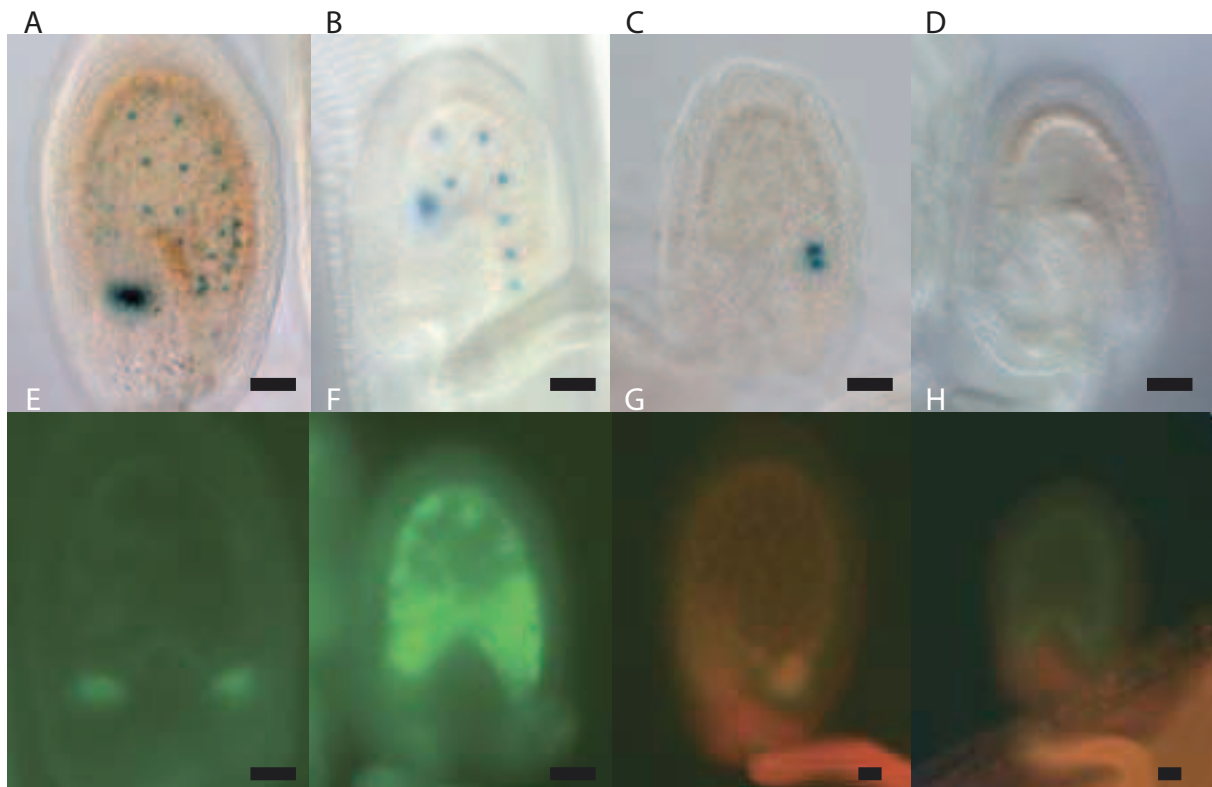
Supplemental Figure 4: Pollen development and pollen tube germination in *wdr55-1*.

A-K Fluorescence- and light-micrographs of *wdr55-1* pollen stained with DAPI (**A**), light micrograph (**B**) and fluorescent micrograph of *wdr55-1* pollen in *quartet* (*qrt*) mutant background stained with DAPI (**C**), *wdr55-1* pollen stained with Alexander solution (**D**), fluorescent micrograph of *wdr55-1* $-/+$ pollen expressing the sperm cell marker *ProHTR10:RFP* (**E**) and the same pollen stained with DAPI (**F**), *wdr55-1* $-/+$ pollen expressing the sperm cell marker *ProDUO:DUO-RFP* (**G**) and the same pollen with DAPI staining (**H**). Light micrographs of germinating wild type and *wdr55-1* pollen tubes (**I-J**) and germination frequencies (**K**). (**A**) *wdr55-1* pollen nuclei were stained with DAPI and visualised under UV, but no obvious defects were found. (**B-C**) *wdr55-1* in *qrt* background where all four pollen grains in the quartet appeared normal with two sperm cells and one vegetative nucleus. (**D**) *wdr55-1* stained with Alexander solution showed that all pollen were viable (N=343). (**E-F**) *wdr55-1* had normal expression of the sperm cell fate markers *ProHTR10:RFP* and (**G-H**) *ProDUO:DUO-RFP*. (**I**) Wild-type and (**J**) *wdr55-1* $-/+$ germinated pollen tubes. (**K**) Comparison of germination frequency in (**I**) and (**J**). Error bars indicate standard deviation (SD) between three biological replicates scored both from wild type (N=406) and from *wdr55-1* (N=402). Two classes of germinated pollen were scored; pollen tubes longer than one pollen diameter (>1Ø) and pollen tubes shorter than one pollen diameter (<1Ø). Scale bar, 10 µm. vn-vegetative nucleus, sc-sperm cell, Ø- diameter.



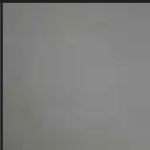
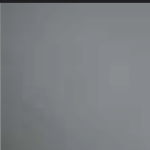
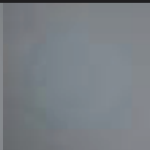
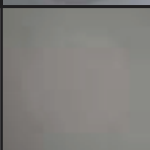
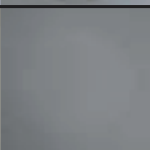
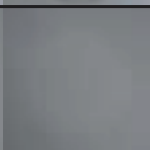
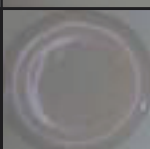
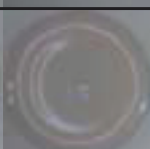
Supplemental Figure 5: Overexpression of *WDR55* results in various developmental defects in pollen.

A-P Light micrographs of Alexander-stained pollen (**A-H**) and fluorescence micrographs of DAPI-stained pollen expressing the splice variant *WDR55.1* and *WDR55.2* under control of the *CDKA;1* promoter (**I-P**). (**A-D**) Two independent *ProCDKA;1:WDR55.1* lines were shown to have a high frequency of aborted pollen. (**E-H**) Four out of nine independent *ProCDKA;1:WDR55.2* lines were also shown to have a high frequency of aborted pollen. (**I-L**) *ProCDKA;1:WDR55.1* affects meiosis, producing early stage abortions (**L**) in microspores. (**I**) WT male tetrad before telophase II with four meiotic products. (**J-K**) *ProCDKA;1:WDR55.1* pre-telophase II stage with incomplete callose walls and fragmented nuclear material (**J**) and more than four compartments (note, five compartments are visible in the focal plane (**K**)). (**M-P**) *ProCDKA;1:WDR55.2* appears to hamper the first microspore mitosis (N and P) when compared to wild type (M and O). n-nuclei, WT-wild type, 1N-one-nucleate microspore, 3N-tri-nucleate microspore. Scale bar, 10 μ m.



Supplemental Figure 6: *ProFIS2:FIS2-GUS* and *ProKS117:GFP* in *wdr55-2* endosperm.

A-D Light micrographs of the early endosperm marker *ProFIS2:FIS2-GUS* in the *wdr55-2* +/- background. Wild-type expression of *ProFIS2:FIS2-GUS* is seen in most seeds in the *wdr55-2* +/- background at 3 DAP (**A**) and 2 DAP (**B**), while a fraction of the seeds show ectopic expression of the marker (**C**) or absence of expression in visible endosperm (**C-D**) at 2 DAP. **E-H** Fluorescence micrographs of the endosperm marker *ProKS117:GFP* in the *wdr55-2* +/- background. The expression of the late endosperm marker *ProKS117:GFP* in the wild type (E and G) and in *wdr55-2* (F and H) shows wild-type expression of the marker at 5 DAP (**E-F**) and at 6 DAP (**G-H**). Scale bar is 20 μ m.

		<i>WDR55.1</i> pGBKT7	BD pGBKT7	<i>lam</i> pGBKT7
<i>DDB1A</i> pADN	QDO			
	-L/-W			
<i>DDB1B</i> pADN	QDO			
	-L/-W			

Supplemental Figure 7: Direct mating of WDR55.1 with DDB1A and DDB1B in a yeast two-hybrid experiment reveal no interaction.

WDR55.1 was tested by direct mating with the full-length sequences of DDB1A and DDB1B in the pADN vector, as binding would implement WDR55 in the CUL4-ROC1 E3 ubiquitin ligase complex. There was no growth on QDO medium, indicating that these proteins do not interact under these circumstances. The -L/-W medium had growth, confirming the presence of both constructs in the yeast mating product, and there was no growth on the controls, indicating no autoactivation. QDO- quadruple drop out media, -L/-W – SD/-Leu/-Trp media, BD- binding domain, Lam- Lamin.

Allele	Line	Insert location	5' flanking position in BAC	3' flanking position in BAC	BAC accession #	Comments	Deletion/ insertion/ filler	AA-phenotype
<i>wdr55-1</i>	<i>dsg3127</i>	exon (#2)	36582	36589	F13P17	204 bp after ATG	8 bp target site duplication	<i>Leu-Tyr-Arg*</i> **- <i>Gly</i> -***
<i>wdr55-2</i>	<i>wiscdslox430F06</i>	exon (#13)	38661	38703	F13P17	2317 bp after ATG	42 bp are either deleted or lie between two or more T-DNA insertions	<i>Asn-Ala-Ser-Gly</i> - <i>Thr-Asn</i> -***
-	<i>salk034787</i>	intron(#13)	NA	38770	F13P17			-
-	<i>salk063054</i>	intron(#10)	38241	38243	F13P17		DNA filler between T-DNA LB and the genomic sequence	-

Supplemental Table 1: Insertion details for mutant lines of *WDR55*.

Lines were obtained from Nottingham Arabidopsis Stock Centre if not otherwise indicated. The inserts were verified using gene- and insert-specific primers, and their locations were determined using BLAST and VNTI. Primers for the insert in *wdr55-1* were *Sense primer At2g34260 nucleotide binding* and *Ds3-2*, and *Antisense primer At2g34260 nucleotide binding* and *Ds5-2*. For *wdr55-2* both the *ASP WiscDsLox430F06* and the *SP WiscDsLox430F06* primers could be used with the LB primer *p745* due to a possible duplication of the T-DNA insert. For *salk034787* the *ASP SALK 034787* and the LB primer *J504* were used and the primers *ASP SALK 063054* and *SALK LBa1*, and *SP SALK 063054* and *Kan pKGWFS7* were used to identify the insert in *salk063054*. Primer sequences can be found in Supplemental Table 4. The locations are indicated as positions on BAC clones. Stop codon is symbolised by ***, endogenous AA and the mutant AA are separated by |. LB, left border.

	Total	1 central cell nucleus	2 polar nuclei	collapsed embryo sac	undeveloped N/A
Unpollinated 3 DAE					
<i>Ler</i>	57	75.4%	5.3%	0.0%	19.3%
<i>Col</i>	41	95.1%	0.0%	0.0%	4.9%
<i>wdr55-1</i> (<i>Ler</i>)	101	49.5%	29.7%	4.0%	16.8%
<i>wdr55-1</i> (<i>Col</i>)	101	75.2%	0.0%	0.0%	24.8%
Unpollinated 4 DAE					
<i>Ler</i>	77	87.0%	1.3%	0.0%	11.7%
<i>wdr55-1</i> (<i>Ler</i>)	55	63.6%	16.4%	0.0%	20.0%
2 DAP 3 DAE					
<i>Ler</i> x <i>Ler</i>	57	1.8%	3.5%	0.0%	8.8%
<i>Col</i> x <i>Col</i>	145	2.1%	0.0%	0.7%	7.6%
<i>Ler</i> x <i>Col</i>	52	11.5%	3.8%	0.0%	34.6%
<i>wdr55-1</i> (<i>Ler</i>) x <i>Ler</i>	92	3.3%	7.6%	1.1%	1.1%
<i>wdr55-1</i> (<i>Ler</i>) x <i>Col</i>	74	6.8%	8.1%	14.9%	2.7%
<i>wdr55-1</i> (<i>Col</i>) x <i>Col</i>	101	15.8%	0.0%	2.0%	6.9%
<i>wdr55-2</i> (<i>Col</i>) x <i>Col</i>	33	0.0%	0.0%	3.0%	6.1%
2 DAP 4 DAE					
<i>Ler</i> x <i>Ler</i>	81	3.7%	1.2%	0.0%	6.2%
<i>wdr55-1</i> (<i>Ler</i>) x <i>Ler</i>	59	5.1%	0.0%	0.0%	11.9%

Supplemental Table 2: Delayed fusion of polar nuclei in *wdr55-1* (*Ler*) embryo sacs.

Embryo sac phenotype count for *wdr55-1* and *wdr55-2* showing percentage of total counts in four classes; 1 central cell nucleus, 2 polar nuclei arrest, collapsed embryo sac and an undeveloped class where the seeds could not be distinguished between 1 nuclear or 2 nuclear arrest (undeveloped N/A). All crosses are female x male. nuc- nucleus, DAP- days after pollination, DAE- days after emasculatation. N/A= not applicable.

T1					T2						F1	
Line	Self %SM ^R (N)	Rescue construct	%WT seeds (N)	SD	Line	Self %SM ^R (N)	SD	Rescue construct	% WT seeds (N)	SD	WT x Line (T2)	Rescue construct
3	72.05 (322)	Hem	NA		3	100.00 (344)	0,00	Hz	69.97 (280)	6,92	52.94 (51)	NA
4	70.75 (212)	Hz	100.00 (60)		4	100.00 (330)		Hz	100.00 (65)		47.69 (130)	NA
6	100.00 (192)	Hz	85.81 (114)	12,04	6	100 (>100)		Hz	NA		NA	NA
8	94.50 (218)	Hz	NA		8	100.00 (288)		Hz	100.00 (57)		100.00 (108)	NA
9	100.00 (142)	Hz	99.09 (117)	1,29	9	100 (>100)		Hz	94.77 (201)	5,44	NA	NA
10	74.70 (253)	Hem	NA		10	100.00 (328)		Hz	81.83 (229)	11,19	53.94 (165)	NA
11	75.31 (243)	Hz	NA		11	74.57 (401)	1,90	Hz	93.17 (110)	7,31	44.62 (186)	Het

Supplemental Table 3: Genomic rescue of *wdr55-1*.

Transmission of the mutant allele *wdr55-1* during self-fertilization in the T1 and T2 generation and in crosses as male (F1) based on selection marker resistance (SM^R) segregation with the rescue construct containing the genomic sequence of *WDR55*, its promoter and the 3' UTR. The seed phenotype segregation is shown as percentage of normal seeds in the silique. SD, standard error in percentage between individual biological replicates; Hem, hemizygous; Hz, homozygous; NA- not available.

Supplemental Table 4A

Line	Primer name	Oligo Sequence
<i>wdr55-1</i> (ds3127)	Ds3-1	5'-CGATTACCGTATTTATCCCGTTTCG-3'
	Ds3-2	5'-CCGGTATATCCCGTTTTTCG-3'
	Ds5-1	5'-CCGTTTACCGTTTTGTATATCCCG-3'
	Ds5-2	5'-CGTTCGTTTTTCGTTTTTTACC-3'
	Antisense primer At2g34260 nucleotide binding	5'-TCAAGATGTGCAACCTGCGC-3'
	Sense primer At2g34260 nucleotide binding	5'-GGAGATCGATTTGGGAGCTAACG-3'
<i>wdr55-2</i> (wiscdslox430f06)	SP Wiscdslox 430F06	5'-CAACAGAATCATACAGCCGATTGG-3'
	p745	5'-AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-3'
	ASP Wiscdslox 430F06	5'-TTCCTCTTGCTGCCTGTAAAGC-3'
salk034787	ASP SALK 034787	5'-AAGAACAGATCCTTGTAGCC-3'
	SP SALK 034787	5'-TCATGACAGTATGCTGAAGG-3'
	J504	5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG-3'
salk063054	ASP SALK 063054	5'-ATACTGTCATGAGCTGTGCTACCG-3'
	SP SALK 063054	5'-GCGATCGGTTTGTTGATCTCG-3'
	SALK_LBa1	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'
	Kan-pKGWFS7	5'-AGCTCATTAACCTCCAGAA-3'

Supplemental Table 4B

	Primer name	Oligo Sequence
Vectorette	Ds3-1	5'-CGATTACCGTATTTATCCCGTTTCG-3'
	Ds3-2	5'-CCGGTATATCCCGTTTTTCG-3'
	Ds5-1	5'-CCGTTTACCGTTTTGTATATCCCG-3'
	Ds5-2	5'-CGTTCGTTTTTCGTTTTTTACC-3'
	vect-1	5'-CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATTCGTACGAGAA-3'
	vect-2	5'-TCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCC-3'
	TopL-vectorette	5'-CGAATCGTAACCGTTCGTACGAGAATTCGTACGAGAATCGCTGTCCTCTCCAACGAGCCAAGG-3'
	Vectorette-BamHI	5'-GATCCCTTGGCTCGTTTTTTTTTGCAAAAA-3'
Genotyping	Antisense primer At2g34260 nucleotide binding	5'-TCAAGATGTGCAACCTGCGC-3'
	Sense primer At2g34260 nucleotide binding	5'-GGAGATCGATTTGGGAGCTAACG-3'
	ASP Wiscdslox 430F06	5'-TTCCTCTTGCTGCCTGTAAAGC-3'
	SP Wiscdslox 430F06	5'-CAACAGAATCATACAGCCGATTGG-3'
	p745	5'-AACGTCCGCAATGTGTTATTAAGTTGTC-

		3'
	ASP SALK 034787	5'-AAGAACAGATCCTTGTAGCC-3'
	ASP SALK 063054	5'-ATACTGTCATGAGCTGTGCTACCG-3'
	SP SALK 034787	5'-TCATGACAGTATGCTGAAGG-3'
	SP SALK 063054	5'-GCGATCGGTTTGTGATCTCG-3'
	SALK_LBa1	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG-3'
	J504	5'- GCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG- 3'
	Kan-pKGWFS7	5'-AGCTCATTAAGTCCAGAA-3'
Realtime RT PCR		
	RP At2g34260 #54	5'-TGAAGAATCTGAGTCGTATCGGTAT-3'
	LP At2g34260 #54	5'-CATCCATCGACGAATCTAGTAGC-3'
	ASP RT PCR WDR55.2	5'-GCAGCCTTTATCATCTCCTGAAGC-3'
	SP RT PCR WDR55.2	5'-TTGGGTTTTAGGAATCGTCACTGC-3'
	act11-77-LP	5'-CAAAAACCTACACACCCGTACCA-3'
	act11-77-RP	5'-TGTCTTCACCATCTGCCATT-3'
GateWay	attB1-adapter	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT- 3'
	attB2-adapter	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT- 3'
	ASP At2g34260 Promoter Gateway	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTG AACAAAGAGTCCGTCGCGC-3'
	SP At2g34260 Promoter Gateway	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTG AAGGTGTAACTTTGCCTGAGGC-3'
	attB1 SP/WDR55.1	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT AATGGAGATCGATTGGGA-3'
	attB2 ASP/WDR55.1	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TAAGTCTGCAAAGAAATT-3'
	attB1 SP/WDR55.2	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT AATGTTTTTT-TGTTGGGTTTTAG-3'
	attB2 ASP/WDR55.2	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TAAGTCTGCAAAGAAATT-3'
	attB1 SP/DDB1A	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT AATGAGCTCATGGAACACTACGT-3'
	attB2 ASP/DDB1A	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TCAGTGAAGCCTAGTGAG-3'
	attB1 SP/DDB1B	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT AATGAGCGTATGGAACACTAC-3'
	attB2 ASP/DDB1B	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TCAGTGAAGCCTAGTGAG-3'
TOPO-GW	TOPO ASP/At2g34260 rescue	5'- AATCTAGATTTGAATCATAAGTTTCAGAGT AGGAGA-3'

	TOPO SP/At2g34260 rescue	5'- AATCTAGACGGGTTCTAAGTTAGCTTAAAG- 3'
Promoter + restriction site	SP pAt2g34260- AscI- 2	5'- GGCGCGCCGAAGGTGTAACTTTGCCTGA- 3'
	ASP pAt2g34260- XhoI- 2	5'-CTCGAGGAACAAAGAGTCCGTCGCGC-3'
Sequencing	M13 Forward (-20)	5'-GTAAAACGACGGCCAG-3'
	M13 Reverse	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
Y2H Candidate cloning	attB1 SP AT5G02960	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT AATGGGTAAGACACGTGGT-3'
	attB2 ASP AT5G02960	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TTAAGATCTTGGCTTCTC-3'
	attB1 SP AT5G60390-long	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTT AATGGGTAAAGAGAAGTTT-3'
	attB2 ASP AT5G60390-long	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTA TCATTTGGCACCCCTTCTT-3'
Verify GFP fusion	EGFP 625F	5'-GCAAAGACCCCAACGAGAAG-3'
	Trans 400sp	5'-CTGTCTTGTATCCCAAATCT-3'
	Egfp-pK7FWG2	5'-AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3'
	Trans 200asp	5'-GTGGAACCTAGAAGAGATTCT-3'
	ASP At2g34260 RT PCR 5	5'-GGTCCATCCCATCATTGTCGC-3'
	SP At2g34260 RT PCR 5	5'-ACAGAATCATACAGCCGATTGGG-3'

***Arabidopsis* WD REPEAT DOMAIN55 Interacts with DNA DAMAGED BINDING PROTEIN1
and Is Required for Apical Patterning in the Embryo**

Katrine N. Bjerkan, Sabrina Jung-Roméo, Gerd Jürgens, Pascal Genschik and Paul E. Grini
Plant Cell; originally published online March 23, 2012;
DOI 10.1105/tpc.111.089425

This information is current as of March 28, 2012

Supplemental Data	http://www.plantcell.org/content/suppl/2012/03/20/tpc.111.089425.DC1.html
Permissions	https://www.copyright.com/ccc/openurl.do?sid=pd_hw1532298X&issn=1532298X&WT.mc_id=pd_hw1532298X
eTOCs	Sign up for eTOCs at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain
CiteTrack Alerts	Sign up for CiteTrack Alerts at: http://www.plantcell.org/cgi/alerts/ctmain
Subscription Information	Subscription Information for <i>The Plant Cell</i> and <i>Plant Physiology</i> is available at: http://www.aspb.org/publications/subscriptions.cfm

Discussion / Perspectives

Préambule à la discussion

Les quatre années de ma thèse se sont écoulées à très grande vitesse et c'est avec une certaine frustration que je constate que malgré le travail investi, nous ne savons encore que peu de choses de la fonction des protéines MSI 2 et MSI 3 chez *Arabidopsis*. Néanmoins, je pense avoir généré de nouveaux outils et initié des expériences qui devraient permettre des avancées importantes dans ce domaine. Ci-dessous, je vais discuter les conclusions que l'on peut déjà tirer de mon travail, mais je vais également présenter les perspectives à venir en utilisant le matériel généré.

1. MSI2 et MSI3, deux protéines à motif WDxR, interagissent-elle avec DDB1a pour former des complexes de type CRL4 ?

Chez les mammifères, l'analyse de la structure 3D du complexe CRL4 a permis d'identifier deux domaines d'interaction particuliers au sein de la protéine adaptatrice, DDB1 (Li et al., 2006). L'un permet l'interaction avec CUL4 et l'autre sert à la fixation des protéines renfermant un domaine appelé DWD « DDB1 binding WD40 » (He et al., 2006 ; Sigma et al., 2007; Lee et al., 2008). Ces protéines sont communément appelées DCAF « DDB1-CUL4 Associated Factors » et représentent des candidats potentiels pour la reconnaissance sélective des substrats des complexes CRL4. Elles renferment toutes le motif appelé DWD-box ou WDxR ou DxR indispensable à l'établissement de l'interaction avec DDB1 (Angers et al., 2006). Des analyses bioinformatiques nous ont permis d'identifier une famille de protéines à domaine WD40 comportant ce motif WDxR : la famille des protéines MSI.

Les gènes *MSI-like* ont été identifiés dans tous les organismes eucaryotes et sont, par contre, absents chez les procaryotes. Le nombre de gènes MSI dépend des organismes. Chez la levure et bon nombre d'invertébrés, un seul gène est mis en évidence. Chez la plupart des vertébrés, on en dénombre deux comme par exemple chez l'homme (HsRbAp46/48) et cette famille s'est encore diversifiée chez les plantes puisque 5 gènes répartis en 3 clades ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Hennig et al., 2005 et **Figure 19A**). Cette séparation en 3 clades est antérieure à la divergence des monocotylédones et dicotylédones. La question de l'évolution de la fonction de chacun des gènes de ces 3 clades se pose donc tout

naturellement. Mon travail de thèse s'est articulé principalement autour du décryptage de la fonction encore inconnue des gènes *MSI 2* et *MSI 3* chez *Arabidopsis*.

Comme indiqué ci-dessus, le motif WDxR est présent dans les 5 protéines MSI d'*Arabidopsis*. Il était donc naturel de se poser la question si la présence de ce motif conservé impliquait nécessairement un lien avec le complexe CRL4 ? C'est une hypothèse que j'ai testée expérimentalement pour les protéines MSI 2 et MSI 3 d'autant plus qu'une interaction avec la protéine DDB1a/b a été prouvée pour les protéines MSI 1 et MSI 4 qui appartiennent aux 2 autres clades de la famille (Hennig et al., 2003). J'ai tout d'abord essayé de valider l'interaction des protéines MSI 2 et MSI 3 en tant que potentiel récepteur de substrat du complexe CRL4 avec la protéine adaptatrice DDB1a. Parmi les différentes techniques mises en œuvre, j'ai pu obtenir un résultat significatif uniquement avec la technique de BiFC qui montre une interaction dans les cellules végétales. Cependant, je n'ai pas pu valider cette interaction avec la technique du FRET/FLIM. Ceci peut éventuellement s'expliquer par des interactions faibles et difficiles à reproduire quand les 2 protéines sont exprimées de manière ectopique dans les cellules de feuilles de *N. benthamiana*. D'ailleurs des expériences de co-IP après expression transitoire dans les feuilles de *N. benthamiana* ne permettent pas non plus de mettre en évidence une telle interaction alors que le contrôle que j'emploie, à savoir l'interaction DDB2 et DDB1a, est positif dans toutes les conditions expérimentales. Cependant, la seule expérience d'immunoprécipitation qui a permis de montrer que la protéine MSI3 était présente dans le même complexe que CUL4 a été réalisée avec une culture de cellules d'*Arabidopsis* prélevées en phase exponentielle de croissance. Cette expérience valide *in vivo* la présence des 2 partenaires, MSI 3 et CUL 4, dans un même complexe en utilisant soit l'anticorps @MSI3, soit l'anticorps @CUL4 pour réaliser l'immunoprécipitation. A l'image du profil d'expression du gène *MSI 3*, la présence de la protéine MSI 3 dans un complexe avec CUL4 dans des cellules en prolifération marque peut-être une spécificité d'action spatio-temporelle du complexe CRL4^{MSI3}.

En me basant sur les résultats de gel filtration publiés par Jeon et Kim (2011), j'ai pu montrer que MSI 3 faisait partie de complexes de haut poids moléculaire de l'ordre de 0,7 et 1 MDa avec des extraits protéiques provenant de boutons floraux fermés. Cette expérience devra être répétée et sera complétée pour identifier les partenaires de MSI 3 dans ces

complexes notamment en utilisant les anticorps dirigés contre les autres sous-unités du complexe CRL4 : @CUL4 et @DDB1a/b.

Finalement, nous pourrions également utiliser une approche de génétique moléculaire pour tester l'importance de l'interaction des MSI 2/3 avec les protéines DDB1-CUL4. En effet, il a été montré que le motif DWD-box joue un rôle important dans l'assemblage des CRL4 chez les mammifères (Angers et al., 2006 ; He et al., 2006). C'est principalement le résidu arginine en position 16 du motif qui est nécessaire à cette interaction (Jin et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, le laboratoire avait également montré que la mutation de ce motif dans la protéine MSI 4 empêchait son interaction avec DDB1a et du coup abolissait la fonction de la protéine dans la régulation du temps de floraison (Pazhouhandeh et al., 2011). Il serait donc intéressant de tester l'interaction entre les protéines DDB1 d'*Arabidopsis* et les protéines MSI 2/MSI 3 mutée dans le motif WDxR (**Figure 19B**). En plus des techniques habituelles d'interaction protéine-protéine, un test de complémentation du phénotype de retard de croissance du mutant *msi3* avec une construction comportant une mutation dans le motif DWxR, prouverait l'importance du motif DWD-box *in vivo*.

2. Les fonctions des gènes MSI 2 et MSI 3 ne sont pas redondantes avec celles des gènes MSI 1 ou MSI 4/MSI 5 dans la plante.

Les fonctions respectives des gènes *MSI 1* et *MSI 4/MSI 5* ont pu être caractérisée principalement grâce à la génétique inverse.

Chez *Arabidopsis*, le gène *MSI 1* semble être le membre fondateur de cette famille. La protéine MSI 1 est l'une des quatre sous-unité du complexe Polycomb PRC2, encore appelé complexe FIS, impliqué dans le contrôle de la gamétogenèse et du développement embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana* (Köhler et al., 2003). Une inactivation du gène *MSI 1* par mutation conduit à l'arrêt du développement de l'embryon à un stade cœur. De plus, un phénotype parthénogénétique a été associé au mutant nul *msi1*. Ce phénotype se définit par le développement de l'albumen, voire d'une structure similaire à un embryon, sans pollinisation.

L'inactivation incomplète du gène *MSI 1* par co-suppression a permis d'étudier le rôle du gène *MSI 1* dans les tissus sporophytiques (Hennig et al., 2003). De nombreux aspects du

développement de la plante sont affectés dont la phyllotaxie et la forme des feuilles. A maturité, les hampes florales sont courtes et l'aspect général est touffu. Les fleurs perdent progressivement leur morphologie normale. Le développement des ovules s'arrête conduisant à la stérilité de ces plantes. L'étude de plantes mutantes *msi1-1(-/-)* partiellement complémentées à l'aide d'une construction p35S::MSI1 a permis d'obtenir des plantes fertiles qui sont affectées dans la régulation de la floraison (Bouveret et al., 2006). Ces plantes fleurissent tardivement. Ce phénotype a permis de révéler le rôle de MSI 1 au niveau épigénétique dans le dépôt de marques activatrices de type H3K4me2 et l'acétylation en position H3K9 pour favoriser l'expression du gène SOC1. Plus récemment, le rôle de MSI 1 dans la régulation épigénétique du locus CO a également été démontré (Steinbach et Hennig, 2014). *MSI 1* est donc impliqué dans la régulation de la floraison en agissant sur deux voies d'intégration du signal de la floraison : la voie autonome et la voie de la photopériode.

Les gènes *MSI 4* (ou *FVE*) et *MSI 5* participent également à la régulation de la floraison en intégrant le signal de floraison par la voie autonome mais indépendamment de *MSI 1*. En effet, les fonctions de *MSI 1* et *MSI4* ne sont pas redondantes puisque *MSI 4* et *MSI 5* sont impliqués dans le dépôt de marques répressives au niveau du locus *FLC* (Pazhouhandeh et al., 2011, Gu et al., 2011).

Pour appréhender la fonction des gènes *MSI 2* et *MSI 3*, j'ai identifié des mutants nuls dans les collections de mutants d'insertion. L'analyse des plantes ne révèle aucun phénotype en corrélation avec les phénotypes décrits pour les mutants knock-out *msi1* ou *msi4/msi5*. J'ai testé la redondance fonctionnelle des deux gènes en générant le double mutant *msi2/msi3*. L'absence d'expression des 2 gènes *MSI 2* et *MSI 3* n'affecte ni le développement de la plante, ni la floraison pour des plantes testées en condition de culture dite « jours courts » ou « jours longs ». L'ensemble de ces observations indique que les gènes *MSI 2* et *MSI 3* n'ont aucune redondance fonctionnelle avec les gènes *MSI 1* et *MSI 4/MSI 5*.

Il est à noter cependant, que la perte d'expression du gène *MSI 3* entraîne un retard de croissance c.à.d des feuilles de rosette qui ont une surface inférieure au contrôle lorsque les plantes sont cultivées en condition standard de culture (16h jour/ 8h nuit). Curieusement ce phénotype n'est pas exacerbé lorsque l'expression du gène homologue *MSI 2* est également invalidée dans la même plante.

Le phénotype du mutant *msi3* ainsi qu'une expression plus forte dans les tissus en division suggère un rôle du gène dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, la prolifération cellulaire et l'élongation cellulaire sont deux phénomènes qui participent à la croissance des feuilles de rosette. Toutefois ce retard de croissance des feuilles est compensé. On peut donc émettre l'hypothèse qu'un phénomène de compensation par élongation cellulaire se met en place. Un tel phénomène a été maintes fois décrit pour des gènes régulateurs du cycle cellulaire (Tsukaya, 2003). Afin d'étayer cette hypothèse, il est important de réaliser des mesures de plusieurs paramètres. Pour cela il faudra mesurer la surface des feuilles de rosette au cours du temps, évaluer le nombre ainsi que la taille des cellules. Enfin il faudra suivre le degré de ploïdie au cours du temps puisque la différenciation des cellules de la feuille implique une augmentation de la taille des cellules et l'endoreduplication. L'ensemble de ces paramètres permettra de conclure sur le phénomène réellement affecté dans le mutant *msi3* : la prolifération des cellules ou l'élongation des cellules.

L'absence de phénotype fort en observant le double mutant *msi2/msi3* pourrait s'expliquer par une possible complémentation de la perte de fonction des gènes de ce clade par les autres membres de la famille. Une telle hypothèse peut être envisagée d'après les profils d'expression des 5 gènes de la famille MSI qui ont été établis d'après les données de microarray. La **Figure 20** montre effectivement un profil très similaire aux 5 gènes. C'est la raison pour laquelle j'ai commencé à introgresser les différentes lignées de mutants ciblant les gènes *MSI 2*, *MSI 3*, *MSI 4* et *MSI 5*. L'obtention des quadruples mutants *msi2msi3msi4msi5* est en cours et leur analyse sera facilitée grâce au fond génétique Col-0 commun à tous les mutants sélectionnés dans mon étude. Une telle combinaison d'allèles mutés devrait nous indiquer la part de redondance de la combinaison *msi4/msi5* par rapport à la combinaison *msi2msi3* si toutefois un tel mutant est viable. A plus long terme, on peut aussi envisager de générer des triples mutants touchant les 3 clades qui forment la famille MSI (**Figure 19A**), *msi1msi2msi4* et *msi1msi3msi5*.

Basé sur les données actuelles, il semble qu'il existe une spécialisation des fonctions assurées par les 3 clades des protéines MSI chez *Arabidopsis*. Toutefois malgré des profils d'expression assez similaires, nous ne pouvons exclure la possibilité d'une certaine redondance entre ces 3 clades. Ainsi, il se pourrait que ce soit plutôt le niveau d'expression et/ou l'expression dans un type cellulaire particulier qui déterminerait la fonction des

différentes protéines MSI. Afin de tester définitivement cette hypothèse, j'ai également initié des expériences de « promoter swapping ». Pour cela, j'ai créé des constructions qui permettront d'exprimer les séquences codantes MSI2 (ou MSI3) sous contrôle du promoteur MSI 1 ou MSI 4 (**Figure 46**) et de réaliser la transformation des mutants correspondants *msi1* ou *msi4*. Cette expérience permettra de tester l'interchangeabilité des protéines MSI des 3 clades. Des expériences de ce type avaient déjà été réalisées en utilisant le promoteur constitutif 35S du CaMV pour exprimer la séquence codante MSI 1 en vue de compléter le mutant *msi4* (Bouveret et al., 2006). Les plantes obtenues n'ont pas permis de valider une complémentation fonctionnelle puisque le phénotype de retard de la floraison n'était pas compensé.



Figure 46 : Constructions générées pour les expériences de « promoter swapping ».

Les séquences codantes de MSI 2 (ou MSI 3) sont placées sous le contrôle des séquences promotrices des gènes *MSI 1* ou *MSI 4*. Les mutants *msi1-1* (-/+) ou *msi4* (-/-) seront transformés respectivement avec ces constructions.

3. Les protéines MSI sont-elles capables de réguler différents mécanismes de modification de la structure chromatinienne ?

En parallèle de l'étude menée par génétique inverse, j'ai également essayé d'identifier les partenaires des protéines MSI 2, MSI 3 et MSI 4. En considérant les MSI comme des récepteurs de substrats, une telle démarche permettrait l'identification des substrats recrutés par les MSI et leur identité pourrait nous renseigner sur la fonction assurée par ces gènes MSI dans la plante. Pour cela, j'ai mis en œuvre deux stratégies communément utilisées : le crible d'une banque d'ADNc par double hybride en levure et la purification de complexe par affinité en utilisant la technique de « Tandem Affinity Purification » à l'aide de culture de cellules d'*Arabidopsis* transgéniques.

Pour la technique du double hybride, j'ai utilisé deux banques d'ADNc représentatives l'une du développement végétatif des feuilles de rosette et l'autre du développement des fleurs. L'analyse du signal de fluorescence dans les plantes transgéniques pMSI2::MSI2 - eYFP et pMSI3::MSI3-eYFP indique que les gènes s'expriment fortement dans les jeunes feuilles et les données de transcriptomique indiquent que tous les gènes MSI ont des pics d'expression dans les méristèmes d'inflorescence et également dans les boutons floraux jusqu'au stade 10 au moins. D'après ces données, les deux banques d'ADNc utilisées devraient permettre d'identifier les partenaires des gènes MSI2 et MSI3. Parmi le faible nombre d'interactants ainsi mis en évidence, je ne garde comme candidats sérieux que les gènes codant pour les protéines à domaine PHD ou « Plant Homeodomain » finger. Il se trouve que les 2 gènes (At5g22760 et At5g35210) identifiés par le crible correspondent au membre d'un même clade dans cette grande famille des protéines à domaine PHD finger chez *Arabidopsis* (Lee et al., 2009). D'autre part, il faut noter que ces mêmes protéines ont été également identifiées par TAP-tag. Cette double identification par 2 stratégies distinctes prouve qu'il ne s'agit pas d'interaction faussement positive.

La stratégie TAP-tag a été menée en réalisant les fusions du côté N-terminal des protéines MSI3 et MSI4. J'ai choisi cette fusion amino-terminale car nous disposions déjà d'informations au laboratoire démontrant que la présence d'un tag n'entravait pas la fonction de la protéine MSI4. Pour MSI3, les résultats de la purification par affinité ont permis d'identifier deux types de partenaires : les deux protéines PHD finger déjà citées précédemment et les protéines CHR11 et 17 pour « Chromatin-remodeling protein 11 ou 17 ». Dans les deux cas, les protéines ou la famille à laquelle elles appartiennent, sont reconnues pour assurer une fonction au niveau chromatinien dans la régulation de l'expression génique.

Le domaine PHD finger correspond à la séquence C4HC3 qui forme une structure en doigt de zinc à ne pas confondre avec le domaine RING de type C3HC4 caractéristique des E3 ligases. Dans les modèles levures et animaux, cette famille de protéines est appelée ING2 sur la base de la protéine « Inhibitor of Growth 2 ». Les protéines qui contiennent ce motif PHD sont capables de se fixer sur les marques activatrices H3K4me2 et H3K4me3 (Mellor, 2006). L'analyse bioinformatique a permis d'identifier 83 protéines avec ce motif C3HC4 dans les bases de données du protéome d'*Arabidopsis*. Ces homologues des protéines ING2 ont été appelés AtING. Une deuxième famille spécifique aux plantes a été appelée AL pour

Alfin-like. Les deux gènes At5g22760 et At5g35210 identifiés appartiennent à la famille AtING. A l'heure actuelle, aucune étude concernant leur fonction n'est disponible. Quelques membres des familles AtING et AL ont été testés pour leur capacité de liaison aux histones H3. Les résultats expérimentaux ont permis de montrer que les protéines se lient uniquement aux formes H3K4me2 et H3K4me3 et non à la forme H3K4me (Lee et al., 2009). Les marques reconnues par les protéines PHD sur les nucléosomes sont des marques spécifiques aux zones de la chromatine active notamment dans les régions promotrices et les séquences 5'UTR des gènes qui sont exprimés. Cette famille de protéines à motif PHD sert d'effecteur pour cette marque activatrice et permet le recrutement d'autres protéines sur la chromatine.

Pour MSI 3, l'expérience de TAP-tag a permis d'identifier deux autres protéines appartenant à la famille des complexes de remodelage de la chromatine appelée « CHromatin Remodeling factors » : CHR11 et CHR17. Les protéines CHR11 ou 17 sont impliquées dans le contrôle de nombreux processus du développement : la gamétogenèse femelle (Huanca-Mamani et al., 2005), la floraison (Li et al., 2012) et le développement des fleurs (Smaczniak et al, 2012). De manière générale, les complexes de remodelage de la chromatine hydrolysent l'ATP via leur sous-unité catalytique à activité ATPase, et au moyen de l'énergie libérée, provoquent un déplacement nucléosomal suite à la modification physique de la structure chromatinienne par torsion de l'ADN. Le déplacement des nucléosomes permet ou restreint l'accès à des régions de régulation transcriptionnelle (Kingston et Narlikar, 1999 ; Narlikar et al., 2002). Les complexes de remodelage de la chromatine sont classés en 3 familles selon l'homologie de séquence de leur sous-unité catalytique (Längst et Becker, 2004). Les protéines CHR11 et CHR17 appartiennent à la famille ISWI (imitation of switch ; Huanca-Mamani, 2005). Les complexes ISWI semblent être capables de faire glisser les octamères d'histones le long de l'ADN, relocalisant ainsi les nucléosomes sans toutefois créer de forme altérée stable.

Après avoir identifié les protéines capables d'interagir avec MSI 3, il va falloir tout d'abord confirmer ces interactions. Il faudra également établir d'une part le rôle de cette interaction *in planta* et d'autre part si ces protéines sont régulées par un complexe CRL4^{MSI3}.

Les protéines identifiées impliquent un rôle dans la régulation de l'expression génique. Il s'agit donc d'identifier les cibles au niveau du génome. Pour répondre à cette question, nous envisageons de réaliser des comparaisons des profils d'expression entre les plantes contrôles Col-0 et les mutants *msi3* et *msi2/msi3* non plus à l'échelle de gènes ciblés comme je l'ai

présenté dans mon mémoire mais en analysant les modifications de l'expression génique à l'échelle du génome entier grâce à des techniques de type « microarray » ou « RNA seq ». Une autre manière d'établir un lien entre les protéines MSI3 avec les cibles sur la chromatine sera l'utilisation des lignées pMSI2::MSI2-eYFP et pMSI3::MSI3-eYFP en vue de réaliser des expériences de « ChIP on chip » ou de « ChIP seq ». Ce travail sera réalisé en utilisant de très jeunes plantules ou des pointes de racine puisque l'expression du gène *MSI 3* est plus importante dans les cellules qui cyclent.

Le lien entre les protéines MSI et les histones n'est plus à démontrer. Dans le modèle animal et la levure, l'interaction des protéines MSI avec les histones H3 ou le dimère H3-H4 a été publié (Murzina et al., 2008). En ce sens, l'interaction de MSI4 d'*Arabidopsis* avec l'histone H4 dans l'expérience TAP-tag est un bon indicateur pour valider les interactions ainsi identifiées. Les protéines MSI font également partie de nombreux complexes dont certains agissent au niveau de la chromatine : MSI1 interagit avec la protéine RBR1 (Retinoblastoma-related protein), MSI1 fait partie du complexe CAF1 (Chromatin Assembly Complex), MSI1 fait partie du complexe Polycomb PRC2. Enfin, chez la drosophile, MSI1 (p55) fait partie d'un complexe de remodelage de la chromatine, appelé NURF et chez l'homme MSI1 (pRbAp48) fait partie du complexe de remodelage de la chromatine, appelé NuRD (Hennig et al., 2005). Dans certains cas, la protéine MSI n'est pas forcément impliquée dans la fonction même du complexe mais elle semble plus nécessaire au recrutement du complexe sur les nucléosomes grâce à son affinité pour les histones. Une telle éventualité est envisageable dans le cas des protéines PHD et CHR identifiées comme partenaire des protéines MSI 3.

Le dernier volet de ce paragraphe est dédié aux protéines capables d'interagir avec la protéine MSI 4 dans ces cultures de cellules d'*Arabidopsis*. Pour réaliser des expériences de TAP-tag nous n'avons pas choisi les protéines MSI2 et MSI3 du même clade mais nous avons préféré étendre l'étude par cette technique à un représentant d'un autre clade, à savoir MSI 4. Le nombre de protéines purifiées par affinité est plus large que dans le cas de MSI 3. En majorité, les partenaires de MSI 4 ainsi révélés possèdent des domaines protéiques décrits pour participer à la dynamique de la chromatine. L'identification des protéines histones H4 et de l'histone déacétylase HDA6 sont de bons indicateurs de la fiabilité des résultats. En effet, l'équipe de Gu en 2011 avait déjà publié l'interaction de MSI4/FVE avec HDA6. Le travail

de cette équipe a démontré que MSI 4 en s'associant à HDA6 forme un complexe HDAC capable d'interagir directement avec les loci ciblés dont notamment le locus FLC. La déacétylation des histones génère des marques répressives et entraîne le « silencing » transcriptionnel. Ce complexe HDAC génère des zones de chromatine inactive au niveau des loci ciblés par les petits ARN (siRNA et asRNA) grâce à la voie RdDM (siRNA-directed DNA Methylation). Parmi les autres protéines identifiées, on retrouve AL4, une protéine à domaine PDH de la famille AL. Il a été montré récemment que les protéines AL1,2,5,6 et 7 sont capables d'interagir avec le complexe Polycomb PRC1 via les sous-unités AtRING1a et AtBIM1b (Molitor et al., 2014). Finalement, nous avons également identifié des protéines appartenant à la Famille TUDOR capable de se lier aux formes méthylées des histones (H4K20me1 , H3K36me3 par exemple) ainsi qu'une protéine de la famille SWIB/MDM2 dont le domaine SWIB indique un lien avec les complexes de remodelage de la chromatine. La majorité des protéines identifiées par cette étude n'ont pas encore de rôle assigné dans le modèle végétal *Arabidopsis*. Leur étude est d'autant plus complexe que chaque protéine identifiée appartient en fait à une famille multigénique comptant entre 5 à 10 membres.

Pour toutes les protéines identifiées sur leur capacité de se lier *in vivo* avec MSI 4, il va falloir tout d'abord confirmer ces interactions. Pour confirmer certaines interactions, je dispose de plantes transgéniques exprimant des protéines CLF ou SWN ou HDA6 exprimées en fusion avec une étiquette. A l'aide de co-IP réalisée sur ces plantes, je pourrai visualiser la présence spécifique de la protéine MSI 4 dans les complexes HDAC (Gu et al., 2011) et également PRC2 (Pazhouhandeh et al., 2011). Pour chaque interactant de MSI4, il faudra également établir d'une part le rôle de cette interaction *in planta* et d'autre part si ces protéines partenaires sont régulées par un complexe CRL4^{MSI4}.

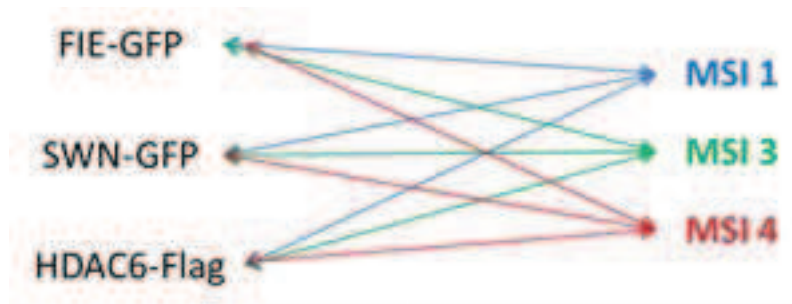


Schéma explicatif des différentes combinaisons de co-IP en vue de confirmer les interactions.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

1. Plantes et cultures cellulaires végétales

1.1 Arabidopsis thaliana

Des plantes sauvages de l'écotype Columbia ainsi que des lignées mutantes pour les gènes MSI1 (AT5G58230), MSI2 (AT2G16780), MSI3 (AT4G35050), MSI4 (AT2G19520) et MSI5 (AT4G29730), CHR11 (AT3G06400), CHR17 (AT5G18620), PHD1 (AT5G22760) et PHD2 (AT5G35210) ont été étudiées. Les mutants d'insertion ADN-T dans les gènes MSI1, MSI2, MSI3, MSI4, MSI5, CHR11, CHR17, PHD1 et PHD2 sont respectivement issus des lignées Sail_429B08, Gabi_710G06, SK_6519, Sail-1167-E05, Sail_567G01, Gabi 718H10, Gabi 835G01, Gabi_178C05, Gabi-422G03, Salk_000850.29.99 et Gabi_727G03. Les lignées Gabi proviennent de la banque Gabi-Kat, les lignées Sail de la banque de Syngenta et la lignée SK de la banque de Saskatoon.

Les plantes ont été cultivées dans les serres ou logettes de l'IBMP en suivant deux conditions :

- Photopériode 16h/8h, température 21/18°C, 80% humidité pour une culture en jours longs.
- Photopériode 8h/16h, température 21/18°C, 80% humidité pour une culture en jours courts.

1.2 Culture in vitro d'Arabidopsis thaliana

Les graines sont tout d'abord stérilisées puis mises en culture sur boîte de Pétri contenant du milieu Mursashige et Skoog (MS) supplémenté, si nécessaire, avec un (ou des) antibiotique(s) pour la sélection de lignées transgéniques. Après une étape de vernalisation de 2 jours à 4°C et à l'obscurité, les boîtes sont placées en chambre de culture en suivant les conditions suivantes : photopériode 16h/8h, température 21/17°C.

1.3 Nicotiana benthamiana

Les expériences d'expression transitoire ont été réalisées sur des feuilles de *N.benthamiana* âgées de 3 semaines environ. Les plants de tabac ont été cultivés dans les serres de l'IBMP en suivant les conditions de culture suivantes : photopériode 16h/8h, température 21/17°C.

1.4 Milieux, antibiotiques et méthode de stérilisation

Milieu MS :	Sigma M5519 et préparé dans du tampon MES 0,5g/L, 10g/L de sucrose, pH 5,7. Pour un milieu solide : 8g/L (Agar Sigma) pour culture horizontale, 12g/L (Agar Sigma) pour culture verticale ; autoclave 121°C, 20 min.
Antibiotiques :	Kanamycine 50 µg/mL, Hygromycine 15 µg/mL, Basta 10 µg/mL, Sulfadiazine 10µg/mL, Carbenicilline 100 µg/mL, Céfotaxime 250 µg/mL.
Stérilisation des graines :	Traitement à l'alcool 70% additionné de Triton X-100 0,1% pendant 10 min, puis rinçage à l'alcool 70% puis à l'alcool 100%. Séchage sous hotte à flux laminaire.

2. Micro-organismes

2.1 Souches d'Escherichia coli utilisées pour le clonage

DB3.1(Invitrogen) :	3. <i>F</i> – <i>gyrA462 endA1 Δ(sr1-recA) mcrB mrr hsdS20(rB–, mB–) supE44 ara-14 galK2 lacY1 proA2 rpsL20(SmR) xyl-5 λ– leu mtl1</i>
TOP10 (Invitrogen) :	4. <i>F</i> – <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) (φ80lacZΔM15) ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ–.</i>

La souche DB3.1 est utilisée pour l'amplification des plasmides de type Gateway® contenant le gène *ccdB* qui code pour une protéine qui interfère avec la gyrase de la bactérie. Cette souche contient l'allèle *gyr462*, ce qui lui permet de résister aux effets toxiques du gène *ccdB*. La souche TOP10 est porteuse d'une mutation dans le gène codant pour la recombinaison *recA*. L'enzyme mutée n'est plus fonctionnelle, ce qui réduit les

Matériel et Méthodes

risques de recombinaison entre le plasmide codé et l'ADN bactérien. Cette souche a été utilisée pour l'ensemble des clonages utilisant la technologie Gateway®.

2.2 Souche d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisée pour la transformation de matériel végétal et infiltration pour expression transitoire.

Chromosomal		Ti plasmid		Opine
Background	Marker gene		Marker gene	
C58	Rif	pMP90 (pTiC58ΔT-DNA)	Kan	Nopaline

GV3101::PM90RK :

Cette souche est utilisée pour les agroinfiltrations et les transformations d'*Arabidopsis thaliana* par « floral dip ». Elle porte le plasmide Ti désarmée par pMP90 portant les gènes Vir nécessaires au transfert du T-DNA dans le génome végétal. Elle est résistante à la gentamycine (plasmide Ti pMP90) et la rifampicine (résistance chromosomique)

2.3 Souche utilisée pour la production de protéines.

Rosetta 2 (DE3) pLysS : F^- ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) pLysSRARE2 (Cam^R)

Cette souche est dérivée de la souche BL21. L'expression de la protéine est possible grâce à la séquence codante pour la T7 ARN polymérase sous la dépendance d'un promoteur contenant une séquence *lacUV5* et par induction à l'IPTG. Elle exprime une lysozyme T7 qui supprime l'activité basale de la T7 ARN polymérase, nécessaire à l'induction, ce qui stabilise le pET recombinants codant pour des protéines cibles affectant la croissance cellulaire et la viabilité.

2.4 Souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées pour le test double hybride.

Matériel et Méthodes

AH109 :

MAT α , *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* ,
gal80 Δ , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-*
GAL2_{TATA}-ADE2, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*.

pJ69-4A:

MAT α , *trp1-901*, *leu2-3*, *112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* ,
gal80 Δ , *GAL-ADE2*, *lys2::GAL1-HIS3*, *met2::GAL7*, *LacZ*

Ces souches ont été utilisées pour les tests d'interaction en double hybride sur les milieux sélectifs –LW, -LWH et –LWA.

2.5 Milieux et antibiotiques.

Les souches bactériennes utilisées pour la transformation de matériel végétal et le clonage ont été cultivées dans du milieu LB (Luria Bertani) supplémenté d'antibiotiques adéquats. Les souches d'*Escherichia coli*, d'*Agrobacterium tumefaciens* et de *Saccharomyces cerevisiae* ont été respectivement cultivées à 37°C, 28°C et 30°C, et sous agitation pour les cultures liquides.

Milieu LB :

Bactotryptone 10 g, Bacto yeast extract 5 g, NaCl 10 g,
H₂O qsp 1 L pH entre 7,2 et 7,5. Ajout d'agar pour milieu solide.

Milieu YPD :

Difco peptone 20 g, Bacto yeast extract 10 g, H₂O qsp 1 L
pH 6.5. Ajout d'agar pour milieu solide.

Milieu SD :

Bacto yeast nitrogen base sans acides aminés 6.7 g, H₂O
qsp 1 L pH 5.8. Ajout d'agar pour milieu solide.

Antibiotiques :

Ampicilline : 100 µg/mL ; Chloramphénicol : 30 µg/mL ;
Gentamycine : 100 µg/mL ; Hygromycin B : 30 µg/mL ;
Kanamycine : 50 µg/mL ; Rifampicine : 20 µg/mL ;
Spectinomycine : 100 µg/mL ; Streptomycine Sulfate : 10
µg/ml ; Zéocine : 50 µg

3. Vecteurs

3.1 Vecteur de clonage



Ce vecteur d'entrée est utilisé pour la première étape de clonage Gateway®, appelées réaction BP. Le pDONR221 confère la résistance à la kanamycine ou à la zéocine aux bactéries transformées.

3.2 Vecteurs d'expression

pB7FWG2



Permet de cloner un fragment en N-terminal de la GFP. Il confère la résistance à la spectinomycine aux bactéries et au glufosinate aux plantes.

pB7WGF2



Permet de cloner un fragment en C-terminal de la GFP. Il confère la résistance à la spectinomycine aux bactéries et au glufosinate aux plantes.

Matériel et Méthodes

**pB7RWG2 /
pH7RWG2**



Permet de cloner un fragment en N-terminal de la RFP. Il confère la résistance à la spectinomycine aux bactéries et au glufosinate (B) ou hygromycine (H) aux plantes.

pB2GW7



Permet de cloner un fragment sous un promoteur fort et constitutif 35S. Il confère la résistance à la spectinomycine aux bactéries et au glufosinate aux plantes.

pGWB640



Permet de cloner la construction génomique d'un gène et de la fusionnée à la eYFP. Il confère la résistance à la spectinomycine aux bactéries et au glufosinate aux plantes.

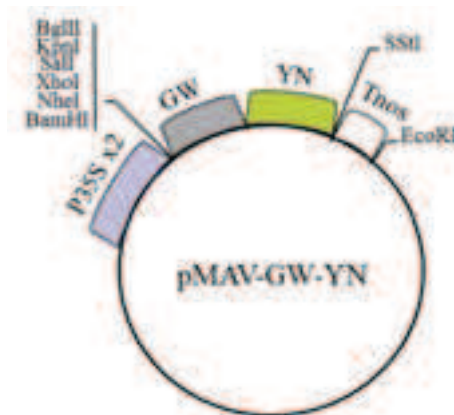
pGWB633



Matériel et Méthodes

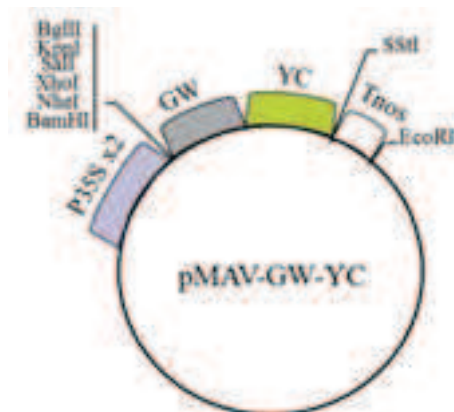
Permet de cloner le promoteur d'un gène et de le fusionner au gène rapporteur GUS. Il confère la résistance à la spectinomycine aux bactéries et au glufosinate aux plantes.

pMAV-GW-YN



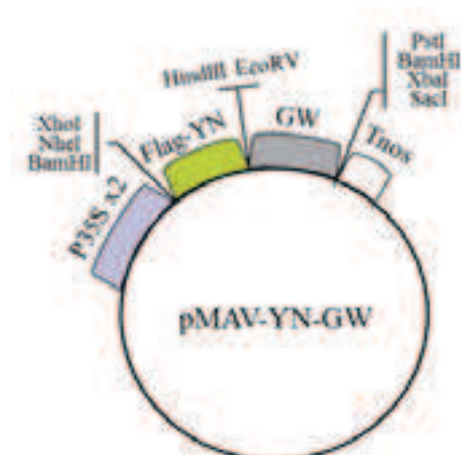
Permet de cloner la partie N-terminale de la YFP en C-terminale d'une protéine d'intérêt.

pMAV-GW-YC



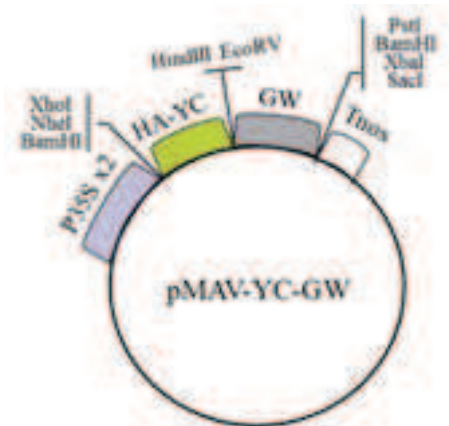
Permet de cloner la partie C-terminale de la YFP en C-terminale d'une protéine d'intérêt.

pMAV-YN-GW



Permet de cloner la partie N-terminale de la YFP en N-terminale d'une protéine d'intérêt.

pMAV-YC-GW



Permet de cloner la partie C-terminale de la YFP en N-terminale d’une protéine d’intérêt.

pHGWA



Permet d’exprimer une protéine en fusion avec le tag HIS en C-terminale.

pHMGWA



Permet d’exprimer une protéine en fusion avec le tag MBP en C-terminale

4. Les anticorps anti-MSI3 et anti-MSI4

Ces anticorps polyclonaux ont été produit chez le lapin à partir des protéines MSI3 et MSI4, fusionnée à un tag 6xHis respectivement, produites en système bactérien. Chaque protéine a servi à immuniser deux lapins sur la plateforme de production d'anticorps de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire à Illkirch / Strasbourg. La purification des différents anticorps polyclonaux s'est faite à l'aide de colonnes d'affinité avec la protéine native fixée sur une résine HIS Trap NHS-activated de 1 ml (GE Healthcare). pour MSI3 et MSI4. La purification a été effectuée selon les instructions du fabricant.

II. Méthodes

1. Techniques relatives aux plantes

1.1. Analyse des extraits d'ADN d'*Arabidopsis thaliana*

1.1.1. Le géotypage par PCR

1.1.1.1 Extraction d'ADN génomique

Pour la préparation d'ADN, des échantillons de plantules d'*Arabidopsis* sont placés dans une plaque 96 puits contenant une bille métallique (diamètre 1mm) et 300 µl de tampon Edwards. Le tout est broyé à l'aide d'un Tissue Lyser. L'ADN est précipité puis dissout dans 100 µL d'H₂O_d selon le protocole d'Edwards et al. (1991, NAR 19:1349).

Tampon Edward's : 200 mM Tris HCL pH 7,5, 250 mM NaCL, 25 mM EDTA, 0,5% SDS.

1.1.1.2 La PCR : Polymerase Chain Reaction

Cette technique permet l'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN de manière exponentielle grâce à l'utilisation de l'ADN Polymérase thermostable isolée de *Thermus aquaticus* (Taq). Elle nécessite l'utilisation de deux amorces oligodésoxyribonucléotidiques

Matériel et Méthodes

spécifiques à la séquence à amplifier. Elle permet aussi d'ajouter aux extrémités de cette séquence des sites de recombinaison (ou de restriction) indispensables aux clonages. Cette réaction se déroule généralement en 35 cycles comportant une étape de dénaturation de la matrice d'ADN (95°C ou 98°C, 30sec suivant la Taq employée), une étape d'hybridation des amorces avec les brins matrices (30sec, température définie selon la température de fusion des deux amorces (T_m)), suivie d'une étape d'élongation des amorces (72°C, la durée varie en fonction de la taille du fragment à amplifier).

Les PCR de contrôle et de génotypage ont été effectuées soit avec la Taq Polymérase Phire (Thermo) soit avec la Taq produite à l'Institut. Toutes les PCR pour amplification avant clonage ont été réalisées avec la Taq Phusion Master Mix (FinnZymes).

Conditions générales de PCR :

	Phire (20µL réactionnel)	Taq Maison (20 µL réactionnel)	Phusion Master Mix (30 µL réactionnel)
Matrice d'ADN	1 µL	1 µL	0.3-1 µL
Oligo sens (10µM)	1 µL	0.5 µL	1 µL
Oligo anti-sens (10µM)	1 µL	0.5 µL	1 µL
dNTP (10mM)	0.4 µL	0.3 µL	Master mix 2x : 15µL
Tampon	x5 : 4 µL	x10 : 2 µL	
ADN polymérase	0.1 µL	0.5 µL	

Programmes de PCR

	Phire	Taq Maison	Phusion Master Mix
Dénaturation	30 sec à 98°C	5 min à 95°C	2 min à 98°C
Dénaturation	5 sec à 98°C	30 sec à 95°C	10 sec à 98°C
Hybridation	5 sec à $T_m + 5^\circ\text{C}$	30 sec à T_m	10 sec à $T_m + 3^\circ\text{C}$
Elongation	72°C, 30 sec par kb	72°C, 1 min par kb	72°C, 1 min par kb

Elongation finale
5 min à 72°C

Les analyses de l'ADN amplifié s'effectuent après séparation des fragments d'ADN par migration sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium, dans un tampon TAE.

Tampon TAE : Tris-Acétate 40 mM, EDTA 0,1 mM

*1.2 Analyse des extraits d'ARN d'*Arabidopsis thaliana**

1.2.1 La RT-qPCR

1.2.1.1 Extraction des ARN végétaux totaux

Environ 100 mg de plantes sont introduits dans un tube Eppendorf de type « safe Lock » contenant des billes de verres 0,5 mm puis congelés dans de l'azote liquide et broyés en fine poudre dans le broyeur Silamat. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy de QIAGEN en suivant les indications du fabricant. La concentration en ARN est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité de DO équivaut à 40 µg/mL d'ARN) à l'aide d'un Nanodrop.

1.2.1.2 La RT-PCR

2µg d'ARN totaux sont directement utilisés pour la réaction de rétrotranscription (RT). Cette réaction s'effectue en présence d'un mélange d'hexamères et d'oligo-dT dans un volume réactionnel final de 50 µL contenant 5 µL de tampon de réaction, 2 µL de dNTP mix (100 mM), 5 µL de Random Primers, 40 unités de RNaseOUT et 250 unités de MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems). Les tubes sont alors placés à 25°C pendant 10 minutes, puis 37°C pendant 2h. La réaction est inactivée à 85°C pendant 5 secondes.

1.2.1.3 La qPCR

Après rétrotranscription des ARN, la PCR qui suit utilise des amorces de gènes spécifiques dans un volume réactionnel total de 10 µL de « SYBR Green Master Mix » (Roche). La réaction s'effectue avec l'appareil « LightCycler LC480 » (Roche) toujours selon les instructions du fabricant. La valeur moyenne de trois répliquas est normalisée par rapport aux gènes ACTIN2 (AT3G18780) et GAPDH (AT3G26650).

1.3 Analyse des extraits protéiques d'*Arabidopsis thaliana*

1.3.1 « Western blot »

1.3.1.1 Extraction des protéines totales végétales

La poudre des échantillons est préparée à l'aide du broyeur Silamat® S5 comme décrit précédemment. Les protéines totales sont extraites en présence d'un tampon dénaturant. Après une étape de dénaturation de 5 min à 95°C suivie d'une centrifugation de 15 min à 16000 x g permettant la sédimentation des débris cellulaire, une fraction aliquote du surnageant, constituant l'extrait protéique, est utilisée pour déterminer la concentration du l'extrait par dosage à l'Amidoblack. Cette méthode de dosage est basée sur la précipitation des protéines dans du méthanol en milieu acide et leurs coloration à l'Amidoblack. 190 µL d'eau sont donc ajoutés à 10 µL d'extraits protéiques complétés par 1 mL d'Amidoblack. Après agitation, le tout est centrifugé 10 min à 16000 x g. Le culot de protéines précipitées est lavé avec une solution de lavage puis dissout dans une solution de NaOH 0,2 M. l'absorbance est déterminée à 595nm. La concentration est calculée à partir d'une gamme étalon établie avec de la BSA (« Albumine de Sérum Bovin »).

**Tampon d'extraction
dénaturant pH 6.8 :**

Tris-base 62.5 mM, SDS 3% (p/v), β-mercaptoéthanol 3% (v/v), Glycérol 10% (v/v), Bleu de bromophénol 0,05% (p/v)

Solution d'Amidoblack :

Acide acétique 10% (v/v), Méthanol 90% (v/v), Amidoblack 0.05 % (p/v)

Solution de lavage :

Acide acétique 10% (v/v), Ethanol 90% (v/v)

1.3.1.2 Séparation et détection des protéines en SDS-PAGE

Les gels sont préparés selon Sambrook et al. 1989 avec le système Mini-Protean III (BioRad). Le gel de résolution est préparé avec une concentration d'acrylamide permettant une séparation optimale des protéines d'intérêt. Le gel de concentration est coulé au-dessus. Après dépôt des échantillons, l'électrophorèse se fait à 140V dans un tampon Tris-Glycine jusqu'à obtenir la séparation désirée. Après la migration, le gel est lavé 3 min dans le tampon de transfert puis placé en contact d'une membrane en PVDF (« PolyFluorure De Vinyldène ») Immobilon-P (Millipore) dans un système d'électrotransfert (« Mini Trans – Blot Cell » de

BioRad). Un courant de 270 mA est appliqué durant 2h afin de transférer les protéines du gel sur la membrane. La membrane est rincée 5 min dans du T-TBS 1x puis mise à saturer dans le tampon lait 5% 1h minimum à température ambiante. Elle est ensuite mise en contact avec les anticorps primaires et mise à incuber 2h à température ambiante ou overnight à 4°C. La membrane est lavée 1 fois 10 min dans du tampon lait puis mise en présence des anticorps secondaires pour un temps d'incubation de 45 min minimum. Cette étape n'est pas nécessaire si l'anticorps primaire utilisé est un anticorps couplé HRP. Un lavage de 10 min dans du tampon lait et deux lavages dans le T-TBS 1x précèdent la révélation. Celle-ci est effectuée par chimioluminescence, avec du Luminata Classico ou Forte Western HRP (Millipore).

Tampon de migration	Tris-base 25 mM, Glycine 250 mM, SDS 0.1%
Tris-Glycine :	
Tampon de transfert :	Tris-base 25 mM, Glycine 192 mM, Ethanol technique 15% (v/v)
T-TBS 1x :	Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1% (v/v)
Tampon 5% lait :	Tris-HCl pH 7,4 20 mM, NaCl 150 mM, Tween 20 0.1% (v/v), Lait en poudre écrémé 5% (p/v)

1.3.2 Chromatographie par gel filtration

12 g de culture cellulaire d'Arabidopsis sont broyés puis transférés dans un mortier, préalablement refroidi dans la glace, contenant du tampon d'extraction (p/2v) froid. L'échantillon est broyé à nouveau jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Celle-ci est ensuite transférée dans un tube Falcon de 50 mL et mis en chambre froide sous rotation constante pendant 1h minimum. La solution est ensuite centrifugée (30 min, 15 000 x g, 4°C), et le surnageant est filtré à travers une unité de filtration de 0,22 µm. Une fois filtrée, la solution est concentrée à l'aide d'AMICON 100K afin de réduire le volume de moitié. Pour l'analyse des fractions, la totalité de l'extrait est chargé sur une colonne de gel-filtration Sephacryl S-300 (HiPrep 26/60) Ge Healthcare. La colonne est préalablement équilibrée avec 500 mL de tampon d'extraction. Les protéines sont éluées dans le même tampon à un débit de 0,2 mL min⁻¹. Toute la procédure est réalisée à 4°C, et des fractions de 1 mL sont collectées. Celles-ci sont poolées par 5. 2,5 mL de chaque pool sont concentré par précipitation au TCA,

repris dans du Laemmli, chargé et séparé sur un gel SDS-PAGE, puis transféré sur membrane PVDF Immobilon. La membrane est mise en contact avec les anticorps spécifiques des partenaires des complexes recherchés. L'autre partie restante est utilisée pour une co-immunoprécipitation dont le protocole est décrit par la suite.

Tampon d'extraction : Tris-HCL 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Glycérol 10%,
MgCl₂ 5 mM, NP40 0.1%. extemporanément : DTT 2mM,
Anti-protéase sans EDTA, MG132 10μM

1.3.3 Co-Immunoprécipitation

Le matériel végétal exprimant une construction d'intérêt est collecté et congelé dans de l'azote liquide. Il est broyé puis transféré dans un mortier, préalablement refroidi dans la glace, contenant du tampon d'extraction (p/2v) froid (voir chapitre 3.2 Résultats). L'échantillon est broyé à nouveau jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Celle-ci est ensuite transférée dans un tube Eppendorf et mis en chambre froide sous rotation constante pendant 1H minimum. La solution est ensuite centrifugée (30 min, 13000 x g, 4°C) et le surnageant est récupéré et transféré dans un nouveau tube. 1/10ème de cet extrait protéique est prélevée pour servir de témoin d'extraction (INPUT). Le reste de l'extrait est incubé à 4°C avec des billes magnétiques MagnaPureProteome protein A ou G Millipore®, auxquelles l'anticorps d'intérêt a préalablement été fixé selon les instructions du fabricant.

Les billes couplées aux protéines immunocapturées sont lavées trois fois avec du tampon PBS, transférées dans un nouveau tube et resuspendues dans du tampon de charge Laemmli. Avant dépôt des échantillons sur un gel de polyacrylamide, les échantillons sont dénaturés 10 min à 95°C. Les échantillons sont séparés par électrophorèse avant leur transfert sur la membrane Immobilon-P. L'anticorps dirigé contre la construction d'intérêt est utilisé comme contrôle de l'immunoprécipitation, un anticorps dirigé contre le potentiel partenaire est utilisé pour la co-immunoprécipitation.

Tampon d'extraction EB : Tris-HCl pH 7,5 50 mM, NaCl 150 mM, Glycérol 10%,

Matériel et Méthodes

MgCl₂ 5 mM, NP40 0.1%. extemporanément : DTT 2mM,
Anti-protéase sans EDTA, MG132 10μM

Tampon PBS 10x :

NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄.2H₂O 10mM,
KH₂PO₄ 1,76 mM. pH 7,4

Tampon de charge Laemmli :

Tris-HCl pH 6,8 240 mM, SDS 8%, Glycérol 40%, β-
mercaptoéthanol 5%, Bleu de Bromophénol 0,01%

Compositions des tampons	EB	EB1	EB2	EB NP40 0,5%	EB NaCl 300 mM	CHAPS 1	CHAPS 2	CHAPS 3
Tris HCl pH 7,5	50 mM	50 mM		50 mM	50 mM	50 mM	50 mM	50 mM
Tampon phosphate pH 8			100 mM					
NaCl	150 mM	150 mM		150 mM	300 mM	150 mM	300 mM	150 mM
MgCl ₂	5 mM	10 mM		5 mM	5 mM	5 mM	5 mM	5 mM
NP 40	0,10%	0,10%		0,50%	0,10%			
CHAPS						1%	0,50%	0,10%
Triton X-100			1%					
Glycérol	10%	10%		10%	10%	10%	10%	10%
EDTA		2,5 mM						
PMSF		1 mM						
Cocktail inhibiteur protéase (n tablettes pour 10 mL)	1		1	1	1	1	1	1
O-phenanthroline hydrochloride monohydrate		2 mM						
MG132	10 μM			10 μM	10 μM	10 μM	10 μM	10 μM
DTT 2 mM	2 mM	1 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM

Composition des différents tampons testés pour les expériences de co-immunoprécipitation et de gel-filtration.

1.3.4 Extraction d'histones

Les histones sont extraites à partir de plantules entières âgées de 10 jours environ réduites en fine poudre dans de l'azote liquide. 3 à 5 mL de poudre sont dissous dans 10 mL de tampon de lyse froid, le tout est vortexé et placé sur une roue rotative pendant 20 min à 4°C. La solution est alors filtrée à travers des Nylon mesh 100μ, puis centrifugée (20 min, 4 000 rpm, 4 °C). Le culot est resuspendu dans 2 mL de tampon de lyse et transféré dans un tube de 2

Matériel et Méthodes

mL. La solution obtenue est alors centrifugée à nouveau (20 min, 4 000 rpm, 4°C). Le culot obtenu est resuspendu dans 150 à 400 µL de tampon Laemmli suivant la quantité de poudre de départ) puis vortexé et incubé 10 minutes à 95°C. Avant transfert du surnageant dans un nouveau tube, la solution est centrifugée (5 minutes, 12 000 rpm, RT). 10 µL sont chargés sur un gel gradient 4-20% puis transféré sur membrane PVDF Immobilon. Un contrôle de charge est effectué avec un anticorps anti-H3, dilué au 5 000ème, afin d'ajuster les quantités entre les différents échantillons.

Low Salt Wash buffer :	Pour 200 mL : 20 mL HEPES pH 7,5 0,5M, 6 mL NaCl 5M, 400 µL EDTA 500mM. Gardé à 4°C
Tampon de Lyse :	Pour 50 mL : 45 mL de Low Salt Wash Buffer, Triton X-100 500µL, Glycérol 5 mL, 20 µL β-mercaptoéthanol. Le tout sur glace, préparé fraîchement.

1.4 Techniques d'analyses microscopiques

1.4.1 Analyse des pointes racinaires par microscopie confocale

Pour l'analyse des lignées portant l'épitope YFP, les plantes sont mis en culture *in vitro* en position verticale. Les racines ainsi formées sont prélevées et placées directement entre lame et lamelle dans une solution aqueuse contenant 100 µg/mL de Iodure de propidium qui va permettre de marquer les membranes des cellules intègrent. Les échantillons sont observés avec un microscope confocal Zeiss LSM700 ou 780, en utilisant un laser argon excitant à 488 nm. La lumière est récupérée à travers un objectif « Plan Apochromat 40x » et filtrée avec un « Band Pass » 505-550nm.

1.4.2 Coloration GUS (β-glucuronidase)

Des plantules de 10 jours exprimant le promoteur MSI2 ou MSI3 sont fixées dans une solution d'acétone 80%. Après 30 minutes d'incubation sur glace, les plantules sont lavées 3 fois avec le tampon phosphate pH 7.2. Au dernier lavage, le tampon phosphate est remplacé par la solution de coloration et les échantillons sont infiltrés 10 min sous vide. La coloration se déroule à l'obscurité, à 37°C pendant toute une nuit. Elle est arrêtée par deux rinçages dans

du tampon phosphate puis les tissus sont décolorés dans des bains successifs d'éthanol 70% et 96% (v/v) de 10 min chacun. Les plantules sont ensuite placées entre lame et lamelle dans une solution de chlorale hydrate en vue de leur observation au microscope optique Nikon E800.

Tampon phosphate pH 7,2 Na_2HPO_4 68,4 mL 0,5M stock , NaH_2PO_4 31,6 mL 0,5M stock

Tampon de coloration GUS : Tampon phosphate 100mM pH 7,2, Triton X-100 0,1%, Ferricyanure de potassium 3mM, EDTA 5mM, X-Glucuronide 0,3 mg/mL

1.4.3 BiFC (« Bimolecular Fluorescence Complementation »)

La technique du BiFC a été utilisée pour mettre en évidence les interactions entre DDB1a et MSI2, 3 et 5. L'interaction déjà connue entre DDB1a et DDB2 a servi de contrôle positif à cette expérience. Les vecteurs « vides » YN et YC ainsi que les vecteurs renfermant le gène codant pour la protéine BPM3 (At2g39760) sont utilisés en tant que contrôle négatif. Les constructions YN-DDB1a, YC-DDB2, YC-MSI1, YC-BPM3, et les vecteurs YN- et YC-vides sont co-transformés avec le vecteur 35S-CPRF2-CFP qui exprime la CFP et permet d'identifier les cellules transformées. Au départ, des billes d'or sont enrobées de l'ADN des différents vecteurs selon le protocole décrit dans Holweg et al. 2004. Le bombardement des billes d'or enrobées permet la transformation des hypocotyles étiolés de moutarde ayant poussé trois jours à l'obscurité (Stolpe et al., 2005). Après bombardement, les échantillons sont incubés en logette pendant 20h, toujours à l'obscurité, et analysés par microscopie. Tous les noyaux transformés, qui contiennent les constructions désirées, émettent un signal bleu CFP. Au sein de ces mêmes noyaux, toute interaction positive se traduit également par un signal jaune YFP. Les images sont enregistrées grâce au stéréo-microscope fluorescent Nikon E800 équipé d'un objectif x40 à immersion et de filtres CFP- et YFP- spécifiques.

2. Techniques relatives aux bactéries

2.1 Préparation de bactéries TOP10 compétentes

Tout d'abord, la souche bactérienne est inoculée dans 5 mL de milieu LB et cultivée 16h à 37°C. Cette pré-culture est transférée dans 250 mL de milieu LB contenu dans un erlenmeyer de 1L. La croissance des cellules se déroule à 37°C sous forte agitation, jusqu'à une DO_{600nm} de 0,7 qui correspond à des cellules en fin de phase exponentielle de croissance. Les étapes qui suivent sont effectuées au froid avec du matériel stérile. La culture obtenue est centrifugée pendant 15 min à 5 000 x g, lavée une fois avec une solution de $CaCl_2$ 0,1 M, reprise ensuite dans 50 mL de cette même solution et incubée toute une nuit à 4°C. Puis, la culture est centrifugée et resuspendue dans 3 mL de tampon $CaCl_2$ 50 mM contenant 15% de glycérol. Cette solution bactérienne est aliquotée dans des tubes individuels, congelée dans de l'azote liquide et stockée à -80°C. Chaque aliquote de 50 μ L est utilisée pour une transformation. Les bactéries *E. coli* de souche TOP10 ainsi préparées peuvent être transformées par choc thermique.

2.2 Préparation d'agrobactéries GV3101 compétentes

Un volume de 50 mL de LB supplémenté avec 100 μ g/mL de Rifampicilline et 10 mM de $MgSO_4$ est inoculé avec une colonie d'agrobactérie GV3101 et cultivé overnight. La croissance des cellules se déroule à 28°C sous forte agitation. Les étapes qui suivent sont effectuées au froid avec du matériel stérile. La culture obtenue est centrifugée pendant 10 minutes à 5 500 rpm, reprise ensuite dans 20 mL d'eau stérile et recentrifugée. La solution est ainsi lavée une nouvelle fois et finalement resuspendue dans 500 μ L de glycérol 10%. Cette solution bactérienne est aliquotée dans des tubes individuels, congelée dans de l'azote liquide et stockée à -80°C. Chaque aliquote de 50 μ L est utilisée pour une transformation. Les agrobactéries ainsi préparées peuvent être transformées par électroporation.

2.3 Transformation des bactéries par choc thermique

Cette technique a été utilisée pour toutes les transformations bactériennes réalisées au cours de cette étude. Le vecteur d'intérêt purifié (100 ng) est ajouté au 50 μ L de bactéries compétentes. Le mélange est incubé 20 min dans la glace puis placé dans un bain-marie à 42°C pendant 45s avant d'être ré-incubé 2 min dans la glace. Après transformation, les bactéries sont placées une heure à 37°C dans 250 μ L de milieu LB. Au final, elles sont étalées

sur un milieu contenant l'antibiotique qui permet la sélection des bactéries renfermant le plasmide d'intérêt.

2.4 Transformation des bactéries par électroporation

Cette technique a été utilisée pour toutes les transformations d'agrobactéries réalisées au cours de cette étude. Le vecteur d'intérêt purifié est ajouté au 50 µL de bactéries compétentes. Le mélange est transféré dans une cuve d'électroporation préalablement refroidie. L'électroporation se fait grâce à un électroporateur réglé à 2,5 kV, 400 Ω, 25 µF, $\tau \pm 3,8$ ms. Après électroporation, les bactéries sont placées 1h à 28°C dans 1 mL de milieu LB. Au final elles sont étalées sur un milieu contenant de la rifampicilline, de la gentamycine et l'antibiotique qui permet la sélection des bactéries renfermant le plasmide d'intérêt.

2.5 Analyse des clones bactériens

Quelques colonies de bactéries issues de la transformation sont mises en culture dans 3 mL de milieu LB en présence de l'antibiotique de sélection. L'ADN plasmidique est isolé de chacune des cultures par la technique de lyse alcaline grâce au kit de purification des plasmides de Macherey Nagel, en suivant les instructions du fabricant. Les séquences des clones obtenus sont vérifiées par séquençage.

3. Techniques relatives aux levures

3.1 Transformation des levures par l'acétate de lithium

Une pré-culture de levures est réalisée à 30°C en inoculant la veille 50 mL de milieu YPD. 30 mL de cette pré-culture servent à inoculer 300 mL de milieu YPD. Lorsque la DO_{600nm} atteint 0,6, les levures sont centrifugées (5 min, 1 000 rpm, RT) et le culot est resuspendu dans 50 mL d'eau distillée puis centrifugé (5 min, 1 000 rpm, RT). Le culot est alors repris dans 1,5 mL de LiAc/TE 1X. Pour la réaction de transformation, 5 µL d'ADN de sperme de saumon préalablement bouilli et refroidi dans la glace sont mélangés à 100 µg de chaque plasmide d'intérêt et 600 µL de LiAc/TE/PEG4000. Ce mélange est ajouté à 100 µL de suspension de

levure préparée précédemment et le tout est homogénéisé au Vortex. 70 µL de DMSO sont ajoutés à cette préparation et mélangé délicatement par inversion. Le tout est placé dans une étuve à 42°C pendant 15 minutes puis rapidement refroidi dans la glace 1 à 2 minutes. Après centrifugation (5 sec, 14 000 rpm, RT), les culots de levures transformées sont repris dans 200 µL de TE et étalés sur milieu sélectif – L(Leucine)/W(Tryptophane). Les boîtes sont placées dans une étuve à 30°C pendant 2 jours.

Tampon LiAc/TE (10X) : LiOAc 1M, Tris-HCl pH 8 100mM, EDTA pH 7,5 10mM

Tampon LiAc/TE/PEG : Tampon LiAc/TE 1x, PEG4000 40% (p/v)

3.2 Test d'interaction en « double hybride »

Les levures sont transformées par les plasmides contenant les gènes codant pour les protéines dont on veut tester l'interaction. Le système utilisé est de type GAL4. Un plasmide porte la séquence de la protéine « appât » en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de la protéine GAL4. Le second plasmide porte la séquence codante de la protéine « proie » en fusion avec le domaine d'activation de GAL4. Si les deux protéines interagissent, elles vont reformer un facteur de transcription GAL4 fonctionnel et ainsi activer une série de gènes rapporteurs portés par la levure. Pour la souche AH 109, ces gènes sont *HIS3*, *ADE2*, *lacZ* et *MEL1*. Pour la souche PJ69-3α, ces gènes sont *HIS3*, *ADE2*, *lacZ* et *GAL7*.

Après la double transformation, les levures sont incubées 3 jours à 30°C sur milieu sélectif permettant la sélection des plasmides. Les nutriments permettant la mise en évidence d'une interaction ne sont pas présents dans le milieu. Ici, il s'agit des gènes rapporteurs *ADE2* qui rétablit l'autotrophie de la souche vis-à-vis de l'adénine et *HIS3*, qui fait de même pour l'histidine. Le milieu –L/W est donc utilisé pour identifier les doubles transformants tandis que les milieux –L/W/H ou –L/W/H/A permettent de tester les interactions. La différence entre ces milieux porte sur la stringence du test où la sélection sur –L/W/H/A requiert une interaction plus forte entre les protéines. Ce test est principalement qualitatif et son succès dépend de la croissance de la souche sur le milieu. Il arrive que certains plasmides présentent une activité d'auto-activation, dans ce cas, une concentration molaire croissante de 3-AT est ajoutée dans les milieux de sélection afin d'inhiber cette auto-activation. Ce test a été effectué sous forme de test en goutte. Dans ce cas, une dilution en cascade du clone dans de l'eau

stérile est réalisée en microplaque ELISA, puis une goutte de chaque dilution est déposée sur milieu sélectif à l'aide d'un répliqueur de plaque.

3.3 Crible double hybride

Après préparation des levures à l'acétate de lithium comme décrits dans le paragraphe 3.1, les levures sont co-transformées avec d'un côté l'appât (dans le vecteur pGBKT7) et de l'autre côté une banque (dans le vecteur pDADT7). Les banques sont issues Clontech, *Arabidopsis thaliana* MATCHMAKER cDNA library, FL4000AB et de ABRC, Horwitz and MA, *Arabidopsis thaliana*, cDNA library, CD4-30 (*ABRC and Fan, H.-Y., Y. Hu, M. Tudor, and H. Ma (1997) Specific interactions between the K domains of AG and AGLs, members of the MADS domain family of DNA binding proteins. Plant J. 12, 999-1010 in any publications*). Les cellules transformées sont incubées sur milieu SD-LTH avec une concentration optimale de 3-AT à 30°C et pour environ 13 jours. En parallèle, un contrôle de transformation est incubé avec 2 x 50 µL d'une dilution au 1 :100ème. La transformation s'effectue comme décrits dans le paragraphe 3.2. Après 13 jours d'incubation, les colonies sont transférées sur milieu SD-LTA pour une deuxième sélection. Une troisième sélection est effectuée en repiquant les colonies ayant poussées sur milieu SD-LTA après transfert sur milieu SD-LTH et SD-LTA. Les colonies capables de pousser sur les deux milieux sont considérées comme des interactants positifs. Les colonies positives sont mises en cultures dans un milieu liquide SD-LT ou SD-L jusqu'à arriver au plateau exponentiel de culture. 2 mL de suspension cellulaire sont centrifugé (1 min, 13 00 rpm) ; 0,2 mL de tampon d'extraction ainsi que des billes de verres pour le broyage sont ajoutés au culot. Le tout est vortexé énergiquement pendant 5 minutes puis mise à incuber à 98°C pendant 5 minutes. 0,2 mL d'un mélange phénol, chloroforme, isopropanol (25 :25 :1) est ajouté, puis le tout est à nouveau vortexé énergiquement pendant 5 minutes. La phase aqueuse est précipitée avec un volume 1/100 de tampon « High Salt » et 1 volume d'Isopropanol. La quantité d'ADN récolté est suffisante pour donner 100 à 10 000 colonies avec une souche de bactéries compétentes. Des bactéries compétentes sont ensuite transformées avec cet ADN et 2 colonies sont prélevées afin d'extraire l'ADN plasmidique. Après séquençage, des levures sont retransformées avec l'ADN appât et l'ADN candidat puis l'interaction est à nouveau testée sur milieu SD-LTH et SD-LTA.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbas, T. and Dutta, A.** (2011). CRL4Cdt2: master coordinator of cell cycle progression and genome stability. *Cell Cycle* **10**: 241–249.
- Abriel, H. and Staub, O.** (2005). Ubiquitylation of ion channels. *Physiology (Bethesda)*. **20**: 398–407.
- Andrade, M.A., Gonzalez-Guzman, M., Serrano, R., and Rodriguez, P.L.** (2001). A combination of the F-box motif and kelch repeats defines a large Arabidopsis family of F-box proteins. *Plant Mol. Biol.* **46**: 603–614.
- Angers, S., Li, T., Yi, X., MacCoss, M.J., Moon, R.T., and Zheng, N.** (2006). Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* **443**: 590–3.
- Arias, E.E. and Walter, J.C.** (2005). Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev.* **19**: 114–126.
- Atanassova, R., Chaubet, N., and Gigot, C.** (1992). A 126 bp fragment of a plant histone gene promoter confers preferential expression in meristems of transgenic Arabidopsis. *Plant J.* **2**: 291–300.
- Bachmair, A., Novatchkova, M., Potuschak, T., and Eisenhaber, F.** (2001). Ubiquitylation in plants: A post-genomic look at a post-translational modification. *Trends Plant Sci.* **6**: 463–470.
- Bates, P.W. and Vierstra, R.D.** (1999). UPL1 and 2, two 405 kDa ubiquitin-protein ligases from Arabidopsis thaliana related to the HECT-domain protein family. *Plant J.* **20**: 183–195.
- Beemster, G.T.S., Vercruysse, S., De Veylder, L., Kuiper, M., and Inzé, D.** (2006). The Arabidopsis leaf as a model system for investigating the role of cell cycle regulation in organ growth. *J. Plant Res.* **119**: 43–50.
- Bernhardt, A., Lechner, E., Hano, P., Schade, V., Dieterle, M., Anders, M., Dubin, M.J., Benvenuto, G., Bowler, C., Genschik, P., and Hellmann, H.** (2006). CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **47**: 591–603.
- Biedermann, S. and Hellmann, H.** (2011). WD40 and CUL4-based E3 ligases: lubricating all aspects of life. *Trends Plant Sci.* **16**: 38–46.
- Bjerkan, K.N. and Grini, P.E.** (2013). The Arabidopsis DDB1 interacting protein WDR55 is required for vegetative development © 2013 Landes Bioscience . Do not distribute © 2013 Landes Bioscience . Do not distribute. 1–6.
- Bjerkan, K.N., Jung-Roméo, S., Genschik, P., and Grini, P.E.** (2012). Arabidopsis WD REPEAT DOMAIN55 Interacts with DNA DAMAGED BINDING PROTEIN1 and Is Required for Apical Patterning in the Embryo. *Vitis*.
- Bootsma, D., Weeda, G., Vermeulen, W., van Vuuren, H., Troelstra, C., van der Spek, P., and Hoeijmakers, J.** (1995). Nucleotide excision repair syndromes: molecular basis and clinical symptoms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **347**: 75–81.
- Bourbousse, C., Ahmed, I., Roudier, F., Zabulon, G., Blondet, E., Balzergue, S., Colot, V., Bowler, C., and Barneche, F.** (2012). Histone H2B monoubiquitination facilitates the rapid modulation of gene expression during arabidopsis photomorphogenesis. *PLoS Genet.* **8**.
- Bouveret, R., Schönrock, N., Gruissem, W., and Hennig, L.** (2006). Regulation of flowering time by Arabidopsis MSI1. *Development* **133**: 1693–702.
- Boyes, D.C., Zayed, A.M., Ascenzi, R., McCaskill, A.J., Hoffman, N.E., Davis, K.R., and Görlach, J.** (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *Plant Cell* **13**: 1499–1510.
- Brady, S.M., Song, S., Dhugga, K.S., Rafalski, J.A., and Benfey, P.N.** (2007). Combining expression and comparative evolutionary analysis. The COBRA gene family. *Plant Physiol.* **143**: 172–187.

- Bratzel, F., López-Torrejón, G., Koch, M., Del Pozo, J.C., and Calonje, M.** (2010). Keeping cell identity in Arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr. Biol.* **20**: 1853–9.
- Braun, B.C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P.M., Finley, D., and Schmidt, M.** (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* **1**: 221–226.
- Breuer, C., Ishida, T., and Sugimoto, K.** (2010). Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 654–660.
- Brustel, J., Tardat, M., Kirsh, O., Grimaud, C., and Julien, E.** (2011). Coupling mitosis to DNA replication: The emerging role of the histone H4-lysine 20 methyltransferase PR-Set7. *Trends Cell Biol.* **21**: 452–460.
- Buscaino, A., White, S.A., Houston, D.R., Lejeune, E., Simmer, F., de Lima Alves, F., Diyora, P.T., Urano, T., Bayne, E.H., Rappsilber, J., and Allshire, R.C.** (2012). Ral1 is a DCAF for the Rik1 DDB1-like protein and has separable roles in siRNA generation and chromatin modification. *PLoS Genet.* **8**.
- Cadwell, K. and Coscoy, L.** (2005). Ubiquitination on nonlysine residues by a viral E3 ubiquitin ligase. *Science* **309**: 127–130.
- Callis, J., Carpenter, T., Sun, C.W., and Vierstra, R.D.** (1995). Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in Arabidopsis thaliana ecotype Columbia. *Genetics* **139**: 921–939.
- Calonje, M.** (2014). PRC1 Marks the Difference in Plant PcG Repression. *Mol. Plant* **7**: 459–71.
- Cao, Y., Wei, J., Yang, S., Sun, J., Xu, H., Wang, Y., Zhao, Y., and He, Q.** (2014). DDB1 and Cul4 are necessary for gene silencing and heterochromatin formation at pericentromeric regions in Neurospora. *Protein Cell*.
- Capron, A., Okrész, L., and Genschik, P.** (2003). First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends Plant Sci.* **8**: 83–89.
- Cardozo, T. and Pagano, M.** (2004). The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 739–751.
- Castellano, M.** (2004). DNA Replication Licensing Affects Cell Proliferation or Endoreplication in a Cell Type – Specific Manner. **16**: 2380–2393.
- Castells, E., Molinier, J., Benvenuto, G., Bourbousse, C., Zabulon, G., Zalc, A., Cazzaniga, S., Genschik, P., Barneche, F., and Bowler, C.** (2011). The conserved factor DE-ETIOLATED 1 cooperates with CUL4-DDB1DDB2 to maintain genome integrity upon UV stress. *EMBO J.* **30**: 1162–72.
- Cebolla, A., Vinardell, J.M., Kiss, E., Oláh, B., Roudier, F., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (1999). The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* **18**: 4476–4484.
- Cenciarelli, C., Chiaur, D.S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M., and Pagano, M.** (1999). Identification of a family of human F-box proteins. *Curr. Biol.* **9**: 1177–1179.
- Centore, R.C., Havens, C.G., Manning, A.L., Li, J.-M., Flynn, R.L., Tse, A., Jin, J., Dyson, N.J., Walter, J.C., and Zou, L.** (2010). CRL4(Cdt2)-mediated destruction of the histone methyltransferase Set8 prevents premature chromatin compaction in S phase. *Mol. Cell* **40**: 22–33.
- Chang, B., Partha, S., Hofmann, K., Lei, M., Goebel, M., Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* **86**: 263–274.
- Chen, H., Huang, X., Gusmaroli, G., Terzaghi, W., Lau, O.S., Yanagawa, Y., Zhang, Y., Li, J., Lee, J.-H., Zhu, D., and Deng, X.W.** (2010). Arabidopsis CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *Plant Cell* **22**: 108–123.

- Chen, X., Zhang, J., Lee, J., Lin, P.S., Ford, J.M., Zheng, N., and Zhou, P.** (2006). A Kinase-Independent Function of c-Abl in Promoting Proteolytic Destruction of Damaged DNA Binding Proteins. *Mol. Cell* **22**: 489–499.
- Christians, M.J., Gingerich, D.J., Hansen, M., Binder, B.M., Kieber, J.J., and Vierstra, R.D.** (2009). The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in Arabidopsis by controlling type-2 ACC synthase levels. *Plant J.* **57**: 332–345.
- Cleaver, J.E., Lam, E.T., and Revet, I.** (2009). Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat. Rev. Genet.* **10**: 756–768.
- Cong-Jung.L. and DePamphilis, M.L.** (2002). Mammalian Orc1 Protein Is Selectively Released from Chromatin and Ubiquitinated during the S-to-M Transition in the Cell Division Cycle. *Mol. Cell. Biol.* **22**: 105–116.
- Criqui, M.C., Parmentier, Y., Derevier, A., Shen, W.H., Dong, A., and Genschik, P.** (2000). Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. *Plant J.* **24**: 763–773.
- Dai, Q. and Wang, H.** (2006). “Cullin 4 makes its mark on chromatin.” *7*: 1–7.
- Derkacheva, M., Steinbach, Y., Wildhaber, T., Mozgová, I., Mahrez, W., Nanni, P., Bischof, S., Gruissem, W., and Hennig, L.** (2013). Arabidopsis MSI1 connects LHP1 to PRC2 complexes. *EMBO J.* **5**: 1–13.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Jørgensen, G., and Estelle, M.** (2005). Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev. Cell* **9**: 109–119.
- Dias, D.C., Dolios, G., Wang, R., and Pan, Z.-Q.** (2002). CUL7: A DOC domain-containing cullin selectively binds Skp1.Fbx29 to form an SCF-like complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 16601–16606.
- Dieterle, M., Thomann, A., Renou, J.-P., Parmentier, Y., Cognat, V., Lemonnier, G., Müller, R., Shen, W.-H., Kretsch, T., and Genschik, P.** (2005). Molecular and functional characterization of Arabidopsis Cullin 3A. *Plant J.* **41**: 386–399.
- Doelling*, J.H., Phillips, A.R., Soyler-Ogretim, G., Wise, J., Chandler, J., Callis, J., And, M.S.O., and Vierstra, R.D.** (2007). The Ubiquitin-Specific Protease Subfamily UBP3/UBP4 Is Essential for Pollen Development and Transmission in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **145**: 801–813.
- Donnelly, P.M., Bonetta, D., Tsukaya, H., Dengler, R.E., and Dengler, N.G.** (1999). Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev. Biol.* **215**: 407–419.
- Doerner, P., Jørgensen, J.E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C.** (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**: 520–523.
- Downes, B.P., Stupar, R.M., Gingerich, D.J., and Vierstra, R.D.** (2003). The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development. *Plant J.* **35**: 729–742.
- Dumbliuskas, E., Lechner, E., Jaciubek, M., Berr, A., Pazhouhandeh, M., Alioua, M., Cognat, V., Brukhin, V., Koncz, C., Grossniklaus, U., Molinier, J., and Genschik, P.** (2011). The Arabidopsis CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting. *EMBO J.* **30**: 731–43.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H., and Elledge, S.J.** (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* **7**: 555–569.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C.** (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**: 1349–1349.
- El-Mahdy, M.A., Zhu, Q., Wang, Q., Wani, G., Praetorius-Ibba, M., and Wani, A.A.** (2006). Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *J. Biol. Chem.* **281**: 13404–13411.

- Eloy, N.B., Coppens, F., Beemster, G.T.S., Hemerly, A.S., and Ferreira, P.C.G.** (2006). The Arabidopsis anaphase promoting complex (APC): regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* **5**: 1957–1965.
- Elsasser, S., Gali, R.R., Schwickart, M., Larsen, C.N., Leggett, D.S., Müller, B., Feng, M.T., Tübing, F., Dittmar, G.A.G., and Finley, D.** (2002). Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat. Cell Biol.* **4**: 725–730.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W.** (1998). Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1. *Mol. Cell* **2**: 163–171.
- Fields, S. and Song, O.** (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–246.
- Figuerola, P., Gusmarolia, G., Serinob, G., Habashia, J., Ligeng Maa, C., Yunping Shena, C., Fenga, S., Bostickd, M., Callisd, J., And, H.H., and Xing Wang Deng, 1** (2005). Arabidopsis Has Two Redundant Cullin3 Proteins That Are Essential for Embryo Development and That Interact with RBX1 and BTB Proteins to Form Multisubunit E3 Ubiquitin Ligase Complexes in Vivo. *Plant Cell* **17**: 1180–1195.
- Fousteri, M., Vermeulen, W., van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H.F.** (2006). Cockayne Syndrome A and B Proteins Differentially Regulate Recruitment of Chromatin Remodeling and Repair Factors to Stalled RNA Polymerase II In Vivo. *Mol. Cell* **23**: 471–482.
- Freitag, M., Lee, D.W., Kothe, G.O., Pratt, R.J., Aramayo, R., and Selker, E.U.** (2004). DNA methylation is independent of RNA interference in *Neurospora*. *Science* **304**: 1939.
- Funabiki, H. and Murray, A.W.** (2000). The *Xenopus* Chromokinesin Xkid Is Essential for Metaphase Chromosome Alignment and Must Be Degraded to Allow Anaphase Chromosome Movement. *Cell* **102**: 411–424.
- Furukawa, M., He, Y.J., Borchers, C., and Xiong, Y.** (2003). Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat. Cell Biol.* **5**: 1001–1007.
- Gagne, J.M., Downes, B.P., Shiu, S.-H., Durski, A.M., and Vierstra, R.D.** (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 11519–11524.
- Gallant, P.** (1992). Cyclin B2 undergoes cell cycle-dependent nuclear translocation and, when expressed as a non-destructible mutant, causes mitotic arrest in HeLa cells. *J. Cell Biol.* **117**: 213–224.
- Genschik, P., Criqui, M., Parmentier, Y., Derevier, A., and Fleck, J.** (1998). Cell cycle -dependent proteolysis in plants. Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* **10**: 2063–2076.
- Genschik, P., Marrocco, K., Bach, L., Noir, S., and Criqui, M.-C.** (2013). Selective protein degradation: a rheostat to modulate cell-cycle phase transitions. *J. Exp. Bot.*: 1–13.
- Genschik, P., Sumara, I., and Lechner, E.** (2013). The emerging family of CULLIN3-RING ubiquitin ligases (CRL3s): cellular functions and disease implications. *EMBO J.* **32**: 2307–20.
- Gingerich, D.J., Gagne, J.M., Salter, D.W., Hellmann, H., Estelle, M., Ma, L., and Vierstra, R.D.** (2005). Cullins 3a and 3b assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-a-brac (BTB) protein family to form essential ubiquitin-protein ligases (E3s) in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **280**: 18810–18821.
- Glickman, M.H. and Ciechanover, A.** (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**: 373–428.
- Glickman, M.H., Rubin, D.M., Fried, V.A., and Finley, D.** (1998). The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3149–3162.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**: 132–138.

- Goldstein, G., Scheid, M., Hammerling, U., Schlesinger, D.H., Niall, H.D., and Boyse, E.A.** (1975). Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiating properties and is probably represented universally in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **72**: 11–15.
- Gordon, D.M. and Roof, D.M.** (2001). Degradation of the kinesin Kip1p at anaphase onset is mediated by the anaphase-promoting complex and Cdc20p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 12515–12520.
- Granier, C., Massonnet, C., Turc, O., Muller, B., Chenu, K., and Tardieu, F.** (2002). Individual leaf development in *Arabidopsis thaliana*: A stable thermal-time-based programme. *Ann. Bot.* **89**: 595–604.
- Gray, W.M., Hellmann, H., Dharmasiri, S., and Estelle, M.** (2002). Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function. *Plant Cell* **14**: 2137–2144.
- Green, E.M. and Gozani, O.** (2011). CUL4B : Trash Talking at Chromatin. *Mol. Cell* **43**: 321–323.
- Grimanelli, D. and Roudier, F.** (2013). Epigenetics and Development in Plants. Green Light to Convergent Innovations. *Curr. Top. Dev. Biol.* **104**: 189–222.
- Groisman, R., Polanowska, J., Kuraoka, I., Sawada, J.I., Saijo, M., Drapkin, R., Kisselev, A.F., Tanaka, K., and Nakatani, Y.** (2003). The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* **113**: 357–367.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H.D., and Huber, R.** (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* **386**: 463–471.
- Gu, X., Jiang, D., Yang, W., Jacob, Y., Michaels, S.D., and He, Y.** (2011). Arabidopsis homologs of retinoblastoma-associated protein 46/48 associate with a histone deacetylase to act redundantly in chromatin silencing. *PLoS Genet.* **7**: e1002366.
- Guo, H., Wei, W., Wei, Z., Liu, X., Evans, S.L., Yang, W., Wang, H., Guo, Y., Zhao, K., Zhou, J.Y., and Yu, X.F.** (2013). Identification of Critical Regions in Human SAMHD1 Required for Nuclear Localization and Vpx-Mediated Degradation. *PLoS One* **8**.
- Gusti, A., Baumberger, N., Nowack, M., Pusch, S., Eisler, H., Potuschak, T., De Veylder, L., Schnittger, A., and Genschik, P.** (2009). The Arabidopsis thaliana F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development. *PLoS One* **4**.
- Han, J., Zhang, H., Zhang, H., Wang, Z., Zhou, H., and Zhang, Z.** (2013). A Cul4 E3 Ubiquitin Ligase Regulates Histone Hand-Off during Nucleosome Assembly. *Cell* **155**: 817–829.
- Hardtke, C.S. and Deng, X.** (2014). Update on Photomorphogenesis The Cell Biology of the COP / DET / FUS Proteins . Regulating Proteolysis in Photomorphogenesis and Beyond ? 1.
- He, Y.J., McCall, C.M., Hu, J., Zeng, Y., and Xiong, Y.** (2006). DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev.* **20**: 2949–2954.
- Hennig, L., Bouveret, R., and Grussem, W.** (2005). MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends Cell Biol.* **15**: 295–302.
- Hennig, L., Menges, M., Murray, J.A.H., and Grussem, W.** (2003). Arabidopsis transcript profiling on Affymetrix GeneChip arrays. *Plant Mol. Biol.* **53**: 457–465.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.** (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 761–807.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.** (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425–479.

- Hershko, A., Ciechanover, A., Heller, H., Haas, A.L., and Rose, I.A.** (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 1783–1786.
- Hershko, A., Ciechanover, A., and Rose, I.A.** (1981). Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J. Biol. Chem.* **256**: 1525–1528.
- Higa, L.A., Wu, M., Ye, T., Kobayashi, R., Sun, H., and Zhang, H.** (2006). CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat. Cell Biol.* **8**: 1277–83.
- Higa, L.A. and Zhang, H.** (2007). Stealing the spotlight : CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *9*: 1–9.
- Higa, L.A., Mihaylov, I.S., Banks, D.P., Zheng, J., and Zhang, H.** (2003). Radiation-mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. *Nat. Cell Biol.* **5**: 1008–1015.
- Hildebrandt, E.R. and Hoyt, M.A.** (2001). Cell cycle-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* spindle motor Cin8p requires APC(Cdh1) and a bipartite destruction sequence. *Mol. Biol. Cell* **12**: 3402–3416.
- Himmelbach, A., Hoffmann, T., Leube, M., H??hener, B., and Grill, E.** (2002). Homeodomain protein ATHB6 is a target of the protein phosphatase ABI1 and regulates hormone responses in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **21**: 3029–3038.
- Holm, M., Ma, L.-G., Qu, L.-J., and Deng, X.-W.** (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of light-dependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* **16**: 1247–1259.
- Hu, J., McCall, C.M., Ohta, T., and Xiong, Y.** (2004). Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1-CUL4A-ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nat. Cell Biol.* **6**: 1003–1009.
- Hua, Z. and Vierstra, R.D.** (2011). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 299–334.
- Huanca-Mamani, W., Garcia-Aguilar, M., León-Martínez, G., Grossniklaus, U., and Vielle-Calzada, J.-P.** (2005). CHR11, a chromatin-remodeling factor essential for nuclear proliferation during female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 17231–6.
- Iovine, B., Iannella, M.L., and Bevilacqua, M.A.** (2011). Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1): a protein with a wide range of functions. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **43**: 1664–7.
- Irigoyen, M.L., Iniesto, E., Rodriguez, L., Puga, M.I., Yanagawa, Y., Pick, E., Strickland, E., Paz-Ares, J., Wei, N., De Jaeger, G., Rodriguez, P.L., Deng, X.W., and Rubio, V.** (2014). Targeted Degradation of Abscissic Acid Receptors Is Mediated by the Ubiquitin Ligase Substrate Adaptor DDA1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **26**: 712–28.
- Ivan, M. and Kaelin, W.G.** (2001). The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 27–34.
- Iwata, E., Ikeda, S., Abe, N., Kobayashi, A., Kurata, M., Matsunaga, S., Yoshioka, Y., Criqui, M.-C., Genschik, P., and Ito, M.** (2012). Roles of GIG1 and UVI4 in genome duplication in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* **7**: 1079–1081.
- Jackson, P.K. and Eldridge, A.G.** (2002). The SCF Ubiquitin Ligase. *Mol. Cell* **9**: 923–925.
- Jackson, P.K., Eldridge, A.G., Freed, E., Furstenthal, L., Hsu, J.Y., Kaiser, B.K., and Reimann, J.D.R.** (2000). The lore of the RINGs: Substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol.* **10**: 429–439.
- Jeon, J. and Kim, J.** (2011). FVE, an *Arabidopsis* homologue of the retinoblastoma-associated protein that regulates flowering time and cold response, binds to chromatin as a large multiprotein complex. *Mol. Cells* **32**: 227–34.
- Jia, S., Kobayashi, R., and Grewal, S.I.S.** (2005). Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. **7**.

- Jiang, C.Z., Yee, J., Mitchell, D.L., and Britt, A.B.** (1997). Photorepair mutants of Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 7441–7445.
- Jin, J., Arias, E.E., Chen, J., Harper, J.W., and Walter, J.C.** (2006). A Family of Diverse Cul4-Ddb1-Interacting Proteins Includes Cdt2, which Is Required for S Phase Destruction of the Replication Factor Cdt1. *Mol. Cell* **23**: 709–721.
- Kamura, T., Conrad, M.N., Yan, Q., Conaway, R.C., and Conaway, J.W.** (1999). The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2. *Genes Dev.* **13**: 2928–2933.
- Kamura, T., Koepp, D.M., Conrad, M.N., Skowyra, D., Moreland, R.J., Iliopoulos, O., Lane, W.S., Kaelin, W.G., Elledge, S.J., Conaway, R.C., Harper, J.W., and Conaway, J.W.** (1999). Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase. *Science* **284**: 657–661.
- Kapetanaki, M.G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D.C., Hsieh, C.L., Rapić-Otrin, V., and Levine, A.S.** (2006). The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 2588–2593.
- Kaufman, P.D., Kobayashi, R., and Stillman, B.** (1997). Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes Dev.* **11**: 345–357.
- Kevei, Z., Baloban, M., da Ines, O., Tiricz, H., Kroll, A., Regulski, K., Mergaert, P., and Kondorosi, E.** (2011). Conserved CDC20 cell cycle functions are carried out by two of the five isoforms in *arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **6**.
- Kim, J., Feng, H., and Kipreos, E.T.** (2007). *C. elegans* CUL-4 prevents rereplication by promoting the nuclear export of CDC-6 via a CKI-1-dependent pathway. *Curr. Biol.* **17**: 966–72.
- Kingston, R.E. and Narlikar, G.J.** (1999). ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev.* **13**: 2339–52.
- Köhler, C., Hennig, L., Bouveret, R., Gheyselinck, J., Grossniklaus, U., and Gruissem, W.** (2003). Arabidopsis MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development. *EMBO J.* **22**: 4804–14.
- Köhler, A. and Hurt, E.** (2010). Gene Regulation by Nucleoporins and Links to Cancer. *Mol. Cell* **38**: 6–15.
- Kopanja, D., Roy, N., Stoyanova, T., Hess, R.A., Bagchi, S., and Raychaudhuri, P.** (2011). Cul4A is essential for spermatogenesis and male fertility. *Dev. Biol.* **352**: 278–287.
- Kornitzer, D. and Ciechanover, A.** (2000). Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. *J. Cell. Physiol.* **182**: 1–11.
- Kraft, C., Herzog, F., Gieffers, C., Mechtler, K., Hagting, A., Pines, J., and Peters, J.M.** (2003). Mitotic regulation of the human anaphase-promoting complex by phosphorylation. *EMBO J.* **22**: 6598–6609.
- Kraft, C., Vodermaier, H.C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.-M.** (2005). The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol. Cell* **18**: 543–53.
- Kunz, B.A., Cahill, D.M., Mohr, P.G., Osmond, M.J., and Vonarx, E.J.** (2006). Plant Responses to UV Radiation and Links to Pathogen Resistance. *Int. Rev. Cytol.* **255**: 1–40.
- Kuroda, H., Takahashi, N., Shimada, H., Seki, M., Shinozaki, K., and Matsui, M.** (2002). Classification and expression analysis of Arabidopsis F-box-containing protein genes. *Plant Cell Physiol.* **43**: 1073–1085.
- Kuscu, C., Zaratiegui, M., Soo, H., Wah, D.A., and Martienssen, R.A.** (2013). CRL4-like Ctr4 complex in *Schizosaccharomyces pombe* depends on an exposed surface of Dos1 for heterochromatin silencing.
- Kwee, H.S. and Sundaresan, V.** (2003). The Nomega gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the Anaphase Promoting Complex in Arabidopsis. *Plant J.* **36**: 853–866.

- Längst, G. and Becker, P.B.** (2004). Nucleosome remodeling: One mechanism, many phenomena? *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1677**: 58–63.
- Lau, O.S. and Deng, X.W.** (2012). The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends Plant Sci.*: 1–10.
- LeBron, C., Chen, L., Gilkes, D.M., and Chen, J.** (2006). Regulation of MDMX nuclear import and degradation by Chk2 and 14-3-3. *EMBO J.* **25**: 1196–1206.
- Lechner, E., Achard, P., Vansiri, A., Potuschak, T., and Genschik, P.** (2006). F-box proteins everywhere. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 631–638.
- Lechner, E., Xie, D., Grava, S., Pigaglio, E., Planchais, S., Murray, J.A.H., Parmentier, Y., Mutterer, J., Dubreucq, B., Shen, W.-H., and Genschik, P.** (2002). The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down-regulation causes severe growth and developmental defects. *J. Biol. Chem.* **277**: 50069–50080.
- Lee, J. and Zhou, P.** (2010). SETting the clock for histone H4 monomethylation. *Mol. Cell* **40**: 345–6.
- Lee, J.-H., Terzaghi, W., Gusmaroli, G., Charron, J.-B.F., Yoon, H.-J., Chen, H., He, Y.J., Xiong, Y., and Deng, X.W.** (2008). Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell* **20**: 152–67.
- Lee, J.M., Lee, J.S., Kim, H., Kim, K., Park, H., Kim, J.-Y., Lee, S.H., Kim, I.S., Kim, J., Lee, M., Chung, C.H., Seo, S.-B., Yoon, J.-B., Ko, E., Noh, D.-Y., Kim, K. II, Kim, K.K., and Baek, S.H.** (2012). EZH2 Generates a Methyl Degron that Is Recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Mol. Cell* **48**: 572–586.
- Leismann, O. and Lehner, C.F.** (2003). Drosophila securin destruction involves a D-box and a KEN-box and promotes anaphase in parallel with Cyclin A degradation. *J. Cell Sci.* **116**: 2453–2460.
- Leung, J.W., Agarwal, P., Canny, M.D., Gong, F., Robison, A.D., Finkelstein, I.J., Durocher, D., and Miller, K.M.** (2014). Nucleosome acidic patch promotes RNF168- and RING1B/BMI1-dependent H2AX and H2A ubiquitination and DNA damage signaling. *PLoS Genet.* **10**: e1004178.
- Levesque, A.A. and Compton, D.A.** (2001). The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *J. Cell Biol.* **154**: 1135–46.
- Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P., and Wu, X.** (2003). The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation. *J. Biol. Chem.* **278**: 30854–30858.
- Liu, F., Ni, W., Griffith, M.E., Huang, Z., Chang, C., Peng, W., Ma, H., and Xie, D.** (2004). The ASK1 and ASK2 genes are essential for Arabidopsis early development. *Plant Cell* **16**: 5–20.
- Lorick, K.L., Jensen, J.P., Fang, S., Ong, A.M., Hatakeyama, S., and Weissman, A.M.** (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 11364–11369.
- Lovering, R., Hanson, I.M., Borden, K.L., Martin, S., O'Reilly, N.J., Evan, G.I., Rahman, D., Pappin, D.J., Trowsdale, J., and Freemont, P.S.** (1993). Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**: 2112–2116.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D.A., Wei, N., and Deshaies, R.J.** (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**: 1382–1385.
- Machida, Y.J., Hamlin, J.L., and Dutta, A.** (2005). Right place, right time, and only once: Replication initiation in metazoans. *Cell* **123**: 13–24.
- Margueron, R. and Reinberg, D.** (2011). The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**: 343–9.

- Marrocco, K., Criqui, M.-C., Zervudacki, J., Schott, G., Eisler, H., Parnet, A., Dunoyer, P., and Genschik, P.** (2012). APC/C-mediated degradation of dsRNA-binding protein 4 (DRB4) involved in RNA silencing. *PLoS One* **7**: e35173.
- Marrocco, K., Thomann, A., Parmentier, Y., and, Genschik, P., and Criqui, M.C.** (2009). The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic Arabidopsis cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development* **136**: 1475–1485.
- Mellor, J.** (2006). It Takes a PHD to Read the Histone Code. *Cell* **126**: 22–24.
- Ménard, R., Verdier, G., Ors, M., Erhardt, M., Beisson, F., and Shen, W.H.** (2014). Histone H2B monoubiquitination is involved in the regulation of cutin and wax composition in arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* **55**: 455–466.
- Menges, M. and Murray, J.A.H.** (2002). Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* **30**: 203–212.
- Miao, Y. and Zentgraf, U.** (2010). A HECT E3 ubiquitin ligase negatively regulates Arabidopsis leaf senescence through degradation of the transcription factor WRKY53. *Plant J.* **63**: 179–188.
- Molinier, J., Lechner, E., Dumbliuskas, E., and Genschik, P.** (2008). Regulation and role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *PLoS Genet.* **4**: e1000093.
- Molitor, A. and Shen, W.-H.** (2013). The Polycomb Complex PRC1: Composition and Function in Plants. *J. Genet. Genomics* **40**: 231–8.
- Molitor, A.M., Bu, Z., Yu, Y., and Shen, W.-H.** (2014). Arabidopsis AL PHD-PRC1 complexes promote seed germination through H3K4me3-to-H3K27me3 chromatin state switch in repression of seed developmental genes. *PLoS Genet.* **10**: e1004091.
- Murray, A.W. and Kirschner, M.W.** (1989). Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science* **246**: 614–621.
- Murzina, N. V., Pei, X.Y., Zhang, W., Sparkes, M., Vicente-Garcia, J., Pratap, J.V., McLaughlin, S.H., Ben-Shahar, T.R., Verreault, A., Luisi, B.F., and Laue, E.D.** (2008). Structural Basis for the Recognition of Histone H4 by the Histone-Chaperone RbAp46. *Structure* **16**: 1077–1085.
- Nakagawa, T. and Xiong, Y.** (2011a). Chromatin regulation by CUL4 E3 ubiquitin ligases © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute . © 2012 Landes Bioscience . 4197–4198.
- Nakagawa, T. and Xiong, Y.** (2011b). X-Linked Mental Retardation Gene CUL4B Targets Ubiquitylation of H3K4 Methyltransferase Component WDR5 and Regulates Neuronal Gene Expression. *Mol. Cell* **43**: 381–391.
- Nakajima, S., Sugiyama, M., Iwai, S., Hitomi, K., Otsoshi, E., Kim, S.T., Jiang, C.Z., Todo, T., Britt, A.B., and Yamamoto, K.** (1998). Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* **26**: 638–644.
- Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K.I., Nakayama, K., Fujita, M., Lygerou, Z., and Nishimoto, T.** (2006). Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J.* **25**: 1126–1136.
- Ohta, T., Michel, J.J., Schottelius, A.J., and Xiong, Y.** (1999). ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell* **3**: 535–541.
- Olma, M.H., Roy, M., Le Bihan, T., Sumara, I., Maerki, S., Larsen, B., Quadroni, M., Peter, M., Tyers, M., and Pintard, L.** (2009). An interaction network of the mammalian COP9 signalosome identifies Dda1 as a core subunit of multiple Cul4-based E3 ligases. *J. Cell Sci.* **122**: 1035–1044.
- Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W.** (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* **405**: 462–466.

- Page, A.M. and Hieter, P.** (1999). The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators. *Annu. Rev. Biochem.* **68**: 583–609.
- Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A., and Genschik, P.** (2011). MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 3430–5.
- Peng, J., Schwartz, D., Elias, J.E., Thoreen, C.C., Cheng, D., Marsischky, G., Roelofs, J., Finley, D., and Gygi, S.P.** (2003). A proteomics approach to understanding protein ubiquitination. *Nat. Biotechnol.* **21**: 921–926.
- Pepper, A., Delaney, T., Washburn, T., Poole, D., and Chory, J.** (1994). DET1, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in arabidopsis, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* **78**: 109–116.
- Peters, J.-M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 644–656.
- Peters, J.-M.** (2002). The Anaphase-Promoting Complex. *Mol. Cell* **9**: 931–943.
- Petroski, M.D. and Deshaies, R.J.** (2005). In Vitro reconstitution of SCF substrate ubiquitination with purified proteins. *Methods Enzymol.* **398**: 143–158.
- Pfleger, C.M. and Kirschner, M.W.** (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* **14**: 655–665.
- Phizicky, E.M. and Fields, S.** (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. *Microbiol. Rev.* **59**: 94–123.
- Pickart, C.M. and Fushman, D.** (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**: 610–6.
- Pintard, L., Willis, J.H., Willems, A., Johnson, J.-L.F., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P.E., Tyers, M., Bowerman, B., and Peter, M.** (2003). The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* **425**: 311–316.
- Potuschak, T., Lechner, E., Parmentier, Y., Yanagisawa, S., Grava, S., Koncz, C., and Genschik, P.** (2003). EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* **115**: 679–689.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M., and Séraphin, B.** (2001). The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* **24**: 218–229.
- Ramirez-Parra, E., Fr??ndt, C., and Gutierrez, C.** (2003). A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *Plant J.* **33**: 801–811.
- Rapic-Otrin, V., Navazza, V., Nardo, T., Botta, E., McLenigan, M., Bisi, D.C., Levine, A.S., and Stefanini, M.** (2003). True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product. *Hum. Mol. Genet.* **12**: 1507–1522.
- Rivett, A.J.** (1989). The multicatalytic proteinase complex. *Revis. Biol. Celular* **20**: 113–123.
- Rose, A.B. and Last, R.L.** (1997). Introns act post-transcriptionally to increase expression of the Arabidopsis thaliana tryptophan pathway gene PAT1. *Plant J.* **11**: 455–464.
- Rudner, A.D. and Murray, A.W.** (2000). Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J. Cell Biol.* **149**: 1377–1390.
- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U., and Deng, X.W.** (2003). The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev.* **17**: 2642–2647.
- Sancar, A. and Reardon, J.T.** (2004). Nucleotide excision repair in E. coli and man. *Adv. Protein Chem.* **69**: 43–71.

- Santner, A. and Estelle, M.** (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J.* **61**: 1029–1040.
- Savaldi-Goldstein, S., Peto, C., and Chory, J.** (2007). The epidermis both drives and restricts plant shoot growth. *Nature* **446**: 199–202.
- Schmid, M., Davison, T.S., Henz, S.R., Pape, U.J., Demar, M., Vingron, M., Schölkopf, B., Weigel, D., and Lohmann, J.U.** (2005). A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* **37**: 501–506.
- Schroeder, D.F., Gahrtz, M., Maxwell, B.B., Cook, R.K., Kan, J.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Chory, J.** (2002). De-Etiolated 1 and Damaged DNA Binding Protein 1 Interact to Regulate *Arabidopsis* Photomorphogenesis. *Curr. Biol.* **12**: 1462–1472.
- Schuettengruber, B. and Cavalli, G.** (2009). Recruitment of polycomb group complexes and their role in the dynamic regulation of cell fate choice. *Development* **136**: 3531–3542.
- Schwartz, Y.B. and Pirrotta, V.** (2007). Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes. *Nat. Rev. Genet.* **8**: 9–22.
- Schwechheimer, C.** (2001). Interactions of the COP9 Signalosome with the E3 Ubiquitin Ligase SCFTIR1 in Mediating Auxin Response. *Science* (80-.). **292**: 1379–1382.
- Schwechheimer, C.** (2004). The COP9 signalosome (CSN): An evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1695**: 45–54.
- Scrima, A., Konickova, R., Czyzewski, B.K., Kawasaki, Y., Jeffrey, P.D., Groisman, R., Nakatani, Y., Iwai, S., Pavletich, N.P., and Thoma, N.H.** (2008). Structural Basis of UV DNA-Damage Recognition by the DDB1-DDB2 Complex. *Cell* **135**: 1213–1223.
- Sedgwick, C., Rawluk, M., Decesare, J., Raithatha, S., Wohlschlegel, J., Semchuk, P., Ellison, M., Yates, J., and Stuart, D.** (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Ime2 phosphorylates Sic1 at multiple PXS/T sites but is insufficient to trigger Sic1 degradation. *Biochem. J.* **399**: 151–160.
- Senga, T., Sivaprasad, U., Zhu, W., Park, J.H., Arias, E.E., Walter, J.C., and Dutta, A.** (2006). PCNA is a cofactor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1-mediated N-terminal ubiquitination. *J. Biol. Chem.* **281**: 6246–6252.
- Seol, J.H., Feldman, R.M., Zachariae, W., Shevchenko, A., Correll, C.C., Lyapina, S., Chi, Y., Galova, M., Claypool, J., Sandmeyer, S., Nasmyth, K., and Deshaies, R.J.** (1999). Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34. *Genes Dev.* **13**: 1614–1626.
- Serino, G. and Deng, X.-W.** (2003). The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* **54**: 165–182.
- Shaul, O., Mironov, V., Burssens, S., Van Montagu, M., and Inze, D.** (1996). Two *Arabidopsis* cyclin promoters mediate distinctive transcriptional oscillation in synchronized tobacco BY-2 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 4868–4872.
- Sheldon, C.C., Burn, J.E., Perez, P.P., Metzger, J., Edwards, J.A., Peacock, W.J., and Dennis, E.S.** (1999). The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell* **11**: 445–458.
- Shiyanov, P., Nag, A., and Raychaudhuri, P.** (1999). Cullin 4A associates with the UV-damaged DNA-binding protein DDB. *J. Biol. Chem.* **274**: 35309–35312.
- Skirycz, A., Claeys, H., De Bodt, S., Oikawa, A., Shinoda, S., Andrianakaja, M., Maleux, K., Eloy, N.B., Coppens, F., Yoo, S.-D., Saito, K., and Inzé, D.** (2011). Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in *Arabidopsis* and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest. *Plant Cell* **23**: 1876–1888.
- Skowrya, D., Craig, K.L., Tyers, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W.** (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* **91**: 209–219.

- Smaczniak, C., Immink, R.G.H., Muiño, J.M., Blanvillain, R., and Busscher, M.** (2012). Characterization of MADS-domain transcription factor complexes in Arabidopsis flower development.
- Smalle, J. and Vierstra, R.D.** (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu. Rev. Plant Biol.* **55**: 555–90.
- Steinbach, Y. and Hennig, L.** (2014). Arabidopsis MSI1 functions in photoperiodic flowering time control. *Front. Plant Sci.* **5**: 77.
- Stogios, P.J., Downs, G.S., Jauhal, J.J.S., Nandra, S.K., and Privé, G.G.** (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome Biol.* **6**: R82.
- Stolpe, T., Süsslin, C., Marrocco, K., Nick, P., Kretsch, T., and Kircher, S.** (2005). In planta analysis of protein-protein interactions related to light signaling by bimolecular fluorescence complementation. *Protoplasma* **226**: 137–146.
- Suárez-López, P., Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., and Coupland, G.** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature* **410**: 1116–1120.
- Sugasawa, K.** (2009). The CUL4 enigma: culling DNA repair factors. *Mol. Cell* **34**: 403–4.
- Suzuki, G., Yanagawa, Y., Kwok, S.F., Matsui, M., and Deng, X.-W.** (2002). Arabidopsis COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev.* **16**: 554–559.
- Takahashi, N., Kuroda, H., Kuromori, T., Hirayama, T., Seki, M., Shinozaki, K., Shimada, H., and Matsui, M.** (2004). Expression and Interaction Analysis of Arabidopsis Skp1-Related Genes. *Plant Cell Physiol.* **45**: 83–91.
- Takeda, D.Y., Parvin, J.D., and Dutta, A.** (2005). Degradation of Cdt1 during S phase is Skp2-independent and is required for efficient progression of mammalian cells through S phase. *J. Biol. Chem.* **280**: 23416–23423.
- Tan, X., Calderon-Villalobos, L.I.A., Sharon, M., Zheng, C., Robinson, C. V., Estelle, M., and Zheng, N.** (2007). Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **446**: 640–645.
- Tarayre, S., Vinardell, J.M., Cebolla, A., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (2004). Two classes of the CDh1-type activators of the anaphase-promoting complex in plants: novel functional domains and distinct regulation. *Plant Cell* **16**: 422–434.
- Tardat, M., Brustel, J., Kirsh, O., Lefevbre, C., Callanan, M., Sardet, C., and Julien, E.** (2010). The histone H4 Lys 20 methyltransferase PR-Set7 regulates replication origins in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* **12**: 1086–1093.
- Tarpey, P.S., Raymond, F.L., O’Meara, S., Edkins, S., Teague, J., Butler, A., Dicks, E., Stevens, C., Tofts, C., Avis, T., Barthorpe, S., Buck, G., Cole, J., Gray, K., Halliday, K., Harrison, R., Hills, K., Jenkinson, A., Jones, D., Menzies, A., et al.** (2007). Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor. *Am. J. Hum. Genet.* **80**: 345–52.
- Tarpey, P.S., Smith, R., Pleasance, E., Whibley, A., Edkins, S., Hardy, C., O’Meara, S., Latimer, C., Dicks, E., Menzies, A., Stephens, P., Blow, M., Greenman, C., Xue, Y., Tyler-Smith, C., Thompson, D., Gray, K., Andrews, J., Barthorpe, S., Buck, G., et al.** (2009). A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation. *Nat. Genet.* **41**: 535–543.
- Thomann, A., Brukhin, V., Dieterle, M., Gheyeselinck, J., Vantard, M., Grossniklaus, U., and Genschik, P.** (2005). Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *Plant J.* **43**: 437–448.
- Thomann, A., Dieterle, M., and Genschik, P.** (2005). Plant CULLIN-based E3s: Phytohormones come first. *FEBS Lett.* **579**: 3239–3245.
- Thomann, A., Lechner, E., Hansen, M., Dumbliuskas, E., Parmentier, Y., Kieber, J., Scheres, B., and Genschik, P.** (2009). Arabidopsis CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms. *PLoS Genet.* **5**: e1000328.

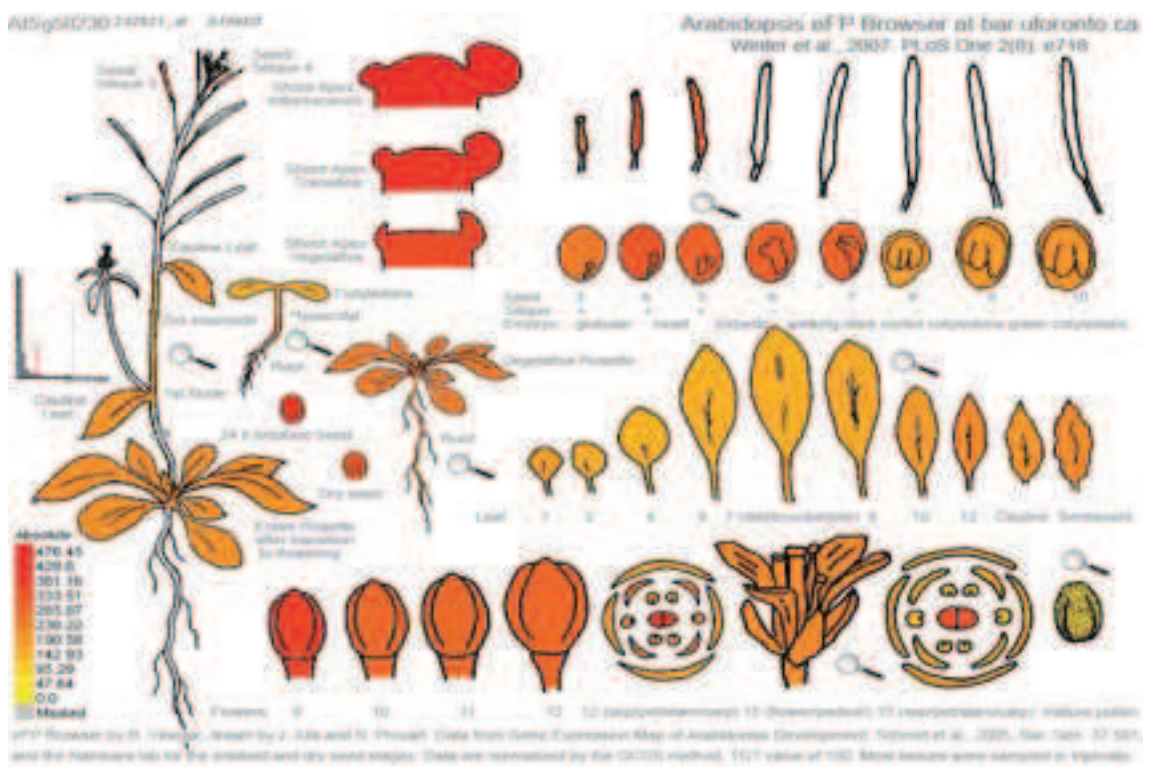
- Thornton, B.R., Ng, T.M., Matyskiela, M.E., Carroll, C.W., Morgan, D.O., and Toczyski, D.P.** (2006). An architectural map of the anaphase-promoting complex. *Genes Dev.* **20**: 449–460.
- Tsukaya, H.** (2003). Organ shape and size: a lesson from studies of leaf morphogenesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 57–62.
- Surana, U., Amon, A., Dowzer C., McGrew J., Byers B., and K.N.** (1993). Destruction of the CDC28/CLB mitotic kinase is not required for the metaphase to anaphase transition in budding yeast. *EMBO J.* **12**: 1969–1978.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupert, M.A., Koonin, E. V, and Nasmyth, K.** (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* **103**: 375–386.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., and Coupland, G.** (2004). Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science* **303**: 1003–1006.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T.S., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inzé, D., and De Veylder, L.** (2005). Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* **139**: 316–328.
- Van Leene, J., Stals, H., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van Isterdael, G., De Clercq, A., Bonnet, E., Laukens, K., Remmerie, N., Henderickx, K., De Vijlder, T., Abdelkrim, A., Pharazyn, A., Van Onckelen, H., Inzé, D., Witters, E., and De Jaeger, G.** (2007). A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics* **6**: 1226–1238.
- Verma, R., Annan, R.S., Huddleston, M.J., Carr, S.A., Reynard, G., and Deshaies, R.J.** (1997). Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science* **278**: 455–460.
- Vierstra, R.D.** (2012). The expanding universe of ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Plant Physiol.* **160**: 2–14.
- Vierstra, R.D.** (2003). The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends Plant Sci.* **8**: 135–42.
- Vlieghe, K., Vuylsteke, M., Florquin, K., Rombauts, S., Maes, S., Ormenese, S., Van Hummelen, P., Van de Peer, Y., Inze, D., and De Veylder, L.** (2003). Microarray analysis of E2Fa-DPa-overexpressing plants uncovers a cross-talking genetic network between DNA replication and nitrogen assimilation. *J. Cell Sci.* **116**: 4249–59.
- Vodermaier, H.C., Gieffers, C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.M.** (2003). TPR subunits of the anaphase-promoting complex mediate binding to the activator protein CDH1. *Curr. Biol.* **13**: 1459–1468.
- Vosper, J.M.D., McDowell, G.S., Hindley, C.J., Fiore-Herich, C.S., Kucerova, R., Horan, I., and Philpott, A.** (2009). Ubiquitylation on canonical and non-canonical sites targets the transcription factor neurogenin for ubiquitin-mediated proteolysis. *J. Biol. Chem.* **284**: 15458–15468.
- Wahl, V., Ponnu, J., Schlereth, A., Arrivault, S., Langenecker, T., Franke, A., Feil, R., Lunn, J.E., Stitt, M., and Schmid, M.** (2013). Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **339**: 704–7.
- Wang, K.L.-C., Yoshida, H., Lurin, C., and Ecker, J.R.** (2004). Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature* **428**: 945–950.
- Wang, S., Liu, J., Feng, Y., Niu, X., Giovannoni, J., and Liu, Y.** (2008). Altered plastid levels and potential for improved fruit nutrient content by downregulation of the tomato DDB1-interacting protein CUL4. *Plant J.* **55**: 89–103.
- Weber, H., Bernhardt, A., Dieterle, M., Hano, P., Mutlu, A., Estelle, M., Genschik, P., and Hellmann, H.** (2005). *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiol.* **137**: 83–93.
- Wei, N., Kwok, S.F., von Arnim, A.G., Lee, A., McNellis, T.W., Piekos, B., and Deng, X.W.** (1994). *Arabidopsis* COP8, COP10, and COP11 genes are involved in repression of photomorphogenic development in darkness. *Plant Cell* **6**: 629–643.

- Weissman, A.M.** (2001). Themes and variations on ubiquitylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 169–178.
- Wertz, I.E., O'Rourke, K.M., Zhang, Z., Dornan, D., Arnott, D., Deshaies, R.J., and Dixit, V.M.** (2004). Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science* **303**: 1371–1374.
- Wild, M., Daviere, J.-M., Cheminant, S., Regnault, T., Baumberger, N., Heintz, D., Baltz, R., Genschik, P., and Achard, P.** (2012). The Arabidopsis DELLA RGA-LIKE3 Is a Direct Target of MYC2 and Modulates Jasmonate Signaling Responses. *Plant Cell* **24**: 3307–3319.
- Wilkinson, K.D., Urban, M.K., and Haas, A.L.** (1980). Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J. Biol. Chem.* **255**: 7529–7532.
- Willems, A.R., Schwab, M., and Tyers, M.** (2004). A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1695**: 133–170.
- Wing, S.S.** (2003). Deubiquitinating enzymes - The importance of driving in reverse along the ubiquitin-proteasome pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **35**: 590–605.
- Xie, Y.** (2010). Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *J. Mol. Cell Biol.* **2**: 308–317.
- Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T.-H., Vidal, M., Elledge, S.J., and Harper, J.W.** (2003). BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* **425**: 316–321.
- Yan, F., Gao, X., Lonard, D.M., and Nawaz, Z.** (2003). Specific ubiquitin-conjugating enzymes promote degradation of specific nuclear receptor coactivators. *Mol. Endocrinol.* **17**: 1315–1331.
- Yanagawa, Y., Sullivan, J.A., Komatsu, S., Gusmaroli, G., Suzuki, G., Yin, J., Ishibashi, T., Saijo, Y., Rubio, V., Kimura, S., Wang, J., and Deng, X.W.** (2004). Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes Dev.* **18**: 2172–2181.
- Yanagida, M.** (2000). Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin. *Genes Cells* **5**: 1–8.
- Yang, X., Lee, S., So, J.H., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L., and Estelle, M.** (2004). The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCF TIR1. *Plant J.* **40**: 772–782.
- Yao, T. and Cohen, R.E.** (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**: 403–407.
- Yi, C. and Deng, X.W.** (2005). COP1 - From plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* **15**: 618–625.
- Yoshida, D., Kim, K., Noha, M., and Teramoto, A.** (2006). Hypoxia inducible factor 1-alpha regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells. *J. Neurooncol.* **76**: 13–21.
- Zachariae, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W.** (1998). Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex. *Science* **282**: 1721–1724.
- Zachariae, W., Shevchenko, A., Andrews, P.D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M.J., Mann, M., and Nasmyth, K.** (1998). Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins. *Science* **279**: 1216–1219.
- Zhang, Y., Feng, S., Chen, F., Chen, H., Wang, J., McCall, C., Xiong, Y., and Deng, X.W.** (2008). Arabidopsis DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 forms a nuclear E3 ubiquitin ligase with DDB1 and CUL4 that is involved in multiple plant developmental processes. *Plant Cell* **20**: 1437–1455.

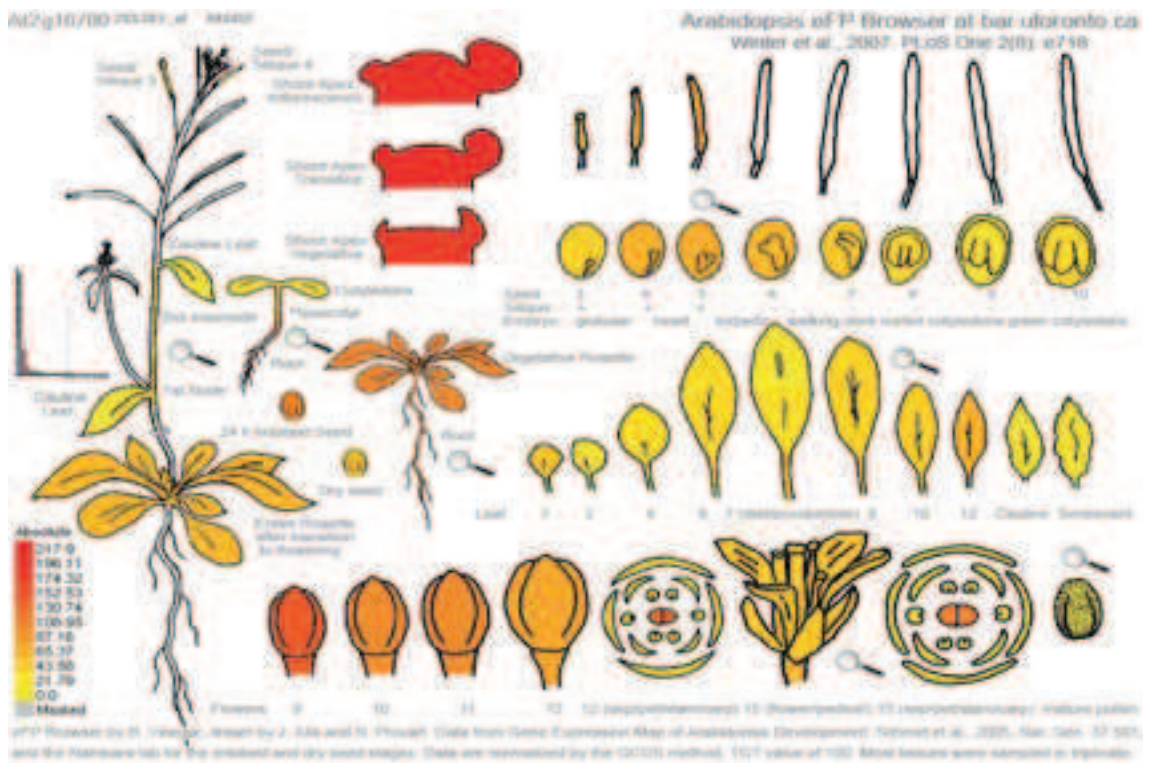
- Zhao, D., Han, T., Risseuw, E., Crosby, W.L., and Ma, H.** (2003). Conservation and divergence of ASK1 and ASK2 gene functions during male meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* **53**: 163–173.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., Chu, C., Koepp, D.M., Elledge, S.J., Pagano, M., Conaway, R.C., Conaway, J.W., Harper, J.W., and Pavletich, N.P.** (2002). Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF ubiquitin ligase complex. *Nature* **416**: 703–709.
- Zhong, W., Feng, H., Santiago, F.E., and Kipreos, E.T.** (2003). CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. *Nature* **423**: 885–889.
- Zou, Y., Liu, Q., Chen, B., Zhang, X., Guo, C., Zhou, H., Li, J., Gao, G., Guo, Y., Yan, C., Wei, J., Shao, C., and Gong, Y.** (2007). Mutation in CUL4B, which encodes a member of cullin-RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **80**: 561–566.

ANNEXES

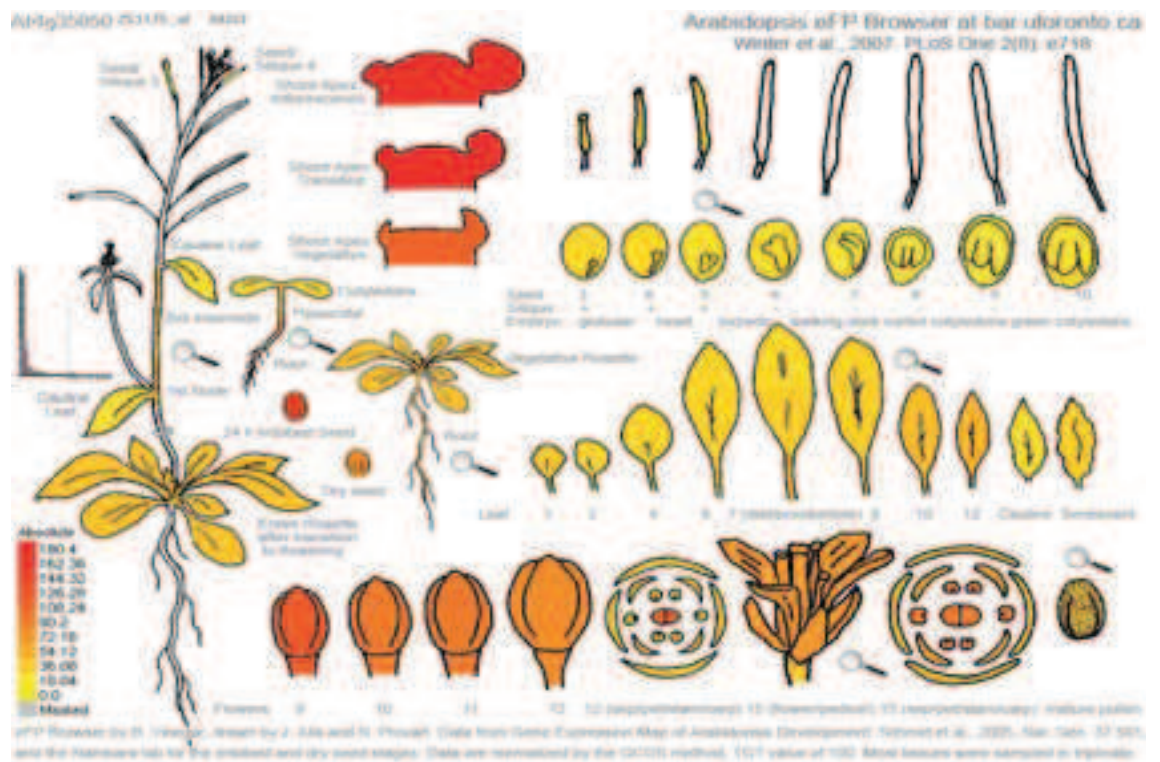
MSI1



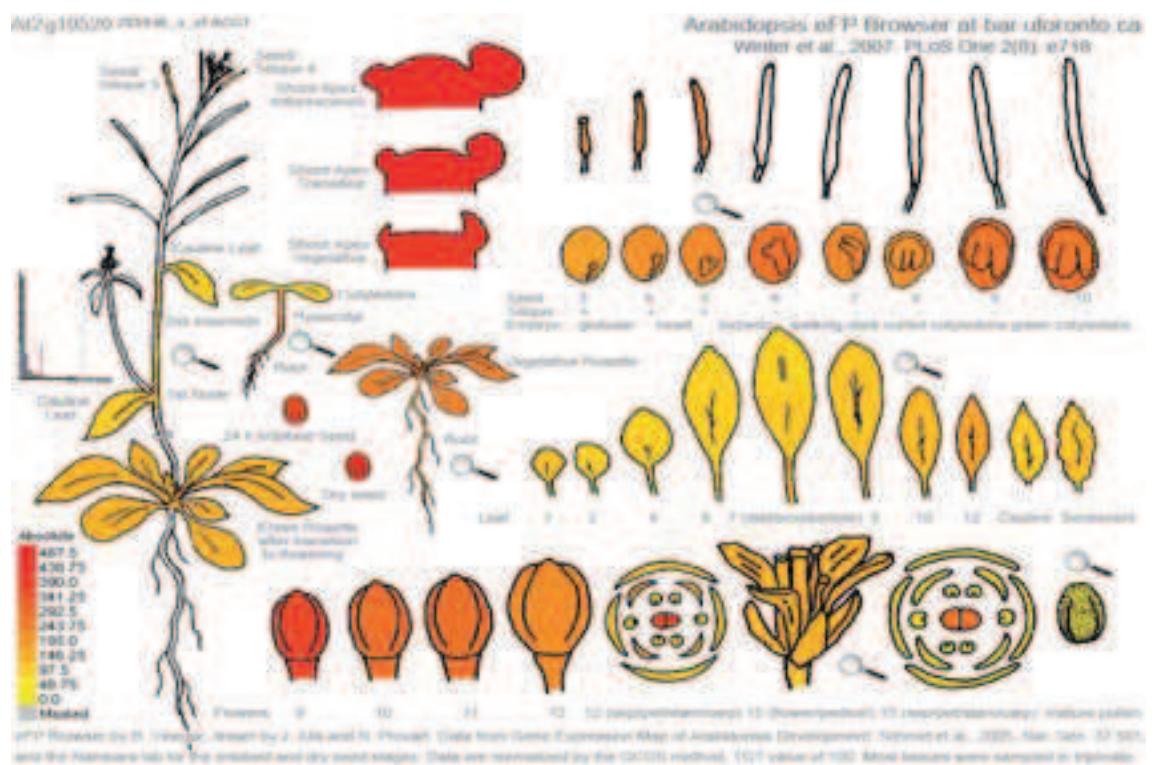
MSI2

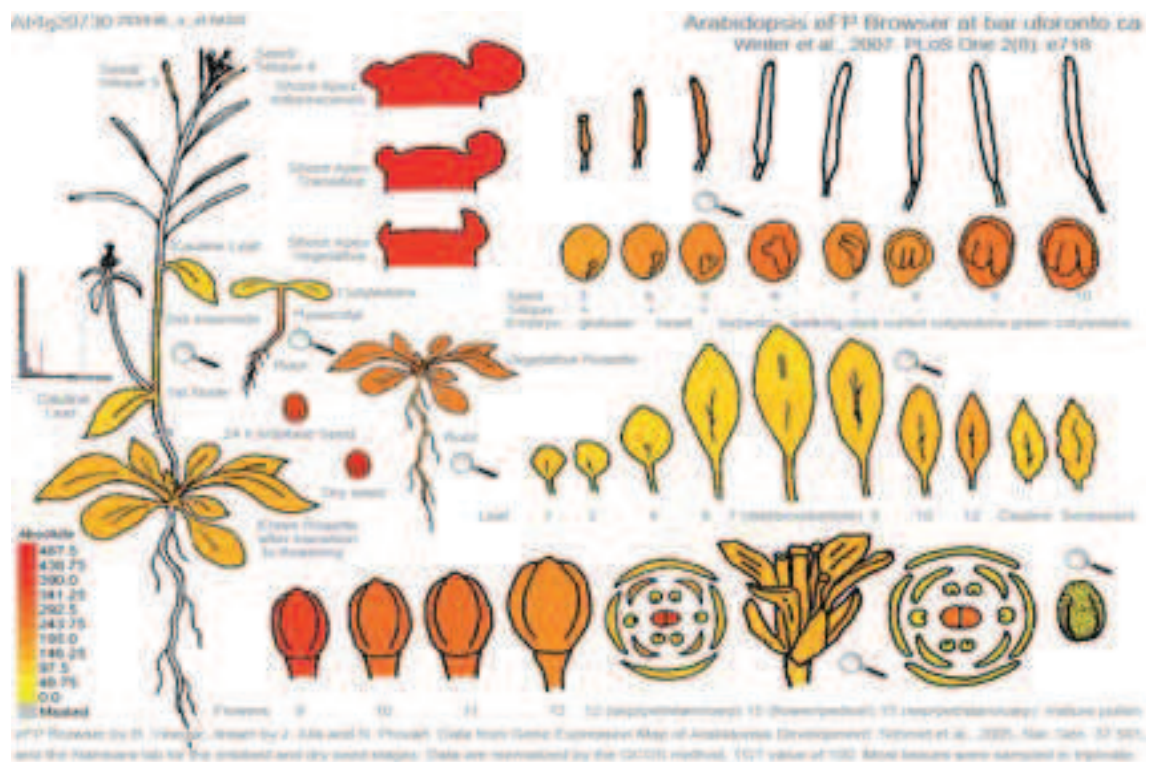


MSI3



MSI4





Annexe 1: L'expression des MSI.

Les données de transcriptomique des gènes d'*Arabidopsis* par « microarray » sont disponibles sur le site TAIR eFP browser (at.bar.utoronto.ca; Winter et al., 2007). Elles sont basées sur les données de publication Schmid et al., 2005 et Brady et al., 2007. L'échelle de la palette de couleur représentant l'intensité de l'expression en niveau absolu d'expression est placée en bas à gauche de la coupe racinaire aux différents stades de développement.



Annexe 2 : Gel-filtration d'un extrait total de protéines issu (ou issues) de cellules en culture d'*Arabidopsis thaliana* Ler. Un volume égal de chaque fraction après précipitation au TCA est séparé sur un gel SDS6PAGE 10% et soumis à une analyse avec un anticorps@Cul4 (blot supérieur), utilisé au 1000ème, un anticorps @MSI3 (blot du milieu), utilisé au 1000ème et un anticorps @MSI4, (blot inférieur) utilisé au 10 000ème. Les poids moléculaires correspondant à chaque fraction ne sont pas indiqués car la colonne HiPrep 26/60 Sephacryl S-300 HR n'a pas été calibrée avec des marqueurs connus.

Noms	Séquences
MSI1 Fw	5' TGTGGTTGCTCATTCGATGGT 3'
MSI1 Rv	5' GCGGTGCTTAGCTTCCGTAGA 3'
MSI2 Fw	5' GGATGCCGCGGACATCAA 3'
MSI2 Rv	5' TCAGAAACTGGCTAAAGCAAG 3'
MSI3 Fw	5' TGAGGATGATGATGATGAAGG 3'
MSI3 Rv	5' TCATCCGCCAAAGACTTGA 3'
MSI4 Fw	5' ATGTTATGACTTGTGCCTCC 3'
MSI4 Rv	5' AACCCGCATTAGTTTACCA 3'
MSI5 Fw	5' GTCCTGACAGAGCTAGAGAA 3'
MSI5 Rv	5' AGACATGATGGGATTGCTT 3'
PHD Fw	5' ATTCCGAAAGAATGTCTGAACCG 3'
PHD Rv	5' GGATCATCCTCTGGAACAAACGTA 3'
CUL4 Fw	5' TCCAGGACCGACAATACCAGA 3'
CUL4 Rv	5' GCTCAGTGATTAGAAGAGTATGGCTCA 3'
DDB1a Fw	5' TCAAAGCAATACCAATAAGACCTTCC 3'
DDB1a Rv	5' TCGTGCGTTATAACAAGCAGATGA 3'
DDB1b Fw	5' CGGCTTGTTTAAGGTCATTCCA 3'
DDB1b Rv	5' TCGTGCATCCATACAGAACTTGA 3'
CHR11 Fw	5' CGGGAGAGAAAGCGCAACTA 3'
CHR11 Rv	5' AACTGGAAATCGTGCAACTGG 3'
CHR17 Fw	5' TGCCCCAATTGCATGATTTT 3'
CHR17 Rv	5' TCATTTGAGTTTTCTGATGTGCTTG 3'
H4 Fw	5' GATGCTGTCACTTACACCGA 3'
H4 Rv	5' GTAAAGAGTCCTTCCTTGCCT 3'
CYCD3;1 Fw	5' GACTTAAGAACAATGCTCACTG 3'
CYCD3;1 Rv	5' GTAAACCGATGCGGTCCACTG 3'
H4b Fw	5' CCTTTAGAAAATGTCAGGTCGTGG 3'
H4b Rv	5' TAACACCACCTCTACGAGCC 3'
CDT1a Fw	5' ATGAGTACACCAGGCTCTTCTA 3'
CDT1a Rv	5' TTCTCTTTCTCTGCATTTTGTGA 3'
ORC1b Fw	5' AAAAAGTCTGGTCAAAGTCAAACA 3'
ORC1b Rv	5' TCAAACCTCCTCGCTTACTCTTCAA 3'
CYCA2;1 Fw	5' CGCTTCAGCGGTTTTCTTAG 3'
CYCA2;1 Rv	5' ATCCTCCATTGCAAGTACCG 3'
CYCB1;1 Fw	5' CAGACCATGCATACAGTCAC 3'
CYCB1 ;1 Rv	5' TCCTAACTCCTAAGCAGATTC 3'

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des oligonucléotides utilisés en qPCR.

Noms	Séquences	Combinaisons Génotypage
msi1-1 LH135	5' GATTCTAGGGTTATAACG 3'	WT : LH135 + LH136 T-DNA: LH136 + LB3
msi1-1 LH136	5' GATGCCATGCAACATCTTCCAC 3'	
RP msi2-1	5' CCCTGGAGATTCTTCGTTTTG 3'	WT: RP + LP T-DNA: RP + T-DNA Gabi
LP msi2-1	5' GTGGAGTCTGAGGAAGCTGTG 3'	
LP msi3-5	5' TCTGATATCTTGGCCTTGTGG 3'	WT: RP + LP T-DNA: RP + SK Tail L3
RP msi3-5	5' TGAGGCTAATGGGACATGAAC 3'	
LP msi5-5	5' AAGCAGACTGGTGAAGGT 3'	WT: RP + LP T-DNA: RP + LB3
RP msi5-5	5' GCACGCTCAGACTTCT 3'	
LP chr11-1	5' GTCAGAGGAGGAAGAAGAGC 3'	WT: RP + LP T-DNA: RP + T-DNA Gabi
RP chr11-1	5' GAAGCGTCTTCCCCAGACC 3'	
LP chr11-2	5' GTCAGAGGAGGAAGAAGAGC 3'	WT: RP + LP T-DNA: RP + T-DNA Gabi
RP chr11-2	5' CACCATATGGGGACCATTGATTCC 3'	
LP chr17-1	5' CAGCACCAACTATCGGCTTC 3'	WT: RP + LP T-DNA: RP + T-DNA Gabi
RP chr17-1	5' GCCAACTTCTTGTAAGCTCTC 3'	
LP chr17-2	5' ATACTGGTGGTGACGAACGAG 3'	WT: RP + LP T-DNA: RP + T-DNA Gabi
RP chr17-2	5' GCAGTTAAGGGATCTCCAAC 3'	
LP chr17-3	5' GGAGGCACACGGTTGCTCAC 3'	WT: RP + LP T-DNA: RP + T-DNA LBb1.3
RP chr17-3	5' GGACCAGGCTCCGCACCCTG 3'	
LB3 Sail	5' TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTCGATACAC 3'	
T-DNA Gabi	5' CCATTTGGACGTGAATGTAGACAC 3'	
SK TAIL L3 msi3-5	5' ATACGACGGATCGTAATTTGTCG 3'	
T-DNA LBb1.3	5' ATTTTGCCGATTTGCGAAC 3'	

Annexe 4 : Tableau récapitulatif des oligonucléotides utilisés pour le génotypage.

Noms	Utilisation	Séquences
M2M3miR-s	clonage amiR	5'gaTACTCAAAAGATAACCCTCGTtctctcttttgattcc3'
M2M3miR-a	clonage amiR	5'gaACGAGGGTTATCTTTTGAGTAtcaaagagaatcaatga3'
M2M3miR*s	clonage amiR	5'gaACAAGGGTTATCTATTGAGTTtcacaggtcgtgatatg3'
M2M3miR*a	clonage amiR	5' gaAACTCAATAGATAACCCTTGTtctacatatattcct3'
M4M5miR-s	clonage amiR	5'gaTAAATCAAGTCACTCATGCGCtctctcttttgattcc3'
M4M5miR-a	clonage amiR	5'gaGCGCATGAGTGACTTGATTTAtcaaagagaatcaatga3'
M4M5miR*s	clonage amiR	5'gaGCACATGAGTGACATGATTTTtcacaggtcgtgatatg3'
M4M5miR*a	clonage amiR	5'gaAAAATCATGTCACTCATGTGCTctacatatattcct3'
att B1 MSI2	clonage	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTGGTGTGTGGAGAGTCAAG 3'
att B2 MSI2	clonage	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATCTCTCTCGCCTCTCAATC 3'
att B1 MSI3	clonage	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCATGGAAGCTCCAAGAGACAC 3'
att B2 MSI3	clonage	5' GGGGACCACTTTGTACAAGCTGGGTCACTCTCTCTCTCGCTCTCGTAC 3'
att B2 MSI2 w/o stop	clonage	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGATTGATTGTTGTGTAATAT 3'
att B2 MSI3 w/o stop	clonage	5' GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCTGGTTTTTCATTGG 3'
attB1 MSI3 ATG	clonage	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCGGCAGAAGAGGGTAAAG 3'
attB1 MSI2 ATG	clonage	5' GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATGGCAGATGAAGGTAAGGAGG 3'

Annexe 5 : Tableau récapitulatif des oligonucléotides utilisés pour le clonage.

**Deux sous-unités du CRL4 et potentiels régulateurs
chromatiniens chez *Arabidopsis thaliana*.**

La dégradation sélective des protéines par le mécanisme ubiquitine et protéasome 26S dépendant est conservée chez tous les eucaryotes. Les E3 ubiquitine ligases sont les derniers acteurs de la cascade d'ubiquitylation et sont responsables de la sélection spécifique des protéines cibles pouvant conduire à leur dégradation. Les enzymes E3 de type CRL4 forment des complexes multiprotéiques dont les récepteurs de substrats sont appelés DCAF pour DDB1-CUL4 Associated Factor. Les études réalisées chez les mammifères et les levures ont permis d'identifier une signature spécifique des DCAF : le motif WDxR à la fin d'un domaine WD40 qui est nécessaire à l'interaction avec DDB1 et distingue les DCAF des autres protéines WD40. L'analyse bioinformatique a montré l'existence de plus de 85 DCAF potentielles chez *Arabidopsis thaliana*. Parmi ces récepteurs, nous nous sommes intéressés à une petite famille multigénique de cinq membres appelée MSI1 (Multicopy Suppressor of IRA1) à MSI5. Des études précédentes ont permis de montrer que MSI1 et MSI4 participaient chacune à un complexe CRL4 différent capable d'interagir fonctionnellement avec des complexes PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2), des complexes chromatiniens qui régulent de façon épigénétique la répression de la transcription de certains gènes. Le rôle des autres membres de la famille MSI d'*Arabidopsis*, en particulier MSI2 et MSI3, était encore inconnu.

Les résultats obtenus et décrits dans ce manuscrit mettent en évidence une interaction physique entre les protéines MSI2 (et MSI3) et DDB1a suggérant l'existence d'un complexe multimérique de type CRL4 incluant CUL4. L'interrogation des données publiques confrontées à nos données expérimentales, nous a permis d'établir que l'expression des deux gènes était régulée de manière cycle cellulaire dépendante. De plus, un mutant perte de fonction *msi3* présente un phénotype de retard de croissance suggérant une fonction de contrôle de la prolifération cellulaire. D'autre part, la capacité des protéines MSI2 et MSI3 d'interagir avec des régulateurs chromatiniens identifiés dans le cadre de ce travail sera discutée. Toutefois, le rôle exact de ces protéines et les cibles potentielles de complexes CUL4-DDB1MSI2/MSI3 restent à déterminer.

Mots-clés : *Arabidopsis*, ubiquitine, CRL4, MSI, cycle cellulaire, chromatine

Selective protein degradation by the UPS (Ubiquitin Proteasome System) is highly conserved in all eukaryotes. The E3 ubiquitin ligases are the last actors in the ubiquitylation pathway and target specifically the proteins for degradation. Note that non-proteolytic functions of ubiquitylation are also known. CRL4 E3 ligases form multiprotein complexes where the substrate receptors are called DCAFs for DDB1-CUL4 Associated Factors. Studies made in mammals and yeast allowed to highlight a characteristic signature for the DCAFs: the WDxR motif at the end of a WD40 domain. This motif is required for interaction with DDB1 and distinguishes DCAFs from other WD40 proteins. Bioinformatic studies could identify around 85 potential DCAFs in *Arabidopsis thaliana*. Among those substrate receptors, we were interested in a small multigenic family of five members called MSI1 (Multicopy Suppressor of IRA1) to MSI5. Previous studies showed that two members of this family MSI1 and MSI4 belong to different CRL4 complexes functionally connected to PRC2 complexes (Polycomb Repressive Complex 2) that were known to repress gene expression at the epigenetic level. The function of the other members of the *Arabidopsis* MSI family and in particular MSI2 and MSI3 remained unknown.

The results obtained and described in this manuscript highlight a physical interaction between MSI 2 (and MSI3) with DDB1a suggesting the existence of a multimeric CRL4 complex including CUL4. Furthermore, bioinformatics as well as experimental data, allowed us to establish that MSI2 and MSI3 gene expression are cell cycle regulated. Moreover, phenotypic analysis of an *msi3* loss of function mutant showed delayed growth suggesting a function of this gene in cell proliferation. Moreover, the ability of MSI2 and MSI3 to interact with chromatin regulators identified in the frame of this work will be discussed. Though the exact function of these proteins as well as their targets in the frame of CUL4-DDB1MSI2/MSI3 complexes remains to be determined.

Keywords: *Arabidopsis*, ubiquitin, CRL4, MSIs, cell cycle, chromatin