

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP) - UPR 2357

THÈSE présentée par :

Naomie GENTRIC

soutenue le : **13 novembre 2020**

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

Discipline/ Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

**Entre cycle cellulaire et réponse aux dommages à l'ADN:
Fonctions de la protéine F-box FBL17
chez *Arabidopsis thaliana***

THÈSE dirigée par :

M. Pascal GENSCHIK

Directeur de recherches, CNRS

RAPPORTEURS :

M Crisanto GUTIERREZ

Professeur, CSIC

Mme Cécile RAYNAUD

Directeur de recherches, CNRS

AUTRES MEMBRES DU JURY :

M Wen Hui SHEN

Directeur de recherches, CNRS

Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été subventionné par la Région Grand Est ainsi que le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS). L'ERC PHAGORISC, l'ANR RHID et le Labex NETRNA ont permis d'apporter une aide financière pour la réalisation des différentes expériences.

J'exprime ma gratitude aux membres du jury sollicités, les docteurs Crisanto Gutierrez, Cécile Raynaud et Wen Hui Shen, d'avoir accepté d'examiner et de discuter du travail réalisé durant ces trois années de Thèse.

Merci à Pascal Genschik de m'avoir accueillie dans son équipe pendant le Master puis en Thèse. Je remercie également Esther Lechner de m'avoir encadrée lors du projet VégéLab et fait découvrir le monde des ubiquitines.

Je tiens tout particulièrement à exprimer ma reconnaissance à mon encadrante, Sandra Noir, pour ces trois dernières années. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné cette opportunité. Merci pour tes nombreux conseils, tes encouragements et ta présence. Tu as toujours su trouver du temps pour moi malgré un emploi du temps très chargé. Merci de ne pas avoir perdu patience avec mes fautes de Français et d'Anglais lors de tes corrections. Merci de m'avoir fait découvrir le projet FBL17 qui m'a fait prendre conscience que parfois le plus important se trouve dans les petites choses pointues, brillantes et rares et pour ces centaines d'heures passées à chercher ces quelques mutant *fbl17*.

Enfin, je remercie tous les membres du Labo 612, anciens et actuels, Pascal, Sandra, Esther, Marie-Claire, Thomas, Imma, Misha, Aleks, Juliette, Marion, Marieke, Thibaut, Adrien, Maxime, Katia, Simon, Corado et Robin, qui ont contribué à travers leurs explications, leurs discussions, leur bonne humeur et leur bienveillance au bon déroulement et à la réussite de ma thèse.

Merci à toutes les personnes qui m'ont apporté un soutien technique lors de ce projet. Marie-Edith pour ses explications et ses conseils dans le domaine des dommages à l'ADN. Phillipe, Lauriane et Johanna pour leur travail et leur implication avec les expériences d'IP-MS.

Malek et Sandrine pour leur aide et leur investissement pour le séquençage, les qPCR et surtout le projet RNAseq. Valérie pour ses analyses de bio-informatique. Et enfin, à Jérôme et Mathieu pour les formations, les explications et l'aide qu'ils m'ont apportées dans le domaine de la microscopie.

Je remercie ma famille de Strasbourg, la famille Glouton, toujours partante pour boire un verre et tester de nouveaux Restaurants. J'ai adoré nos soirées « Cocktail » ou « Raclette », les soirées Jeux et les Escape Game, nos balades et notre passion pour les Tiki Ginger. Merci pour tous ces bons moments. Merci à Aude pour ta bienveillance et à Camille pour mettre un peu de couleur dans nos vies. Merci à Alex pour tous les supers jeux qu'il a inventé. Mention spéciale à Laura et Marcel, mes compagnons de l'IBMP durant ces trois années. Merci Laura pour toute ta gentillesse et nos soirées séries, et un grand merci à Marcel d'avoir été présent pour moi depuis le Master. Merci pour ta bonne humeur et ton énergie... !! La vie est Belle !!

Enfin je remercie de tout cœur ma famille sans qui je n'aurais jamais pu arriver jusque-là. Merci à mes grands-parents, à mon frère Pierre-Emmanuel, à ma sœur et son mari Evodie et Gaëtan, aux petits nouveaux arrivés durant cette thèse, Letty et Tim. Merci particulièrement à mes parents d'avoir toujours été présents, de m'avoir soutenu et d'avoir su trouver les mots quand ça n'allait pas malgré la distance. Merci pour votre aide, pour les fous rires et pour tout l'amour que vous m'avez apportés. Merci d'être une Famille si Fantastique.

Table des Matières

Abréviations.....	6
PARTIE 1 : Introduction	9
Chapitre 1 : La Protéolyse Ubiquitine-Dépendante.....	10
I L'ubiquitine.....	10
II La cascade d'ubiquitination.....	11
II.A E1, l'enzyme activatrice de l'Ub	12
II.B E2, l'enzyme de conjugaison de l'Ub	12
II.C E3, l'enzyme Ub ligase	13
II.C.1 La famille des enzymes HECT.....	14
II.C.2 La famille des enzymes RING.....	15
II.C.2.a La classe des CRL.....	15
II.C.2.b Le complexe APC/C.....	17
II.C.3 La famille des enzymes U-box	18
III La dégradation <i>via</i> le protéasome	19
Chapitre 2 : La régulation du cycle cellulaire.....	21
I Les cycles cellulaires.....	21
I.A Les 4 phases du cycle cellulaire mitotique	21
I.B L'endoréduplication ou endocycle	22
II Le complexe DREAM	23
II.A La protéine RBR (RETINOBLASTOMA-RELATED).....	23
II.A.1 RBR, une plateforme pour de multiple interactions protéiques.....	24
II.A.2 Les modifications post-traductionnelles de RBR.....	25
II.B L'activation et la répression des gènes.....	27
II.B.1 Les facteurs de transcription MYB.....	27
II.B.2 Les facteurs de transcription E2F et leur partenaire DP	28
II.B.3 La régulation du cycle par Rb et les E2F canoniques.....	29
III Les CDK régulent la progression du cycle	32
III.A Les CDK	32
III.B La régulation de l'activité des CDK	33
III.B.1 Les complexes CDK-cyclines	34
III.B.2 Les phosphorylations des CDK.....	35

III.B.2.a Les kinases activatrices des CDK (CAK)	35
III.B.2.b Phosphorylations inhibitrices des CDK	36
III.B.3 Les inhibiteurs des CDK	37
Chapitre 3 : La réponse aux dommages à l'ADN	40
I Les stress génotoxiques.....	40
I.A Les stress endogènes.....	40
I.A.1 Production d'espèces réactives de l'oxygène	40
I.A.2 La réplication de l'ADN	41
I.B Les stress exogènes	41
I.B.1 Les rayonnements	42
I.B.2 Les agents chimiques.....	42
I.B.2.a La Zéocine (zeocin).....	43
I.B.2.b L'Hydroxyurée.....	43
I.B.2.c La Cisplatine	44
II Les réponses aux dommages à l'ADN	44
III La voie de signalisation de la DDR.....	46
III.A Les senseurs.....	46
III.A.1 Le complexe MRN.....	46
III.A.2 Le complexe KU70-KU80	47
III.A.3 Le complexe RPA	47
III.A.4 Le Complexe 9-1-1	48
III.B Les transducteurs.....	49
III.C Les médiateurs.....	50
III.D Les effecteurs	51
III.D.1 SOG1 est un facteur de transcription clef de la réponse aux dommages à l'ADN chez les plantes	52
III.D.2 La régulation de SOG1.....	52
III.D.3 L'activation des réponses aux dommages à l'ADN par SOG1	53
IV Implication des acteurs du cycle cellulaire dans la réponse aux dommages à l'ADN	54
Chapitre 4 : La protéine FBL17 chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
I La protéine F-box-like 17, FBL17	57
II FBL17 et les transitions du cycle cellulaire.....	59
III FBL17 et l'endoréplication	60
IV FBL17 et la machinerie de réplication	60
Les objectifs du projet de recherche doctoral.....	62

PARTIE 2 : Résultats	63
Chapitre 1 : Etudes des partenaires protéiques de FBL17	64
I Identification de l'interactome de FBL17	64
II La relation entre FBL17, les membres du complexe DREAM (RBR1 et E2Fb) et E2Fa	68
III Conclusion	71
Chapitre 2 : Implication de FBL17 dans la réponse aux dommages à l'ADN.....	72
I Le mutant <i>fb17</i> présente une DDR constitutive.....	84
I.A Caractérisation des lésions de l'ADN par détection des événements de recombinaison homologue	84
I.B Contribution de E2Fa et des composants du complexe DREAM dans les phénotypes du mutant <i>fb17</i>	85
II Caractérisation des fonctions de FBL17 dans la voie de la DDR	87
II.A.. Identification de l'interactome de FBL17 en condition de stress génotoxique	87
II.B Régulation de FBL17 et RBR1 au niveau des foci	90
II.C Régulation des acteurs de la DDR par FBL17	91
II.C.1 La relation FBL17-SOG1	91
II.C.2 La relation FBL17-BRCA1	92
II.C.3 La relation entre FBL17 et les kinases de la DDR.....	94
III Conclusion chapitre 2.....	95
PARTIE 3 : Discussion et Perspectives	97
I La caractérisation de la protéine F-box FBL17	98
I.A L'interactome de FBL17.....	98
I.A.1 FBL17 et le complexe DREAM	98
I.A.1.a En condition standard	98
I.A.1.b Dans un contexte DDR.....	103
I.A.2 L'absence des interactants connus	105
I.B La régulation de la protéine F-box FBL17	105
I.B.1 Les phosphorylations.....	106
I.B.2 L'ubiquitination.....	107
II Les Responsables de la DDR constitutive chez <i>fb17</i>	109
III La protéine F-box FBL17 et <i>Physcomitrella patens</i>	111
PARTIE 4 : Matériels et Méthodes	113
Chapitre 1 : Matériels	114

I	Matériel végétal	114
II	Souches Bactériennes	114
III	Vecteurs et constructions binaires	114
IV	Anticorps utilisés pour les Western Blots et l'immunomarquage.....	115
V	Composés chimiques et antibiotiques	115
	V.A Antibiotiques et herbicides de sélection des bactéries/plantes.....	115
	V.B Composés chimiques appliqués sur les plantes	116
	V.C Microscope confocal	116
Chapitre 2 : Méthodes		117
I	Condition de culture.....	117
	I.A Culture en <i>in vitro</i>	117
	I.B Sur terre	117
II	Analyse phénotypique.....	117
	II.A Etude de l'élongation racinaire	117
	II.B L'étude de la mort cellulaire.....	118
III	Analyse des acides nucléique.....	118
	III.A Extraction de l'ADN pour le génotypage	118
	III.B Amplification de l'ADN par PCR.....	118
	III.C Extraction des ARN et traitement à la DNase.....	119
	III.D Quantitative real-time PCR	119
	III.E Séquençage des ARN	119
	III.E.1 Isolation d'acide nucléique	119
	III.E.2 Préparation de bibliothèque d'ADNc.....	120
	III.E.3 Séquençage et analyse de données.....	120
IV	Analyses protéiques.....	121
	IV.A Western Blot	121
	IV.A.1 Extraction protéique	121
	IV.A.2 Quantification protéique (Popov et al., 1975)	121
	IV.A.3 Immunodetection par Western Blot.....	121
	IV.B Immunomarquage.....	122
	IV.C Co-immunoprécipitation et Spectrométrie de Masse de partenaires protéiques	122
	IV.C.1 Condition de culture et traitement	122
	IV.C.2 Extraction protéique.....	123
	IV.C.3 Immunoprécipitation	123
	IV.C.4 Spectrométrie de masse.....	124
V	Construction de nouvelles lignées	124

V.A Technologie GateWay	124
V.B Purification des plasmides et séquençage	125
V.C Transformation bactérienne	125
V.C.1 La transformation des TOP10 par choc thermique.....	125
V.C.2 La transformation des <i>A.tumefaciens</i> par électroporation.....	126
V.C.3 Agro-transformation de plantes d'Arabidopsis.....	126
Bibliographie.....	127
Annexes	150

Abréviations

9-1-1	RAD9-RAD1-HUS1
-/-	Homozygote (2 allèles mutants)
+/-	Hétérozygote (1 allèle sauvage et 1 allèle mutant)
°C	Degrés Celsius
aa	Acide aminé
ABA	Acide abscissique
adjp	Valeur P ajustée
ADN	Acide désoxyribonucléique
APC/C	Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome
ARM	Armadillo repeat
ARN	Acide ribonucléique
ASK	Arabidopsis SKP homolog
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATP	Adénosine TriPhosphate
ATR	Ataxia-Telangiectasia Related
Atrip	ATR-Interacting Protein
BET	Bromure d'éthidium
Brca1	Breast Cancer 1
BTB	Broad complex/Tramtrack/Bric-à-brac
CC-MB	Coiled-Coil Marked Box
CDC6	Cell Division Cycle 6
CDK	Cyclin-Dependant Kinase
CDT1	Cdc10-Dependent Transcript 1
ChAP	Chromatin affinity purification
ChIPseq	Chromatin immunoprecipitation sequencing
Cip/Kip	CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein
CKI	CDK inhibitor
Col-0	Ecotype Columbia
CRL	Cullin Ring Ligase
Cu ²⁺	Cuivre
CUL	Cullines
CYC	Cycline
Cys	Cystéines
D-box	Destruction-box
DDR	DNA damage response
DP	Dimerisation Partner
DSB	Double strand break
DWD	Damaged-DNA-binding1-binding/WD-40 domain
E	Glutamate
E2F	Adenovirus Early Gene 2 Binding Factor
E6-AP	E6-Associated Protein
F	Phénylalanine
FBL17	F-box-like 17
Fe ²⁺	Fer

G1/G2	Gap1 et Gap2
GO	Gene ontology
GUS	β -glucuronidase
h	Heure
H2O2	Peroxyde d'hydrogène
HECT	Homologous to E6-associated protein C-Terminus
His	Histidines
HO•	Radical hydroxyle
HR	Homologous Recombination
HTB1	Histone Two B1
HU	Hydroxyurée
ICK/KRP	Interactor/Inhibitor of CDK/Kip-related inhibitor
INK4	INHibitors of CDK4
IP-MS	Immunoprécipitation associée à de la spectrométrie de masse
IR	Rayonnements ionisants
K	Lysines
kDa	Kilos Dalton
LB	Luria Bertini
Lig4	Ligase IV
LRR	Leucine-Rich Repeat
MCM	MiniChromosome Maintenance
Mdc1	Mediator of DNA damage checkpoint protein 1
mg	Milligramme
miRNA	Micro-ARN
ml	Millilitre
MLN	MLN4924
mM	Millimolaire
mm	Millimètre
Mre11	Meiotic Recombination 11 Homolog 1
MRN	Mre11-Rad50-Nbs1
MS	Murashide et Skoog
MSA	Mitosis-Specific Activator
MuVB	Multi-Vulva class B
N	Asparagine
NAC	NAM, ATAF1/2, CUC2
NBS1	Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1
NDX	Nodulin homeobox
ng	nanogramme
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
O ₂ ⁻	Anion superoxyde
O ₂	Dioxygène
OE	Overexpressed
ORC	Origin Recognition Complex
ORI	Origines de réplication
P	Proline
Phases M	Mitose
Phases S	Phase de synthèse

Pol	DNA polymérase
PRC1	Polycomb Repressive Complex1
Pro	Proline
PTM	Post Translational Modification
PUB	PLANT U-BOX
Rb	Retinoblastoma
RBD	Rb-binding domain
RBR	Rb-Related
RBX1	RING BOX-1
RD21A	Responsive to Dessiccation 21A
RING	Really Interesting New Gene
ROS	Reactive Oxygen Species
RPA	Replication Protein A
rpm	Rotation par minute
RUB	Related to UBiquitin
SA	salicylic acid
SCF	Skp1-Cullin-F-box
Ser	Sérine
SH3P	Sarc Homology 3 Of Plant
SHR	Recombinaisons homologues somatiques
SKP	S-phase kinase-associated Protein
SMR	SIAMESE-related ou SIM-related
SNI1	Suppressor of NPR1-1, Inducible
SOG1	Suppressor of gamma response 1
SQ	Sérine-glycine
SSB	Single Strand Break
SUMO	Small Ubiquitin-like Modifier
TChAP	Tandem Chromatin Affinity Purification
TF	Transcription factor
Thr	Thréonine
Ub	Ubiquitine
UBA	Ubiquitin Activating
UBC	Ub-Conjugating
UPL	Ubiquitin Protein Ligase
UPS	Ubiquitin dependent Proteolysis System
UV	Ultraviolet
v/v	Volume/volume
w/v	Poid/volume
WD repeat	Tryptophane-acide aspartique
WHY	Whirly
Xrcc4	X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 4
Zn	Zinc
α	Alpha
γ	Gamma

PARTIE 1 :

Introduction

Chapitre 1 : La Protéolyse Ubiquitine-Dépendante

En 1975, Gideon Goldstein découvre une nouvelle molécule présente de façon universelle chez tous les Eucaryotes, l'ubiquitine (Goldstein et al., 1975). La caractérisation de cette dernière permettra l'une des plus importantes découvertes scientifiques de la fin du 20^{ème} siècle, celle du Système de la Protéolyse Ubiquitine-dépendante (*Ubiquitin dependent Proteolysis System* ou UPS), qui valut à Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose, le prix Nobel de chimie en 2004 (pour revue, Hershko, 2005; Varshavsky, 2006; Kresge et al., 2006).

La protéolyse ubiquitine-dépendante est la combinaison d'une modification post-traductionnelle (l'attachement de l'ubiquitine sur une protéine cible), et de la dégradation sélective de cette protéine par le protéasome 26S, permettant une régulation fine des pools protéiques au sein des organismes. La caractérisation de l'UPS ces 30 dernières années a permis de mettre en évidence son implication dans tous les aspects de la vie des organismes, tels que le développement, la croissance, la régulation du cycle cellulaire, l'expression des gènes ou la réponse aux stress (Hershko et Ciechanover, 1998; Hershko, 2005). Cependant, l'UPS semble avoir une importance particulière au sein des plantes puisque près de 5% du génome lui est dédié, chez *Arabidopsis thaliana*, contre seulement 1% pour le protiste *Naegleria gruberi* et 4% chez les mammifères (*Homo sapiens* ; Du et al., 2009; Vierstra, 2009; Zuin et al., 2014).

I L'ubiquitine

Du nom latin *ubique* signifiant « partout » et « sans exception », l'ubiquitine (Ub) est présente à tous les niveaux tissulaires et subcellulaires (noyau, cytoplasme et structures membranaires) d'un organisme. Ce polypeptide est composé de 76 acides aminés (8,5 kDa ; Goldstein et al., 1975) et présente une structure globulaire compacte composée de 5 feuillets β antiparallèles et d'une hélice α (Vijay-Kumar et al., 1985, 1987). L'Ub possède une glycine à son extrémité C-terminale qui lui permet d'établir des liaisons covalentes avec les lysines (K) d'autres protéines cibles ou avec l'une des 7 lysines internes de l'Ub (K6, K11, K27, K29, K31,

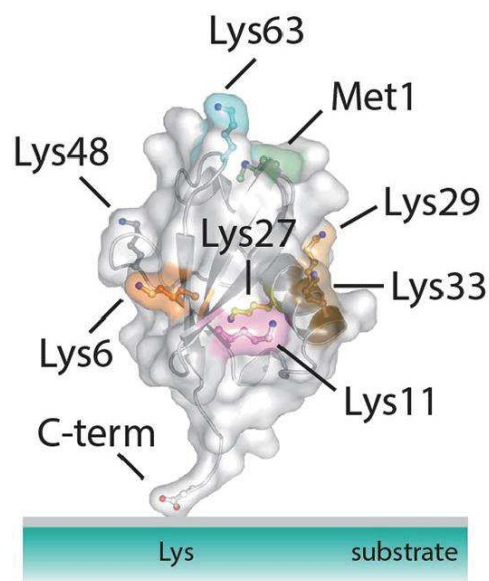


Figure 1.1.1 : L'ubiquitine

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 aa présentant 8 sites d'ubiquitination au niveau des lysines K6, K11, K27, K29, K31, K48 et K63 permettant de générer les chaînes de polyubiquitine, et une glycine en C-terminale pour interagir avec le substrat. Image issue de Swatek et Komander (2016).

K48 et K63) pour former des chaînes poly-Ub (Figure 1.1.1 ; Vijay-Kumar et al., 1985, 1987). Ces chaînes poly-Ub sont très variées et peuvent être de type homotypique, la chaîne ainsi formée se fait par la liaison des Ub au niveau de la même lysine (par exemple les chaînes K48), ou hétérotypique entraînant la liaison de l'Ub via différentes lysines et/ou la formation de branches générant des chaînes d'ubiquitines mixtes. Notons que les protéines Ub-like peuvent aussi se lier à ces chaînes (pour revue Kwon et Ciechanover, 2017).

L'étude de l'Ub au sein des différents règnes Eucaryotes a permis de mettre en évidence une grande conservation de cette dernière (Zuin et al., 2014), d'un point de vue nucléaire, notamment entre les plantes et les animaux (Gausung et Barkardottir, 1986), mais aussi d'un point de vue protéique, où l'Ub ne présente qu'un acide aminé (aa) de différence entre les plantes supérieures (*Arabidopsis*) et les algues (*Chlamydomonas*), 2 en comparaison avec les levures (*Saccharomyces*) et 3 avec les animaux (Callis et al., 1989). L'Ub est codée par plusieurs gènes (4 chez l'Homme et la levure et 12 chez les plantes; Wiborg et al., 1985; Ozkaynak et al., 1987; Callis, 2014) localisés en différents loci et trois classes d'Ub sont distinguées chez les Eucaryotes : la forme homomérique dite poly-Ub issue de la répétition en tandem de la séquence de l'Ub (Sharp et Li, 1987) et 2 classes hétéromériques qui constituent les *ubiquitin-extension proteins* et qui correspondent à une fusion de l'Ub avec, une ou deux petite(s) protéine(s) ribosomale(s) (Finley et al., 1989; Callis et al., 1990), ou avec les protéines *ubiquitin-like* RUB (Related to Ubiquitin ; Callis et al., 1995). Ces Ub homomériques et hétéromériques doivent être clivées par des enzymes de déubiquitination (DUB) pour libérer une protéine Ub active de 76 aa (Callis, 2014; Kalinowska et al., 2016). Chez *Arabidopsis thaliana*, un total de 12 gènes encodent l'Ub, 5 poly-Ub, 5 Ub ribosomales et 2 Ub-RUB (Figure 1.1.2 ; Burke et al., 1988; Sun et Callis, 1993; Callis et al., 1995; Callis, 2014).

II La cascade d'ubiquitination

La cascade d'ubiquitination comprend les étapes permettant la fixation de l'Ub sur la protéine cible. Impliquant 3 enzymes, E1, E2 et E3 (Figure 1.1.2), cette cascade intervient pour toutes les voies impliquant le signal Ub telles que la régulation du cycle cellulaire, la réponse inflammatoire, le trafic moléculaire (protéines, hormones), l'endocytose ou encore l'autophagie (Swatek et Komander, 2016).

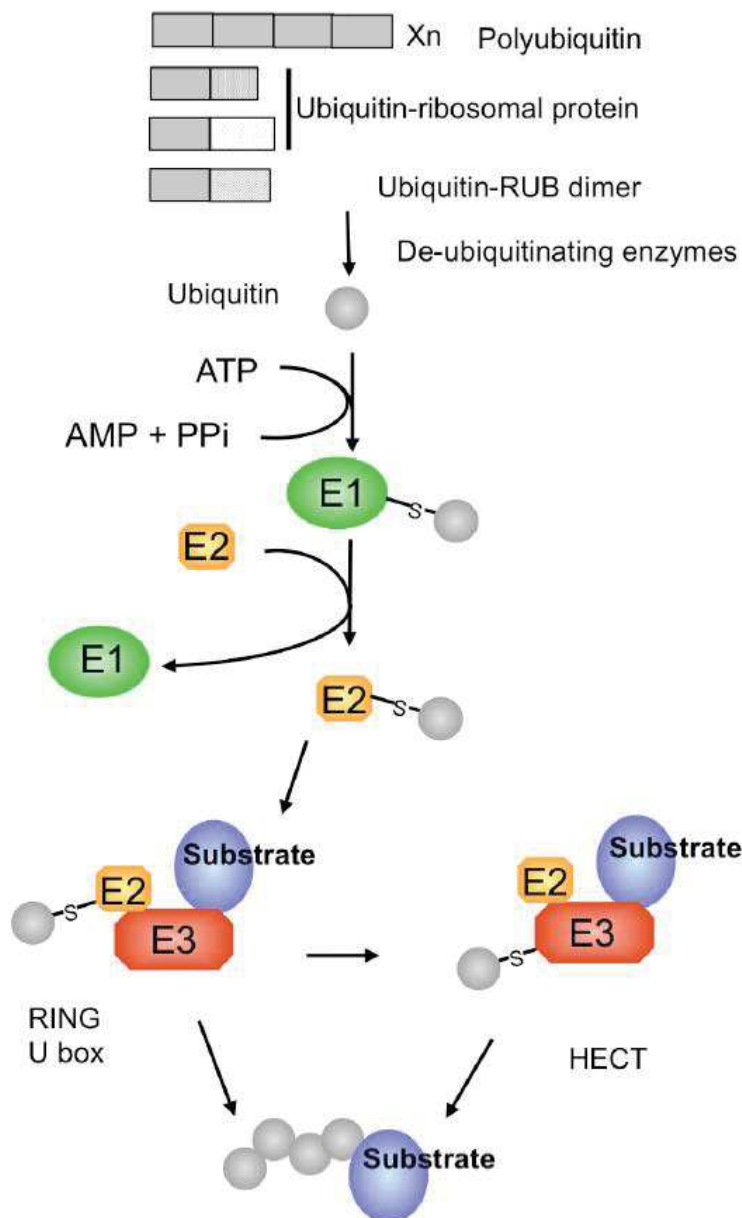


Figure 1.1.2 : La cascade d'ubiquitination

Les gènes *poly-Ub*, *Ub-ribosomal* et *Ub-RUB* codent pour des protéines de fusion qui doivent être clivées par les DUB pour devenir actives. Après être activée, l'ubiquitine est transférée sur un site cystéine actif de l'enzyme E1 entraînant la formation d'une liaison thioester et la libération de l'AMP. Une nouvelle ubiquitine vient alors former une liaison ubiquitine-adénylate sur le site libéré précédemment. Ainsi l'enzyme E1 comporte toujours plusieurs ubiquitines à différents stades d'activation. L'ubiquitine activée est transférée à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2) *via* une transestérification. Le complexe E2-Ub interagit alors avec les enzymes E3 ligases, entraînant l'ubiquitination du substrat. La partie C-ter de l'ubiquitine est alors attachée *via* une liaison isopeptidique à une lysine du substrat. La répétition de ces étapes permettent la mise en place d'une chaîne polyubiquitine. Dans le cas des protéines HECT, l'ubiquitine est d'abord transférée sur la E3 ligase avant d'être conjuguée au substrat. Image modifiée issue de Callis (2014).

II.A E1, l'enzyme activatrice de l'Ub

Au cours de la première étape de cette cascade, l'enzyme E1 active l'Ub de façon ATP (adénosine triphosphate)-dépendante. Une adénylation entre le complexe E1-ATP et l'Ub va permettre le recrutement de cette dernière et la formation d'une liaison thioester entre le groupement carboxyle C-terminal de l'Ub et un résidu cystéine de l'enzyme E1 (Figure 1.1.2 ; Haas et al., 1983; Callis, 2014).

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'enzyme E1 est codée par 2 gènes *UBA1* et *UBA2* (*Ubiquitin Activating 1 et 2*), qui partagent 77% et 80% d'homologie de séquences nucléique et protéique, respectivement (Hatfield et al., 1997). Elles sont largement exprimées et possèdent peu de spécificité pour les enzymes E2 auxquelles elles vont transmettre l'Ub activée. Cependant, la caractérisation des mutants *uba1* et *uba2* a permis de mettre en évidence une différence d'expression entre ces deux gènes. Alors qu'*uba1* présente une plus grande sensibilité aux agents pathogènes, *uba2* se comporte comme le contrôle sauvage (Goritschnig et al., 2007). Cette différence phénotypique s'explique par le fait que, comparé à *UBA2*, *UBA1* s'exprime de façon plus élevée dans de nombreux organes et tissus. Ainsi en absence de *UBA1*, l'Ub ne peut être activée à un niveau maximal, impactant l'efficacité de l'UPS (Zimmermann et al., 2004).

II.B E2, l'enzyme de conjugaison de l'Ub

Les enzymes E2 sont très conservées au sein des règnes Eucaryotes, comme illustré par la similarité des structures cristallines de ces protéines entre *Arabidopsis* et les mammifères, et la présence d'un domaine commun, le domaine UBC (Ub-Conjugating ; Cook et al., 1992b, 1992a). Composé de 150 résidus catalytiques, le domaine UBC présente une structure compacte organisée en 4 hélices α et un feuillet β antiparallèle à 4 brins (Cook et al., 1992b, 1992a; WENZEL et al., 2010). Ce domaine inclut les régions impliquées dans les interactions avec les enzymes E1 et E3 de la cascade d'ubiquitination. Les enzymes E2 vont recevoir l'Ub activée par les E1 en formant une liaison thioester avec cette dernière au niveau du résidu cystéine de E2. L'enzyme E2 a alors deux possibilités, soit elle transfère elle-même l'Ub sur un substrat grâce à une enzyme E3 ubiquitine ligase (E3 ligase), soit elle transfère l'Ub à l'E3 ligase (Figure 1.1.2). Les interactions entre les enzymes E1-E2 et E2-E3 se faisant dans des régions

Tableau 1.1.1 : Liste des membres de la cascade d'ubiquitination chez l'Homme, Arabidopsis et Saccharomyces. Tableau modifié issu de Callis, 2014.

Protéine	<i>Homo sapiens</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ensemble des E3	377 (Medvar et al., 2016)	1500 (Hua and Vierstra, 2011)	
HECT	30 (Medvar et al., 2016)	7 (Callis, 2014)	
RING	331 (Medvar et al., 2016)	490 (Callis, 2014)	47 (Deshaies and Joazeiro, 2009)
U-box	6 (Medvar et al., 2016)	64 (Callis, 2014)	2 (Deshaies and Joazeiro, 2009)
Autres	10 (Medvar et al., 2016)		
Composants liés aux E3 ligases de type CRL			
BTB	169 (Medvar et al., 2016)	80 (Hua and Vierstra, 2011)	5 (Hua and Vierstra, 2011)
Culline	7 (Jiménez-López et al., 2018)	5 (Jiménez-López et al., 2018)	3 (Jiménez-López et al., 2018)
F-box	61 (Medvar et al., 2016)	694 (Gagne et al., 2002; Risseuw et al., 2003)	20 (Hua and Vierstra, 2011)
Autres	53 (Medvar et al., 2016)	Pas de données	Pas de données

du domaine UBC qui se superposent, cela implique la dissociation préalable entre E1 et E2, avant l'interaction entre E2 et E3 (Eletr et al., 2005).

Arabidopsis thaliana possède 48 enzymes E2 identifiées (pour revue, Callis, 2014). Trois d'entre elles ne font pas de lien avec l'Ub mais avec les protéines *ubiquitin-like* telles que les RUB ou les SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier), 8 ne possèdent pas un site cystéine actif nécessaire à la formation de la liaison thioester avec l'Ub, et finalement, 37 E2 présentent ce site cystéine actif et peuvent intervenir dans la cascade d'ubiquitination (Callis, 2014). Ce nombre plus important d'enzymes E2, en comparaison aux E1, s'explique par leur rôle important dans la décision du sort des substrats. En effet, en fonction des lysines internes utilisées pour lier l'Ub (K6, K11, K27, K29, K31, K48 et K63 ; Figure 1.1.1), elles entraînent la formation d'un code qui permet l'activation de diverses fonctions biologiques (Woelk et al., 2007; Swatek et Komander, 2016). Ainsi, la poly-ubiquitination la mieux caractérisée à ce jour est celle de l'ubiquitination en K48 (d'au moins 4 Ub ; Thrower et al., 2000) impliquée dans la dégradation sélective des protéines par le protéasome 26S (Pickart et Fushman, 2004). Cependant, d'autres formes de poly-ubiquitination ont été caractérisées dont notamment la formation des chaînes en K63, associé notamment aux mécanismes d'endocytose, d'autophagie et de réponse aux dommages à l'ADN, qui représentent la seconde forme de polyubiquitination la plus abondante chez les plantes après celle en K48 (Kim et al., 2013; Johnson et Vert, 2016). Une étude récente a permis l'identification des enzymes UBC35 et UBC36 comme les enzymes E2 majeures de la poly-Ub en K63 chez les plantes nécessaire à leur croissance et développement (*Arabidopsis thaliana* ; Romero-Barrios et al., 2020)

II.C E3, l'enzyme Ub ligase

Les enzymes E3 Ub-ligases sont les membres de la cascade d'ubiquitination les mieux caractérisés. En effet, les E3 ligases confèrent la spécificité au système d'ubiquitination en assurant la reconnaissance de la protéine cible. Les gènes codant ces enzymes, pour couvrir la diversité des substrats possibles, ont été largement amplifiés au sein des génomes et représentent les membres les plus nombreux de la cascade, se comptant par centaine ou millier dans les différents règnes Eucaryotes (Tableau 1.1.1; Hotton et Callis, 2008; Hua et Vierstra, 2011; Callis, 2014). Les enzymes E3 ligases sont divisées en 3 groupes distincts en fonction du domaine présent : les HECT, les U-box et les RING. Alors que les HECT

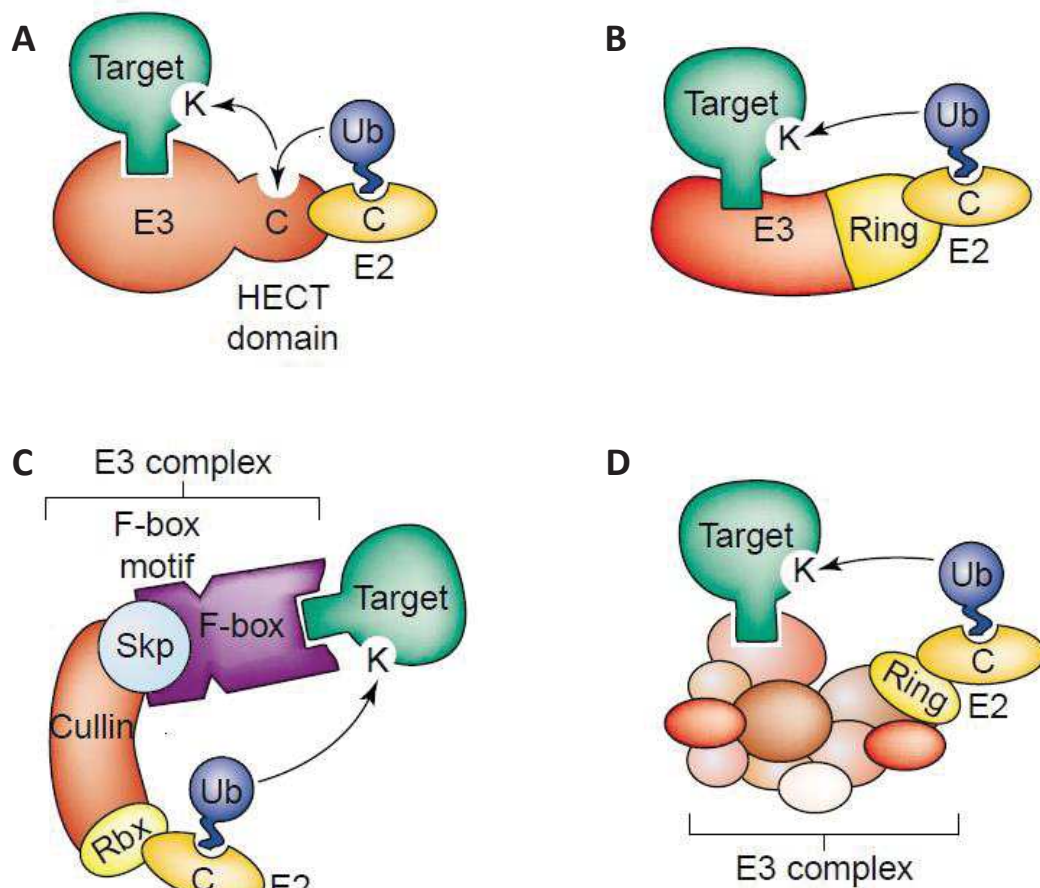


Figure 1.1.3 : Les E3 ligases

Organisation structurale des enzymes E3 ligases de type HECT (A), RING et U-box (B), SCF (C), et le complexe APC (D). La dynamique du transfert de l'ubiquitine du complexe E2-Ub vers le substrat est mis en évidence grâce aux flèches. Image modifiée issue de Vierstra (2003).

(Homologous to E6-associated protein C-Terminus) vont établir une liaison thioester avec l'Ub avant de la transférer sur la protéine cible, les U-box et les RING (Really Interesting New Gene) vont permettre le rapprochement des enzymes E2 des protéines cibles permettant ainsi leur ubiquitination (Figure 1.1.2 et 1.1.3 ; Vierstra, 2009).

Depuis plusieurs années, la caractérisation des protéines ciblées par les E3 ligases a permis de montrer la présence de séquences minimales au sein des protéines, appelée dégron, permettant la reconnaissance et la dégradation des substrats par le système protéolytique (Varshavsky, 1991). Ces dégrons peuvent être intrinsèques et permettent la dégradation des protéines mal repliées ou n'arrivant pas à s'assembler en complexe. L'exemple le plus connu est la boîte de destruction (*Destruction-box* ou *D-box*) des cyclines ciblées par le complexe APC/C (cf Partie 1, Chapitre 2). Les dégrons peuvent aussi être acquis par des modifications post-traductionnelles telles que les phosphorylations, les hydroxylations et les glycosylations (Ravid et Hochstrasser, 2008; Ella et al., 2019). Chez les mammifères, les protéines F-box (cf paragraphe II.C.2.a) ont été particulièrement bien caractérisées pour la reconnaissance des motifs phosphorylés, alors appelés phosphodégron (Jin et al., 2005; Ravid et Hochstrasser, 2008; Skaar et al., 2013). On retrouve notamment la dégradation de CKI par le complexe SCF^{Cdc4} chez la levure et celle de la cycline E par SCF^{Fbw7} chez les mammifères après phosphorylation et donc mise en place de leur phosphodégron (Koepp et al., 2001; Nash et al., 2001). Chez les plantes, le ciblage des phosphodégrons par les protéines F-box n'a pas été aussi bien exploré. Cependant, certaines données suggèrent la conservation de ce mécanisme telle que la dégradation phospho-dépendante de KRP2 (Verkest et al., 2005a).

II.C.1 La famille des enzymes HECT

Les E3 ubiquitine ligases HECT tirent leur nom de la première E3 ligase de ce type analysée chez l'Homme, l'enzyme E6-AP (E6-Associated Protein ; Huibregtse et al., 1991) . Ces HECT comportent une partie N-terminale variable composée de différents motifs fonctionnels impliqués dans la reconnaissance et la conjugaison des substrats, et en C-terminale, le domaine HECT caractéristique de cette famille, qui permet la liaison de l'Ub provenant de l'enzyme E2 *via* une cystéine active (Figure 1.1.3; Rotin et Kumar, 2009). L'étude de la structure de ce domaine chez l'enzyme E6-AP a montré que ce motif est composé de 2 structures lobées séparées par une crevasse où se trouve l'activité catalytique nécessaire à

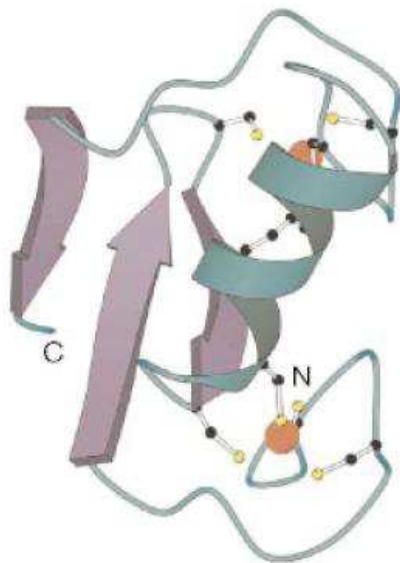
l'interaction avec l'E2 (Huang et al., 1999). Comme pour la majorité des composants du système d'ubiquitination, les E3 ligases de type HECT présentent une grande conservation entre les règnes Eucaryotes (Marín, 2013).

L'implication des E3 ligases de type HECT a été largement étudiée chez l'Homme. Les 30 membres de cette famille (Tableau 1.1.1) ont été caractérisés pour leurs rôles dans de nombreux processus cellulaires clefs tels que la signalisation, le trafic protéique, la réponse virale, la réponse aux dommages à l'ADN et ont été impliqués dans de nombreux cancers (Rotin et Kumar, 2009). Alors que plusieurs centaines d'articles ont été publiés chez l'Homme, chez la plante modèle *Arabidopsis*, seule une vingtaine d'articles couvrent la caractérisation de cette famille d'E3 ubiquitine ligase HECT. *Arabidopsis thaliana* possède 7 gènes *HECT* appelés *UPL* 1 à 7 (*Ubiquitin Protein Ligase*). Les protéines correspondantes, de taille entre 96 et 405 kDa, sont classées en 4 catégories en fonction de la similarité de séquence du domaine HECT et de la structure de la protéine (Downes et al., 2003). Ces protéines HECT de plantes interviennent dans différents processus cellulaires et physiologiques, ainsi *UPL3* est impliquée dans l'endoréplication (Downes et al., 2003; El Refy et al., 2004) et *UPL5* dans la sénescence (Miao et Zentgraf, 2010). Quatre de ces UPL (*UPL1*, *UPL3*, *UPL4* et *UPL5*) apparaissent impliquées dans l'immunité végétale en régulant l'expression des gènes de la réponse immunitaire et de la voie de l'acide salicylique (SA ; Furniss et al., 2018). Soulignons enfin le rôle fondamental de *UPL3*. La mutation de *UPL3* entraîne un phénotype rarement observé dans les différents mutants E3 ubiquitine ligases puisqu'elle impacte le niveau total de polyubiquitination cellulaire. En effet, *UPL3* en s'associant à la partie 19S du protéasome 26S (cf paragraphe III), permet d'augmenter l'efficacité d'ubiquitination et de dégradation des protéines cibles en interagissant avec d'autres E3 ligases (Furniss et al., 2018).

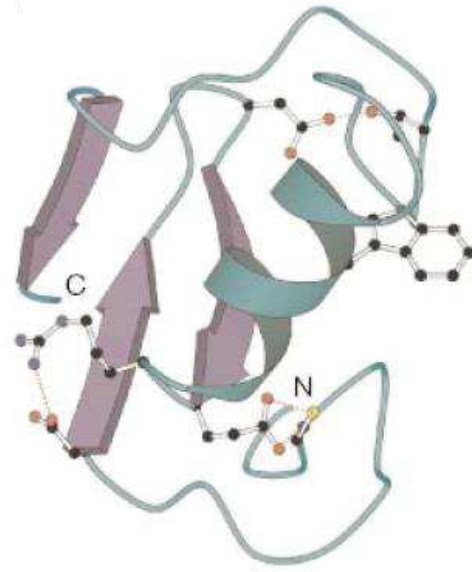
II.C.2 La famille des enzymes RING

II.C.2.a La classe des CRL

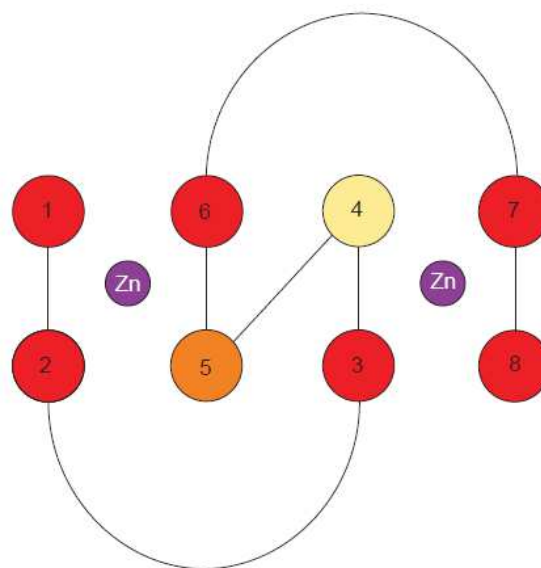
Avec plusieurs centaines de E3 ligases de type RING chez les Eucaryotes, ces E3 ligases sont les plus nombreuses au sein des différents règnes (Tableau 1.1.1). Elles sont caractérisées par la présence du domaine RING, une région de 40 à 60 aa riche en résidus cystéines (Cys) et histidines (His), Cys-X2-Cys-X(9±39)-Cys-X(1±3)-His-X(2±3)-Cys/His-X2-Cys-X(4±48)-Cys-X2-

A

RING protéine



U-box protéine

B**Figure 1.1.4 : Les domaines RING et U-box**

(A) Représentation structurale des domaines RING et U-box. Image issue de Aravind et Koonin (2000). **(B)** Représentation schématique du domaine RING. Les cystéines sont représentées en rouge, l'histidine en jaune, le résidu 5 peut être soit une cystéine, soit une histidine et le zinc en violet. Les traits noirs représentent une séquence d'aa variable. Image issue de Jackson et al. (2000).

Cys, où X peut être n'importe quel aa. Ces Cys et His permettent de lier 2 atomes de zinc (Zn) ce qui donne une structure similaire à celle en doigt de zinc (Figure 1.1.4 ; Freemont, 1993; Lovering et al., 1993). Cependant, alors que la structure en doigt de zinc est impliquée dans l'interaction avec l'ADN, le domaine RING est impliqué dans l'interaction protéine-protéine notamment pour recruter l'enzyme E2-Ub et permettre le transfert de l'Ub directement sur le substrat (Figure 1.1.3; Borden et Freemont, 1996; Saurin et al., 1996). Environ 500 protéines RING ont été prédites chez *Arabidopsis thaliana* (Tableau 1.1.1), certaines fonctionnent sous forme de monomères et sont dites « simples », et d'autres forment des complexes multiprotéiques et sont dites « complexes » (Callis, 2014).

Ces E3 ligases dites complexes sont caractérisées par la nécessité de recruter de nombreuses sous-unités pour assurer l'activité E3 ligase. Parmi ces E3 ligases multimériques, la classe des CRL (Cullin Ring Ligase) est la plus importante et fait intervenir une protéine de type culline. *Arabidopsis thaliana* code 5 protéines cullines (CUL1, CUL2, CUL3a, CUL3b et CUL4) qui possèdent toutes une région conservée, le domaine culline, de 200 aa et ont une taille qui varie entre 85 et 98 kDa (Shen et al., 2002; Sarikas et al., 2011). Ces cullines jouent le rôle essentiel de « charpente » dans la structuration des complexes CRL. Elles vont permettre, en C-terminale, de recruter l'enzyme E2 grâce à une protéine intermédiaire à domaine RING-*finger*, la sous-unité catalytique de 16 kDa, RBX1 (RING BOX-1). Deux RBX1 existent chez *Arabidopsis*, RBX1a et RBX1b. RBX1a est apparue comme étant essentielle puisqu'une diminution de la quantité de protéine RBX1a entraîne des phénotypes drastiques avec des plantes naines et peu fertiles, et la perte de cette protéine n'est pas viable puisqu'aucun homozygote *rbx1a* n'a pu être identifié (Gray et al., 2002; Lechner et al., 2002). Ces phénotypes mettent en évidence le rôle essentiel de RBX1a dans le fonctionnement des complexes CRL, et illustrent l'importance des CRL dans les processus développementaux et les réponses physiologiques chez les plantes (Hua and Vierstra, 2011). Par ailleurs, en N-terminale, les cullines, parfois aidées d'une protéine adaptatrice, s'associent à une protéine qui va reconnaître spécifiquement le substrat. En fonction de la culline considérée, la sous-unité impliquée dans la reconnaissance du substrat sera différente, ce qui permet de distinguer différents complexes CRL. Ainsi, la culline CUL1 s'associe avec les protéines à domaine F-box *via* la protéine adaptatrice SKP (S-phase kinase-associated Protein) et forme le complexe CRL1 aussi appelé complexe SCF pour Skp1-Cullin-F-box ; CUL3 interagit

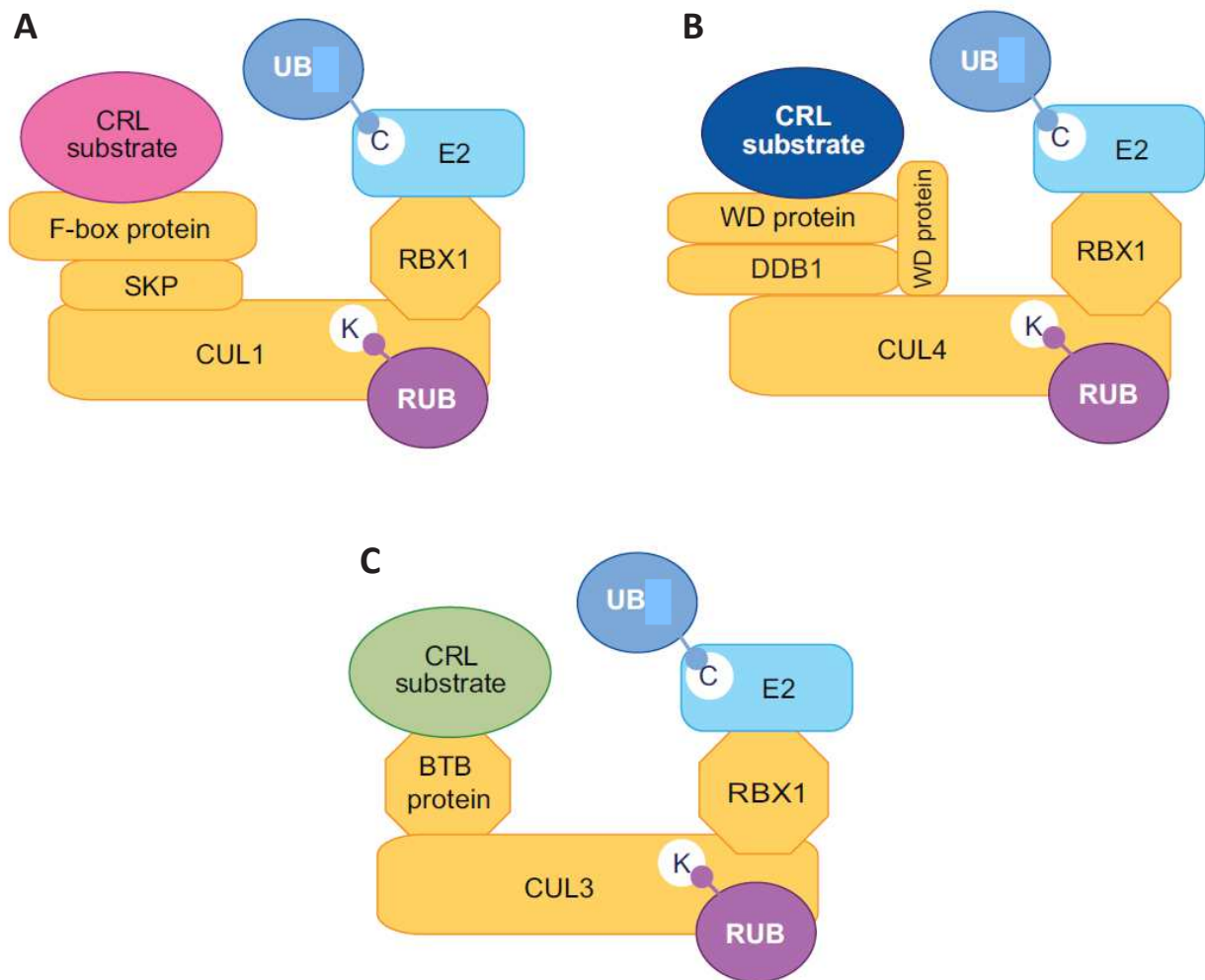


Figure 1.1.5 : Les enzymes RING de type CRL

Représentation schématique des enzymes E3 ligase RING de type CRL chez Arabidopsis. **(A)** Le complexe CRL1 composé de la culline 1, la protéine adaptatrice SKP (appelée aussi ASK) et la protéine à domaine F-box. **(B)** Le complexe CRL3 composé de la culline 3 et de la protéine à domaine BTB. **(C)** Le complexe CRL4 composé de la culline 4, de la protéine adaptatrice DDB1 et de la protéine à domaine D²WD. Chacun des complexes est capable d'interagir avec le complexe E2-Ub *via* la protéine adaptatrice RBX1. La rubylation *via* la protéine RUB (RELATED TO UBIQUITIN) permet d'activer la formation du complexe. Image modifiée issue de Hotton and Callis, 2008.

directement avec la protéine réceptrice de substrat BTB (Broad complex/Tramtrack/Bric-à-brac) et forme les complexes CRL3 ; et CUL4 forme le complexe CRL4 en s'associant avec les protéines DWD (DDB1, Damaged-DNA-binding1-binding/WD-40 domain) *via* la protéine adaptatrice DDB1 (Figure 1.1.5 ; Hua et Vierstra, 2011).

Parmi les protéines impliquées dans la reconnaissance du substrat, le plus grand groupe et le mieux étudié à ce jour est celui des protéines F-box avec environ 700 membres chez *Arabidopsis thaliana* (Tableau 1.1.1 ; Gagne et al., 2002). Les protéines F-box sont caractérisées par le domaine F-box d'environ 40 aa généralement en N-terminale et impliqué dans l'interaction avec la protéine adaptatrice ASK (Arabidopsis SKP homolog), associé en C-terminale à un domaine d'interaction de structure variable pour recruter le substrat dont les plus communs sont les domaines LRR (leucine-rich repeat) et WD repeat (tryptophane-acide aspartique ; Bai et al., 1996; Gagne et al., 2002; Kipreos et Pagano, 2000). Avec 19 gènes ASK présents chez *Arabidopsis*, plus de 10 000 combinaisons sont théoriquement possibles pour former les complexes SCF. La caractérisation de ce groupe a permis de mettre en évidence leurs implications dans tous les aspects du développement des plantes, comme par exemple, la régulation hormonale, la signalisation lumineuse, la régulation du cycle circadien, la croissance, la réponse immunitaire, la formation des gamètes ou encore la régulation du cycle cellulaire (Lechner et al., 2006; Williams et al., 2019). Bien que très étudiées, la détermination de nouvelles fonctions pour les protéines F-box est encore un champ de recherche pleinement actif comme le montre récemment l'implication de la protéine F-box HAWAIIAN SKIRT (HWS) dans la voie des miRNA (Zhang et al., 2017) ou celle de FBW2 dans les mécanismes de *RNA silencing* (T. Hacquard, P. Genschick, en préparation) mais aussi, la caractérisation du rôle répressif de la protéine F-box SAGL1 (SMALL AND GLOSSY LEAVES1) dans la biosynthèse de la cire cuticulaire (Kim et al., 2019) ou encore l'implication de la protéine F-box MAX2 (MORE AXILLARY GROWTH 2) dans la voie de signalisation des karrikins en plus de son implication dans la voie des strigolactones (Khosla et al., 2020).

II.C.2.b Le complexe APC/C

Parmi les enzymes E3 ligases, l'APC/C (Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome) est certainement le complexe le plus multimérisé connu à ce jour. En effet, ce complexe

relativement bien conservé au cours de l'évolution, est composé de nombreuses sous-unités, i.e. 13 chez la levure, 15 chez les vertébrés et 11 chez *Arabidopsis thaliana*, et atteint une taille d'environ 1,2 MDa (Figure 1.1.3 ; Peters, 2006; Capron et al., 2003). Parmi ses sous-unités, APC2 possède un domaine culline en C-terminale et APC11 un domaine RING faisant de ce complexe un membre des enzymes E3 ligase de type RING complexe (Capron et al., 2003a; McLean et al., 2011; Yamano, 2019). Le complexe APC/C est un régulateur clef de la progression et de la sortie de la phase mitotique chez les Eucaryotes (Peters, 2006; Genschik et al., 2014). Il intervient dans la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase, dans la sortie de la mitose pour donner les deux cellules filles et permet d'initier la réplication de l'ADN en phase S (Peters, 2006). De plus, l'étude des mutants pour différentes sous-unités du complexe a permis de montrer son rôle dans le nombre de divisions méiotiques lors du développement des gamètes (Cifuentes et al., 2016). En effet, ces mutants présentent un arrêt des gamétogénèses femelle (Capron et al., 2003b; Kwee et Sundaresan, 2003; Pérez-Pérez et al., 2008; Wang et al., 2012a, 2013) et mâle (Zheng et al., 2011), dû à l'accumulation de la cycline B1 ciblée par la sous unité APC11 pour entraîner sa dégradation chez *Arabidopsis thaliana* (Zheng et al., 2011; Guo et al., 2016). Le complexe APC a aussi été caractérisé pour son implication dans le contrôle de l'endoréduplication. Chez *Arabidopsis*, le contrôle des gènes *CCS52A1* et *CCS52A2* (des activateurs du complexe APC) permet d'induire l'endoréduplication au niveau des méristèmes, contrôlant ainsi leur taille, en induisant *CCS52A1* et inhibe l'endoréduplication en réprimant *CCS52A1* et *CCS52A2* via la sous-unité du complexe médiateur MED16 (Takahashi et al., 2013; Liu et al., 2019). En plus de ses fonctions essentielles dans les différents cycles cellulaires Eucaryotes, le complexe APC intervient aussi dans la croissance, la signalisation hormonale et l'interaction symbiotique (pour revue Heyman et Veylder, 2012).

II.C.3 La famille des enzymes U-box

La première E3 ligase de type U-box, UFD2 (Ubiquitin Fusion Degradation 2), a été identifiée chez la levure (Koegl et al., 1999). La caractérisation de son domaine U-box, un motif d'environ 70 aa partagé entre les règnes Eucaryotes, a permis de montrer que ce domaine est dérivé du domaine RING-*finger* (Figure 1.1.4 ; Aravind et Koonin, 2000). En effet, comme pour le domaine RING, il intervient dans l'interaction avec l'enzyme E2 conjuguée à l'Ub (Figure

1.1.3 ; Hatakeyama et Nakayama, 2003; Yee et Goring, 2009). Cependant, le domaine U-box n'a pas les résidus cystéines et histidines permettant la chélation du zinc, mais établit des liaisons non covalentes, dites *salt bridges*, avec des hydrogènes et des ions, pour permettre la stabilisation de sa structure (Figure 1.1.4 ; Aravind et Koonin, 2000).

Alors que chez la levure et l'Homme, le nombre d'E3 ligases de type U-box est très limité avec respectivement, 2 et 6 membres, les plantes montrent encore une fois l'importance du système d'ubiquitination pour leur survie avec 64 E3 ligases de type U-box chez *Arabidopsis thaliana* (Tableau 1.1.1, Azevedo et al., 2001; Callis, 2014). Appelés PLANT U-BOX (PUB), ces protéines sont classées en fonction des autres domaines présents, tels que les domaines ARM (Armadillo repeat) représentant 64% des PUB et caractérisés par la répétition en tandem du motif ARM, les PUB contenant un motif kinase (23%), ou encore celles en plus faible proportion présentant les domaines WD40, ou MIF4G (pour revue, Yee et Goring, 2009). Les E3 ligases PUB sont impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que le développement, l'auto-incompatibilité, la réponse hormonale, la défense contre les agents pathogènes et la réponse aux stress abiotiques (Yee et Goring, 2009; Callis, 2014). Les PUB jouent, en général, un rôle clef dans la coordination des réponses, comme cela a été montré par l'étude du récepteur aux brassinostéroïdes, BRI1 (BR INSENSITIVE 1). L'ubiquitination de BRI1 par PUB12 et PUB13 entraîne son endocytose permettant de coordonner la différenciation cellulaire, la croissance et l'immunité (Zhou et al., 2018). Un autre exemple est l'implication de PUB46 et PUB48 dans la réponse au stress hydrique (Adler et al., 2017).

III La dégradation via le protéasome

Comme décrit dans le paragraphe II.B, l'ubiquitination des protéines cibles entraîne la formation d'un code impliqué dans diverses fonctions biologiques (Woelk et al., 2007; Swatek et Komander, 2016; Kwon et Ciechanover, 2017). Les protéines ubiquitinées en K11 et K43 sont reconnues par un complexe protéolytique de 2 000 kDa, le protéasome 26S, afin d'être dégradées. Cette dégradation combine, le clivage du substrat en petits peptides de façon ATP-dépendante par le protéasome, et le recyclage des Ub par l'action des enzymes DUB afin de les réutiliser.

Le protéasome 26S est composé de nombreuses sous-unités divisées en 2 sous-complexes : le cœur protéolytique 20S et un complexe régulateur 19S, tous deux bien

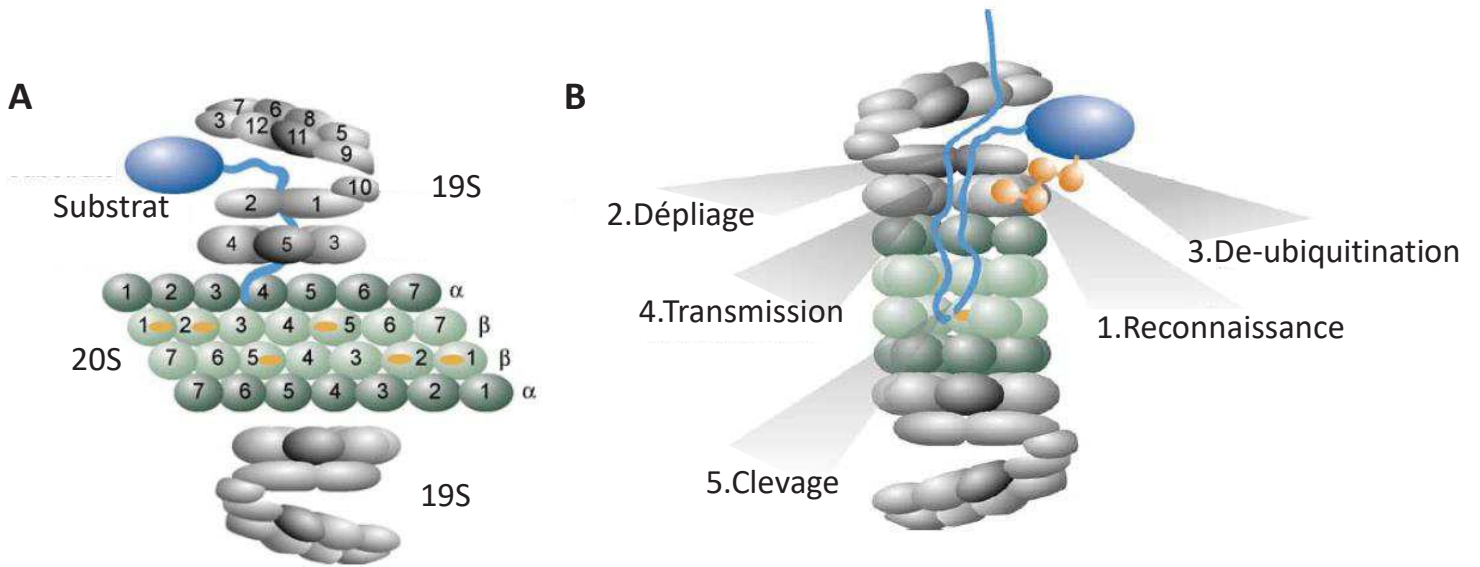


Figure 1.1.6 : Le protéasome 26S

(A) Le protéasome 26S est composé de deux complexes 19S composés chacun de 18 sous-unités ATPase et du cœur protéolytique 20S sous forme de cylindre. **(B)** les protéines polyubiquitinées sont reconnues par le complexe 19S puis dépliées. Les DUB coupent la chaîne d'Ub afin de les recycler. La protéine linéarisée est alors transmise à la chambre du cylindre 20S pour y être coupée. Image modifiée issue de Wolf et Hilt, 2004.

conservés chez les Eucaryotes (Genschik et al., 1992, 1994; Fu et al., 1998; Gille et al., 2003; Wolf et Hilt, 2004; Tanaka, 2009; Fort et al., 2015). Le complexe 19S est présent aux deux extrémités du cœur protéolytique 20S et possède une activité isopeptidasique ATP-dépendante, permettant ses nombreuses fonctions. Il va être impliqué dans la reconnaissance des protéines ubiquitinées et destinées à être détruites. Le complexe 19S permet leur linéarisation ainsi que la libération de la chaîne d'Ub (recyclée grâce aux enzymes DUB). Son activation permet l'ouverture du passage vers le complexe 20S et la transmission de la protéine linéarisée. Le cœur protéolytique 20S possède une structure sous forme de cylindre composé de quatre anneaux présentant 6 sites catalytiques. Ces sites catalytiques possèdent une activité protéasique trypsique et chymotrypsique permettant de cliver les protéines en peptides (Figure 1.1.6 ; pour revue, Wolf et Hilt, 2004 et Marshall et Vierstra, 2019).

Chapitre 2 : La régulation du cycle cellulaire

Tous les organismes multicellulaires proviennent d'une seule et unique cellule. Cette dernière va se diviser *via* le cycle cellulaire et donner naissance à deux cellules filles parfaitement identiques qui elles-mêmes réaliseront cette division, permettant la croissance et le développement des organismes. Le cycle cellulaire est un mécanisme hautement régulé d'un point de vue moléculaire, afin d'éviter la transmission d'information génétique altérée qui affecterait l'intégrité de la descendance. De plus, afin d'assurer la progression unidirectionnelle du cycle, de nombreux acteurs sont régulés par le système UPS. La caractérisation de ces mécanismes et leurs régulations valut à Leland Hartwell, Tim Hunt et Paul Nurse le prix Nobel de physiologie et de médecine en 2001.

Alors que les animaux présentent un développement embryonnaire et donnent naissance à des individus entièrement formés, les plantes présentent un développement post-embryonnaire et doivent produire de nouveaux organes tout au long de leur vie. Ceci implique un équilibre fin du maintien des cellules méristématiques assurant la prolifération cellulaire, et de leur évolution vers des tissus différenciés.

I Les cycles cellulaires

I.A Les 4 phases du cycle cellulaire mitotique

L'ADN est une macromolécule qui possède une structure en double hélice composée de deux brins antiparallèles complémentaires et qui contient l'information génétique nécessaire à la formation et au fonctionnement des organismes. En condition de prolifération cellulaire, durant la phase S (ou phase de synthèse) du cycle cellulaire, l'ADN est répliqué. Les deux brins de l'ADN sont séparés (brins parentaux) et permettent la synthèse de nouveaux brins complémentaires (brins néoformés) grâce aux ADN polymérases, des enzymes impliquées dans la formation des liaisons nucléotidiques. Durant ce processus semi-conservatif, deux molécules d'ADN identiques sont produites (4C, double contenu en ADN pour les organismes diploïdes) et seront séparées durant la phase M (ou mitose) afin d'obtenir deux cellules-filles

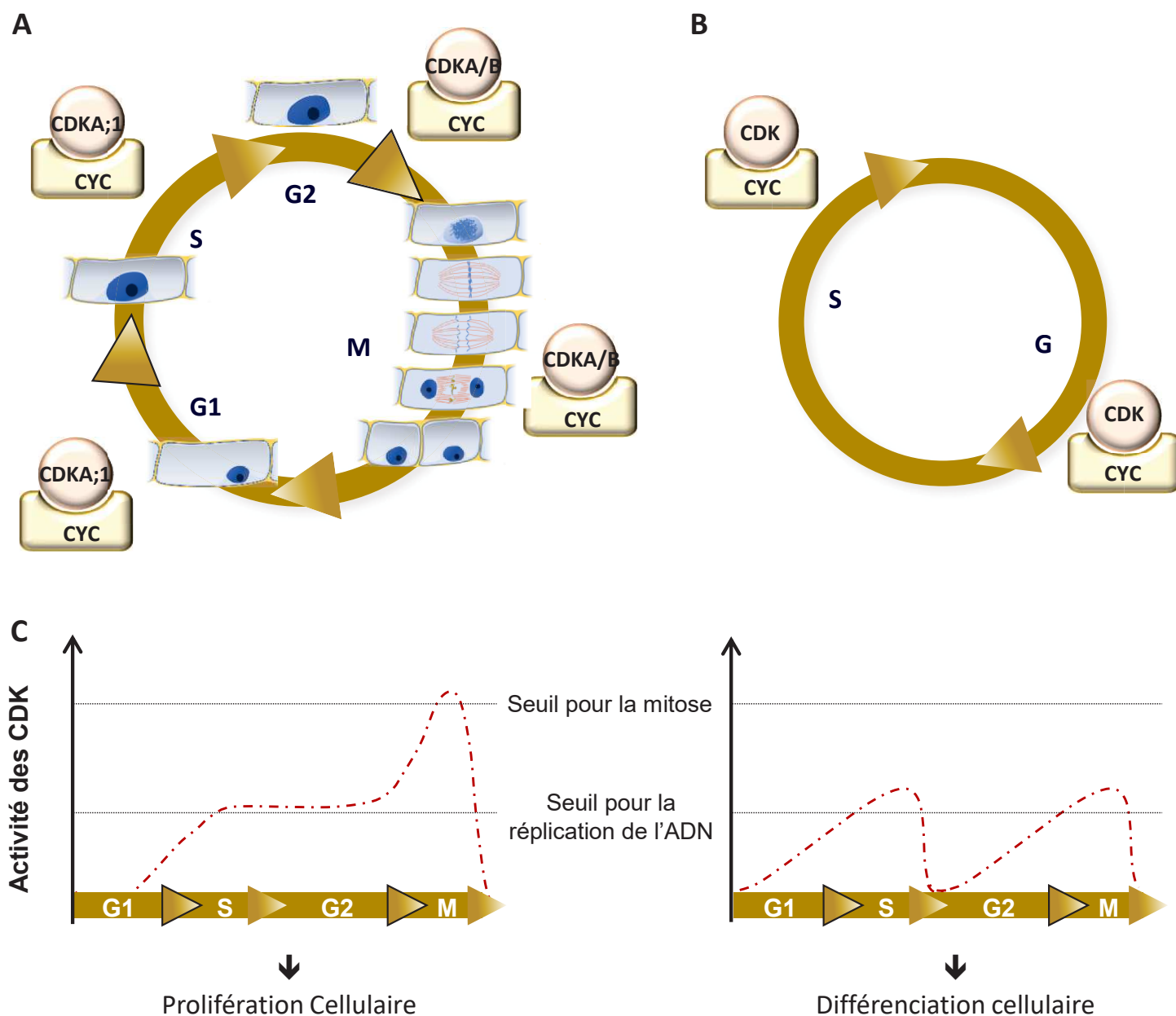


Figure 1.2.1 : Les cycles cellulaires

(A) Le cycle cellulaire mitotique permet d'entretenir la prolifération cellulaire. Les deux étapes essentielles du cycle cellulaire mitotique sont la duplication des chromosomes lors de la phase S et la division nucléaire lors de la phase M. La phase M est divisée en plusieurs étapes comprenant la prophase, la métaphase lors de laquelle les chromosomes sont alignés au niveau de la plaque métaphasique puis l'anaphase entraînant la séparation des chromatides le long des fuseaux mitotiques, l'anaphase et la télophase entraînant la division cellulaire. Les phases S et M sont séparées par les phases G1 et G2 qui sont des phases de préparation et de points de contrôle. **(B)** L'endoréplication intervient notamment lors de la différenciation cellulaire. Elle se caractérise par la succession des phases S et G entraînant la duplication de la quantité d'ADN à chaque nouvelle phase S sans présenter de phase M. **(C)** La progression à travers les différentes étapes des cycles est sous le contrôle de l'oscillation des niveaux d'activités des complexes CDK-CYC. Image modifiée issue de De Veylder et al. (2011).

avec la même information génétique (2C, pour les organismes diploïdes). Ces deux phases sont séparées par les phases G1 et G2 (Gap1 et Gap2) qui permettent, respectivement, de préparer les cellules aux phases S et M. Dans ce cycle, la transition G1/S est particulièrement importante pour les cellules, car une fois la réplication de l'ADN initiée, les cellules sont engagées et doivent finir entièrement le cycle. Lorsque les conditions ne sont pas favorables à la réalisation du cycle cellulaire, les cellules peuvent soit entrer en phase de quiescence (ou phase G0), et cet état est maintenu jusqu'à ce qu'un signal externe entraîne l'entrée en phase G1, soit sortir du cycle mitotique pour se différencier (Figure 1.2.1 ; Morgan et New Science Press, 2007).

I.B L'endoréduplication ou endocycle

Au cours du développement, certaines cellules vont sortir du cycle cellulaire mitotique afin d'arrêter la prolifération cellulaire et entrer en différenciation. Pour certaines cellules en différenciation, ceci entraîne la reprogrammation du cycle cellulaire vers l'endoréduplication. Ce cycle va permettre à la cellule de modifier son métabolisme, de réguler sa taille, d'adapter sa morphogénèse en réponse soit à un signal intrinsèque, soit à un stimulus extracellulaire tel qu'un changement environnemental ou un stress. Au cours de ce cycle particulier, l'ADN est répliqué sans phase de division, les phases S et G se répètent, entraînant une augmentation du niveau de ploïdie (8C, 16C, 32C, 64C..., pour les organismes diploïdes) du noyau de la cellule. La cellule présente alors un noyau plus volumineux contenant de multiples copies de l'ADN génomique (Figure 1.2.1). L'endoréduplication est un phénomène couramment présent chez les Eucaryotes. On le retrouve chez les amphibiens, les poissons, plus rarement chez les mammifères et très fréquemment chez les plantes (Zielke et al., 2013; Shu et al., 2018a). Chez les plantes, l'endoréduplication, associée à la différenciation et l'expansion cellulaire, est un processus complètement inhérent à la destinée cellulaire (*cell fate* ; Breuer et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, l'exemple le mieux caractérisé est celui des trichomes. Ces structures unicellulaires présentes à la surface des feuilles, des cotylédons ou le long des tiges, entrent en endoréduplication pour se différencier et former une structure à trois branches impliquée dans la protection de la plante (Bramsiepe et al., 2010).

II Le complexe DREAM

La synthèse des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire est régulée à un niveau transcriptionnel au cours du cycle. Deux profils d'expression de gènes peuvent ainsi être clairement différenciés, les gènes qui codent pour des protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN, nécessaires à l'entrée en phase S, dont l'expression culmine en G1/S (Bertoli et al., 2013), et les gènes qui, régulant la mitose, présentent un pic d'expression en G2/M (Sadasivam et al., 2012). Au total, plus de 1000 gènes ont été identifiés pour leur implication dans le cycle cellulaire chez l'Homme (Whitfield et al., 2002; Bar-Joseph et al., 2008; Peña-Díaz et al., 2013; Grant et al., 2013; Dominguez et al., 2016; Fischer et al., 2016; Liu et al., 2017) et chez les plantes (Breyne et al., 2002; Menges et al., 2003; Trolet et al., 2019). L'induction de ces gènes est régulée par un complexe, appelé complexe DREAM, composé chez l'Homme des protéines **DP** (Dimerisation Partner), des protéines **Rb-like** (Retinoblastoma), des facteurs de transcription **E2F** (adenovirus early gene 2 binding factor) et du complexe **MuVB** (Multi-Vulva class B) (Fischer et Müller, 2017). Des analyses phylogénétiques ont montré d'une part, que les gènes *Rb*, *E2F* et *DP*, hautement conservés, sont présents chez tous les organismes pluricellulaires (Cao et al., 2010; Desvoyes et al., 2014) et d'autre part, que les facteurs de transcription Myb composant le complexe MuVB, sont conservés entre les plantes et les animaux (Braun et Grotewold, 1999; Ito, 2005). Ainsi, une version légèrement différente du complexe DREAM humain a été identifiée chez *Arabidopsis* composé des protéines DP, de la protéine RBR1 (Rb-Related) et des facteurs de transcription E2F et MYB (Kobayashi et al., 2015a; Fischer et DeCaprio, 2015; Magyar et al., 2016).

II.A La protéine RBR (RETINOBLASTOMA-RELATED)

Découvert en 1986, le gène *Rb* (*Rétinoblastoma*) code pour la première protéine identifiée comme présentant une activité antitumorale (Friend et al., 1986; Lee et Nurse, 1987). Depuis, il a été montré que chez l'Homme, 70% des tumeurs présentent l'absence ou l'inactivation d'une protéine Rb, faisant de cette catégorie de protéines l'une des principales cibles de la recherche médicale pour lutter contre le cancer (Knudsen et Knudsen, 2006). Rb appartient à une famille de protéines, appelée famille des protéines « pocket », composée de deux autres membres, les protéines p107 et p130 (ou protéines Rb-like, RBL1 et RBL2,

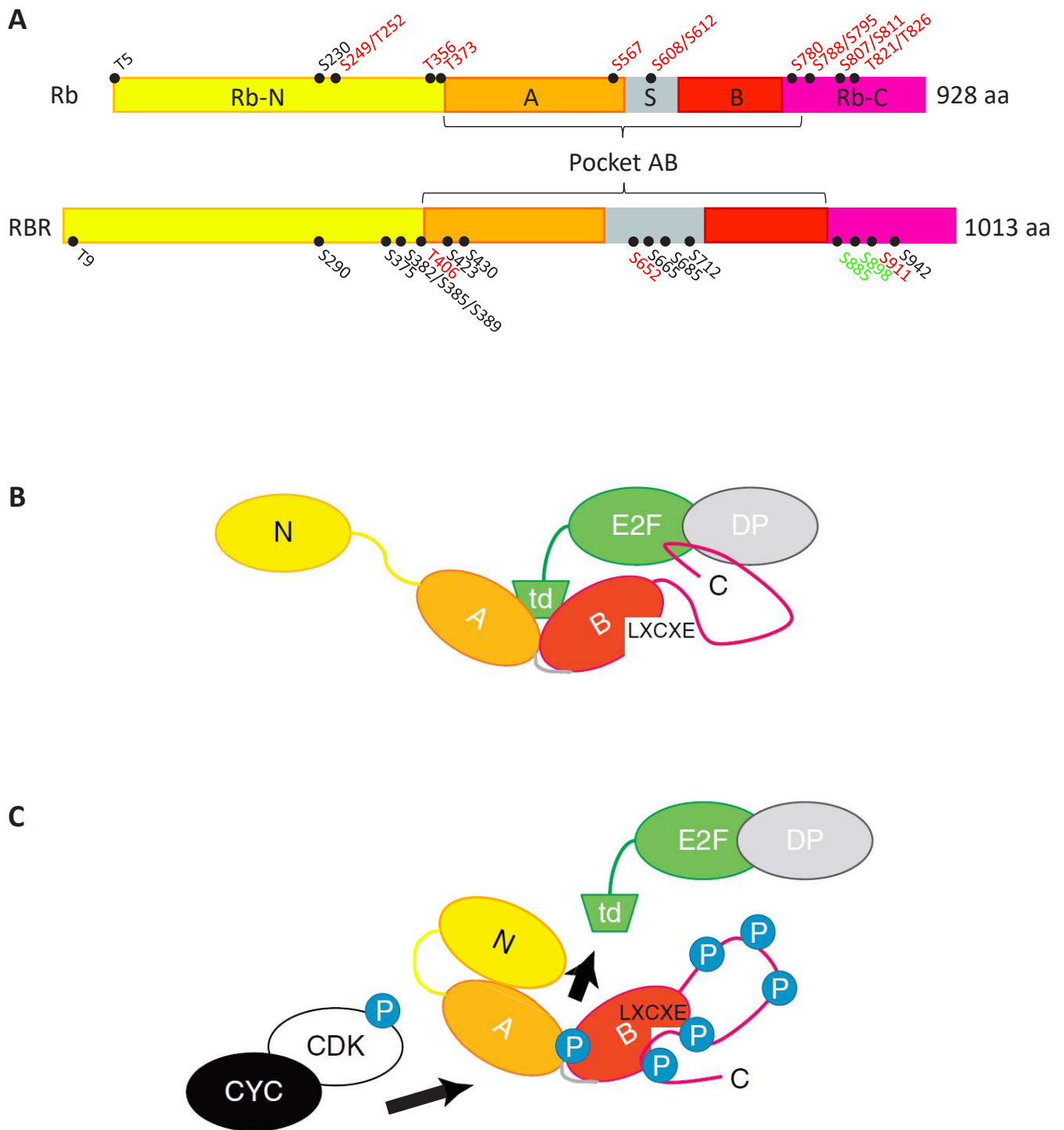


Figure 1.2.2 : La protéine Rb

(A) Comparaison des protéines Rb (Humain) et RBR (Arabidopsis). Rb-N = domaine amino-terminal, Rb-C = domaine carboxy-terminal, A et B = les sous-domaines composant le domaine *pocket* et S = spacer. Les sites de phosphorylation des sérines et thréonines pour Rb et RBR sont mis en évidence (en noir les sites prédits, en rouge les sites démontrés *in vivo* et en vert les sites observés en spectrométrie de masse). Les couleurs utilisées pour les différents domaines sont conservées pour la représentation de la conformation de Rb en B et C. Image modifiée issue de Desvoyes et al., 2014. **(B)** Représentation schématique de la structure de Rb lors de son interaction répressive avec les E2F-DP. Image issue de Gutzat et al. (2012). **(C)** Représentation schématique de Rb après les phosphorylations *via* le complexe CDK-CYC entraînant la libération des E2F-DP et la conformation globulaire de Rb. Image modifiée issue de Gutzat et al. (2012). **(B,C)** td = domaine de transactivation, LxCxE = de motifs RBD (Rb-binding domain) capable d'interagir avec 5 résidus peptidiques constituant le motif LxCxE.

respectivement), qui partagent de nombreuses similarités en termes de structure protéique, de fonction ou encore de régulation (Cao et al., 2010).

La caractérisation de la protéine Rb a mis en évidence son implication dans le cycle cellulaire où elle permet notamment de prévenir la prolifération cellulaire en arrêtant la progression du cycle (Dick et Rubin, 2013). Au-delà de ce rôle clef, Rb a depuis été caractérisée pour son implication dans la réponse aux dommages à l'ADN (voir Partie 1, Chapitre 3) et dans le maintien de l'intégrité génomique (Vélez-Cruz et Johnson, 2017), dans la régulation des cellules souches (Mushtaq et al., 2016), dans l'apoptose et la différenciation cellulaire (Du et Searle, 2009). Étant données les nombreuses implications de Rb dans les processus cellulaires vitaux des organismes, il n'est pas surprenant que le mutant *Rb*^{-/-} chez la souris présente de l'embryo-létalité (Clarke et al., 1992; Jacks et al., 1992; Lee et al., 1992).

Quatre orthologues de *Rb*, appelés *RETINOBLASTOMA-RELATED* (*RBR*) ont d'abord été identifiés chez le maïs (*ZmRBR1* et *ZmRBR2* ; (Graf et al., 1996; Xie et al., 1996; Ach et al., 1997; Sabelli and Larkins, 2009), puis chez d'autres plantes. La plante modèle *Arabidopsis thaliana* ne présente, elle, qu'un seul gène *AtRBR1* (Desvoyes et al., 2014). La protéine RBR semble jouer, chez les plantes, un rôle tout aussi important que son homologue chez les animaux (Gutzat et al., 2012; Desvoyes et Gutierrez, 2020). En effet, les mutants *rbr* sont, chez *Arabidopsis*, létaux, d'un point de vue gamétophytique (Ebel et al., 2004; Johnston et al., 2008) et sporophytique (Johnston et al., 2010). Cependant, si depuis les dernières décennies, les fonctions de la protéine RBR sont de mieux en mieux comprises, la mécanistique structurale de la protéine est étudiée pour le moment principalement chez les animaux. Ainsi, la suite de cette partie se concentrera sur Rb en précisant les informations disponibles chez les plantes.

II.A.1 RBR, une plateforme pour de multiple interactions protéiques

La protéine Rb (928 aa chez l'Homme) est composée de 3 domaines (Figure 1.2.2). Le domaine « pocket » (ou « pocket AB » ; Livingston et al., 1993; Lee et al., 1998; Balog et al., 2011) est formé par l'interaction des sous-domaines A et B, séparés par une séquence « spacer » de 74 aa. Ces sous-domaines possèdent une conformation de type cycline (une hélice α centrale entourée de quatre autres hélices) impliquée dans la reconnaissance des protéines et de l'ADN (Noble et al., 1997). Le sillon formé par l'interaction des deux sous-domaines A et B interagit spécifiquement avec le domaine de transactivation des E2F (voir

paragraphe II.B.2 ; Lee et al., 2002). Le domaine amino-terminal, Rb-N, possède deux autres structures de type cycline ressemblant fortement au domaine « pocket » (Hassler et al., 2007), et le troisième domaine en carboxy-terminale, Rb-C, possède une structure désorganisée d'environ 150 résidus essentiels pour certaines interactions (Rubin et al., 2005). De plus, la protéine Rb est capable d'interagir avec de nombreuses protéines au niveau de motifs dits *Rb-binding domain* (RBD). Le premier RBD, situé au niveau du sous-domaine B, est capable d'interagir avec 5 résidus peptidiques constituant le motif LxCxE (Figure 1.2.2 ; L=leucine, C=Cystéine, E=glutamate et x = n'importe quel aa ; Lee et al., 1998). Parmi les protéines présentant un motif LxCxE, sont notamment retrouvées, GATA-1 et FOG-2 ou les cyclines D impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Kadri et al., 2009; Goupille et al., 2017). Le second RBD est capable de reconnaître le motif PENF (P=proline, E = glutamate, N = asparagine et F= phénylalanine), il intervient dans l'interaction de nombreuses protéines virales et cellulaires, telles que les cyclines D, BRCA1 ou la protéine virale HCMV (human cytomegalovirus), au niveau du domaine Rb-C (Darnell et al., 2003; Liu et al., 2018). Les différents domaines décrits ci-dessus font de Rb une plateforme incroyable capable d'interagir avec plusieurs centaines de partenaires (Morris et Dyson, 2001; Sanidas et al., 2019).

Chez les plantes, les protéines RBR (ZmRBR1 chez le maïs, NtRBR1 chez le tabac et AtRBR1 de 1013 aa chez Arabidopsis) présentent une forte conservation de la séquence en aa avec Rb, notamment au niveau des domaines « pocket AB » et Rb-N mais pas au niveau du domaine Rb-C (Figure 1.2.2 ; Ach et al., 1997; Durfee et al., 2000). Cette conservation de la « pocket AB » indiquerait que les protéines végétales RBR adoptent une structure identique et donc fonctionnent de façon similaire (Durfee et al., 2000). De plus, de nombreuses protéines présentent les motifs RBD LxCxE et PENF reconnus par Rb chez Arabidopsis, telles que les cyclines D qui présentent les 2 motifs (Vandepoele et al., 2002; Darnell et al., 2003).

II.A.2 Les modifications post-traductionnelles de RBR

Les modifications post-traductionnelles (PTM) sont des mécanismes fondamentaux régulant le métabolisme cellulaire (Xin et Radivojac, 2012) et Rb est une protéine qui subit de nombreuses PTM afin de réguler son activité (MacDonald and Dick, 2012). Les phosphorylations sont les PTM les mieux caractérisées chez Rb et en particulier celles dépendantes des complexes CDK-CYC qui contrôlent la progression du cycle cellulaire. Ainsi,

chez l'Homme, 14 sites de phosphorylation ont été identifiés et confirmés sur la base du motif minimal de phosphorylation des CDK, Ser/Thr-Pro. Quatre se trouvent au niveau de Rb-N, sept au niveau de Rb-C et trois dans le domaine « pocket AB» (Figure 1.2.2 ; MacDonald and Dick, 2012; Rubin, 2013). Cependant, d'autres kinases ont été caractérisées pour leur implication dans la phosphorylation de Rb telles que la kinase p38 qui phosphoryle Rb lors de stress cellulaire (i.e. stress génotoxique ou oxydatif ; Delston et al., 2011; Rousset-Roman et al., 2019), les sérine-thréonine-kinases point de contrôle Chk1 et Chk2 lors des dommages à l'ADN, la kinase Aurora afin de maintenir la stabilité chromosomique (et éviter la polyploïdie), ou encore la kinase Ask1 impliquée dans l'induction de l'apoptose (MacDonald and Dick, 2012). La protéine Rb présente d'autres possibilités de PTM telles que l'acétylation et/ou la méthylation des résidus lysines et arginines. Six sites d'acétylation et trois de méthylation ont été identifiés chez l'Homme et sont principalement impliqués dans le maintien de Rb sous sa forme active (en évitant les phosphorylations) et l'arrêt du cycle cellulaire. Enfin, la protéine Rb possède quatre sites d'ubiquitination au niveau des lysines K143, K265, K574 et K810, et un site de SUMOylation en K720. Ces sites d'ubiquitination sont ciblés par des E3 ligases pour induire la dégradation de Rb par le protéasome. A ce jour, trois E3 ligases ciblant Rb ont été identifiées, Mdm2 (chez la souris, Hdm2 chez l'homme), NRbE3 (Novel Rb E3 Ubiquitin Ligase) et hUTP14a (Xiao et al., 1995; Darnell et al., 2003; Uchida et al., 2005; Sdek et al., 2005; Delston et al., 2011; Wang et al., 2015; Liu et al., 2018; Rousset-Roman et al., 2019). La SUMOylation, quant à elle, a été caractérisée pour son implication dans l'hyperphosphorylation de Rb et donc la prolifération cellulaire (Meng et al., 2016). La protéine Rb-like p130 est, quant à elle, ciblée par la protéine F-box Skp2 qui sera présentée dans le chapitre 4 de cette introduction (Tedesco et al., 2002; Bhattacharya et al., 2003).

Chez les plantes, les PTM de RBR sont beaucoup moins bien décrites. Cependant, sur la base des similarités de séquence en aa et la conservation des domaines avec la protéine Rb humaine, 17 sites de phosphorylation par les CDK-CYC ont été proposés (Figure 1.2.2 ; Desvoyes et al., 2014). Sur ces 17 sites, 5 phosphorylation ont été observée au niveau des sérines S652, S911, S885 et S898 et de la thréonine T406 chez *Arabidopsis* (Reiland et al., 2009; Ábrahám et al., 2011; Magyar et al., 2012; Willems et al., 2020). Comme chez l'Homme, RBR est aussi phosphorylée par d'autres kinases que les CDK telles que PIP5K et S6K (Henriques et al., 2010, 2013; Dieck et al., 2012). A ce jour aucune acétylation, méthylation ou ubiquitination n'a été démontrée chez RBR. Cependant, dans un milieu dépourvu de sucre, alors que la

protéine RBR1 est presque entièrement dégradée après 12h, l'ajout de MG132 (drogue inhibitrice du protéasome) bloque cette dégradation (Hirano et al., 2011a). Cette donnée suggère que les plantes ont conservé le système de régulation de RBR *via* l'UPS.

II.B L'activation et la répression des gènes

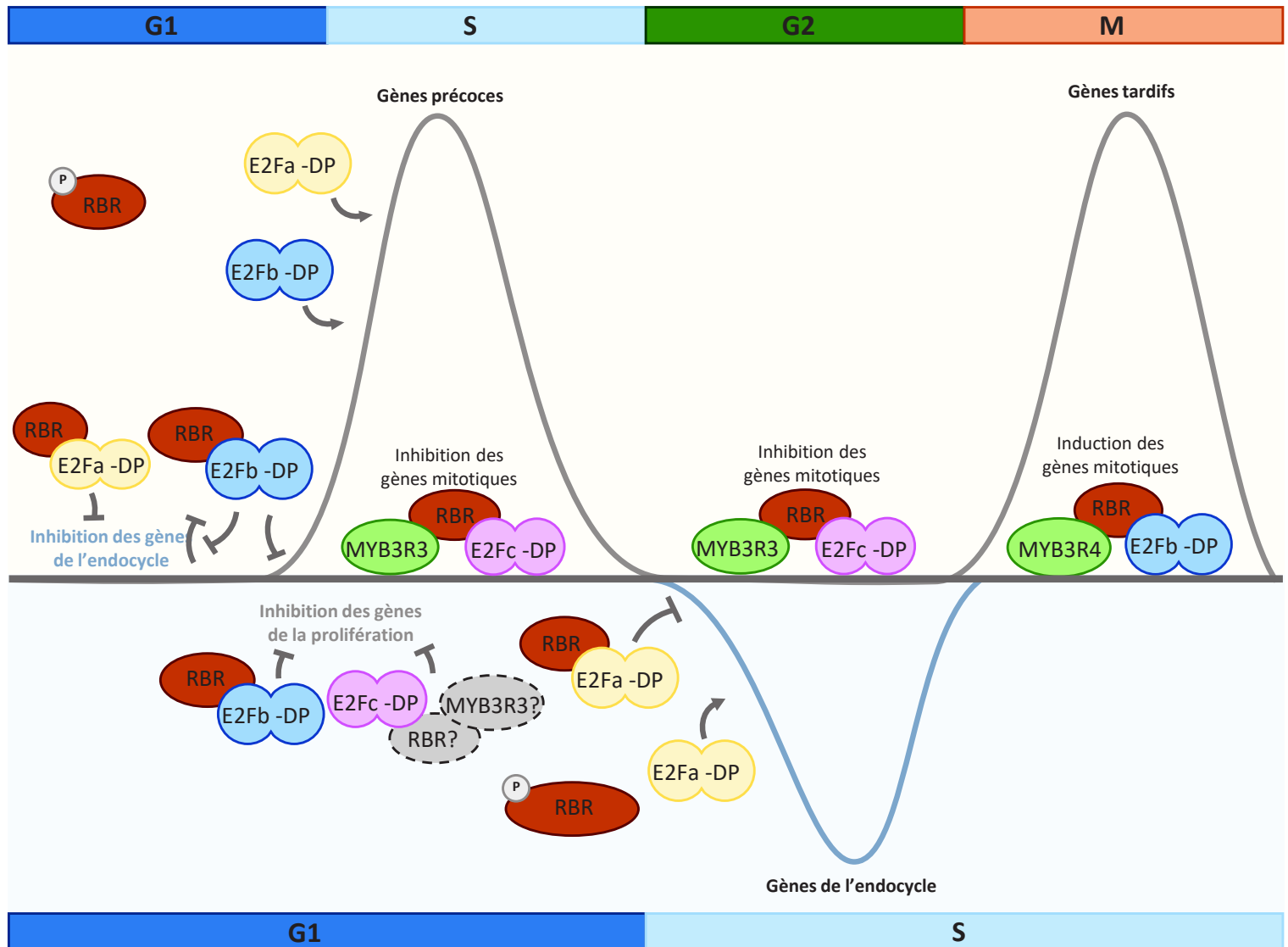
Comme mentionné précédemment, la protéine RBR avec les facteurs E2F et MYB sont capables de former des complexes DREAM. Les combinaisons de complexes DREAM permettent de coordonner l'expression des gènes précoces (G1/S) et tardifs (G2/M) du cycle cellulaire. Par analogie avec les animaux, RBR semble jouer le rôle de plateforme centrale dont la diversité des interactions, en fonction de son état de phosphorylation, déterminerait la composition des complexes DREAM pour former aussi bien des complexes activateurs que répresseurs. Les différents complexes formés vont intervenir dans la régulation de la prolifération, l'endoréduplication et la quiescence des cellules.

II.B.1 Les facteurs de transcription MYB

La famille des facteurs de transcription MYB est caractérisée par la présence du domaine de liaison à l'ADN Myb. Ce domaine d'une cinquantaine d'aa prend une conformation de type hélice-hélice-tour-hélice et peut être répété une, deux ou trois fois, donnant respectivement les noms de MYB1R, MYB2R et MYB3R à ces facteurs. Alors que chez les vertébrés trois protéines Myb ont été identifiées (a-Myb, b-Myb et c-Myb ; Weston, 1998) possédant toutes trois répétitions du motif Myb (MYB3R), Arabidopsis possède 130 gènes *MYB*. Parmi ces 130 gènes *MYB*, 125 présentent 2 répétitions du motif et sont impliqués dans le métabolisme primaire et secondaire, le développement et les réponses aux stress biotiques et abiotiques, et 5 ont été identifiés pour posséder les 3 répétitions (MYB3R1 à MYB3R5) et permettent la régulation du cycle cellulaire (Stracke et al., 2001; Dubos et al., 2010).

Ces facteurs de transcription MYB3R sont capables de se fixer sur le promoteur des gènes présentant un motif MSA (Mitosis-Specific Activator) TCYAACGGYYA (Y correspondant à T ou C) afin de réguler la mitose (Ito, 2000; Ito et al., 2001; Ito, 2005; Haga et al., 2011; Kobayashi et al., 2015b). Parmi ces 5 MYB3R, MYB3R1 et MYB3R4 ont été caractérisés pour leurs rôles

Cycle cellulaire mitotique → prolifération cellulaire / tissus jeunes



Endocycle → différenciation / tissus âgés → quiescence

Figure 1.2.3 : La régulation de la prolifération et de l'endoréduplication par le complexe DREAM

Lors de la prolifération cellulaire, les gènes précoces sont inhibés par le complexe RBR-E2Fb-DP. La libération de E2Fa et E2Fb de l'action répressive de RBR permet la transcription des gènes précoces du cycle mitotique. Les gènes tardifs mitotiques sont quant à eux activés par le complexe RBR-E2Fb-DP-MYB3R4 lors de l'entrée en phase M et sont réprimés par le complexe RBR-E2Fc-DP-MYB3R3 lors du reste du cycle. L'entrée en endoréduplication se fait d'une part par l'inhibition des gènes de la prolifération *via* E2Fc et le complexe RBR-E2Fb, et d'autre part, par l'activation des gènes de l'endoréduplication par E2Fa. Figure modifiée d'après Magyar et al. (2016). Pointillés: Intervention des protéines pas encore démontrée

activateurs (MYB-ac) sur les gènes de la transition G2/M (Haga et al., 2011) alors que MYB3R1, MYB3R3 et MYB3R5 en sont les répresseurs (MYB-rep ; Figure 1.2.3 ; Kobayashi et al., 2015).

La famille de facteurs de transcription MYB-rep est régulée par le protéasome comme l'a montré l'accumulation de MYB3R3 et MYB3R5 après un traitement au MG132. Par contre, le niveau protéique de MYB3R4 ne changeant pas après un tel traitement, ces données suggèrent que le turn-over des MYB-ac pourrait être régulé par un autre processus (Chen et al., 2017).

II.B.2 Les facteurs de transcription E2F et leur partenaire DP

La famille des facteurs de transcription E2F joue un rôle essentiel dans le contrôle de la prolifération cellulaire en activant ou réprimant de nombreux gènes impliqués dans la progression du cycle et la réplication. Cette fonction nécessite la formation d'un hétérodimère avec une protéine DP (E2F-DP) qui leur permet d'augmenter leurs liaisons à l'ADN et leur activité de transactivation (Maehara et al., 2005; Frolov et al., 2005). Chez les animaux, trois gènes *DP* (*DP1*, *DP2* et *DP3*) et huit gènes *E2F* ont été identifiés. Les *E2F* sont regroupés en fonction de leur homologie de séquence et de leur fonction transcriptionnelle. Ainsi, E2F1, E2F2 et E2F3A sont des protéines activatrices lors de la transition G1/S, alors que E2F3B, E2F4, E2F5 et E2F6 sont des répresseurs présents de façon constitutive tout au long du cycle cellulaire (Cao et al., 2010). Ces facteurs E2F se caractérisent par la présence d'un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé dans la partie N-terminale qui reconnaît la séquence consensus TTT(C/G)(C/G)CGC (élément *cis* régulateur) du promoteur des gènes cibles, d'un domaine de dimérisation DP contenant une répétition de sept leucines et d'un domaine de transactivation en C-terminale (Morgunova et al., 2015). Deux autres protéines E2F, E2F7 et E2F8, ont été caractérisées pour leur fonctionnement atypique puisqu'elles ne forment pas d'hétérodimères avec les protéines DP mais présentent un deuxième domaine de liaison à l'ADN et assurent un rôle de répresseurs en fin de phase S (Cao et al., 2010; Morgunova et al., 2015; Chen et al., 2009).

Chez *Arabidopsis thaliana*, parmi les 6 gènes codant des protéines E2F (*E2F a* à *f*), trois d'entre eux, *E2Fa*, *E2Fb* et *E2Fc* (les *E2F* canoniques) sont homologues des *E2F* de mammifères impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (*E2F1* à *E2F5*), et leur protéine sont capables de former des hétérodimères avec les 2 protéines DP (DPa et DPb ; Vandepoele et al., 2002;

Mariconti et al., 2002). E2Fa et E2Fb interagissent avec DPa tandis que E2Fc interagit préférentiellement avec DPb (Magyar et al., 2000; del Pozo et al., 2006). En terme de fonctions dans la régulation du cycle cellulaire, on attribue classiquement à ces facteurs, une action activatrice pour E2Fa et E2Fb, et inhibitrice pour E2Fc (Mariconti et al., 2002; Magyar et al., 2016). Cependant, des analyses récentes montrent que les fonctions attribuées aux E2F sont plus complexes et dépendent de leurs associations, décrites ci-après, avec RBR1 et/ou les autres membres des complexes DREAM (Magyar et al., 2016).

Ces trois facteurs de transcription E2Fa, E2Fb et E2Fc sont par ailleurs, régulés par le protéasome comme l'a montré l'accumulation de ces protéines après un traitement au MG132 en condition de carence en sucre (Hirano et al., 2011b). De plus, il a été montré que E2Fc est phosphorylée par les complexes CDKA;1-CYCA2;2 et CDKA;1-CYCD2;1 entraînant son recrutement par le complexe SCF^{SKP2A} pour induire sa dégradation (del Pozo et al., 2002). Les enzymes E3 ligases entraînant la dégradation de E2Fa et E2Fb n'ont, quant à elles, pas encore été clairement identifiées.

Arabidopsis possède aussi 3 protéines E2F atypiques qui ne forment pas d'hétérodimères avec les protéines DP : E2Fe/DEL1, E2Fd/DEL2 et E2Ff/DEL3. Ces facteurs de transcription ont perdu leur domaine de transactivation, d'hétérodimérisation avec les protéines DP et le domaine de liaison avec RBR mais possèdent deux domaines de liaison à l'ADN (Vandepoele et al., 2002; Mariconti et al., 2002). La duplication de ce domaine de liaison à l'ADN leur permet de se fixer en monomères sur les sites E2F pour réprimer l'expression des gènes régulés par les autres E2F (Mariconti et al., 2002).

II.B.3 La régulation du cycle par Rb et les E2F canoniques

La protéine Rb est notamment connue pour son rôle de répresseur des E2F (Hiebert et al., 1992). La mécanistique derrière cette répression nécessite à la fois le domaine « pocket AB » et le domaine Rb-C (Figure 1.2.2 ; Qin et al., 1992; Hiebert, 1993; Zhu et al., 1995). Comme décrit précédemment, le domaine de transactivation des E2F se lie au niveau du sillon formé par la « pocket AB » d'une part (Lee et al., 2002; Xiao et al., 2003), alors que le domaine CC-MB (*Coiled-Coil Marked Box*) du complexe E2F-DP interagit avec le domaine Rb-C d'autre part, permettant la formation du complexe Rb-E2F-DP (Rubin et al., 2005). Cette interaction Rb-E2F-DP dépend de l'hétérodimérisation du complexe E2F-DP puisqu'aucune interaction

entre Rb et E2F seul n'est détectée. Notons que la formation de ce complexe Rb-E2F-DP est conservée parmi tous les membres des sous-familles E2F canoniques et DP (Rubin et al., 2005). La dissociation du complexe Rb-E2F-DP est sous le contrôle de modifications post-traductionnelles de la protéine Rb. Alors que dans le complexe Rb-E2F-DP, Rb possède une architecture allongée active favorisant les interactions, des phosphorylations vont entraîner un changement conformationnel de Rb sous une forme globulaire inactive inhibant ces interactions (Figure 1.2.2 ; Lamber et al., 2013). La libération des complexes E2F-DP, chez l'Homme, se fait en deux étapes. La première étape est la phosphorylation des sérines S788/S795 et S608/S612 qui inhibent l'interaction de Rb avec les complexes E2F-DP. La deuxième étape est la phosphorylation des thréonines Thr821/Thr826 et Thr356/Thr373 qui favorisent, respectivement, le repliement et l'interaction de Rb-C et de Rb-N au niveau de la « pocket AB », entraînant la conformation globulaire et donc l'inactivation de Rb (Rubin et al., 2005; Burke et al., 2010, 2012).

Chez *Arabidopsis*, les interactions de RBR1 avec E2Fa, E2Fb et E2Fc et leurs partenaires, DPa et DPb, ont été mises en évidence (Boruc et al., 2010; Van Leene et al., 2010; Magyar et al., 2012). Tout comme chez les animaux, la régulation de ces complexes est sous le contrôle de l'état de phosphorylation de RBR assuré par les complexes CDK-CYC. RBR1 est capable d'interagir avec les CYCD, CDKA;1 et CDKF;1 (Boruc et al., 2010). Il a été montré, d'abord chez le tabac (Nakagami et al., 2002; Uemukai et al., 2005; Boniotti and Gutierrez, 2001), puis chez *Arabidopsis* (Boniotti and Gutierrez, 2001; Magyar et al., 2012), que RBR est phosphorylée par le complexe CDKA;1-CYCD3;1, ce qui entraîne la libération des E2F. Cependant, la régulation de ces complexes RBR-E2F reste encore compliquée.

Dans le cas de E2Fa, il est globalement admis que ce facteur de transcription s'associe à RBR et DPa mais ne prend pas part aux complexes DREAM. Dans les tissus jeunes, E2Fa contribue à l'activation des gènes de la phase S et ainsi, au maintien de la prolifération cellulaire (Magyar et al., 2012) alors que dans les cellules en différenciation, lors du développement des feuilles par exemple, E2Fa libérée de RBR1, induit l'endoréduplication (Figure 1.2.3 ; De Veylder et al., 2002). Récemment, l'enzyme E3 ligase SUMO AtMMS21 (METHYL METHANESULFONATE SENSITIVITY GENE21) a été caractérisée pour induire la dissociation du complexe E2Fa-DPa, en s'associant à DPa et induisant sa SUMOylation, ce qui affecte l'activation des gènes cibles de E2Fa (Liu et al., 2016), cette diminution de l'induction des gènes G1/S pourrait permettre le passage des cellules en stade de quiescence.

Les facteurs, E2Fb et E2Fc sont eux capables de s'associer avec les protéines du complexe DREAM (Kobayashi et al., 2015b). Chez Arabidopsis, E2Fb s'exprime de façon constante au cours du cycle cellulaire et intervient aussi bien dans la régulation de la transition G1/S que G2/M (Mariconti et al., 2002; Magyar et al., 2000, 2005). La dynamique du complexe RBR1-E2Fb dépend du niveau de phosphorylation de RBR1 par le complexe CDKA;1-CYCD3;1 (Magyar et al., 2012). Dans les tissus jeunes, E2Fb est impliqué dans le maintien de la prolifération. Lors de la phase G1, RBR1 forme un complexe avec E2Fb (RBR1-E2Fb) afin d'inhiber les gènes précoces du cycle cellulaire et les gènes impliqués dans la différenciation cellulaire tels que l'entrée en endoreduplication (Magyar et al., 2005, 2012). Lors de l'entrée en phase S, la libération de E2Fb du répresseur RBR (alors phosphorylé) permet l'activation des gènes impliqués dans la réplication (De Veylder et al., 2002; Magyar et al., 2000, 2012; Sozzani et al., 2006; Ószi et al., 2020). Dans les tissus plus âgés, E2Fb est impliqué dans la répression de cette prolifération grâce à la diminution des quantités de protéines RBR et E2Fb et la formation du complexe répresseur RBR-E2Fb (Kobayashi et al., 2015b; Ószi et al., 2020). Lors de la mitose, le complexe RBR1-E2Fb-MYB3R4 vient activer les gènes permettant la réalisation de la mitose (Figure 1.2.3 ; Kobayashi et al., 2015). Dans le cas de E2Fc, ce facteur qui s'accumule lors de la phase S au niveau transcriptionnel, s'exprime au niveau des tissus méristématiques ainsi que dans les cellules différenciées telles que les trichomes. Il joue un rôle clef dans le développement des plantes en assurant à la fois, la répression de la prolifération cellulaire et le contrôle de l'entrée et du maintien en endoreduplication (del Pozo et al., 2002, 2006; Kobayashi et al., 2015b). L'activité répressive de E2Fc est assurée lors du cycle grâce à la formation du complexe RBR1-E2Fc-MYB3R3 qui permet de réprimer les gènes mitotiques (Figure 1.2.3 ; Kobayashi et al., 2015).

Grâce à des analyses de séquençage de chromatine immunoprécipitée (ChIPseq ou *Chromatin immunoprecipitation sequencing*) et de techniques dérivées (ChAP ou *chromatin affinity purification* et, TChAP ou *Tandem Chromatin Affinity Purification*), 2407 gènes ciblés par E2Fa ont été identifiés chez Arabidopsis dont 684 présentent la séquence consensus *E2F-binding* (Ramirez-Parra et al., 2003; Vandepoele et al., 2005a; Naouar et al., 2009; Verkest et al., 2014). Ces gènes sont principalement impliqués directement dans le cycle cellulaire ou sa régulation séquentielle, et dans la réparation de l'ADN (Verkest et al., 2014). Les facteurs de transcription E2Fa, E2Fb et E2Fc reconnaissant, au niveau des séquences promotrices, la

même séquence consensus *E2F-binding* que chez l'Humain, ils entrent donc directement en compétition dans la régulation de l'expression des gènes ciblés (Mariconti et al., 2002).

Une analyse de CHIPseq a récemment mis en évidence la liaison indirecte de RBR1 avec 937 gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réparation et la réplication de l'ADN, ainsi que l'organisation de la chromatine (Bouyer et al., 2018a). Sur ces gènes, 368 présentent la séquence consensus *E2F-binding* (WTTSSCSS ou le W est A/T et S, C/G) dont 121 sont déjà connus pour être ciblés par E2Fa (Top 200 ; Verkest et al., 2014). Notons que 64 autres gènes présents dans l'analyse CHIPseq de RBR1 sont ciblés par E2Fa malgré l'absence de la séquence consensus. Par ailleurs, parmi les 207 promoteurs ciblés par le facteur MYB3R3 retrouvés dans l'analyse CHIPseq de RBR1 (Kobayashi et al., 2015b), 90 le sont aussi par E2Fa. L'analyse de Bouyer et al. (2018) combinée aux données déjà publiées (Verkest et al., 2014 ; Kobayashi et al., 2015) a permis de mettre en évidence une liste non exhaustive des gènes ciblés par le complexe DREAM.

III Les CDK régulent la progression du cycle

La progression à travers les phases du cycle mitotique tout comme de l'endocycle, est sous le contrôle de l'activité d'une famille de protéines, les kinases dépendantes des cyclines (Cyclin-Dependant Kinase ou CDK). Ces niveaux d'activité kinase sont régulés par des interactions protéine-protéine, des modifications post-traductionnelles ainsi que des dégradations sélectives de protéines (Morgan et New Science Press, 2007).

III.A Les CDK

Les CDK ont un rôle clef dans la progression du cycle cellulaire. Identifiées pour la première fois chez des mutants de levure, *Schizosaccharomyces pombe* (Cdc2) et *Saccharomyces cerevisiae* (Cdc28), présentant un défaut du cycle cellulaire (Russell et Nurse, 1986), leurs orthologues ont été identifiés chez les mammifères (Humain ; Lee et Nurse, 1987; Draetta et al., 1987) et les plantes (Arabidopsis ; Ferreira et al., 1991; Hemerly et al., 1992). Huit classes de CDK (CDKA à CDKG) ont été caractérisées chez Arabidopsis (Mironov et al., 1999; Joubès et al., 2000; Vandepoele et al., 2002; Menges et al., 2005) mais seules deux

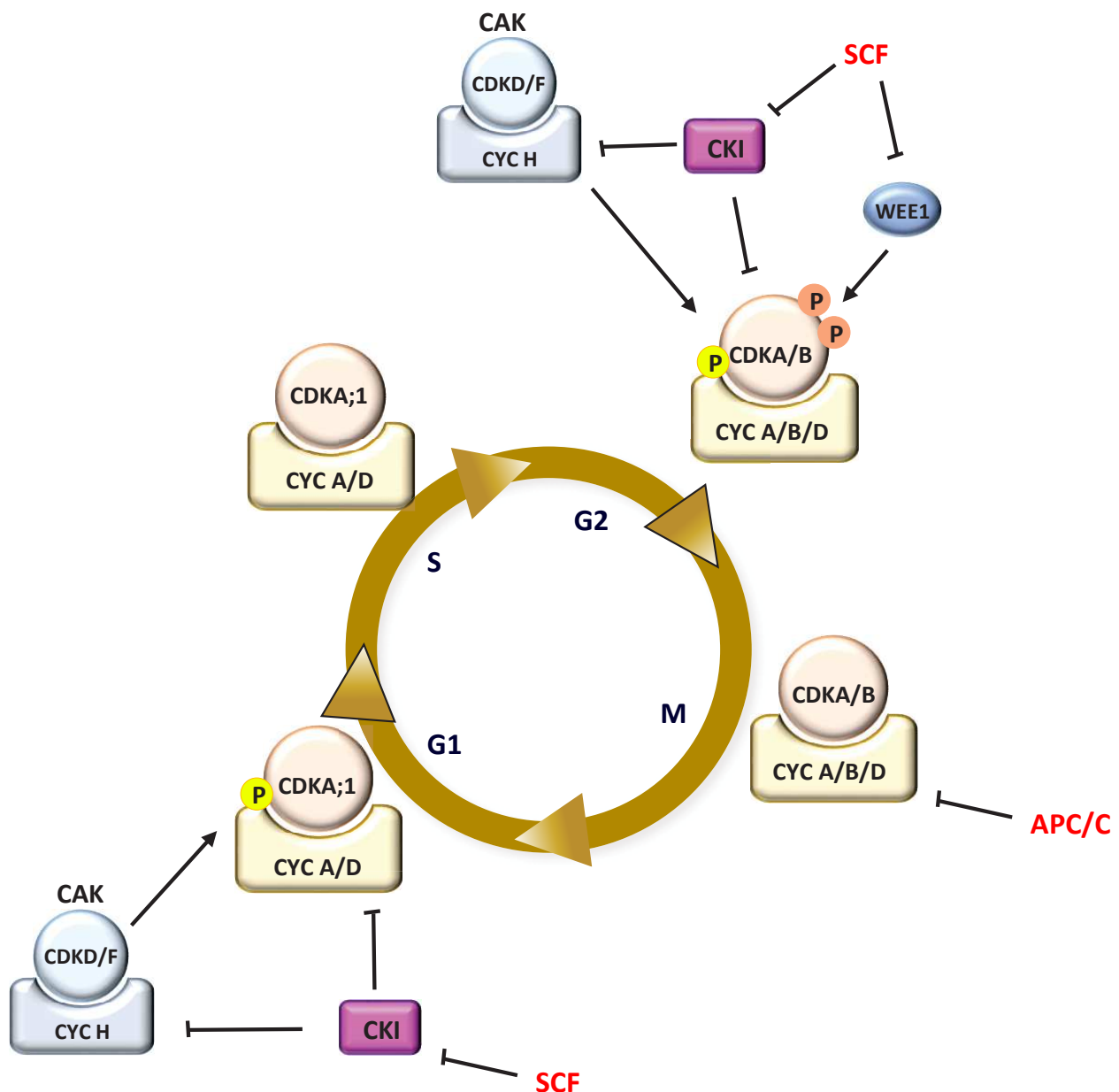


Figure 1.2.4 : Mécanismes moléculaires des différents niveaux de régulation lors du cycle cellulaire.

Les quatre phases du cycle cellulaire (G1, S, G2 et M) sont régulaées par les kinases dépendantes des cyclines, les CDK. L'activité des CDK est sous le contrôle de leur association avec les cyclines et de leur phosphorylation par les kinases activatrices des CDK (CAK) induisant leur activation, alors que les kinases inhibitrices des CDK (CKI) bloquent les complexes CDK-CYC. La phosphorylation des CDK par WEE1 permet de réguler leur activité. La régulation de l'activité des CDK permet de vérifier les bonnes conditions pour entrer dans un nouveau cycle ou pour vérifier la qualité de la réplication (checkpoint). Les complexes SCF permettent d'arrêter les actions inhibitrices des CKI et de WEE1 en ciblant ces protéines et en induisant leur dégradation. La sortie de la mitose est, quant à elle, sous le contrôle du complexe APC/C.

d'entre elles, CDKA et CDKB, sont impliquées directement dans la progression du cycle cellulaire.

Chez *Arabidopsis*, la famille des CDKA est composée d'un seul membre, le gène *CDKA;1*, qui joue un rôle clef dans la division cellulaire en contrôlant les cycles méiotique et mitotique lors des transitions G1/S et G2/M (Figure 1.2.4 ; Ferreira et al., 1991; Magyar et al., 1997; Dissmeyer et al., 2007; Harashima et al., 2007; Bulankova et al., 2010; Nowack et al., 2012; Takatsuka et al., 2015; Sofroni et al., 2020). La kinase CDKA;1 est la seule CDK, chez *Arabidopsis*, contenant le motif PSTAIRE impliqué dans l'interaction avec les cyclines, tout comme ses orthologues Cdk1 chez les mammifères et Cdc2/28 chez les levures (Mironov et al., 1999; Joubès et al., 2000; Vandepoele et al., 2002). Bien que viable, le mutant *cdka;1* a une fréquence d'apparition de 3,8% dans la descendance d'une plante hétérozygote, et est affecté au niveau cellulaire dans l'entrée des cellules en phase S et le maintien des cellules souches. Ces altérations résultent en des phénotypes sévères, notamment une stérilité totale, un retard de l'élongation racinaire, une forte réduction de la taille des cotylédons et des feuilles, une augmentation de la taille des cellules au niveau des cotylédons et de la première paire de feuilles et, une réduction de l'endoréduplication en accord avec la présence de trichomes petits et non branchés (Nowack et al., 2012).

Les CDKB spécifiques des plantes, constituent chez *Arabidopsis* une famille de 4 gènes *CDKB1;1*, *CDKB1;2*, *CDKB2;1* et *CDKB2;2*. Ces protéines sont caractérisées par la présence des motifs PPTALRE (CDKB1) et PS/PTTLRE (CDKB2 ; Vandepoele et al., 2002). De manière générale, elles assurent la régulation du point de contrôle G2/M lors de la progression du cycle (Figure 1.2.4 ; Porceddu et al., 2001; Nowack et al., 2012), et plus particulièrement leur implication a été montrée dans la formation des stomates (CDKB1 ; Boudolf et al., 2004; Xie et al., 2010) et l'organisation des niches de cellules souches (CDKB2 ; Andersen et al., 2008).

III.B La régulation de l'activité des CDK

L'activité des CDK est fortement régulée par le contrôle de leur conformation suite aux interactions avec d'autre protéines ou aux PTM. Si la conformation des CDK et la dynamique précise de leur régulation est très bien documentée dans le règne animal (livre et revue Morgan et New Science Press, 2007; Wood et Endicott, 2018), peu d'informations sont

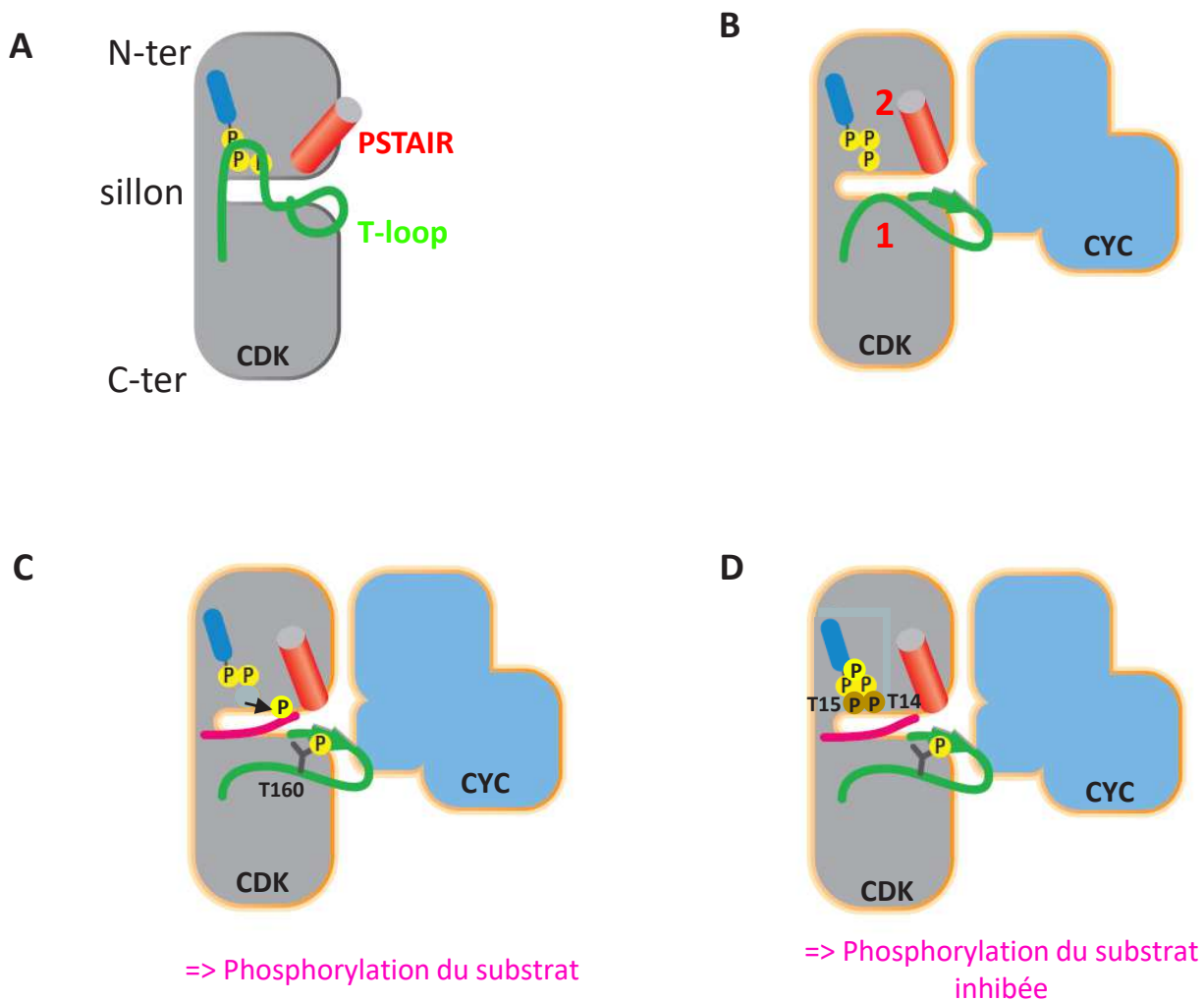


Figure 1.2.5 : Fonctionnement des complexes CDK-CYC: cas du complexes CDK(PSTAIR)-CYC

(A) En termes de structure, les CDK (en gris) sont composées de deux lobes, un petit lobe N-terminal et un grand lobe C-terminal, formant un sillon qui constitue un site actif de fixation de l'ATP nécessaire à l'activité kinase des CDK. Lorsqu'elles sont inactives, une boucle T (T-loop ou boucle d'activation ; en vert) dans le lobe de la partie carboxyle vient bloquer la poche active des CDK et une chaîne d'aa mal conformée dans cette poche active empêche l'utilisation de l'ATP. **(B)** En interagissant avec les lobes des CDK, les cyclines (CYC, en bleu) entraînent un changement de position de deux hélices. L'hélice L12 de la boucle T change de conformation et devient un feuillet bêta permettant la libération de la poche active (1) alors que l'hélice PSTAIRE du lobe N-terminal change de position et permet la re-conformation de la chaîne d'aa de la poche active (2). **(C)** Ce complexe CDK-CYC peut être régulé à différents niveaux. La thréonine 160 (T160) de la boucle T peut être phosphorylée permettant d'augmenter l'activité du complexe en stabilisant les interactions avec les substrats (en rose). **(D)** Par ailleurs, les phosphorylations sur la thréonine 14 (T14) et la tyrosine (T15) 15 des CDK inhibent leur activité kinase en interférant avec l'orientation du phosphate de l'ATP. Image modifiée d'après Morgan and New Science Press, 2007.

disponibles au niveau structural chez les plantes. Ces informations structurales nécessaires à la compréhension de l'activité des CDK sont présentées en Figure 1.2.5.

III.B.1 Les complexes CDK-cyclines

Les cyclines (CYC) ont un rôle majeur dans l'activation des CDK. Les cyclines présentent un domaine *cyclin-box* d'environ 100 aa qui permet leur interaction avec les CDK entraînant l'activation de leur activité kinase (Nugent et al., 1991; Wang et al., 2004). Chaque cycline présente un profil d'expression spécifique durant le cycle cellulaire permettant grâce aux différents complexes CDK-CYC de réguler les phases du cycle. Les premières cyclines (A et B) ont été identifiées chez des œufs d'oursin de mer et présentaient une accumulation et une dégradation par protéolyse à des stades précis du cycle cellulaire (Evans et al., 1983). Depuis cette découverte, 29 cyclines ont été caractérisées chez les mammifères (Humain ; Malumbres et Barbacid, 2005) et 49 chez les plantes (Arabidopsis ; Vandepoele et al., 2002; Wang et al., 2004; Menges et al., 2005). Chez Arabidopsis, ces cyclines sont organisées en dix classes (A-D, H, L, T, U, SDS et J18 ; Wang et al., 2004) et quatre d'entre elles interviennent directement dans la régulation du cycle cellulaire.

Les cyclines A (A1, A2 et A3 constituant une famille de 10 gènes), les cyclines B (B1 et B2, une famille de 11 gènes) et les cyclines D (D1-D7, une famille de 10 gènes ; Vandepoele et al., 2002; Wang et al., 2004; Menges et al., 2005), sont capables de s'associer avec les CDKA;1 et CDKB (Figure 1.2.4 ; Boruc et al., 2010; et références citées dedans). Au sein des cyclines de type A, CYCA3;1 et CYCA3;2 sont fortement présentes dès l'entrée en phase G1/S (Menges et al., 2005), et des analyses *in vitro* ont montré que le complexe CDKA;1-CYCA3;1 permet la phosphorylation de la protéine RBR1 (cf paragraphe II.A.2) confirmant le rôle clef de ces cyclines A dans la transition G1/S (Takahashi et al., 2010). Les autres cyclines A sont majoritairement exprimées en G2/M (Menges et al., 2005) et sont des régulateurs clefs de cette transition (Vanneste et al., 2011). Ainsi, l'association de la CYCA2;3 avec CDKB1;1 intervient dans le contrôle du maintien du cycle mitotique et la régulation négative de l'entrée en endocycle (Imai et al., 2006; Boudolf et al., 2009). Les cyclines B sont fortement exprimées en phase G2/M et interviennent dans l'entrée et la progression de la mitose (Menges et al., 2005; Joubès et al., 2000). La CYCB1;1 a été caractérisée pour son implication dans la réponse aux dommages à l'ADN, où le complexe CDKB1-CYCB1;1 intervient au niveau de la

recombinaison homologue (HR ; Weimer et al., 2016). Bien qu'étant un marqueur de la division cellulaire, l'induction de CYCB1;1 en condition de stress marque l'arrêt des cellules en phase S ou en début de phase G2 (Schnittger et De Veylder, 2018). Les cyclines B interviennent aussi dans la régulation de l'endoréduplication puisque la dégradation de CYCB1;1 permet d'induire l'endoréduplication dans les cellules non-méristématiques (Serralbo et al., 2006; Pérez-Pérez et al., 2008). La plupart des cyclines D (i.e. CYCD3;3, CYCD4;1, CYCD4;2, CYCD5;1, CYCD6;1 et CYCD7;1 ; Komaki et Sugimoto, 2012) sont exprimées au cours des phases G1 et S, et tout comme chez les animaux, elles interviennent dans la transition G1/S. Ainsi, en association avec la CYCD1;1 (Veylder et al., 1997), CDKA;1 est capable de phosphoryler l'homologue de Rb (RBR1 ; cf paragraphe II.A) permettant l'entrée en phase S (Boniotti and Gutierrez, 2001; Nowack et al., 2012). Aussi, de façon intéressante, la CYCD3;1 est transcrite au cours des phases G2 et M. Des analyses de surexpression et de mutant de CYCD3;1 ont permis de révéler son implication dans la durée de la phase M et dans le *timing* de la transition vers l'endocycle (Schnittger et al., 2002; Dewitte et al., 2003). Notons que sur les dix cyclines D présentes chez Arabidopsis, huit présentent le motif LxCxE permettant l'interaction avec RBR1 (Vandepoele et al., 2002).

Tout comme leur homologue chez la levure, la majorité des CYCA et CYCB chez Arabidopsis présentent un domaine dit D-box (*Destruction box* ; Genschik et al., 1998; Wang et al., 2004) permettant leur dégradation suite à l'adressage de ces cyclines *via* le complexe APC/C au protéasome 26S (Marrocco et al., 2009; Boudolf et al., 2009). Les cyclines D sont aussi dégradées par le protéasome, mais le complexe E3 ligases les ciblant n'a pas été identifié (Sanz et al., 2011).

Enfin la cycline H, codée par un gène unique chez Arabidopsis, (CYCH;1; Vandepoele et al., 2002), permet de réguler l'activité des kinases activatrices des CDK (*CDK-activating kinase* ou CAK, décrites ci-après) en se liant à ces kinases (Figure 1.2.4 ; Boruc et al., 2010) .

III.B.2 Les phosphorylations des CDK

III.B.2.a Les kinases activatrices des CDK (CAK)

Un autre niveau d'activation des CDK, leur permettant la reconnaissance de leur substrat, est leur phosphorylation. Les CDK peuvent être activées par une phosphorylation dans leur

région T-loop (Figure 1.2.5). Ces phosphorylations sont réalisées par une catégorie particulière de CDK, appelées kinases activatrices de CDK ou CAK (Nigg, 1996; Draetta, 1997). Chez *Arabidopsis*, deux classes de CAK ont été identifiées, celle des CDKD composée de trois gènes (*CDKD;1*, *CDKD;2* et *CDKD;3*) et celle de CDKF, spécifique des plantes, et codée par un seul gène *CDKF;1* (Umeda et al., 2005). Ces CAK ont un rôle majeur chez les plantes. En effet, bien que présentant une activité redondante (les simples mutants *cdkd* n'ont pas de phénotype particulier; Hajheidari et al., 2012), la perte de plusieurs de ces gènes entraîne des phénotypes importants. Ainsi les doubles mutants *cdkd;1cdkd;2* et *cdkd;2cdkd;3* présentent une réduction de la croissance et de la fertilité (Hajheidari et al., 2012), le double mutant *cdkd;1cdkd;3* présente une létalité gamétophytique due à leur implication dans la méiose (Takatsuka et al., 2015; Sofroni et al., 2020) alors que le triple mutant pour les trois allèles *CDKD* est létal (Hajheidari et al., 2012). Le mutant *cdkf;1*, quant à lui, est sévèrement affecté dans la division et l'élongation cellulaire ainsi que l'endoréduplication entraînant la formation d'une plante naine avec des feuilles serratées (Takatsuka et al., 2009; Hajheidari et al., 2012). Ces altérations peuvent s'expliquer par l'implication des CAK dans la régulation de l'activité de CDKA;1 qui devient active à la suite de la phosphorylation du résidu thréonine Thr161 de sa région T-loop (Figure 1.2.4 et 1.2.5 ; Dissmeyer et al., 2007). Cette activation est permise grâce aux CDKD, elles-mêmes phosphorylées sur leur région T-loop et activées par CDKF;1 (Takatsuka et al., 2009; Hajheidari et al., 2012).

III.B.2.b Phosphorylations inhibitrices des CDK

La phosphorylation (inhibitrice)/déphosphorylation (activatrice) des résidus Tyrosine 15 et Thréonine 14 au niveau de la partie N-terminale des CDK composant le sillon permet de moduler leur activité (Figure 1.2.5 ; Morgan et New Science Press, 2007). Ces modifications, largement comprises chez les mammifères, sont réalisées par le module Wee1 (kinase)/ Cdc25 (phosphatase). L'équilibre entre les activités de Wee1 et Cdc25 permet la progression correcte du cycle cellulaire mitotique chez les mammifères (Elbæk et al., 2020). Ces régulateurs clés du cycle cellulaire interviennent, d'une part, lors de la phase S pour réguler la réplication de l'ADN. Wee1 permet de limiter l'initiation de la réplication régulant ainsi la dynamique de réplication et l'intégrité des génomes. D'autre part, lors de la phase G2, Wee1 et Cdc25

permettent l'arrêt du cycle cellulaire et le contrôle de l'ADN répliqué avant l'entrée en mitose (Figure 1.2.4 ; Elbæk et al., 2020).

Chez les plantes, ces phosphorylations inhibitrices/activatrices et leurs régulations, sont différentes (Dissmeyer et al., 2010). D'une part, l'homologue de Wee1 est présent chez les plantes (Sun et al., 1999; Sorrell et al., 2002; Gonzalez et al., 2007). Alors que chez les mammifères, les souris mutantes *Wee1*^{-/-} meurent pendant l'embryogénèse (Tominaga et al., 2006), les mutants d'*Arabidopsis wee1* présentent une croissance et un développement normal comparés aux plantes sauvages (De Schutter et al., 2007). Grâce à des analyses *in vitro*, il a été montré que WEE1 est capable de phosphoryler les CDK pour inhiber leurs activités (Sun et al., 1999; Shimotohno et al., 2006; Gonzalez et al., 2007; Dissmeyer et al., 2009). D'un point de vue régulation, WEE1 serait ciblée par l'E3 ligase SCF^{SKIP1} pour induire sa dégradation par le protéasome 26S (Cook et al., 2013). D'autre part, les plantes ne présentent pas de "vrai" homologue de Cdc25. Seul un gène candidat *CDC25* a été caractérisé chez les plantes (Landrieu et al., 2004a, 2004b), mais il ne possède pas la région régulatrice N-terminale, bien qu'impliqué dans l'augmentation de l'activité des complexes CDK-cycline (Landrieu et al., 2004a). Les mutants *cdc25* quant à eux ne présentent pas d'altération de la croissance ou du profil de ploïdie de l'ADN (Dissmeyer et al., 2009).

Ainsi, les membres du module CDKA/WEE1/CDC25 sont présents chez les plantes et les phosphorylations des résidus Tyrosine 15 et Thréonine 14 ont été mises en évidence chez *Arabidopsis* pour moduler l'activité des CDKA;1 (Dissmeyer et al., 2009). Cependant, ces phosphorylations n'interviennent pas très clairement dans la régulation de la progression du cycle cellulaire permettant d'expliquer l'absence de phénotypes des mutants *wee1* et *cdc25*. Cela suggère des fonctions redondantes de ces protéines avec d'autre kinase et phosphatases chez les plantes.

III.B.3 Les inhibiteurs des CDK

Un autre niveau de régulation des CDK-CYC est la fixation de protéines dites inhibiteurs de CDK (CDK inhibitor ou CKI) qui vont bloquer l'activité du complexe (Figure 1.2.4). Les CKI peuvent venir interagir à la fois avec la cycline et la CDK, entraînant un changement de conformation du lobe amino-terminal au-dessus du site actif et le blocage du site de liaison à l'ATP (Figure 1.2.5). Chez les mammifères, deux classes de CKI sont distinguées sur la base de

leur mode d'action et de leur séquence : les Cip/Kip (CDK interacting protein/Kinase inhibitory protein) et les INK4 (**IN**hibitors of **CDK4**). La famille des Cip/Kip comprend 3 membres, à savoir : p21^{Cip1} impliquée en phases G1 et G2, notamment en réponse aux dommages à l'ADN, p27^{Kip1} qui aide à maintenir les cellules en phase G0, et p57^{Kip2} qui permet de réguler la prolifération et la différenciation cellulaire et intervient en G0 et G1. La famille INK4 quant à elle, distingue 4 membres : p16/INK4 A, p15/INK4B, p18/INK4C, et p19/INK4D. Ces protéines INK4 se lient aux Cdk4 et Cdk6, inhibant l'interaction et l'activation de ces CDK par les cyclines D lors de la phase G1 (Roskoski, 2019).

Chez les plantes, deux familles de CKI sont présentes. La première partage un domaine de 30 résidus en N-terminale avec la famille des CIP/KIP des mammifères et s'appelle les ICK/KRP (Interactor/Inhibitor of CDK/Kip-related inhibitor ; Wang et al., 2000; De Veylder et al., 2001; Zhou et al., 2003). Chez Arabidopsis, 7 membres KRP (KRP1-7) ont été identifiés et tous sont capables d'interagir avec les CDKA;1, CDKB1;2, CDKD;2, CDKD;3 et les cyclines de types D et H alors que les interactions avec les cyclines A, CDKB1;1, CDKB2;1, CDKD;1, CDKF;1 semblent être spécifiques à certaines KRP (Vandepoele et al., 2002; De Veylder et al., 2001). Le niveau d'accumulation des protéines KRP est important pour leurs fonctions. D'une part, la surexpression de ces KRP entraîne des phénotypes forts affectant la croissance et la morphologie des plantes tels que la réduction du nombre de cellules, de la taille des plantes, la formation de feuilles serrées et une modification du niveau de l'endoreduplication (Wang et al., 2000; De Veylder et al., 2001; Jasinski et al., 2002; Zhou et al., 2003; Jégu et al., 2013; Noir et al., 2015). Ces phénotypes sont probablement dus à l'action inhibitrice des KRP sur les CDK comme cela a été démontré pour KRP2 et CDKA;1 (De Veylder et al., 2001; Cheng et al., 2013). D'autre part, à l'exception de quelques mutants (i.e KRP5 ; Jégu et al., 2013), la perte d'une seule KRP n'entraîne pas de phénotypes forts. La redondance de fonctions des KRP nécessite l'utilisation de quadruples et quintuples mutants *krp* pour observer des phénotypes tels qu'une augmentation du nombre de cellules mais une réduction de leurs tailles ou la formation de feuilles étroites et courbées et des septuples mutants pour étudier la fonction des KRP dans la formation des mégaspores (Cheng et al., 2013; Cao et al., 2018). Le niveau de protéines KRP est régulé grâce à leur dégradation par le système UPS. Ainsi il a été montré que KRP1 est ciblée par l'E3 ligase SCF^{SKP2b} et la protéine RING RKP (Related to KPC1), les enzymes RHF1a (RING-H2 group F1a) et RHF2a entraînent la dégradation de KRP6 durant la méiose lors de la formation des gamètes alors que les KRP 6 et 7 sont reconnues par l'E3 ligase

SCF^{FBL17} lors du développement du grain de pollen (voir chapitre 4 ; Ren et al., 2008; Liu et al., 2008; Gusti et al., 2009; Kim et al., 2008).

La deuxième famille de CKI, spécifique aux plantes, est celle des SMR (SIAMESE-related ou SIM-related). Les SIM/SMR partagent un motif commun avec les KRP, bien que non essentiel à leur fonctionnement, impliqué dans l'interaction avec les cyclines (Churchman et al., 2006; Peres et al., 2007; Kumar et al., 2018). Ainsi, les SIM/SMR sont capables d'interagir avec les cyclines D et CDKA;1 (Churchman et al., 2006), et aussi, avec CDKB1;1 *in vitro* (Kumar et al., 2015). Ce groupe est composé de 17 membres chez *Arabidopsis* (Kumar et al., 2015) qui interviennent principalement dans la mise en place de l'endoreduplication, mais aussi dans la réponse aux conditions de stress (Churchman et al., 2006; Peres et al., 2007; Kumar et Larkin, 2017; Kumar et al., 2018; Dubois et al., 2018).

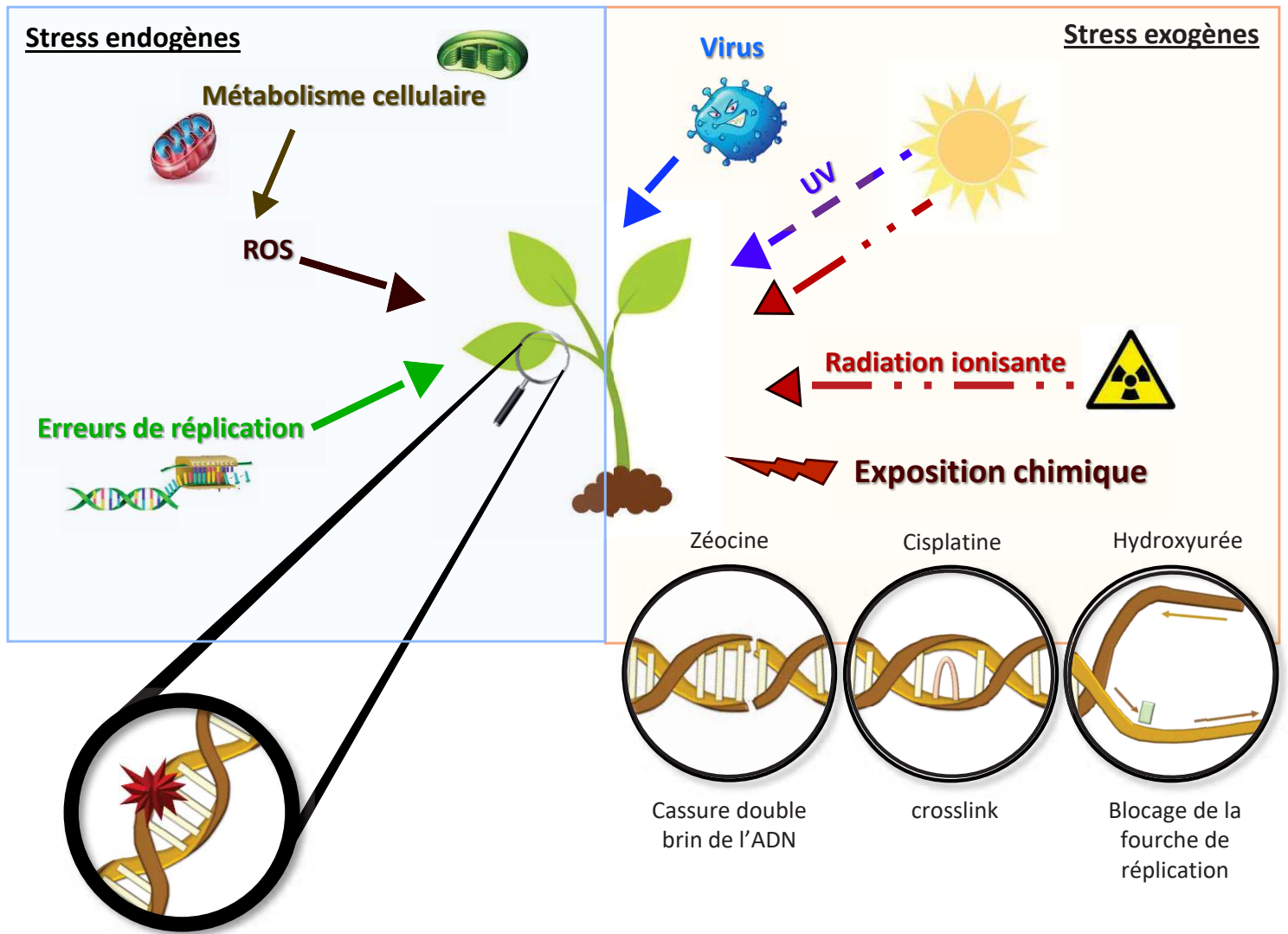


Figure 1.3.1 : Les stress génotoxiques endogènes et exogènes

Les stress génotoxiques peuvent être d'origines soit endogène, suite à une erreur lors de la réplication de l'ADN ou une production anormalement élevée de ROS par le métabolisme cellulaire, soit exogène, *via* l'exposition aux agents pathogènes, aux radiations (UV et ionisantes) et aux produits chimiques.

Chapitre 3 : La réponse aux dommages à l'ADN

Les organismes sont constamment soumis à différentes sortes de stress. Qu'ils soient endogènes ou exogènes, certains de ces stress peuvent compromettre l'intégrité physique ou fonctionnelle des génomes et induire des dommages à l'ADN, ces stress sont alors dits génotoxiques (Figure 1.3.1). Cependant, les cellules possèdent des systèmes complexes et sophistiqués pour maintenir l'intégrité génétique de l'individu afin que ces anomalies ne soient pas transmises aux générations futures. L'étude de ces systèmes a permis à Tomas Lindahl, Paul Modrich et Aziz Sancar de recevoir le prix Nobel de chimie en 2015 pour avoir cartographié les mécanismes moléculaires de la réparation de l'ADN et de la conservation de l'information génétique (Cleaver, 2016).

I Les stress génotoxiques

I.A Les stress endogènes

I.A.1 Production d'espèces réactives de l'oxygène

Les espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* ou ROS) sont des molécules bioactives importantes intervenant au niveau de la signalisation et de l'homéostasie cellulaires dans de nombreux processus tels que la croissance, le développement, la maintenance des méristèmes végétatifs apicaux, la morphogénèse des organes, la réponse aux stress et les modifications épigénétiques (Huang et al., 2019). L'anion superoxyde (O_2^-), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle (HO^*) font parties des ROS les mieux décrites (Sharma et al., 2012; Chatterjee et Walker, 2017). Ils sont issus d'un transfert d'électrons, dérivés des activités chloroplastiques, mitochondriales ou de voies métaboliques, sur le dioxygène (O_2 ; Sharma et al., 2012; Huang et al., 2019). Leur production est favorisée par les stress environnementaux tels que la sécheresse, le stress salin, les radiations UV ou les attaques pathogènes. Malgré leurs rôles importants en tant que messenger secondaire dans les processus cellulaires, une forte accumulation de ROS au sein des cellules peut entraîner un stress oxydatif provoquant des dommages à l'ADN pouvant être nucléaires, mitochondriaux ou chloroplastiques (Sharma et al., 2012; Chatterjee et Walker, 2017). L'attaque oxydative de

l'ADN entraîne une oxydation des désoxyriboses, une cassure des brins d'ADN, la perte de nucléotides, la modification des bases des nucléotides ainsi que la formation d'interactions croisées (*crosslink*) avec des protéines (Sharma et al., 2012). Par exemple, l' HO^\bullet , espèce la plus réactive, va réagir avec les bases de l'ADN en s'ajoutant au niveau de leurs doubles liaisons ou avec les sucres de l'ADN en retirant les atomes d'hydrogènes des désoxyriboses (Imlay et al., 1988; Dizdaroglu et al., 1991; Breen et Murphy, 1995).

Tout en maintenant une quantité suffisante de ROS pour maintenir les activités cellulaires, les plantes possèdent des systèmes de défense antioxydants efficaces afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, permettant d'éviter une accumulation de ROS et donc de dommages à l'ADN.

I.A.2 La réplication de l'ADN

La réplication de l'ADN, qui se doit d'être hautement fidèle afin d'éviter la perte d'information génétique, est assurée par des enzymes, les DNA polymérases (Pol, cf Partie 1, Chapitre 2). Chez la plupart des organismes, ces DNA polymérases sont multiples (e.g. 8 chez *Saccharomyces cerevisiae*, 16 chez l'Homme et 12 chez *Arabidopsis thaliana*) et 3 complexes en particulier, les Pol α , δ , et ϵ , assurent la duplication des génomes chez les eucaryotes (Pedroza-Garcia et al., 2019). Ces polymérases répliquatives peuvent engendrer des erreurs à la suite de l'incorporation de nucléotides mal appariés. Un système de relecture assuré par des DNA polymérases spécialisées est capable de retirer 90 à 99% des bases mal appariées permettant à la machinerie de réplication de présenter un taux d'erreurs d'environ 10^{-7} à 10^{-8} chez les Eucaryotes (Kunkel, 2004; Jiricny, 2013). Ces taux d'erreurs, déterminés en absence de stress environnementaux et de réparation de l'ADN, sont augmentés par tout stress supplémentaire agissant sur la machinerie de réplication.

I.B Les stress exogènes

En tant qu'organismes sessiles, les plantes subissent des contraintes exercées par leur environnement sans pouvoir leur échapper. Les stress génotoxiques exogènes correspondent aux infections par des agents pathogènes ou à l'exposition à des métaux lourds (tels que

l'aluminium), et principalement à l'exposition aux rayonnements solaires, ou à des agents chimiques mutagènes. Ces deux derniers types de stress sont développés ci-après.

I.B.1 Les rayonnements

Certains rayonnements sont capables d'induire des dommages à l'ADN. Dans 65% des cas, ces dommages sont issus de la production de ROS chez les organismes et dans 35% des cas, les rayonnements affectent directement l'intégrité physique de l'ADN (étude *in vitro* sur des cellules de mammifères; Chapman et al., 1973; Ward, 1988). Parmi ces rayonnements, on retrouve, d'une part, les rayonnements ultraviolets (UV ; 10–400 nm), issus de la lumière du soleil et décomposés en trois classes, les UV-A (320 à 400 nm), les UV-B (290 à 320 nm) et les UV-C (280 à 100 nm). Seuls les UV-A (95% des rayonnements) et les UV-B (5% des rayonnements) atteignent la surface de la Terre, alors que les UV-C sont eux filtrés à leur entrée dans l'atmosphère par l'oxygène et l'ozone (Sinha et Häder, 2002). Cependant, aussi bien les UV-B que les UV-C peuvent être absorbés par l'ADN et produire des photolésions et des photoproduits. Ceux-ci entraînent alors une distorsion de l'hélice d'ADN ce qui peut soit interférer avec la réplication et la transcription de l'ADN, soit dans certains cas, induire des cassures simple brins de l'ADN (Sinha et Häder, 2002; Molinier, 2017). D'autre part, les rayonnements ionisants (IR) composés des rayonnements alpha, bêta, gamma, neutron, X et les UV lointains (122 à 200 nm) sont produits par différentes sources naturelles (sol, rayonnement cosmique...) ou par l'Homme (appareils médicaux, activités industrielles...) et sont les plus nuisibles pour l'ADN. Ils peuvent former des *clusters* de dommages comprenant des lésions au niveau des bases de l'ADN voir leurs pertes, l'oxydation des purines ou pyrimidines, des réactions croisées avec les protéines (*crosslink*), des cassures simple-brin de l'ADN, mais aussi le dommage le plus critique, des cassures double-brins de l'ADN (Ward, 2000; Sage et Shikazono, 2017).

I.B.2 Les agents chimiques

La découverte des cellules cancéreuses en 1850 a entraîné le développement de méthodes visant à contrer cette prolifération anormale des cellules. En plus de la chirurgie et de la radiothérapie, il a fallu attendre presque 100 ans et la découverte de molécules

chimiques pouvant affecter la régulation du cycle cellulaire pour permettre la mise en place de la chimiothérapie, efficace dans contre de nombreux types de cancers. Ces molécules chimiques sont capables d'inhiber la prolifération anormale des cellules cancéreuses, mais induisent aussi des dommages à l'ADN sur toutes les cellules de l'organisme. Certaines de ces drogues sont utilisées afin d'étudier la réponse aux dommages à l'ADN (Kim et al., 2016a).

I.B.2.a La Zéocine (*zeocin*)

Dans les années 1956, Umezawa et ses collaborateurs découvrent, en étudiant la bactérie *Streptomyces verticillus*, une nouvelle classe d'antibiotiques antitumoraux appelée bléomycine (Umezawa et al., 1966; Kim et al., 2016c). Cette famille possède des propriétés radiomimétiques dont le mode d'action se caractérise par la formation de complexes avec des ions métalliques tels que le cuivre (Cu^{2+}) ou le fer (Fe^{2+} , D'Andrea et Haseltine, 1978). Ce complexe s'intercale entre les bases de l'ADN et catalyse une réaction d'oxydoréduction entraînant la cassure de l'ADN par la libération de radicaux libres (Stubbe et Kozarich, 1987).

La Zéocine (ou phléomycine D1, $\text{C}_{55}\text{H}_{86}\text{N}_{20}\text{O}_{21}\text{S}_2$) est un analogue naturel de la bléomycine. Son implication dans la cassure double-brin (*double strand break* ou DSB) de l'ADN a été caractérisée chez *Saccharomyces cerevisiae* (Todorova et al., 2019) et *Chlamydomonas reinhardtii* (Chankova et al., 2007). Soluble dans l'eau, elle est vendue sous forme inactive, chélatée au cuivre Cu^{2+} , lui donnant sa couleur bleue caractéristique. La réduction de Cu^{2+} en Cu^+ libère la Zéocine qui devient active et se lie alors à l'ADN entraînant les cassures (Thermofisher: User Guide: Zeocin Selection Reagent (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/cell-culture/transfection/selection/zeocin.html>)).

I.B.2.b L'Hydroxyurée

Synthétisée pour la première fois en 1869 par W.F.C Dresler, il a fallu attendre 1928 et les travaux de F. Rosenthal sur l'inhibition de la croissance des leucocytes de moelles osseuses de lapin pour découvrir le mode d'action de l'hydroxyurée (HU; Dresler et Stein, 1869; Rosenthal et al., 1928). En se liant à la ribonucléotide réductase, l'HU ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}_2$) inhibe la formation des désoxyribonucléotides à partir des ribonucléotides perturbant la synthèse de

l'ADN durant la phase S (Young et Hodas, 1964; Krakoff et al., 1968). L'inhibition de la synthèse de l'ADN en phase S entraîne un arrêt du cycle ainsi que l'induction de dommages à l'ADN tels que les cassures simple brin (Singh et Xu, 2016).

I.B.2.c La Cisplatine

Synthétisée pour la première fois en 1845 par Michel Peyrone, la cisplatine ($\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2$) présente une structure assez simple élucidée en 1893 par Alfred Werner, composée d'un atome de platine en son centre, de 2 groupes amines et 2 chlores (Chemical & Engineering News: Top Pharmaceuticals: Cisplatin). Il a fallu attendre 1965 et les travaux de B. Rosenberg sur l'impact des champs électriques sur la prolifération bactérienne pour comprendre son mode d'action (Rosenberg et al., 1965). B. Rosenberg observa que l'inhibition de la prolifération bactérienne dans un milieu de culture en présence de courant électrique est en fait due à la nature des électrodes et non à la présence de courant électrique. Les électrodes de platines en réaction aux ions ammonium et chlorure du milieu de culture libèrent un complexe de platine, la cisplatine, ayant un effet inhibiteur sur la division cellulaire. Depuis lors, la cisplatine est l'une des drogues les plus utilisées dans les traitements anti-cancéreux (Rosenberg et al., 1965; Kim et al., 2016b). Lorsque la cisplatine est en conformation cis, elle est alors active et une hydrolyse des groupements chlores entraîne un chargement de l'ion platine $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{ClH}_2\text{O}]^+$ induisant une liaison aux bases guanosines ou adénines de l'ADN. Cette liaison de la cisplatine à l'ADN entraîne la formation de réticulation croisée ou intra-brin (*crosslink ou intracrosslink*) qui à terme entraîne un arrêt de la réplication de l'ADN.

II Les réponses aux dommages à l'ADN

L'ADN est sujet à un large répertoire de dommages comprenant la réticulation de l'ADN (*crosslink*), les cassures simple- et double- brin, les dommages ou la perte de bases ou de nucléotides, les interactions ADN-protéine ou le blocage de la fourche de réplication (Tuteja et al., 2001). Parmi ces dommages, la cassure double-brin (DSB) de l'ADN est le type le plus néfaste pour l'intégrité de la séquence d'ADN. En effet, si la réparation mise en place n'est pas efficace, l'organisme peut perdre des fragments de séquence d'ADN porteuse de l'information génétique allant parfois jusqu'à la perte d'un gène entier (Cannan et Pederson, 2016). Etant

donnée l'importance de conserver leur intégrité génomique, les cellules ont développé différentes stratégies pour détecter et répondre aux stress génotoxiques. Ces stratégies constituent les réponses aux dommages à l'ADN (*DNA damage response* ou DDR ; Tuteja et al., 2001).

A la suite de la détection d'un dommage à l'ADN (cf paragraphe.III.A), la première stratégie de DDR consiste en l'arrêt du cycle cellulaire grâce à l'activation de différents points de contrôle et l'inhibition des acteurs impliqués dans la progression du cycle (Preuss et Britt, 2003; Yoshiyama et al., 2009), afin de mettre en place un mécanisme approprié de réparation de l'ADN. En effet, le répertoire des voies de réparation de l'ADN est aussi étendu que celui des dommages et permet d'y répondre spécifiquement (Tuteja et al., 2001). On retrouve notamment la voie de réparation par excision de nucléotides ou de bases, la voie de réparation des mésappariements et celles de la réparation des cassures simple et double-brin de l'ADN (Tuteja et al., 2001, 2009). Les DSB de l'ADN sont détectées et réparées par deux voies, celle de la jonction non-homologue des extrémités de l'ADN (*Non-Homologous End-Joining* ou NHEJ) et la recombinaison homologue (*Homologous Recombination* ou HR). La NHEJ est réalisée tout au long du cycle cellulaire et plus particulièrement en phase G1 (Goodarzi et al., 2010) où elle relie les extrémités de l'ADN sans rechercher de modèle de séquence, entraînant une perte d'information génétique (Deriano et Roth, 2013). La HR, quant à elle, nécessite la présence de la chromatine sœur, utilisée comme matrice homologue, pour permettre une réparation avec un minimum d'erreurs et a donc lieu en phase S/G2 (Cejka, 2015). Chez les plantes, il a été montré que la réparation des DSB de l'ADN dans les cellules méiotiques se fait *via* la HR alors que la majorité des DSB dans les cellules somatiques sont réparées par la voie NHEJ (Puchta, 2005).

Si les dommages à l'ADN ne peuvent être réparés, la cellule en division doit alors éviter leur transmission aux cellules-filles, soit par la mise en place d'une mort cellulaire programmée, soit par une transition du cycle mitotique vers l'endoréduplication (Cf Partie 1, Chapitre 1). Chez les animaux, l'apoptose est une mort cellulaire programmée fréquemment induite en réponse aux dommages à l'ADN, cela se traduit notamment par le rétrécissement cellulaire, une condensation de la chromatine périphérique ainsi qu'une fragmentation nucléaire (Norbury et Zhivotovsky, 2004; Elmore, 2007). Chez les plantes, à la suite d'un stress génotoxique, cette mort cellulaire programmée s'observe principalement au niveau des cellules méristématiques, racinaires et caulinaires, et se traduit par une perte de l'organisation

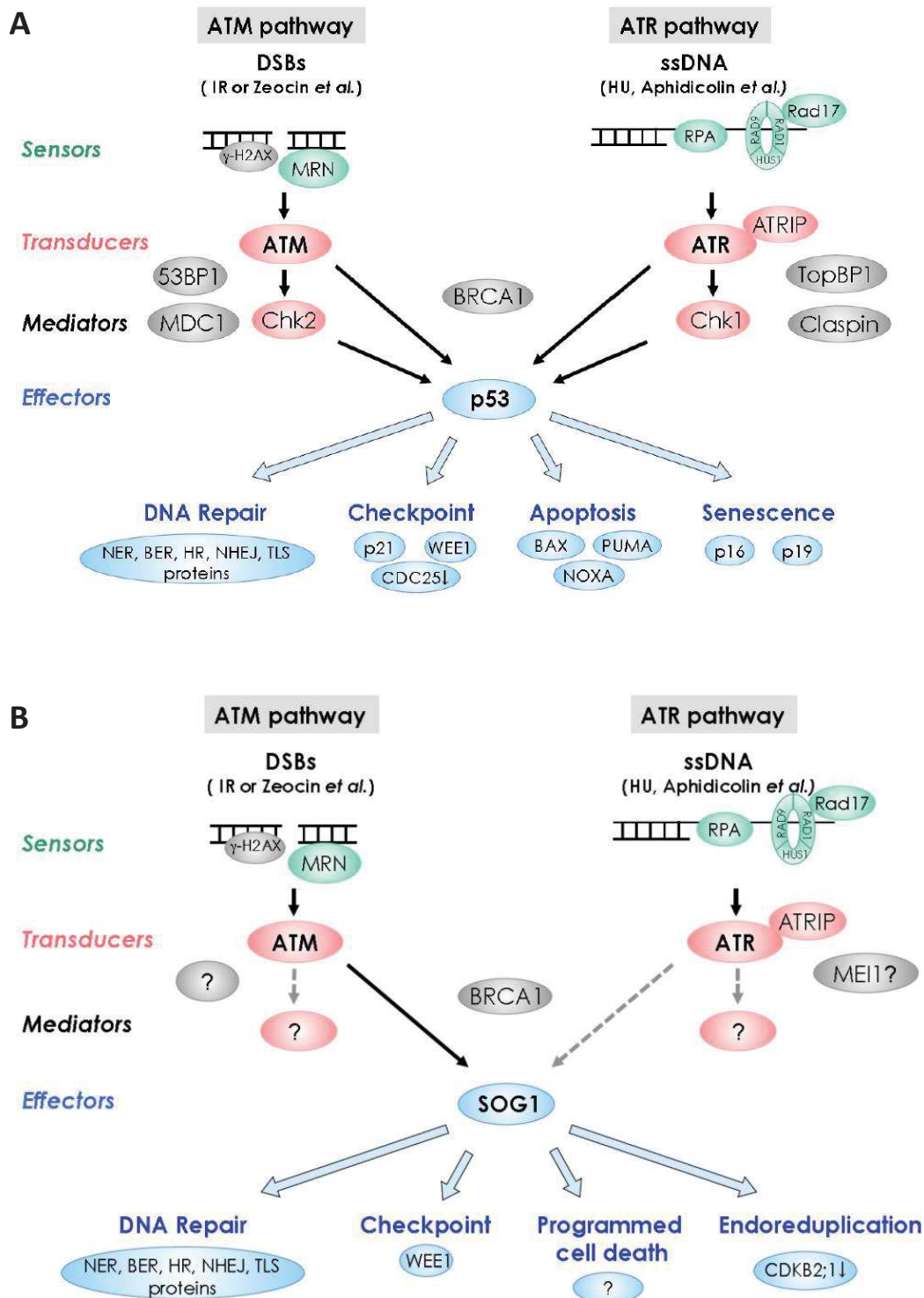


Figure 1.3.2 : Voie de signalisation aboutissant à la réponse aux dommages à l'ADN (DDR)

Comparaison des voies de la DDR chez les mammifères (**A**) et les plantes (**B**). Les senseurs de la DDR sont représentés en vert, les transducteurs en rouge, les médiateurs en gris et les effecteurs en bleu clair. En bleu roi, sont précisées les réponses aux dommages à l'ADN. Image issue de Yoshiyama *et al* (2013).

interne avec une réorganisation du cytosquelette, une rupture du tonoplaste et de nombreuses vésicules (Fulcher et Sablowski, 2009; Furukawa et al., 2010). Il a été montré chez *Arabidopsis thaliana* que cette mort cellulaire implique les kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (Ataxia-Telangiectasia Related ; cf paragraphe III.B) et qu'il s'agit bien d'une réponse génétiquement programmée consécutive aux dommages à l'ADN et non un effet secondaire subi (Fulcher et Sablowski, 2009). Une alternative à la mort cellulaire en réponse aux stress génotoxiques est la reprogrammation du cycle cellulaire vers l'endoréduplication (Shu et al., 2018, Cf Partie 1, Chapitre 2). L'endoréduplication requiert les acteurs majeurs de la voie de la DDR à savoir, ATM, ATR et SOG1, décrits ci-après et permet aux plantes d'empêcher le transfert d'ADN endommagé sans entraîner la mort de la cellule, réponse drastique provoquant l'altération de la structure tissulaire et pouvant entraîner une faiblesse pour les plantes (Adachi et al., 2011).

III La voie de signalisation de la DDR

La voie de la DDR comprend de nombreux acteurs impliqués à différents niveaux. Les senseurs vont permettre de reconnaître les dommages et de transmettre l'information aux transducteurs du signal, les kinases. Ces dernières, grâce à des phosphorylations, vont activer les médiateurs et les effecteurs de la voie de la DDR afin d'induire les réponses spécifiques décrites ci-dessus (Figure 1.3.2).

III.A Les senseurs

III.A.1 Le complexe MRN

Le complexe MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) est décrit comme étant un acteur clef de la réponse aux dommages à l'ADN et de la maintenance de l'intégrité génomique chez les Eucaryotes, puisqu'il intervient à la fois, en tant que senseur, en reconnaissant les DSB de l'ADN (présenté ci-dessous), mais aussi en tant que médiateur (discuté plus tard ; Rupnik et al., 2010). Ce complexe est composé en son centre des nucléases Mre11 (Meiotic Recombination 11 Homolog 1) sous forme de dimère (Sung et al., 2014), de deux sous-unités ATPase Rad50 permettant de rapprocher les extrémités d'ADN grâce à leurs domaines *coiled-*

coil (Hopfner et al., 2002) et de la protéine Nbs1 (Nijmegen Breakage Syndrome Protein 1) permettant le recrutement nucléaire de Mre11-Rad50 et l'activation de la kinase Atm au niveau des sites de dommages à l'ADN (Kobayashi et al., 2002; Hořejší et al., 2004; Lee et Paull, 2004; Rupnik et al., 2010; Paull et Deshpande, 2014). D'un point de vue évolutif, le complexe MRN apparaît bien conservé depuis les archées jusqu'aux Eucaryotes en ce qui concerne les protéines Mre11 et Rad50 (Connelly et Leach, 2002), et entre Eucaryotes pour la protéine Nbs1 (Paull et Deshpande, 2014; Komatsu, 2016). Ainsi chez les mammifères, quelle que soit la protéine altérée, Mre11, Rad50 ou Nbs1, cette perte entraîne la létalité embryonnaire (Xiao et Weaver, 1997; Luo et al., 1999; Zhu et al., 2001; Buis et al., 2008; Dumon-Jones et al., 2003). Dans le cas d'*Arabidopsis*, les mutants *mre11*, *rad50* et *nbs1*, sont viables mais présentent une hypersensibilité aux agents génotoxiques, conséquence d'un défaut dans le mécanisme de réparation de l'ADN (Gallego et al., 2001; Bundock et Hooykaas, 2002; Waterworth et al., 2007).

III.A.2 Le complexe KU70-KU80

Dans la voie de la NHEJ, la DSB de l'ADN est reconnue par l'hétérodimère de protéines kinases Ku (Ku70/Xrcc6-Ku80/Xrcc5). Ces protéines Ku vont permettre le recrutement de facteurs tels que Xrcc4 (X-Ray Repair Cross-Complementing Protein 4) et la ligase IV (Lig4) impliqués dans la modification des extrémités de l'ADN et le remplissage des espaces permettant la liaison des extrémités de l'ADN cassé (Deriano et Roth, 2013). Chez *Arabidopsis*, les mutants *ku70* et *lig4* présentent une hypersensibilité aux conditions générant des DSB de l'ADN (Furukawa et al., 2015).

III.A.3 Le complexe RPA

Le complexe RPA (Replication Protein A) est un hétérotrimère composé des sous unités Rpa1, Rpa2 et Rpa3, capable de lier un simple brin d'ADN et particulièrement important dans la réplication, la réparation de l'ADN et la DDR (Oakley et Patrick, 2010). En conditions de cassure simple brin de l'ADN (*Single Strand Break* ou SSB), le complexe RPA se lie au brin d'ADN cassé pour participer à la réparation *via* l'excision de bases et de nucléotides, la réparation des mésappariements (*mismatch*) et la réparation des DSB (Wold, 1997; Oakley et Patrick,

2010; Deng et al., 2014). La mutation de n'importe quelle sous-unité du complexe entraîne, chez la levure, la létalité ou une déstabilisation génomique (Smith et Rothstein, 1995; Santocanale et al., 1995) faisant du complexe RPA un régulateur central de la machinerie de maintenance du génome (Byrne et Oakley, 2019). En termes évolutifs, alors que le complexe RPA est hautement conservé chez les Eucaryotes (Wold, 1997), des régulations spécifiques de ce complexe se distinguent entre l'Homme, la levure et les plantes. Une seule copie par sous-unité du complexe RPA est détectée chez les mammifères alors que le génome d'*Arabidopsis* présente 5 gènes *RPA1*, 2 gènes *RPA2*, et 3 gènes *RPA3* (Shultz et al., 2007; Ganpudi and Schroeder, 2011; Aklilu et al., 2014). Ces nombreuses sous-unités RPA vont former différents complexes impliqués préférentiellement dans certaines voies de signalisation (Eschbach et Kobbe, 2014; Aklilu et Culligan, 2016). Ainsi, chez *Arabidopsis*, RPA1a est impliquée dans la progression de la méiose, RPA1b et RPA1d interviennent dans la réplication de l'ADN et RPA1c et RPA1e jouent un rôle clef dans la voie de réparation de l'ADN (Aklilu et al., 2014; Aklilu and Culligan, 2016)

III.A.4 Le Complexe 9-1-1

Le complexe hétérotrimérique 9-1-1 (RAD9-RAD1-HUS1 ; Onge et al., 1999; Hang et Lieberman, 2000) est recruté au niveau de la chromatine endommagée suite à différents stress (tels que les UV, les IR et les drogues) suggérant son implication dans la réponses à plusieurs types de dommages à l'ADN (Parrilla-Castellar et al., 2004). Des études chez la levure et l'Homme ont permis de montrer que le recrutement de ce complexe au site de lésion de l'ADN se fait grâce à la protéine Rad17 et son interaction avec Rad9 (Bermudez et al., 2003). Les sous-unités 9-1-1 s'associent alors sous forme d'anneau qui encerclent l'ADN double brin (agissant comme une pince ; Doré et al., 2009; Sohn et Cho, 2009; Xu et al., 2009). Une fois fixé, ce complexe va permettre le recrutement d'autres facteurs et activer les points de contrôle tels que Chk1 et la kinase Atr (voir ci-dessous ; Zou et al., 2002). La plante modèle *Arabidopsis* présente des protéines orthologues pour chacune des sous-unités du complexe 9-1-1 et pour Rad17 (Venclovas et Thelen, 2000; Heitzeberg et al., 2004) et bien que moins étudiées que chez les mammifères, leur implication dans la réparation de l'ADN a été confirmée (Fidantsef et al., 2000; Heitzeberg et al., 2004).

III.B Les transducteurs

Chez les animaux, la détection des dommages à l'ADN par les senseurs entraîne le recrutement et l'activation des transducteurs du signal, les sérine-thréonine-kinases, Atm, Atr et DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit). Ainsi, lors des DSB, Nbs1 du complexe MRN recrute Atm sur le site du dommage et Ku80 recrute DNA-PK. Les SSB induisent alors le recrutement de Atr *via* la protéine Atrip (ATR-Interacting Protein) et le complexe RPA (Zou et Elledge, 2003; Blackford et Jackson, 2017). Une fois recrutée, ces kinases vont devenir actives *via* une auto-phosphorylation et vont phosphoryler de nombreux acteurs en aval de la voie entraînant une cascade d'activation et d'inhibition des médiateurs, des senseurs et des points de contrôles de la DDR. Chez les mammifères, ces kinases ciblent notamment les protéines Brca1 (Breast Cancer 1), le suppresseur de tumeur p53 et les sérine-thréonine-kinases Chk1/Chk2 (Matsuoka et al., 2007; Stokes et al., 2007; Blackford et Jackson, 2017). Chk1/Chk2 vont elles-mêmes phosphoryler Brca1, p53, et les régulateurs du cycle E2f1 et Cdc25a (Kim et al., 2007). Ainsi, lors de dommages à l'ADN, la réplication de l'ADN et la mitose sont inhibées alors que la recombinaison, la réparation de l'ADN et l'apoptose sont activées. Les kinases Atm et Atr assurent un rôle majeur dans la DDR chez les animaux. Les mutants *Atr*^{-/-} sont sujets à de la létalité embryonnaire (Brown et Baltimore, 2000) et les mutants *Atm*^{-/-} chez les mammifères présentent des problèmes de croissance, des dysfonctionnements cérébraux et de la stérilité (Xu et al., 1996) alors que les mutants *Dna-pk*^{-/-} ne semblent pas présenter de phénotypes particuliers chez la souris (Gao et al., 1998; Menolfi et Zha, 2020).

Arabidopsis présente des orthologues des protéines Atm et Atr qui ont conservé leur fonction en tant que transducteur du signal de la DDR (Garcia et al., 2003; Culligan et al., 2004). Cependant, des différences existent puisque la kinase DNA-PK, les kinases Chk1/Chk2 et la protéine p53 ne sont pas conservées chez les plantes. De plus, il a été montré que parmi les 108 protéines phosphorylées de façon ATM-/ATR-dépendantes chez les plantes, 69 sont des orthologues de protéines ciblées de façon Atm-/Atr-dépendantes chez les mammifères mettant en avant une différence de répertoire de protéines cibles entre les deux règnes (Roitinger et al., 2015; Matsuoka et al., 2007; Stokes et al., 2007). D'un point de vue phénotypique, les mutants d'*Arabidopsis* *atm* et *atr* sont viables et présentent un phénotype sauvage, sauf au niveau gamétophytique pour le mutant *atm* qui présente une stérilité partielle (Roitinger et al., 2015; Matsuoka et al., 2007; Stokes et al., 2007). Enfin, les travaux

sur ces kinases ont permis de mettre en évidence qu'ATM est spécifiquement recrutée par le complexe MRN lors des DSB de l'ADN (Rupnik et al., 2010), le mutant *atm* est donc sensible aux agents génotoxiques induisant des DSB (e.g. IR, Zéocine ; Garcia et al., 2003), alors qu'ATR est recrutée lors des dommages simple brin ou du blocage de la fourche de réplication et son mutant est donc sensible aux stress affectant la réplication tels que une exposition à l'aphidicoline ou l'HU (Culligan et al., 2004; Maréchal and Zou, 2013).

III.C Les médiateurs

Les médiateurs de la voie DDR vont permettre de recruter des substrats supplémentaires et/ou, en jouant le rôle de plateforme, d'assembler des complexes protéiques. Parmi les nombreux médiateurs identifiés chez les mammifères, tels que le complexe Mrn, Brca1, Mdc1 (Mediator of DNA damage checkpoint protein 1) ou les Claspins (liste non exhaustive ; Harper et Elledge, 2007), l'histone H2AX joue un rôle clef. Suite à la formation de dommages à l'ADN, notamment les DSB de l'ADN, cette histone va être phosphorylée par les kinases Atm, Atr et DNA-PKcs au niveau de la sérine S139. Ainsi modifiée elle est surnommée γ H2AX, (Stiff et al., 2004, 2006; Rogakou et al., 1998). Cette phosphorylation entraîne le recrutement de Mdc1, elle-même reliée au complexe MRN-Atm contribuant à l'amplification de la phosphorylation des histones H2AX (Melandier et al., 2008; Spycher et al., 2008; Chapman et Jackson, 2008; Wu et al., 2008). Plusieurs centaines voire des milliers d'histones H2AX vont être phosphorylées au niveau de la cassure et vont pouvoir être détectées par microscopie sous forme de focus (Rogakou et al., 1999). Les γ H2AX jouent le rôle de plateforme de recrutement pour les autres médiateurs et acteurs de la DDR tels que la kinase Chk2 et le facteur de transcription p53 (Fillingham et al., 2006; Harper et Elledge, 2007). Ce mécanisme d'action pour répondre aux DSB est conservé chez les plantes. *Arabidopsis* présente une phosphorylation des histones H2AX suite à un stress génotoxique de façon ATM-/ATR-dépendante (Friesner et al., 2005; Amiard et al., 2010). Enfin, l'étude de la dynamique des foci, suite à un stress IR, a permis de montrer que les foci γ H2AX étaient réparés rapidement après l'induction des DSB (disparition des foci dès 2h post-IR ; Friesner et al., 2005).

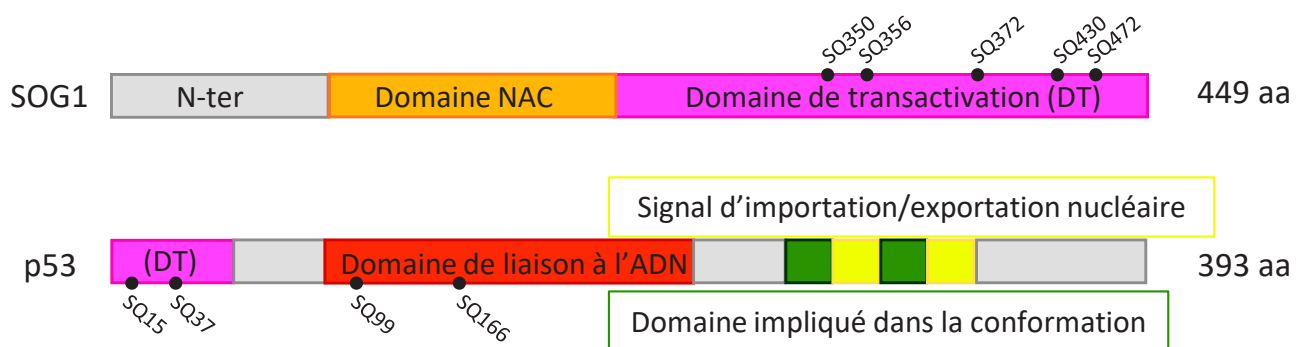


Figure 1.3.3 : Comparaison des protéines p53 et SOG1

La protéine SOG1 est composée d'un domaine NAC impliqué dans la liaison avec l'ADN en N-terminale et d'un domaine de transactivation. Cinq sites de phosphorylation sérine-guanine (SQ) ont été identifiés. Ces sites sont phosphorylés par ATM à la suite d'un dommage à l'ADN. La protéine p53 présente son domaine de transactivation en N-terminale et parmi les quatre sites de phosphorylation identifiés, SQ15 et SQ37 sont phosphorylés en réponse aux dommages à l'ADN. Image modifiée de Mahapatra et Roy (2020).

III.D Les effecteurs

Les effecteurs de la DDR permettent d'induire la réponse appropriée à une large variété de dommages à l'ADN. Parmi ces effecteurs, le premier identifié fut le facteur de transcription p53 chez les mammifères (Figure 1.3.2 et 1.3.3). L'étude de souris mutées pour p53 (*p53^{-/-}*) a montré que même si elles sont viables, ces souris développent notamment de nombreuses tumeurs dans les 2 à 9 mois après leur naissance (Attardi et Donehower, 2005) alors que les souris comportant un nombre surnuméraire de copies de p53 présentent une DDR améliorée et une protection dans l'apparition de cancer (García-Cao et al., 2002). Ces travaux ont mis en évidence le rôle clef de p53 en tant que suppresseur de tumeurs notamment grâce à son implication dans le maintien de l'intégrité génétique. En effet, une régulation fine de la protéine p53 permet aux cellules de choisir entre l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN ou l'apoptose en cas de dommages trop importants (Helton et Chen, 2007). En condition standard, une quantité basale de p53 existe dans la cellule, régulée notamment par le système UPS (Cf chapitre 1, Brooks et Gu, 2006). Après un stress génotoxique, p53 va être stabilisée par des phosphorylations en partie N-terminale *via* l'action des transducteurs Atm et Atr (Lukas et al., 2004), p53 s'accumule alors dans les noyaux et régule la transcription des gènes impliqués dans la DDR. Chez les mammifères, 343 gènes cibles de la protéine p53 ont été confirmés, dont certains présentent une régulation tissu-spécifique (Rozan et El-Deiry, 2007; Fischer, 2017).

Alors que de nombreux acteurs clef de la DDR sont partagés au sein du règne Eucaryote, la protéine p53, conservée depuis les invertébrés multicellulaires aux mammifères, ne présente pas d'orthologue chez les levures unicellulaires ni chez les plantes (Rutkowski et al., 2010). Cependant, un homologue fonctionnel de p53 a été mis en évidence chez les plantes terrestres multicellulaires *via* l'étude du mutant *sog1* (*suppressor of gamma response 1* ; Preuss et Britt, 2003). Cette étude a permis de montrer que le facteur de transcription SOG1 est l'effecteur clef de la DDR chez les plantes.

III.D.1 SOG1 est un facteur de transcription clef de la réponse aux dommages à l'ADN chez les plantes

La protéine SOG1 appartient à la plus grande famille de facteurs de transcription chez les plantes (comprenant plus d'une centaine de membres), celle des protéines NAC (NAM, ATAF1/2, CUC2 ; Figure 1.3.2 et 1.3.3 ; Ooka et al., 2003; Yoshiyama et al., 2009). Comme p53 chez les mammifères, SOG1, chez *Arabidopsis*, permet l'induction de gènes en réponse à un stress génotoxique de façon tissu-spécifique (Yoshiyama et al., 2009; Furukawa et al., 2010; Bourbousse et al., 2018). Ainsi, lors d'une irradiation au rayonnement γ , le mutant *sog1-1* ne présente pas l'induction de gènes observée chez le sauvage, mettant en évidence le rôle clef de SOG1 dans la réponse aux DSB de l'ADN (Yoshiyama et al., 2009). De plus, une analyse de *microarray* associée à une étude de ChIP-seq chez *Arabidopsis* a mis en évidence qu'à la suite d'une DSB de l'ADN induit par la Zéocine, 442 gènes sont différentiellement exprimés (342 induits et 100 réprimés ; Ogita et al., 2018). Sur les 342 gènes induits, 332 ne le sont pas chez le mutant *sog1-1* après le traitement à la Zéocine et sont donc régulés par SOG1. Enfin, parmi ces 332 gènes, 146 sont des cibles directes de SOG1, l'induction des autres résultant d'une régulation indirecte. Ces 146 cibles sont notamment impliquées dans le cycle cellulaire, dans la réplication de l'ADN, dans la réponse aux stress abiotiques et dans la réparation de l'ADN (notamment la HR ; Ogita et al., 2018). Alors que l'étude de ces gènes a mis en évidence un faible pourcentage de gènes communs avec ceux ciblés par p53, une analyse GO (*Gene ontology*) a permis de mettre en évidence des catégories communes telles que celle du cycle cellulaire et de la réponse aux stress abiotiques. L'activation de la voie de la DDR *via* la HR semble, elle, être un ciblage propre à SOG1 et donc un niveau de régulation spécifique aux plantes (Ogita et al., 2018).

III.D.2 La régulation de SOG1

SOG1 est une protéine nucléaire régulée aux niveaux post-traductionnels par phosphorylation (Yoshiyama et al., 2013a). En effet, contrairement à son homologue p53, *SOG1* ne subit pas de régulation transcriptionnelle et sa protéine ne présente ni accumulation ni relocalisation subcellulaire même en conditions de stress génotoxiques (Yoshiyama et al., 2013a). Ce facteur de transcription est composé d'un domaine conservé NAC, nécessaire à la

liaison avec l'ADN, en position N-terminale et, en C-terminale, d'un domaine de régulation de la transcription, dit domaine de transactivation, incluant 5 motifs sérine-glycine (SQ, Figure 1.3.3 ; Yoshiyama et al., 2013). Suite à la formation de dommages à l'ADN, les sérines de ces cinq motifs SQ vont être phosphorylées par le transducteur du signal, ATM (Yoshiyama et al., 2013a, 2017). La phosphorylation de ces 5 motifs est séquentielle et nécessaire pour l'activation entière de SOG1 : en premier a lieu la phosphorylation des motifs, SQ350 et SQ356, puis celle des motifs SQ372, SQ430 et SQ436 (Yoshiyama et al., 2017). En effet, la génération de lignées Arabidopsis mutantes pour les différents sites de phosphorylation de SOG1 (substitution des sérines en alanines) a permis de montrer que, plus le niveau de phosphorylation de SOG1 est important, plus le niveau de régulation transcriptionnelle en aval sera élevé (amplification de l'activation ou de la répression des gènes cibles de SOG1) et la DDR renforcée (Yoshiyama et al., 2017). Les phosphorylations des sérines permettent d'exposer progressivement le domaine NAC de SOG1 et ainsi d'augmenter l'affinité de ses liaisons aux séquences promotrices (Yoshiyama et al., 2017). Ainsi, chez Arabidopsis, il a été montré que l'accumulation de dommages à l'ADN, associés à des DSB, entraîne une hyperphosphorylation de SOG1 dans les 20 minutes suivant l'exposition à la Zéocine et que la perte d'une unique phosphorylation sur l'un des cinq motifs SQ résulte en une DDR aberrante (Yoshiyama et al., 2013a, 2017; 2018). L'étude de l'implication de SOG1, lors d'un stress par l'aluminium entraînant la production de ROS (Murali Achary et Panda, 2010), a permis de mettre en évidence la phosphorylation *in vitro* de SOG1 par ATR (site exacte de la phosphorylation non connu à ce jour), qui entraîne alors une réponse transcriptionnelle différente de celle induite par ATM (Sjogren et al., 2015). Ces données illustrent bien que les différents stress génotoxiques entraînent des réponses transcriptionnelles spécifiques permettant des réponses ciblées indispensables à l'intégrité génomique (Sjogren et al., 2015).

III.D.3 L'activation des réponses aux dommages à l'ADN par SOG1

Le facteur de transcription SOG1 va permettre la mise en place de réponses aux dommages à l'ADN distinctes. La première réponse consiste en l'arrêt du cycle cellulaire. Cet arrêt est provoqué par l'inhibition transcriptionnelle de gènes permettant la progression du cycle cellulaire tels que *CDKB2;1* (nécessaire à la progression en G2/M) et *KNOLLE* (nécessaire à la cytokinèse ; Preuss et Britt, 2003; Yoshiyama et al., 2009), combinée à l'induction de

l'expression des CKI, *SMR5* et *SMR7* (Yi et al., 2014), et de la kinase *WEE1* qui permet de contrôler l'arrêt du cycle cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN (Cf Partie 1, Chapitre 2 ; De Schutter et al., 2007). Le facteur de transcription SOG1 permet aussi d'activer les gènes de réparation de l'ADN (notamment ceux impliqués dans la recombinaison homologue) tels que *BRCA1* et *RAD51* (Yoshiyama et al., 2009; Ogita et al., 2018). L'endoréduplication est également une réponse régulée par SOG1. En effet, il a été montré que l'expansion cellulaire associée à l'endoréduplication est supprimée chez le double mutant *atm-2 atr-2* et le simple mutant *sog1-1*, suggérant que SOG1 est nécessaire, avec ATM ou ATR, à l'induction de l'endoréplication (Adachi et al., 2011). Enfin, alors qu'une plante sauvage présente de la mort cellulaire dès 12 heures après irradiation UV, le mutant *sog1-1* ne présente pas de mort cellulaire avant 50 à 70 heures (Furukawa et al., 2010), montrant que SOG1 permet aussi d'induire la mort cellulaire programmée. Le facteur de transcription SOG1 permet donc l'induction des différentes réponses aux dommages à l'ADN ce qui en fait un acteur clef dans le maintien de la stabilité génomique (Yoshiyama et al., 2009).

IV Implication des acteurs du cycle cellulaire dans la réponse aux dommages à l'ADN

Le cycle cellulaire est un mécanisme finement régulé grâce à l'intervention de nombreux acteurs (Cf chapitre 2). Plusieurs points abordés précédemment illustrent l'interconnexion entre la DDR et le cycle cellulaire. Chez Arabidopsis, de récentes études ont permis de mettre en évidence le rôle clef de la kinase WEE1, du facteur de transcription E2Fa et des acteurs des complexes DREAM tels que RBR1 et les facteurs MYB3R et E2Fc dans la DDR.

Chez Arabidopsis, E2Fa et RBR1 jouent des rôles essentiels dans le maintien de l'intégrité des génomes et dans la viabilité des cellules méristématiques. Les mutants, *rbr* (hypomorphe) et *e2fa*, présentent ainsi une hypersensibilité aux stress génotoxiques mise en évidence par l'accumulation de mort cellulaire et l'inhibition de l'élongation racinaire (Roa et al., 2009; Lang et al., 2012; Cruz-Ramírez et al., 2013; Horvath et al., 2017; Biedermann et al., 2017). D'un point de vue transcriptionnel, RBR1 et E2Fa sont, chez Arabidopsis, capables de cibler les gènes impliqués dans la DDR afin de réguler leur activation (analyse GO à partir de données de CHIPseq ; Verkest et al., 2014; Bouyer et al., 2018). E2Fa a été décrit comme un facteur de

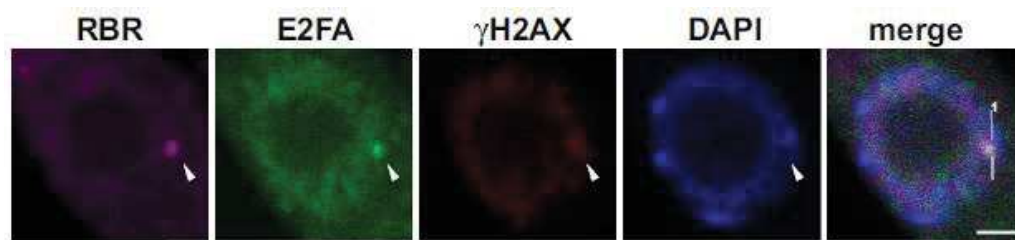


Figure 1.3.4 : Recrutement des protéines RBR1 et E2Fa au niveau des foci γ H2AX

Colocalisation des foci γ H2AX, E2Fa et RBR (flèche blanche) suite à un stress génotoxique (Mitomycine C). Échelle = 2 μ m. Figure issue de Horvath et al. (2017).

transcription important dans l'activation des gènes *BRCA1* et *RAD51* impliqués dans la HR ou dans celle de *RAD17* et *PCNA* impliqués dans la réplication et la réparation de l'ADN (Manova et Gruszka, 2015; Yoshiyama et al., 2013b; Vandepoele et al., 2005; Verkest et al., 2014; Biedermann et al., 2017; Bouyer et al., 2018). L'implication de E2Fa dans l'activation de ces gènes est sous le contrôle de l'action inhibitrice de RBR1 (Horvath et al., 2017; Biedermann et al., 2017) mais aussi de SNI1 (Suppressor of NPR1-1, Inducible ; Wang et al., 2018). SNI1 est une protéine clef dans l'induction de la réparation de l'ADN qui a récemment été caractérisée pour son interaction inhibitrice avec E2Fa, permettant d'arrêter la progression du cycle cellulaire (Wang et al., 2018). Par ailleurs, E2F, chez *Nicotiana tabacum*, et E2Fa et RBR1, chez *Arabidopsis*, sont recrutées au niveau des foci γ H2AX (Figure 1.3.4 ; Lang et al., 2012; Horvath et al., 2017; Biedermann et al., 2017). Il a été montré également qu'au niveau de ces foci, non seulement RBR1 co-localise et interagit avec BRCA1 (Horvath et al., 2017), mais aussi qu'il est nécessaire au recrutement de RAD51 (Biedermann et al., 2017), suggérant un rôle clef de RBR1 en tant que plateforme de recrutement des médiateurs de la DDR.

En réponse aux dommages à l'ADN, les facteurs de transcription répresseurs des complexes DREAM interviennent d'une part *via* E2Fc, dans la régulation de l'expression des gènes *SOG1* et *ATR*, ainsi que dans l'inhibition de la prolifération cellulaire suite à un stress UV-B (Gómez et al., 2019), et d'autre part *via* les MYB-rep, dans l'inhibition des gènes spécifiques de la transition G2/M afin d'empêcher la division cellulaire lors de dommages à l'ADN (Chen et al., 2017; Bourbousse et al., 2018). Dans ce cas, SOG1 réprime la transcription du gène MYB-ac *MYB3R4* (Adachi et al., 2011; Chen et al., 2017). Ces *MYB-ac* de la transition G2/M n'étant plus transcrits, une diminution de l'activité des CDK a lieu ce qui empêche la phosphorylation des MYB-rep et leur dégradation par le protéasome 26S, entraînant une accumulation de ces MYB-rep (Chen et al., 2017). Enfin, notons que chez *Arabidopsis*, les facteurs de transcription MYB-rep sont également capables de cibler les gènes impliqués dans la DDR afin de réguler leur activation (analyse GO à partir de données de CHIP-seq de MYB3R3 ; Kobayashi et al., 2015).

Chez *Arabidopsis*, le mutant *wee1* présente une hypersensibilité aux stress réplcatifs induisant des dommages à l'ADN (De Schutter et al., 2007). En réponse aux dommages à l'ADN (suite à un stress réplcatif ou non), les kinases ATM et ATR induisent la transcription de *WEE1* probablement *via* le facteur de transcription SOG1 (De Schutter et al., 2007; Ogita et al., 2018). La kinase WEE1 joue alors le rôle de point de contrôle et induit, chez *Arabidopsis*, un arrêt du

cycle cellulaire en phase G2 (De Schutter et al., 2007). Cependant, le rôle de médiateur de la DDR par WEE1 est indépendant des phosphorylations inhibitrices sur les Thr14 et Tyr15 de CDKA ;1 (Dissmeyer et al., 2009). Il est donc suggéré que la kinase WEE1 phosphoryle d'autres protéines du cycle cellulaire en réponse aux stress génotoxiques chez les plantes.

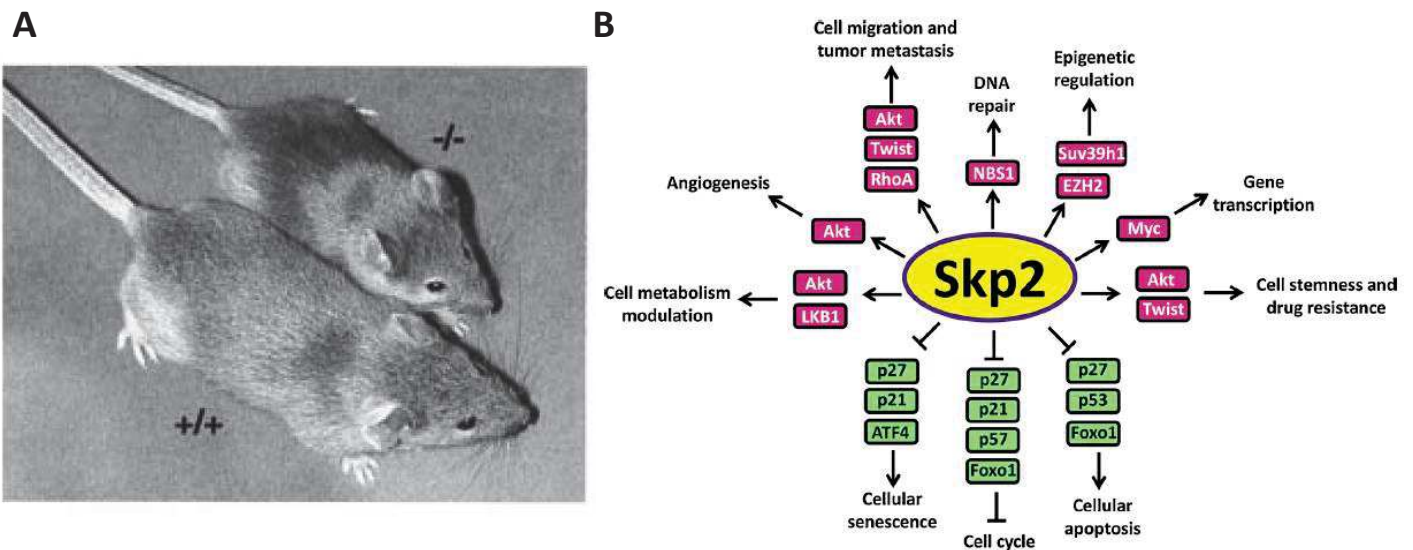


Figure 1.4.1 : La protéine F-box Skp2

(A) Photo mettant en évidence la différence de développement d'une souris sauvage (+/+) et d'une souris n'ayant plus de protéine Skp2 (-/-). Photo issue de Nakayama et al. (2000). **(B)** Liste non exhaustive des cibles/substrats de Skp2 et leur implication. Image issue de Cai et al. (2020).

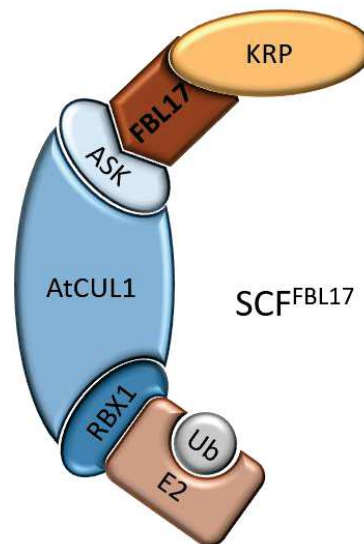


Figure 1.4.2 : Le complexe SCF^{FBL17}

La protéine FBL17 interagit grâce à son domaine F-box en N-ter avec la protéine adaptatrice ASK, pour former le complexe SCF , et en C-ter grâce à son domaine LRR avec le substrat, ici une protéine KRP.

Chapitre 4 : La protéine FBL17 chez *Arabidopsis thaliana*

Le maintien de l'intégrité des génomes est capital pour la survie des organismes, et en de nombreux points dans les chapitres précédents, le lien entre les régulateurs du cycle cellulaire et les acteurs de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) a été mis en évidence.

Chez les mammifères, la protéine F-box Skp2 du complexe E3 ubiquitine ligase SCF^{Skp2} illustre justement cette interconnexion. La perte de cette protéine F-box entraîne chez les souris *Skp2*^{-/-} une stérilité, un retard de croissance ainsi qu'une augmentation de l'apoptose (Figure 1.4.1 ; Nakayama et al., 2000). Ces phénotypes sont expliqués par le rôle clef de Skp2 dans la régulation du cycle cellulaire (Nakayama et al., 2000; Frescas et Pagano, 2008; Zhu, 2010; Kossatz et al., 2004; Carrano et al., 1999), la différenciation, mais aussi dans l'apoptose ou encore la DDR (Wang et al., 2012; Wu et al., 2012). La diversité de son répertoire de protéines cibles fait de Skp2 l'une des protéines F-box majeure chez les mammifères. Parmi ces cibles, on retrouve notamment des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire telles que les CKI p27^{Kip1}, p21^{Cip1} et p57^{Kip2} (Yu et al., 1998; Tsvetkov et al., 1999; Carrano et al., 1999; Nakayama et al., 2000b; Kamura et al., 2003), le facteur de transcription E2F1 (Marti et al., 1999), et la cycline E (Nakayama et al., 2000b), des acteurs clefs de la machinerie de réplication tels que hOrc1p (Méndez et al., 2002) et Cdt1 (Li et al., 2003) et les protéines supprimeurs de tumeur FOXO1 (Huang et al., 2005), BRCA1 (Parameswaran et al., 2015) et la protéine Rb-like p130 (Tedesco et al., 2002; Bhattacharya et al., 2003). Cette liste non exhaustive ne cite que les substrats les mieux décrits de Skp2 (pour revue, Germain, 2011; Cai et al., 2020; Asmamaw et al., 2020).

I La protéine F-box-like 17, FBL17

La caractérisation de la protéine F-box FBL17 (F-box-like 17 ; AT3G54650) chez *Arabidopsis thaliana* révèle en N-terminale un motif F-box impliqué dans l'interaction avec la protéine adaptatrice ASK (1 et 11) du complexe SCF et en C-terminale 12 motifs LRR pour interagir avec les protéines cibles (Figure 1.4.2 ; Kim et al., 2008; Gusti et al., 2009). Comme de nombreuses protéines F-box, elle est régulée par l'UPS *via* une E3 ubiquitine ligase de type CRL (Noir et al., 2015), et comme Skp2, FBL17 apparait impliquée dans divers processus

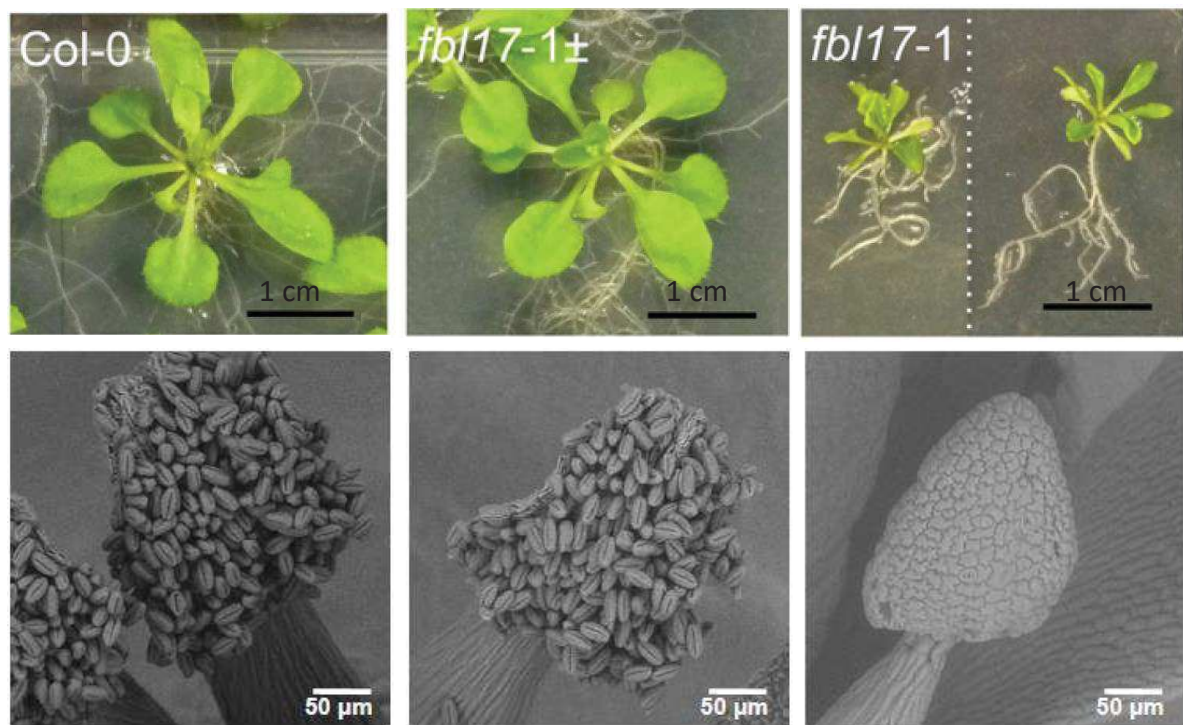


Figure 1.4.3 : Phénotypes de mutant *fbl17*

Contrairement aux plantes hétérozygotes (*fbl17-1+/-*), le mutant *fbl17-1* présente un phénotype fort comparé à la plante sauvage (Col-0). Le panel du haut représente les plantes après une croissance de 20 jours en conditions *in vitro*. Le mutant *fbl17* présente une taille réduite, une diminution de la croissance racinaire et des feuilles de petite taille et serratées. Le panel du bas met en évidence l'absence de grains de pollen chez le mutant *fbl17*. Les images ont été prises par microscopie électronique à balayage. Figure issue de Noir et al. (2015).

cellulaires chez *Arabidopsis thaliana*. La caractérisation de FBL17 ces dernières années laisse en effet suggérer qu'elle correspond à l'homologue fonctionnel de Skp2.

Les travaux sur la protéine FBL17, chez la plante modèle *Arabidopsis*, ont permis de montrer que cette protéine F-box est un régulateur clef du cycle cellulaire, durant les phases gamétophytique et sporophytique de la vie de la plante (Kim et al., 2008; Gusti et al., 2009; Noir et al., 2015). Bien que la plante mutante hétérozygote pour FBL17 (*fb17+/-*) ne présente pas de phénotype remarquable en termes de développement, elle présente une fertilité partielle (Figure 1.4.3). Durant la phase gamétophytique mâle, les grains de pollen mutants *fb17*, bloqués lors de la progression en mitose II, ne produisent pas les deux cellules spermatiques haploïdes nécessaires à la double fécondation du sac embryonnaire chez les plantes à fleurs, entraînant un avortement des embryons fécondés par ce pollen (Kim et al., 2008; Gusti et al., 2009). Notons qu'en absence totale de FBL17, le mutant homozygote *fb17* ne produit pas de grain de pollen (Figure 1.4.3 ; Noir et al., 2015). Durant la phase gamétophytique femelle, l'analyse des défauts de mise en place du sac embryonnaire au sein du double mutant hétérozygote *cdka;1+/- fb17+/-* a montré que CDKA;1 et FBL17 sont tous deux nécessaires au contrôle des première et seconde divisions mitotiques du sac embryonnaire (Zhao et al., 2012). Par ailleurs, la pollinisation des mutants *fb17* avec du pollen sauvage ne permet pas le développement des siliques et la formation des graines (donnée non publiée de l'équipe). L'ensemble de ces données montre que l'absence de FBL17 lors de la formation des gamètes entraîne une stérilité complète des mutants homozygotes (Kim et al., 2008; Gusti et al., 2009; Zhao et al., 2012; Noir et al., 2015 ; Figure 1.4.3). Lors de la phase sporophytique, FBL17 joue un rôle tout aussi essentiel puisque le mutant *fb17* présente des altérations développementales sévères. Ces mutants homozygotes qui n'apparaissent qu'à une fréquence d'environ 1% dans la descendance d'une plante hétérozygote *fb17+/-*, sont de petite taille, présentent un retard de croissance important, un système racinaire mal formé, et des feuilles serratées et filiformes (Figure 1.4.3 ; Noir et al., 2015). D'un point de vue moléculaire, ce phénotype peut être expliqué par les différentes altérations observées lors de la progression du cycle cellulaire chez le mutant *fb17* décrites ci-après.

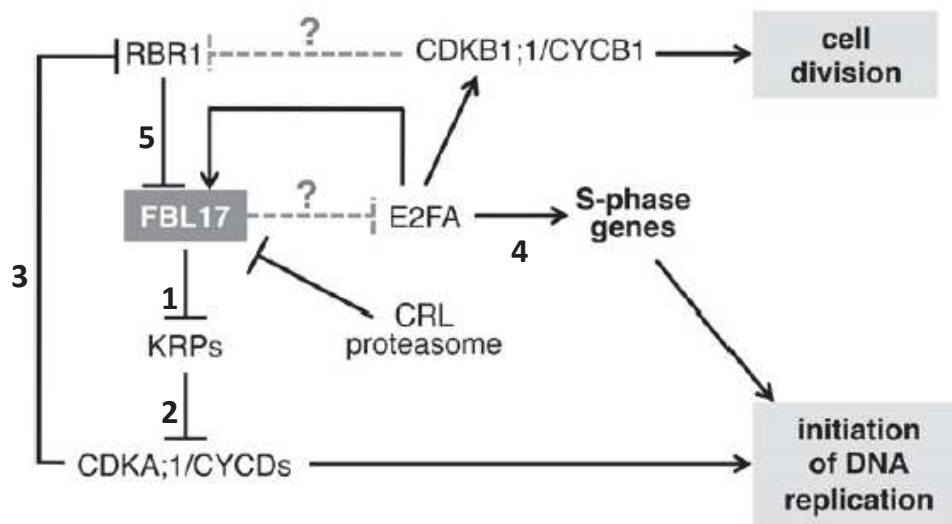


Figure 1.4.4 : Boucle de rétrocontrôle de la transition G1/S impliquant FBL17

Représentation schématique de la boucle de rétrocontrôle en cinq étapes régulant la transition G1/S. (1) dégradation des KRP *via* FBL17. (2) inhibition des CDK. (3) Inhibition de RBR1. (4) libération des facteurs de transcription E2F et induction des gènes de la phase S. (5) Répression de *FBL17* *via* la fixation de RBR1 sur son promoteur. Figure issue de Noir et al. (2015).

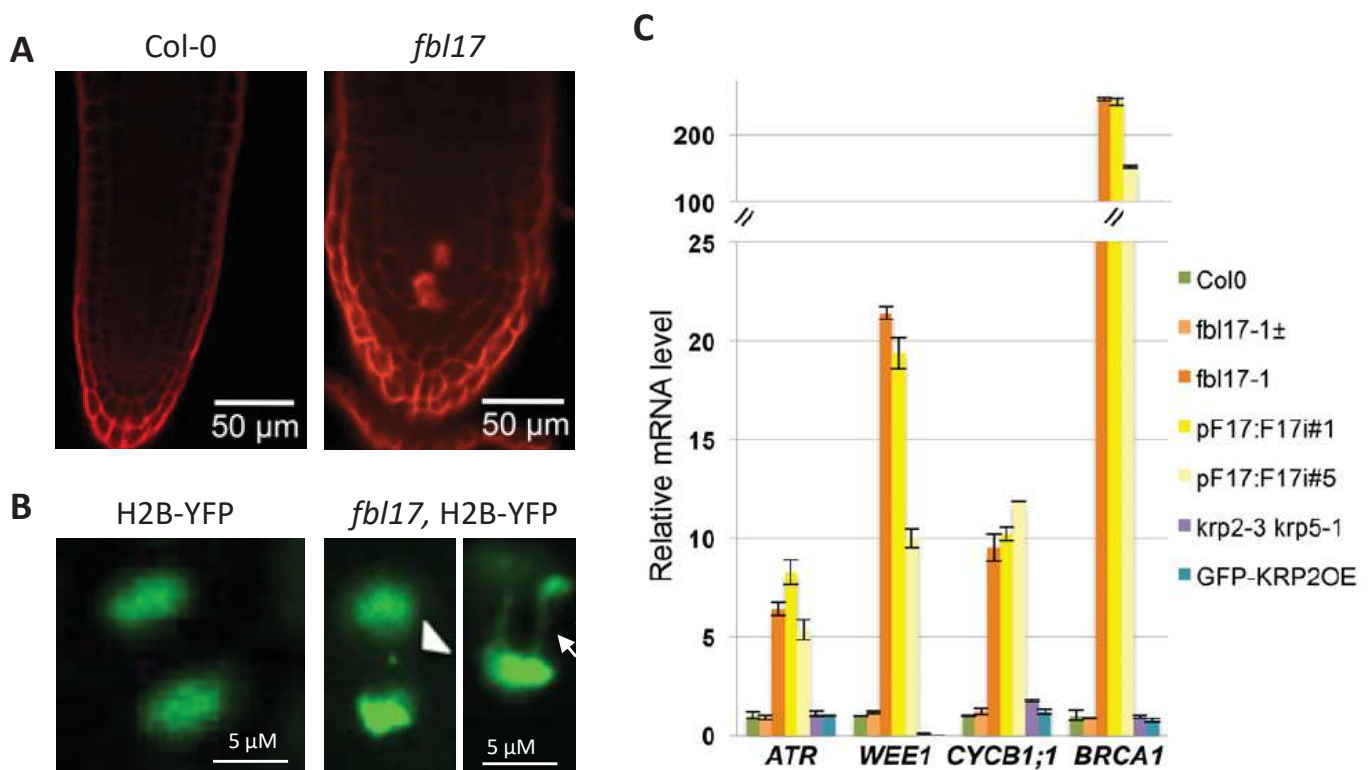


Figure 1.4.5 : Instabilité génomique chez le mutant *fbl17*

(A) Révélation de la mort cellulaire constitutive au niveau des pointes racinaires chez le mutant *fbl17* avec le iodure de propidium. (B) Formation de ponts chromosomiques (flèche) et de micronoyaux (tête de flèche) lors de la télophase durant la mitose dans les cellules racinaires chez *fbl17*, H2B-YFP. (C) Induction constitutive des gènes de la DDR (*ATR*, *WEE1*, *CYCB1;1* et *BRCA1*) chez le mutant *fbl17*. Figures issues de Noir et al. (2015).

II FBL17 et les transitions du cycle cellulaire

Avec les protéines CDKA;1, KRP, RBR1 et E2F, FBL17 fait partie, chez Arabidopsis, d'un module permettant la régulation de l'entrée en phase S grâce à une boucle de rétrocontrôle en cinq étapes (Figure 1.4.4):

- 1) FBL17 est capable de cibler l'ensemble des membres de la famille des KRP (à l'exception de KRP1 ; Kim et al., 2008; Gusti et al., 2009; Noir et al., 2015). Comme montré par l'accumulation de KRP2, KRP6 et KRP7 lors d'un traitement au MG132, ces interactions entraînent la dégradation des protéines KRP par le protéasome 26S.
- 2) Les KRP inhibent CDKA;1 (Nakai et al., 2006; Verkest et al., 2005; cf Partie 1, Chapitre 1)
- 3) CDKA;1 phosphoryle et inhibe RBR1 (Nowack et al., 2012; cf Partie 1, Chapitre 1).
- 4) RBR1 phosphorylée libère le facteur de transcription E2FA qui va induire les gènes nécessaires à l'entrée en phase S dont notamment, *FBL17* (Vandepoele et al., 2005; Gusti et al., 2009; Zhao et al., 2012).
- 5) RBR1 (*a priori* non phosphorylée) se fixe directement sur le promoteur de *FBL17* entraînant sa répression transcriptionnelle (Zhao et al., 2012).

D'après ces étapes, en absence de FBL17, une accumulation de KRP est observée et entraîne une inhibition accrue des CDKA;1 provoquant un blocage dans la progression du cycle cellulaire caractérisé par un retard de la phase S chez le mutant *fb17* (Noir et al., 2015).

A un niveau transcriptionnel, les gènes impliqués dans la transition G1/S (*RBR1*, *E2Fa* et *CYCD3;1*), ceux de la transition G2/M (*CDKB1;1*, et *CYCB1;2*) ainsi que les gènes de la DDR (*BRCA1*), sont constitutivement surexprimés chez le mutant *fb17* (Noir et al., 2015). Cette altération du programme transcriptionnel pourrait expliquer les problèmes de prolifération cellulaire et d'instabilité génomique illustrés par la formation de micro-noyaux et de ponts chromosomiques lors de la mitose ainsi que la mort cellulaire constitutive chez le mutant *fb17* (Figure 1.4.5 ; Noir et al., 2015). Notons que ces phénotypes, non-observés dans la lignée sur-expresser KRP2^{OE}, ne semblent pas dus à une accumulation de KRP, et laissent suggérer l'implication de FBL17 au niveau des acteurs du processus de réplication de l'ADN ou de la mitose (Noir et al., 2015).

III FBL17 et l'endoréduplication

La protéine FBL17 a aussi été caractérisée pour son implication dans l'endoréduplication. En effet, l'entrée en endoréduplication est altérée chez le mutant *fb17*, résultant en la quasi-absence de noyaux avec un niveau de ploïdie supérieur à 4C dans les premières paires de feuilles, les cotylédons et les racines à 20 jours (Noir et al., 2015). D'un point de vue phénotypique, ce phénomène peut être observé grâce à l'étude des trichomes (Cf Partie 1, Chapitre 1). Chez le mutant *fb17*, les trichomes sont plus petits et moins fréquents que les trichomes sauvages, et présente une branche unique (Noir et al., 2015). D'un point de vue moléculaire, la perte de l'endoréduplication chez le mutant *fb17* est probablement due à une accumulation des KRP (Noir et al., 2015), ces derniers étant caractérisés pour supprimer l'endoréduplication lorsqu'ils sont fortement accumulés (De Veylder et al., 2001; Schnittger et al., 2003; Verkest et al 2005).

IV FBL17 et la machinerie de réplication

La caractérisation du mutant *fb17* a permis de mettre en évidence, d'une part, la présence d'une forte proportion de noyaux dont l'ADN apparaît en cours de réplication (suggérant un ralentissement en phase S), ou qui pourrait être partiellement répliqué (contenu en ADN de 2C-4C), et d'autre part, l'induction des gènes *WEE1* et *ATR*, kinases activées lors de stress réplcatif (Culligan et al., 2004; De Schutter et al., 2007; Noir et al., 2015). Ces données suggèrent une altération des mécanismes de réplication de l'ADN chez le mutant *fb17*.

La réplication de l'ADN est un processus complexe pouvant entraîner de nombreuses erreurs dans l'information génétique et une instabilité du génome (Cf Partie 1, Chapitre 1), la disponibilité et le bon fonctionnement des composants de la machinerie de réplication sont donc un prérequis au maintien de l'intégrité génomique. Parmi ces composants, le complexe de pré-réplication, formé des protéines ORC (Origin Recognition Complex), de CDC6 (Cell Division Cycle 6), de l'hétérohexamère MCM (MiniChromosome Maintenance) et des CDT1 (Cdc10-Dependent Transcript 1), permet d'initier la réplication de l'ADN (*licensing step*; Riera et al., 2017). La formation de ce complexe repose d'une part sur les protéines ORC qui assurent la sélection des origines de réplication (ORI) et l'interaction avec l'ADN et d'autre part les

protéines CDT1, qui permettent d'activer les ORI et d'éviter la re-réplication de l'ADN, prévenant ainsi les risques d'instabilité génomique (del Mar Castellano et al., 2004; Arias et Walter, 2007; Sanchez et al., 2012). L'expression de ces protéines est finement régulée, et des travaux de Crisanto Gutierrez (CSIC, Madrid) ont permis de montrer, chez Arabidopsis, l'implication de FBL17 dans la régulation de la dynamique de l'initiation de la réplication de l'ADN. Ces études récentes suggèrent que dans les cellules en prolifération lors de la transition G1/S, FBL17 est la protéine F-box ciblant CDT1a (Desvoyes et al., 2019 BioRxiv).

Les objectifs du projet de recherche doctoral

L'équipe de recherche « Fonctions cellulaires de la protéolyse ubiquitine-dépendante », dans laquelle j'ai réalisé ma thèse, étudie les enzymes E3 ligases et leurs implications dans le contrôle du cycle cellulaire, la signalisation hormonale et la régulation post-transcriptionnelle (PTGS), chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Depuis de nombreuses années, l'équipe travaille sur la caractérisation des rôles de la protéine F-box FBL17, notamment lors du cycle cellulaire. Durant ces trois dernières années, j'ai participé à élucider les implications fonctionnelles de cette protéine chez *Arabidopsis thaliana* à travers deux axes principaux faisant chacun l'objet d'un chapitre de résultats.

- 1- Tout d'abord, j'ai étudié l'interactome de la protéine FBL17 dans le but d'identifier de nouveaux partenaires protéiques intervenant potentiellement dans de nouvelles voies biologiques. En effet, les fonctions des protéines F-box sont indissociables de celles de leurs substrats, leur permettant d'intervenir dans de nombreux mécanismes cellulaires. Ce premier chapitre de résultats de thèse présentera les nouveaux candidats identifiés et la caractérisation de certains d'entre eux.
- 2- J'ai ensuite mis en évidence un rôle nouveau de FBL17 dans la voie biologique de la réponse aux dommages à l'ADN (DDR). Ce travail a donné lieu à une publication dans *Plant Physiology* en 2020 (Gentric et al., 2020) et cet aspect continue d'être étudié afin de comprendre les implications génétiques et moléculaires de FBL17 dans la DDR.

PARTIE 2 :

Résultats

Tableau 2.1.1: Mise en évidence du nombre de protéines identifiées (A) et du nombre de spectres de spectrométrie de masse détectés (B) lors des 2 réplicats biologiques (IP-MS 1 et 2) réalisés en triplicat technique (rep1, rep2 et rep3).

A	Total number of proteins identified					
	IP-MS 1			IP-MS 2		
	rep1	rep2	rep3	rep1	rep2	rep3
BPM6 (ctrl)	833	594	670	451	388	360
BPM6 (zeo)	621	719	700	393	428	465
FBL17 (ctrl)	694	678	883	209	205	193
FBL17 (zeo)	721	509	313	284	152	227

B	Total number of spectra identified					
	IP-MS 1			IP-MS 2		
	rep1	rep2	rep3	rep1	rep2	rep3
BPM6 (ctrl)	8838	7379	7693	4006	2794	2613
BPM6 (zeo)	10858	12401	11259	3387	3739	4603
FBL17 (ctrl)	4823	4899	6833	1564	1426	1411
FBL17 (zeo)	5232	4024	3256	1916	1191	1624

Tableau 2.1.2: Liste non exhaustive des protéines statistiquement enrichies après immunoprécipitation avec BPM6 et identifiées par spectrométrie de masse

En jaune sont représentés les Log de Fold Change (LogFC) des protéines enrichies avec BPM6. Un test statistique, par la méthode de Benjamini-Hochberg, a permis d'attribuer une p.value (*probability value*) à chaque protéine identifiée (à partir des trois réplicats techniques) et chaque p.value a subi une correction statistique (adjp ou *adjusted p value*) par une régression binominale négative. Lorsque la p.value et l'adjp sont statistiquement significatives (<0,05), leur case sont représentées en gris. La recherche des peptides identifiés dans les banques de données a été réalisée avec l'algorithme Mascot (version 2.5) et la banque TAIR.

FBL17 (ctrl) vs BPM6 (ctrl)								
IP-MS 1			IP-MS 2			Accession	gene names	Function
LogFC	p.value	adjp	LogFC	p.value	adjp			
-12,44	1,39E-192	1,85E-189	-11,63	9,27E-216	7,42E-213	AT3G43700.1	BPM6	BTB/POZ and MATH domain-containing protein 6
-9,59	8,34E-55	2,78E-52	-8,88	9,50E-53	1,90E-50	AT5G21010.1	BPM5	BTB/POZ and MATH domain-containing protein 5
-9,46	1,14E-67	5,06E-65	-8,68	4,88E-34	4,34E-32	AT1G26830.1	CUL3A	Cullin-3A
-8,26	1,34E-31	1,19E-29	-8,10	1,54E-31	1,03E-29	AT2G37570.1	SLT1	sodium- and lithium-tolerant 1
-7,51	1,54E-21	7,91E-20	-5,42	4,98E-06	4,92E-05	AT1G32230.1	RCD1	Inactive poly [ADP-ribose] polymerase RCD1
-7,35	7,72E-17	2,95E-15	-7,07	8,02E-16	2,70E-14	AT4G17880.1	MYC4	Transcription factor MYC4
-7,26	4,23E-18	1,88E-16	-6,93	1,04E-14	3,32E-13	AT5G46760.1	MYC3	Transcription factor MYC3
-7,23	2,74E-18	1,26E-16	-6,27	6,37E-09	1,06E-07	AT3G13670.1	At3g13670	Casein kinase-like protein
-7,08	4,95E-15	1,57E-13	-6,44	9,24E-10	1,57E-08	AT1G32640.1	MYC2	Transcription factor MYC2
-7,06	2,48E-53	6,63E-51	-8,33	1,20E-36	1,37E-34	AT3G03740.1	BPM4	BTB/POZ and MATH domain-containing protein 4
-6,98	1,74E-15	5,95E-14	-5,58	1,36E-06	1,53E-05	AT5G02480.1	T22P11.70	Non caractérisé
-6,68	6,55E-13	1,86E-11	-6,32	3,70E-10	6,87E-09	AT2G39760.1	BPM3	BTB/POZ and MATH domain-containing protein 3
-6,29	2,99E-10	7,39E-09	-5,58	1,39E-06	1,54E-05	AT2G40085.1	AT2G40085.1	Non caractérisé
-6,19	1,22E-09	2,85E-08	-4,68	4,54E-04	2,90E-03	AT5G60450.1	ARF4	Auxin response factor 4
-6,14	2,38E-09	5,38E-08	-5,50	2,54E-06	2,69E-05	AT3G03940.1	T11I18.5	Protein kinase family protein
-5,96	2,09E-08	4,36E-07	-4,37	1,71E-03	9,28E-03	AT4G31160.1	DCAF1	DDB1- and CUL4-associated factor homolog 1
-5,83	8,03E-08	1,39E-06	-4,68	4,54E-04	2,90E-03	AT1G14740.1	OBE3	Protein OBERON 3
-5,83	7,99E-08	1,39E-06	-3,98	6,66E-03	2,91E-02	AT3G22330.1	RH53	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 53
-5,76	1,62E-07	2,65E-06	-4,54	8,78E-04	5,14E-03	AT2G24570.1	WRKY17	Probable WRKY transcription factor 17
-5,26	1,14E-05	1,44E-04	-4,37	1,71E-03	9,28E-03	AT3G48750.1	CDKA-1	Cyclin-dependent kinase A-1
-4,80	7,22E-25	4,59E-23	-7,35	3,68E-19	1,63E-17	AT3G06190.1	BPM2	BTB/POZ and MATH domain-containing protein 2
-4,79	2,05E-04	1,80E-03	-5,05	6,47E-05	4,98E-04	AT5G41990.1	WNK8	Serine/threonine-protein kinase WNK8
-3,39	2,62E-04	2,21E-03	-3,08	1,33E-03	7,53E-03	AT5G02530.1	ALY2	THO complex subunit 4B
-3,01	6,39E-09	1,37E-07	-2,48	2,36E-03	1,19E-02	AT2G01250.1	RPL7B	60S ribosomal protein L7-2
-2,64	2,12E-26	1,57E-24	-1,52	1,05E-02	4,52E-02	AT5G26742.2	RH3	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 3
-2,49	2,81E-03	1,63E-02	-2,06	5,30E-03	2,42E-02	AT1G10290.1	DRP2A	Dynamitin-2A
-2,36	1,08E-03	7,15E-03	-4,53	9,17E-04	5,24E-03	AT1G27090.1	T7N9.15	Glycine-rich protein
-1,96	5,20E-06	7,16E-05	-5,50	2,54E-06	2,69E-05	AT1G18080.1	RACK1A	Receptor for activated C kinase 1A
-1,78	1,17E-03	7,69E-03	-4,54	8,80E-04	5,14E-03	AT5G42080.1	DRP1A	Dynamitin-related protein 1A

Chapitre 1 : Etudes des partenaires protéiques de FBL17

Chez les mammifères, l'étude du répertoire des protéines ciblées par la protéine F-box Skp2 a permis de caractériser son implication dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération, l'apoptose et la différenciation cellulaire (pour revue Asmamaw et al., 2020). A ce jour, le rôle de FBL17, homologue fonctionnel de Skp2 chez *Arabidopsis*, n'a été caractérisé que dans une voie biologique, celle de la progression du cycle cellulaire (Kim et al., 2008; Gusti et al., 2009; Zhao et al., 2012; Noir et al., 2015; Desvoyes et al., 2019). De plus, seules 4 protéines cibles ont été identifiées, à savoir KRP2, KRP6, KRP7 et CDT1a (Kim et al., 2008; Gusti et al., 2009; Noir et al., 2015; Desvoyes et al., 2019). Afin d'élucider les différentes fonctions de FBL17 chez les plantes, une meilleure connaissance de son répertoire de protéines cibles est nécessaire.

I Identification de l'interactome de FBL17

Pour étudier le répertoire des protéines ciblées par FBL17, une analyse d'immunoprécipitation associée à de la spectrométrie de masse (IP-MS) a été réalisée *in vivo* sur des plantules 35S:FBL17-GFP de 6 jours. Afin de favoriser l'identification des substrats de FBL17, les complexes protéiques comprenant la protéine F-box FBL17 et ses interactants potentiels ont été stabilisés par un traitement MLN4924 (MLN). Celui-ci bloque la rubbylation de la culline associée à la formation des complexes CRL et interfère avec la dégradation des substrats (Hakenjos et al., 2011).

D'un point de vue technique, les résultats présentés ci-après sont issus de deux réplicats biologiques. Malgré la bonne qualité de ces 2 réplicats, le réplicat 2 présente un faible nombre de protéines identifiées de façon significative comparé au premier réplicat (25 et 83 protéines avec $\text{adj}p < 0,05$, respectivement), du fait d'un plus faible nombre de spectres détectés en spectrométrie de masse (Tableau 2.1.1). Un troisième réplicat biologique est envisagé pour conforter certaines des données de cette analyse.

La lignée rapportrice 35S:GFP-BPM6 a été utilisée comme contrôle afin de discriminer les liaisons aspécifiques avec FBL17. La protéine BPM6 est une protéine réceptrice de substrat prenant place dans un complexe E3 ligase de type CRL3 (cf Partie 1, chapitre 1.II.C.2.a), et dont l'interactome a récemment été identifié (Chico et al., 2020). Dans notre analyse,

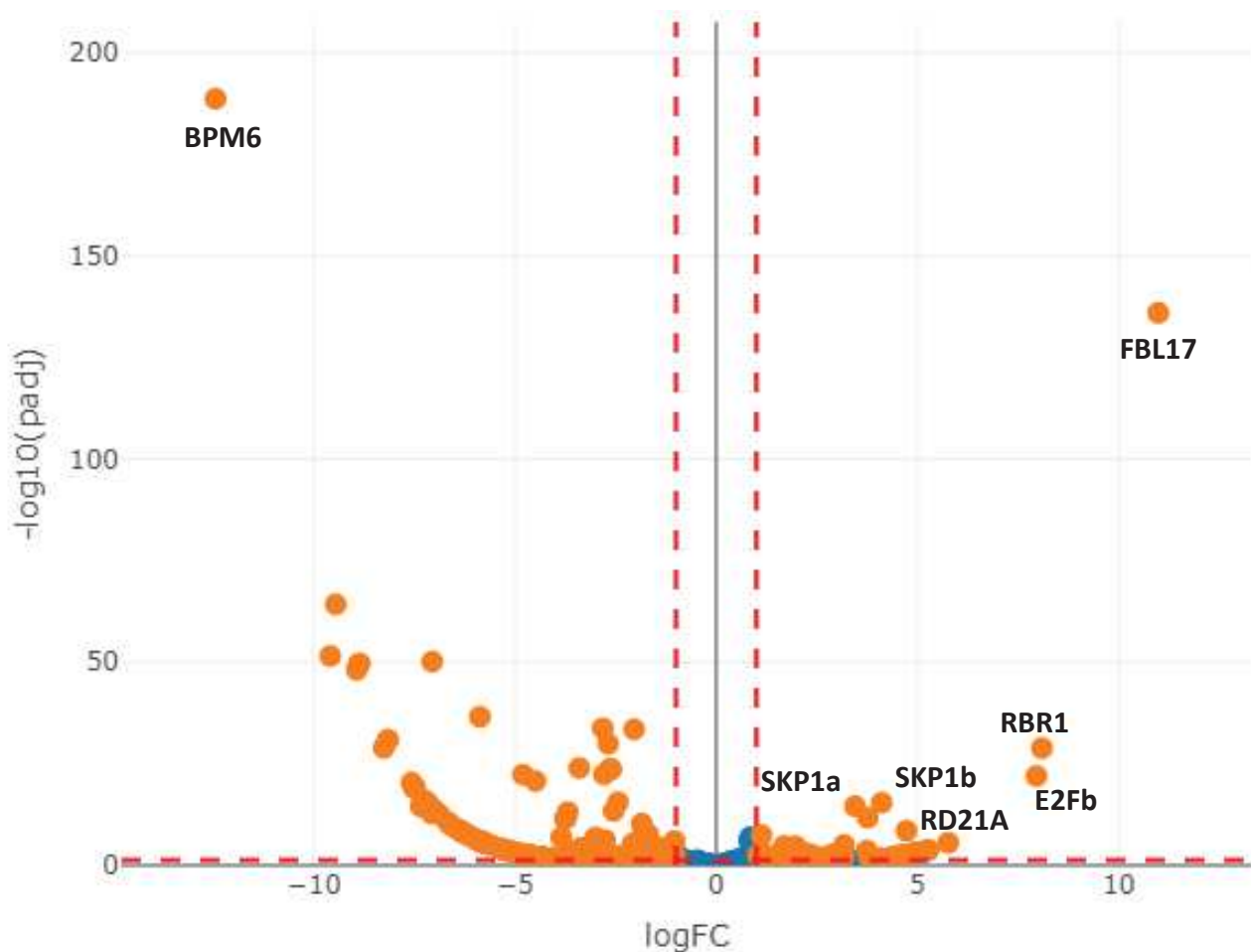


Figure 2.1.1: Représentation graphique obtenue à partir de l'analyse protéomique représentant les protéines enrichies avec GFP-BPM6 (à gauche) et FBL17-GFP (à droite).

Les protéines identifiées dans le réplicat 1 sont classées dans un volcano plot en fonction de leur rapport d'abondance (BPM6/FBL17) et l'analyse statistique a été réalisée par une régression binominale négative (valeur P ajustée). Pour chaque protéine, le nombre moyen de spectres des échantillons GFP-BPM6 (n = 3) a été comparé au nombre moyen de spectres des échantillons de FBL17-GFP (n = 3). Les lignes pointillées rouges verticales affichent des changements de Fold Change de grande ampleur (axe x, FC <0,5, gauche; FC > 2, droite) tandis que la ligne pointillée rouge horizontale affiche une signification statistique élevée (axe y, valeur P ajustée <0,05 au-dessus de la ligne). Les points oranges représentent des protéines enrichies de façon significative, tandis que les points bleus représentent des protéines identifiées de façon non significative. Les protéines associées à la représentation du graphique du volcan sont répertoriées dans les Tableaux 2.1.2 et 2.1.3.

l'immunoprécipitation de BPM6 a permis de précipiter 76 protéines présentes de façon significative dans les 2 réplicats (adjp (valeur P ajustée) $<0,05$; Figure 2.1.1). Comme indiquées dans le Tableau 2.1.2, des protéines identiques à celles de l'interactome décrit par Chico et al., 2020 ont été identifiées, dont les protéines BPM1, BPM4, BPM5, et les facteurs de transcription MYC2, MYC3 et MYC4, permettant de confirmer les bonnes conditions de l'expérience (le traitement MLN, le tampon d'extraction en condition native et l'immunoprécipitation des protéines ; cf Partie 4 : Matériels et Méthodes). Notons que les conditions utilisées lors de cette IP-MS ne sont pas les mêmes que celles utilisées dans Chico et al., 2020. Ainsi, de nouveaux interactants potentiels de BPM6 ont été mis en évidence tels que BPM3 et la kinase CDKA;1 (Tableau 2.1.2). La présence de cette kinase dans les résultats IP-MS de BPM6 laisse suggérer l'implication des protéines BPM dans le cycle cellulaire, mais cette possibilité ne sera pas plus discutée dans cette thèse.

La lignée rapportrice 35S:FBL17-GFP a, quant à elle, permis de précipiter 10 protéines, présentes de façon significative dans les 2 réplicats (adjp $<0,05$; Figure 2.1.1 et Tableau 2.1.3). Parmi ces 10 protéines, les protéines adaptatrices SKP1A (ASK1) et SKP1B (ASK2) ont été détectées. Ces protéines, prenant place dans les complexes SCF, sont des interactants connus de FBL17 (Gusti et al., 2009; Kim et al., 2008), ce qui confirme là aussi les bonnes conditions expérimentales.

De façon très intéressante, parmi les protéines les plus enrichies après l'IP de FBL17, sont retrouvés les membres du complexe DREAM, à savoir RBR1, E2FB et DPB (adjp $<0,05$; Figure 2.1.1 et Tableau 2.1.3 ; Partie 1, Chapitre 2.II). Notons l'enrichissement d'autres régulateurs du cycle, DPA (adjp $<0,05$) et E2Fa (p.value $<0,05$) dans le premier réplicat, et celui de E2Fc, de façon non significative dans le deuxième réplicat (Tableau 2.1.3). La comparaison des séquences peptidiques entre E2Fa, E2Fb et E2Fc a permis d'identifier un peptide tryptique commun entre E2Fb et E2Fc (Annexe 1). Cependant ce dernier n'ayant pas été identifié en IP-MS, les protéines E2Fb et E2Fc n'ont pas pu être confondues lors de la caractérisation de l'interactome de FBL17 (Annexe 1). Une caractérisation de ces candidats a été initiée et est présentée dans les paragraphes suivants (cf Partie 2, Chapitre 1.II).

Quatre autres protéines sont sorties lors de ces analyses de façon significative (adjp $<0,05$) dans les deux réplicats : RD21A, WHY3, HTB1 et NDX (Tableau 2.1.3) :

- La protéine RD21A (Responsive to Dessiccation 21A) est une protéase à cystéine impliquée dans la régulation des réponses aux stress biotique. Il a été montré qu'elle

Tableau 2.1.3: Liste des protéines statistiquement enrichies après immunoprécipitation avec FBL17 et identifiées par spectrométrie de masse

En vert sont représentés les Log de Fold Change (LogFC) des protéines enrichies avec FBL17. Un test statistique, par la méthode de Benjamini-Hochberg, a permis d'attribuer une p.value (*probability value*) à chaque protéine identifiée (à partir des trois réplicats techniques) et chaque p.value a subi une correction statistique (adjp ou *adjusted p value*) par une régression binominale négative . Lorsque la p.value et l'adjp sont statistiquement significatives (<0,05), leurs cases sont représentées en gris. La recherche des peptides identifiés dans les banques de données a été réalisée avec l'algorithme Mascot (version 2.5) et la banque TAIR.

FBL17 (ctrl) vs BPM6 (ctrl)								
IP-MS 1			IP-MS 2			Accession	Noms	Description
LogFC	p.value	adjp	LogFC	p.value	adjp			
10,98	1,43E-139	9,56E-137	10,63	1,96E-168	7,84E-166	AT3G54650.1	FBL17	F-box/LRR-repeat protein 17
8,09	1,60E-31	1,33E-29	6,51	3,86E-12	9,37E-11	AT3G12280.1	RBR1	Retinoblastoma-related protein 1
7,96	1,65E-24	9,99E-23	6,60	7,92E-13	2,11E-11	AT5G22220.2	E2FB	Transcription factor E2FB
5,76	1,63E-07	2,65E-06	5,04	3,53E-05	2,91E-04	AT5G03415.1	DPB	Transcription factor-like protein DPB
4,73	1,17E-10	3,01E-09	4,91	8,08E-05	6,16E-04	AT1G47128.1	RD21A	Cysteine proteinase RD21A
4,11	8,98E-18	3,75E-16	4,11	1,27E-10	2,49E-09	AT5G42190.1	SKP1B	SKP1-like protein 1B
3,84	8,56E-03	3,80E-02	4,20	2,26E-03	1,16E-02	AT2G02740.1	WHY3	Single-stranded DNA-binding protein
3,84	8,66E-03	3,80E-02	4,20	2,25E-03	1,16E-02	AT4G03090.1	NDX	Nodulin homeobox
3,45	6,76E-17	2,66E-15	6,36	4,95E-11	9,89E-10	AT1G75950.1	SKP1A	SKP1-like protein 1A
3,17	6,23E-07	9,56E-06	2,91	2,47E-04	1,78E-03	AT1G07790.1	HTB1	Encode a histone 2B (H2B) protein
1,59	5,83E-05	6,08E-04	0,17	9,08E-01	1,00E+00	AT5G22060.1	ATJ2	Chaperone protein dnaJ 2
4,48	8,99E-04	6,19E-03				AT5G02470.1	DPA	Transcription factor-like protein DPA
3,17	9,73E-04	6,56E-03				AT1G79930.1	HSP70-14	Heat shock 70 kDa protein 14
3,54	1,87E-02	6,58E-02				AT2G36010.1	E2FA	Transcription factor E2FA
2,66	9,61E-02	2,06E-01				AT4G18060.1	SH3P3	SH3 domain-containing protein 3
1,87	2,39E-01	3,43E-01				AT5G44280.1	RING1A	Putative E3 ubiquitin-protein ligase RING1a
0,74	7,97E-03	3,80E-02	2,80	6,54E-03	2,91E-02	AT1G31440.1	SH3P1	SH3 domain-containing protein 1
			1,96	2,12E-01	4,37E-01	AT1G47870.1	E2FC	Transcription factor E2FC

contribue à l'immunité végétale notamment vis-à-vis des nématodes (Pogorelko et al., 2019), du champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* (Shindo et al., 2012), ou de la bactérie *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (Liu et al., 2020). Elle semble aussi impliquée dans des mécanismes développementaux tels que la skotomorphogenèse (Liu et al 2020), la régulation de la mort cellulaire en tant que facteur activateur (Lampl et al 2013) ou encore la sénescence *via* son interaction avec les SERPIN (Pružinská et al., 2017). RD21A est régulée par le système UPS en étant ciblée par deux E3 ubiquitine ligases distinctes de type RING pour induire sa dégradation par le protéasome 26S. La E3 ubiquitine ligase AIRP3/LOG2 apparaît comme le régulateur positif des mécanismes de tolérance aux stress salins et à la sécheresse *via* la voie de l'acide abscissique (ABA; Kim et Kim, 2013), alors que la E3 ligase SINAT4 (SEVEN IN ABSENTIA 4) en étant elle-même ciblée par des effecteurs de bactéries (AvrRxo1 de *Xanthomonas* chez *Arabidopsis*) ou d'oomycètes (AvrBlb2 de *Phytophthora infestans* chez *Nicotiana*) pour augmenter son activité et cibler RD21A pour sa dégradation, apparaît impliquée dans la signalisation de l'immunité des plantes (Liu et al., 2020).

- La famille de protéines Whirly (WHY) est composée de trois membres. Les protéines WHY1 et WHY3 se localisent au niveau des plastides alors que WHY2 se retrouve au niveau des mitochondries (Krause et al., 2005; Maréchal et al., 2008), où elles sont capables de se fixer de façon aspécifique au niveau de l'ADN de ces organelles (Prikryl et al., 2008; Marechal et al., 2009; Cappadocia et al., 2010). Chez *Arabidopsis*, WHY1 et WHY3 interviennent dans la stabilité du génome plastidique (ADNpt). En se fixant aux extrémités simple brin de l'ADN, WHY1 et WHY3 protègent le génome de la voie de réparation médiée par micro-homologie (*micro-homology-mediated repair* ou MHMR) ou celle de la NHEJ qui favorise l'apparition de réarrangement génomique et celle d'erreurs (Marechal et al., 2009; Cappadocia et al., 2010; Pérez Di Giorgio et al., 2019). Il a été proposé qu'en protégeant ces extrémités, les protéines WHY favorisent la réparation *via* la HR au niveau des génomes des organelles.
- La protéine HTB1 (Histone Two B1) est l'un des 11 variants de l'histone H2B, chez *Arabidopsis*. La comparaison des séquences peptidiques entre les 11 variants a permis d'identifier les protéines HTB1, HTB2, HTB3, HTB4, HTB9 et HTB11 comme des « *sameset* » (les protéines sont identifiées avec le même set de peptides et ne peuvent être différenciées ; Annexe 2-A), les protéines HTB5, HTB6, HTB7, et HTB10 comme des

Tableau 2.1.4: Mise en évidence des modifications post-traductionnelles identifiées chez FBL17 et ses interactants lors des deux réplicats de l’analyse IP-MS (réalisés en triplicat technique (rep1, rep2 et rep3)).

Lorsqu’une PTM a été identifiée pour une protéine, un score de confiance pour la localisation de ces modifications est attribué par le logiciel d’alignement Proline (plus le score est proche de 1 plus la confiance sur la location de la modification est importante). Les scores sont représentés en vert lorsque la location de ces modifications a pu être confirmée manuellement.

			Séquence	Modifications	Confiance sur le site					
					IP-MS 1			IP-MS 2		
					rep 1	rep 2	rep 3	rep 1	rep 2	rep 3
Contrôle	FBL17	AT3G54650	ALSFDDVDAR	Phospho (S99)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
			RALSFDDVDAR	Phospho (S99)	1.0	1.0	1.0			
			MQPQPHISPNTATAAISALESQR	Phospho (S8)	1.0	1.0	0.99	1.0	0.95	0,9
			STVLSLTAAPSSR	Phospho (S80)				0,98	0,95	0,95
	E2FB	AT5G22220	SGTLASGSNAGSPGNNFAQAGTCR	Phospho (S117)	0.86		1.0			
RBR1	AT3G12280	KIDALSSPAR	Phospho (S375)	0.85		0.5				
Zéocine	FBL17	AT3G54650	ALSFDDVDAR	Phospho (S99)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
			RALSFDDVDAR	Phospho (S99)	1.0	1.0	1.0		1.0	
			MQPQPHISPNTATAAISALESQR	Phospho (S8)	0.99	0.99	1.0	0,98	1	0,96
			AQJGYIGSLLQKCPR	Ub (K195 ou C196)		1.0	1.0			
	E2FB	AT5G22220	SGTLASGSNAGSPGNNFAQAGTCR	Phospho (S117)	0,95	0,97	0,97			
	RBR1	AT3G12280								

« *subset* » (les protéines sont identifiées avec seulement une partie de ces peptides ; Annexe 2-B) et la protéine HTB8 n'a pas été identifiée (Annexe 2-C). Ainsi, à partir des spectres identifiés, il est impossible de savoir le(s)quel(s) de ces variant(s) de l'histone H2B se trouve(nt) dans l'interactome de FBL17.

Les histones H2B avec les histones H2A, H3 et H4 constituent les histones de cœur (*core histones*) composant les nucléosomes de la chromatine (pour revue, Probst et al., 2020). Ces histones subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles (acétylation, méthylation, ubiquitination...) qui vont fortement influencer leur implication dans la régulation des gènes, la réparation de l'ADN et la stabilité chromosomique (pour revue Castillo et al., 2017; Lorković et Berger, 2017; Kim, 2019). Notons, que la monoubiquitination (H2Bub1) des histones H2B 1 à 11 excepté H2B8 permet leur activation et l'induction de la transcription (Kim et al., 2013b; Feng et Shen, 2014; Wu et al., 2013). Une étude récente sur la famille des histones H2B chez les plantes suggère que l'importante diversification de ces variants d'histones est associée à une spécialisation des profils d'expression, de la distribution génomique et des propriétés de ces variants (Jiang et al., 2020).

- La protéine NDX (*nodulin homeobox*) appartient à l'une des 11 classes de protéines à homéodomaine chez les plantes, et la classe NDX chez *Arabidopsis* est composée de ce seul membre (pour revue Mukherjee et al., 2009 et Bürglin et Affolter, 2016). Il a été montré dans le contexte de la floraison (*flowering time*) que NDX est capable d'interagir d'une part avec l'ADN simple brin en région 3' du gène *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) codant pour un répresseur floral majeur, et d'autre part, avec la région promotrice des transcrits antisens *COOLAIR* (ensemble de transcrits antisens issus du locus *FLC*) par formation d'une structure R-loop (i.e. une molécule hybride ADN:ARN formant une structure à trois brins d'acides nucléiques), permettant ainsi une régulation fine de la floraison (Sun et al 2013). NDX a aussi été caractérisée pour son intervention en tant que régulateur négatif de la voie de l'ABA. AtNDX interagit directement avec les composants AtRING1A et AtRING1B du complexe PRC1 (Polycomb Repressive Complex1) régulant ainsi l'expression de gènes de réponse à l'ABA. AtNDX peut également interagir directement avec la région 3' du gène *ABI4* (*ABA-INSENSITIVE*) pour réprimer son expression (Zhu et al., 2020). Notons que dans le réplicat 1 de l'IP-MS, la protéine RING1A est enrichie avec FBL17 de façon non

A MQPQPHIS^YPNTATAAISAALESQRSRKNRGSYNCGRCGQPKKGHVCLLTAPPDIPPTPIASEPVSCISAAASSSRSTVLS^YSLTA
APSSRQTFTHLRRAL^YSFDDVDARNSLDES^YDLDAASMDLD^YLQLDTDIVQ^YPGRF^YHAVGLW^YEVLKRLPPSS^YLLMAARVCKGW
RETSRKMWKA^YAEELRIRVPERAQIGYIGSLLO^YKCPRLIRLSLKIESDFDATTACIAFSCPNLEVLEITTSGAAVNRISGD^YELSR
FVANKRGLTSLKMEGCSNLGGFSLSSSSSLTLWLSDLHSLSKMIFNCPNLTEISLEFSRQEDDSTDLVTMVDGLGRTCTRLQ
NIHIASLKLSTVVLSTAVNFRYLRLMSLVLGINITDASVAAISSGYKNLELLDLSGSSITDTGLGMICDVLPTLSKLLVALCP
NITSSGIQFATAQLP^YLELMDCGMTVSDPNSDNPTFVENP^YSPHKTP^YGYNQKMF^YIKHKRLKKLSLWGCSSLDALF^YLNCPEL
MDLNLNLCSNLHPESVLVQC^YPKLQLVYASGCQGLLTGAIRKQVSENF^YSAGENHMPRKRLADASKRIQALPSLYQETREDGI
YAGKRRKLEKEMCTIIH



Figure 2.1.2: La protéine FBL17

(A) La séquence peptidique de FBL17 met en évidence les sites de phosphorylation (jaune) et d'ubiquitination (rouge) identifiés en IP-MS-MS, et les motifs prédits, le motif LxCxE (bleu), le motif PENF (vert) et les motifs de phosphorylation par des CDK (violet). **(B)** Représentation schématique de la protéine FBL17 avec les domaines F-box (marron) et LRR (vert anis) ainsi que les sites possibles de PTM ou motifs spécifiques mentionnés en A (même code couleur).

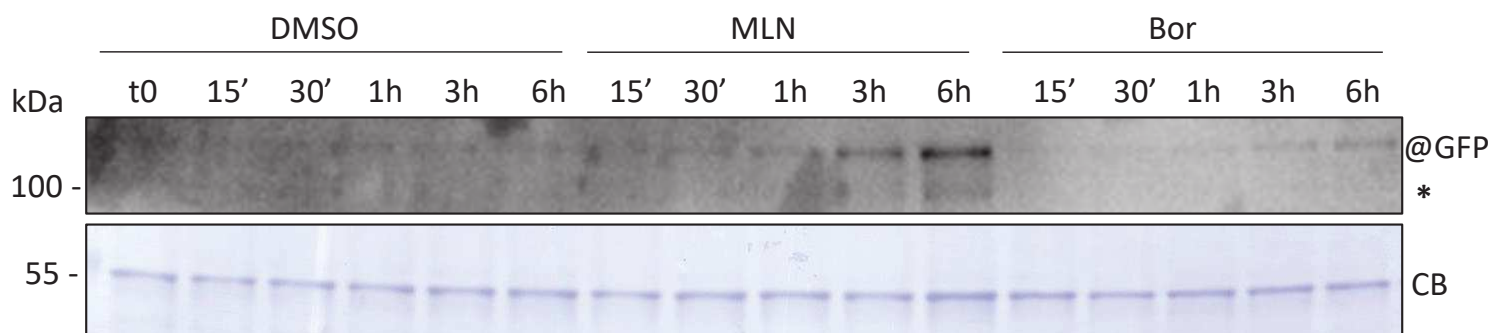


Figure 2.1.3: Accumulation de la protéine FBL17 après un traitement au Bortezomib et au MLN

Western Blot des protéines FBL17-GFP de plantules de 8 jours 35S:FBL17-GFP traitées de 15 minutes (15') à 6 heures (6h) avec du DMSO (contrôle), du Bortezomib (Bor; inhibiteur du protéasome) ou du MLN (inhibiteur des complexes CRL). Une coloration au Bleu de Coomassie (CB) a été utilisée comme contrôle de charge. Le @ indique l'hybridation avec l'anticorps utilisé. L'astérisque (*) indique l'accumulation de la seconde bande FBL17-GFP.

significative (Tableau 2.1.3). L'identification d'un partenaire connu de la protéine NDX, bien qu'enrichi de façon non significative, laisse envisager la possibilité d'une interaction de FBL17 au sein du complexe AtNDX-RING1A.

Enfin, l'étude des spectres protéiques identifiés en IP-MS a permis de mettre en évidence la présence de 3 sites de phosphorylation pour la protéine FBL17 au niveau des sérines Ser8 et Ser99 dans les 2 réplicats, et au niveau de la Ser80 dans le deuxième réplicat (score Proline entre 0,90 et 1 par échantillon, plus une validation manuelle de ces modifications (Johanna Chicher, plateforme de protéomique, IBMC, Esplanade, Strasbourg ; Tableau 2.1.4). Ces sites de phosphorylation se situent dans la partie N-terminale de FBL17 en amont du domaine F-box (Figure 2.1.2). L'accumulation de FBL17-GFP en microscopie après un traitement au MG132 (un inhibiteur du protéasome) et un traitement MLN a mis en évidence sa régulation post-traductionnelle par un complexe de type CRL (Noir et al., 2015). L'accumulation de FBL17-GFP a été confirmée en Western Blot après un traitement au Bortezomib (un autre inhibiteur du protéasome) et un traitement MLN (Figure 2.1.3). Notons l'accumulation d'une deuxième bande après le traitement MLN laissant suggérer l'accumulation d'une forme modifiée de FBL17.

II La relation entre FBL17, les membres du complexe DREAM (RBR1 et E2Fb) et E2Fa

Les protéines FBL17, RBR1 et E2Fa font partie d'une boucle de rétrocontrôle avec les protéines CDKA;1 et KRP afin de réguler l'entrée en phase S des cellules. Les protéines RBR1 et E2Fa sont notamment capables de se fixer au niveau du promoteur FBL17 afin de réguler son expression transcriptionnelle (Vandepoele et al., 2005; Gusti et al., 2009; Zhao et al., 2012). L'identification des protéines E2F et RBR1 dans l'interactome de FBL17 laisse suggérer un autre niveau de régulation entre ces protéines. Différentes analyses ont été initiées, afin d'étudier si les protéines RBR1, E2Fa ou E2Fb interviennent dans la régulation de FBL17 ou si FBL17, en tant que protéine F-box, cible ces protéines pour induire leur dégradation.

La relation entre FBL17 et les protéines RBR1, E2Fa et E2Fb a tout d'abord été étudiée d'un point de vue génétique en réalisant différents croisements. Le mutant *rbr1* nul (knockout) étant létal, la lignée *fb17-1* a été croisée avec des lignées hypomorphes (knockdown) *rbr1-2*

Taleau 2.1.5.: Liste des lignées Arabidospis générées dans le cadre de ce projet

Parent femelle	Parent mâle	Nouvelle lignée
<i>fb17-1</i>	<i>e2fa-1</i>	F2
<i>fb17-1</i>	<i>e2fa-2</i>	Disponible
<i>fb17-1</i>	<i>e2fb-1</i>	Disponible
<i>fb17-1</i>	<i>e2fb-2</i>	Disponible
<i>fb17-1</i>	<i>rbr1-2</i>	Disponible
<i>fb17-1</i>	<i>Rbi</i>	Disponible
<i>fb17-1</i>	<i>amigoRBR</i>	F3
<i>fb17-1</i>	<i>atm-2</i>	F2
<i>fb17-1</i>	<i>wee1-1</i>	Disponible
<i>fb17-1</i>	<i>atr-2</i>	Disponible
<i>fb17-1</i>	pBRCA1:BRCA1-GFP	F3
<i>fb17-1</i>	pWEE1:WEE1-GFP	F2
<i>fb17-1</i>	pE2Fa:E2Fa-GFP	Disponible
<i>fb17-1</i>	pE2Fb:E2Fb-GFP	Disponible
<i>fb17-1</i>	pRBR1:mcherry-RBR1	F2
<i>fb17-1</i>	1406	Disponible
<i>fb17-1</i>	1445	F2
<i>fb17-1</i>	IC1	F2
<i>fb17-1</i>	IC6	F2
<i>fb17-1</i>	IC9	F2

Parent femelle	Parent mâle	Nouvelle lignée
pFBL17:FBL17-GFP	pRBR1:mcherry-RBR1	Disponible
35S:FBL17-GFP	pRBR1:mcherry-RBR1	F3
pFBL17:FBL17-GFP	<i>e2fa-1</i>	F2
35S:FBL17-GFP	<i>e2fa-1</i>	F2
pFBL17:FBL17-GFP	<i>e2fa-2</i>	F2
35S:FBL17-GFP	<i>e2fa-2</i>	F2
pFBL17:FBL17-GFP	<i>e2fb-1</i>	F2
35S:FBL17-GFP	<i>e2fb-1</i>	F2
pFBL17:FBL17-GFP	<i>e2fb-2</i>	F2
35S:FBL17-GFP	<i>e2fb-2</i>	F2
pFBL17:FBL17-GFP	<i>amigoRBR</i>	F2
35S:FBL17-GFP	<i>amigoRBR</i>	F2
pFBL17:FBL17-GFP	<i>Rbi</i>	Disponible
35S:FBL17-GFP	<i>Rbi</i>	Disponible
pFBL17:FBL17-GFP	<i>wee1-1</i>	F2
35S:FBL17-GFP	<i>wee1-1</i>	F3
pFBL17:FBL17-GFP	<i>atm-2</i>	F3
35S:FBL17-GFP	<i>atm-2</i>	F2
pFBL17:FBL17-GFP	<i>atr-2</i>	F3
35S:FBL17-GFP	<i>atr-2</i>	F3
pFBL17:FBL17-GFP	<i>sog1-1</i>	F3
35S:FBL17-GFP	<i>sog1-1</i>	F3
pFBL17:FBL17-GFP	<i>brca1-1</i>	F3
35S:FBL17-GFP	<i>brca1-1</i>	F3

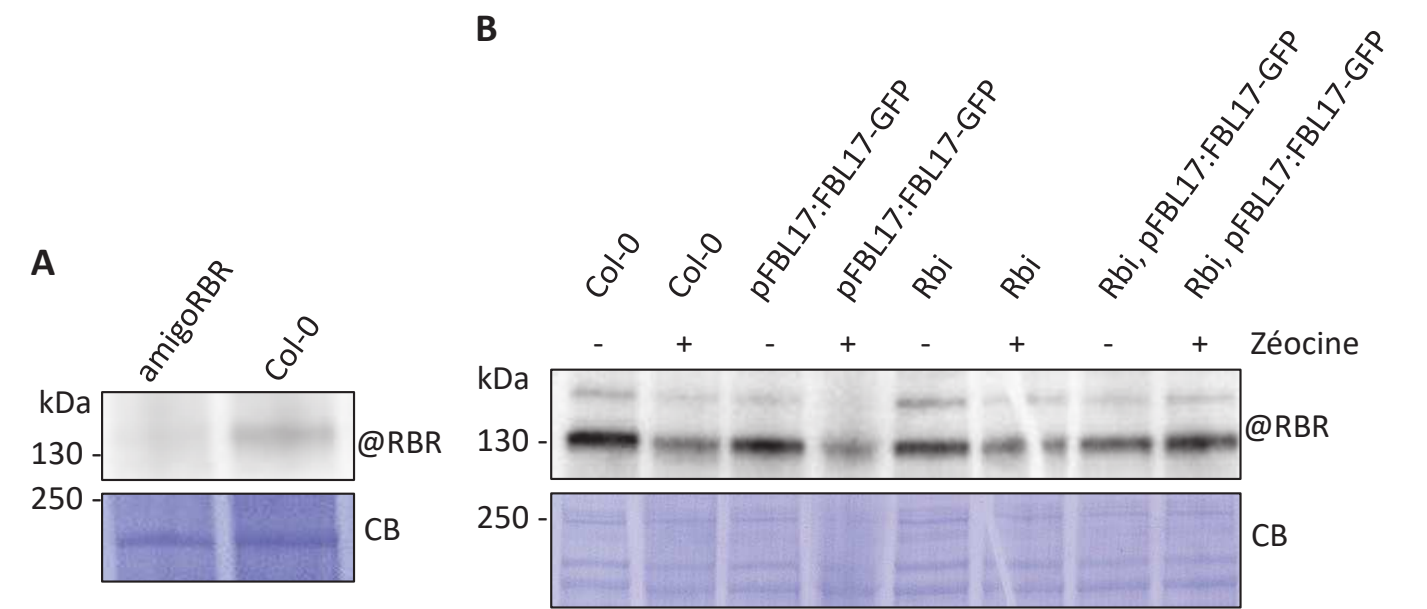


Figure 2.1.4: Caractérisation des lignées hypomorphes pour RBR1.

Niveaux protéiques de RBR1 observés par Western Blot dans les lignées *amigoRBR* (A) et *Rbi* (B) sur des plantules âgées de 10 et 6 jours respectivement, et comparé à *Col-0* (contrôle sauvage). (A-B) Une coloration au Bleu de Coomassie (CB) a été utilisée comme contrôle de charge. Le @ indique l'hybridation avec l'anticorps utilisé.

et RNAi (*amigoRBR* et *Rbi* ; Tableau 2.1.5). Afin de vérifier le niveau de protéines RBR1 au sein de ces lignées *knockdown*, un Western Blot a été réalisé. Comme attendue, une forte diminution de la quantité de RBR1 peut être observée dans la lignée *amigoRBR* en comparaison à Col-0 (Figure 2.1.4-A), par contre dans le cas de la lignée *Rbi* le résultat est moins évident et nécessite d'être répété (Figure 2.1.4-B). Notons cependant que les lignées hypomorphes pour RBR1 ont été caractérisées pour présenter de la mort cellulaire constitutive et une hypersensibilité aux stress génotoxiques (Cruz-Ramírez et al., 2013; Horvath et al., 2017; Biedermann et al., 2017), ces phénotypes sont bien retrouvés dans notre lignée *Rbi* laissant supposer une baisse suffisante du niveau de RBR1 pour engendrer ce phénotype (Figure 2.1.7). La lignée *fb17-1* a aussi été introgressée dans les fonds mutants T-DNA *e2fb-1*, *e2fb-2*, *e2fa-1* et *e2fa-2* (Tableau 2.1.5). Pour ces différents croisements, aucun double mutant homozygote n'a pu être identifié dans les lignées *fb17-1 e2fb* (deux populations par allèle criblées pour le phénotype *fb17*-like, i.e. plantules petites, plus claires, cotylédons filiformes et petites racines, et 100 individus prélevés au hasard génotypés par PCR), *fb17-1 rbr1-2* (plus de treize populations criblées et environ 400 individus génotypés). Les populations nouvellement générées de *fb17-1+/- Rbi*, *fb17-1+/- amigoRBR* et *fb17-1+/- e2fa-1* n'ont, quant à elles, pas encore été caractérisées (Tableau 2.1.5). Seule la lignée *fb17-1 e2fa-2* a permis l'identification de doubles mutants. Le double mutant *fb17-1 e2fa-2* présente des phénotypes développementaux forts identiques à ceux du simple mutant *fb17*. Les plantes sont très petites avec des feuilles serratées (Figure 2.1.5), et le même retard d'élongation racinaire peut être observé pour le double mutant *fb17-1 e2fa-2* que pour le simple mutant *fb17-1*, alors que le simple mutant *e2fa-2* présente une élongation racinaire similaire à celle du contrôle Col-0 (Figure 2.1.6).

Afin d'étudier l'implication des protéines RBR1, E2Fa et E2Fb dans la régulation post-traductionnelle de FBL17, la construction rapportrice pFBL17:FBL17-GFP a été introgressée dans les mutants *e2fa*, *e2fb* et *Rbi* (Tableau 2.1.5). Ces lignées permettront de regarder d'une part, le niveau protéique de FBL17 dans ces fonds mutants, et d'autre part, les possibles modifications de la distribution subcellulaire de FBL17. Si les lignées *e2fa*, pFBL17:FBL17-GFP et *e2fb*, pFBL17:FBL17-GFP ne sont pas encore disponibles, la lignée *Rbi*, pFBL17:FBL17-GFP a été caractérisée. Au niveau des pointes racinaires, la protéine FBL17-GFP ne présente pas d'expression différentielle d'un point de vue tissulaire ni de relocalisation au niveau subcellulaire (Figure 2.1.7).

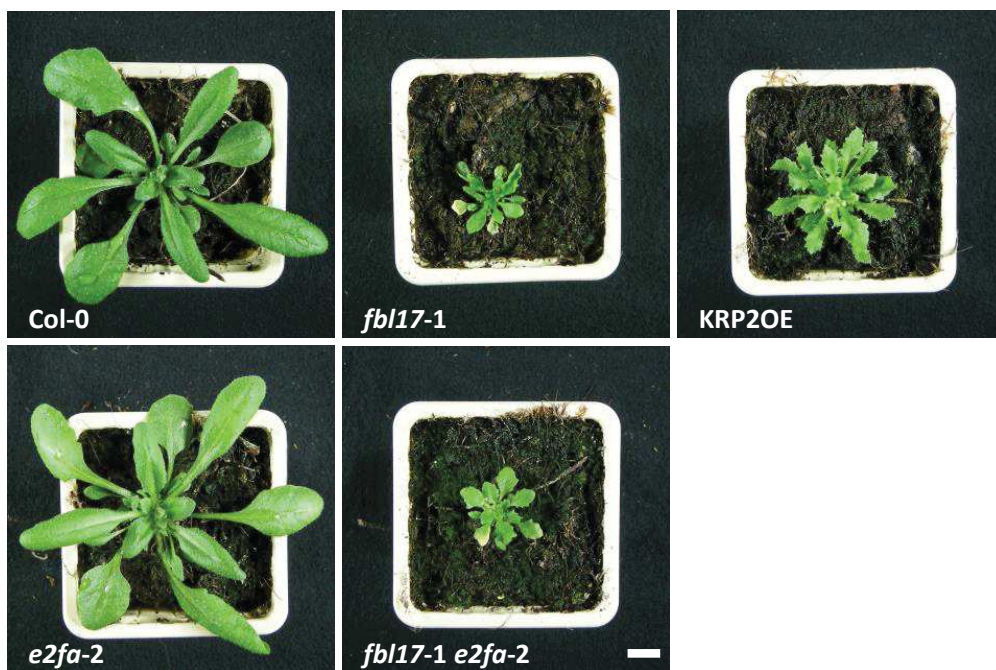


Figure 2.1.5: Le double mutant *fbl17 e2fa* présente le même phénotype développemental que le simple mutant *fbl17*.

Les graines ont germé en condition *in vitro*, après une semaine, les plantules ont été transférées sur sol. Sur l'image les plantules sont âgées de 5 semaines. Echelle = 1cm.

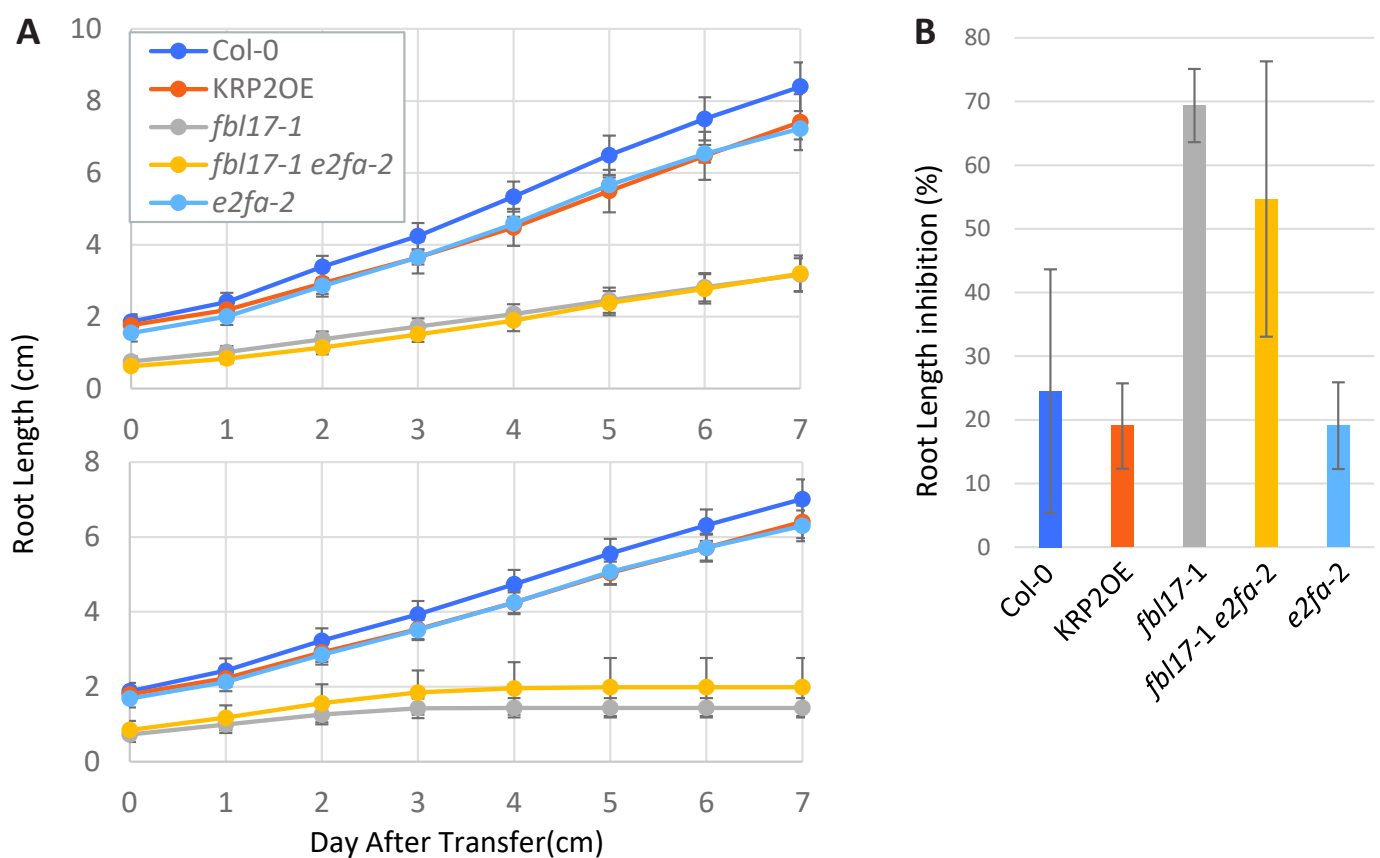


Figure 2.1.6: Le double mutant *fbl17 e2fa* présente la même sensibilité aux stress génotoxiques que le simple mutant *fbl17*.

(A) Elongation racinaire des plantules de 5 jours des géotypes indiqués et transférées sur milieu MS standard (en haut) ou contenant 5 μ M de Zéocine (en bas) pendant 7 jours supplémentaires. Les barres d'erreurs indiquent la variabilité au sein de l'expérience. **(B)** pourcentage de l'inhibition de l'élongation racinaire pour l'expérience décrite en A.

Enfin, l'enrichissement des protéines RBR1, E2Fb et DPB lors de l'IP avec FBL17 (Figure 2.1.1 et Tableau 2.1.3), ainsi que la régulation des protéines E2Fa, E2Fb et RBR1 par le protéasome 26S (del Pozo et al., 2002; Hirano et al., 2011a, 2011b), nous permet d'envisager la participation de la protéine F-box FBL17 dans la régulation post-traductionnelle des composants des complexes DREAM ainsi que de E2Fa. Pour vérifier cette hypothèse, la stabilisation de ces protéines a tout d'abord été étudiée sous traitement MLN, afin de vérifier leur régulation par des complexes CRL. Ainsi, aussi bien dans les lignées Col-0 pour la protéine RBR1, que dans les lignées pE2Fb:E2Fb-GFP, une stabilisation des protéines testées peut être observée sous traitement Bortezomib, mais aussi sous traitement MLN, confirmant la régulation de RBR1 et E2Fb par un complexe CRL (Figure 2.1.8-A&B). Ensuite, afin d'étudier si les protéines E2Fa, E2Fb et RBR1 pourraient être régulées par le complexe SCF^{FBL17}, les quantités de ces protéines ont été analysées dans le fond mutant *fb17* en utilisant des anticorps endogènes. En absence de la protéine FBL17, une accumulation des protéines RBR1 et E2Fb a été clairement observée alors que pour E2Fa la qualité du résultat obtenu ne permet pas de conclure (Figure 2.1.8-C&D et Annexe 3). Notons également l'accumulation d'une des formes phosphorylées de RBR1 dans le fond mutant *fb17* (Figure 2.1.8-C). Ces résultats, associés à l'identification, lors des IP-MS, de motifs phosphorylés au niveau des sérines 117 pour E2Fb (score Proline entre 0,86 et 1 dans le réplicat 1, plus une validation manuelle de ces modifications ; Tableau 2.1.4) et des sérines 374 ou 375 pour RBR1 (score Proline entre 0,5 et 1 dans le réplicat 1, plus une validation manuelle de ces modifications ; Tableau 2.1.4), suggère que FBL17 pourrait réguler RBR1 et E2Fb *via* le protéasome en ciblant l'un des motifs phosphodégron identifiés. A ce stade, la faible quantité d'anticorps endogènes dont nous disposons pour les protéines E2F ne nous permet pas de confirmer l'implication de FBL17 dans la stabilité de ces protéines. De ce fait, les lignées rapportrices pRBR1:mcherry-RBR1, pE2Fa:E2Fa-GFP et pE2Fb:E2Fb-GFP ont été introgressées dans le fond mutant *fb17-1* (Tableau 2.1.5). La lignée rapportrice *fb17-1+/-*,pRBR1:mcherryRBR1 est encore en cours de génotypage, mais les lignées *fb17-1+/-*,pE2Fa:E2Fa-GFP et *fb17-1+/-*,pE2Fb:E2Fb-GFP ont déjà pu être obtenues. Cependant, l'analyse des F₃ issues de ces croisements n'a pas permis, à ce jour, d'identifier des mutants homozygotes *fb17*.

Bien que la lignée surexpresser 35S:FBL17-GFP ne présente pas de phénotype particulier (Noir et al., 2015), l'étude du niveau des protéines RBR1 et des E2F au sein de cette lignée a été initiée afin de vérifier si une surexpression de FBL17 pourrait impacter la quantité de ces

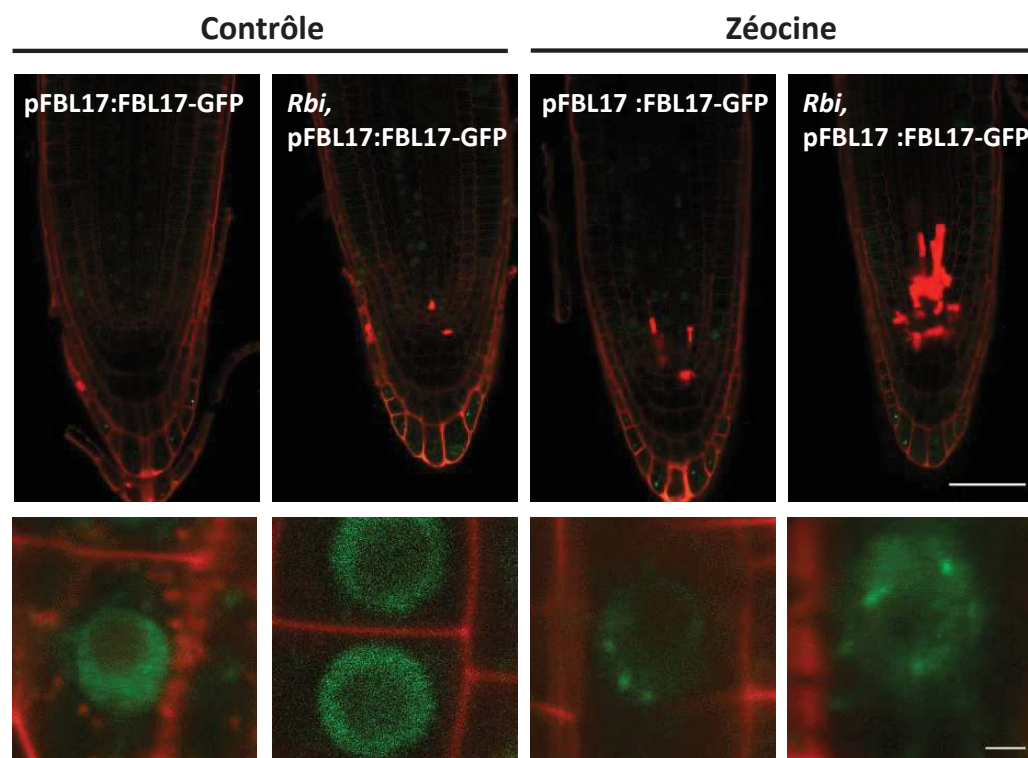


Figure 2.1.7: La protéine FBL17 est recrutée sous forme de foci dans la lignée *Rbi* après un stress génotoxique.

Microscopie confocale sur les pointes racinaires des lignées pFBL17:FBL17-GFP et *Rbi*, pFBL17:FBL17-GFP de 6 jours après 16 heures de traitement génotoxique (Zéocine 20µM) ou en condition standard (Contrôle). Echelle = 50 µm (panel du haut) et 2 µm (panel du bas). L'expérience a été réalisée deux fois (9 < N (par génotype) < 10).

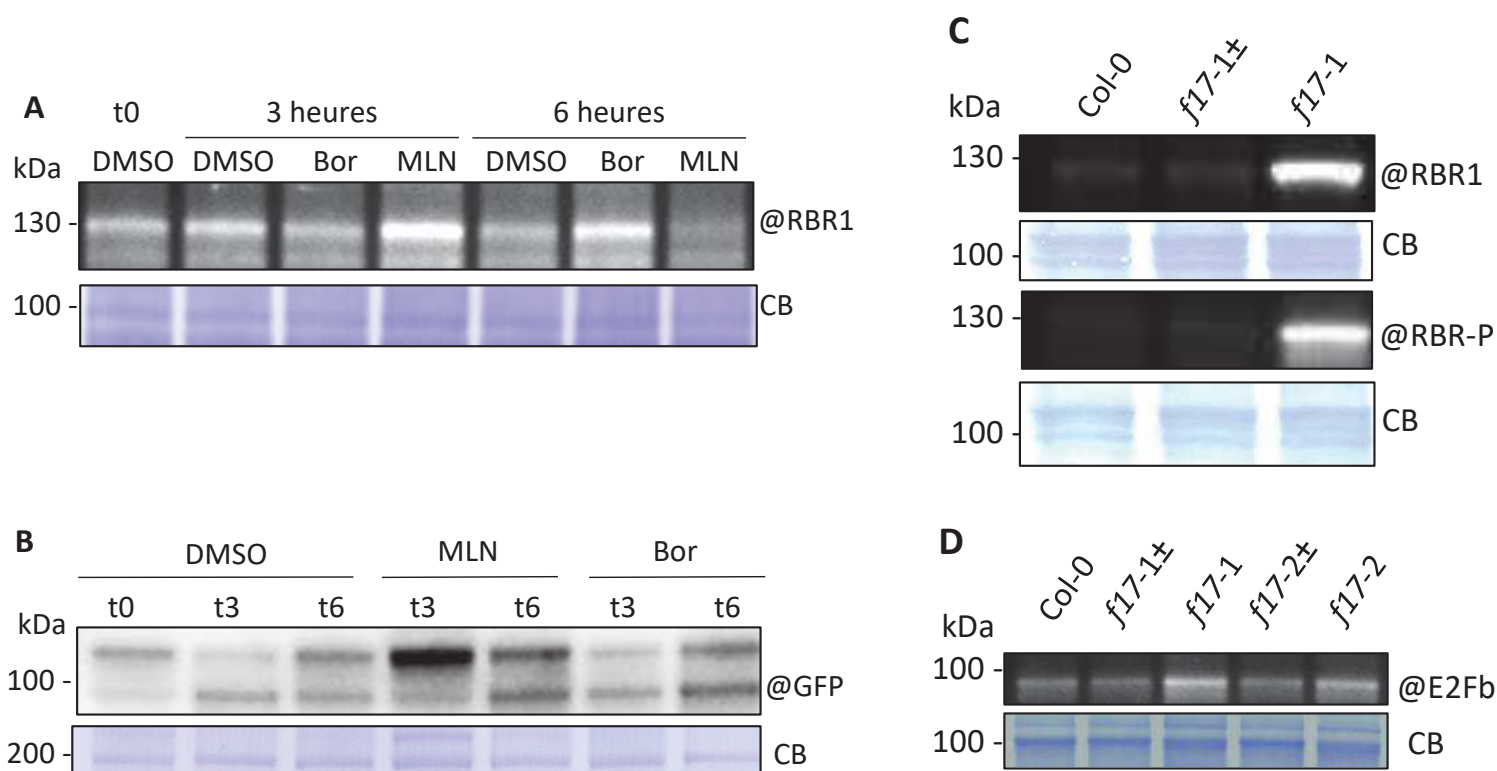


Figure 2.1.8: Accumulation des protéines E2Fb et RBR1 sous inhibiteur du système UPS et dans le fond mutant *fb17*

(A) Western Blot des protéines RBR1 de plantules de 10 jours Col-0 traitées pendant 3 et 6 heures avec du DMSO (contrôle), du Bortezomib (50 µM; Bor; inhibiteur du protéasome) ou du MLN (25 µM, inhibiteur des complexes CRL). **(B)** Western Blot des protéines E2Fb-GFP de plantules de 8 jours pE2Fb:E2Fb-GFP traitées pendant 3 (t3) et 6 (t6) heures avec du DMSO (contrôle), du Bortezomib (50 µM Bor; inhibiteur du protéasome) et du MLN (25 µM inhibiteur des complexes CRL). **(C)** Western Blot des protéines RBR1 de plantules Col-0, *fb17-1* et *fb17-1[±]* de 12 jours. **(D)** Western Blot des protéines E2Fb des plantules Col-0, *fb17-1* et *fb17-1[±]* de 20 jours. **(A-D)** Une coloration au Bleu de Coomassie (CB) a été utilisée comme contrôle de charge. Le @ indique l'hybridation avec l'anticorps utilisé.

protéines au sein des plantes. Des lignées 35S:FBL17-mCherry et pFBL17:FBL17-mCherry ont été générées pour réaliser les croisements avec les lignées rapportrices pE2Fa:E2Fa-GFP et pE2Fb:E2Fb-GFP. Un anticorps endogène pour RBR1 étant disponible, l'analyse se fera directement sur la lignée surexpresser 35S:FBL17-GFP. Cependant, les expériences sont encore en cours et ne sont pas présentés ici.

Enfin, un croisement a été réalisé entre les lignées pRBR1:mCherry-RBR1 et pFBL17:FBL17-GFP afin d'étudier la dynamique d'accumulation au niveau cellulaire entre les protéines FBL17 et RBR1 (Tableau 2.1.5). Alors que la protéine mCherry-RBR1 est exprimée dans les noyaux de façon homogène à tous les niveaux tissulaires de la pointe racinaire, la protéine FBL17-GFP présente, au niveau des noyaux, un profil plus composite du fait du pic d'expression de FBL17 lors de l'entrée en phase S et de son instabilité (Noir et al., 2015). Cette lignée a permis d'observer une colocalisation de FBL17 et RBR1 dans des noyaux en interphase (Figure 2.1.9). Des cinétiques d'observation sont actuellement en cours afin de déterminer finement la dynamique d'expression entre ces 2 protéines. Une fois la lignée pFBL17:FBL17-mCherry disponible, son croisement avec les lignées rapportrices pE2Fa:E2Fa-GFP et pE2Fb:E2Fb-GFP permettra le même niveau d'analyses dynamiques entre FBL17 et les E2F.

III Conclusion

Ce premier axe de recherche a permis d'identifier les partenaires protéiques de FBL17 et d'initier leur caractérisation. En plus des protéines SKP1A (ASK1) et SKP1B (ASK2), prenant part au complexe SCF, et des protéines RD21A, WHY3, HTB1 et NDX, la protéine F-box FBL17 présente au sein de son interactome les protéines E2Fa et DPa ainsi que les membres du complexe DREAM à savoir les protéines RBR1, E2Fb et DPb. L'étude de la relation entre ces derniers est encore en cours d'étude, mais les résultats obtenus à ce jour permettent déjà de faire l'hypothèse que FBL17 pourrait jouer un rôle clef dans la régulation par le protéasome de ces protéines. Notons que l'étude de la régulation de FBL17 par RBR1 et les E2F n'est pas encore suffisamment avancée pour exclure la possibilité d'un rétro-contrôle entre ces interactants.

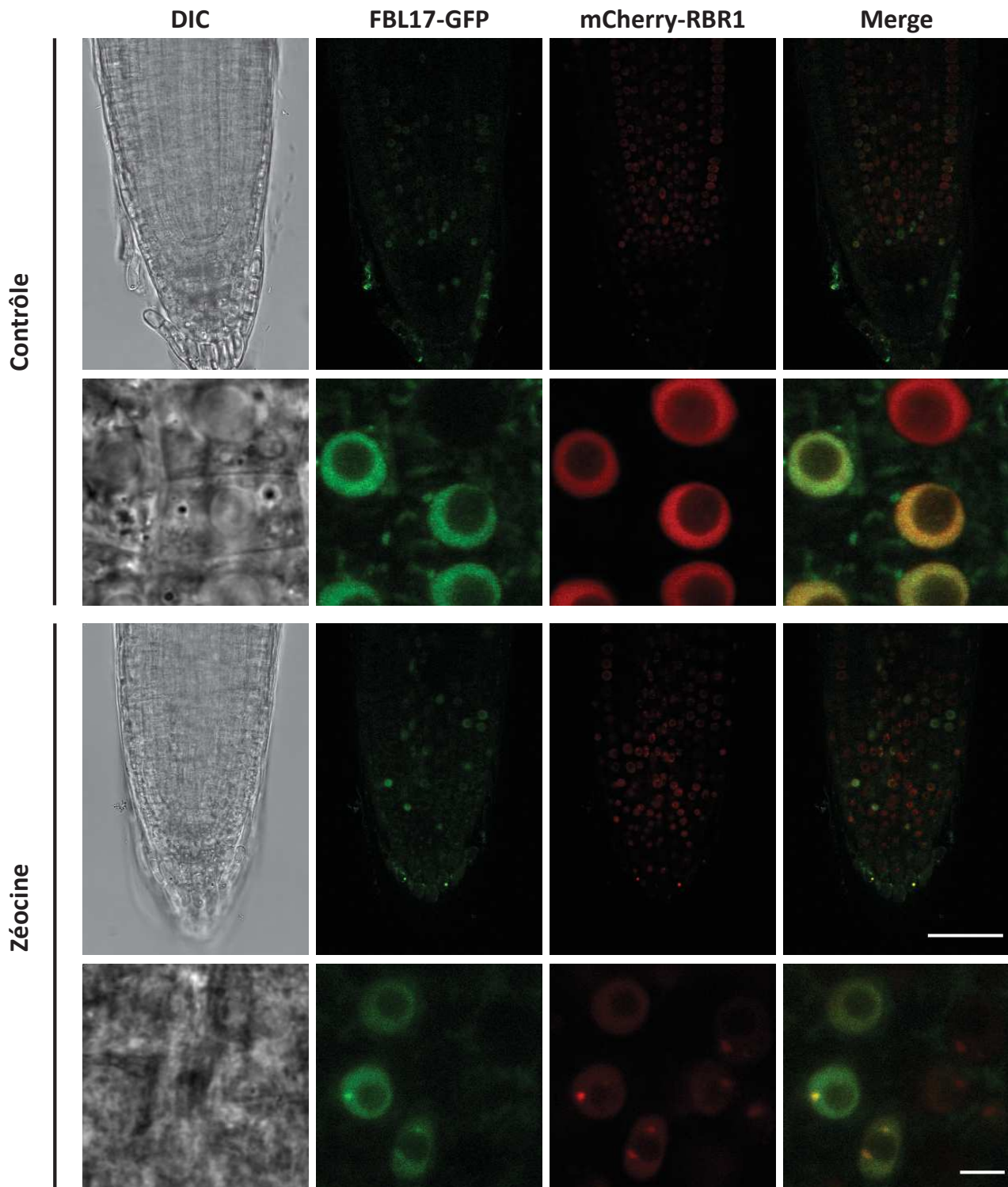


Figure 2.1.9: Les protéines rapportrices de FBL17 et RBR1 co-localisent en condition standard et sous stress génotoxique.

Microscopie confocale sur les pointes racinaires de la lignée pFBL17:FBL17-GFP pRBR1:mcherry-RBR1 de 6 jours en condition standard (Contrôle) ou après 16 heures de traitement génotoxique (Zéocine 20 μ M). Echelle = 50 μ m (pointes racinaires) et 5 μ m (noyaux). L'expérience a été réalisée une fois.

Chapitre 2 : Implication de FBL17 dans la réponse aux dommages à l'ADN

Depuis quelques années, la caractérisation des acteurs clefs de la progression du cycle cellulaire a permis de mettre en évidence leur implication dans la réponse aux dommages à l'ADN. Que ce soit la plateforme protéique RBR, les facteurs de transcription E2F et MYB ou la kinase WEE1, ces protéines semblent intervenir à la suite d'un stress génotoxique en étant recrutées au niveau des lésions de l'ADN et/ou en régulant le cycle cellulaire. Dans l'équipe, la caractérisation du mutant *fb17* a permis de mettre en évidence l'induction de certains gènes de la voie DDR, la présence de mort cellulaire constitutive au niveau des pointes racinaires et des problèmes de ségrégation chromosomique lors de la mitose (Noir et al., 2015). L'ensemble de ces données laissait suggérer l'implication de FBL17 dans la voie de la réponse aux dommages à l'ADN chez *Arabidopsis thaliana*.

Le second axe de recherche de ma thèse a donc été d'étudier cette implication en caractérisant, d'une part, la DDR constitutivement présente chez le mutant *fb17*, et d'autre part, la sensibilité de ce mutant aux stress génotoxiques, en m'intéressant aux régulations transcriptionnelles et post-traductionnelles de FBL17 en réponse aux dommages à l'ADN. Par ailleurs, chez les mammifères, la protéine F-box Skp2 intervient dans la régulation de certains acteurs de la DDR (pour revue Cai et al., 2020; Asmamaw et al., 2020). Par analogie, la relation de FBL17 avec des acteurs de la DDR tels que SOG1, BRCA1, ATR, ATM et WEE1 a été initiée.

Une partie des résultats de ce second chapitre ont donné lieu à une publication (Gentric et al., 2020), dont les Figures et Tableaux supplémentaires se trouvent en Annexe 4 et 5.

The F-Box-Like Protein FBL17 Is a Regulator of DNA-Damage Response and Colocalizes with RETINOBLASTOMA RELATED1 at DNA Lesion Sites^{1[OPEN]}

Naomie Gentric, Kinda Masoud, Robin P. Journot, Valérie Cognat, Marie-Edith Chabouté, Sandra Noir,² and Pascal Genschik³

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

ORCID IDs: 0000-0003-0624-1887 (N.G.); 0000-0002-1967-2400 (R.P.J.); 0000-0001-9337-2767 (V.C.); 0000-0001-8688-721X (M.-E.C.); 0000-0002-5666-2885 (S.N.); 0000-0002-4107-5071 (P.G.).

In *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), the F-box protein F-BOX-LIKE17 (FBL17) was previously identified as an important cell-cycle regulatory protein. FBL17 is required for cell division during pollen development and for normal cell-cycle progression and endoreplication during the diploid sporophyte phase. FBL17 was reported to control the stability of the CYCLIN-DEPENDENT KINASE inhibitor KIP-RELATED PROTEIN (KRP), which may underlie the drastic reduction in cell division activity in both shoot and root apical meristems observed in *fbl17* loss-of-function mutants. However, whether FBL17 has other substrates and functions besides degrading KRPs remains poorly understood. Here we show that mutation of *FBL17* leads not only to misregulation of cell cycle genes, but also to a strong upregulation of genes involved in DNA damage and repair processes. This phenotype is associated with a higher frequency of DNA lesions in *fbl17* and increased cell death in the root meristem, even in the absence of genotoxic stress. Notably, the constitutive activation of DNA damage response genes is largely SOG1-independent in *fbl17*. In addition, through analyses of root elongation, accumulation of cell death, and occurrence of γ H2AX foci, we found that *fbl17* mutants are hypersensitive to DNA double-strand break-induced genotoxic stress. Notably, we observed that the FBL17 protein is recruited at nuclear foci upon double-strand break induction and colocalizes with γ H2AX, but only in the presence of RETINOBLASTOMA RELATED1. Altogether, our results highlight a role for FBL17 in DNA damage response, likely by ubiquitylating proteins involved in DNA-damage signaling or repair.

The eukaryotic cell cycle is composed of four phases. In DNA synthesis (S) phase, DNA replication occurs, and in mitosis (M) phase, chromosomes segregate into

two nuclei, followed by cytokinesis, allowing cells to be divided into two daughter cells (Nurse, 2000). These two phases are separated by two gap phases (G1 and G2) during which cells increase in size and in number of organelles, and are subjected to cell-cycle checkpoints. The proper orchestration of the cell cycle requires numerous levels of control. In particular, cyclin-dependent kinases (CDKs), activated by cyclins, are crucial players in this process and their activity is strictly regulated (Malumbres and Barbacid, 2005; De Veylder et al., 2007). For instance, several CDKs are inactivated by CDK inhibitors (CKIs; Denicourt and Dowdy, 2004), and in both fungi and metazoans, it has been established that CKI degradation at the G1-to-S transition releases CDK activity, which in turn is required to enter S phase. In budding yeast, this is achieved by the ubiquitin E3 ligase complex SCF^{Cdc4} (Skp1, Cdc53/CULLIN, and Cdc4, a WD40-type F-box protein), which ubiquitylates the CKI Sic1 protein, leading to its proteolysis shortly before S phase (Schwob et al., 1994; Feldman et al., 1997). Similarly, in mammalian cells, the CKI protein p27^{Kip1} becomes unstable when cells enter S phase, as targeted by the SCF^{Skp2} (Skp2 being a Leu rich repeat-containing F-box

¹This work was supported by the Grand Est Région (grant no. 168947) and the Agence Nationale de la Recherche (ANR) International Collaborative Research Project (PRCI; ANR-RHiD grant no. ANR-19-CE13-0032) and ANR LabEx program (grant no. ANR-10-LABX-0036_NETRINA).

²Author for contact: Sandra.Noir@ibmp-cnrs.unistra.fr.

³Senior author.

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.plantphysiol.org) is: Sandra Noir (sandra.noir@ibmp-cnrs.unistra.fr).

S.N. and P.G. conceived the original research plans; N.G., K.M., and M.-E.C. performed experiments based on immunolabeling and confocal imaging; N.G., K.M., and S.N. performed experiments based on RT-qPCR analysis; N.G. carried out the preparation of the RNA-seq libraries; R.P.J., V.C., N.G., and S.N. performed the bioinformatics analyses; N.G., M.-E.C., P.G., and S.N. designed the experiments and analyzed the data; and N.G., S.N., and P.G. wrote the article with contributions from all the authors.

^[OPEN] Articles can be viewed without a subscription.

www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.20.00188

protein) ubiquitin ligase (for a review, see Starostina and Kipreos, 2012). Notably, the human SCF^{Skp2} E3 also targets several other essential regulators of S-phase progression as well as other regulatory proteins.

Whether a similar regulation also occurs in plants is still not fully understood, but the Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) F-box protein FBL17 has been proposed to mediate such a process. *FBL17* loss-of-function mutants fail to undergo pollen mitosis II, which normally generates the two sperm cells in a mature pollen grain (Kim et al., 2008; Gusti et al., 2009). This major cell-cycle defect could be at least partially suppressed by the mutation of some CKI genes, called KIP-RELATED PROTEINS (KRPs; Gusti et al., 2009; Zhao et al., 2012). As some viable, though sterile, *fbl17* loss-of-function plants could be recovered, it was possible to show that these mutants accumulate a higher level of the KRP2 CKI protein and share some phenotypic characteristics with plants overexpressing KRP proteins (Noir et al., 2015). However, it also appeared that *fbl17* mutant plants exhibited some characteristics not observed in KRP overexpressors, suggesting that this F-box protein might have other protein targets and functions. In particular, we observed the occurrence of cell death and abnormal chromosome segregation in *fbl17* mutant root tips, suggesting defects in genome stability (Noir et al., 2015).

The maintenance of genome integrity requires efficient DNA damage sensing and repair mechanisms (Cools and De Veylder, 2009; Nisa et al., 2019). Cells are constantly subjected to DNA damage arising from multiple origins, such as replication errors, mutations induced by the production of reactive oxygen species, or exposure to UV light, among others. However, most DNA damage will be detected and efficiently repaired by several DNA repair pathways (for review, see Spampinato, 2017). For cells, the most deleterious type of DNA damage is a double-strand break (DSB), which can lead to chromosomal rearrangements, loss of genetic information, and eventually cell death (Amiard et al., 2013). DSBs induce a DNA-damage response (DDR) that activates both cell-cycle checkpoints and DNA repair pathways (Hu et al., 2016). At the molecular level, when DSBs occur on chromatids, they are recognized by the MRE11-RAD50-NBS1 (MRN) complex (Syed and Tainer, 2018), which recruits ataxia telangiectasia mutated (ATM) kinase. Note that another kinase, ATM- and RAD3-related (ATR), is not activated by DSBs but rather by single-stranded DNA damage and replication fork stalling. Upon ATM activation, the kinase phosphorylates a multitude of downstream proteins involved in DDR. Among these, ATM phosphorylates the plant-specific transcription factor SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 (SOG1; Yoshiyama et al., 2013), which plays a central role in DDR by activating the expression of genes that participate in DNA repair, cell cycle arrest, and cell death (Yoshiyama et al., 2009; Bourbousse et al., 2018). For instance, SOG1 binds to the promoters and induces the expression of B1-type cyclin CYCB1;1 (Weimer et al., 2016), CDK

inhibitors SIAMESE-RELATED5 (SMR5) and SMR7 (Yi et al., 2014), and the DNA repair protein BRCA1 (Sjogren et al., 2015). Another important target of ATM is the histone variant H2AX, which upon phosphorylation becomes γ H2AX (Friesner et al., 2005; Dickey et al., 2009). γ H2AXs form foci at DSB sites that are important for recruitment of DNA-repair proteins such as RADIATION SENSITIVE51 (RAD51) and BRCA1 (Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017). Strikingly, cell-cycle regulators not only are transcriptionally regulated during DDR, but may also directly participate in the repair mechanism. Indeed, it has recently been reported that upon DNA damage, the Arabidopsis RETINOBLASTOMA RELATED (RBR1) protein and its binding partner E2FA are recruited to γ H2AX-labeled foci in an ATM- and ATR-dependent manner, and that RBR1 and BRCA1 even physically interact (Lang et al., 2012; Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017). Moreover, RBR1 also partially colocalizes at DNA break sites with RAD51, a recombinase involved in homology-dependent DNA repair (Biedermann et al., 2017). However, the functional relevance for genome integrity of the specific association of RBR1 with DNA repair proteins remains to be elucidated. Notably, silencing of RBR1 leads to the upregulation of several genes involved in DDR, and for at least one of these, *BRCA1*, it represses expression through DNA-binding of the E2FA transcription factor (Horvath et al., 2017).

Here we show that the F-box protein FBL17, previously cited for its functions in cell-cycle regulation, is also involved in DDR processes. *FBL17* loss of function is associated with a constitutive activation of DDR gene expression, a higher frequency of DNA lesions, and increased cell death in the root meristem, even in the absence of genotoxic stress. Moreover, the *FBL17* mutation leads to hypersensitivity to DSB-induced genotoxic stress. Notably, the FBL17 protein is recruited at nuclear foci upon DSB induction and partially colocalizes with γ H2AX. The possible roles of FBL17 in DNA damage-signaling or repair are discussed.

RESULTS

The *fbl17* Mutant Transcriptome Exhibits a Strong Upregulation of Genes Related to DDR Processes

Previous analyses have shown that Arabidopsis *fbl17* mutation leads to reduced leaf size, the appearance of serrated leaves, and sterility, likely caused by multiple cell-cycle defects (Noir et al., 2015). To further investigate the molecular basis of this phenotype, we performed a RNA sequencing (RNA-seq) analysis based on three biological replicates to identify differentially expressed genes (DEGs) between Col-0 and *fbl17-1* homozygous seedlings (Fig. 1A; Supplemental Table S1). The comparative analysis of Col-0 and *fbl17-1* transcriptome data revealed that there are 6,804 DEGs (i.e. ~25% of the whole transcriptome) in the *fbl17-1* mutant

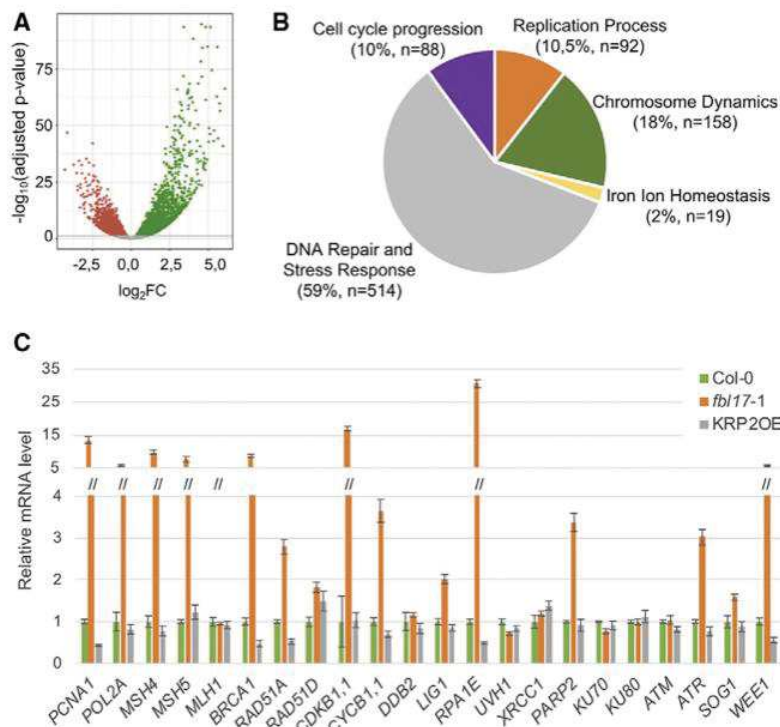


Figure 1. The whole transcriptome of the *fbl17* mutant reveals misexpression of numerous cell-cycle and DDR genes. **A**, All DEGs in *fbl17* compared with Col-0 wild-type plants (\log_2FC [x axis]) were plotted against the $-\log_{10}(\text{adjusted } P\text{-value})$. The horizontal line indicates the significance threshold for DEGs ($P < 0.05$). Up- and downregulated genes are shown with green and red dots, respectively. Non-DEGs are shown with gray dots. **B**, GO functional analysis of DEGs in *fbl17* exhibiting a \log_2FC absolute value > 1.5 (i.e. 1,443 genes). The GO enrichment analysis is based on Biological Process functional categories of ShinyGo v0.61 software. The five major functional groups are based on the 50 most significant terms taken into account from the hierarchical clustering tree summarizing the correlation among pathways with many shared genes (Supplemental Fig. S1). The number of non-redundant genes (n) per functional group and the corresponding percentage are indicated in parentheses. **C**, Relative expression levels of gene transcripts from 8-d-old in vitro grown plants of the indicated genotype as determined by RT-qPCR. The bar graph depicts expression level mean values of the indicated transcripts of one independent replicate (\pm SE of the technical triplicate). The experiment was repeated two times, giving the same tendency.

(adjusted P -value of < 0.05), with almost 54% of those upregulated (Fig. 1A). Considering all DEGs in *fbl17*, a Gene Ontology (GO) term enrichment analysis based on the Biological Process category showed an overrepresentation of genes involved in primary metabolic pathways, such as photosynthesis, and other cellular responses, most of them related to stress conditions (Supplemental Table S2), in line with the severe global phenotypic alterations of the mutant plants.

Remarkably, by filtering DEGs based on the \log_2 fold change (i.e. \log_2FC absolute value > 1.5 ; Fig. 1B), the comparative RNA-seq analysis revealed that there are still $> 1,400$ DEGs in the *fbl17* mutant and that their GO term enrichment analysis highlighted their involvement in cell cycle progression, DNA replication mechanisms, chromosome dynamics, and, in an unexpectedly extended manner, DNA repair and stress response. The latter category represents 59% of the DEGs (Fig. 1B, Supplemental Fig. S1), with 405 genes ($\sim 79\%$) exhibiting upregulation, suggesting a constitutive induction of genes linked to DNA damage and stress response. More precisely, using the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; Kanehisa et al., 2017) enrichment analysis, six enriched pathways were identified (Supplemental Table S3). One corresponds to pyrimidine metabolism, involving modifications of both DNA and RNA nucleic acids. The five others are related to DNA metabolism, in particular to DNA replication and DNA repair mechanisms, including mismatch repair, homologous recombination, nucleotide excision repair, and base excision repair.

Remarkably, in the six enriched pathways, the identified genes were all upregulated in *fbl17-1* compared to Col-0.

Finally, to validate the RNA-seq approach, genes implicated in distinct DNA damage pathways, suggested by the KEGG analysis and some other genes, were selected and their expression was monitored for comparison by reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) in wild-type Col-0 and the *fbl17-1* homozygous mutant, as well as in the KRP2 overexpressor line (KRP2^{OE}; Noir et al., 2015), under standard culture conditions (Fig. 1C). Each of the 22 tested genes revealed the same tendency in terms of expression level in both analyses, thus validating the data of the RNA-seq analysis. Furthermore, besides the expression of *WEE1*, *ATR*, *CYCB1.1*, *CDKB1.1*, and *BRCA1* already reported (Noir et al., 2015), the selected genes *PARP2*, *RPA1E*, *RAD51A*, *MSH5*, *MSH4*, *POL2A*, and *PCNA1* are also upregulated under standard growth conditions in *fbl17* but not in the control, Col-0 (Fig. 1C). Given that *fbl17* mutants present an accumulation of the CDK inhibitor KRP2, it is expected that the KRP2^{OE} line might mimic some of the *fbl17* mutant phenotypes (Noir et al., 2015). Interestingly, in this analysis, the KRP2^{OE} line exhibited an expression pattern comparable to that of Col-0, indicating that the constitutive upregulation of DDR genes in *fbl17* is not a direct consequence of KRP2 overaccumulation. Altogether, this analysis indicates that loss of *FBL17* function causes a constitutive and rather global induction of the DDR.

Gentric et al.

fb17 Mutants Reveal an Increased Frequency of DNA Lesions

The constitutive transcriptional DDR suggests that *fb17* mutants are subjected to genome instability, which is further supported by the occurrence of micronuclei and chromosome bridges previously observed in dividing mutant cells (Noir et al., 2015). To further investigate this issue, we used the sensitive and highly specific γ H2AX marker, which detected by immunolabeling can reveal DNA break sites (Fig. 2A). Interestingly, accumulation of γ H2AX foci in the *fb17* mutant background was observed. More precisely, whereas the frequency of root nuclei exhibiting constitutive γ H2AX foci in *fb17* was only slightly increased in comparison to Col-0 (i.e. ~30% in *fb17* versus 20% in Col-0; Fig. 2A), the number of γ H2AX-marked foci per nucleus was much higher in *fb17* than in Col-0 (Fig. 2B), reflecting an excessive frequency of DNA lesions even in the absence of genotoxic stress.

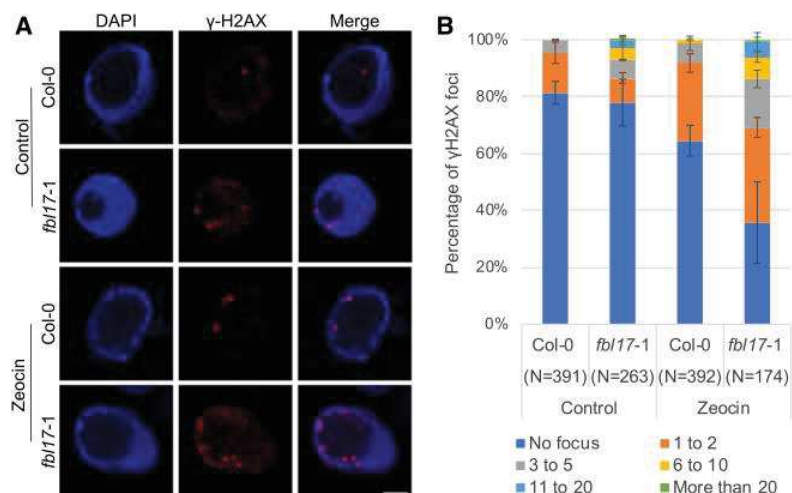
fb17 Mutants Are Hypersensitive to Drug-Induced DSB DNA Lesions

Given the specificity of γ H2AX recruitment at DNA lesion sites and their accumulation in the *fb17* loss-of-function mutant, and also considering that this type of DNA lesion especially can result in loss of genetic information, we turned our attention to genotoxic conditions triggering DSB DNA lesions. To begin with, transcript levels of the previously tested DNA-damage genes were evaluated after treatment of seedlings with zeocin, an antibiotic of the bleomycin (BLM) family widely used as an inducer of DSBs. It should be mentioned that the *FB17* gene itself is not differentially regulated upon genotoxic stress or in the tested DDR mutant background *sog1-1* (Fig. 3). Under zeocin treatment, a number of genes known to be involved in the DDR pathway, such as *RAD51A*, *TSO2*, *BRCA1*,

SMR7, *GR1*, *RPA1E*, *RAD17*, *PARP2*, *XRI1*, *SYN2*, *CYCB1;1*, and *SIP4*, among others, appeared strongly induced in Col-0 (i.e. \log_2 FC up to 200; Fig. 3B). According to the literature, many of these genes are known to be induced after DSB-induced stress, and are targeted by the transcription factor SOG1 (Culligan et al., 2006; Ogita et al., 2018). Notably, for several genes, such as *RAD51A*, *BRCA1*, *SMR7*, *PARP2*, and *XRI1*, whereas they were also induced in *fb17* (i.e. \log_2 FC between 2 and 6), expression induction was lower compared to the Col-0 control, possibly due to the preexisting constitutive induction of these genes in the mutant (Fig. 3A). In addition, *TSO2*, *NSE4*, *GR1*, *TIL1*, *RPA1E*, *WEE1*, *RPA70C*, and *RAD17* did not appear to be induced by zeocin in *fb17*, likely because they were already at maximal gene expression levels in the mutant even in the absence of the drug. Lastly, some genes (among which some were constitutively upregulated in *fb17*) were not upregulated after zeocin treatment in the *fb17* mutant or in the Col-0 control (i.e. *LIG4*, *PCNA1*, *FAN1*, *ATM*, and *ATR*; Supplemental Fig. S2). This is in accordance with previous analyses showing that these genes are not induced by DSB stress and are not targeted by SOG1 (Culligan et al., 2006).

Next, we investigated the sensitivity of the *fb17* mutant to zeocin treatment using a root elongation assay. Severe delay of *fb17* primary root elongation, observed previously, was confirmed under standard conditions (Fig. 4A). The *atm-2* mutant was used as a sensitive control (Garcia et al., 2003) and, as expected, the primary root elongation of this mutant started to be slightly delayed after 4 d of zeocin treatment (Fig. 4A), confirming the efficacy of the treatment. At that time point, Col-0 and *KRP2^{OE}* were not yet affected by the chemical treatment, whereas *fb17* root elongation had completely stopped already by day 3. After 7 d of zeocin treatment, *atm-2* exhibited an intermediate phenotype of root length inhibition (i.e. 40%, median value), which lay between the respective ratios of ~5%

Figure 2. Increased accumulation of γ H2AX foci in *fb17*. A, Representative images of Col-0 and *fb17-1* after immunostaining of γ H2AX foci (red) in root-tip nuclei from seedlings under control conditions or treated for 16 h with 5 μ M zeocin. Nuclei were counterstained with 4',6-diaminophenylindole (blue). Scale bar = 2 μ m. B, Quantification of γ H2AX foci in nuclei from Col-0 and *fb17-1* seedlings under control conditions or treated with zeocin. Between 79 and 233 nuclei per line per replicate were analyzed and categorized into six types: no focus, 1 to 2, 3 to 5, 6 to 10, 11 to 20, or >20 γ H2AX foci/nucleus, respectively. Two independent replicates were performed. Error bars indicate the SD.



FBL17 Is a Regulator of DNA-Damage Response

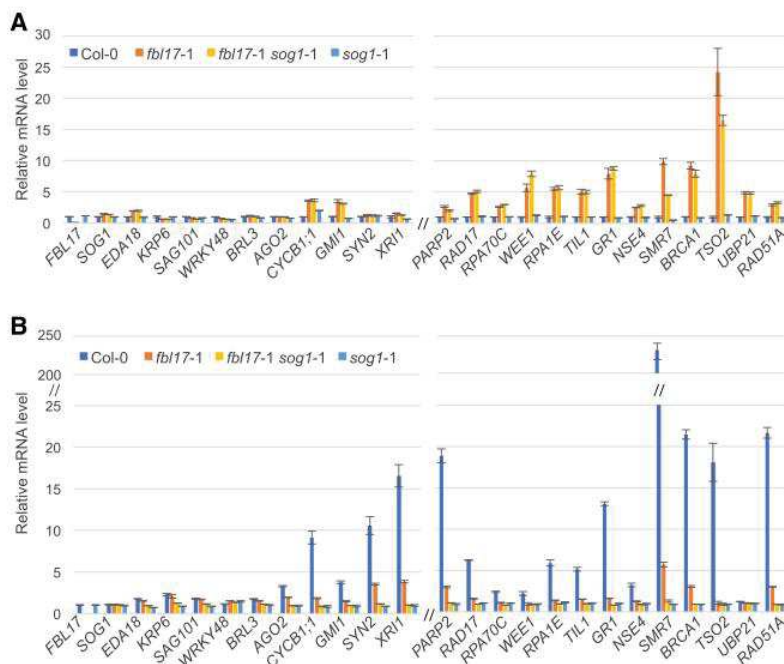


Figure 3. DDR gene expression levels in Col-0, *fbl17*, the *sog1* single-mutant, and the *fbl17 sog1* double-mutant backgrounds with and without zeocin treatment. A, Relative expression levels of genes in 8-d-old in vitro grown plants (standard conditions) of the indicated genotypes as determined by RT-qPCR. Data are compared to the Col-0 value normalized at 1. B, Relative expression levels of genes in 8-d-old in vitro grown plants of the indicated genotypes after 3 h of 20 μ M zeocin treatment as determined by RT-qPCR. Data are compared to the value of the same genotype under standard conditions (A) normalized at 1. Bar graphs depict expression level mean values of the indicated transcripts of one independent replicate (\pm SE of the technical triplicate). The experiment was repeated two times with similar results.

to 6% for Col-0 and KRP2^{OE} lines and 60% for the *fbl17* mutant line (Fig. 4B).

A strategy undertaken by multicellular organisms to eliminate damaged cells is to actively trigger cell death (Hu et al., 2016). Under the same experimental culture conditions, occurrence of cell death was estimated after 3 d of zeocin exposure. As expected, the *atm-2* sensitive mutant exhibited more cell death than the control, Col-0 (Fulcher and Sablowski, 2009), and the KRP2^{OE} line. Remarkably, whereas *fbl17* root tips already exhibited constitutive cell death, further accumulation was noticed upon zeocin treatment, which corresponded to an even wider area of dead cells than observed in the *atm-2* mutant (Fig. 4, C and D). In addition, whereas cell death observed in Col-0 root tips was qualitatively mainly located at the level of the quiescent center (QC), cell death in *fbl17* occurred both at the QC and in more distant tissues of the root. Finally, the frequency of γ H2AX foci was monitored after zeocin treatment in Col-0 and *fbl17* (Fig. 2A). Under this condition, the frequency of γ H2AX-marked nuclei in *fbl17* was significantly higher (~70%) than in Col-0 (~30%; Fig. 2B). Moreover, γ H2AX-marked nuclei accumulated a larger number of foci per nucleus in *fbl17* than in Col-0; in some cases, >20 γ H2AX foci were observed in a single nucleus.

Altogether, the impaired root meristem activity, the accumulation of cell death, and the increased number of γ H2AX foci upon zeocin treatment indicate that the *fbl17* mutant is hypersensitive to DSB-induced genotoxic stress. This phenotype is not the consequence of KRP overaccumulation occurring in *fbl17* mutants, but

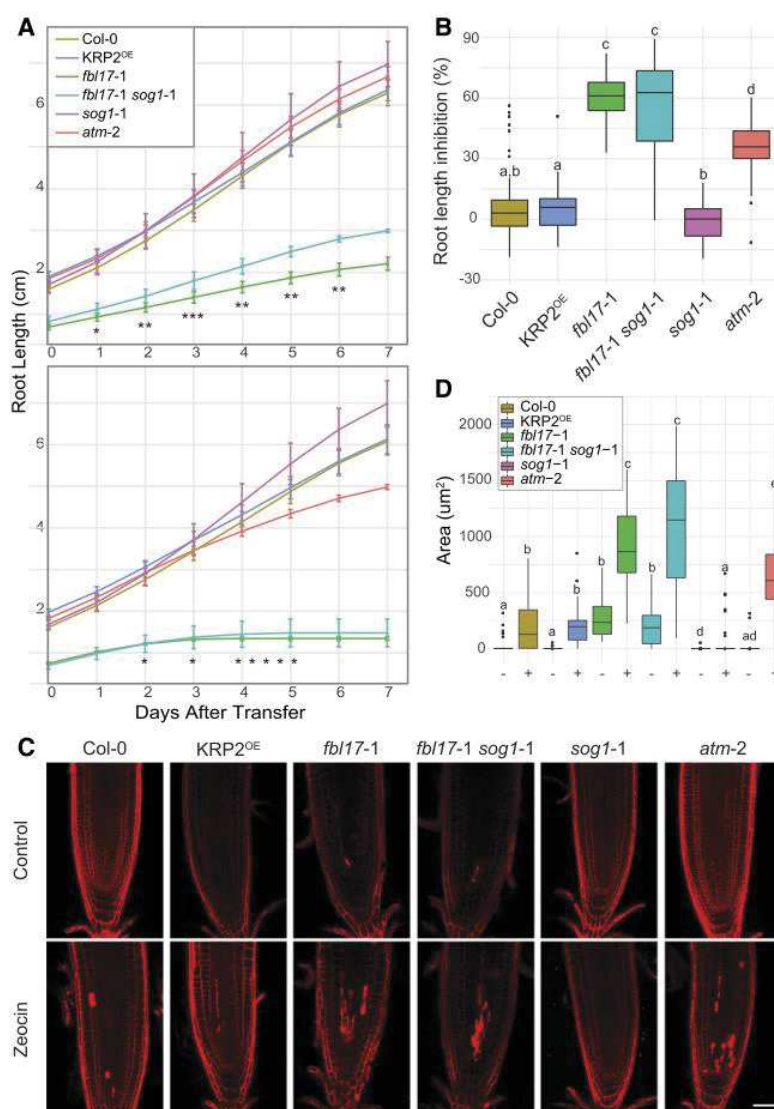
rather suggests that FBL17 might be involved in DDR beyond its cell-cycle regulatory functions.

fbl17 Constitutive Overexpression of DDR Genes and Hypersensitivity to Drug-Induced DSBs Are SOG1 Independent

Mechanisms for sensing DNA lesions and initiating DDR involve massive gene regulation, ultimately leading to DNA repair. At this level of control, the Arabidopsis SOG1 transcription factor of the NAC family has been shown to be a master regulator controlling multiple DDR pathways (Yoshiyama, 2016; Bourbousse et al., 2018; Ogita et al., 2018). As already mentioned above (see Fig. 3), SOG1 is not differentially regulated in *fbl17* at the transcriptional level. In order to investigate the putative implication of SOG1 in the DDR observed in the *fbl17* mutant, the double mutant *fbl17-1 sog1-1* was generated. At a macroscopic level, the developmental phenotype of the double mutant was similar to that of the *fbl17* single mutant (Supplemental Fig. S3), although, regarding its root growth, the double mutant exhibits a minor rescue of root length (Fig. 4A). Upon genotoxic stress, whereas *sog1-1* exhibits a slight resistance to zeocin in our experimental conditions (Fig. 4B; see also Adachi et al., 2011), the *fbl17-1 sog1-1* double mutant shares a similar level of sensitivity with the *fbl17* single mutant in terms of root growth inhibition (Fig. 4B) and cell death occurrence (Fig. 4, C and D). Despite the absence of obvious rescue of the *fbl17* phenotype by the *sog1* mutation, we next asked whether SOG1 loss of function could at least

Gentric et al.

Figure 4. The *fbl17* mutant exhibits hypersensitivity to zeocin treatment. **A**, Root growth elongation of the indicated genotypes in 5-d-old seedlings grown under standard conditions and then transferred onto control medium (top) or medium containing 5 μ M zeocin (bottom) for a further 7 d of culture. Error bars indicate the mean \pm SD of three independent experiments ($4 < N$ [per genotype] < 37). Asterisks indicate significant difference between *fbl17-1* and *fbl17-1 sog1-1*: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ by Wilcoxon-Mann-Whitney test. Complete statistical analyses are given in Supplemental Tables S4 and S5. **B**, Percentage of root length inhibition for the experiment described in **A**. Statistical significance was calculated by Wilcoxon-Mann-Whitney test. Box whiskers with different lowercase letters denote statistical differences determined by one-way ANOVA ($P < 0.05$ at least). Complete statistical analysis is given in Supplemental Table S6. **C**, Representative images of root tips of 5-d-old seedlings transferred onto control medium or medium containing 5 μ M zeocin for a further 3 d of growth before propidium iodide staining. Scale bar = 50 μ m. Three independent replicates were performed ($4 < N$ [per genotype] < 11). **D**, Cell death quantification of the root samples illustrated in **C** on control medium (–) or medium containing 5 μ M zeocin (+) for a further 3 d. Statistical significance analysis was calculated by Wilcoxon-Mann-Whitney test. Box whiskers with different lowercase letters denote statistical differences determined by one-way ANOVA ($P < 0.05$ at least). Complete statistical analysis is given in Supplemental Table S7.



partially attenuate the global upregulation of DNA-damage genes observed in the *fbl17* mutant background.

At first, by testing some gene targets of SOG1 that are not implicated in DDR according to Ogita et al. (2018), e.g. *EDA18*, *KRP6*, *SAG101*, *BRL3*, *AGO2*, we verified that they are not constitutively upregulated in the *fbl17* single mutant and, as expected, in *fbl17-1 sog1-1* (Fig. 3A). Nevertheless, most of the DDR genes constitutively induced without genotoxic stress were similarly differentially expressed in *fbl17-1 sog1-1* and *fbl17* (Fig. 3A); the exceptions were *TSO2* and *SMR7*, which showed only a slight decrease of expression. By contrast, and as expected, induction of these genes by zeocin was fully suppressed in the *sog1-1* single mutant and also in the *fbl17-1 sog1-1* double mutant (Fig. 3B). It is noteworthy, however, that upon zeocin treatment in *fbl17*, only the additive increase of expression of some DDR genes (e.g. *RAD51A*, *BRCA1*, *SMR7*, *PARP2*) was dependent on

SOG1. Altogether, these results indicate that the constitutive DDR and hypersensitivity to DSB-induced genotoxic stress observed in *fbl17* do not depend on SOG1 and likely involve other transcriptional regulatory mechanisms.

FBL17 Is Recruited at Nuclear Foci upon DSB Induction

It was previously shown that FBL17 is a nuclear F-box protein restricted to a few cells in the root meristem that shows a cell cycle phase-dependent expression pattern (Noir et al., 2015; Desvoyes et al., 2019). We next investigated whether DNA damage affects subcellular distribution of FBL17. To answer this question, we took advantage of the previously established *fbl17-1* pFBL17:FBL17-GFP line (Noir et al., 2015). At first, the sensitivity of this reporter line to zeocin was monitored using a root elongation assay (Supplemental Fig. S4, A and

B) and by RT-qPCR analysis (Supplemental Fig. S4D). In the tested conditions, the reporter line exhibited behavior similar to that of the Col-0 wild-type control, establishing that the FBL17-GFP protein is functional and could confidently be used for our analyses. Consequently, the GFP-reporter line was exposed to distinct genotoxic stresses and the distribution of the fusion protein was imaged by confocal microscopy (Fig. 5A). For this assay, we used zeocin to induce DSB DNA lesions, and due to the implication of FBL17 in DNA replication, cisplatin and hydroxyurea (HU) treatments were also applied to trigger DNA cross-linking and stalled replication forks, respectively. Under these conditions, no obvious differential distribution of the FBL17-GFP protein at a tissue level was observed among the three treatments tested. However, focusing at a sub-cellular nuclear level, the formation of FBL17 nuclear foci could be observed only with the zeocin treatment, and not with cisplatin or HU, suggesting that the formation of FBL17 foci might be specific to DSB-type DNA lesions.

DSB-Type DNA Lesions Recruit FBL17 at γ H2AX Foci

The observation of FBL17 foci upon genotoxic stress was reminiscent of the formation of γ H2AX foci.

Intriguingly, it was recently shown that in addition to the expected proteins from the DNA-damage machinery, some cell-cycle transcriptional regulators, both *Arabidopsis* E2FA and *Nicotiana tabacum* E2F transcription factors and RETINOBLASTOMA RELATED1 (RBR1), also localized at DNA damage sites (Lang et al., 2012; Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017). To better define the FBL17 foci, we used an immunostaining approach that, despite revealing a low frequency of nuclei with FBL17 foci (Supplemental Table S9), allowed us to investigate whether they colocalize with γ H2AX foci and/or RBR1. Indeed, we observed the colocalization of FBL17 with γ H2AX foci in some nuclear foci, supporting the idea that the F-box protein is recruited at DNA lesion sites upon zeocin treatment (Fig. 5B). More interestingly, we also observed a clear colocalization of FBL17 and RBR1 (Fig. 5, B and C). In fact, quantification of these nuclear foci under zeocin treatment (Fig. 5D) revealed a mean value of 5% colocalization of RBR1 with γ H2AX and 5% colocalization of FBL17 with RBR1 (Supplemental Table S9). Note that FBL17 and γ H2AX never colocalize if RBR1 is not itself detected at these foci (Fig. 5D; Supplemental Table S9) and colocalization of all three proteins together represented only 1% of our observations. These

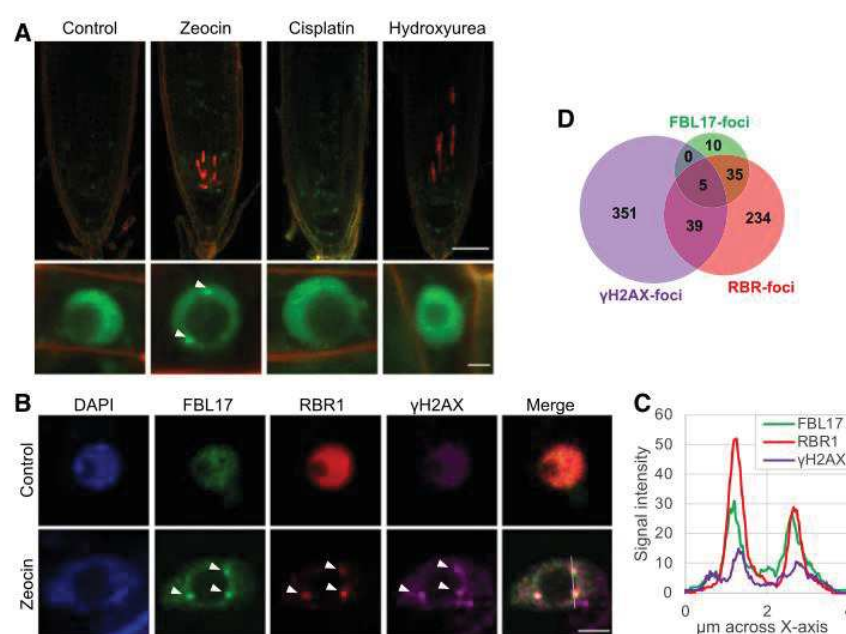


Figure 5. FBL17 proteins are recruited at γ H2AX foci and colocalize with RBR1 upon DSB-induced stress. A, Live microscopy of *fb17-1*, pFBL17:FBL17-GFP after 16 h of genotoxic treatment (zeocin 20 μ M, cisplatin 15 μ M, or HU 5 μ M). Scale bars = 50 μ m (top) and 2 μ m (bottom). Three independent experiments were analyzed (5 < N [per genotype] < 10). B, Representative images of *fb17-1*, pFBL17:FBL17-GFP root nuclei with triple immunolocalization of γ H2AX (purple), RBR1 (red), and FBL17-GFP (anti-GFP; green), showing colocalization of the three signals (arrowheads) after 16 h of zeocin treatment (20 μ M). Nuclei were counterstained with 4',6-diamino-phenylindole (blue). Scale bar = 2 μ m. C, Signal intensity distribution of the total amount of pixels at the x axis shown in the zeocin-treated nucleus in B. Statistical significance analysis of the signal colocalization is given in Supplemental Table S8. D, Venn diagram showing the frequency of the different colocalization combinations of FBL17, RBR1, and γ H2AX foci in the nuclei of one replicate (total number of foci = 758). Complete frequency analysis of the three independent replicates is given in Supplemental Table S9.

Gentric et al.

results suggest that FBL17 and RBR1 follow a dynamic recruitment at the DNA damage sites, where they likely contribute to DNA repair and genome integrity.

DISCUSSION

We have previously shown that Arabidopsis *FBL17* loss of function slows plant growth by decreasing cell proliferation and also suppressing endoreplication (Noir et al., 2015). At the molecular level, *fb17* mutant plants showed increased accumulation of the KRP2 protein, which is known to switch off CDKA;1 kinase activity (Verkest et al., 2005), and phenotypically resembled the *cdka;1* null mutant (Nowack et al., 2012), indicating that a main function of FBL17 is to positively regulate CDKA;1 activity. In line with such a role, the loss of *FBL17* delayed, or even blocked, S-phase in some cells and led to differential expression of cell-cycle genes, among them, consistently, genes involved in the process of DNA replication (Noir et al., 2015). However, our transcriptomic approach revealed that the *fb17* mutation also leads to a broader activation of numerous DDR genes beyond those solely linked to DNA replication stress. Note that genome-wide transcriptional studies of synchronized plant cells revealed that several DDR genes have their expression maximum in S-phase (Menges et al., 2005; Trolet et al., 2019).

In plants, a major regulator of DDR is the transcription factor SOG1, which has been functionally compared to the mammalian tumor suppressor p53 (Yoshiyama et al., 2009; Yoshiyama, 2016). SOG1 is directly phosphorylated by ATM, and its mutation impairs DNA repair, cell cycle arrest, and activation of cell death (Preuss and Britt, 2003; Yoshiyama et al., 2009; Furukawa et al., 2010). Whereas posttranslational regulation of SOG1 by FBL17 cannot be fully excluded, according to our analysis, *FBL17* does not seem to act in *SOG1* transcription regulation. First, the constitutive transcriptional activation of DDR genes in *fb17* is not suppressed by the *sog1* mutation. Second, many of the SOG1 target genes can still be induced upon zeocin treatment in the *fb17* mutant background. Third, *fb17* mutant hypersensitivity to DSB-inducing agents and increased amount of cell death are not dependent on SOG1.

Interestingly, it has recently been shown that several genes involved in DDR are induced when RBR1 is downregulated by RNA interference or in the hypomorphic *rbr1-2* mutant (Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017). At least for Arabidopsis *BRCA1*, it was shown that RBR1 directly represses this gene through the E2FA transcription factor (Horvath et al., 2017). A genome-wide RBR1 chromatin immunoprecipitation analysis further indicated that RBR1 is recruited to E2F sites present in the promoters of many DDR genes (Bouyer et al., 2018). According to our analysis, combining the information of E2FA-binding sites (Verkest et al., 2014) with the RBR1 chromatin immunoprecipitation dataset (Bouyer et al., 2018),

several of the DDR genes constitutively induced in *fb17* are likely targets of RBR1/E2FA.

At the functional level, it was reported that *rbr1* mutants exhibit an elevated level of DNA damage in normal growth conditions, whereas after BLM treatment, these mutants show a significantly higher level of DNA fragmentation (Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017). Moreover, both the lack of functional RBR1 and the loss of E2FA resulted in hypersensitivity against DNA DSB-inducing agents (Roa et al., 2009; Lang et al., 2012; Biedermann et al., 2017). Thus, the loss of *FBL17* function shares many similarities with the phenotype of RBR1/E2FA-deficient plants, suggesting that the F-box protein could act at this level. Indeed, we observed the colocalization of FBL17 and RBR1 at DNA damage sites. The recruitment of RBR1 and E2FA to γ H2AX foci has been previously reported (Lang et al., 2012; Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017), suggesting that these proteins might play a more direct role in DNA repair besides their known transcriptional regulatory function. Interestingly, RBR1 colocalizes with the RADIATION SENSITIVE51 (RAD51) protein and is necessary for RAD51 localization to DNA after BLM treatment (Biedermann et al., 2017). RBR1 also colocalizes with BRCA1 foci upon DNA stress, although RBR1 recruitment to γ H2AX foci was found independent of BRCA1 (Horvath et al., 2017). As shown in mammals, where retinoblastoma physically interacts with the BRCA1 (Aprelikova et al., 1999), RBR1 also directly interacts with BRCA1 in plants (Horvath et al., 2017), suggesting a structural role of retinoblastoma-related proteins in the DDR machinery. Our observation that FBL17 and RBR1 colocalize in nuclear foci after DNA damage generating DSBs suggests that the F-box protein directly participates in the process of DNA repair. Since FBL17 association with γ H2AX seems to depend on RBR1, it is possible that the latter recruits FBL17 at the DNA damage sites in a dynamic manner. This raises the question of which proteins might be ubiquitinated by FBL17 at the sites of DNA lesions.

In mammalian cells, DSB repair implies a complex interplay between ubiquitylation and SUMOylation for faithful repair of such damage (Schwertman et al., 2016). In particular, it has been shown that ubiquitylation of proteins in the vicinity of DNA lesions functions as a recruitment signal for DSB repair factors. Ubiquitylation and deubiquitylation cycles also control the steady-state level of DSB repair factors and/or their interactions. Of particular interest for our study is the mammalian F-box protein Skp2. Whereas Skp2 is a main regulator of the cell cycle (Frescas and Pagano, 2008; Starostina and Kipreos, 2012), it has also been involved in DDR. Thus, it was shown that Skp2 is required for the activation and recruitment of the ATM kinase to DNA damage foci (Wu et al., 2012). At the molecular level, in response to DSBs, Skp2 triggers the K63-dependent ubiquitylation of NBS1, a component of the MRN complex, which in turn facilitates ATM recruitment to DNA foci for activation. Skp2 also ubiquitylates other proteins at DSBs, such as BRCA1, which

FBL17 Is a Regulator of DNA-Damage Response

is important for the timing of end resection (Parameswaran et al., 2015). Similar to Skp2, the Arabidopsis FBL17 F-box protein is able to degrade CKI proteins (Noir et al., 2015 and references therein), but whether it also ubiquitylates components of the DNA repair machinery is presently unknown. Note that at the DNA damage sites, RBR1 itself and/or E2FA are also possible candidate substrates of the SCF^{FBL17} ubiquitin E3 ligase. Therefore, further experiments will be necessary to elucidate the function of this plant F-box protein at DSB sites.

MATERIALS AND METHODS

Plant Material

The following Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) lines were used in this study: the transfer DNA insertion lines *fb17-1* (Gabi-KAT_170-E02; Noir et al., 2015), *atm-2* (SALK_006953; Garcia et al., 2003), the EMS mutant line *sog1-1* (Yoshiyama et al., 2009), and the Arabidopsis reporter and/or over-expressor lines *fb17-1*, pFBL17:FBL17-GFP, 35S:FBL17-GFP, and GFP-KRP2OE described in Noir et al. (2015). Transfer DNA insertions and mutations were confirmed by PCR-based genotyping and by further sequencing for the *sog1-1* allele. The *fb17-1 sog1-1* double mutant was generated by performing crosses and genotyping/sequencing of the resulting F₂ and/or F₃ progenies by PCR-based approaches. Primers designed for this purpose are listed in Supplemental Table S10.

Plant Growth Conditions

For in vitro growth conditions, seed sterilization, stratification, and in vitro culture were performed as described previously (Noir et al., 2015) with or without a supplemented genotoxic agent. To obtain flowering plants and seeds, seedlings initially grown under in vitro culture were transferred onto soil at days 6 to 8 and kept in 16-h light/8-h dark growth chambers under fluorescent light (49W/965, Osram Biolux).

For monitoring of root growth, seedlings were germinated and grown in vitro on vertical plates using 1% (w/v) Murashige and Skoog agar medium and transferred at day 5 to 1% (w/v) Murashige and Skoog agar medium with or without 5 μ M zeocin (Invitrogen). Root elongation was scored each day for 7 d and root length was measured using Fiji software (ImageJ 1.52p; <http://imagej.nih.gov/ij>). The final values were calculated using R software (version 3.6.1) to determine the arithmetic mean of the root length values of three biological replicates, which were themselves the average of 4 to 37 plants.

RT-qPCR

Purification of total RNA from 8-d-old seedlings grown under in vitro conditions was performed using Tri-Reagent (Molecular Research Center) according to the manufacturer's instructions. Complementary DNAs (cDNAs) were prepared using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). qPCR was performed using gene-specific primers and SYBR Green Master Mix (Roche) on a LightCycler LC480 apparatus (Roche) according to the manufacturer's instructions. The mean value of three replicates was normalized using the *TIP4.1* (AT4G34270) and *SAND* (AT2G28390) genes as internal controls. All primers used in RT-qPCR analyses are listed in Supplemental Table S10.

Nucleic Acid Isolation, cDNA Library Preparation, Sequencing, and Data Analysis

Total RNA was extracted using Trizol solution (Invitrogen) from 10-d-old *fb17-1* and Col-0 seedlings grown in vitro, with extraction performed as described above and completed by a second phenol/chloroform treatment. Three biological replicates were used as starting material. RNA concentrations were determined with a QuBit Fluorometer (Thermo Fisher Scientific). RNA integrities were checked using the 2100 Bioanalyzer (Agilent). mRNA was isolated

from total RNA using the NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB) for mRNA library preparation. Sequencing libraries were prepared using the Colibri stranded RNA library kit for Illumina (Invitrogen). The libraries were sequenced using an Illumina Nextseq 500 system (single-end mode 1 \times 75 bp). RNA-seq data have been deposited in the ArrayExpress database at EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) under accession number E-MTAB-9050.

For the bioinformatics analysis, the preprocessing of the sequencing data were performed using TrimGalore (v0.5.0; https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore); reads were processed by removing the Illumina adaptor sequences using Cutadapt v1.18 and quality was assessed using FastQC v0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). The reads with quality >30 and minimal read length of 50 pb were kept. The data were mapped to the Arabidopsis genome (TAIR10) using Hisat2 (v2.1.0) software (Kim et al., 2015) and sorted with Samtools v1.9 (Li et al., 2009). For each gene, read quantification was performed using HTSeq-count v0.11.0 software (with the parameter "intersection nonempty"; Anders et al., 2015). Differential expression analysis by pairwise comparison was performed using the R package DESeq2 (v1.24.0; Anders and Huber, 2010) and the betaprior parameter set to true. GO and KEGG enrichment analysis were performed using ShinyGo v0.61 software (Ge et al., 2019).

Immunolabeling

Fixation and immunostaining were performed as previously described (Batzenschlager et al., 2015) using 6-d-old in vitro grown seedlings. The primary antibodies used were the rabbit polyclonal anti- γ H2AX (diluted at 1:500; Davids biotechnologie) against the synthetic phosphopeptide VGKNKGDIG-SA(p)SQGEF as described in Friesner et al. (2005), mouse monoclonal anti-GFP (1:500; Life Technologies), and chicken polyclonal anti-RBR1 (1:7,000; Agrisera). Depending on the experiments, the conjugated secondary antibodies for γ H2AX detection were either the goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 (1:300; Life Technologies) for red signals or the goat anti-rabbit Cyn5 (1:500; Life Technologies) for purple signals. For GFP and RBR1 detection, the conjugated secondary antibodies used were, respectively, goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (1:200; Interchim) for the green signal and goat anti-chicken Alexa Fluor 568 (1:300; Life Technologies) for the red signal.

Confocal Microscopy Analyses and Image Treatments

All confocal microscopy observations were performed using the Leica TCS SP8 microscope. Roots of seedlings expressing fluorescent reporter constructs were observed after treatment with 20 μ M zeocin (Invitrogen), 15 μ M cisplatin (Sigma), or 5 mM HU (Sigma), or after transfer to standard conditions for 16 h, and just before observation were counterstained in 75 mg mL⁻¹ propidium iodide (Fluka). To score cell death, 8-d-old seedlings not treated or treated for 3 d with 5 μ M zeocin were stained as described previously (Biedermann et al., 2017). Dead cell quantification was performed at the quiescent center (QC) plan considering a fixed area of 15,000 μ m² (200 μ m length long, from the QC toward the elongation zone, and 75 μ m wide) using Fiji software (ImageJ 1.52p; <http://imagej.nih.gov/ij>). The final values were calculated by determining the arithmetic mean of three biological replicates (4 < N per genotype < 11) using R software (v3.6.1). For immunolabeling imaging, confocal images of fixed nuclei were taken as a consecutive series along the z axis. Microscope settings were kept the same for image acquisition of each genotype and/or condition, and signal colocalization was evaluated using Fiji software.

Accession Numbers

Gene data from this article can be found in The Arabidopsis Information Resource database (www.arabidopsis.org) under accession numbers: AT1G02970 (*WEE1*), AT1G07370 (*PCNA1*), AT1G07745 (*RAD51D*), AT1G08130 (*LIG1*), AT1G08260 (*TIL1*), AT1G08260.1 (*POL2A*), AT1G16970 (*KU70*), AT1G25580 (*SOG1*), AT1G31280 (*AGO2*), AT1G48050 (*KU80*), AT1G48360 (*FAN1*), AT1G51130 (*NSE4A*), AT1G80420 (*XRCC1*), AT2G28390 (*SAND*), AT2G34920 (*EDA18*), AT3G13380 (*BRL3*), AT3G19150 (*KRP6*), AT3G20475 (*MSH5*), AT3G27060 (*TSO2*), AT3G27630 (*SMR7*), AT3G48190 (*ATM*), AT3G52115 (*GR1*), AT3G54180 (*CDKB1;1*), AT3G54650 (*FBL17*), AT4G02390 (*PARP2*), AT4G09140 (*MLH1*), AT4G17380 (*MSH4*), AT4G19130 (*RPA1E*), AT4G21070 (*BRCA1*), AT4G34270 (*TIP41*), AT4G37490 (*CYCB1;1*), AT5G14930 (*SAG101*), AT5G20850 (*RAD51A*), AT5G24280 (*GMI1*), AT5G40820 (*ATR*), AT5G41150 (*UVH1*), AT5G45400 (*RPA70C*), AT5G46740 (*UBP21*), AT5G48720.02

Gentric et al.

(XRI1), AT5G49520 (WRKY48), AT5G57160 (LIG4), AT5G58760 (DDB2), AT5G66130 (RAD17), and AtT5G40840.2 (SYN2).

SUPPLEMENTAL DATA

The following supplemental materials are available.

Supplemental Figure S1. Details of the GO functional analysis of DEGs in *fb17* exhibiting a log₂FC absolute value >1.5 (i.e. 1,443 genes; see Fig. 1B).

Supplemental Figure S2. Gene expression analysis under standard conditions and after zeocin treatment.

Supplemental Figure S3. The *fb17-1 sog1-1* double mutant exhibits the same phenotype as the *fb17* single mutant.

Supplemental Figure S4. FBL17-GFP reporter lines exhibit the same sensitivity as Col-0 under zeocin treatment.

Supplemental Table S1. Set of genes differentially regulated in *fb17-1* seedlings compared with Col-0 plants (i.e. 6,804 DEGs).

Supplemental Table S2. GO enrichment analysis of all DEGs in *fb17* compared to Col-0 (i.e. 6,804 DEGs).

Supplemental Table S3. KEGG pathway enrichment analysis based on DEGs in *fb17* compared to Col-0 (log₂FC absolute value >1.5; i.e. 1,443 genes).

Supplemental Table S4. Statistical significance for Figure 4A, regarding the root length of *fb17-1* and *fb17-1 sog1-1* under standard conditions (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

Supplemental Table S5. Statistical significance for Figure 4A, regarding the root length of *fb17-1* and *fb17-1 sog1-1* under zeocin conditions (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

Supplemental Table S6. Statistical significance for Figure 4B, root length inhibition (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

Supplemental Table S7. Statistical significance table for Figure 4D, cell death quantification (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

Supplemental Table S8. Statistical significance analysis of the FBL17-, RBR1-, and γH2AX-signal colocalization (Pearson's coefficient and Manders' coefficient).

Supplemental Table S9. Frequency of nuclei showing γH2AX, RBR1, and/or FBL17 foci compared to the total number of nuclei with foci, and frequency of foci showing γH2AX, RBR1, and/or FBL17 foci compared to the total number of foci.

Supplemental Table S10. Primer combinations used for genotyping and RT-qPCR analyses.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jérôme Mutterer (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Microscopy and Cellular Imaging platform) for confocal microscopy support; Sandrine Koehler and Abdelmalek Alioua (Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Gene Expression Analysis platform), and Anne Molitor, Antoine Hanauer, and Raphael Carapito (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, GENOMAX platform, UMRS_1109) for Next-Generation Sequencing experiments.

Received February 21, 2020; accepted May 5, 2020; published May 15, 2020.

LITERATURE CITED

- Adachi S, Minamisawa K, Okushima Y, Inagaki S, Yoshiyama K, Kondou Y, Kaminuma E, Kawashima M, Toyoda T, Matsui M, et al (2011) Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 10004–10009
- Amiard S, Gallego ME, White C (2013) Signaling of double strand breaks and deprotected telomeres in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* **4**: 405
- Anders S, Huber W (2010) Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**: R106
- Anders S, Pyl PT, Huber W (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**: 166–169
- Aprelikova ON, Fang BS, Meissner EG, Cotter S, Campbell M, Kuthiala A, Bessho M, Jensen RA, Liu ET (1999) BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 11866–11871
- Batzenschlager M, Lermontova I, Schubert V, Fuchs J, Berr A, Koini MA, Houlne G, Herzog E, Rutten T, Alioua A, et al (2015) *Arabidopsis* MZT1 homologs GIP1 and GIP2 are essential for centromere architecture. *Proc Natl Acad Sci USA* **112**: 8656–8660
- Biedermann S, Harashima H, Chen P, Heese M, Bouyer D, Sofroni K, Schnittger A (2017) The retinoblastoma homolog RBR1 mediates localization of the repair protein RAD51 to DNA lesions in *Arabidopsis*. *EMBO J* **36**: 1279–1297
- Bourbousse C, Vegesna N, Law JA (2018) SOG1 activator and MYB3R repressors regulate a complex DNA damage network in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **115**: E12453–E12462
- Bouyer D, Heese M, Chen P, Harashima H, Roudier F, Grüttnner C, Schnittger A (2018) Genome-wide identification of RETINOBLASTOMA RELATED 1 binding sites in *Arabidopsis* reveals novel DNA damage regulators. *PLoS Genet* **14**: e1007797
- Cools T, De Veylder L (2009) DNA stress checkpoint control and plant development. *Curr Opin Plant Biol* **12**: 23–28
- Culligan KM, Robertson CE, Foreman J, Doerner P, Britt AB (2006) ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J* **48**: 947–961
- Denicourt C, Dowdy SF (2004) Cip/Kip proteins: More than just CDK inhibitors. *Genes Dev* **18**: 851–855
- Desvoves B, Noir S, Masoud K, Lopez MI, Genschik P, Gutierrez C (2019) FBL17 targets CDT1a for degradation in early S-phase to prevent *Arabidopsis* genome instability. *bioRxiv* 774109
- Dickey JS, Redon CE, Nakamura AJ, Baird BJ, Sedelnikova OA, Bonner WM (2009) H2AX: Functional roles and potential applications. *Chromosoma* **118**: 683–692
- Feldman RMR, Correll CC, Kaplan KB, Deshaies RJ (1997) A complex of Cdc4p, Skp1p, and Cdc53p/cullin catalyzes ubiquitination of the phosphorylated CDK inhibitor Sic1p. *Cell* **91**: 221–230
- Frescas D, Pagano M (2008) Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and β-TrCP: Tipping the scales of cancer. *Nat Rev Cancer* **8**: 438–449
- Friesner JD, Liu B, Culligan K, Britt AB (2005) Ionizing radiation-dependent γ-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Mol Biol Cell* **16**: 2566–2576
- Fulcher N, Sablowski R (2009) Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 20984–20988
- Furukawa T, Curtis MJ, Tominey CM, Duong YH, Wilcox BWL, Aggoune D, Hays JB, Britt AB (2010) A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair (Amst)* **9**: 940–948
- Garcia V, Bruchet H, Camescasse D, Granier F, Bouchez D, Tissier A (2003) ATR is essential for meiosis and the somatic response to DNA damage in plants. *Plant Cell* **15**: 119–132
- Ge SX, Jung D, Yao R (2019) ShinyGO: A graphical gene-set enrichment tool for animals and plants. *Bioinformatics* **36**: 2628–2629
- Gusti A, Baumberger N, Nowack M, Pusch S, Eisler H, Potuschak T, De Veylder L, Schnittger A, Genschik P (2009) The *Arabidopsis thaliana* F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development. *PLoS One* **4**: e4780
- Horvath BM, Kourova H, Nagy S, Nemeth E, Magyar Z, Papdi C, Ahmad Z, Sanchez-Perez GF, Perilli S, Biliou I, et al (2017) *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO J* **36**: 1261–1278
- Hu Z, Cools T, De Veylder L (2016) Mechanisms used by plants to cope with DNA damage. *Annu Rev Plant Biol* **67**: 439–462
- Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K (2017) KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res* **45**(D1): D353–D361
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL (2015) HISAT: A fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods* **12**: 357–360

FBL17 Is a Regulator of DNA-Damage Response

- Kim HJ, Oh SA, Brownfield L, Hong SH, Ryu H, Hwang I, Twell D, Nam HG (2008) Control of plant germline proliferation by SCF FBL17 degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* 455: 1134–1137
- Lang J, Smetana O, Sanchez-Calderon L, Lincker F, Genestier J, Schmit AC, Houlne G, Chabouté ME (2012) Plant γ H2AX foci are required for proper DNA DSB repair responses and colocalize with E2F factors. *New Phytol* 194: 353–363
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R; 1000 Genome Project Data Processing Subgroup (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25: 2078–2079
- Malumbres M, Barbacid M (2005) Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30: 630–641
- Menges M, de Jager SM, Gruijssem W, Murray JAH (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41: 546–566
- Nisa MU, Huang Y, Benhamed M, Raynaud C (2019) The plant DNA damage response: Signaling pathways leading to growth inhibition and putative role in response to stress conditions. *Front Plant Sci* 10: 653
- Noir S, Marrocco K, Masoud K, Thomann A, Gusti A, Bitrian M, Schnittger A, Genschik P (2015) The control of *Arabidopsis thaliana* growth by cell proliferation and endoreplication requires the F-box protein FBL17. *Plant Cell* 27: 1461–1476
- Nowack MK, Harashima H, Dissmeyer N, Zhao X, Bouyer D, Weimer AK, De Winter F, Yang F, Schnittger A (2012) Genetic framework of cyclin-dependent kinase function in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 22: 1030–1040
- Nurse P (2000) A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 100: 71–78
- Ogita N, Okushima Y, Tokizawa M, Yamamoto YY, Tanaka M, Seki M, Makita Y, Matsui M, Okamoto-Yoshiyama K, Sakamoto T, et al (2018) Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in *Arabidopsis*. *Plant J* 94: 439–453
- Parameswaran B, Chiang HC, Lu Y, Coates J, Deng CX, Baer R, Lin HK, Li R, Paull TT, Hu Y (2015) Damage-induced BRCA1 phosphorylation by Chk2 contributes to the timing of end resection. *Cell Cycle* 14: 437–448
- Preuss SB, Britt AB (2003) A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics* 164: 323–334
- Roa H, Lang J, Culligan KM, Keller M, Holec S, Cognat V, Montané MH, Houlne G, Chabouté ME (2009) Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 151: 461–471
- Schwertman P, Bekker-Jensen S, Mailand N (2016) Regulation of DNA double-strand break repair by ubiquitin and ubiquitin-like modifiers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 379–394
- Schwob E, Böhm T, Mendenhall MD, Nasmyth K (1994) The B-type cyclin kinase inhibitor p40^{SIC1} controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79: 233–244
- Sjogren CA, Bolaris SC, Larsen PB (2015) Aluminum-dependent terminal differentiation of the *Arabidopsis* root tip is mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-regulated transcriptional response. *Plant Cell* 27: 2501–2515
- Spampinato CP (2017) Protecting DNA from errors and damage: An overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals. *Cell Mol Life Sci* 74: 1693–1709
- Starostina NG, Kipreos ET (2012) Multiple degradation pathways regulate versatile CIP/KIP CDK inhibitors. *Trends Cell Biol* 22: 33–41
- Syed A, Tainer JA (2018) The MRE11-RAD50-NBS1 complex conducts the orchestration of damage signaling and outcomes to stress in DNA replication and repair. *Annu Rev Biochem* 87: 263–294
- Trolet A, Baldrich P, Criqui M-C, Dubois M, Clavel M, Meyers BC, Genschik P (2019) Cell cycle-dependent regulation and function of ARGONAUTE1 in plants. *Plant Cell* 31: 1734–1750
- Verkest A, Abeel T, Heyndrickx KS, Van Leene J, Lanz C, Van De Slijke E, De Winne N, Eeckhout D, Persiau G, Van Breusegem F, et al (2014) A generic tool for transcription factor target gene discovery in *Arabidopsis* cell suspension cultures based on tandem chromatin affinity purification. *Plant Physiol* 164: 1122–1133
- Verkest A, Manes C-L, Vercruysse S, Maes S, Van Der Schueren E, Beeckman T, Genschik P, Kuiper M, Inzé D, De Veylder L (2005) The cyclin-dependent kinase inhibitor KRP2 controls the onset of the endoreduplication cycle during *Arabidopsis* leaf development through inhibition of mitotic CDKA₁ kinase complexes. *Plant Cell* 17: 1723–1736
- De Veylder L, Beeckman T, Inzé D (2007) The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 655–665
- Weimer AK, Biedermann S, Harashima H, Roodbarkelari F, Takahashi N, Foreman J, Guan Y, Pochon G, Heese M, Van Damme D, et al (2016) The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in *Arabidopsis*. *EMBO J* 35: 2068–2086
- Wu J, Zhang X, Zhang L, Wu CY, Rezaeian AH, Chan CH, Li JM, Wang J, Gao Y, Han F, et al (2012) Skp2 E3 ligase integrates ATM activation and homologous recombination repair by ubiquitinating NBS1. *Mol Cell* 46: 351–361
- Yi D, Alvim Kamei CL, Cools T, Vanderauwera S, Takahashi N, Okushima Y, Eeckhout T, Yoshiyama K, Larkin J, Van den Daele H, et al (2014) The *Arabidopsis* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell* 26: 296–309
- Yoshiyama K, Conklin P, Huefner ND, Britt AB (2009) Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 12843–12848
- Yoshiyama KO (2016) SOG1: A master regulator of the DNA damage response in plants. *Genes Genet Syst* 90: 209–216
- Yoshiyama KO, Kobayashi J, Ogita N, Ueda M, Kimura S, Maki H, Umeda M (2013) ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in *Arabidopsis*. *EMBO Rep* 14: 817–822
- Zhao X, Harashima H, Dissmeyer N, Pusch S, Weimer AK, Bramsiepe J, Bouyer D, Rademacher S, Nowack MK, Novak B, et al (2012) A general G1/S-phase cell-cycle control module in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 8: e1002847

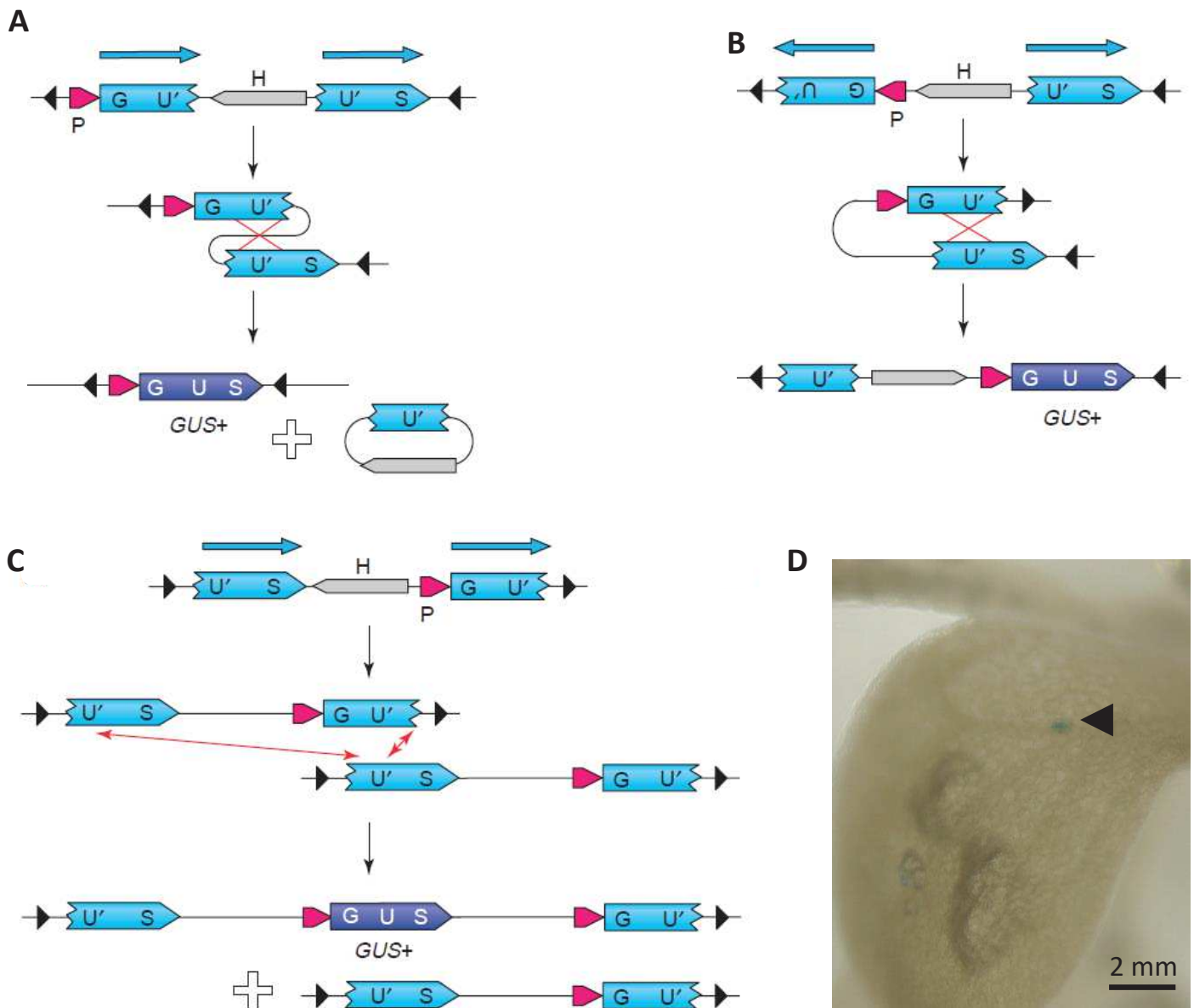


Figure 2.2.1: Lignées rapportrices des recombinaisons homologues somatiques (SHR)

Représentation schématique des réactions HR, intramoléculaire entre les répétitions U du gène de la β -glucuronidase (*GUS*) dans un sens identique (**A** ; lignée 1406) ou inversé (**B** ; lignée 1445), et intermoléculaire (**C** ; IC1, IC6 et IC9). Les évènements de HR restaurent le gène *GUS* (*GUS+*). P représente le promoteur 35S et H le gène de résistance à l'hygromycine. Figure issue de Schuermann et al., (2005). (**D**) Restauration de l'expression du gène de la B-glucuronidase de la lignée 1406 dans le fond mutant *fb17*. La flèche noire met en évidence une cellule de feuille ayant subi une recombinaison homologue somatique (SHR) entraînant la restauration du gène *GUS*, après révélation en présence de X-Gluc.

I Le mutant *fb17* présente une DDR constitutive

Afin de comprendre les phénotypes liés à la perte de FBL17 (i.e une réduction de la taille des feuilles, l'apparence dentelée des feuilles et la stérilité ; Noir et al., 2015), une étude de RNAseq a été réalisée chez le mutant *fb17* (Gentric et al., 2020). Cette dernière a révélé que près de 25% du transcriptome total de *fb17* présente des gènes différentiellement exprimés. En sélectionnant ceux présentant un \log_2FC d'une valeur absolue $> 1,5$, nous avons mis en évidence l'implication de ces gènes dans la réponse aux stress et la réparation de l'ADN (59%), dans la progression du cycle cellulaire (10%), dans les mécanismes de réplication de l'ADN (10,5%) et dans la dynamique des chromosomes (18%). En plus d'une induction constitutive des gènes de la DDR, le mutant *fb17* présente aussi des phénotypes forts tels qu'une hypersensibilité aux stress génotoxiques et une augmentation du nombre de lésions au niveau de l'ADN. De plus, cette DDR constitutive observée chez le mutant *fb17* est indépendante du facteur de transcription SOG1, bien qu'il soit le régulateur central de la réponse aux stress génotoxiques chez *Arabidopsis* (Yoshiyama, 2015; Ogita et al., 2018; Bourbousse et al., 2018). Ces données montrent que dans la DDR, la protéine FBL17 est nécessaire au maintien de l'intégrité génétique des cellules de façon SOG1-indépendante.

Afin de comprendre les causes moléculaires des phénotypes de DDR constitutive, la caractérisation du mutant *fb17* est encore en cours. Les deux parties présentées ci-dessous, non publiées dans Gentric et al., (2020), permettent 1- de caractériser la DDR constitutive *via* les événements de recombinaison homologue et 2- d'étudier d'autres candidats responsables de cette DDR.

I.A Caractérisation des lésions de l'ADN par détection des événements de recombinaison homologue

Chez les plantes, la réparation des DSB de l'ADN dans les cellules somatiques est principalement réalisée par la voie NHEJ. Il a été montré que la fréquence des recombinaisons homologues somatiques (SHR) augmente en réponse aux dommages à l'ADN (pour revue Puchta, 2005). Ces dernières années, l'utilisation des lignées rapportrices SHR a permis d'étudier la fréquence d'apparition de ces recombinaisons chez différents mutants ou en présence de stress génotoxiques (Puchta et Hohn, 2012). Ces lignées sont composées du gène

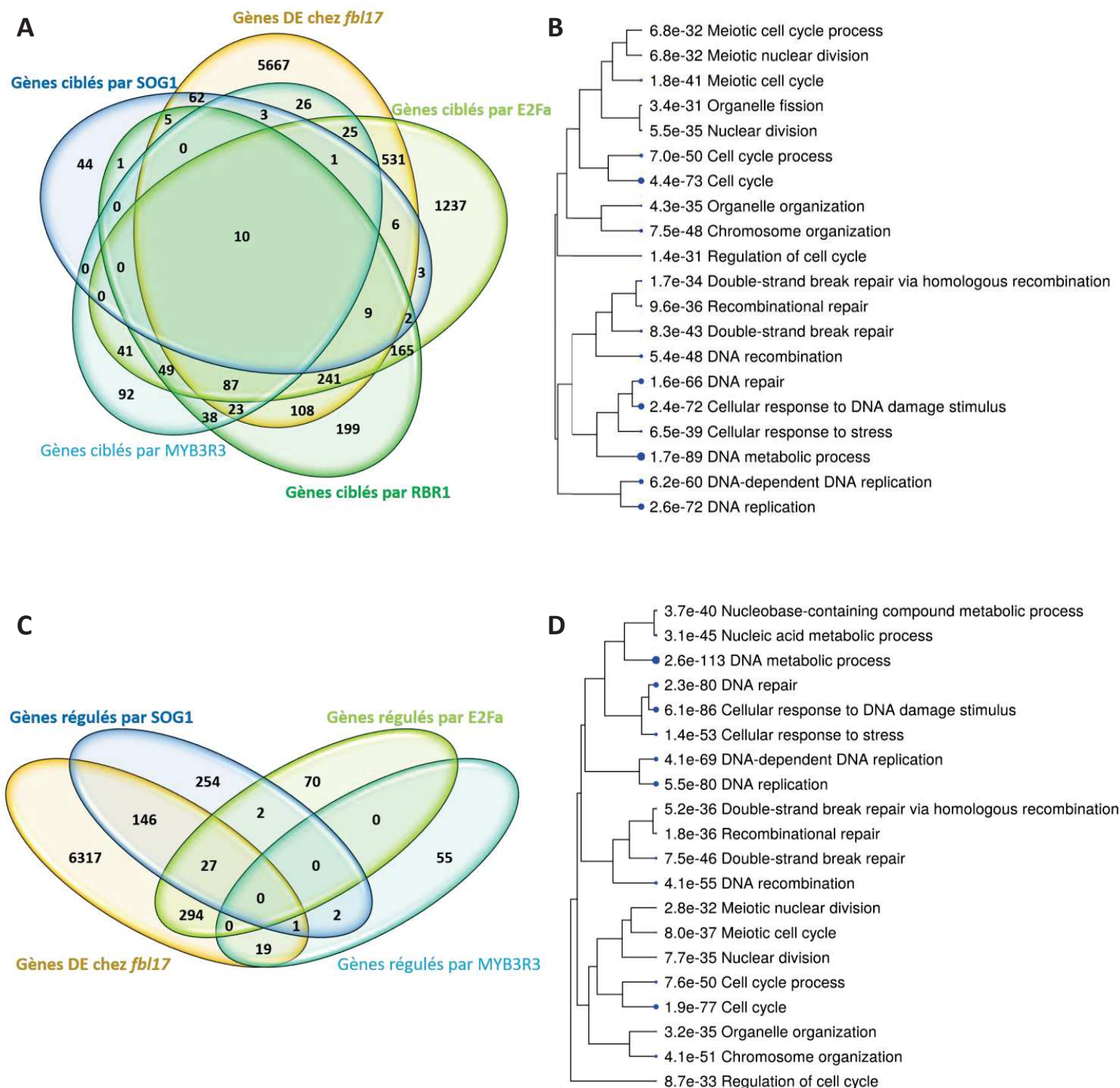


Figure 2.2.2: Les 6804 gènes différentiellement exprimés dans *fb17* sont ciblés par RBR1 et les facteurs de transcription E2Fa, MYB3R3 et SOG1.

(A) Diagramme de Venn présentant la répartition des 6804 gènes différentiellement exprimés (DE) à chez *fb17* qui sont ciblés par RBR1 et les facteurs de transcription E2FA, MYB3R3 et SOG1. **(B)** Analyse de l'ontologie des 1137 gènes (GO) DE chez *fb17* et ciblés par RBR1 et les facteurs de transcription E2Fa, MYB3R3 et SOG1. **(C)** Diagramme de Venn présentant la répartition des 6804 gènes DE chez *fb17* qui sont régulés par les facteurs de transcription E2Fa, MYB3R3 et SOG1. **(D)** Analyse de l'ontologie des 487 gènes DE chez *fb17* et régulés par les facteurs de transcription E2Fa, MYB3R3 et SOG1. **(B)** et **(D)** L'analyse de l'enrichissement des GO est basée sur des catégories de fonction de processus biologiques du logiciel ShinyGO v0.61. Les 30 enrichissements les plus significatifs sont montrés en utilisant un regroupement hiérarchique résumant la corrélation des gènes partagés entre les différentes voies. Plus les points bleus sont gros plus la p-value est petite.

de la β -glucuronidase (*GUS*) tronqué en deux parties superposables. Lors d'un évènement de SHR, le gène *GUS* est restauré et permet la visualisation des cellules ayant subi cet évènement *via* l'apparition de points bleus (Figure 2.2.1 ; Orel et al., 2003; Schuermann et al., 2009). Ces différentes lignées se distinguent par l'orientation des parties tronquées du gène *GUS* permettant d'étudier les recombinaisons intramoléculaires (lignée 1406 et 1445 ; Gherbi et al., 2001; Schuermann et al., 2009; Gao et al., 2012), mais aussi les recombinaisons intermoléculaires (lignées IC1, IC6 et IC9 ; Molinier et al., 2004).

Le mutant *fb17* présentant une forte accumulation de lésions à l'ADN (Gentric et al., 2020), nous avons souhaité quantifier la réparation des cassures *via* les recombinaisons homologues au sein de ce mutant. Pour cela, le mutant *fb17* a été croisé avec différentes lignées SHR, citées ci-dessus, afin d'étudier l'accumulation ou la diminution des événements SHR dans le mutant en présence et en absence de stress génotoxiques (Tableau 2.1.5). A ce stade, bien que les lignées aient été générées, la fréquence des événements de SHR dans le fond mutant *fb17* n'a pas encore été évaluée.

I.B Contribution de E2Fa et des composants du complexe DREAM dans les phénotypes du mutant *fb17*

D'un point de vue transcriptionnel, la caractérisation, chez *Arabidopsis thaliana*, des composants des complexes DREAM ces dernières années grâce à des analyses CHIP et TChAP, a permis d'explorer d'une part, les promoteurs des gènes ciblés par ces composants, à savoir 937 pour RBR1, 2407 pour E2Fa et 394 pour MYB3R3 (Verkest et al., 2014; Kobayashi et al., 2015b; Bouyer et al., 2018a), et d'autre part, les gènes directement régulés, à savoir 393 pour E2Fa et 77 pour MYB3R3. A ce jour, aucune analyse n'a été réalisée sur les gènes ciblés par les autres facteurs de transcription E2Fb et E2Fc. Puisqu'il est communément admis que ces facteurs de transcription reconnaissent la même séquence promotrice TTT(C/G)(C/G)CGC, ciblant les mêmes gènes, l'utilisation de ces données nous permet d'envisager l'importance des facteurs E2F. Sur les 6804 gènes différentiellement exprimés (DE) chez *fb17*, 13,37% sont ciblés par E2Fa dont 4,72% sont directement régulés par ce TF, 2,57% sont ciblés par MYB3R3 dont 0,29% régulés, et 7,10% sont ciblés par RBR1 contre seulement 1,41% ciblés par le facteur de transcription SOG1 dont 2,56% gènes régulés (directement ou indirectement) par lui (Figure 2.2.2-A&C). Ces gènes sont principalement impliqués dans le processus de réplication,

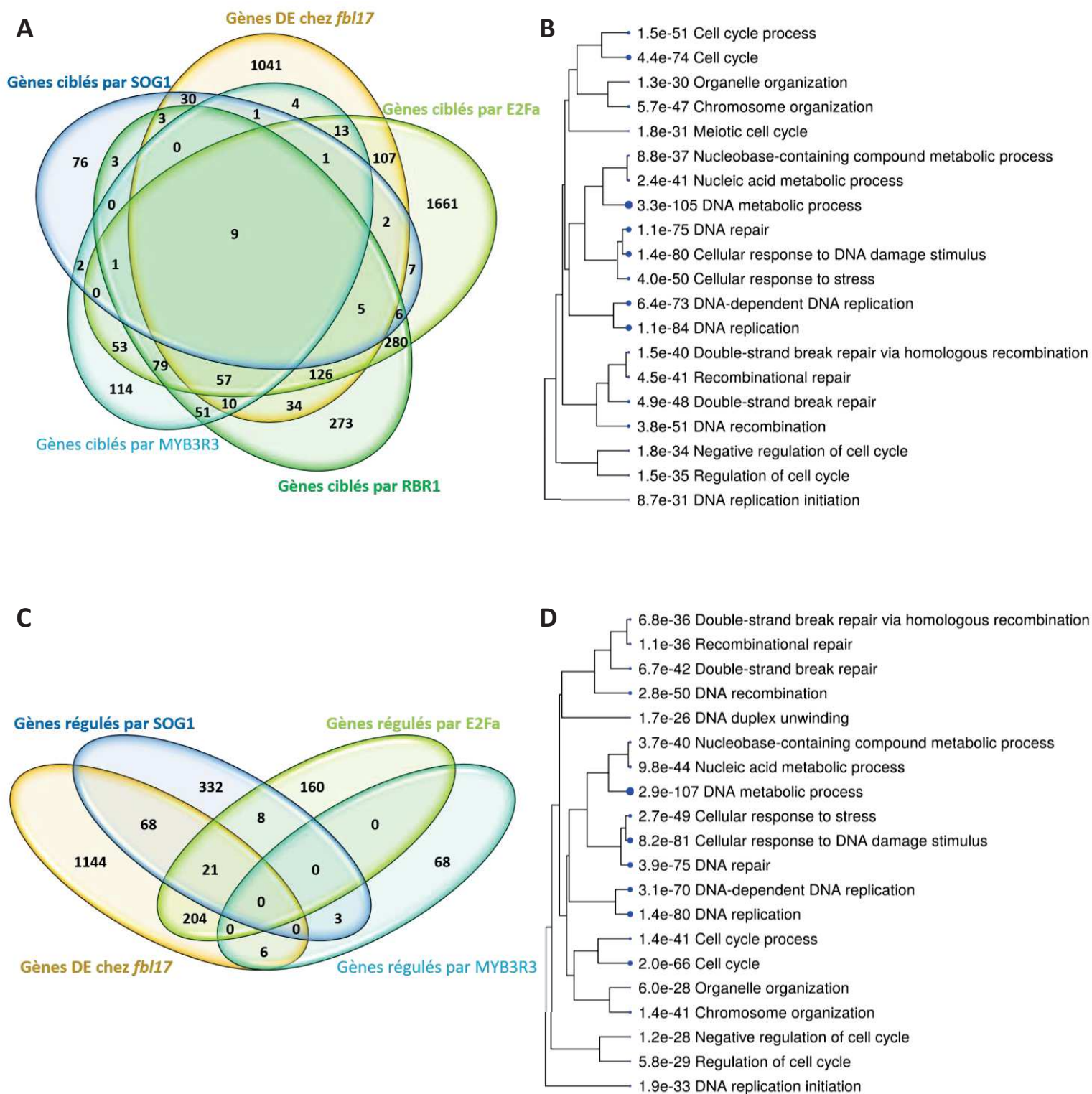


Figure 2.2.3: Les 1443 gènes différentiellement exprimés dans *fb17* ($\text{LogFC} > 1,5$) sont ciblés par RBR1 et les facteurs de transcription E2Fa, MYB3R3 et SOG1.

(A) Diagramme de Venn présentant la répartition des 1443 gènes différentiellement exprimés (DE) chez *fb17* avec un $\text{log}_2\text{FC} > 1,5$ et ciblés par RBR1 et les facteurs de transcription E2FA, MYB3R3 et SOG1. **(B)** Analyse de l'ontologie (GO) des 402 gènes DE chez *fb17* et ciblés par RBR1 et les facteurs de transcription E2Fa, MYB3R3 et SOG1. **(C)** Diagramme de Venn présentant la répartition des 1443 gènes DE chez *fb17* avec un $\text{log}_2\text{FC} > 1,5$ qui sont régulés par les facteurs de transcription E2Fa, MYB3R3 et SOG1. **(D)** Analyse de l'ontologie des 299 gènes DE chez *fb17* et régulés par les facteurs de transcription E2Fa, MYB3R3 et SOG1. **(B)** et **(D)** L'analyse de l'enrichissement des GO est basée sur des catégories de fonction de processus biologiques du logiciel ShinyGO v0.61. Les 30 enrichissements les plus significatifs sont montrés en utilisant un regroupement hiérarchique résumant la corrélation des gènes partagés entre les différentes voies. Plus les points bleus sont gros plus la p-value est petite.

la réparation de l'ADN et la réponse aux stress et la dynamique des chromosomes (Figure 2.2.2-B&D et Annexe 6 et 7). Ces catégories sont celles retrouvées après un filtrage de $\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$ des gènes DE chez le mutant *fb17* (Gentric et al., 2020). Sur les 1443 gènes DE après ce filtrage chez *fb17*, 22,18% sont ciblés par E2Fa dont 15,59% sont régulés par E2Fa, 6,58% sont ciblés par MYB3R3 dont 0,42% régulés et 16,91% sont ciblés par RBR1 contre seulement 3,53% gènes ciblés par SOG1 dont 6,17% régulés par ce facteur de transcription (Figure 2.2.3 et Annexe 8 et 9). Dans Gentric et al., (2020), nous avons mis en évidence que, si l'induction des gènes de la voie DDR est dépendante de SOG1 après un stress génotoxique, l'induction constitutive de ces gènes est, quant à elle, SOG1-indépendante chez le mutant *fb17*. Les analyses *in silico* ci-dessus, montrent que MYB3R3 cible un faible nombre de gènes DE chez *fb17* (i.e. 6,58%), en régule encore moins (i.e. 0,42%), et ne ressort pas dans les analyses IP-MS contrairement à E2Fa, E2Fb et RBR1. Ainsi l'accumulation de ces protéines dans le mutant *fb17* (Figure 2.1.8-C&D) pourrait, du moins en partie, contribuer à l'expression différentielle de près de 25% du génome d'*Arabidopsis* dont près de 59% des gènes concernés sont impliqués dans la réparation de l'ADN et la réponse aux stress chez le mutant (Gentric et al., 2020).

Pour comprendre l'implication de ces acteurs dans la DDR constitutive de *fb17* et puisque seule la mutation *e2fa* a permis l'identification de double mutant homozygote *fb17 e2fa* (Tableau 2.1.5 et Figure 2.1.5), des études transcriptomique et phénotypique ont été réalisées chez ce double mutant.

D'un point de vue transcriptionnel, le mutant *e2fa-2* présente globalement un niveau d'induction des gènes de la DDR similaire aux contrôles Col-0 et KRP2^{OE} (Figure 2.2.4). L'étude des gènes de la voie DDR a permis de mettre en évidence l'induction constitutive de *BRCA1*, *ATR*, *RAD17*, *WEE1*, *RBR1*, *RAD51* et *ZDP* au sein du double mutant *fb17 e2fa*. Cependant, alors que pour *ATR*, *RBR1* et *RAD51* cette induction est comparable à celle observée chez le simple mutant *fb17-1*, chez le double mutant, l'induction des gènes *BRCA1*, *RAD17* et *WEE1* semble atténuée et l'expression du gène *ZDP* est, elle, plus fortement induite (Figure 2.2.4).

Les simples mutants *fb17* et *e2fa* ont chacun été caractérisés pour leur hypersensibilité aux stress génotoxiques chez *Arabidopsis thaliana* (Roa et al., 2009; Biedermann et al., 2017; Gentric et al., 2020). La sensibilité du double mutant *fb17-1 e2fa-2* à un traitement à la Zéocine grâce à un test d'élongation racinaire a été étudiée. Dans les

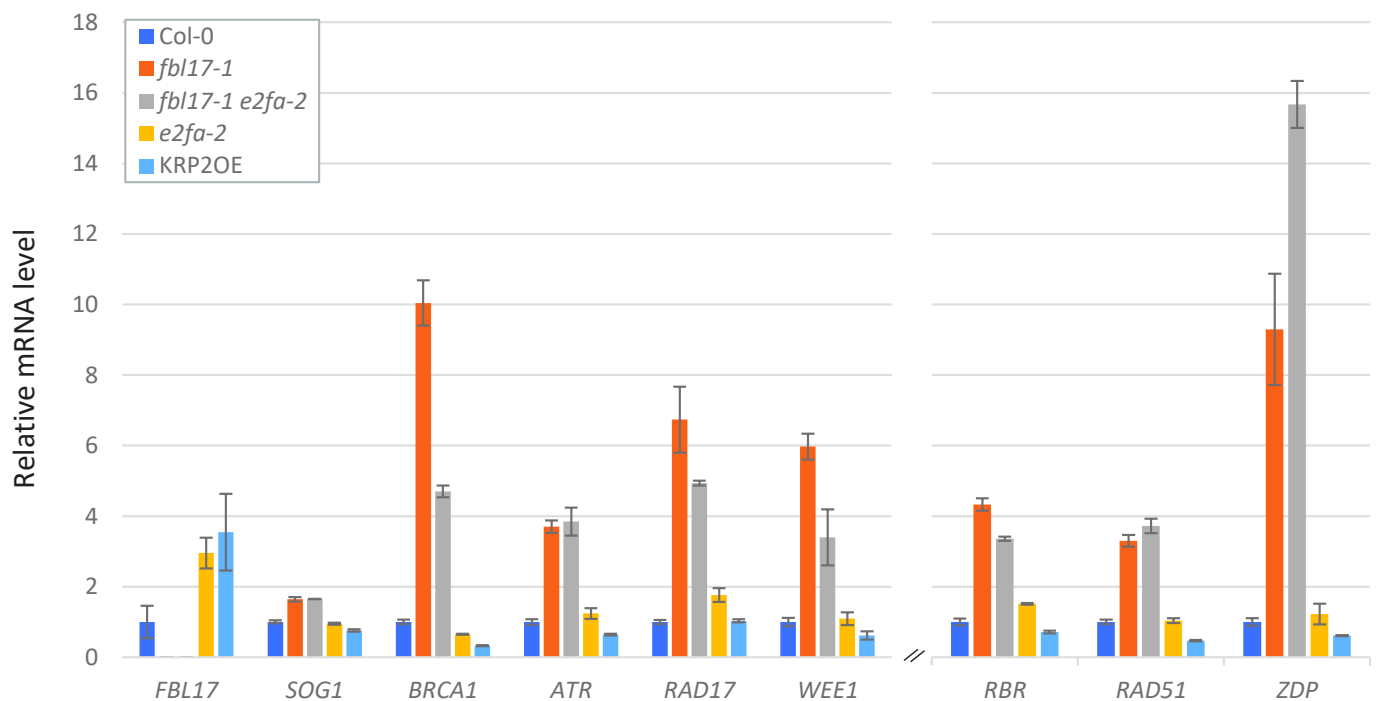


Figure 2.2.4: Niveau d'expression des gènes de la voie DDR chez Col-0, les simples mutants *fbl17* et *e2fa* et le double mutant *fbl17 e2fa*.

Niveaux d'expression relative des gènes chez des plantules de 8 jours cultivées en condition *in vitro* standard, déterminés par RT-qPCR. Les données sont comparées à Col-0 normalisé à 1. Les barres représentent le niveau moyen de transcrits du gène indiqué issus d'un réplica biologique indépendant (les barres d'erreurs représentent la variabilité au sein d'un triplicat technique). L'expérience a été réalisée une seule fois.

conditions utilisées, le simple mutant *e2fa-2* présente une sensibilité au traitement à la Zéocine similaire à celle des contrôles Col-0 et KRP2^{OE} avec un pourcentage d'élongation racinaire d'environ 20% (Figure 2.1.6-A&B). Comme montré précédemment ((Gentric et al., 2020)), l'élongation racinaire du simple mutant *fb17-1* est totalement inhibée après 3 jours sous Zéocine avec une inhibition d'environ 70% (Figure 2.1.6-A&B). Le double mutant *fb17-1 e2fa-2* semble tout aussi affecté avec toutefois un léger retard de l'inhibition de l'élongation racinaire à partir seulement de quatre jours (Figure 2.1.6-A). La barre d'erreur du pourcentage d'inhibition ne nous permet pas de préciser si la différence observée entre le simple et le double mutant est significative (Figure 2.1.6-B).

II Caractérisation des fonctions de FBL17 dans la voie de la

DDR

Lors de stress génotoxique induisant des DSB de l'ADN, FBL17 est recrutée au niveau de *foci* nucléaires où elle co-localise, partiellement avec la protéine γ H2AX, et parfaitement avec la protéine RBR1 (Gentric et al., 2020). Pour comprendre les fonctions moléculaires de la protéine FBL17 en condition de stress génotoxique, différents niveaux d'analyse, présentés ci-dessous, se sont intéressés aux potentiels substrats de FBL17 lors de DSB de l'ADN, à la relation entre FBL17 et RBR1 au niveau des foci nucléaires ainsi qu'à la relation entre FBL17 et certains acteurs centraux de la DDR.

II.A Identification de l'interactome de FBL17 en condition de stress génotoxique

Etant donné le recrutement de FBL17 au niveau des foci γ H2AX, une étude du répertoire des protéines ciblées par FBL17 lors de dommages à l'ADN a été réalisée par IP-MS. Un stress génotoxique, identique à celui utilisé pour observer les foci dans Gentric et al. (2020 ; i.e 16h à 20 μ M Zéocine), a été appliqué sur les plantules 35S:FBL17-GFP et le contrôle 35S:GFP-BPM6 une heure avant l'ajout de MLN. Deux réplicats biologiques ont été effectués, révélant pour ces échantillons, aussi, une différence en nombre de protéines et spectres identifiés de façon significative Tableau 2.2.1.

Tableau 2.2.1: Liste des protéines statistiquement enrichies après immunoprécipitation avec FBL17 (vert) et identifiées par spectrométrie de masse après un traitement à la zéocine.

En vert et en jaune sont représentés les Log de Fold Change (LogFC) des protéines enrichies avec FBL17 et BPM6, respectivement. Un test statistique, par la méthode de Benjamini-Hochberg, a permis d'attribuer une p.value (*probability value*) à chaque protéine identifiée (à partir des trois réplicats techniques) et chaque p.value a subi une correction statistique (adjp ou *adjusted p value*) par une régression binominale négative. Lorsque la p.value et l'adjp sont statistiquement significatives (<0,05), leurs cases sont représentées en gris. La recherche des peptides identifiés dans les banques de données a été réalisée avec l'algorithme Mascot (version 2.5) et la banque TAIR.

FBL17 (zeo) vs BPM6 (zeo)								
IP-MS 1			IP-MS 2			Accession	gene names	Function
LogFC	p.value	adjp	LogFC	p.value	adjp			
11,26	1,16E-284	1,55E-281	10,82	1,39E-138	5,58E-136	AT3G54650.1	FBL17	F-box/LRR-repeat protein 17
7,94	7,20E-30	2,67E-28	6,90	5,85E-15	1,27E-13	AT5G22220.2	E2FB	Transcription factor E2FB
8,12	8,55E-34	4,07E-32	6,87	4,40E-15	9,78E-14	AT3G12280.1	RBR1	Retinoblastoma-related protein 1
3,23	6,18E-19	9,26E-18	6,68	1,52E-12	2,54E-11	AT1G75950.1	SKP1A	SKP1-like protein 1A
4,99	5,27E-05	2,59E-04	5,37	3,78E-06	2,65E-05	AT5G03415.1	DPB	Transcription factor-like protein DPB
3,97	1,76E-19	2,83E-18	5,08	1,12E-12	1,94E-11	AT5G42190.1	SKP1B	SKP1-like protein 1B
2,24	2,75E-11	2,15E-10	4,41	1,04E-03	4,81E-03	AT1G31440.1	SH3P1	SH3 domain-containing protein 1
1,13	2,27E-03	8,85E-03	3,65	1,29E-02	4,71E-02	AT5G22060.1	ATJ2	Chaperone protein dnaJ 2
2,79	2,07E-09	1,41E-08	2,20	3,88E-03	1,64E-02	AT1G47128.1	RD21A	Cysteine proteinase RD21A
3,61	1,47E-02	4,66E-02				AT2G36010.1	E2FA	Transcription factor E2FA
4,16	2,85E-03	1,07E-02				AT5G02470.1	DPA	Transcription factor-like protein DPA
2,72	8,45E-02	1,96E-01				AT1G79930.1	HSP70-14	Heat shock 70 kDa protein 14
1,00	1,17E-01	2,46E-01	-1,11	3,86E-01	6,07E-01	AT1G07790.1	HTB1	Encode a histone 2B (H2B) protein
0,00	1,00E+00	1,00E+00	-1,80	2,67E-01	4,44E-01	AT2G02740.1	WHY3	Single-stranded DNA-binding protein
0,00	1,00E+00	1,00E+00				AT5G44280.1	RING1A	Putative E3 ubiquitin-protein ligase RING1a
-6,407E-16	1,00E+00	1,00E+00				AT4G18060.1	SH3P3	SH3 domain-containing protein 3
0,00	1,00E+00	1,00E+00	4,20	2,37E-03	1,05E-02	AT4G03090.1	NDX	Nodulin homeobox
			1,96	2,13E-01	4,38E-01	AT1G47870.1	E2FC	Transcription factor E2FC

La comparaison FBL17-GFP/GFP-BPM6 a permis de mettre en évidence le maintien de l'enrichissement des protéines RBR1, E2Fb, DPb, SKP1A, SKP1B et RD21A (Figure 2.2.5 et Tableau 2.2.1) alors que HTB1 et WHY3 ne sont plus retrouvées comme enrichies avec FBL17-GFP sous Zéocine (Tableau 2.2.1). La protéine NDX n'est, quant à elle, pas enrichie dans le réplicat 1 mais l'est de façon significative ($\text{adjp} < 0,05$) dans le réplicat 2. De façon intéressante, deux nouvelles protéines, c'est à dire non identifiées dans l'interactome de FBL17 en condition standard (et en comparaison avec l'interactome de BPM6), sont enrichies de façon significative ($\text{adjp} < 0,05$) dans les deux réplicats sous Zéocine : SH3P1 et ATJ2 (Tableau 2.2.1 et Tableau 2.1.3).

Chez Arabidopsis, la famille des protéines SH3P (Sarc Homology 3 Of Plant) est composée de trois membres, SH3P1, SH3P2 et SH3P3, caractérisés pour leur implication dans l'endocytose (Lam et al., 2001, 2002; Kolb et al., 2015). Plus précisément, SH3P1 et SH3P3 sont impliquées dans le trafic de vésicules entourées de clathrin (*trafficking of clathrin-coated vesicles*). La protéine SH3P1 est capable de s'associer avec l'actine, les auxilin (AUXILIN-RELATED PROTEIN-1 Ou AUXILIN-LIKE1) et les clathrin pour réaliser ce trafic (Lam et al., 2001). La protéine SH3P2, quant à elle, a été caractérisée pour son implication dans la formation des plaques cellulaires (*cell plate*) dans les cellules en division *via* son association avec les protéines KNOLLE et DRP1A (DYNAMIN-RELATED PROTEIN 1A ; Ahn et al., 2017), et dans l'assemblage des autophagosomes des cellules qui ne sont pas en division (Zhuang et al., 2013). En plus des protéines mentionnées ci-dessus, SH3P1 est capable de former un complexe avec les protéines SH3P2 et DRP1A (Ahn et al., 2017). Notons que dans notre analyse IP-MS avec FBL17 en condition standard, SH3P3 a été identifiée, mais de façon non significative et SH3P2 n'a pas été détectée (Tableau 2.1.3). De plus, la protéine DRP1A est enrichie de façon significative avec BPM6 dans les 2 réplicats (Tableau 2.1.2 et Tableau 2.1.3). Les protéines SH3P2 et DRP1A n'ayant pas été identifiées dans l'interactome de FBL17, ces résultats laissent supposer que dans les conditions utilisées lors de l'IP-MS, SH3P1 pourrait interagir avec FBL17 seule ou au sein d'un autre complexe que celui qui lui est connu avec les protéines SH3P2 et DRP1A.

Les protéines J (appelées aussi HSP40 ou DnaJ protein) sont des co-chaperonnes impliquées dans la reconnaissance de protéines non-actives et leur transport jusqu'aux protéines chaperonnes HSP70. Elles permettent alors l'activation des HSP70 (passage de

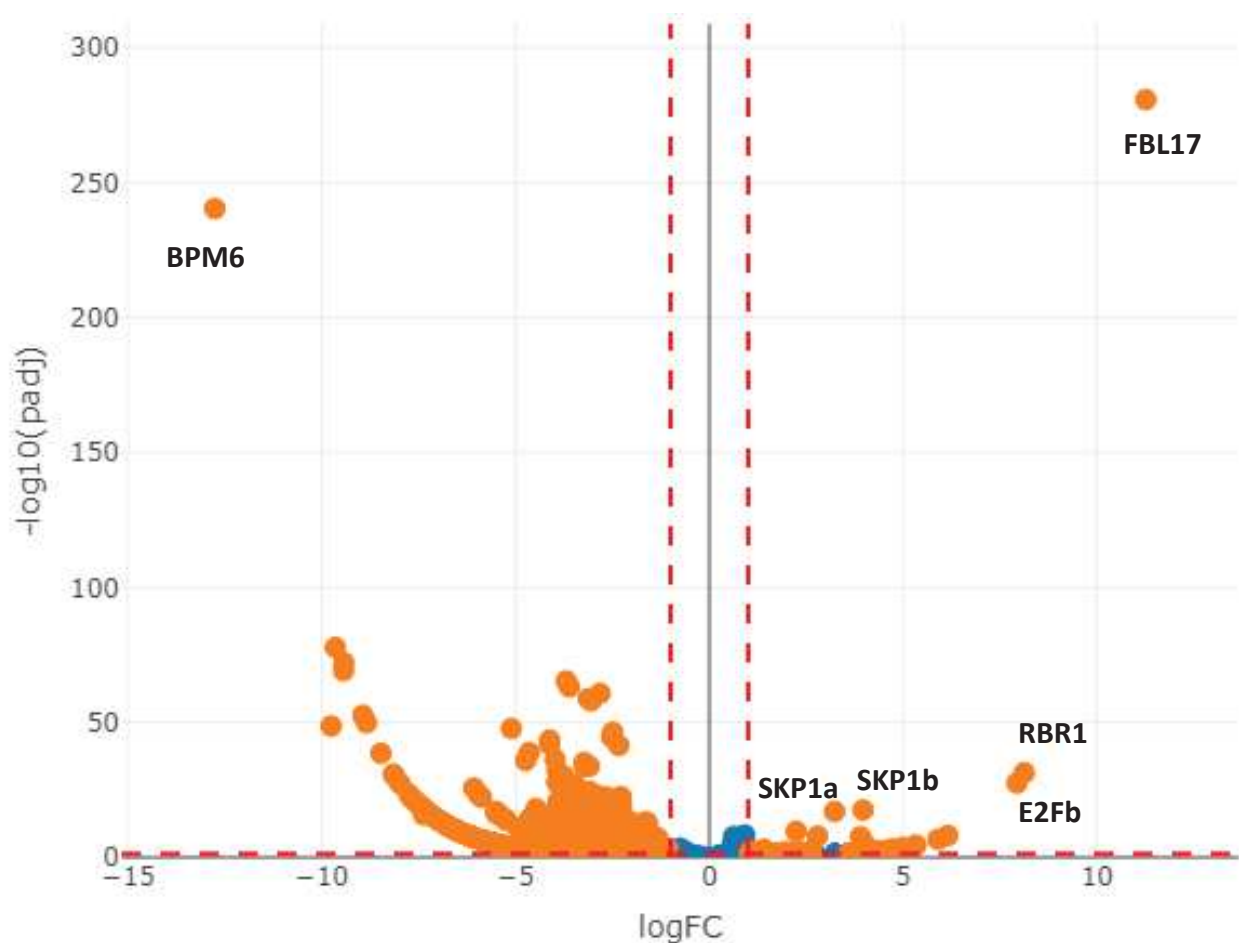


Figure 2.2.5: Représentation graphique obtenue à partir de l'analyse protéomique représentant les protéines enrichies avec GFP-BPM6 (à gauche) et FBL17-GFP (à droite) après un traitement à la Zéocine.

Les protéines identifiées dans le réplicat 1 sont classées dans un volcano plot en fonction de leur rapport d'abondance (BPM6/FBL17) et l'analyse statistique a été réalisée par une régression binominale négative (valeur P ajustée). Pour chaque protéine, le nombre moyen de spectres des échantillons GFP-BPM6 ($n = 3$) a été comparé au nombre moyen de spectres des échantillons de FBL17-GFP ($n = 3$). Les lignes pointillées rouges verticales affichent des changements de Fold Change de grande ampleur (axe x, $FC < 0,5$, gauche; $FC > 2$, droite) tandis que la ligne pointillée rouge horizontale affiche une signification statistique élevée (axe y, valeur P ajustée $< 0,05$ au-dessus de la ligne). Les points oranges représentent des protéines enrichies de façon significative, tandis que les points bleus représentent des protéines identifiées de façon non significative. Les protéines associées à la représentation du graphique du volcan sont répertoriées dans le Tableaux 2.2.1.

HSP70-ATP à HSP70-ADP) qui vont assurer la re-conformation des protéines mal conformées ou leur transfert vers la voie de la protéolyse (pour revue, Cyr et Ramos, 2015; Jacob et al., 2017). Les protéines J ont aussi été caractérisées pour réguler les gènes induits par les stress en se liant et régulant des facteurs de transcription chez le tabac (Ham et al., 2006). Chez *Arabidopsis*, la protéine ATJ2 a été décrite comme l'homologue de DnaJ chez *Escherichia coli* (Zhou et al., 1995). Notons que parmi les nombreuses protéines HSP70 identifiées par spectrométrie de masse dans nos analyses (HSP70-3, HSP70-5, HSP70-6, HSP70-7, HSP70-9, HSP70-10, HSP70-14), seule HSP70-14 est enrichie de façon significative ($\text{adj}p < 0,05$) dans le réplicat 1 en condition standard (Tableau 2.1.3)

La comparaison de l'enrichissement en protéines entre FBL17-GFP sous Zéocine et FBL17-GFP en condition standard n'a pas permis, dans nos conditions, de mettre en évidence des différences significatives entre les deux réplicats (Annexe 10). Cependant, notons que des plantules entières ont été utilisées pour ces analyses d'IP-MS et rappelons que les foci FBL17 sont observés au niveau des pointes de racines à une fréquence faible (i.e. de l'ordre de 2% ; Gentric et al., 2020), sans que cela ait été vérifié expérimentalement, on peut postuler que cette fréquence pourrait être du même ordre de grandeur dans les autres organes de la plantule. Les interactants spécifiques de la DDR pourraient donc être présent en trop faible quantité dans le protéome total des plantules pour être identifiés par cette méthode.

Enfin, l'étude des spectres protéiques identifiés en IP-MS a permis de mettre en évidence la présence des 2 sites de phosphorylation pour la protéine FBL17 déjà identifiés en condition standard, à savoir au niveau des sérines Ser8 et Ser99 dans les 2 réplicats (score Proline entre 0,90 et 1 par échantillon, plus une validation manuelle de ces modifications ; Tableau 2.1.4). En plus de ces phosphorylations, un site d'ubiquitination a aussi été détecté en condition de stress génotoxique dans le réplicat 1 au niveau de la lysine K195 ou de la cystéine C196. Bien que les peptides identifiés ne permettent pas de discriminer l'aa exact de cette ubiquitination, le site identifié dans cette analyse se situe dans le domaine LRR de FBL17 (Figure 2.1.2). De plus, notons que la phosphorylation de la protéine E2Fb au niveau de la sérines 117, déjà identifiée en condition standard, est maintenue lors du stress génotoxique dans le réplicat 1 (score Proline entre 0,95 et 0,97 par échantillon, plus une validation manuelle de ces modifications ; Tableau 2.1.4), alors que la phosphorylation des sérines 374 ou 375, identifiée

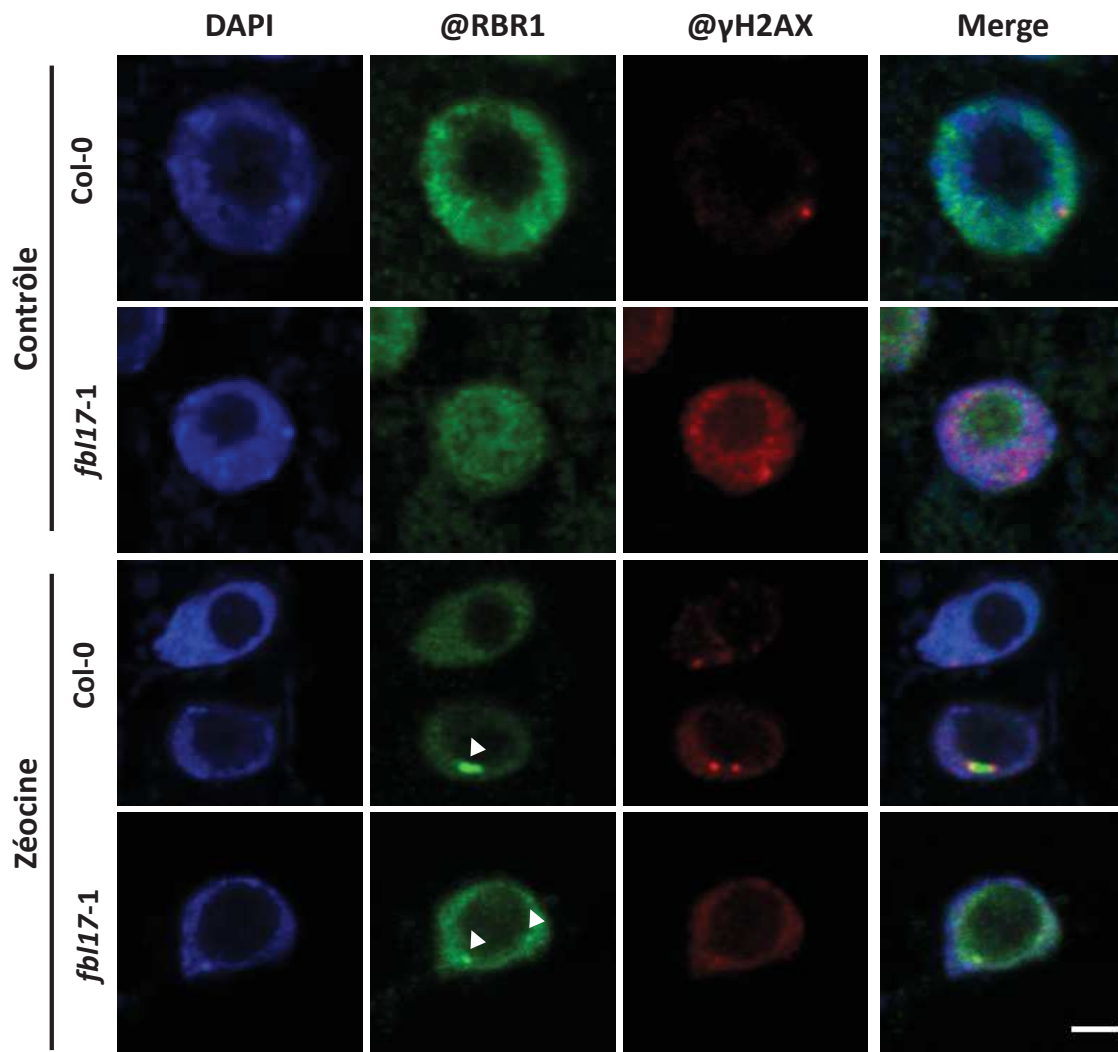


Figure 2.2.6: La protéine RBR1 est recrutée sous forme de foci dans le mutant *fb17* après un stress génotoxique.

Image représentative des noyaux de pointes racinaires de Col-0 et *fb17* après immunomarquage des foci RBR1 (vert) et γ H2AX (rouge) sous condition standard (Contrôle) ou après un stress génotoxique de 16h avec 5 μ M de Zéocine. Les noyaux sont marqués au 4',6-diaminophénylindole (DAPI, bleu). Echelle = 2 μ m

en condition standard pour RBR1, n'a pas été détectée après le traitement Zéocine (Tableau 2.1.4).

II.B Régulation de FBL17 et RBR1 au niveau des foci

En présence de stress génotoxique, les protéines FBL17 et RBR1 ont été caractérisées pour être recrutées sous forme de foci au niveau des lésions à l'ADN et co-localisent au niveau des foci γ H2AX (Horvath et al., 2017; Biedermann et al., 2017; Gentric et al., 2020). Afin d'étudier la relation entre FBL17 et RBR1 au niveau de ces foci, la lignée *Rbi*,pFBL17:FBL17-GFP a été soumise à un stress génotoxique. Tout comme la lignée pFBL17:FBL17-GFP, la lignée *Rbi*,pFBL17:FBL17-GFP est capable d'entraîner le recrutement de FBL17 sous forme de foci (Figure 2.1.7). La protéine RBR1 ne semble donc pas nécessaire au recrutement de FBL17 sous forme de foci. Du fait de l'utilisation de lignée *knockdown*, une analyse immunomarquage des foci FBL17-GFP dans *Rbi* permettra de calculer la fréquence des foci et savoir si le niveau de protéine RBR1 influence la fréquence des foci FBL17. Lors d'un stress génotoxique, le niveau protéique de RBR1 diminue mettant en évidence un autre niveau de régulation de cette protéine en plus de sa relocalisation sous forme de foci en présence de dommages à l'ADN (Figure 2.1.4-B). Afin d'étudier si FBL17 est impliquée dans la régulation de RBR1, et puisque la lignée rapportrice *fb17-1*,pRBR1:mCherry-RBR1 n'est pas encore disponible, l'utilisation de l'anticorps @RBR1 lors des analyses d'immunomarquage chez le mutant *fb17-1*, a permis de montrer le recrutement de RBR1 sous forme de foci (Figure 2.2.6). A ce stade de l'analyse, la fréquence des foci RBR1 dans *fb17* n'a pas été quantifiée.

Nous avons montré précédemment que FBL17 n'est recrutée au niveau des foci γ H2AX qu'en présence de RBR1 (Gentric et al., 2020). Afin d'étudier la dynamique *in vivo* des foci FBL17 et RBR1 (time-laps en microscopie), la lignée pRBR1:mCherry-RBR1 pFBL17:FBL17-GFP a été soumise à un stress génotoxique. Bien que préliminaire, ces données confirment la co-localisation des foci FBL17 et RBR1 (Figure 2.1.9). Les conditions expérimentales utilisées dans cette expérience sont les mêmes que dans Gentric et al. (2020), c'est-à-dire 16 heures de traitement Zéocine 20 μ M sur des plantules de 5 jours) et vise à maximiser l'apparition des foci FBL17 qui présentent une très faible fréquence (i.e. de l'ordre de 2% ; Gentric et al., 2020). Cependant, les observations réalisées sur la lignée pRBR1:mCherry-RBR1 pFBL17:FBL17-GFP

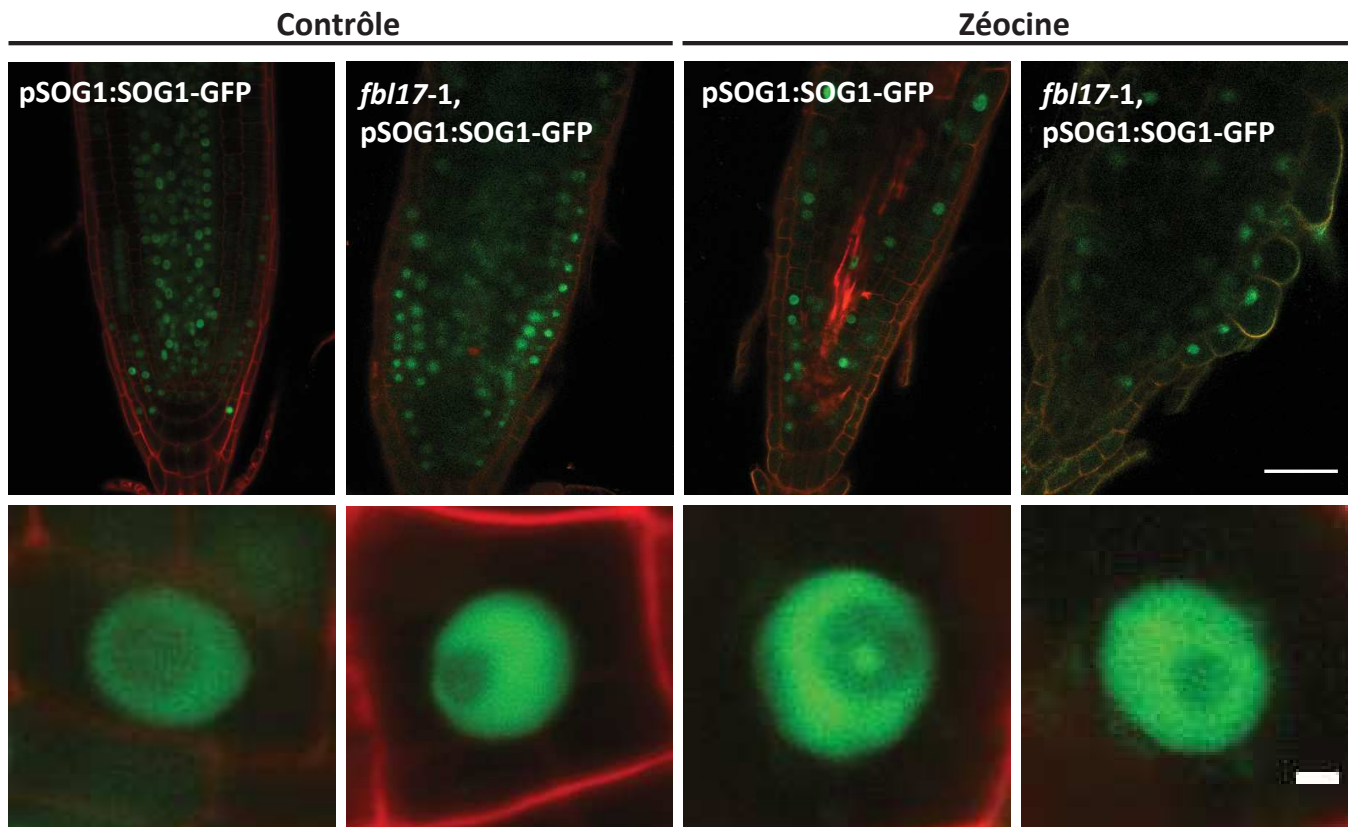


Figure 2.2.7: La protéine SOG1 n'est pas exprimée différenciellement dans le mutant *fb17*, en condition standard ou après un stress génotoxique

Microscopie confocale sur les pointes racinaires des lignées pSOG1:SOG1-GFP et *fb17-1*, pSOG1:SOG1-GFP de 8 jours en condition standard ou après 48 heures de traitement génotoxique (Zéocine 20 μ M). Echelle = 50 μ m (images du haut) et 2 μ m (images du bas). L'expérience a été réalisée une fois ($2 < N/\text{par génotype} < 10$).

dans ces conditions n'ont pas permis d'observer la dynamique de recrutement puis de disparition des protéines RBR1 et FBL17 au niveau de ces foci. En effet, tous les foci FBL17 observés colocalisent déjà avec les foci RBR1 (Figure 2.1.9). Afin de pouvoir observer cette dynamique entre FBL17 et RBR1, de nouvelles conditions expérimentales vont être testées, notamment : 1- un traitement plus court de Zéocine (20 μ M) entre 3 et 6 heures, et 2- un traitement de Zéocine (20 μ M) de 16h puis un transfert en condition sans Zéocine. Le facteur le plus problématique est de ne pas savoir la durée de vie de ces foci. Les observations réalisées jusqu'à présent ont été faites entre 1 heure et 3 heures. Une observation plus longue est envisagée afin de ne pas manquer l'étape de dissolution des foci.

II.C Régulation des acteurs de la DDR par FBL17

II.C.1 La relation FBL17-SOG1

Malgré le caractère SOG1-indépendant de la DDR constitutive chez le mutant *fb17* (Gentric et al., 2020), une étude de la possible relation entre les protéines SOG1 et FBL17 a été initiée.

La protéine SOG1 est connue pour être une protéine nucléaire ne subissant ni accumulation, ni relocalisation subcellulaire même en conditions de stress génotoxiques (Yoshiyama et al., 2013a). Afin d'étudier l'implication de FBL17 dans la régulation de SOG1, la lignée rapportrice pSOG1:SOG1-GFP a été introgressée dans le mutant *fb17-1* (Tableau 2.1.5). Comme le montre la Figure 2.2.7, le mutant *fb17* ne présente ni accumulation ou diminution évidente du niveau protéique de SOG1-GFP au niveau tissulaire, ni relocalisation au niveau subcellulaire. La protéine SOG1 étant le facteur de transcription clef de la voie DDR, un stress génotoxique à la Zéocine a été appliqué. Tout comme en condition standard, la lignée *fb17-1*, pSOG1:SOG1-GFP ne présente pas de régulation, que ce soit aux niveaux tissulaire ou nucléaire, de la protéines SOG1-GFP (Figure 2.2.7).

La régulation directe ou indirecte de FBL17 par SOG1 restant une possibilité, les lignées 35S:FBL17-GFP et pFBL17:FBL17-GFP ont été introgressées dans le mutant *sog1-1* et sont bientôt disponibles (Tableau 2.1.5).

Enfin, chez les mammifères, le facteur de transcription p53 est une protéine finement régulée notamment par le système UPS. En effet, à ce jour, une quinzaine de E3 ligases ont

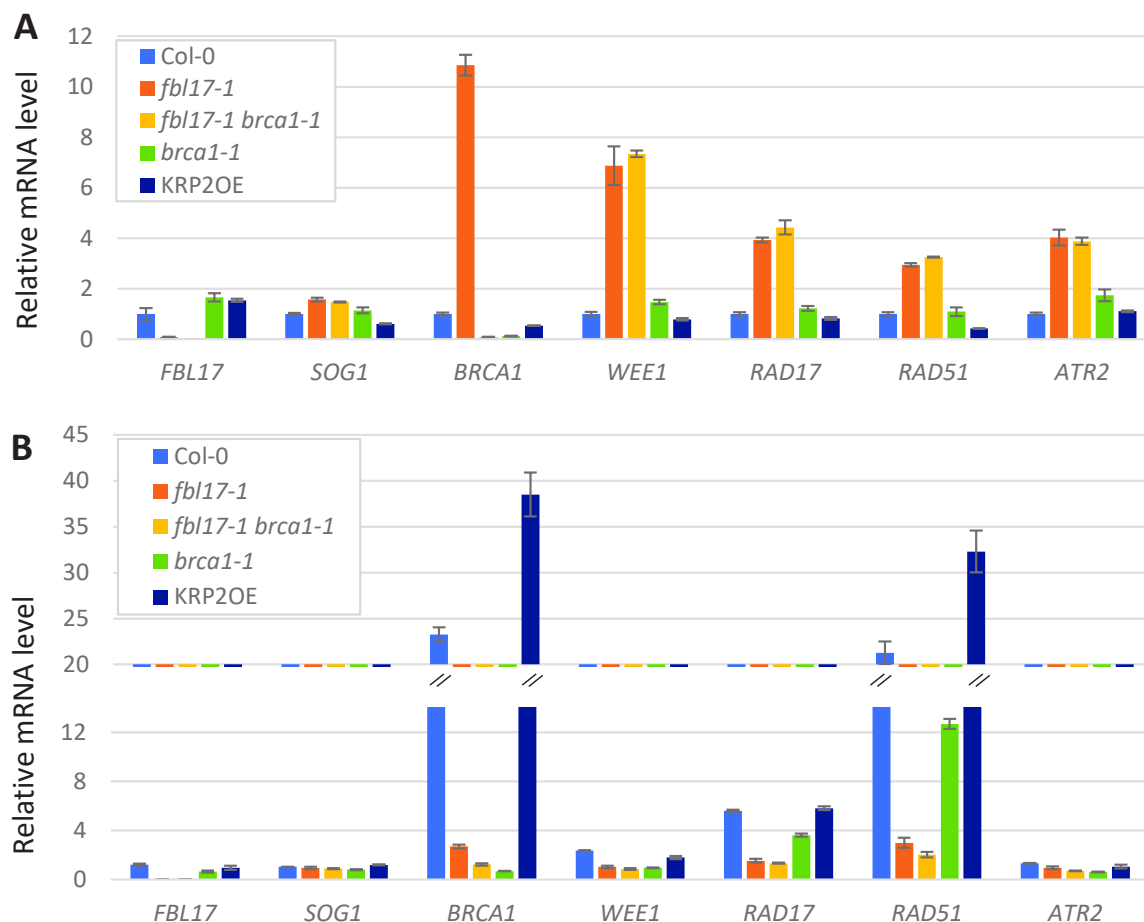


Figure 2.2.8: Niveau d'expression des gènes de la voie DDR chez Col-0, les simples mutants *fbl17* et *brca1* et le double mutant *fbl17 brca1* en absence (A) ou présence (B) de stress génotoxique (Zéocine).

(A) Niveaux d'expression relatifs des gènes chez des plantules de 8 jours cultivées *in vitro* (en condition standard) déterminés par RT-qPCR. Les données sont comparées à Col-0 normalisé à 1. **(B)** Niveaux d'expression relatifs des gènes chez des plantules de 8 jours cultivées en conditions *in vitro* et prélevées après 3h de traitement Zéocine 20 μ M, déterminés par RT-qPCR. Les données sont comparées au niveau d'expression dans le même génotype en condition standard. Les barres représentent le niveau moyen des transcrits indiqués issus d'un réplicat indépendant. L'expérience a été réalisée une seule fois. Les barres d'erreurs représentent la variation d'un triplicat technique.

été caractérisées pour réguler son activité, dont le complexe SCF^{Skp2} (pour revue Chao, 2015). Les protéines SOG1 et FBL17 étant respectivement les homologues fonctionnels de p53 et Skp2 chez *Arabidopsis thaliana*, l'hypothèse d'une régulation de SOG1 par FBL17 ne peut être exclue. Tout d'abords, une étude de la stabilité de la protéine SOG1 après un traitement au Bortezomib ou MLN permettra de savoir si cette protéine est régulée par le protéasome 26S et une enzyme E3 ligase de type CRL, respectivement. Ensuite, bien qu'aucune accumulation de la protéine SOG1 n'a pu être observée chez le mutant *fb17* (Figure 2.2.7), la protéine SOG1 est connue pour être régulée post-traductionnellement par des phosphorylations *via* la kinase ATM en réponse aux dommages à l'ADN (Yoshiyama et al., 2013a, 2017). Les E3 ligases ciblant préférentiellement les protéines avec un motif phosphorylé (phosphodégron), une étude du niveau de phosphorylation de SOG1 dans le mutant *fb17* est envisagée. Cette expérience nécessite l'utilisation d'un réactif *phos-tag* dans le gel de polyacrylamide afin de faire migrer différenciellement les protéines SOG1 non phosphorylées, mono-phosphorylées et pluri-phosphorylées (Yoshiyama et al., 2013a, 2017; Hamasaki et al., 2019). A terme, cette expérience nous permettra de mettre en évidence si une forme différenciellement phosphorylée de SOG1 (en présence ou en absence de stress génotoxiques) est détectée dans le fond mutant *fb17*.

II.C.2 La relation FBL17-BRCA1

La protéine BRCA1 est un acteur clef de la réparation des DSB de l'ADN. Chez les mammifères, en réponse aux stress génotoxiques, Brca1 est hyperphosphorylée par les kinases Atm et Chk2 (Scully et al., 1997; Cortez et al., 1999; Lee et al., 2000). Le motif phosphodégron de Brca1 est reconnu par l'E3 ligase Skp2 entraînant son ubiquitination et sa dégradation *via* le protéasome 26S (Parameswaran et al., 2015).

La régulation de BRCA1 par FBL17 a donc été envisagée et le croisement des lignées T-DNA *fb17-1* et *brca1-1* a été réalisé. Les résultats présentés ci-après, constituent des données préliminaires, puisque certaines expériences n'ont pas encore fait l'objet de réplicats. Tout d'abord, l'absence des transcrits *FBL17* et *BRCA1* dans le double mutant *fb17-1 brca1-1* a été vérifiée et confirmée par analyse de RT-qPCR (Figure 2.2.8). Alors que le mutant *brca1-1* ne se distingue pas de la plante sauvage Col-0 en termes de développement (taille des rosettes, forme des feuilles, floraison), le double mutant *fb17-1 brca1-1* présente un développement

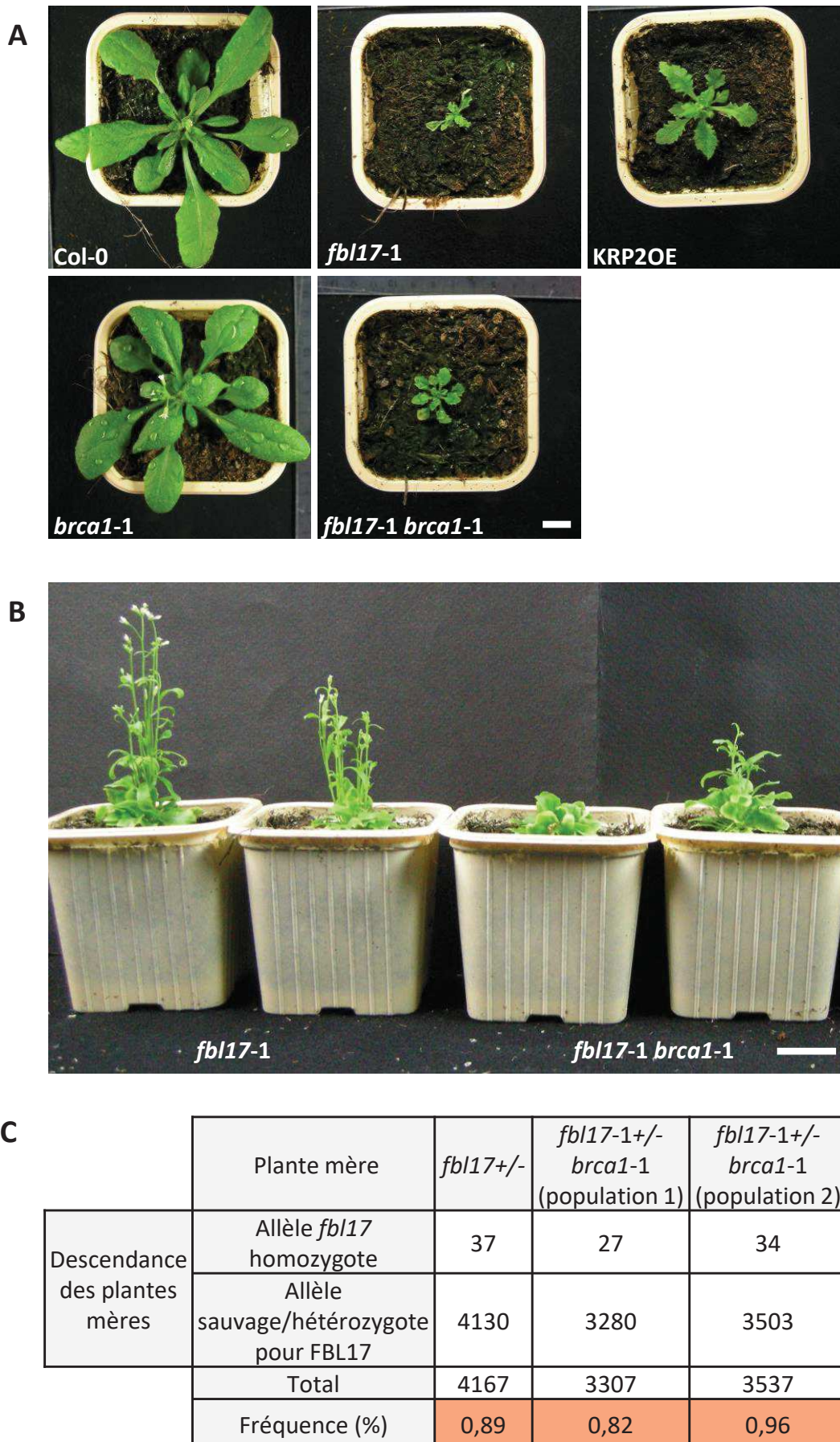


Figure 2.2.9: La mutation *brca1* ne restaure pas le phénotype mutant *fbl17*.

Les graines ont germé en condition *in vitro* pendant une semaine et ont été transférées sur sol jusqu'à 4 (A; échelle = 1cm) et 7 (B; échelle = 2 cm) semaines. C. Fréquence d'apparition du double mutant *fbl17 brca1* et du simple mutant *fbl17*.

retardé et des phénotypes forts similaires à ceux du simple mutant *fb17* (i.e. les plantes sont très petites, les feuilles sont serrées ; Figure 2.2.9-A). Cependant et bien que n'ayant pas été quantifiées, quelques légères différences peuvent être notées telles que des feuilles moins filiformes chez le double mutant (mais restant plus proches phénotypiquement de *fb17-1* que de la lignée KRP2^{OE} ; Figure 2.2.9-A), et un léger retard de la floraison (Figure 2.2.9-B). Le double mutant *fb17-1 brca1-1* présente la même stérilité que le mutant *fb17-1* (i.e. absence totale de graines). La fréquence d'apparition des doubles homozygotes, sélectionnés sur la base de leur phénotype à partir de 6 jours, a été calculée à partir de deux populations distinctes. Ainsi, le double mutant *fb17-1 brca1-1* a une fréquence d'apparition moyenne de 0,89% dans la descendance d'une plante *fb17-1*+/- *brca1-1*, soit identique à celle observée chez le simple mutant *fb17-1* (Figure 2.2.9-C). L'étude de l'élongation racinaire chez le double mutant *fb17-1 brca1-1* a été initiée mais n'a pas abouti du fait de la perte des quelques mutants identifiés après leur transfert. Toutefois, la caractérisation des pointes racinaires par microscopie confocale a permis de mettre en évidence la même désorganisation structurale des cellules racinaires ainsi que la présence de mort cellulaire constitutive chez les doubles mutants *fb17-1 brca1-1* (Figure 2.2.10). Enfin, d'un point de vue transcriptionnel, en condition standard, le mutant *brca1-1* présente le même niveau d'induction des gènes de la voie DDR que les contrôles Col-0 et KRP2^{OE}. Le double mutant *fb17-1 brca1-1* présente, quant à lui une induction des gènes *WEE1*, *RAD17*, *RAD51* et *ATR2* aussi importante que celle présente chez le simple mutant *fb17-1* (Figure 2.2.8-A). L'ensemble de ces données suggèrent qu'en condition standard, la mutation *brca1* ne restaure ni les phénotypes développementaux ; ni la DDR constitutive, observés chez le mutant *fb17*.

Les simples mutants *brca1* et *fb17* ont chacun été caractérisés pour leur hypersensibilité aux stress génotoxiques (Horvath et al., 2017; Gentric et al., 2020). L'étude du double mutant *fb17-1 brca1-1* sous traitement Zéocine a été initiée. D'un point de vue phénotypique, malheureusement, aucune donnée n'est disponible, les doubles mutants *fb17-1 brca1-1* ayant été perdus après leur détection lors de cette analyse. D'un point de vue transcriptionnel, alors que dans les lignées contrôles Col-0 et KRP2^{OE}, les gènes *BRCA1*, *RAD17*, ou *RAD51* sont fortement induits après un stress génotoxique et faiblement induit pour *WEE1*, le simple mutant *brca1-1* présente, lui, une induction plus faible des gènes *RAD51* et *RAD17*, et l'absence d'induction pour *WEE1* (Figure 2.2.8-B). L'induction des gènes de la voie DDR a largement été caractérisée en condition de stress génotoxiques chez *fb17-1* (Gentric et al.,

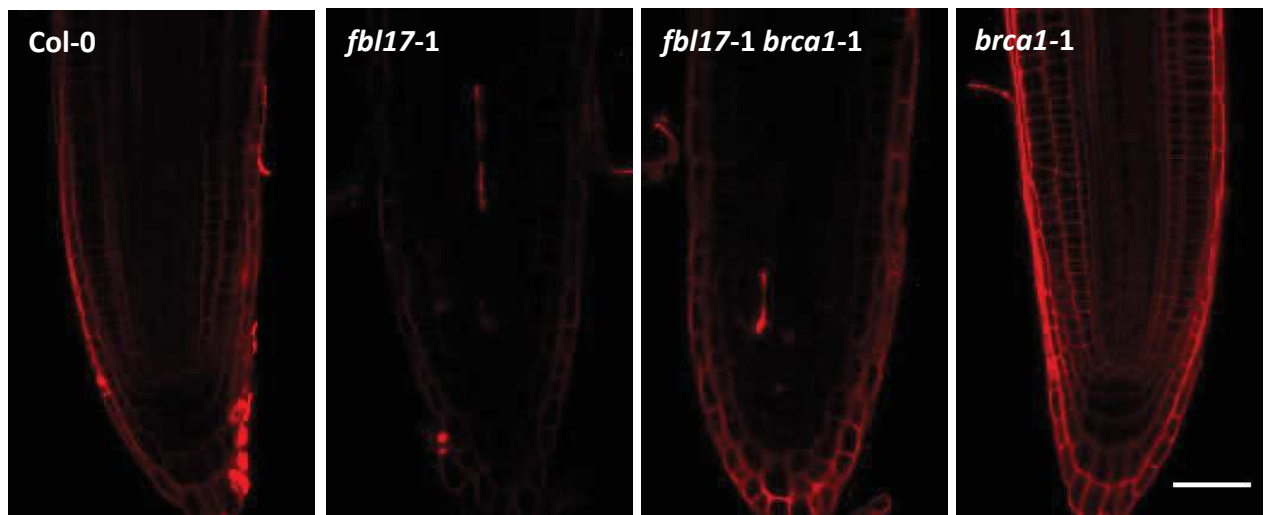


Figure 2.2.10: Le double mutant *fbl17 brca1* présente, tout comme le simple mutant *fbl17*, de la mort cellulaire de façon constitutive.

Image représentative des pointes racinaires de plantules de 8 jours des génotypes indiqués cultivées en conditions *in vitro*. La mort cellulaire est révélée suite à une coloration au iodure de propidium. 5 plantules par génotype ont été analysées et présentent des phénotypes similaires. L'expérience a été réalisée une fois. Echelle = 50 μ m.

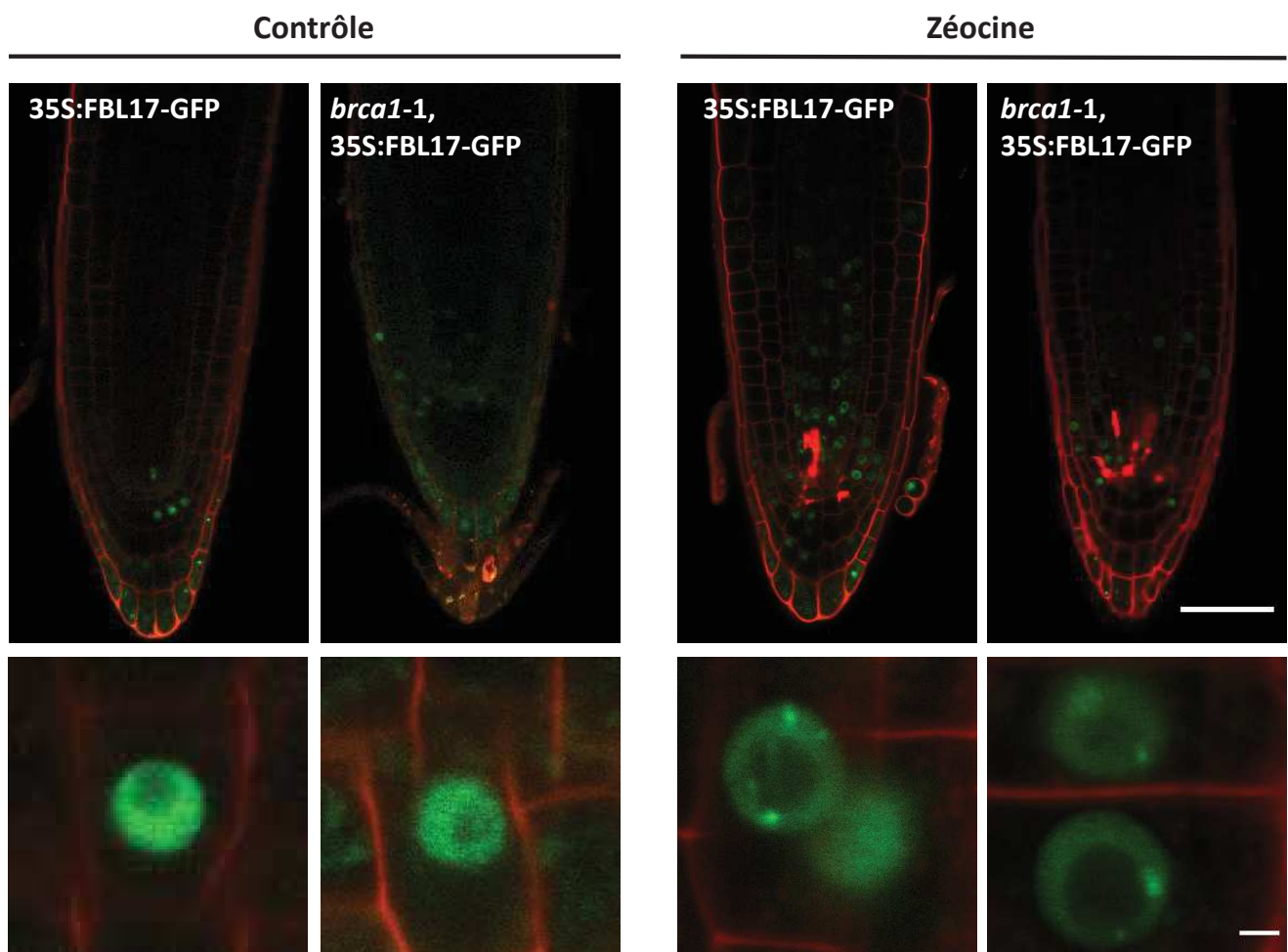


Figure 2.2.11: La protéine FBL17 est recrutée sous forme de foci dans le mutant *brca1* après un stress génotoxique.

Microscopie confocale sur les pointes racinaires des lignées 35S:FBL17-GFP et *brca1*, 35S:FBL17-GFP de 6 jours en condition standard ou après 16 heures de traitement génotoxique (Zéocine 20 μ M). Echelle = 50 μ m (images du haut) et 2 μ m (images du bas). L'expérience a été réalisée une fois (2 < N/génotype < 10).

2020), le double mutant *fb17-1 brca1-1* présente des profils similaires à ceux du simple mutant *fb17-1* avec l'absence de sur-induction des gènes testés (Figure 2.2.8-B). Comme cela a été proposé dans Gentric et al. (2020), cette réduction ou absence d'induction après un traitement génotoxique s'expliquerait par l'induction constitutive de ces gènes chez *fb17-1* et *fb17-1 brca1-1*. Les gènes *SOG1* et *ATR2* sont, quant à eux, connus pour ne pas changer d'expression suite aux stress génotoxiques (Culligan et al., 2006; Yoshiyama et al., 2013a).

Enfin, en terme de protéines, aussi bien FBL17 que BRCA1 ont été caractérisées pour être recrutées sous forme de foci au niveau des lésions à l'ADN et co-localise chacune avec RBR1 au niveau des foci γ H2AX (Horvath et al., 2017; Gentric et al., 2020). Alors que BRCA1 et RBR1 sont capables d'interagir ensemble, les deux protéines sont recrutées indépendamment au niveau des foci γ H2AX (Horvath et al., 2017). Par contre, FBL17 n'apparaît localisée au niveau de ces foci qu'en présence de RBR1 (Gentric et al., 2020). Afin d'étudier la relation entre FBL17 et BRCA1 au niveau de ces foci, les lignées rapportrices pBRCA1:BRCA1-GFP et 35S:FBL17-GFP ont été introgressées dans les mutants *fb17-1* et *brca1-1*, respectivement (Tableau 2.1.5). La lignée *brca1-1*,35S:FBL17-GFP ne présente pas d'expression différentielle de la protéine FBL17-GFP à un niveau tissulaire, ni de relocalisation à un niveau subcellulaire (Figure 2.2.11). Lors de l'application d'un stress génotoxique, la lignée *brca1-1*,35S:FBL17-GFP, tout comme la lignée contrôle 35S:FBL17-GFP, présente le recrutement de FBL17 sous forme de foci (Figure 2.2.11). La protéine BRCA1 ne semble donc pas impliquée dans le recrutement de FBL17 au niveau des foci γ H2AX. Cette hypothèse pourra être vérifiée avec une expérience d'immunomarquage pour regarder si, dans le fond mutant *brca1-1*, FBL17 est toujours capable de co-localiser avec les foci γ H2AX.

La lignée rapportrice *fb17-1*,pBRCA:BRCA1-GFP, quant à elle, est encore en cours de génotypage. Elle permettra d'étudier si FBL17 intervient dans le recrutement de BRCA1 au niveau des foci et la régulation potentielle de BRCA1 par FBL17 au niveau post-traductionnel en absence et en présence de dommages à l'ADN.

II.C.3 La relation entre FBL17 et les kinases de la DDR

En phosphorylant divers substrats, les kinases ATM, ATR et WEE1 jouent un rôle clef dans la DDR permettant la mise en place d'une réponse appropriée aux dommages présents. L'étude de la relation entre FBL17 et ces kinases a été initiée pour, d'une part, étudier si FBL17

est elle-même régulée par ces kinases, ce qui pourrait influencer son rôle lors de la DDR, et d'autre part, pour étudier si FBL17 peut cibler des protéines phosphorylées par ces kinases. En effet, en tant que protéine F-box, FBL17 ciblerait préférentiellement les substrats présentant un motif phosphodétron. Les croisements du mutant *fb17-1* avec les lignées mutantes T-DNA *wee1-1*, *atr-2* et *atm-2* ont été réalisés (Tableau 2.1.5). Pour l'instant, le croisement *fb17* x *atm* a été retardé en raison de la difficulté de polliniser l'une ou l'autre de ces lignées, les plantes *fb17-1+/-* et *atm-2* étant toutes 2 affectées dans leur fertilité. Les lignées *fb17-1+/- atr-2* et *fb17-1+/- wee1-1* ont, par contre, été obtenues et ont pu être analysées. Cependant, à ce jour, aucun double mutant homozygote n'a pu être identifié à la suite du criblage à l'œil de phénotypes *fb17*-like (i.e. plantules petites, plus claires, cotylédons filiformes et petites racines). Un crible PCR sur 100 individus prélevés au hasard par lignée n'a pas non plus permis d'identifier de doubles mutants homozygotes qui auraient présenté une suppression du phénotype *fb17*. Les doubles mutants *fb17 wee1* et *fb17 atr2* n'ayant pas été identifiés, nous avons conclu que la perte simultanée de ces gènes n'est pas viable pour les plantules, laissant supposer une relation importante entre ces protéines chez les plantes. A terme, une alternative envisagée au sein de l'équipe est d'utiliser un mutant *fb17* hypomorphe (*knockdown*) afin d'éventuellement contourner ces problèmes de létalité des doubles mutants. Enfin, les lignées rapportrices 35S:FBL17-GFP et pFBL17:FBL17-GFP ont été introgressées dans les mutants *wee1*, *atm*, *atr* et, la lignée pWEE1:WEE1-GFP dans le fond mutant *fb17* (Tableau 2.1.5). Ces lignées, en cours de génotypage, seront bientôt disponibles et permettront de quantifier et de localiser les protéines de fusion dans les fonds mutants introgressés.

III Conclusion chapitre 2

Dans ce second axe de recherche, l'étude du mutant *fb17* a permis de caractériser la présence d'une DDR constitutive associée à une augmentation du nombre de lésions au niveau de l'ADN, et l'induction des gènes liés aux dommages à l'ADN de façon SOG1-indépendante. Bien qu'encore à l'étude, la présence de cette DDR constitutive chez le mutant *fb17* pourrait être, au moins en partie, due aux membres des complexes DREAM à savoir les E2F et RBR1.

En condition de stress génotoxique, l'hypersensibilité du mutant *fb17* a été révélée. De plus, FBL17 est recrutée au niveau de foci nucléaires où elle co-localise, partiellement avec la protéine γ H2AX (un marqueur de la cassure double brin de l'ADN), et parfaitement avec la protéine RBR1, une protéine associée au contrôle de la progression du cycle cellulaire et de la réponse aux dommages à l'ADN.

L'ensemble de ces données suggèrent que la protéine FBL17 participerait d'une part, au maintien de l'intégrité génétique des cellules en condition standard, et d'autre part, à la dynamique de réparations des lésions de l'ADN lors d'un stress génotoxique.

PARTIE 3 :

Discussion et Perspectives

I La caractérisation de la protéine F-box FBL17

Parmi les différentes voies dans lesquelles intervient le système d'ubiquitination, celle de la dégradation, médiée par le protéasome 26S, est la plus répandue. Ainsi, chez les mammifères, environ 80% des protéines sont régulées par le système UPS (Yen et al., 2008). Le caractère sélectif de ce système est sous le contrôle des E3 ubiquitine ligases qui ciblent de façon spécifique certaines protéines. La caractérisation de ces E3 ubiquitine ligases, ces dernières décennies, a fait l'objet de nombreuses études et s'est intéressée à deux niveaux d'analyses. Le premier est l'étude de l'interactome, permettant d'identifier le répertoire des protéines ciblées par ces enzymes et ainsi de comprendre leur rôle biologique. Le deuxième est la régulation-même de ces protéines E3 ubiquitine ligases afin de comprendre dans quels contextes celles-ci sont actives ou inactives.

Lors de cette thèse, la protéine F-box FBL17 prenant part au complexe SCF (Skp1-Cullin-F-box) a été caractérisée afin de comprendre ses implications biologiques et fonctionnelles.

I.A L'interactome de FBL17

L'étude de l'interactome de FBL17 était essentielle à la découverte de nouvelles voies biologiques impliquant cette protéine F-box. Parmi les protéines identifiées dans l'analyse IP-MS, certaines ont particulièrement retenu notre attention, dont notamment les protéines RBR1, E2Fb et DPb identifiées de façon significative lors des deux réplicats biologique ainsi que E2Fa et DPa identifiées de façon significative dans un seul des réplicats (Tableau 2.1.3 et 2.2.1).

I.A.1 FBL17 et le complexe DREAM

I.A.1.a En condition standard

Les protéines RBR1, E2Fb et DPb, identifiées dans l'interactome de FBL17 (Figure 2.1.1), ont été caractérisées pour leur implication au sein du complexe DREAM. Ce complexe est notamment impliqué dans les tissus jeunes où il inhibe les gènes précoces du cycle cellulaire et les gènes impliqués dans la différenciation cellulaire telle que l'entrée en endoreduplication

(Magyar et al., 2005, 2012). Lors de la caractérisation de ces protéines, la régulation par le protéasome des protéines E2Fb et RBR1 a été mise en évidence (Hirano et al., 2011a).

Mes travaux de thèse suggèrent une interaction potentielle des protéines RBR1 et E2Fb avec la protéine F-box FBL17 et laissent à supposer que FBL17 pourrait participer à leur dégradation par le protéasome. En effet, chez les mammifères, la protéine Rb est régulée par trois E3 ubiquitine ligases : Mdm2, NRbE3 et hUTP14a alors que la protéine Rb-like p130 et le facteur de transcription E2F1 sont ciblés par la protéine F-box Skp2 (Xiao et al., 1995; Marti et al., 1999; Tedesco et al., 2002; Bhattacharya et al., 2003; Darnell et al., 2003; Uchida et al., 2005; Sdek et al., 2005; Delston et al., 2011; Wang et al., 2015; Liu et al., 2018; Rousset-Roman et al., 2019). Par analogie, les protéines RBR1 et E2Fb chez *Arabidopsis* pourraient être ciblées par différentes E3 ubiquitine ligases dont FBL17 supposée être l'homologue fonctionnel de Skp2. En effet, les résultats présentés lors de cette thèse démontrent la régulation de ces protéines par le protéasome *via* un complexe CRL (Figure 2.1.8-A&B), l'accumulation de ces protéines dans le fond mutant *fbl17* (Figure 2.1.8-C&D) et leur co-localisation au niveau cellulaire (Figure 2.1.9) suggérant que E2Fb et RBR1 constituent de bons candidats en tant que substrats de FBL17. Par ailleurs, l'analyse *in silico* de la séquence protéique de FBL17 a révélé deux motifs RDB (*Rb-binding domain*), à savoir le motif LxCxE au niveau du domaine LRR de FBL17 et un motif PENF dégénéré au niveau du domaine F-box (Figure 2.1.2 ; Lee et al., 1998; Darnell et al., 2003; Liu et al., 2018). Le motif PENF, caractérisé chez les mammifères, prend place au sein de la séquence consensus Z(X4-5)J(X4)PZZJ(X6-7)Z(X8-9)JJ où Z représente un résidu polaire, J représente un résidu hydrophobe large et X représente n'importe quel aa et, au sein de cette séquence, quatre substitutions d'aa sont autorisés (Darnell et al., 2003). Notons que le motif PENF identifié chez FBL17 ne présente que deux substitutions (Figure 2.1.2). La présence de ces motifs conforte l'hypothèse d'une interaction directe entre FBL17 et RBR1, qu'il reste toutefois à démontrer. Enfin, les E3 ubiquitine ligases de type SCF ont été caractérisées pour leur affinité vis-à-vis de motifs dégrons phosphorylés (ou phosphodégrons) présents sur leur substrat (Jin et al., 2005; Ravid et Hochstrasser, 2008; Skaar et al., 2013). L'identification de E2Fb et RBR1 dans l'interactome de FBL17 a aussi permis de révéler et/ou confirmer des sites de phosphorylation chez ces protéines. Chez *Arabidopsis*, la kinase TOR (Target Of Rapamycin) est capable de phosphoryler le facteur de transcription E2Fb *in vitro*. Cependant, la position exacte de cette phosphorylation n'est pas encore déterminée (Li et al., 2017). Ainsi, la phosphorylation de la sérine 117 chez E2Fb constitue à ce jour, le premier site

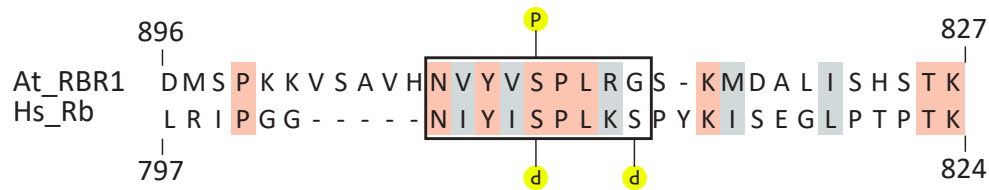
A**B**

Figure 3.1.1: Alignement des séquences N-terminales (A) et C-terminales (B) des protéines Retinoblastoma chez Arabidopsis (At_RBR1) et l'Homme (Hs_Rb).

L'alignement des séquences a été réalisé avec le logiciel Muscle dans Geneious (version 7.1; <http://www.geneious.com>). La similarité entre les aa a été déterminée par la matrice de similarité Blosum62 avec un threshold de 1 dans Geneious. En orange sont représentés les aa avec 100% de similarité et en gris les aa avec une conservation biochimique. Les encadrés représentent les séquences consensus dégénérées ou ont été identifiées des phosphorylations lors de l'IP-MS (encadré en A) ou avec l'anticorps Rb-P^{S807/811} (encadré en B)

de phosphorylation caractérisé au niveau du facteur de transcription E2Fb chez *Arabidopsis*. En ce qui concerne RBR1, cette protéine est connue pour être, comme son homologue Rb, une protéine multi-phosphorylée, avec 17 sites de phosphorylations prédits (Figure 1.2.2 ; pour revue Desvoyes et al., 2014; Desvoyes et Gutierrez, 2020). La forme enrichie dans l'interactome de FBL17 est phosphorylée en sérine 374 ou 375 (Tableau 2.1.4). Grâce à la similarité des séquences protéiques entre Rb et RBR, il est possible de faire l'analogie des séquences présentant les motifs phosphorylés. La phosphorylation de la Ser374/375 au niveau de la séquence KIDALSS chez *Arabidopsis* correspond donc à la séquence QTDSIDS (position 344-350) chez l'Homme, pour laquelle aucune phosphorylation n'a été identifiée (Figure 3.1.1). Ainsi, cette phosphorylation, qui semble être spécifique aux plantes, ne permet pas d'émettre des hypothèses quant à sa fonction chez RBR1. Il est intéressant de noter que l'étude du mutant *fb17* a permis de mettre en évidence l'accumulation d'une forme phosphorylée de RBR1, grâce à l'utilisation de l'anticorps @Rb-P^{S807/811} dirigé contre un phospho-peptide humain (Figure 2.1.8-C). Lorsque Ábrahám et al (2011) ont caractérisé cet anticorps, ils ont mis en évidence que les phosphorylations des Ser807/811 au niveau de la séquence NIYISPLKS chez l'Homme correspondent à la phosphorylation des Ser911/916 au niveau de la séquence homologue NYYVSPLRG chez *Arabidopsis* (Figure 3.1.1). Notons que seule la phosphorylation de la Ser911 a été confirmée chez *Arabidopsis* (pour revue Desvoyes et al., 2014; Desvoyes et Gutierrez, 2020). Si la kinase responsable de cette phosphorylation chez les plantes n'a pas encore été identifiée, la séquence peptidique ressemble à la séquence consensus de phosphorylation par les CDK (SPXK). Aussi, l'utilisation de cet anticorps, chez *Arabidopsis*, a permis de mettre en évidence que la phosphorylation sucre-dépendante de RBR1 est sous le contrôle de CYCD3;1 (accumulation de RBR1-P dans la lignée CYCD3;1^{OE}) et KRP2 (réduction du niveau de RBR-P dans la lignée KRP2^{OE} ; Magyar et al., 2012). Notons que, dans le fond mutant *fb17*, une accumulation simultanée de RBR-P (Figure 2.1.8-C) et de KRP2 (Noir et al., 2015) est observée, suggérant une régulation post-traductionnelle complexe de ces régulateurs. A ce jour l'implication fonctionnelle de cette phosphorylation chez RBR1 (RBR1-P) n'est pas décrite. Il est aussi intéressant de noter que chez la luzerne, l'utilisation de l'anticorps @Rb-P^{S807/811} a permis de mettre en évidence la présence de RBR-P sous forme de spots dans les noyaux en interphases et sous forme de granules dans les noyaux en prophases (Ábrahám et al., 2011). Chez les mammifères, la forme phosphorylée de Rb, Rb-P^{S807/811}, est retrouvée au niveau des mitochondries et la phosphorylation de la sérine 807 permet

l'association de Rb avec la protéine pro-apoptotique Bax afin de bloquer l'apoptose (Antonucci et al., 2014). Notons, que la phosphorylation de la sérine 807 ne peut être réalisée lorsque Rb interagit avec des protéines au niveau de leur motif LxCxE (Zarkowska et Mitnacht, 1997). D'autres implications fonctionnelles des phosphorylations de Rb en C-terminale (dont Rb-P⁸¹¹) ont été révélées dans la régulation des promoteurs de gènes ciblés par Rb, notamment dans l'induction de gènes mitochondriaux et, par association de Rb-P⁸¹¹ et du complexe NURD (*Nucleosome Remodeling and Deacetylase*) dans l'activation de gènes impliqués dans la HR (Sanidas et al., 2019).

Afin d'élucider les relations mécanistiques entre FBL17-RBR1 et FBL17-E2Fb, différents niveaux d'études peuvent être proposés.

La première étape serait de vérifier si ces protéines sont capables d'interagir directement, soit par BiFC (dans des protoplastes d'*Arabidopsis* ou par infiltration dans *Nicotiana benthamiana*), soit par FRET-FLIM (grâce à la lignée d'*Arabidopsis* pRBR1:mCherry-RBR1 pFBL17:FBL17-GFP). Si cette interaction était confirmée, il serait particulièrement intéressant de déterminer le(s) domaine(s) assurant cette/ces interaction(s). Puisque FBL17 présente à la fois un motif PENF dans sa région F-box (impliquée dans son interaction avec le complexe SCF) et un motif LxCxE dans le domaine LRR (impliqué dans l'interaction avec le substrat), ces deux motifs d'interaction offrent des possibilités d'interconnexion entre FBL17 et RBR1 :

1. Dans le cas où FBL17 et RBR1 interagissent au niveau du motif PENF. Cette hypothèse implique que le recrutement de FBL17 par RBR1 empêche la formation du complexe SCF^{FBL17} en bloquant l'interaction de FBL17 avec la protéine SKP1 (ASK). Bien que peu probable puisque les protéines SKP1A (ASK1) et SKP1B (ASK2) ont été identifiées dans l'interactome de FBL17 (Figure 2.1.1 et 2.2.5 et Tableau 2.1.3 et 2.2.1), cette possibilité pourrait se mettre en place dans certains contextes biologiques.
2. Dans le cas où FBL17 recrute RBR1 au niveau du motif LxCxE. Cette possibilité correspondrait à une interaction classique d'une protéine F-box avec son substrat et suggère l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de RBR1 *via* FBL17.

Alors que ces deux protéines sont déjà sujettes à un rétrocontrôle transcriptionnel, les hypothèses 1 et 2 ci-dessus suggèrent la possibilité d'un rétrocontrôle complexe post-

traductionnel où les fonctions de FBL17 pourraient être bloquées par RBR1 et la dégradation de RBR1 pourrait être assurée par FBL17.

Dans la suite de ce travail, il serait donc intéressant de réaliser des mutations au niveau des motifs PENF et LxCxE de la protéines FBL17 et/ou d'établir des lignées tronquées composées, soit, de la région C-terminale de FBL17 (donc ayant perdu le domaine F-box ; *fb17*, FBL17(CTR)-GFP), soit, de la région N-terminale de FBL17 (donc ayant perdu le domaine LRR ; *fb17*, FBL17(NTR)-GFP) afin d'étudier quel domaine est impliqué dans l'interaction de ces protéines et d'étudier le phénotype des plantes associé à l'absence d'interaction entre FBL17 et RBR1.

Si une interaction directe est confirmée entre FBL17 et nos 2 candidats, deux niveaux d'études pourront être envisagés :

1. Déterminer le niveau d'ubiquitination *in vivo* des substrats potentiels. Il s'agira de vérifier si les protéines E2Fb et RBR1 sont ubiquitinées et si FBL17 est responsable de cette ubiquitination. Ces questions pourront être étudiées en testant la présence de formes ubiquitinées de E2Fb ou RBR1, en vérifiant si ces formes ubiquitinées sont accumulées après un traitement au Bortezomib, et si ces formes ubiquitinées sont réduites ou absentes dans le fond mutant *fb17* grâce à l'utilisation d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement les chaînes d'Ub. Après avoir vérifié l'ubiquitination de ces protéines, il serait également intéressant de vérifier le type de chaîne impliqué dans cette ubiquitination. En effet, chez les mammifères, l'homologue fonctionnel de FBL17, Skp2, est impliqué dans l'ubiquitination des protéines en K48 pour induire leur dégradation ainsi qu'en K63 pour stabiliser certaines protéines, induire le recrutement d'interactants ou altérer leur localisation subcellulaire (pour revue Yumimoto et al., 2020). Cette analyse pourrait être réalisée grâce au système d'Ubicapture permettant d'isoler les protéines présentant un type donné de chaîne.
2. Caractériser le motif phosphodégron impliqué dans le recrutement des substrats. Ainsi, des lignées phospho-mimiques et phospho-mutantes pourraient être générées pour les sites de phosphorylation identifiés chez E2Fb et RBR1. Ces lignées permettraient de maintenir la protéine sous une forme mimant la forme phosphorylée, en remplaçant les sérines (S) par des acides aspartiques (D ; E2Fb^{S117D},

RBR^{S374/375D}, RBR^{S911D}), ou au contraire sous sa forme non phosphorylée, en remplaçant les sérines (S) par des alanines (A ; E2Fb^{S117A}, RBR^{S374/375A}, RBR^{S911A}). Ces lignées pourraient aussi être réalisées avec une étiquette protéique afin d'étudier si l'interaction avec FBL17 est maintenue ou non.

Notons qu'il serait aussi intéressant de réaliser les analyses décrites ci-dessus avec le facteur de transcription E2Fa identifié dans l'une des analyses IP-MS.

De plus, afin de déterminer avec quelle(s) versions du complexe DREAM FBL17 interagit, il serait intéressant de réaliser une IP-MS sur la première paire de feuilles de plantules de 8 jours, condition utilisée pour identifier le complexe RBR-E2Fb-DPb-MYB3R4 (Kobayashi et al., 2015). Ce complexe s'exprime dans les tissus âgés, où il vient activer les gènes permettant la réalisation de la mitose (Figure 1.2.3 ; Kobayashi et al., 2015). L'utilisation de plantules de 6 jours dans nos conditions expérimentales ne permet pas d'exclure un rôle de FBL17 au sein de cette version du complexe DREAM.

I.A.1.b Dans un contexte DDR

Dans un contexte de stress génotoxiques, il a été montré que les protéines RBR1 et E2Fa sont recrutées au niveau des foci γ H2AX, le marqueur des cassures double brin de l'ADN (Lang et al., 2012; Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017), suggérant que ces protéines pourraient jouer un rôle plus direct dans la réparation de l'ADN. Il est intéressant de noter que RBR1 interagit physiquement avec la protéine BRCA1, que ce soit chez les mammifères ou les plantes, au niveau des foci γ H2AX (Aprelikova et al., 1999; Horvath et al., 2017), et qu'elle est nécessaire au recrutement de la protéine RAD51 au niveau de ces foci (Biedermann et al., 2017) suggérant un rôle structural des protéines RBR dans la machinerie DDR.

Lors de cette thèse, la protéine FBL17 a été caractérisée en condition de stress génotoxique pour sa capacité à se relocaliser sous forme de foci nucléaires. Ces foci colocalisent avec la protéine RBR1 au niveau des sites de dommage à l'ADN (Gentric et al., 2020 ; Figure 2.1.9). L'observation de cette colocalisation laisse suggérer l'implication de FBL17 dans le processus de réparation de l'ADN. De plus, le recrutement de FBL17 au niveau de ces lésions est directement lié à la présence de la protéine RBR1 (Gentric et al., 2020), suggérant une dynamique d'interaction entre ces deux protéines (Figure 2.1.9). Ces

observations suggèrent deux hypothèses. Premièrement, la protéine RBR1 pourrait recruter FBL17 au niveau des foci γ H2AX, où elle exercerait son rôle de protéine F-box sur des protéines présentes au niveau des sites de lésions de l'ADN. Cette hypothèse est soutenue par l'analogie avec les mammifères où la protéine BRCA1 est ubiquitinée par la protéine Skp2 induisant sa dégradation afin d'assurer la réalisation de la HR en phase S/G2 (Parameswaran et al., 2015). Deuxièmement, la protéine FBL17 ciblerait RBR1 afin d'entraîner sa dégradation. RBR1 étant nécessaire au recrutement de protéines essentielles à la réparation de l'ADN, sa dégradation pourrait initier la disparition des foci γ -H2AX une fois l'ADN réparé. Cette idée est soutenue par la diminution du niveau protéique de RBR1 suite à un stress génotoxique, suggérant sa régulation par dégradation (Figure 2.1.4). Ces deux hypothèses pourraient être exclusives, respectivement, ou non exclusives et dans ce cas prendre place selon une cinétique qui resterait à déterminer.

L'étude des implications de FBL17 dans la DDR ainsi que la vérification des hypothèses posées pourraient être vérifiées grâce à différentes expérimentations :

1. Les expériences proposées en condition standard, telles que l'interaction entre les protéines ou le rôle des phosphorylations, pourraient être étudiées en condition de stress génotoxiques.
2. Il a été mis en évidence, notamment chez les champignons, que certaines protéines F-box, exercent un rôle de façon indépendante de leur complexe E3 en interagissant seulement avec SKP1 (Jonkers et Rep, 2009). L'identification de deux SKP1 (Ask) dans l'interactome de FBL17 (Figure 2.1.1 et 2.2.5 et Tableau 2.1.3 et 2.2.1), ainsi que l'absence de culline, pourrait suggérer un rôle fonctionnel de FBL17 en dehors de son complexe SCF. Il serait intéressant de vérifier si, au niveau des foci, le complexe SCF entier est recruté avec FBL17, pour assurer l'ubiquitination de substrats, ou si seule la protéine F-box FBL17 est recrutée assurant une régulation indépendante de son complexe E3 ligase.
3. Etant donné le recrutement de RBR1 et FBL17 sous forme de foci, il serait intéressant d'étudier la régulation subcellulaire de E2Fb, en condition de stress génotoxiques. L'utilisation d'une lignée pE2Fb:E2Fb-GFP pFBL17:FBL17-mCherry permettrait d'observer, par immunomarquage, si cet autre membre du complexe DREAM identifié dans

l'interactome de FBL17 est aussi recruté sous forme de foci et si les protéines FBL17, E2Fb et RBR colocalisent au niveau de ces foci.

I.A.2 L'absence des interactants connus

De façon surprenante, l'analyse IP-MS n'a pas permis de mettre en évidence les interactants connus de FBL17 tels que les protéines KRP ou CDT1a (Tableaux 2.1.3 et 2.2.1). Ces protéines, jouant un rôle précis lors de certaines phases du cycle cellulaire, sont finement régulées et peuvent présenter des profils d'expression cycliques au sein des cellules. Ainsi, certaines KRP sont probablement dégradées par FBL17 avant la transition G1-S, alors que CDT1a est dégradée en début de phase S (Gusti et al., 2009; Desvoyes et al., 2019). Etant donnée l'utilisation de plantules entières dans les analyses d'IP-MS, ces interactants, spécifiques de certaines phases du cycle cellulaire, pourraient être présents en trop faible quantité dans le protéome total des plantules pour être identifiées par cette méthode. Nous ne pouvons donc pas exclure que d'autres interactants spécifiques du cycle cellulaire peuvent ne pas être identifiés dans notre analyse.

Afin de remédier à ce problème, une des solutions envisagées est l'utilisation de lignées BY2 afin de travailler sur une population de cellule pouvant être synchronisées et d'étudier les interactants de FBL17 à chaque phase du cycle (Kumagai-Sano et al., 2006). Une alternative serait la synchronisation des cellules de pointes racinaires par l'utilisation de l'HU. En effet, il a été montré que des plantules traitées à l'HU présentaient alors un arrêt transitoire en transition G1/S (Cools et al., 2010).

I.B La régulation de la protéine F-box FBL17

De nombreuses études ont permis de mettre en évidence les différents niveaux de régulation post-traductionnelles des E3 ubiquitine ligases. Ainsi, les phosphorylations interviennent dans leur activation ou l'inhibition des interactions avec le substrat, alors que les ubiquitinations interviennent notamment dans la dégradation de ces E3 ubiquitine ligases (de Bie et Ciechanover, 2011).

I.B.1 Les phosphorylations

Bien qu'en nombre modéré, des phosphorylations ont pu être mises en évidence chez les protéines F-box. Chez les mammifères, la protéine suppresseur de tumeur F-box Fbxw7 (F-box/WD repeat-containing protein 7) est phosphorylée au niveau des sérines 25, 176, 349 et 372 et de la tyrosine 205 par les kinases Pik2 (class I phosphoinositide 3-kinases), Cdk5 et ERK (Extracellular signal-Regulated Kinases) induisant son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome 26S (Cizmecioglu et al., 2012; Ko et al., 2019; Ji et al., 2015). Suite à un stress génotoxique, la protéine F-box Fbxo31 est phosphorylée par la kinase Atm au niveau des sérine-glutamine 278/279. Cette phosphorylation permet l'interaction de Fbxo31 avec ses substrats tels que la cycline D1 ou le régulateur négatif de la protéine suppresseur de tumeur p53 Mdm2, conduisant à leur ubiquitination et leur dégradation par le protéasome 26S (Santra et al., 2009; Malonia et al., 2015). Enfin, dans un autre modèle, chez le champignon pathogène pour l'Homme, *Aspergillus fumigatus*, la protéine F-box Fbx15 est constitutivement phosphorylée au niveau des sérines 468/469 et interagit avec la protéine Skpa pour former le complexe SCF^{Fbx15}. Fbx15 phosphorylée permet le transport nucléaire du corépresseur SsnF qui cible les gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et les métabolites secondaires. Suite à un stress oxydatif, Fbx15 est déphosphorylée, entraînant une activité moins importante du complexe et ainsi une réduction du transport de SsnF dans le noyau, permettant l'activation des gènes (Jöhnk et al., 2016). La phosphorylation de protéines F-box reste encore peu étudiée, à ce jour, chez les plantes.

Chez *Arabidopsis thaliana*, trois sites de phosphorylation au niveau des sérines 8, 80 et 99 ont été identifiés pour la protéine F-box FBL17, lors de cette thèse (Tableau 2.1.4). Afin d'étudier le rôle de ces phosphorylations dans la régulation de FBL17, des lignées phospho-mimiques (FBL17^{S8D}, FBL17^{S80D}, FBL17^{S99D}) et phospho-mutantes (FBL17^{S8A}, FBL17^{S80A}, FBL17^{S99A}; mutations simples et multiples) pourraient être générées et introduites dans le fond génétique *fb17*. Quatre niveaux d'études pourraient être envisagés :

1. Le phénotype de ces lignées pourrait être comparé à Col-0. Si l'une (ou plusieurs) de ces phosphorylations interviennent dans l'inactivation de la protéine FBL17, un phénotype *fb17*-like (i.e. plantules petites, plus claires, cotylédons filiformes et petites racines) pourrait être observé.

2. La localisation subcellulaire de FBL17 en condition standard, mais aussi sous stress génotoxique, pourrait être étudiée et nous informer du rôle potentiel de ces phosphorylations dans le maintien de FBL17 dans le noyau ou dans son recrutement sous forme de foci en conditions génotoxiques.
3. L'interaction entre FBL17 et ses substrats, ainsi que leur niveau protéique permettrait d'évaluer le rôle de ces phosphorylations dans la dégradation des substrats par le protéasome 26S. Une étude du niveau protéique des substrats après un traitement au CHX permettrait de vérifier l'activité de FBL17 dans les différentes lignées phospho-mimiques et phospho-mutantes.
4. FBL17 étant une protéine très instable et régulée par le protéasome (Figure 2.1.3, Noir et al., 2015), l'étude de ces lignées phospho-mimiques et phospho-mutantes permettrait d'envisager l'implication de ces phosphorylations dans la stabilité de la protéine F-box elle-même.

Enfin, trois kinases ont été étudiées dans cette thèse, à savoir WEE1, ATR et ATM et aucun double mutant homozygote n'a pu être identifié pour *fbl17 wee1* et *fbl17 atr* alors que la lignée *fbl17 atm* n'est pas encore disponible (Tableau 2.1.5). Cette absence de double mutant homozygote laisse suggérer un lien fort entre les protéines FBL17/WEE1 et FBL17/ATR. Des expériences pourraient être menées afin de tester si ces kinases sont responsables de la phosphorylation de FBL17.

I.B.2 L'ubiquitination

La caractérisation de certaines protéines F-box a permis de mettre en évidence leur capacité à s'autoréguler (de Bie et Ciechanover, 2011). Chez les mammifères, deux protéines F-box, Grr1p et Cdc4p, ont été caractérisées pour s'auto-ubiquitiner au sein de leur complexe SCF *in vivo*, entraînant leur dégradation par le protéasome 26S (Galan et Peter, 1999). D'autres protéines F-box sont proposées poursuivre le même type de régulation, telles que Skp2, pour laquelle une ubiquitination *in vitro* au sein du complexe CRL purifié a été montrée (Wirbelauer et al., 2000). Ce type d'autorégulation a aussi été mis en évidence chez le champignon filamenteux *Neurospora crassa*, ainsi que la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Zhou et Howley, 1998; He et al., 2005), *mais pas encore chez les plantes*. En effet, si certaines protéines F-box

sont connues pour être régulées *via* le protéasome 26S (Noir et al., 2015; Sun et al., 2015; Stuttmann et al., 2009), à ce jour aucune ubiquitination autocatalytique n'a été démontrée.

L'identification d'un site d'ubiquitination chez FBL17, au niveau de la lysine K195 ou la cystéine C196 au début du domaine LRR (Tableau 2.1.4 et Figure 2.1.2), en plus de l'absence d'une autre E3 ubiquitine ligases dans l'interactome de FBL17 (Tableaux 2.1.3 et 2.2.1) permet d'envisager ce type d'autorégulation de la protéine F-box FBL17. Afin de vérifier cette hypothèse, différentes expériences pourraient être réalisées :

1. La première étape serait de prouver l'ubiquitination *in vivo* de FBL17 et l'accumulation de cette forme ubiquitinée suite à un traitement au Bortezomib. Cette analyse pourrait être réalisée grâce à l'utilisation d'anticorps qui reconnaissent spécifiquement les chaînes K48 (K11 ou K63).
2. L'importance du complexe SCF (Skp1-Cullin1-F-box) dans l'autoubiquitination de FBL17 pourrait être étudiée. Puisque la mutation de la culline 1 est létale (Shen et al., 2002), les lignées rapportrices FBL17-GFP pourraient être introgressées dans les fonds mutants *ask1* et *ask2* (*Skp1*-like genes), mais pas le double mutant *ask1ask2* qui est aussi létal (Yang et al., 1999; Liu et al., 2004), permettant d'étudier la stabilité protéique de FBL17 dans ces fonds génétiques.
3. La nécessité du complexe SCF entier dans l'ubiquitination de FBL17 pourrait être explorée grâce à l'utilisation d'une lignée mutée dans le domaine F-box. Si FBL17 s'autoubiquitine au sein de son complexe SCF, la perte du domaine F-box nécessaire à l'interaction avec le domaine SCF entraînerait une stabilisation de la protéine FBL17 en absence de tout traitement.
4. Il a récemment été montré l'implication des enzymes E2, UBC35 et UBC36, comme les enzymes majeures de la poly-Ub en chaînes polyubiquitines de type K63 chez les plantes, nécessaires à leur croissance et développement (Romero-Barrios et al., 2020). Il serait intéressant d'étudier quelle enzyme E2 s'associe avec FBL17 et de croiser le mutant *fbl17-1* avec le double mutant *ubc35-1* et *ubc36-2* (knockout).

II Les responsables de la DDR constitutive chez *fb17*

Chez les plantes, l'un des régulateurs clefs de la DDR est le facteur de transcription SOG1, qui a été comparé en terme de fonction, au suppresseur de tumeur p53 chez les mammifères (Yoshiyama et al., 2009; Yoshiyama, 2015). L'activation de SOG1 dépend de son niveau de phosphorylation par la kinase ATM (Yoshiyama et al., 2013a, 2017), et lui permet de réguler (directement ou indirectement) plus de 300 gènes impliqués dans le cycle cellulaire, la réplication de l'ADN, la réponse aux stress abiotiques et la réparation de l'ADN en réponse à un stress génotoxique (Yoshiyama et al., 2009; Furukawa et al., 2010; Bourbousse et al., 2018; Ogita et al., 2018). Ainsi, la mutation *sog1* entraîne des déficiences au niveau de la réparation de l'ADN, de l'arrêt du cycle cellulaire et de l'activation de la mort cellulaire (Preuss et Britt, 2003; Yoshiyama et al., 2009; Furukawa et al., 2010). Le mutant *fb17* a précédemment été caractérisé pour l'induction constitutive de certains gènes de la DDR, la formation de micro-noyaux et de ponts chromosomiques lors de la mitose, ainsi que la présence de mort cellulaire constitutive au niveau des pointes racinaires (Noir et al., 2015). Lors de cette thèse, la DDR constitutive du mutant *fb17* a été caractérisée précisément. Ainsi, une approche transcriptomique a révélé que la mutation *fb17* conduit à une activation très large de nombreux gènes de la DDR (i.e ~60% des 1 443 gènes DE chez *fb17* ($-1,5 < \log_2 FC < 1,5$); Gentric et al., 2020). De plus, la perte de cette protéine entraîne une augmentation du nombre de lésions au niveau de l'ADN. Certaines données obtenues suggèrent que la DDR présente de façon constitutive chez le mutant *fb17* n'est toutefois pas dépendante de SOG1. En effet, l'induction transcriptionnelle constitutive des gènes de la DDR dans le mutant *fb17* n'est pas supprimée par la mutation *sog1* et de nombreux gènes ciblés par SOG1 peuvent encore être induits lors d'un traitement à la Zéocine dans le fond mutant *fb17*. Enfin, l'hypersensibilité du mutant *fb17* aux agents induisant des DSB et l'augmentation de la mort cellulaire au niveau des pointes racinaire ne dépendent pas de SOG1 (Gentric et al., 2020).

Ces dernière années, la caractérisation de mutants, tels que *wee1* ou *abo4-1*, dans le fond mutant *sog1*, a permis de mettre en évidence la présence d'une réponse DDR SOG1-indépendante chez les plantes (pour revue Nisa et al., 2019). Les acteurs clefs du cycle cellulaire, RBR1 et E2Fa, ont été caractérisés pour leur implication dans la régulation transcriptionnelle de nombreux gènes de la DDR (Figure 2.2.2 et 2.2.3 ; Verkest et al., 2014; Bouyer et al., 2018). La protéine RBR1 est notamment recrutée au niveau des sites consensus

E2F de nombreux promoteurs des gènes de la DDR (Bouyer et al., 2018a) et semble jouer un rôle de répresseur, puisque plusieurs gènes impliqués dans la DDR sont induits lorsque le niveau protéique de RBR1 est réduit dans des lignées RNAi ou dans le mutant hypomorphe *rbr1-2* (Horvath et al., 2017; Biedermann et al., 2017). Cette action répressive semble coordonnée avec E2Fa puisque, chez *Arabidopsis*, le gène *BRCA1* a été caractérisé pour être réprimé directement par RBR1 et le facteur de transcription E2Fa (Horvath et al., 2017). Selon notre analyse, en combinant les informations des sites de liaison du facteur de transcription E2Fa (Verkest et al., 2014) avec l'ensemble de données d'immunoprécipitation de la chromatine RBR1 (Bouyer et al., 2018a), ainsi que ceux de MYB3R3 (Kobayashi et al., 2015b) et SOG1 (Ogita et al., 2018) plusieurs des gènes de la DDR constitutivement induits dans *fb17* apparaissent être des cibles de RBR1/E2F (Figure 2.2.2 et 2.2.3). D'un point de vue fonctionnel, les lignées knockdown pour RBR1 présentent un niveau élevé de dommages à l'ADN en condition standard ainsi qu'une augmentation significative du niveau de fragmentation de l'ADN après traitement BLM (Biedermann et al., 2017; Horvath et al., 2017). De plus, la réduction de RBR1 fonctionnelle et la perte d'E2Fa entraînent une hypersensibilité aux agents induisant des DSB de l'ADN (Roa et al., 2009; Lang et al., 2012; Biedermann et al., 2017). Ainsi, la perte de la fonction FBL17 partage de nombreuses similitudes avec le phénotype des plantes *knockdown* pour RBR1 et *knockout* pour E2Fa, suggérant que la protéine F-box pourrait agir à ce niveau. Cependant, si les protéines RBR1 et E2F sont effectivement impliquées dans la régulation des gènes de la DDR chez *fb17*, cette régulation est plus compliquée que décrite jusqu'à présent. En effet, le mutant *fb17* présente une suraccumulation des protéines RBR1 et E2Fb (Figure 2.1.8), et si le double mutant *fb17-1 e2fa-2* ne présente pas de phénotype particulier (Figure 2.1.5), l'activation transcriptionnelle constitutive des gènes DDR dans *fb17* est seulement légèrement réduite par la mutation *e2fa* (Figure 2.2.4). Enfin, l'analyse d'IP-MS a permis de mettre en évidence un enrichissement très important des protéines E2Fb et RBR1 dans l'interactome de FBL17 (Tableaux 2.1.3 et 2.2.1). Ainsi, plusieurs études pourraient être réalisées pour comprendre la DDR constitutive du mutant *fb17* :

1. Tout comme lors de la régulation des gènes du cycle cellulaire, le complexe DREAM (RBR1-E2Fb-DPb) et le complexe RBR1-E2Fa pourraient réguler les gènes de la DDR de façon différente. Si le complexe RBR1-E2Fa réprimait ces gènes, le complexe RBR1-E2Fb-DPb

(dont RBR1 et E2Fb sont suraccumulés dans le mutant *fb17*) pourrait au contraire les induire. Ceci devrait être testé.

2. Puisqu'une légère baisse du niveau d'induction des gènes de la DDR dans le double mutant *fb17-1 e2fa-2* a pu être observée comparé à *fb17-1* (Figure 2.2.4), l'hypothèse d'une action redondante des E2F peut être soulevée et suggère la nécessité d'étudier les doubles et triple mutants *e2f* dans le fond mutant *fb17*.

III La protéine F-box FBL17 et *Physcomitrella patens*

L'intégrité génétique des individus est primordiale au maintien des espèces. Ainsi, chacun des grands règnes composant l'arbre universel de la vie de Carl Woese (les eucaryotes et les procaryotes composés des bactéries et des archées) possèdent des mécanismes de réparation de l'ADN plus ou moins bien conservés (pour revue DiRuggiero et Robb, 2004; Hanawalt, 2015). L'absence d'organisation de la chromatine chez les bactéries (Hanawalt, 2015), ainsi que certaines similarités entre les composants de la machinerie de réparation chez les archées et les eucaryotes suggèrent une évolution indépendante entre, d'une part, les bactéries et, d'autre part, les archées et les eucaryotes (DiRuggiero et Robb, 2004). Au sein des Eucaryotes, les plantes ont été caractérisées pour leur mécanisme d'adaptation aux conditions de stress génotoxiques. Ainsi, les plantes supérieures sont plus résistantes aux radiations ionisantes par rapport aux mammifères. En effet, suite à une exposition aux rayonnements γ , les cellules de tabac BY2 ne présentent qu'un tiers des DSB de l'ADN retrouvées lors d'un traitement identique chez les cellules d'ovaire de hamster chinois (Yokota et al., 2005). Chez une espèce plus primitive, la mousse *Physcomitrella patens*, de récentes études ont permis de mettre en évidence une nouvelle voie de réponse aux dommages à l'ADN, celle de la reprogrammation (Gu et al., 2020). Cette voie entraîne la dédifférenciation des cellules foliaires de *Physcomitrella* ayant subi des dommages à l'ADN et leur différenciation en protonema *via* la voie ATR. L'hypothèse proposée dans Gu et al (2020) est l'utilisation de cette voie par *Physcomitrella* afin d'échapper à un environnement génotoxique.

Avec comme objectif d'étudier le rôle de FBL17 chez la mousse modèle *Physcomitrella patens*, une étude phylogénétique de cette protéine F-box a été réalisée. De façon surprenante, FBL17 n'a pas été retrouvée chez *Physcomitrella*. En effet, elle est apparue avec les spermatophytes et est donc retrouvée chez les gymnospermes, les monocotylédones et

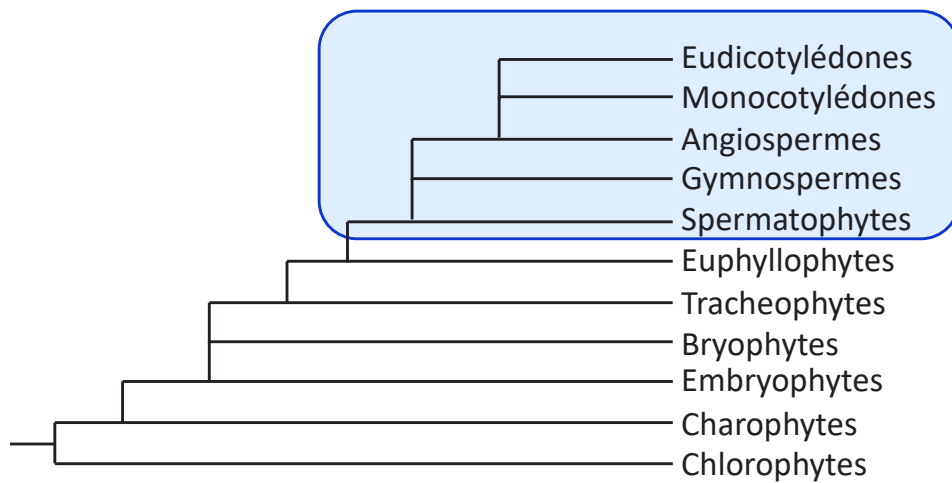
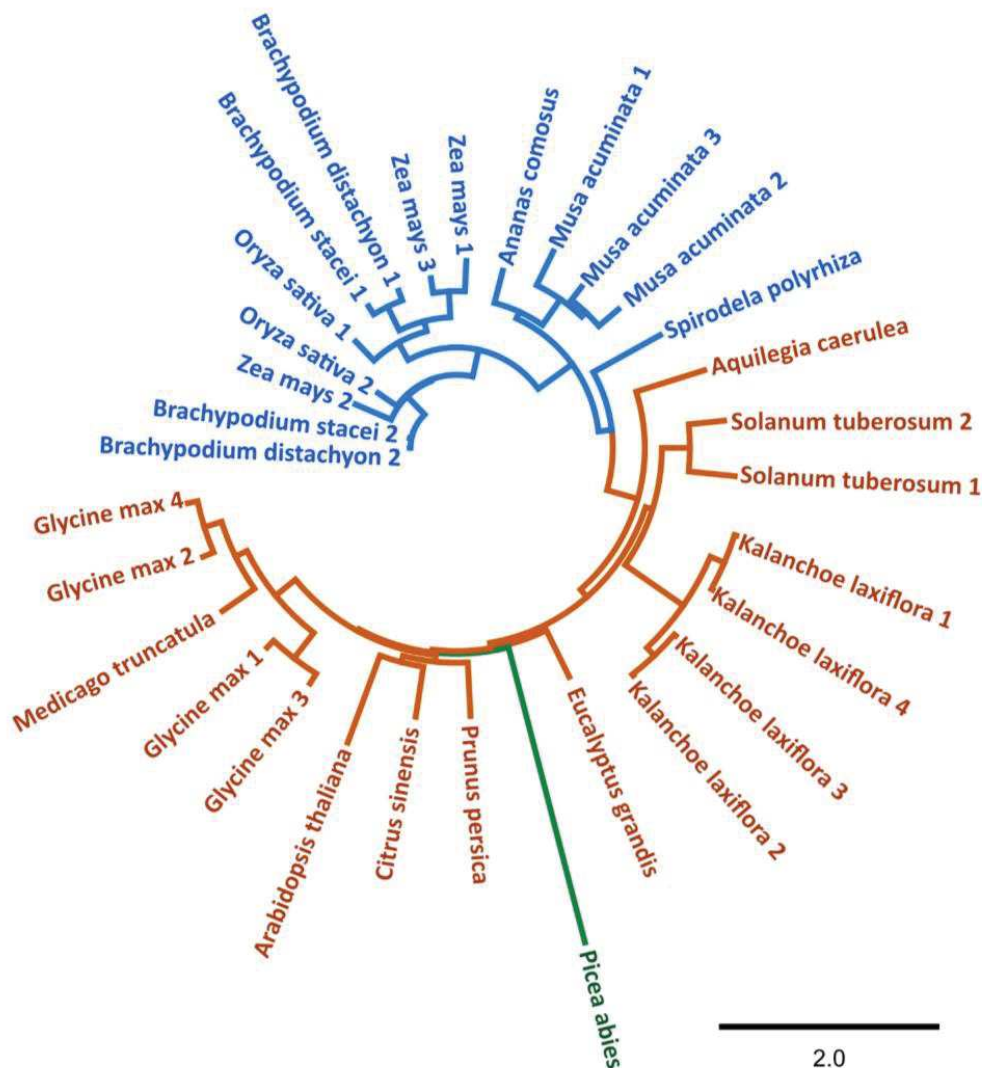
A**B**

Figure 3.1.2: Phylogénie de la protéine FBL17.

(A) Mise en évidence de l'apparition de la protéine FBL17 (en bleu) dans l'arbre phylogénétique des Viridiplantae. (B) Arbre phylogénétique de la protéine FBL17 construit avec le plugin PHYML dans Geneious (version 7.1 ; <http://www.geneious.com>). Les différents clades sont mis en évidence par groupes de couleurs, vert pour le gymnosperme, bleu pour les monocotylédones et orange pour les eudicotylédones. Les séquences sont issues de la plateforme Phytozome et Congenie. Seules les séquences présentant un score de Bits > 50 et une E value > 10^{-10} ont été sélectionnées. L'alignement des séquences a été réalisé avec le logiciel Muscle dans Geneious. La distance des branches représente le taux de substitution des acides aminés et a été calculée avec un test Chi². La barre d'échelle représente le nombre de changements par position d'acides aminés.

les dicotylédones (Figure 3.1.2). FBL17 étant l'homologue fonctionnel de Skp2 chez les mammifères, il serait intéressant d'identifier et d'étudier l'homologue fonctionnel de Skp2 et FBL17 parmi les 228 gènes codant potentiellement une protéine F-box chez *Physcomitrella* (Elzanati et al., 2017). Trois stratégies peuvent être utilisées. La première est l'identification de protéines F-box régulées au cours du cycle cellulaire et dont la transcription pique en phase S. La seconde est la présence d'un motif *E2F binding* sur le promoteur de cette F-box et la troisième l'identification d'un motif LxCxE au sein de cette protéine F-box. Une fois cet homologue identifié, son implication dans le cycle cellulaire et la DDR pourrait être étudiée. De plus, l'identification de cette nouvelle voie de réponse aux dommages à l'ADN chez *Physcomitrella* (Gu et al., 2020), ouvre la question de l'évolution de la DDR chez les plantes.

PARTIE 4 :
Matériels et Méthodes

Tableau 4.1.1: Liste des lignées mutantes et transgéniques utilisées

Mutants et lignées transgéniques	Ecotype	Mutagenèse	Sélection
<i>fb17-1</i>	Col-0	GABikat_170E02	Sulfadiazine/PCR
<i>brca1-1</i>	Col-0	SALK_014731	PCR
<i>atm-2</i>	Col-0	SALK_006953	PCR
<i>sog1-1</i>	Col-0/ler	EMS mutant	sequencing
<i>atr-2</i>	Col-0	SALK_032841	PCR
<i>wee1-1</i>	Col-0	GABI_270E05	PCR
Rbi	Col-0	<i>RNA silencing</i>	Hygromycine
amigoRBR	Col-0	<i>RNA silencing</i>	Fluorescence
<i>e2fa-1</i>	Col-0	MPIZ-244	PCR
<i>e2fa-2</i>	Col-0	GABI_348E09	PCR
<i>e2fb-1</i>	Col-0	SALK_103138	PCR
<i>e2fb-2</i>	Col-0	SALK_120959	PCR
1406	Col-0		Hygromycine
1445	Col-0		Hygromycine
IC1	Col-0		Hygromycine
IC6	Col-0		Hygromycine
IC9	Col-0		Hygromycine
35S:F17-GFP	Col-0		Kanamycine
<i>fb17</i> , pF17:F17-GFP	Col-0		Kanamycine + Sulfadiazine
35S:KRP2-GFP	Col-0		
pWEE1::GFP-WEE1	Col-0		Kanamycine
pBRCA1::BRCA1-GFP	Col-0		Norflurazon
pSOG1:SOG1-GFP	Col-0		Hygromycine
pRBR1:mcherryRBR1	Col-0		Fluorescence
pE2Fa:E2Fa-GFP	Col-0		
pE2Fb:E2Fb-GFP	Col-0		

Chapitre 1 : Matériels

I Matériel végétal

Toutes les lignées Arabidopsis utilisées dans ce manuscrit sont décrites dans le Tableau 4.1.1.

II Souches Bactériennes

La souche TOP10 d'*Escherichia coli* (Invitrogen) a été utilisée afin d'amplifier les plasmides et réaliser les clonages par choc thermique. Génotype : F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG.

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (PMP90) a été utilisée pour transformer les plantes d'*Arabidopsis*. Elle possède une résistance à la rifampicine et comporte le plasmide PMP90 Ti (*Tumor inducing*) désarmé qui encode les gènes *vir* nécessaires au transfert du T-DNA et lui confère une résistance à la gentamycine.

III Vecteurs et constructions binaires

L'ensemble des vecteurs utilisés sont associés à la technique GateWay (Invitrogen) décrite dans la partie Méthodes (Partie 4, II). Les différentes constructions réalisées sont décrites dans le Tableau 4.1.2.

Le pDONR221 (4762 paires de bases) porte un gène de résistance à la kanamycine. Le plasmide contient les sites de recombinaison *attP1* et *attP2* entre lesquels se trouve le gène suicide *ccdB*. La séquence complète de ce plasmide est disponible sur le site www.invitrogen.com. Pour créer le clone pENTRY(221)-FBL17g, le plasmide pDONR221 a été recombiné avec le fragment PCR contenant la séquence génomique de FBL17 (2876 paires de bases) flanquée des sites de recombinaison *attB1* et *attB2*. Pour créer le clone pENTRY(P4-P1R)-pFBL17, le plasmide pDONR221 P4-P1R (contenant les sites de recombinaison *attP4* et *attB1*) a été recombiné avec le fragment PCR contenant la séquence promotrice de FBL17 (1173 paires de bases) flanquée des sites de recombinaison *attB1* et *attB4*. La liste des amorces utilisées pour amplifier le promoteur et le gène de FBL17 et introgresser les

Tableau 4.1.2 : Liste des constructions réalisées.

P4-P1R	attB1 attB2	R2-L3	Vecteur binaire	Construction	Résistance (bactérie)	Résistance (plante)
pENTRY(P4-P1R)-pFBL17	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-3xFlag	pB7m34GW,0	pFBL17:FBL17-3xFLAG	Spectinomycine	BASTA
pENTRY(P4-P1R)-35S	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-3xFlag	pB7m34GW,0	P35S:FBL17-3xFLAG	Spectinomycine	BASTA
pENTRY(P4-P1R)-pFBL17	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-mRFP	pB7m34GW,0	pFBL17:FBL17-mRFP	Spectinomycine	BASTA
pENTRY(P4-P1R)-35S	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-mRFP	pB7m34GW,0	P35S:FBL17-mRFP	Spectinomycine	BASTA
pENTRY(P4-P1R)-pFBL17	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-3HA	pB7m34GW,0	pFBL17:FBL17-3xHA	Spectinomycine	BASTA
	pENTRY(221)-FBL17g		pGWB14	P35S:FBL17-3xHA	Spectinomycine	Hygromycine
pENTRY(P4-P1R)-pFBL17	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-eGFP	pB7m34GW,0	pFBL17:FBL17-eGFP	Spectinomycine	BASTA
pENTRY(P4-P1R)-35S	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-eGFP	pB7m34GW,0	P35S:FBL17-eGFP	Spectinomycine	BASTA
pENTRY(P4-P1R)-pFBL17	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-mcherry	pB7m34GW,0	pFBL17:FBL17-mcherry	Spectinomycine	BASTA
pENTRY(P4-P1R)-35S	pENTRY(221)-FBL17g	pENTRY(R2-L3)-mcherry	pB7m34GW,0	P35S:FBL17-mcherry	Spectinomycine	BASTA
	pENTRY(221)-FBL17g		pGWB617	P35S:FBL17-4xMYC	Spectinomycine	BASTA

séquences *att* dans les vecteurs sont décrites dans le Tableau 4.1.3. Les vecteurs pENTRY(R2-L3)-3xFlag, pENTRY(R2-L3)-mRFP, pENTRY(R2-L3)-3HA, pENTRY(R2-L3)-eGFP, pENTRY(R2-L3)-mcherry, pENTRY(P4-P1R)-35S ont été réalisés par Plant Systems Biology (VIB, Ghent, Belgique) et les détails de ces vecteurs sont disponibles sur <https://gatewayvectors.vib.be/>. La transcription des constructions insérées est arrêtée par un terminateur 35S dans les pENTRY(R2-L3).

Le vecteur binaire pGWB617 (P35S-*att*R1-Cmr-*ccdB*-*att*R2-4xMyc-TNOS) comporte une résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries et un gène de résistance au BASTA pour celle des plantes. pGWB14 (P35S-*att*R1-Cmr-*ccdB*-*att*R2-3xHA-TNOS) comporte une résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries et un gène de résistance à l'hygromycine pour celle des plantes. Ces vecteurs proviennent de la collection Nakagawa (Nakagawa et al., 2007). Le vecteur binaire pB7m34GW,0 comporte une résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries et un gène de résistance au BASTA pour celle des plantes. Le vecteur binaire pH7m34GW,0 comporte une résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries et un gène de résistance à l'hygromycine pour celle des plantes. Ces vecteurs ont été désignés par la société Plant Systems Biology (VIB, Ghent, Belgique) et les détails de ces vecteurs sont disponibles sur <https://gatewayvectors.vib.be/>.

IV Anticorps utilisés pour les Western Blots et l'immunomarquage

Les anticorps primaires et secondaires utilisés lors des différentes études par Western Blot et immunomarquage et leur condition d'utilisation sont décrits dans le Tableau 4.1.4.

V Composés chimiques et antibiotiques

V.A Antibiotiques et herbicides de sélection des bactéries/plantes

La liste des antibiotiques et herbicides utilisés pour sélectionner les bactéries et les plantes est présentée ci-après avec leur concentration d'utilisation.

Tableau 4.1.3: Amorces utilisées pour le clonage.

Nom	Séquence (5' -> 3')	Fonction
attb4-pFBL17-p4R1_fwd_NG612	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGCATAAT GTCGTGTGAAGATATGATCGCTGT	Clonning (BP reaction)
attb1-pFBL17-p4R1_rev_NG612	GGGGACTGCTTTTTGTACAAACTTGCGTGAG ATTTGGGAGAGGGAGAGA	Clonning (BP reaction)
attb2-FBL17g-p221_fwd_NG612	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGG ATGCAACCTCAGCCGCAT	Clonning (BP reaction)
attb1-FBL17g-p221_rev_NG612	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAT GTATAATGGTACACATTTCTTTCTCCAAC	Clonning (BP reaction)
attb1-FBL17g-p221_fwd2_NG612	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGG ATGCAACCTCAGCCGCATATTTCTC	Clonning (BP reaction)
attb2-FBL17g-p221_rev2_NG612	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGAT GTATAATGGTACACATTTCTTTCTCC	Clonning (BP reaction)
pFBL17-1_fwd_NG612	CTGTCCTGCAATACTTTTGATCGTT	sequencing
pFBL17-2_fwd_NG612	ACAAGAAATTCAACACGATCACCAA	sequencing
pFBL17-3_fwd_NG612	GCGACACGATTTCCAGATTCTTATT	sequencing
pFBL17-4_fwd_NG612	TTTAGCTTCGGTGTCTTTCGAAATC	sequencing
FBL17g-5_fwd_NG612	GAGGAAGTTACAATTGCGGTAGATG	sequencing
FBL17g-6_fwd_NG612	CGAGAGGTGATTCTTCTTCTATCGT	sequencing
FBL17g-7_fwd_NG612	GCTAATAAACGAGGACTAACAAGCC	sequencing
FBL17g-8_fwd_NG612	TACTGCTGTGAATTTAGGTTTGTC	sequencing
FBL17g-9_rev_NG612	TTGTAACCTTGGACATTGTAGCACC	sequencing
FBL17g-10_fwd_NG612	CTCGGGATGATCTGCGATGTC	sequencing
pDR M13_F (pDONR221)	GTAAAACGACGGCCAG	sequencing
pDR M13_R (pDONR221)	CAGGAAACAGCTATGAC	sequencing
MD30_For (pDONR et pENTRY)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT	sequencing
MD31_Rev (pDONR et pENTRY)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT	sequencing

Agent de sélection	Solvant	Solution stock (mg/ml)	Concentration finale (µg/ml)
BASTA	Eau	10	10
Gentamycine	Eau	100	50-100
Hygromycine	Eau	500	70 µL/L
Kanamycine	Eau	100	50
Norflurazon	DMSO	5 mM	5 µM
Rifampicine	DMSO	100	50
Spectinomycine	Eau	100	100
Streptomycine	Eau	30	30
Sulfadiazine	Eau	10	5

V.B Composés chimiques appliqués sur les plantes

La liste des produits chimiques utilisés pour traiter les plantules d'Arabidopsis est présentée ci-dessous avec leur condition d'utilisation.

Composé chimique	Solvant	Solution stock	Concentration finale	Fournisseur
MLN4924	DMSO	25 mM	25 µM	Activebiochem
MG132	DMSO	50 mM	100 µM	Sigmaaldrich
Bortezomib (PS-341)	DMSO	50 mM	50 µM	Selleckchem
Cycloheximide	Ethanol 100%	100 mM	100 µM	Sigma
Zéocine	Eau	70,05 mM	5 ou 20 µM	Invitrogen
Cisplatine	NaCl	1,67 mM	15 µM	Sigma
Hydroxyurée	Eau	100 mM	5 mM	Sigma

V.C Microscope confocal

Les données de microscopie confocale ont été réalisées à partir des objectifs x20, x40 en immersion avec l'eau et x60 en immersion sous huile avec le microscope confocal LEICA TCS SP8 (Leica Microsystem). Le lasers Argon a permis l'excitation des protéines GFP (488 nm) et Cyn5 (476 nm), le laser DPSS 561 celle des protéines mcherry, RFP ou le marquage au Iodure de propidium et le laser UV (405 nm), la révélation du marquage au DAPI. Les images de microscopie ont été traitées en utilisant le logiciel Fiji (ImageJ 1.52p ; <http://imagej.nih.gov/ij>).

Tableau 4.1.4: Liste des anticorps utilisés

Epitope reconnu	Catégorie	Type	Anticorps secondaire couplé à HRP	Dilution	Expérience	Référence
@GFP (JL8)	Primaire	Monoclonale	Goat anti Mouse	1:2000	WB	Clontech
@GFP	Primaire	Monoclonale	Goat anti Mouse	1 :500	Immunomarquage	Life Technologies
@RBR1	Primaire	Polyclonale	Goat anti Chicken	1 :7000	WB/ Immunomarquage	Agrisera
@RBR-P	Primaire	Polyclonale	oat anti Rabbit	1:2000	WB	Cell Signaling technology
@γH2AX	Primaire	Polyclonale	Goat anti Rabbit	1 :500	Immunomarquage	Davids biotechnologie
@E2Fa	Primaire	Polyclonale	Goat anti Rat	1 :500	WB	(Leviczky et al., 2019)
@E2Fb	Primaire	Polyclonale	Goat anti Rabbit	1 : 500	WB	(Leviczky et al., 2019)
goat anti-chicken	Secondaire			1 :10000	WB	
goat anti-mousse	Secondaire			1 :10000	WB	Invitrogen
goat anti-rabbit	Secondaire			1 :10000	WB	Invitrogen
goat anti-rabbit Alexa Fluor 568	Secondaire			1:300	Immunomarquage	Life Technologies
goat anti-rabbit Cyn5	Secondaire			1:500	Immunomarquage	Life Technologies
goat anti-mouse Alexa Fluor 488	Secondaire			1:200	Immunomarquage	Interchim
goat anti-chicken Alexa Fluor 568	Secondaire			1:300	Immunomarquage	Life Technologies
goat anti-chicken Alexa Fluor 568	Secondaire			1:350	Immunomarquage	Life Technologies

Chapitre 2 : Méthodes

I Condition de culture

I.A Culture en *in vitro*

Les graines destinées à la culture *in vitro* sont stérilisées dans une solution à 70% d'éthanol. Après trois lavages de 5 min avec cette solution, elles sont rincées à l'éthanol 100% et séchées sous hotte stérile. Les graines sont ensuite semées sur du milieu MS supplémenté de 0,8% ou 1% d'agar avant d'être stratifiées 2 jours à 4°C dans le noir. Les graines sont alors transférées dans une chambre de culture avec 16 heures de jours à 21°C, 8 heures de nuit à 18°C et 80% d'humidité.

- Milieu MS (Murashide et Skoog) : MS avec micro- et macro-éléments M0255 (KALYS), 10 g/L de sucrose, pH 7,5

I.B Sur terre

Les plantules issues de la culture *in vitro* sont transférées sur terre et cultivées en terre dans des chambres de culture avec 16 heures de jours à 21°C, 8 heures de nuit à 18°C, 80% d'humidité et une lumière fluorescente (49W/965, Osram Biolux).

II Analyse phénotypique

II.A Etude de l'élongation racinaire

Les graines sont germées et cultivées en culture *in vitro* sur des boîtes verticales avec du milieu MS 1% (w/v) et transférées, après 5 jours, sur du milieu MS 1% avec ou sans Zéocine 5 µM. L'élongation racinaire est suivie pendant 7 jours à la même heure. Le logiciel Fiji (ImageJ 1.52p ; <http://imagej.nih.gov/ij>) a été utilisé afin de mesurer les racines. Le logiciel R a permis de calculer la moyenne arithmétique des élongations racinaires.

Tableau 4.2.1: Détails des mixes et programmes d'amplification PCR

Mix Phire II		Programme Phire II		
	20µL		T°C	Secondes
H ₂ O	12,6	Dénaturation initiale	98	30
Tampon de réaction Phire x5	4	Dénaturation	98	8
dNTP	0,4	Hybridation	56	10
Amorces	1/amorces	Elongation	72	60
ADN polymérase Phire	0,1	Elongation finale	72	300
ADN	2			

X35

Mix Phusion		Programme Phusion		
	25µL		T°C	Secondes
H ₂ O	15,96	Dénaturation initiale	98	60
Tampon de réaction Phusion x5	5	Dénaturation	98	15
dNTP (10mM)	0,5	Hybridation	68/64/60	15
Amorces (10µM)	1,25/amorces	Elongation	72	120
ADN polymérase Phusion	0,25	Elongation finale	72	600
ADN	<250 ng			

X 28

Tableau 4.2.2 : Amorces utilisés pour le génotypage.

Nom	Séquence (5' -> 3')
LBb1.3_TDNA-SALK_F	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
GABI_TDNA-GABI_F	CCCATTGGACGTGAATGTAGA
<i>fbl17-1_F</i>	GAAGTCTTGATCTGAGTGGG
<i>fbl17-1_R</i>	CCAACTTCCTTCTCTCCCTG
<i>brca1-1_F</i>	CAAAGAGTCGCTTTGTTCTG
<i>brca1-1_R</i>	TATCACTTGCTTTTCAACGG
<i>atr-2_F</i>	GCAGCAAAAATTTCTTGTTG
<i>atr-2_R</i>	ACTTCAAGGGTCCGATGTTT
<i>atm-2_F</i>	ATCCATGTGGTTCAGTCTTGC
<i>atm-2_R</i>	TTGGTATCCTGCAGAGGAAAG
<i>wee1-1_F</i>	GGATCACGATCCATCATTGTC
<i>wee1-1_R</i>	TCACGGACTTTCATGAAATCC
<i>sog1_F</i> (séquençage)	ATGGGACGGTGTCTCACTTC
<i>sog1_R</i> (séquençage)	CTGTTGTGGCTGCTGGTAGA
FBL17_cDNA_R	TCGCGTCAAAATCACTCTCG
pFBL17_F	CCACGTGACGTGATCTATTCC
p35S_F	TTCGCAAGACCCTTCTCTATA
<i>e2fa-1_TDNA-MPIZ_F</i>	CTCGGGAATGGCGAAATCAAGGGCATC
<i>e2fa-2_TDNA-GABI2_F</i>	CCCATTGGACGTGAATGTAGACAC
<i>e2fb-1_TDNA-SALK_F</i>	GATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC
<i>e2fa-1_F</i>	ACGAAAGAGAAAGGCGACAA
<i>e2fa-1_R</i>	CATTGTATGGAACGCACCTG
<i>e2fa-2_F</i>	TCCTGGTGGTGGAGTACTCAC
<i>e2fa-2_R</i>	GGTTTCCAGGTCTGTCTTTCC
<i>e2fb-1_F</i>	TGCGAACTCTGTTATGCAATG
<i>e2fb-1_R</i>	GCAAGCATAACGTTTGAGGAC
<i>e2fb-2_F</i>	GTGCCTTTACAGCTATCAGCG
<i>e2fb-2_R</i>	TTGGATTCTTCCATTTGATG

II.B L'étude de la mort cellulaire

L'étude de la mort cellulaire a été réalisée sur des plantules de 8 jours traitées ou non avec de la Zéocine 5 μM pendant 3 jours. Le marquage de la mort cellulaire a été réalisée comme décrit précédemment (Biedermann et al., 2017). La quantification de la mort cellulaire a été effectuée avec le logiciel Fiji (ImageJ 1.52p ; <http://imagej.nih.gov/ij>) sur une zone de 15 000 μm^2 (200 μm de long à partir du QC et 75 μm de large). Le logiciel R a permis de calculer la moyenne arithmétique des aires de mort cellulaire.

III Analyse des acides nucléiques

III.A Extraction de l'ADN pour le génotypage

L'ADN des lignées mutantes *e2f* (*e2fa-1*, *e2fa-2*, *e2fb-1*, *e2fb-2*) est extrait dans 300 μL de tampon Edwards. Les échantillons sont centrifugés 10 min à 3700 rpm et 100 μL de surnageant sont transférés dans 80 μL d'isopropanol et mélangés délicatement avant d'être centrifugés 15 min à 3700 rpm. Les culots sont séchés pendant 15 min à 37°C, puis resuspendus dans de l'eau. L'ADN des autres lignées est extrait dans 300 μL de tampon Magic, ne nécessitant que l'étape de broyage.

- Tampon Edwards : 200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA et 0.5% SDS
- Tampon Magic : 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10% sucrose

III.B Amplification de l'ADN par PCR

L'amplification PCR (*Polymerase chain reaction*) a été utilisée pour le clonage et le génotypage. L'ADN polymérase Phusion High-Fidelity (ThermoFisher Scientific) a été utilisée pour amplifier avec une grande fidélité les séquences promotrices et génomiques de *FBL17*. L'ADN polymérase Phire Hot Start II (ThermoFisher Scientific) a été utilisée pour le génotypage. Les conditions PCR (mix et programmes) sont décrites dans le Tableau 4.2.1. La liste des amorces utilisées pour le génotypage est présentée dans le Tableau 4.2.2. Les amplifications PCR sont analysées par électrophorèse sur gel d'agarose (entre 1 et 2%) dans du TAE 1X. L'ADN est marqué avec du Bromure d'éthidium (BET) et révélé sous UV.

Tableau 4.2.3: Amorces utilisées pour les qRT-PCR.

Nom	Séquence (5' -> 3')		Nom	Séquence (5' -> 3')	
TIP41	GTGAAAACTGTTGGAGAGAAGCAA	F	KRP6	GAAACCGAAACCGAAACCTC	F
AT4G34270	TCAACTGGATACCCTTTCGCA	R	AT3G19150	CCCTCACTCACTGGACTCGT	R
SAND	AACTCTTATGCAGCATTTGATCCACT	F	SAG101	AGCTCACGCCATGGAGTCTTCTTC	F
AT2G28390	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	R	AT5G14930	ACCACAAGCTTCCCAAGTGCAG	R
WEE1	TGGTGCTGGACATTTCAAGTCGG	F	WRKY48	GGTTTGCCTTCTGACGAAGAGC	F
AT1G02970	CAAGAGCTTGCACCTTCCATCATAG	R	AT5G49520	TGGTGCAACGGTAATAGCTTCTGG	R
SOG1	CCACCTGAGTTTCGTCTGAGC	F	BRL3	CGTATCTGTCAGCCTTTGATTCCG	F
AT1G25580	TCCCCAAGCGAGAAAGC	R	AT3G13380	ACCGGATATGAGCTTGGAAACGATG	R
FBL17	CTCGGGATGATCTGCGATGTC	F	AGO2	TGGTTTCTGAACCCGTTCTGTAG	F
AT3G54650	GACTTGGATTCTCTACAAAGGTCG	R	AT1G31280	AAGTCGCAACTTGCACCGATGG	R
ATM	TGATCATCCATACCATAAATCTTGC	F	CYCB1,1	CCCATATGGACCAGCACTCT	F
AT3G48190	GCGTTGGTTATCCTTGATACGG	R	AT4G37490	CTTGTGCTTCCATTGCTGA	R
ATR	TGCCATTAGATTGACCCAGA	F	GMI1	TGCGTTTAAGCCTGACTTGTGC	F
AT5G40820	CCCTCATGAAGATGCCCTCA	R	AT5G24280	GGAAGCTATACCAGAACCCTCATC	R
BRCA1	CATGTGCCTTTTGTGAGTGTCA	F	CDKB1,1	CAACTGGTGTGACATGTGGTCTG	F
AT4G21070	AAATCCGCAGAGACAGGTTCA	R	AT3G54180	TCAGTTGGTGTTCCTAGCAACCTG	R
RAD51A	GCTCATGCCACCACAACAAG	F	RAD51D	AGCATCCCACACGTGAGACTTTC	F
AT5G20850	GGCAAACATGGCGAGCTTAT	R	AT1G07745	TTGGCCTGAAGGCAAGGATGTG	R
PARP2	TATGCCAACACTGGCGCTAA	F	MSH4	TGAGAACAGAGCCAAAGAGGTTGG	F
AT4G02390	TCATGTCTCCAAAGCAACCTC	R	AT4G17380	AGATGCAGTGAAGCCGATCTTAGG	R
LIG4	TTGCAGCAGAAAGCAGTGGA	F	MSH5	ACGAGAGCTGCTTGCCTGTTTC	F
AT5G57160	TGGATGACATCTCGCTGACG	R	AT3G20475	TCTGTGTCTGGCCTAAGAACGC	R
XRI1	TTCTCTGCAATCTTAAATCAAGTGCT	F	MLH1	ACGACGGTCACGGTATTAGACG	F
AT5G48720.02	AAGCTGAGACCCCTCGGGTAA	R	AT4G09140	AGCTTCGATGTTGTATGTCTCTCG	R
SYN2	CGTTTTTGAACAGAGGGAAAGA	F	DDB2	TTGCCAAGCCGAGAGATTGTTTC	F
At5G40840.2	TCCACGTATCCTTTGGTCTTCAA	R	AT5G58760	TGAGTGACTCCGAGGTATCCTTAG	R
RAD17	GTTGCCACTGAAAATGGATGC	F	LIG1	TGACGCTTCTGTTGATGTTGGC	F
AT5G66130	TCCGTCCTCACAAAATCTAACACA	R	AT1G08130	TGCAGGCTCATAGGTAGCATCTG	R
POL2A	GCCGATGAGGTGCAACAGA	F	UVH1	TGTGGCTTGCAAAGATGAACGG	F
AT1G08260.1	GGGCATTAACAGCCAAGTTATGG	R	AT5G41150	TCCATTCTTCCCGCATTACCTTC	R
NSE4A	TCTTGCCAAAGATGGACGAGTTG	F	PCNA1	GGCAGAACACAACCTGTAGACAAGC	F
AT1G51130	TCAGGTGCATTTCTCGGCATGG	R	AT1G07370	TGGAGTTGCCTTTGTGAAGGA	R
SMR7	GCCAAAACATCGATTGCGGGCTTC	F	XRCC1	GTCCCAAGATGCTAATCGAGA	F
AT3G27630	TCGCCGTGGGAGTGATACAAAT	R	AT1G80420	GATGGTGTTCCTTCTTCTG	R
RPA70C	ACTGACTTGGCAGCAGGAATGC	F	KU70	GGTGACGCAGATGATGGAAA	F
AT5G45400	TCCTTCGAGTCTGGATGAGATTGC	R	AT1G16970	TGTCTCAGTTCGACCACAGTCA	R
RPA1E	ATGTCATCAAGGGTCGAAGGATTG	F	KU80	TCGTAAAGGCTGCGTCTTGG	F
AT4G19130	TTTCTCCTGGAACAGGATGCC	R	AT1G48050	TTGGCATAACTGAATAGATGGTTCA	R
TIL1	ATCCACTGGAAGTGAACCCAGAGG	F	FAN1	TCTCTCATATGGCGCGTTGA	F
AT1G08260.2	ACAGAGTAGGAGGCCATTGTCTGG	R	AT1G48360	CAATGCATTTGTAAGTTGGGTATTTGA	R
GR1	TGATTGACGACGAGACACAGG	F	EDA18	AGGCCTCGGACTTATTGGGAAG	F
AT3G52115	AATTCGCTGTCTGATGGACTCG	R	AT2G34920	AAACCCGAAACCGTTCTTCTCTC	R
TSO2	TTTCGCTTGCCTCGAAGGTATC	F	UBP21	TCCCATCAGAAACGCCAAGGAAC	F
AT3G27060	AGGCATGAGTCCTCGTTCTTCAG	R	AT5G46740	AGGATCTGGAGCAGAAGCAGCAAC	R

III.C Extraction des ARN et traitement à la DNase

Environ 100 mg de plantules congelées dans l'azote liquide sont broyées en présence de billes de verres (1,7-2,1 mm) par le Silamat (Ivoclar Vivadent). La poudre est resuspendue dans 1 mL de réactif Trizol (Sigma-Aldrich). Après avoir bien agités les échantillons, 200 µL de chloroforme (Sigma-Aldrich) sont ajoutés avant de vortexer les tubes pendant deux minutes et de réaliser une centrifugation de 15 minutes à vitesse maximale à 4°C. Le surnagent est prélevé et transféré dans un nouveau tube avant de précipiter les ARN en y ajoutant 500µL d'isopropanol 100%. Les tubes sont agités délicatement à la main et incubés 20 minutes à température ambiante. Une centrifugation de 10 minutes à vitesse maximale est réalisée afin de culoter les ARN. Les culots sont lavés dans 1 mL d'éthanol 75% puis centrifugés 5 min à 7500g avant d'enlever le surnageant. Cette étape est réalisée deux fois puis les culots sont séchés pendant 10 minutes et sont resolubilisés dans 25µL d'eau. Les ARN sont alors quantifiés en utilisant le nanodrop (ThermoFisher Scientific).

III.D Quantitative real-time PCR

Un traitement à la DNase est réalisé sur 1µg des ARN totaux obtenus lors de l'extraction avec la DNAase I (ThermoFisher Scientific). Les cDNA sont obtenus en utilisant le kit de transcription inversée (Applied Bioscience) et sont dilués deux fois avant de réaliser la qPCR. Le master mix SYBR Green (Roche) est utilisé pour réaliser la qPCR sur le LightCycler 480 (Roche) en suivant les instructions. La valeurs moyenne de trois réplicats expérimentaux est utilisée dans les graphiques et normalisée à partir des contrôles internes Sand et TIP41 (Tableau 4.2.3). Toutes les amorces utilisées pour les qRT-PCR sont listées dans le Tableau 4.2.3.

III.E Séquençage des ARN

III.E.1 Extraction d'acide nucléique

L'ARN total a été extrait en utilisant une solution de Trizol (Invitrogen) à partir de plantules *fb17-1* et Col-0 âgées de 10 jours cultivées en *in vitro*, avec une extraction réalisée

comme décrit ci-dessus et complétée par un deuxième traitement au phénol/chloroforme. Trois réplicats biologiques ont été utilisés comme matériel de départ. Les concentrations d'ARN ont été déterminées avec un fluoromètre QuBit (Thermo Fisher Scientific). L'intégrité de l'ARN a été vérifiée à l'aide du Bioanalyzer 2100 (Agilent).

III.E.2 Préparation de banque d'ADNc

Les ARNm ont été isolés des ARN totaux en utilisant le module d'isolation magnétique des ARNm Poly(A) NEBNext (NEB) pour la préparation des bibliothèques d'ARNm. Les bibliothèques de séquençage ont été préparées en utilisant le kit de bibliothèques d'ARN Colibri pour Illumina (Invitrogen).

III.E.3 Séquençage et analyse de données

Les bibliothèques ont été séquencées en utilisant le système Illumina Nextseq 500 (mode *single-end* 1x75 pb). Les données RNA-seq ont été déposées dans la base de données ArrayExpress d'EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) sous le numéro d'accèsion E-MTAB-9050. Pour l'analyse bioinformatique, le prétraitement des données de séquençage a été réalisé à l'aide de TrimGalore (v0.5.0; https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/trim_galore); les lectures ont été traitées en supprimant les séquences adaptatrices Illumina à l'aide de Cutadapt v1.18 et la qualité a été évaluée à l'aide de FastQC v0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Les lectures avec une qualité de 0,30 et une longueur de lecture minimale de 50 pb ont été conservées. Les données ont été cartographiées avec le génome d'*Arabidopsis* (TAIR10) à l'aide du logiciel Hisat2 (v2.1.0) (Kim et al., 2015) et triées avec Samtools v1.9 (Li et al., 2009). Pour chaque gène, une quantification de lecture a été réalisée à l'aide du logiciel HTSeqcount v0.11.0 (avec le paramètre « *intersection nonempty* »; Anders et al., 2015). L'analyse d'expression différentielle par comparaison par paires (*pairwise*) a été réalisée à l'aide du package R DESeq2 (v1.24.0; Anders et Huber, 2010) et le paramètre *betaprior* défini sur *true*. Les analyses d'enrichissement GO et KEGG ont été effectuées à l'aide du logiciel ShinyGo v0.61 (Ge et al., 2019).

IV Analyses protéiques

IV.A Western Blot

IV.A.1 Extraction protéique

Environ 100 mg de plantules congelées dans l'azote liquide sont broyées en présence de billes de verres (1,7-2,1 mm) par le Silamat (Ivoclar Vivadent). La poudre est resuspendu avec 200 μ L de tampon Laemmli chaud (95°C) et dénaturée 5 min à 95°C avant d'être centrifugée 5 min à 15 000 rpm. Le surnageant (extrait total de protéines) est récupéré et utilisé pour réaliser la quantification protéique et le western blot.

- Tampon Laemmli : 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 3% SDS, 10% glycérol, 0,1% bleu de bromophénol, et 100 mM DTT.

IV.A.2 Quantification protéique (Popov et al., 1975)

10 μ L d'extrait total de protéine sont dilués et mélangés avec 190 μ L d'eau avant d'ajouter 1 mL de solution Amidoblack. Les tubes sont alors centrifugés à température ambiante pendant 15 min à 15 000 rpm et le surnageant est éliminé. Les culots sont rincés avec la solution de lavage puis recentrifugés avant d'éliminer le surnageant. Les culots sont alors séchés à température ambiante pendant 10-15 min puis dissous dans 1 mL de solution NaOH à 0,2M. 200 μ L sont utilisés pour mesure de la DO à 630 nm et la concentration de l'échantillon est calculée en fonction de la courbe obtenue à partir de la gamme BSA.

- Solution Amidoblack : 10% Acide acétique (v/v), 90% méthanol (v/v), et 0,05% Amidoblack (w/v)
- Solution de lavage : 10% Acide acétique (v/v), et 90% éthanol (v/v)

IV.A.3 Immunodetection par Western Blot

Les protéines totales sont séparées par SDS-PAGE en utilisant les gels précoûlés Criterion (4-15% Criterion™ TGX Stain-Free™, BioRad). Les protéines totales sont d'abord séparées dans le tampon de migration pendant 15 min à 50V puis à 120V jusqu'à l'obtention de la séparation souhaitée. Elles sont transférées sur une membrane de type Immobilon-P PVDF (GE

Healthcare-Life Science) à 270 mA pendant environ 1h30 dans le tampon de transfert. La membrane est alors incubée 1h avec la solution TBS-T et 5% de lait à température ambiante. Une fois la saturation de la membrane terminée, l'anticorps primaire est ajouté et laissé toute la nuit à 4°C. La membrane est rincée trois fois 20 min avec du TBS-T avant d'être incubée 2h à température ambiante avec l'anticorps secondaire puis rincée à nouveau trois fois. La liste des anticorps utilisés est présentée dans le Tableau 4.1.4. La révélation se fait en utilisant le substrat chimioluminescent Clarity (BioRad) et le signal est détecté par l'imageur Fusion FX (Vilber). La quantité totale de protéine est mise en évidence par une coloration avec la solution de bleu de Coomassie.

- Tampon de migration : Tris-Glycine : 25mM Tris-base, 250mM glycine, 0,1% SDS
- Tampon de transfert : 25mM Tris-base, 192 mM Glycine, 15%(v/v) éthanol
- Tampon TBS-T (Tris-buffer saline-Tween) : 20mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20 (Sigma-Aldrich)
- Solution de bleu de Coomassie : 90% éthanol, 10% acide acétique, 0,05% de bleu brillant (R250, Sigma-Aldrich)

IV.B Immunomarquage

La fixation et l'immunocoloration ont été effectuées comme décrit précédemment (Batzenschlager et al., 2015) en utilisant des semis cultivés *in vitro* âgés de 6 jours. Les anticorps primaires utilisés sont l'anticorps anti- γ H2AX, l'anticorps anti-GFP et l'anticorps anti-RBR1. Selon les expériences, les anticorps secondaires conjugués pour la détection de γ H2AX étaient soit le Alexa Fluor 568 pour les signaux rouges ou le Cyn5 pour les signaux violets. Pour la détection de GFP et RBR1, les anticorps secondaires conjugués utilisés étaient respectivement l'Alexa Fluor 488 pour le signal vert et l'Alexa Fluor 568 pour le signal rouge. La liste des anticorps utilisés est présentée dans le Tableau 4.1.4.

IV.C Co-immunoprécipitation et Spectrométrie de Masse de partenaires protéiques

IV.C.1 Condition de culture et traitement

Des plantules de cinq jours sont rincées une fois dans du milieu MS liquide et avant d'être transférée dans une solution de MS liquide avec de la Zéocine (20 μ M). Elles sont remises en

logette *in vitro* pour 1 heure sous légère agitation (<10 rpm) avant d'y ajouter du MLN pour 15 heures supplémentaires. Après ce traitement de 16h, les plantules sont récoltées et essuyées délicatement avant de peser 3g de matériels et de le plonger dans l'azote liquide.

IV.C.2 Extraction protéique

L'extraction protéique est réalisée en chambre froide. Le matériel végétal congelé est broyé dans un mortier, préalablement refroidi à l'azote liquide, jusqu'à l'obtention d'une fine poudre blanche. Cette poudre est transférée dans un nouveau mortier contenant le tampon Clavel modifié (3 mL/g de matériel) ainsi qu'un peu de poudre de quartz et de PVP (Polyvinylpyrrolidone) et broyée en continu pendant 20 min. La préparation est transférée dans des tubes Eppendorf de 2mL et centrifugée à 4°C pendant 15 min à 20 000g. Le surnageant est prélevé et centrifugé une seconde fois dans les mêmes conditions puis réparti dans trois tubes de 2mL utilisés comme triplicat technique lors de l'immunoprécipitation et l'analyse de spectrométrie de masse.

- Tampons d'extraction protéiques (tampon Clavel modifié ; Derrien et al., 2018) : 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 10% glycerol, 0.1% Igepal, 5 mM DTT et cocktail d'inhibiteurs (60 mM p-glycerophosphate, 0,1 mM Na₃VO₃, 0,5 NaF, 1 mM tablette d'inhibiteurs protéasiques (Roche), 10 pg leupetine, 10 pg aprotinine, 25 μM MLN4924)

IV.C.3 Immunoprécipitation

L'immunoprécipitation de la protéine de fusion d'intérêt et de ses partenaires est réalisée avec le kit μMACs GFP Milteny (*Miltenyi Biotec*, Bergisch Gladbach, Allemagne ; 130-091-125). Les 2 mL de surnageant récupérés (cf II.C.2.b) sont incubés pendant au moins 1h à 4°C sous agitation douce (rpm 10) avec 50μL de microbilles anti-GFP. La séparation des protéines d'intérêt est réalisée grâce à l'utilisation de μcolonnes (*Miltenyi Biotec*) placées sur un stand magnétique et équilibrées une première fois avec 100μL de tampon de lyse du kit puis une seconde fois avec 200μL de tampon d'extraction protéique (cf tampon Clavel modifié). Après l'incubation, chaque échantillon est chargé sur la μcolonne 200μL par 200μL. Les μcolonnes sont alors rincées quatre fois avec 200μL de tampon d'extraction protéique (cf tampon Clavel modifié) puis une fois avec 200μL du tampon Wash 2 du kit. L'élution est réalisée hors stand

et à température ambiante en appliquant 150 µL de tampon d'élution du kit préalablement chauffés à 95°C.

IV.C.4 Spectrométrie de masse

L'analyse par spectrométrie de masse est réalisée par Phillipe Hammann, Lauriane Kuhn et Johanna Chicher à la plateforme de protéomique de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC, Esplanade, Strasbourg). Une digestion enzymatique des échantillons protéiques élués en II.D.2.c est réalisée afin de cliver les protéines de manière spécifique en C-ter des résidus lysine (K) et arginine (R). Les peptides tryptiques vont être transférés sur une chromatographie liquide (Thermo Scientific™, EASY-nanoLC 1000, Thermo Fisher Scientific) couplée en amont du spectromètre de masse (Thermo Scientific™, Q Exactive™, Thermo Fisher Scientific). La recherche des peptides identifiés dans les banques de données se fait avec l'algorithme Mascot (version 2.5) et la banque TAIR. L'analyse statistique se fait grâce au test statistique développé par Hélène Zuber (équipe D. Gagliardi, IBMP, Strasbourg) comprenant 3 étapes. Lors de la première étape, un diagramme PCA (*principal component analysis*) permet de vérifier la reproductibilité des réplicats. La deuxième étape est un test statistique avec une comparaison 2-à-2 basée sur les scripts R « msmsTests » (*LC-MS/MS differential expression tests* ; Gregori et al) et « edgeR » (*Empirical Analysis of digital gene expression data in R*). Et enfin, la troisième étape permet la représentation des données obtenues sous forme de volcano plot.

V Construction de nouvelles lignées

V.A Technologie GateWay

La technologie Gateway (Invitrogen) est basée sur le système de recombinaison du phage λ dans *E. coli*. Le phage λ va se recombiner au niveau des sites *att* (*attachment*), appelé *attB* sur le génome de la bactérie *E. coli* et *attP* sur celui du phage λ . La recombinaison donne deux nouveaux sites *att* appelés *attL* et *attR*. L'utilisation de ce système dans la technologie Gateway permet de faciliter le transfert d'une séquence d'ADN hétérologue (encadrée des séquences *att*) entre différents vecteurs. La technologie GateWay se base sur deux réactions.

Après avoir flanqué de sites *attB* un fragment d'ADN par amplification PCR, ce fragment d'ADN est recombiné dans des vecteurs (pDONR) contenant les sites *attP* lors de la réaction BP. La recombinaison des deux donne des vecteurs pENTRY avec des sites *attL*. La réaction LR facilite la recombinaison entre les pENTRY *attL* et des vecteurs d'expression (vecteurs de destination) contenant les sites *attR*. Le protocole complet du système Gateway est disponible sur www.invitrogen.com. Les détails des réactions BP et LR sont présentés ci-dessous :

Réaction BP		Réaction LR	
Produit PCR avec les sites <i>att</i>	100 ng	pENTRY	80 ng
pDONR221	80 ng	pDEST	80 ng
BP clonase	1 µL	LR clonase	1 µL
H2O	qsp à 10 µL	H2O	qsp à 10 µL

Les réactions sont laissées sur la nuit à 25°C

V.B Purification des plasmides et séquençage

La purification des plasmides est réalisée à partir de 2,5 mL de culture d'*E. coli* cultivée sur la nuit et centrifugée à 3500 rpm pendant 10 min en utilisant le kit NucleoSpin Plasmid QuickPure (Macherey Nagel®). La fidélité des amplifications PCR d'ADN est vérifiée par séquençage Sanger (1µL d'amocès , 500 à 800 ng d'ADN, qsp à 10 µL).

V.C Transformation bactérienne

V.C.1 La transformation des TOP10 par choc thermique

Les bactéries compétentes TOP10 sont décongelées sur glace. 3µL de réaction LR sont mélangés délicatement avec les TOP10 et incubés pendant 20 minutes dans la glace. Les cellules sont alors transférées à 42°C pendant 1 min avant d'être immédiatement replongées dans la glace pour 5 minutes supplémentaires. 500 µL de milieu LB liquide sont mélangés avec les cellules et incubés sous agitation à 37°C pendant 40 minutes. 300µL de cette culture transformée sont étalés sur des boîtes de milieu LB supplémentées des antibiotiques nécessaires à la sélection des cellules transformées.

V.C.2 La transformation des *A.tumefaciens* par électroporation

Les cellules compétentes *A. tumefaciens* sont décongelées sur glace. 10 ng de vecteurs sont délicatement mélangés aux cellules compétentes et incubés pendant 10 minutes dans la glace. Les cellules sont transférées dans des cuves d'électroporation et électroporées à 2500V, 400 Ohm, 0,25 μ F en utilisant l'appareil *Gene pulser* (BioRad). Les cellules sont alors incubées dans 500 μ L de milieu LB à 28°C pendant 1 heure. 300 μ L de cette culture transformée sont étalés sur des boîtes de milieu LB supplémentées des antibiotiques nécessaires à la sélection des cellules transformées.

- Milieu LB (Luria Bertini) : 10 g/L bacto-tryptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L NaCL, pH7,2, +/- Agarose.

V.C.3 Agro-transformation de plantes d'*Arabidopsis*

Le protocole décrit par Bernhardt et al., 2012 a été suivi pour réaliser l'immersion florale (*floral dip*) des plantes d'*Arabidopsis*. 3 ml d'*A. tumefaciens* transformées sont mis dans 200 mL de milieu LB et les antibiotiques appropriés pendant 16 à 24h pour avoir une DO entre 1,5 et 2. Les cellules sont alors culotées pendant 10 min à 4400 rpm et resuspendues dans une solution de sucrose supplémentée de 200 μ M d'acétosyringone et 0,02% de Silwet (DO final 0,8). Les plantes d'*Arabidopsis* d'environ 6-7 semaines avec de nombreuses inflorescences sont utilisées pour la transformation. La hampe florale principale de ces plantes a été préalablement coupée quelques jours avant afin de favoriser l'émergence (*bolting*) des hampes florales secondaires. Les inflorescences sont trempées pendant 3 minutes dans la solution bactérienne puis transférées en chambre de culture. Une fois les siliques des plantes sèches, elles sont récoltées puis semées sous traitement approprié pour sélectionner les transformants. Environ 40 hétérozygotes T1 transformés sont sélectionnés sur sol pour la résistance au BASTA. Après sélection des T2 ne présentant qu'une seule insertion (75% de résistants), des lignées T3 homozygotes (100% de résistants) sont sélectionnées *in vitro* et amplifiées.

Bibliographie

- Ábrahám, E., Miskolczi, P., Ayaydin, F., Yu, P., Kotogány, E., Bakó, L., Ötvös, K., Horváth, G.V., and Dudits, D. (2011). Immunodetection of retinoblastoma-related protein and its phosphorylated form in interphase and mitotic alfalfa cells. *J. Exp. Bot.* **62**: 2155–2168.
- Ach, R.A., Durfee, T., Miller, A.B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P.C., and Grissem, W. (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 5077–5086.
- Adachi, S. et al. (2011). Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 10004–10009.
- Adler, G., Konrad, Z., Zamir, L., Mishra, A.K., Raveh, D., and Bar-Zvi, D. (2017). The Arabidopsis paralogs, PUB46 and PUB48, encoding U-box E3 ubiquitin ligases, are essential for plant response to drought stress. *BMC Plant Biol.* **17**.
- Ahn, G. et al. (2017). SH3 Domain-Containing Protein 2 Plays a Crucial Role at the Step of Membrane Tubulation during Cell Plate Formation. *Plant Cell* **29**: 1388–1405.
- Aklilu, B.B. and Culligan, K.M. (2016). Molecular Evolution and Functional Diversification of Replication Protein A1 in Plants. *Front. Plant Sci.* **7**.
- Aklilu, B.B., Soderquist, R.S., and Culligan, K.M. (2014). Genetic analysis of the Replication Protein A large subunit family in Arabidopsis reveals unique and overlapping roles in DNA repair, meiosis and DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **42**: 3104–3118.
- Amiard, S., Charbonnel, C., Allain, E., Depeiges, A., White, C.I., and Gallego, M.E. (2010). Distinct Roles of the ATR Kinase and the Mre11-Rad50-Nbs1 Complex in the Maintenance of Chromosomal Stability in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**: 3020–3033.
- Andersen, S.U., Buechel, S., Zhao, Z., Ljung, K., Novák, O., Busch, W., Schuster, C., and Lohmann, J.U. (2008). Requirement of B2-Type Cyclin-Dependent Kinases for Meristem Integrity in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **20**: 88.
- Antonucci, L.A., Egger, J.V., and Krucher, N.A. (2014). Phosphorylation of the Retinoblastoma protein (Rb) on serine-807 is required for association with Bax. *Cell Cycle* **13**: 3611–3617.
- Aprelikova, O.N., Fang, B.S., Meissner, E.G., Cotter, S., Campbell, M., Kuthiala, A., Bessho, M., Jensen, R.A., and Liu, E.T. (1999). BRCA1-associated growth arrest is RB-dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 11866–11871.
- Aravind, L. and Koonin, E.V. (2000). The U box is a modified RING finger — a common domain in ubiquitination. *Curr. Biol.* **10**: R132–R134.
- Arias, E.E. and Walter, J.C. (2007). Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Dev.* **21**: 497–518.
- Asmamaw, M.D., Liu, Y., Zheng, Y.-C., Shi, X.-J., and Liu, H.-M. (2020). Skp2 in the ubiquitin-proteasome system: A comprehensive review. *Med. Res. Rev.* **n/a**.
- Attardi, L.D. and Donehower, L.A. (2005). Probing p53 biological functions through the use of genetically engineered mouse models. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **576**: 4–21.
- Azevedo, C., Santos-Rosa, M.J., and Shirasu, K. (2001). The U-box protein family in plants. *Trends Plant Sci.* **6**: 354–358.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., 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.
- Balog, E.R.M., Burke, J.R., Hura, G.L., and Rubin, S.M. (2011). Crystal Structure of the Unliganded Retinoblastoma Protein Pocket Domain. *Proteins* **79**: 2010–2014.
- Bar-Joseph, Z., Siegfried, Z., Brandeis, M., Brors, B., Lu, Y., Eils, R., Dynlacht, B.D., and Simon, I. (2008). Genome-wide transcriptional analysis of the human cell cycle identifies genes differentially regulated in normal and cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 955–960.
- Batzenschlager, M. et al. (2015). Arabidopsis MZT1 homologs GIP1 and GIP2 are essential for centromere architecture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 8656–8660.
- Bermudez, V.P., Lindsey-Boltz, L.A., Cesare, A.J., Maniwa, Y., Griffith, J.D., Hurwitz, J., and Sancar, A. (2003). Loading of the human 9-1-1 checkpoint complex onto DNA by the checkpoint clamp loader hRad17-replication factor C complex in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 1633–1638.

- Bernhardt, K., Vigelius, S.K., Wiese, J., Linka, N., and Weber, A.P.M.** (2012). Agrobacterium-mediated *Arabidopsis thaliana* transformation: an overview of T-DNA binary vectors, floral dip and screening for homozygous lines - JPortal. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research*.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M., and de Bruin, R.A.M.** (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 518–528.
- Bhattacharya, S., Garriga, J., Calbó, J., Yong, T., Haines, D.S., and Graña, X.** (2003). SKP2 associates with p130 and accelerates p130 ubiquitylation and degradation in human cells. *Oncogene* **22**: 2443–2451.
- Bhatti, S., Kozlov, S., Farooqi, A.A., Naqi, A., Lavin, M., and Khanna, K.K.** (2011). ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 2977.
- de Bie, P. and Ciechanover, A.** (2011). Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms. *Cell Death Differ.* **18**: 1393–1402.
- Biedermann, S., Harashima, H., Chen, P., Heese, M., Bouyer, D., Sofroni, K., and Schnittger, A.** (2017). The retinoblastoma homolog RBR1 mediates localization of the repair protein RAD51 to DNA lesions in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **36**: 1279–1297.
- Blackford, A.N. and Jackson, S.P.** (2017). ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol. Cell* **66**: 801–817.
- Boniotti, M.B. and Gutierrez, C.** (2001). A cell-cycle-regulated kinase activity phosphorylates plant retinoblastoma protein and contains, in *Arabidopsis*, a CDKA/cyclin D complex. *Plant J.* **28**: 341–350.
- Borden, K.L. and Freemont, P.S.** (1996). The RING finger domain: a recent example of a sequence-structure family. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**: 395–401.
- Boruc, J., Daele, H.V. den, Hollunder, J., Rombauts, S., Mylle, E., Hilson, P., Inzé, D., Veylder, L.D., and Russinova, E.** (2010). Functional Modules in the *Arabidopsis* Core Cell Cycle Binary Protein–Protein Interaction Network. *Plant Cell* **22**: 1264–1280.
- Boudolf, V. et al.** (2009). CDKB1;1 Forms a Functional Complex with CYCA2;3 to Suppress Endocycle Onset. *Plant Physiol.* **150**: 1482–1493.
- Boudolf, V., Barrôco, R., Engler, J. de A., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., Inzé, D., and De Veylder, L.** (2004). B1-Type Cyclin-Dependent Kinases Are Essential for the Formation of Stomatal Complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**: 945–955.
- Bourbousse, C., Vegesna, N., and Law, J.A.** (2018). SOG1 activator and MYB3R repressors regulate a complex DNA damage network in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**: E12453–E12462.
- Bouyer, D., Heese, M., Chen, P., Harashima, H., Roudier, F., Grüttner, C., and Schnittger, A.** (2018a). Genome-wide identification of RETINOBLASTOMA RELATED 1 binding sites in *Arabidopsis* reveals novel DNA damage regulators. *PLoS Genet.* **14**.
- Bouyer, D., Heese, M., Chen, P., Harashima, H., Roudier, F., Grüttner, C., and Schnittger, A.** (2018b). Genome-wide identification of RETINOBLASTOMA RELATED 1 binding sites in *Arabidopsis* reveals novel DNA damage regulators. *PLoS Genet.* **14**.
- Bramsiepe, J., Wester, K., Weinl, C., Roodbarkelari, F., Kasili, R., Larkin, J.C., Hülskamp, M., and Schnittger, A.** (2010). Endoreplication Controls Cell Fate Maintenance. *PLoS Genet.* **6**.
- Braun, E.L. and Grotewold, E.** (1999). Newly Discovered Plant c-myc-Like Genes Rewrite the Evolution of the Plant myb Gene Family. *Plant Physiol.* **121**: 21–24.
- Breen, A.P. and Murphy, J.A.** (1995). Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 1033–1077.
- Breuer, C., Ishida, T., and Sugimoto, K.** (2010). Developmental control of endocycles and cell growth in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **13**: 654–660.
- Breyne, P., Dreesen, R., Vandepoele, K., De Veylder, L., Van Breusegem, F., Callewaert, L., Rombauts, S., Raes, J., Cannoot, B., Engler, G., Inzé, D., and Zabeau, M.** (2002). Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 14825–14830.
- Brooks, C.L. and Gu, W.** (2006). p53 Ubiquitination: Mdm2 and Beyond. *Mol. Cell* **21**: 307–315.
- Brown, E.J. and Baltimore, D.** (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.* **14**: 397–402.
- Buis, J., Wu, Y., Deng, Y., Leddon, J., Westfield, G., Eckersdorff, M., Sekiguchi, J.M., Chang, S., and Ferguson, D.O.** (2008). Mre11 Nuclease Activity has Essential Roles in DNA Repair and Genomic Stability Distinct from ATM Activation. *Cell* **135**: 85–96.
- Bulankova, P., Riehs-Kearnan, N., Nowack, M.K., Schnittger, A., and Riha, K.** (2010). Meiotic Progression in *Arabidopsis* Is Governed by Complex Regulatory Interactions between SMG7, TDM1, and the Meiosis I–Specific Cyclin TAM. *Plant Cell* **22**: 3791–3803.
- Bundock, P. and Hooykaas, P.** (2002). Severe Developmental Defects, Hypersensitivity to DNA-Damaging Agents, and Lengthened Telomeres in *Arabidopsis* MRE11 Mutants. *Plant Cell* **14**: 2451–2462.

- Bürglin, T.R. and Affolter, M. (2016). Homeodomain proteins: an update. *Chromosoma* **125**: 497–521.
- Burke, J.R., Deshong, A.J., Pelton, J.G., and Rubin, S.M. (2010). Phosphorylation-induced Conformational Changes in the Retinoblastoma Protein Inhibit E2F Transactivation Domain Binding. *J. Biol. Chem.* **285**: 16286–16293.
- Burke, J.R., Hura, G.L., and Rubin, S.M. (2012). Structures of inactive retinoblastoma protein reveal multiple mechanisms for cell cycle control. *Genes Dev.* **26**: 1156–1166.
- Burke, T.J., Callis, J., and Vierstra, R.D. (1988). Characterization of a polyubiquitin gene from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **213**: 435–443.
- Byrne, B.M. and Oakley, G.G. (2019). Replication protein A, the laxative that keeps DNA regular: The importance of RPA phosphorylation in maintaining genome stability. *Semin. Cell Dev. Biol.* **86**: 112–120.
- Cai, Z., Moten, A., Peng, D., Hsu, C.-C., Pan, B.-S., Manne, R., Li, H., and Lin, H.-K. (2020). The Skp2 Pathway: A Critical Target for Cancer Therapy. *Semin. Cancer Biol.*
- Callis, J. (2014). The Ubiquitination Machinery of the Ubiquitin System. *Arab. Book Am. Soc. Plant Biol.* **12**.
- 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.
- Callis, J., Pollmann, L., Shanklin, J., Wettern, M., and Vierstra, R.D. (1989). Sequence of a cDNA from *Chlamydomonas reinhardtii* encoding a ubiquitin 52 amino acid extension protein. *Nucleic Acids Res.* **17**: 8377.
- Callis, J., Raasch, J.A., and Vierstra, R.D. (1990). Ubiquitin extension proteins of *Arabidopsis thaliana*. Structure, localization, and expression of their promoters in transgenic tobacco. *J. Biol. Chem.* **265**: 12486–12493.
- Cannan, W.J. and Pederson, D.S. (2016). Mechanisms and Consequences of Double-strand DNA Break Formation in Chromatin. *J. Cell. Physiol.* **231**: 3–14.
- Cao, L., Peng, B., Yao, L., Zhang, X., Sun, K., Yang, X., and Yu, L. (2010). The ancient function of RB-E2F Pathway: insights from its evolutionary history. *Biol. Direct* **5**: 55.
- Cao, L., Wang, S., Venglat, P., Zhao, L., Cheng, Y., Ye, S., Qin, Y., Datla, R., Zhou, Y., and Wang, H. (2018). *Arabidopsis* ICK/KRP cyclin-dependent kinase inhibitors function to ensure the formation of one megaspore mother cell and one functional megaspore per ovule. *PLoS Genet.* **14**.
- Cappadocia, L., Maréchal, A., Parent, J.-S., Lepage, É., Sygusch, J., and Brisson, N. (2010). Crystal Structures of DNA-Whirly Complexes and Their Role in *Arabidopsis* Organelle Genome Repair[C][W]. *Plant Cell* **22**: 1849–1867.
- Capron, A., Ökrész, L., and Genschik, P. (2003a). First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin–protein ligase. *Trends Plant Sci.* **8**: 83–89.
- Capron, A., Serralbo, O., Fülöp, K., Frugier, F., Parmentier, Y., Dong, A., Lecureuil, A., Guerche, P., Kondorosi, E., Scheres, B., and Genschik, P. (2003b). The *Arabidopsis* anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell* **15**: 2370–2382.
- Carrano, A.C., Eytan, E., Hershko, A., and Pagano, M. (1999). SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell Biol.* **1**: 193–199.
- Castillo, J., López-Rodas, G., and Franco, L. (2017). Histone Post-Translational Modifications and Nucleosome Organisation in Transcriptional Regulation: Some Open Questions. In *Protein Reviews*, M.Z. Atassi, ed, *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (Springer Singapore: Singapore), pp. 65–92.
- Cejka, P. (2015). DNA End Resection: Nucleases Team Up with the Right Partners to Initiate Homologous Recombination. *J. Biol. Chem.* **290**: 22931–22938.
- Chankova, Dimova, E., Dimitrova, M., and Bryant, P.E. (2007). Induction of DNA double-strand breaks by zeocin in *Chlamydomonas reinhardtii* and the role of increased DNA double-strand breaks rejoining in the formation of an adaptive response. *Radiat. Environ. Biophys.* **46**: 409–416.
- Chao, C.C.-K. (2015). Mechanisms of p53 degradation. *Clin. Chim. Acta* **438**: 139–147.
- Chapman, J.D., Reuvers, A.P., Borsa, J., and Greenstock, C.L. (1973). Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiat. Res.* **56**: 291–306.
- Chapman, J.R. and Jackson, S.P. (2008). Phospho-dependent interactions between NBS1 and MDC1 mediate chromatin retention of the MRN complex at sites of DNA damage. *EMBO Rep.* **9**: 795–801.
- Chatterjee, N. and Walker, G.C. (2017). Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* **58**: 235–263.
- Chemical & Engineering News: Top Pharmaceuticals: Cisplatin.**
- Chen, P., Takatsuka, H., Takahashi, N., Kurata, R., Fukao, Y., Kobayashi, K., Ito, M., and Umeda, M. (2017). *Arabidopsis* R1R2R3-Myb proteins are essential for inhibiting cell division in response to DNA damage. *Nat. Commun.* **8**: 635.

- Cheng, Y., Cao, L., Wang, S., Li, Y., Shi, X., Liu, H., Li, L., Zhang, Z., Fowke, L.C., Wang, H., and Zhou, Y. (2013). Downregulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes upregulates the E2F pathway and increases cell proliferation, and organ and seed sizes in Arabidopsis. *Plant J.* **75**: 642–655.
- Chico, J.M., Lechner, E., Fernandez-Barbero, G., Canibano, E., García-Casado, G., Franco-Zorrilla, J.M., Hammann, P., Zamarreño, A.M., García-Mina, J.M., Rubio, V., Genschik, P., and Solano, R. (2020). CUL3BPM E3 ubiquitin ligases regulate MYC2, MYC3, and MYC4 stability and JA responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **117**: 6205–6215.
- Churchman, M.L. et al. (2006). SIAMESE, a Plant-Specific Cell Cycle Regulator, Controls Endoreplication Onset in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **18**: 3145–3157.
- Cifuentes, M. et al. (2016). TDM1 Regulation Determines the Number of Meiotic Divisions. *PLoS Genet.* **12**.
- Cizmecioglu, O., Krause, A., Bahtz, R., Ehret, L., Malek, N., and Hoffmann, I. (2012). Plk2 regulates centriole duplication through phosphorylation-mediated degradation of Fbxw7 (human Cdc4). *J. Cell Sci.* **125**: 981–992.
- Clarke, A.R., Maandag, E.R., van Roon, M., van der Lugt, N.M.T., van der Valk, M., Hooper, M.L., Berns, A., and te Rielef, H. (1992). Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development. *Nature* **359**: 328–330.
- Cleaver, J.E. (2016). Profile of Tomas Lindahl, Paul Modrich, and Aziz Sancar, 2015 Nobel Laureates in Chemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**: 242–245.
- Connelly, J.C. and Leach, D.R.F. (2002). Tethering on the brink: the evolutionarily conserved Mre11–Rad50 complex. *Trends Biochem. Sci.* **27**: 410–418.
- Cook, G.S., Grønlund, A.L., Siciliano, I., Spadafora, N., Amini, M., Herbert, R.J., Bitonti, M.B., Graumann, K., Francis, D., and Rogers, H.J. (2013). Plant WEE1 kinase is cell cycle regulated and removed at mitosis via the 26S proteasome machinery. *J. Exp. Bot.* **64**: 2093–2106.
- Cook, W.J., Jeffrey, L.C., Carson, M., Chen, Z., and Pickart, C.M. (1992a). Structure of a diubiquitin conjugate and a model for interaction with ubiquitin conjugating enzyme (E2). *J. Biol. Chem.* **267**: 16467–16471.
- Cook, W.J., Jeffrey, L.C., Sullivan, M.L., and Vierstra, R.D. (1992b). Three-dimensional structure of a ubiquitin-conjugating enzyme (E2). *J. Biol. Chem.* **267**: 15116–15121.
- Cools, T., Iantcheva, A., Maes, S., Daele, H.V. den, and Veylder, L.D. (2010). A replication stress-induced synchronization method for Arabidopsis thaliana root meristems. *Plant J.* **64**: 705–714.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J., and Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science* **286**: 1162–1166.
- Cruz-Ramírez, A., Díaz-Triviño, S., Wachsman, G., Du, Y., Arteaga-Vázquez, M., Zhang, H., Benjamins, R., Blilou, I., Neef, A.B., Chandler, V., and Scheres, B. (2013). A SCARECROW-RETINOBLASTOMA protein network controls protective quiescence in the Arabidopsis root stem cell organizer. *PLoS Biol.* **11**: e1001724.
- Culligan, K., Tissier, A., and Britt, A. (2004). ATR Regulates a G2-Phase Cell-Cycle Checkpoint in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**: 1091–1104.
- Culligan, K.M., Robertson, C.E., Foreman, J., Doerner, P., and Britt, A.B. (2006). ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* **48**: 947–961.
- Cyr, D.M. and Ramos, C.H. (2015). Specification of Hsp70 Function by Type I and Type II Hsp40. In *The Networking of Chaperones by Co-chaperones: Control of Cellular Protein Homeostasis*, G.L. Blatch and A.L. Edkins, eds, Subcellular Biochemistry. (Springer International Publishing: Cham), pp. 91–102.
- D'Andrea, A.D. and Haseltine, W.A. (1978). Sequence specific cleavage of DNA by the antitumor antibiotics neocarzinostatin and bleomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**: 3608–3612.
- Darnell, G.A., Antalis, T.M., Johnstone, R.W., Stringer, B.W., Ogbourne, S.M., Harrich, D., and Suhrbier, A. (2003). Inhibition of Retinoblastoma Protein Degradation by Interaction with the Serpin Plasminogen Activator Inhibitor 2 via a Novel Consensus Motif. *Mol. Cell. Biol.* **23**: 6520–6532.
- De Schutter, K., Joubès, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babychuk, E., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Kushnir, S., Inzé, D., and De Veylder, L. (2007). Arabidopsis WEE1 Kinase Controls Cell Cycle Arrest in Response to Activation of the DNA Integrity Checkpoint. *Plant Cell* **19**: 211–225.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacqmard, A., Engler, G., and Inzé, D. (2002). Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa–DPA transcription factor. *EMBO J.* **21**: 1360–1368.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T.S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., and Inzé, D. (2001). Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 1653–1668.

- Delston, R.B., Matatall, K.A., Sun, Y., Onken, M.D., and Harbour, J.W.** (2011). p38 phosphorylates Rb on Ser567 by a novel, cell cycle-independent mechanism that triggers Rb-Hdm2 interaction and apoptosis. *Oncogene* **30**: 588–599.
- Deng, S.K., Gibb, B., de Almeida, M.J., Greene, E.C., and Symington, L.S.** (2014). RPA Antagonizes Microhomology-Mediated Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**: 405–412.
- Deriano, L. and Roth, D.B.** (2013). Modernizing the Nonhomologous End-Joining Repertoire: Alternative and Classical NHEJ Share the Stage. *Annu. Rev. Genet.* **47**: 433–455.
- Derrien, B., Clavel, M., Baumberger, N., Iki, T., Sarazin, A., Hacquard, T., Ponce, M.R., Ziegler-Graff, V., Vaucheret, H., Micol, J.L., Voinnet, O., and Genschik, P.** (2018). A Suppressor Screen for AGO1 Degradation by the Viral F-Box P0 Protein Uncovers a Role for AGO DUF1785 in sRNA Duplex Unwinding[OPEN]. *Plant Cell* **30**: 1353–1374.
- Desvoves, B. and Gutierrez, C.** (2020). Roles of plant retinoblastoma protein: cell cycle and beyond. *EMBO J.* **n/a**: e105802.
- Desvoves, B., de Mendoza, A., Ruiz-Trillo, I., and Gutierrez, C.** (2014). Novel roles of plant RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) protein in cell proliferation and asymmetric cell division. *J. Exp. Bot.* **65**: 2657–2666.
- Desvoves, B., Noir, S., Masoud, K., López, M.I., Genschik, P., and Gutierrez, C.** (2019). FBL17 targets CDT1a for degradation in early S-phase to prevent Arabidopsis genome instability. *bioRxiv*: 774109.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M.S., Jacquard, A., Kilby, N.J., and Murray, J.A.H.** (2003). Altered Cell Cycle Distribution, Hyperplasia, and Inhibited Differentiation in Arabidopsis Caused by the D-Type Cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**: 79–92.
- Dick, F.A. and Rubin, S.M.** (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 297–306.
- Dieck, C.B., Wood, A., Brglez, I., Rojas-Pierce, M., and Boss, W.F.** (2012). Increasing phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate biosynthesis affects plant nuclear lipids and nuclear functions. *Plant Physiol. Biochem. PPB Soc. Francaise Physiol. Veg.* **57**: 32–44.
- DiRuggiero, J. and Robb, F.T.** (2004). Early Evolution of DNA Repair Mechanisms. In *The Genetic Code and the Origin of Life*, L. Ribas de Pouplana, ed (Springer US: Boston, MA), pp. 169–182.
- 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.
- Dissmeyer, N., Weimer, A.K., De Veylder, L., Novak, B., and Schnittger, A.** (2010). The regulatory network of cell cycle progression is fundamentally different in plants versus yeast or metazoans. *Plant Signal. Behav.* **5**: 1613–1618.
- Dissmeyer, N., Weimer, A.K., Pusch, S., De Schutter, K., Kamei, C.L.A., Nowack, M.K., Novak, B., Duan, G.-L., Zhu, Y.-G., De Veylder, L., and Schnittger, A.** (2009). Control of Cell Proliferation, Organ Growth, and DNA Damage Response Operate Independently of Dephosphorylation of the Arabidopsis Cdk1 Homolog CDKA₁. *Plant Cell* **21**: 3641–3654.
- Dizdaroglu, M., Rao, G., Halliwell, B., and Gajewski, E.** (1991). Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**: 317–324.
- Dominguez, D., Tsai, Y.-H., Gomez, N., Jha, D.K., Davis, I., and Wang, Z.** (2016). A high-resolution transcriptome map of cell cycle reveals novel connections between periodic genes and cancer. *Cell Res.* **26**: 946–962.
- Doré, A.S., Kilkenny, M.L., Rzechorzek, N.J., and Pearl, L.H.** (2009). Crystal Structure of the Rad9-Rad1-Hus1 DNA Damage Checkpoint Complex—Implications for Clamp Loading and Regulation. *Mol. Cell* **34**: 735–745.
- 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.
- Draetta, G., Brizuela, L., Potashkin, J., and Beach, D.** (1987). Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by *cdc2+* and *suc1+*. *Cell* **50**: 319–325.
- Draetta, G.F.** (1997). Cell cycle: Will the real Cdk-activating kinase please stand up. *Curr. Biol.* **7**: R50–R52.
- Dresler, W.F.C. and Stein, R.** (1869). Ueber den Hydroxylharnstoff; *Ann. Chem. Pharm.* **150**: 242–252.
- Du, W. and Searle, J.S.** (2009). The Rb Pathway and Cancer Therapeutics. *Curr. Drug Targets* **10**: 581–589.
- Du, Z., Zhou, X., Li, L., and Su, Z.** (2009). plantsUPS: a database of plants' Ubiquitin Proteasome System. *BMC Genomics* **10**: 227.
- Dubois, M., Selden, K., Bediée, A., Rolland, G., Baumberger, N., Noir, S., Bach, L., Lamy, G., Granier, C., and Genschik, P.** (2018). SIAMESE-RELATED1 Is Regulated Posttranslationally and Participates in Repression of Leaf Growth under Moderate Drought1[OPEN]. *Plant Physiol.* **176**: 2834–2850.

- Dubos, C., Stracke, R., Grotewold, E., Weisshaar, B., Martin, C., and Lepiniec, L. (2010). MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci.* **15**: 573–581.
- Dumon-Jones, V., Frappart, P.-O., Tong, W.-M., Sajithlal, G., Hulla, W., Schmid, G., Herceg, Z., Digweed, M., and Wang, Z.-Q. (2003). Nbn heterozygosity renders mice susceptible to tumor formation and ionizing radiation-induced tumorigenesis. *Cancer Res.* **63**: 7263–7269.
- Durfee, T., Feiler, H.S., and Gruissem, W. (2000). Retinoblastoma-related proteins in plants: homologues or orthologues of their metazoan counterparts? *Plant Mol. Biol.* **43**: 635–642.
- Ebel, C., Mariconti, L., and Gruissem, W. (2004). Plant retinoblastoma homologues control nuclear proliferation in the female gametophyte. *Nature* **429**: 776–780.
- El Refy, A., Perazza, D., Zekraoui, L., Valay, J.-G., Bechtold, N., Brown, S., Hülskamp, M., Herzog, M., and Bonneville, J.-M. (2004). The Arabidopsis KAKTUS gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles. *Mol. Genet. Genomics* **270**: 403–414.
- Elbæk, C.R., Petrosius, V., and Sørensen, C.S. (2020). WEE1 kinase limits CDK activities to safeguard DNA replication and mitotic entry. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **819–820**: 111694.
- Eletr, Z.M., Huang, D.T., Duda, D.M., Schulman, B.A., and Kuhlman, B. (2005). E2 conjugating enzymes must disengage from their E1 enzymes before E3-dependent ubiquitin and ubiquitin-like transfer. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**: 933–934.
- Ella, H., Reiss, Y., and Ravid, T. (2019). The Hunt for Degrons of the 26S Proteasome. *Biomolecules* **9**.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**: 495–516.
- Elzanati, O., Roche, J., Boulaflous-Stevens, A., Mouzeyar, S., and Bouzidi, M.F. (2017). Genome-wide analysis, classification, expression and interaction of *Physcomitrella patens* SKP1-like (PpSKP) and F-box (FBX) genes. *Plant Gene* **12**: 13–22.
- Eschbach, V. and Kobbe, D. (2014). Different Replication Protein A Complexes of Arabidopsis thaliana Have Different DNA-Binding Properties as a Function of Heterotrimer Composition. *Plant Cell Physiol.* **55**: 1460–1472.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D., and Hunt, T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33**: 389–396.
- Feng, J. and Shen, W.-H. (2014). Dynamic regulation and function of histone monoubiquitination in plants. *Front. Plant Sci.* **5**.
- Ferreira, P.C., Hemerly, A.S., Villarroel, R., Van Montagu, M., and Inzé, D. (1991). The Arabidopsis functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *Plant Cell* **3**: 531–540.
- Fidantsef, A.L., Mitchell, D.L., and Britt, A.B. (2000). The Arabidopsis UVH1 Gene Is a Homolog of the Yeast Repair Endonuclease RAD1. *Plant Physiol.* **124**: 579–586.
- Fillingham, J., Keogh, M.-C., and Krogan, N.J. (2006). GammaH2AX and its role in DNA double-strand break repair. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **84**: 568–577.
- Finley, D., Bartel, B., and Varshavsky, A. (1989). The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature* **338**: 394–401.
- Fischer, M. (2017). Census and evaluation of p53 target genes. *Oncogene* **36**: 3943–3956.
- Fischer, M. and DeCaprio, J.A. (2015). Does Arabidopsis thaliana DREAM of cell cycle control? *EMBO J.* **34**: 1987–1989.
- Fischer, M., Grossmann, P., Padi, M., and DeCaprio, J.A. (2016). Integration of TP53, DREAM, MMB-FOXM1 and RB-E2F target gene analyses identifies cell cycle gene regulatory networks. *Nucleic Acids Res.* **44**: 6070–6086.
- Fischer, M. and Müller, G.A. (2017). Cell cycle transcription control: DREAM/MuvB and RB-E2F complexes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **52**: 638–662.
- Fort, P., Kajava, A.V., Delsuc, F., and Coux, O. (2015). Evolution of Proteasome Regulators in Eukaryotes. *Genome Biol. Evol.* **7**: 1363–1379.
- Freemont, P.S. (1993). The RING Finger. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **684**: 174–192.
- Friend, S.H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R.A., Rapaport, J.M., Albert, D.M., and Dryja, T.P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* **323**: 643–646.
- Friesner, J.D., Liu, B., Culligan, K., and Britt, A.B. (2005). Ionizing Radiation–dependent γ -H2AX Focus Formation Requires Ataxia Telangiectasia Mutated and Ataxia Telangiectasia Mutated and Rad3-related. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2566–2576.
- Frolov, M.V., Moon, N.-S., and Dyson, N.J. (2005). dDP Is Needed for Normal Cell Proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 3027–3039.

- Fu, H., Doelling, J.H., Arendt, C.S., Hochstrasser, M., and Vierstra, R.D.** (1998). Molecular organization of the 20S proteasome gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **149**: 677–692.
- Fulcher, N. and Sablowski, R.** (2009). Hypersensitivity to DNA damage in plant stem cell niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 20984–20988.
- Furniss, J.J., Grey, H., Wang, Z., Nomoto, M., Jackson, L., Tada, Y., and Spoel, S.H.** (2018). Proteasome-associated HECT-type ubiquitin ligase activity is required for plant immunity. *PLoS Pathog.* **14**.
- Furukawa, T., Angelis, K.J., and Britt, A.B.** (2015). *Arabidopsis* DNA polymerase lambda mutant is mildly sensitive to DNA double strand breaks but defective in integration of a transgene. *Front. Plant Sci.* **6**.
- Furukawa, T., Curtis, M.J., Tominey, C.M., Duong, Y.H., Wilcox, B.W.L., Aggoune, D., Hays, J.B., and Britt, A.B.** (2010). A shared DNA-damage-response pathway for induction of stem-cell death by UVB and by gamma irradiation. *DNA Repair* **9**: 940–948.
- 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.
- Galan, J.-M. and Peter, M.** (1999). Ubiquitin-dependent degradation of multiple F-box proteins by an autocatalytic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 9124–9129.
- Gallego, M.E., Jeanneau, M., Granier, F., Bouchez, D., Bechtold, N., and White, I.** (2001). Disruption of the *Arabidopsis* RAD50 gene leads to plant sterility and MMS sensitivity. *Plant J.* **25**: 31–41.
- Ganpudi, A.L. and Schroeder, D.F.** (2011). UV Damaged DNA Repair & Tolerance in Plants. *Sel. Top. DNA Repair*.
- Gao, J., Zhu, Y., Zhou, W., Molinier, J., Dong, A., and Shen, W.-H.** (2012). NAP1 Family Histone Chaperones Are Required for Somatic Homologous Recombination in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **24**: 1437–1447.
- Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D.T., and Alt, F.W.** (1998). A Targeted DNA-PKcs-Null Mutation Reveals DNA-PK-Independent Functions for KU in V(D)J Recombination. *Immunity* **9**: 367–376.
- Garcia, V., Bruchet, H., Camescasse, D., Granier, F., Bouchez, D., and Tissier, A.** (2003). AtATM Is Essential for Meiosis and the Somatic Response to DNA Damage in Plants. *Plant Cell* **15**: 119–132.
- García-Cao, I., García-Cao, M., Martín-Caballero, J., Criado, L.M., Klatt, P., Flores, J.M., Weill, J.-C., Blasco, M.A., and Serrano, M.** (2002). ‘Super p53’ mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J.* **21**: 6225–6235.
- Gausung, K. and Barkardottir, R.** (1986). Structure and expression of ubiquitin genes in higher plants. *Eur. J. Biochem.* **158**: 57–62.
- 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., Jamet, E., Phillips, G., Parmentier, Y., Gigot, C., and Fleck, J.** (1994). Molecular characterization of a β -type proteasome subunit from *Arabidopsis thaliana* co-expressed at a high level with an α -type proteasome subunit early in the cell cycle. *Plant J.* **6**: 537–546.
- Genschik, P., Marrocco, K., Bach, L., Noir, S., and Criqui, M.-C.** (2014). Selective protein degradation: a rheostat to modulate cell-cycle phase transitions. *J. Exp. Bot.* **65**: 2603–2615.
- Genschik, P., Philipps, G., Gigot, C., and Fleck, J.** (1992). Cloning and sequence analysis of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to a proteasome alpha subunit from *Drosophila*. *FEBS Lett.* **309**: 311–315.
- Gentric, N., Masoud, K., Journot, R.P., Cognat, V., Chabouté, M.-E., Noir, S., and Genschik, P.** (2020). The F-Box-Like Protein FBL17 Is a Regulator of DNA-Damage Response and Colocalizes with RETINOBLASTOMA RELATED1 at DNA Lesion Sites1. *Plant Physiol.* **183**: 1295–1305.
- Germain, D.** (2011). Skp2 and Skp2B team up against Rb and p53. *Cell Div.* **6**: 1.
- Gherbi, H., Gallego, M.E., Jalut, N., Lucht, J.M., Hohn, B., and White, C.I.** (2001). Homologous recombination in planta is stimulated in the absence of Rad50. *EMBO Rep.* **2**: 287–291.
- Gille, C., Goede, A., Schlöetelburg, C., Preißner, R., Kloetzel, P.-M., Göbel, U.B., and Frömmel, C.** (2003). A Comprehensive View on Proteasomal Sequences: Implications for the Evolution of the Proteasome. *J. Mol. Biol.* **326**: 1437–1448.
- 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.
- Gómez, M.S., Ferreyra, M.L.F., Sheridan, M.L., and Casati, P.** (2019). *Arabidopsis* E2Fc is required for the DNA damage response under UV-B radiation epistatically over the microRNA396 and independently of E2Fe. *Plant J.* **97**: 749–764.

- Gonzalez, N., Gévaudant, F., Hernould, M., Chevalier, C., and Mouras, A.** (2007). The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *Plant J.* **51**: 642–655.
- Goodarzi, A.A., Jeggo, P., and Lobrich, M.** (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair* **9**: 1273–1282.
- Goritschnig, S., Zhang, Y., and Li, X.** (2007). The ubiquitin pathway is required for innate immunity in Arabidopsis. *Plant J.* **49**: 540–551.
- Goupille, O., Penglong, T., Kadri, Z., Granger-Locatelli, M., Denis, R., Luquet, S., Badoual, C., Fucharoen, S., Maouche-Chrétien, L., Leboulch, P., and Chrétien, S.** (2017). The LXCXE Retinoblastoma Protein-Binding Motif of FOG-2 Regulates Adipogenesis. *Cell Rep.* **21**: 3524–3535.
- Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., Larkins, B.A., DeCaprio, J.A., Sellers, W.R., and Kaelin, W.G.** (1996). A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: involvement in endoreduplication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 8962–8967.
- Grant, G.D., Brooks, L., Zhang, X., Mahoney, J.M., Martyanov, V., Wood, T.A., Sherlock, G., Cheng, C., and Whitfield, M.L.** (2013). Identification of cell cycle-regulated genes periodically expressed in U2OS cells and their regulation by FOXM1 and E2F transcription factors. *Mol. Biol. Cell* **24**: 3634–3650.
- 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.
- Gu, N., Tamada, Y., Imai, A., Palfalvi, G., Kabeya, Y., Shigenobu, S., Ishikawa, M., Angelis, K.J., Chen, C., and Hasebe, M.** (2020). DNA damage triggers reprogramming of differentiated cells into stem cells in *Physcomitrella*. *Nat. Plants*.
- Guo, L., Jiang, L., Zhang, Y., Lu, X.-L., Xie, Q., Weijers, D., and Liu, C.-M.** (2016). The anaphase-promoting complex initiates zygote division in Arabidopsis through degradation of cyclin B1. *Plant J.* **86**: 161–174.
- 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**.
- Gutzat, R., Borghi, L., and Grissem, W.** (2012). Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends Plant Sci.* **17**: 139–148.
- Haas, A.L., Warms, J.V., and Rose, I.A.** (1983). Ubiquitin adenylate: structure and role in ubiquitin activation. *Biochemistry* **22**: 4388–4394.
- Haga, N., Kobayashi, K., Suzuki, T., Maeo, K., Kubo, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Demura, T., Nakamura, K., Jürgens, G., and Ito, M.** (2011). Mutations in MYB3R1 and MYB3R4 Cause Pleiotropic Developmental Defects and Preferential Down-Regulation of Multiple G2/M-Specific Genes in Arabidopsis1[C][W]. *Plant Physiol.* **157**: 706–717.
- Hajheidari, M., Farrona, S., Huettel, B., Koncz, Z., and Koncz, C.** (2012). CDKF;1 and CDKD Protein Kinases Regulate Phosphorylation of Serine Residues in the C-Terminal Domain of Arabidopsis RNA Polymerase II[C][W]. *Plant Cell* **24**: 1626–1642.
- Hakenjos, J.P., Richter, R., Dohmann, E.M.N., Katsiarimpa, A., Isono, E., and Schwechheimer, C.** (2011). MLN4924 Is an Efficient Inhibitor of NEDD8 Conjugation in Plants1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* **156**: 527–536.
- Ham, B.-K., Park, J.M., Lee, S.-B., Kim, M.J., Lee, I.-J., Kim, K.-J., Kwon, C.S., and Paek, K.-H.** (2006). Tobacco Tsp1, a DnaJ-Type Zn Finger Protein, Is Recruited to and Potentiates Tsi1-Mediated Transcriptional Activation. *Plant Cell* **18**: 2005–2020.
- Hamasaki, H., Kurihara, Y., Kuromori, T., Kusano, H., Nagata, N., Yamamoto, Y.Y., Shimada, H., and Matsui, M.** (2019). SnRK1 Kinase and the NAC Transcription Factor SOG1 Are Components of a Novel Signaling Pathway Mediating the Low Energy Response Triggered by ATP Depletion. *Front. Plant Sci.* **10**.
- Hanawalt, P.C.** (2015). Historical Perspective on the DNA Damage Response. *DNA Repair* **36**: 2–7.
- Hang, H. and Lieberman, H.B.** (2000). Physical Interactions among Human Checkpoint Control Proteins HUS1p, RAD1p, and RAD9p, and Implications for the Regulation of Cell Cycle Progression. *Genomics* **65**: 24–33.
- Harashima, H., Shinmyo, A., and Sekine, M.** (2007). Phosphorylation of threonine 161 in plant cyclin-dependent kinase A is required for cell division by activation of its associated kinase. *Plant J.* **52**: 435–448.
- Harper, J.W. and Elledge, S.J.** (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Mol. Cell* **28**: 739–745.
- Hassler, M., Singh, S., Yue, W.W., Luczynski, M., Lakbir, R., Sanchez-Sanchez, F., Bader, T., Pearl, L.H., and Mittnacht, S.** (2007). Crystal structure of the retinoblastoma protein N domain provides insight into tumor suppression, ligand interaction, and holoprotein architecture. *Mol. Cell* **28**: 371–385.
- Hatakeyama, S. and Nakayama, K.I.** (2003). U-box proteins as a new family of ubiquitin ligases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**: 635–645.

- Hatfield, P.M., Gosink, M.M., Carpenter, T.B., and Vierstra, R.D.** (1997). The ubiquitin-activating enzyme (E1) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **11**: 213–226.
- He, Q., Cheng, P., He, Q., and Liu, Y.** (2005). The COP9 signalosome regulates the *Neurospora* circadian clock by controlling the stability of the SCFFWD-1 complex. *Genes Dev.* **19**: 1518–1531.
- Heitzeberg, F., Chen, I.-P., Hartung, F., Orel, N., Angelis, K.J., and Puchta, H.** (2004). The Rad17 homologue of *Arabidopsis* is involved in the regulation of DNA damage repair and homologous recombination. *Plant J.* **38**: 954–968.
- Helton, E.S. and Chen, X.** (2007). p53 modulation of the DNA damage response. *J. Cell. Biochem.* **100**: 883–896.
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Inzé, D., and Ferreira, P.** (1992). Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 3295–3299.
- Henriques, R., Magyar, Z., and Bögre, L.** (2013). S6K1 and E2FB are in mutually antagonistic regulatory links controlling cell growth and proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* **8**.
- Henriques, R., Magyar, Z., Monardes, A., Khan, S., Zalejski, C., Orellana, J., Szabados, L., de la Torre, C., Koncz, C., and Bögre, L.** (2010). *Arabidopsis* S6 kinase mutants display chromosome instability and altered RBR1–E2F pathway activity. *EMBO J.* **29**: 2979–2993.
- Hershko, A.** (2005). The ubiquitin system for protein degradation and some of its roles in the control of the cell division cycle. *Cell Death Differ.* **12**: 1191–1197.
- Hershko, A. and Ciechanover, A.** (1998). The Ubiquitin System. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 425–479.
- Heyman, J. and Veylder, L.D.** (2012). The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Control of Plant Development. *Mol. Plant* **5**: 1182–1194.
- Hiebert, S.W.** (1993). Regions of the retinoblastoma gene product required for its interaction with the E2F transcription factor are necessary for E2 promoter repression and pRb-mediated growth suppression. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 3384–3391.
- Hiebert, S.W., Chellappan, S.P., Horowitz, J.M., and Nevins, J.R.** (1992). The interaction of RB with E2F coincides with an inhibition of the transcriptional activity of E2F. *Genes Dev.* **6**: 177–185.
- Hirano, H., Shinmyo, A., and Sekine, M.** (2011a). *Arabidopsis* G1 cell cycle proteins undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation. *Plant Physiol. Biochem.* **49**: 687–691.
- Hirano, H., Shinmyo, A., and Sekine, M.** (2011b). Both negative and positive G1 cell cycle regulators undergo proteasome-dependent degradation during sucrose starvation in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* **6**: 1394–1396.
- Hopfner, K.-P. et al.** (2002). The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature* **418**: 562–566.
- Hořejší, Z., Falck, J., Bakkenist, C.J., Kastan, M.B., Lukas, J., and Bartek, J.** (2004). Distinct functional domains of Nbs1 modulate the timing and magnitude of ATM activation after low doses of ionizing radiation. *Oncogene* **23**: 3122–3127.
- Horvath, B.M. et al.** (2017). *Arabidopsis* RETINOBLASTOMA RELATED directly regulates DNA damage responses through functions beyond cell cycle control. *EMBO J.*: e201694561.
- Hotton, S.K. and Callis, J.** (2008). Regulation of Cullin RING Ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 467–489.
- Hua, Z. and Vierstra, R.D.** (2011a). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 299–334.
- Hua, Z. and Vierstra, R.D.** (2011b). The cullin-RING ubiquitin-protein ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**: 299–334.
- Huang, H., Regan, K.M., Wang, F., Wang, D., Smith, D.I., van Deursen, J.M.A., and Tindall, D.J.** (2005). Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 1649–1654.
- Huang, H., Ullah, F., Zhou, D.-X., Yi, M., and Zhao, Y.** (2019). Mechanisms of ROS Regulation of Plant Development and Stress Responses. *Front. Plant Sci.* **10**.
- Huang, L., Kinnucan, E., Wang, G., Beaudenon, S., Howley, P.M., Huibregtse, J.M., and Pavletich, N.P.** (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 Complex: Insights into Ubiquitination by the E2-E3 Enzyme Cascade. *Science* **286**: 1321–1326.
- Huibregtse, J.M., Scheffner, M., and Howley, P.M.** (1991). A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomavirus types 16 or 18. *EMBO J.* **10**: 4129–4135.
- Imai, K.K., Ohashi, Y., Tsuge, T., Yoshizumi, T., Matsui, M., Oka, A., and Aoyama, T.** (2006). The A-Type Cyclin CYCA2;3 Is a Key Regulator of Ploidy Levels in *Arabidopsis* Endoreduplication. *Plant Cell* **18**: 382–396.
- Imlay, J.A., Chin, S.M., and Linn, S.** (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science* **240**: 640–642.
- Ito, M.** (2005). Conservation and diversification of three-repeat Myb transcription factors in plants. *J. Plant Res.* **118**: 61–69.

- Ito, M.** (2000). Factors controlling cyclin B expression. *Plant Mol. Biol.* **43**: 677–690.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., and Watanabe, A.** (2001). G2/M-Phase-Specific Transcription during the Plant Cell Cycle Is Mediated by c-Myb-Like Transcription Factors. *Plant Cell* **13**: 1891–1906.
- Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E.M., Bronson, R.T., Goodell, M.A., and Weinberg, R.A.** (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature* **359**: 295–300.
- Jacob, P., Hirt, H., and Bendahmane, A.** (2017). The heat-shock protein/chaperone network and multiple stress resistance. *Plant Biotechnol. J.* **15**: 405–414.
- Jasinski, S., Riou-Khamlichi, C., Roche, O., Perennes, C., Bergounioux, C., and Glab, N.** (2002). The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants. *J. Cell Sci.* **115**: 973–982.
- Jégu, T. et al.** (2013). Multiple Functions of Kip-Related Protein5 Connect Endoreduplication and Cell Elongation[C][W]. *Plant Physiol.* **161**: 1694–1705.
- Ji, S. et al.** (2015). ERK kinase phosphorylates and destabilizes the tumor suppressor FBW7 in pancreatic cancer. *Cell Res.* **25**: 561–573.
- Jiang, D., Borg, M., Lorković, Z.J., Montgomery, S.A., Osakabe, A., Yelagandula, R., Axelsson, E., and Berger, F.** (2020). The evolution and functional divergence of the histone H2B family in plants. *PLOS Genet.* **16**: e1008964.
- Jin, J., Ang, X.L., Shirogane, T., and Wade Harper, J.** (2005). Identification of substrates for F-box proteins. *Methods Enzymol.* **399**: 287–309.
- Jiricny, J.** (2013). Postreplicative Mismatch Repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**.
- Jöhnk, B., Bayram, Ö., Abelmann, A., Heinekamp, T., Mattern, D.J., Brakhage, A.A., Jacobsen, I.D., Valerius, O., and Braus, G.H.** (2016). SCF Ubiquitin Ligase F-box Protein Fbx15 Controls Nuclear Co-repressor Localization, Stress Response and Virulence of the Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. *PLOS Pathog.* **12**: e1005899.
- Johnson, A. and Vert, G.** (2016). Unraveling K63 Polyubiquitination Networks by Sensor-Based Proteomics1. *Plant Physiol.* **171**: 1808–1820.
- Johnston, A.J., Kirioukhova, O., Barrell, P.J., Rutten, T., Moore, J.M., Baskar, R., Grossniklaus, U., and Grissem, W.** (2010). Dosage-Sensitive Function of RETINOBLASTOMA RELATED and Convergent Epigenetic Control Are Required during the Arabidopsis Life Cycle. *PLoS Genet.* **6**.
- Johnston, A.J., Matveeva, E., Kirioukhova, O., Grossniklaus, U., and Grissem, W.** (2008). A Dynamic Reciprocal RBR-PRC2 Regulatory Circuit Controls Arabidopsis Gametophyte Development. *Curr. Biol.* **18**: 1680–1686.
- Jonkers, W. and Rep, M.** (2009). Lessons from Fungal F-Box Proteins. *Eukaryot. Cell* **8**: 677–695.
- Joubès, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., and Renaudin, J.P.** (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol. Biol.* **43**: 607–620.
- Kadri, Z., Shimizu, R., Ohneda, O., Maouche-Chretien, L., Gisselbrecht, S., Yamamoto, M., Romeo, P.-H., Leboulch, P., and Chretien, S.** (2009). Direct Binding of pRb/E2F-2 to GATA-1 Regulates Maturation and Terminal Cell Division during Erythropoiesis. *PLoS Biol.* **7**.
- Kalinowska, K., Nagel, M.-K., and Isono, E.** (2016). Measuring the Enzyme Activity of Arabidopsis Deubiquitylating Enzymes. In *Plant Proteostasis: Methods and Protocols*, L.M. Lois and R. Matthiesen, eds, *Methods in Molecular Biology*. (Springer: New York, NY), pp. 35–44.
- Kamura, T., Hara, T., Kotoshiba, S., Yada, M., Ishida, N., Imaki, H., Hatakeyama, S., Nakayama, K., and Nakayama, K.I.** (2003). Degradation of p57Kip2 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 10231–10236.
- Khosla, A., Morffy, N., Li, Q., Faure, L., Chang, S.H., Yao, J., Zheng, J., Cai, M.L., Stanga, J., Flematti, G.R., Waters, M.T., and Nelson, D.C.** (2020). Structure–Function Analysis of SMAX1 Reveals Domains That Mediate Its Karrikin-Induced Proteolysis and Interaction with the Receptor KAI2. *Plant Cell* **32**: 2639–2659.
- Kim, D.-Y., Scalf, M., Smith, L.M., and Vierstra, R.D.** (2013a). Advanced Proteomic Analyses Yield a Deep Catalog of Ubiquitylation Targets in Arabidopsis[W]. *Plant Cell* **25**: 1523–1540.
- Kim, H., Yu, S., Jung, S.H., Lee, B., and Suh, M.C.** (2019). The F-Box Protein SAGL1 and ECERIFERUM3 Regulate Cuticular Wax Biosynthesis in Response to Changes in Humidity in Arabidopsis[OPEN]. *Plant Cell* **31**: 2223–2240.
- Kim, H.J., Oh, S.A., Brownfield, L., Hong, S.H., Ryu, H., Hwang, I., Twell, D., and Nam, H.G.** (2008). Control of plant germline proliferation by SCFFBL17 degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* **455**: 1134–1137.
- Kim, J., Kim, J.-A., McGinty, R.K., Nguyen, U.T.T., Muir, T.W., Allis, C.D., and Roeder, R.G.** (2013b). The n-SET Domain of Set1 Regulates H2B Ubiquitylation-Dependent H3K4 Methylation. *Mol. Cell* **49**: 1121–1133.

- Kim, J.-H.** (2019). Chromatin Remodeling and Epigenetic Regulation in Plant DNA Damage Repair. *Int. J. Mol. Sci.* **20**: 4093.
- Kim, J.H. and Kim, W.T.** (2013). The Arabidopsis RING E3 Ubiquitin Ligase AtAIRP3/LOG2 Participates in Positive Regulation of High-Salt and Drought Stress Responses. *PLANT Physiol.* **162**: 1733–1749.
- Kim, K.-W., Roh, J.K., Wee, H.-J., and Kim, C.** (2016a). Advancements in Bioscience and New Cancer Drugs. In *Cancer Drug Discovery: Science and History*, K.-W. Kim, J.K. Roh, H.-J. Wee, and C. Kim, eds (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 259–276.
- Kim, K.-W., Roh, J.K., Wee, H.-J., and Kim, C.** (2016b). Alkylating Anticancer Drugs. In *Cancer Drug Discovery: Science and History*, K.-W. Kim, J.K. Roh, H.-J. Wee, and C. Kim, eds (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 71–94.
- Kim, K.-W., Roh, J.K., Wee, H.-J., and Kim, C.** (2016c). Natural Product Anticancer Drugs. In *Cancer Drug Discovery: Science and History*, K.-W. Kim, J.K. Roh, H.-J. Wee, and C. Kim, eds (Springer Netherlands: Dordrecht), pp. 113–134.
- Kim, M.-A., Kim, H.-J., Brown, A.L., Lee, M.-Y., Bae, Y.-S., Park, J.-I., Kwak, J.-Y., Chung, J.H., and Yun, J.** (2007). Identification of novel substrates for human checkpoint kinase Chk1 and Chk2 through genome-wide screening using a consensus Chk phosphorylation motif. *Exp. Mol. Med.* **39**: 205–212.
- Kipreos, E.T. and Pagano, M.** (2000). The F-box protein family. *Genome Biol.* **1**: reviews3002.1-reviews3002.7.
- Knudsen, E.S. and Knudsen, K.E.** (2006). Retinoblastoma Tumor Suppressor: Where Cancer Meets the Cell Cycle. *Exp. Biol. Med.* **231**: 1271–1281.
- Ko, Y.U., Kim, C., Lee, J., Kim, D., Kim, Y., Yun, N., and Oh, Y.J.** (2019). Site-specific phosphorylation of Fbxw7 by Cdk5/p25 and its resulting decreased stability are linked to glutamate-induced excitotoxicity. *Cell Death Dis.* **10**: 579.
- Kobayashi, J., Tauchi, H., Sakamoto, S., Nakamura, A., Morishima, K., Matsuura, S., Kobayashi, T., Tamai, K., Tanimoto, K., and Komatsu, K.** (2002). NBS1 Localizes to γ -H2AX Foci through Interaction with the FHA/BRCT Domain. *Curr. Biol.* **12**: 1846–1851.
- Kobayashi, K. et al.** (2015a). Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* **34**: 1992–2007.
- Kobayashi, K. et al.** (2015b). Transcriptional repression by MYB3R proteins regulates plant organ growth. *EMBO J.* **34**: 1992–2007.
- Koegl, M., Hoppe, T., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Mayer, T.U., and Jentsch, S.** (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* **96**: 635–644.
- Koepp, D.M., Schaefer, L.K., Ye, X., Keyomarsi, K., Chu, C., Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (2001). Phosphorylation-Dependent Ubiquitination of Cyclin E by the SCFFbw7 Ubiquitin Ligase. *Science* **294**: 173–177.
- Kolb, C., Nagel, M.-K., Kalinowska, K., Hagmann, J., Ichikawa, M., Anzenberger, F., Alkofer, A., Sato, M.H., Braun, P., and Isono, E.** (2015). FYVE1 Is Essential for Vacuole Biogenesis and Intracellular Trafficking in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **167**: 1361–1373.
- Komaki, S. and Sugimoto, K.** (2012). Control of the Plant Cell Cycle by Developmental and Environmental Cues. *Plant Cell Physiol.* **53**: 953–964.
- Komatsu, K.** (2016). NBS1 and multiple regulations of DNA damage response. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* **57**: i11–i17.
- Kossatz, U., Dietrich, N., Zender, L., Buer, J., Manns, M.P., and Malek, N.P.** (2004). Skp2-dependent degradation of p27kip1 is essential for cell cycle progression. *Genes Dev.* **18**: 2602–2607.
- Krakoff, I.H., Brown, N.C., and Reichard, P.** (1968). Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.* **28**: 1559–1565.
- Krause, K., Kilbiński, I., Mulisch, M., Rödiger, A., Schäfer, A., and Krupinska, K.** (2005). DNA-binding proteins of the Whirly family in *Arabidopsis thaliana* are targeted to the organelles. *FEBS Lett.* **579**: 3707–3712.
- Kresge, N., Simoni, R.D., and Hill, R.L.** (2006). The Discovery of Ubiquitin-mediated Proteolysis by Aaron Ciechanover, Avram Hershko, and Irwin Rose. *J. Biol. Chem.* **281**: e32–e32.
- Kumagai-Sano, F., Hayashi, T., Sano, T., and Hasezawa, S.** (2006). Cell cycle synchronization of tobacco BY-2 cells. *Nat. Protoc.* **1**: 2621–2627.
- Kumar, N. et al.** (2015). Functional Conservation in the SIAMESE-RELATED Family of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors in Land Plants. *Plant Cell* **27**: 3065–3080.
- Kumar, N., Dale, R., Kemboi, D., Zeringue, E.A., Kato, N., and Larkin, J.C.** (2018). Functional Analysis of Short Linear Motifs in the Plant Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor SIAMESE1[OPEN]. *Plant Physiol.* **177**: 1569–1579.
- Kumar, N. and Larkin, J.C.** (2017). Why do plants need so many cyclin-dependent kinase inhibitors? *Plant Signal. Behav.* **12**.

- Kunkel, T.A. (2004). DNA Replication Fidelity. *J. Biol. Chem.* **279**: 16895–16898.
- Kwee, H.-S. and Sundaresan, V. (2003). The NOMEA gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the Anaphase Promoting Complex in Arabidopsis. *Plant J.* **36**: 853–866.
- Kwon, Y.T. and Ciechanover, A. (2017). The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem. Sci.* **42**: 873–886.
- Lam, B.C.-H., Sage, T.L., Bianchi, F., and Blumwald, E. (2002). Regulation of ADL6 activity by its associated molecular network. *Plant J.* **31**: 565–576.
- Lam, B.C.-H., Sage, T.L., Bianchi, F., and Blumwald, E. (2001). Role of SH3 Domain-Containing Proteins in Clathrin-Mediated Vesicle Trafficking in Arabidopsis. *Plant Cell* **13**: 2499.
- Lamber, E.P., Beuron, F., Morris, E.P., Svergun, D.I., and Mittnacht, S. (2013). Structural Insights into the Mechanism of Phosphoregulation of the Retinoblastoma Protein. *PLoS ONE* **8**.
- Landrieu, I., da Costa, M., De Veylder, L., Dewitte, F., Vandepoele, K., Hassan, S., Wieruszeski, J.-M., Faure, J.-D., Van Montagu, M., Inzé, D., and Lippens, G. (2004a). A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 13380–13385.
- Landrieu, I., Hassan, S., Sauty, M., Dewitte, F., Wieruszeski, J.-M., Inzé, D., Veylder, L.D., and Lippens, G. (2004b). Characterization of the Arabidopsis thaliana Arath;CDC25 dual-specificity tyrosine phosphatase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **322**: 734–739.
- Lang, J., Smetana, O., Sanchez-Calderon, L., Lincker, F., Genestier, J., Schmit, A.-C., Houlné, G., and Chabouté, M.-E. (2012). Plant γ H2AX foci are required for proper DNA DSB repair responses and colocalize with E2F factors. *New Phytol.* **194**: 353–363.
- 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, C., Chang, J.H., Lee, H.S., and Cho, Y. (2002). Structural basis for the recognition of the E2F transactivation domain by the retinoblastoma tumor suppressor. *Genes Dev.* **16**: 3199–3212.
- Lee, E.Y.-H.P., Chang, C.-Y., Hu, N., Wang, Y.-C.J., Lai, C.-C., Herrup, K., Lee, W.-H., and Bradley, A. (1992). Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis. *Nature* **359**: 288–294.
- Lee, J.-H. and Paull, T.T. (2004). Direct Activation of the ATM Protein Kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 Complex. *Science* **304**: 93–96.
- Lee, J.-O., Russo, A.A., and Pavletich, N.P. (1998). Structure of the retinoblastoma tumour-suppressor pocket domain bound to a peptide from HPV E7. *Nature* **391**: 859–865.
- Lee, J.-S., Collins, K.M., Brown, A.L., Lee, C.-H., and Chung, J.H. (2000). hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. *Nature* **404**: 201–204.
- Lee, M.G. and Nurse, P. (1987). Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2. *Nature* **327**: 31–35.
- Li, X., Cai, W., Liu, Y., Li, H., Fu, L., Liu, Z., Xu, L., Liu, H., Xu, T., and Xiong, Y. (2017). Differential TOR activation and cell proliferation in Arabidopsis root and shoot apices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 2765–2770.
- Li, X., Zhao, Q., Liao, R., Sun, P., and Wu, X. (2003). The SCFSkp2 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.
- Liu, H., Wang, J., Liu, Y., Hu, L., Zhang, C., Xing, B., and Du, X. (2018). Human U3 protein14a is a novel type ubiquitin ligase that binds RB and promotes RB degradation depending on a leucine-rich region. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1865**: 1611–1620.
- Liu, J. et al. (2008). Targeted Degradation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK4/KRP6 by RING-Type E3 Ligases Is Essential for Mitotic Cell Cycle Progression during Arabidopsis Gametogenesis. *Plant Cell* **20**: 1538–1554.
- Liu, Y. et al. (2020). Cysteine protease RD21A regulated by E3 ligase SINAT4 is required for drought-induced resistance to Pseudomonas syringae in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.*: eaa255.
- Liu, Y. et al. (2017). Transcriptional landscape of the human cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**: 3473–3478.

- Liu, Y., Lai, J., Yu, M., Wang, F., Zhang, J., Jiang, J., Hu, H., Wu, Q., Lu, G., Xu, P., and Yang, C. (2016). The Arabidopsis SUMO E3 Ligase AtMMS21 Dissociates the E2Fa/DPa Complex in Cell Cycle Regulation. *Plant Cell* **28**: 2225–2237.
- Liu, Z., Chen, G., Gao, F., Xu, R., Li, N., Zhang, Y., and Li, Y. (2019). Transcriptional Repression of the APC/C Activator Genes CCS52A1/A2 by the Mediator Complex Subunit MED16 Controls Endoreduplication and Cell Growth in Arabidopsis. *Plant Cell* **31**: 1899–1912.
- Livingston, D.M., Kaelin, W., Chittenden, T., and Qin, X. (1993). Structural and functional contributions to the G1 blocking action of the retinoblastoma protein. (the 1992 Gordon Hamilton Fairley Memorial Lecture). *Br. J. Cancer* **68**: 264–268.
- Lorković, Z.J. and Berger, F. (2017). Heterochromatin and DNA damage repair: Use different histone variants and relax. *Nucl. Austin Tex* **8**: 583–588.
- 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.
- Lukas, J., Lukas, C., and Bartek, J. (2004). Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair* **3**: 997–1007.
- Luo, G., Yao, M.S., Bender, C.F., Mills, M., Bladl, A.R., Bradley, A., and Petrini, J.H.J. (1999). Disruption of mRad50 causes embryonic stem cell lethality, abnormal embryonic development, and sensitivity to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 7376–7381.
- MacDonald, J.I. and Dick, F.A. (2012). Posttranslational Modifications of the Retinoblastoma Tumor Suppressor Protein as Determinants of Function. *Genes Cancer* **3**: 619–633.
- Maehara, K., Yamakoshi, K., Ohtani, N., Kubo, Y., Takahashi, A., Arase, S., Jones, N., and Hara, E. (2005). Reduction of total E2F/DP activity induces senescence-like cell cycle arrest in cancer cells lacking functional pRB and p53. *J. Cell Biol.* **168**: 553–560.
- Magyar, Z. et al. (1997). Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**: 223–235.
- Magyar, Z., Atanassova, A., Veylder, L.D., Rombauts, S., and Inzé, D. (2000). Characterization of two distinct DP-related genes from Arabidopsis thaliana 1. *FEBS Lett.* **486**: 79–87.
- Magyar, Z., Bögre, L., and Ito, M. (2016). DREAMs make plant cells to cycle or to become quiescent. *Curr. Opin. Plant Biol.* **34**: 100–106.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D., and Bögre, L. (2005). The Role of the Arabidopsis E2FB Transcription Factor in Regulating Auxin-Dependent Cell Division. *Plant Cell* **17**: 2527–2541.
- Magyar, Z., Horváth, B., Khan, S., Mohammed, B., Henriques, R., De Veylder, L., Bakó, L., Scheres, B., and Bögre, L. (2012). Arabidopsis E2FA stimulates proliferation and endocycle separately through RBR-bound and RBR-free complexes. *EMBO J.* **31**: 1480–1493.
- Malonia, S.K., Dutta, P., Santra, M.K., and Green, M.R. (2015). F-box protein FBXO31 directs degradation of MDM2 to facilitate p53-mediated growth arrest following genotoxic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**: 8632–8637.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2005). Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem. Sci.* **30**: 630–641.
- Manova, V. and Gruszka, D. (2015). DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Front. Plant Sci.* **6**.
- del Mar Castellano, M., Boniotti, M.B., Caro, E., Schnittger, A., and Gutierrez, C. (2004). DNA Replication Licensing Affects Cell Proliferation or Endoreplication in a Cell Type-Specific Manner. *Plant Cell* **16**: 2380–2393.
- Maréchal, A., Parent, J.-S., Sabar, M., Veronneau-Lafortune, F., Abou-Rached, C., and Brisson, N. (2008). Overexpression of mtDNA-associated AtWhy2 compromises mitochondrial function. *BMC Plant Biol.* **8**: 42.
- Marechal, A., Parent, J.-S., Veronneau-Lafortune, F., Joyeux, A., Lang, B.F., and Brisson, N. (2009). Whirly proteins maintain plastid genome stability in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 14693–14698.
- Maréchal, A. and Zou, L. (2013). DNA Damage Sensing by the ATM and ATR Kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**.
- Mariconti, L., Pellegrini, B., Cantoni, R., Stevens, R., Bergounioux, C., Cella, R., and Albani, D. (2002). The E2F Family of Transcription Factors from Arabidopsis thaliana NOVEL AND CONSERVED COMPONENTS OF THE RETINOBLASTOMA/E2F PATHWAY IN PLANTS. *J. Biol. Chem.* **277**: 9911–9919.
- Marín, I. (2013). Evolution of Plant HECT Ubiquitin Ligases. *PLoS ONE* **8**.

- Marrocco, K., Thomann, A., Parmentier, Y., 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.
- Marshall, R.S. and Vierstra, R.D.** (2019). Dynamic Regulation of the 26S Proteasome: From Synthesis to Degradation. *Front. Mol. Biosci.* **6**.
- Marti, A., Wirbelauer, C., Scheffner, M., and Krek, W.** (1999). Interaction between ubiquitin–protein ligase SCF SKP2 and E2F-1 underlies the regulation of E2F-1 degradation. *Nat. Cell Biol.* **1**: 14–19.
- Matsuoka, S. et al.** (2007). ATM and ATR Substrate Analysis Reveals Extensive Protein Networks Responsive to DNA Damage. *Science* **316**: 1160–1166.
- McLean, J.R., Chaix, D., Ohi, M.D., and Gould, K.L.** (2011). State of the APC/C: Organization, function, and structure. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**: 118–136.
- Melander, F., Bekker-Jensen, S., Falck, J., Bartek, J., Mailand, N., and Lukas, J.** (2008). Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage–modified chromatin. *J. Cell Biol.* **181**: 213–226.
- Méndez, J., Zou-Yang, X.H., Kim, S.-Y., Hidaka, M., Tansey, W.P., and Stillman, B.** (2002). Human Origin Recognition Complex Large Subunit Is Degraded by Ubiquitin-Mediated Proteolysis after Initiation of DNA Replication. *Mol. Cell* **9**: 481–491.
- Meng, F., Qian, J., Yue, H., Li, X., and Xue, K.** (2016). SUMOylation of Rb enhances its binding with CDK2 and phosphorylation at early G1 phase. *Cell Cycle* **15**: 1724–1732.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., and Murray, J.A.H.** (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol. Biol.* **53**: 423–442.
- Menges, M., Jager, S.M.D., Gruissem, W., and Murray, J.A.H.** (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* **41**: 546–566.
- Menolfi, D. and Zha, S.** (2020). ATM, ATR and DNA-PKcs kinases—the lessons from the mouse models: inhibition ≠ deletion. *Cell Biosci.* **10**.
- 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.
- Mironov, V., De Veylder L, Van Montagu M, and Inze, D.** (1999). Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant Cell* **11**: 509–522.
- Molinier, J.** (2017). Genome and Epigenome Surveillance Processes Underlying UV Exposure in Plants. *Genes* **8**.
- Molinier, J., Ries, G., Bonhoeffer, S., and Hohn, B.** (2004). Interchromatid and Interhomolog Recombination in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**: 342–352.
- Morgan, D.O. and New Science Press** (2007). The cell cycle: principles of control (New Science Press ; Sinauer Associates: London; Sunderland, MA).
- Morgunova, E., Yin, Y., Jolma, A., Dave, K., Schmierer, B., Popov, A., Eremina, N., Nilsson, L., and Taipale, J.** (2015). Structural insights into the DNA-binding specificity of E2F family transcription factors. *Nat. Commun.* **6**: 10050.
- Morris, E.J. and Dyson, N.J.** (2001). Retinoblastoma protein partners. In *Advances in Cancer Research* (Academic Press), pp. 1–54.
- Mukherjee, K., Brocchieri, L., and Burglin, T.R.** (2009). A Comprehensive Classification and Evolutionary Analysis of Plant Homeobox Genes. *Mol. Biol. Evol.* **26**: 2775–2794.
- Murali Achary, V.M. and Panda, B.B.** (2010). Aluminium-induced DNA damage and adaptive response to genotoxic stress in plant cells are mediated through reactive oxygen intermediates. *Mutagenesis* **25**: 201–209.
- Mushtaq, M., Gaza, H.V., and Kashuba, E.V.** (2016). Chapter Five - Role of the RB-Interacting Proteins in Stem Cell Biology. In *Advances in Cancer Research*, K.D. Tew and P.B. Fisher, eds (Academic Press), pp. 133–157.
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M., and Shinmyo, A.** (2002). Phosphorylation of Retinoblastoma-Related Protein by the Cyclin D/Cyclin-Dependent Kinase Complex Is Activated at the G1/S-Phase Transition in Tobacco. *Plant Cell* **14**: 1847–1857.
- Nakagawa, T. et al.** (2007). Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**: 2095–2100.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., and Sekine, M.** (2006). Arabidopsis KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Lett.* **580**: 336–340.

- Nakayama, K. et al.** (2000a). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27(Kip1), polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.* **19**: 2069–2081.
- Nakayama, K. et al.** (2000b). Targeted disruption of Skp2 results in accumulation of cyclin E and p27Kip1, polyploidy and centrosome overduplication. *EMBO J.* **19**: 2069–2081.
- Naouar, N., Vandepoele, K., Lammens, T., Casneuf, T., Zeller, G., Hummelen, P.V., Weigel, D., Rätsch, G., Inzé, D., Kuiper, M., Veylder, L.D., and Vuylsteke, M.** (2009). Quantitative RNA expression analysis with Affymetrix Tiling 1.0R arrays identifies new E2F target genes. *Plant J.* **57**: 184–194.
- Nash, P., Tang, X., Orlicky, S., Chen, Q., Gertler, F.B., Mendenhall, M.D., Sicheri, F., Pawson, T., and Tyers, M.** (2001). Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication. *Nature* **414**: 514–521.
- Nigg, E.A.** (1996). Cyclin-dependent kinase 7: at the cross-roads of transcription, DNA repair and cell cycle control? *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**: 312–317.
- Nisa, M.-U., Huang, Y., Benhamed, M., and Raynaud, C.** (2019). The Plant DNA Damage Response: Signaling Pathways Leading to Growth Inhibition and Putative Role in Response to Stress Conditions. *Front. Plant Sci.* **10**.
- Noble, M.E.M., Endicott, J.A., Brown, N.R., and Johnson, L.N.** (1997). The cyclin box fold: protein recognition in cell-cycle and transcription control. *Trends Biochem. Sci.* **22**: 482–487.
- Noir, S., Marrocco, K., Masoud, K., Thomann, A., Gusti, A., Bitrian, M., Schnittger, A., and Genschik, P.** (2015). The Control of Arabidopsis thaliana Growth by Cell Proliferation and Endoreplication Requires the F-Box Protein FBL17. *Plant Cell* **27**: 1461–1476.
- Norbury, C.J. and Zivotovsky, B.** (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23**: 2797–2808.
- Nowack, M.K., Harashima, H., Dissmeyer, N., Zhao, X., Bouyer, D., Weimer, A.K., De Winter, F., Yang, F., and Schnittger, A.** (2012a). Genetic Framework of Cyclin-Dependent Kinase Function in Arabidopsis. *Dev. Cell* **22**: 1030–1040.
- Nowack, M.K., Harashima, H., Dissmeyer, N., Zhao, X., Bouyer, D., Weimer, A.K., De Winter, F., Yang, F., and Schnittger, A.** (2012b). Genetic Framework of Cyclin-Dependent Kinase Function in Arabidopsis. *Dev. Cell* **22**: 1030–1040.
- Nugent, J.H., Alfa, C.E., Young, T., and Hyams, J.S.** (1991). Conserved structural motifs in cyclins identified by sequence analysis. *J. Cell Sci.* **99**: 669–674.
- Oakley, G.G. and Patrick, S.M.** (2010). Replication protein A: directing traffic at the intersection of replication and repair. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **15**: 883–900.
- Ogita, N. et al.** (2018). Identifying the target genes of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1, a master transcription factor controlling DNA damage response in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **94**: 439–453.
- Onge, R.P.St., Udell, C.M., Casselman, R., and Davey, S.** (1999). The Human G2 Checkpoint Control Protein hRAD9 Is a Nuclear Phosphoprotein That Forms Complexes with hRAD1 and hHUS1. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1985–1995.
- Ooka, H. et al.** (2003). Comprehensive Analysis of NAC Family Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* **10**: 239–247.
- Orel, N., Kyryk, A., and Puchta, H.** (2003). Different pathways of homologous recombination are used for the repair of double-strand breaks within tandemly arranged sequences in the plant genome. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **35**: 604–612.
- Őszi, E., Papdi, C., Mohammed, B., Petkó-Szandtner, A., Leviczky, T., Molnár, E., Galvan-Ampudia, C., Khan, S., Juez, E.L., Horváth, B., Bögre, L., and Magyar, Z.** (2020). E2FB Interacts with RETINOBLASTOMA RELATED and Regulates Cell Proliferation during Leaf Development. *Plant Physiol.* **182**: 518–533.
- Ozkaynak, E., Finley, D., Solomon, M.J., and Varshavsky, A.** (1987). The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions. *EMBO J.* **6**: 1429–1439.
- Parameswaran, B., Chiang, H.-C., Lu, Y., Coates, J., Deng, C.-X., Baer, R., Lin, H.-K., Li, R., Paull, T.T., and Hu, Y.** (2015). Damage-induced BRCA1 phosphorylation by Chk2 contributes to the timing of end resection. *Cell Cycle* **14**: 437–448.
- Parrilla-Castellar, E.R., Arlander, S.J.H., and Karnitz, L.** (2004). Dial 9–1–1 for DNA damage: the Rad9–Hus1–Rad1 (9–1–1) clamp complex. *DNA Repair* **3**: 1009–1014.
- Paull, T.T. and Deshpande, R.A.** (2014). The Mre11/Rad50/Nbs1 Complex: recent insights into catalytic activities and ATP-driven conformational changes. *Exp. Cell Res.* **329**: 139–147.
- Pedroza-Garcia, J.-A., De Veylder, L., and Raynaud, C.** (2019). Plant DNA Polymerases. *Int. J. Mol. Sci.* **20**.

- Peña-Díaz, J., Hegre, S.A., Anderssen, E., Aas, P.A., Mjelle, R., Gilfillan, G.D., Lyle, R., Drabløs, F., Krokan, H.E., and Sætrum, P.** (2013). Transcription profiling during the cell cycle shows that a subset of Polycomb-targeted genes is upregulated during DNA replication. *Nucleic Acids Res.* **41**: 2846–2856.
- Peres, A. et al.** (2007). Novel Plant-specific Cyclin-dependent Kinase Inhibitors Induced by Biotic and Abiotic Stresses. *J. Biol. Chem.* **282**: 25588–25596.
- Pérez Di Giorgio, J.A., Lepage, É., Tremblay-Belzile, S., Truche, S., Loubert-Hudon, A., and Brisson, N.** (2019). Transcription is a major driving force for plastid genome instability in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* **14**.
- Pérez-Pérez, J.M., Serralbo, O., Vanstraelen, M., González, C., Criqui, M.-C., Genschik, P., Kondorosi, E., and Scheres, B.** (2008). Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J.* **53**: 78–89.
- Peters, J.-M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**: 644–656.
- Pickart, C.M. and Fushman, D.** (2004). Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**: 610–616.
- Pogorelko, G.V. et al.** (2019). Re-targeting of a plant defense protease by a cyst nematode effector. *Plant J.*: tpj.14295.
- Popov, N., Schmitt, M., Schulzeck, S., and Matthies, H.** (1975). [Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates]. *Acta Biol. Med. Ger.* **34**: 1441–1446.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.-P., Segers, G., Veylder, L.D., Barrôco, R. de P., Casteels, P., Montagu, M.V., Inzé, D., and Mironov, V.** (2001). A Plant-specific Cyclin-dependent Kinase Is Involved in the Control of G2/M Progression in Plants. *J. Biol. Chem.* **276**: 36354–36360.
- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., and Gutierrez, C.** (2002). *Arabidopsis* E2F_c functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* **14**: 3057–3071.
- del Pozo, J.C., Díaz-Trivino, S., Cisneros, N., and Gutierrez, C.** (2006). The Balance between Cell Division and Endoreplication Depends on E2F_c-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCFSKP2A Pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 2224–2235.
- Preuss, S.B. and Britt, A.B.** (2003). A DNA-damage-induced cell cycle checkpoint in *Arabidopsis*. *Genetics* **164**: 323–334.
- Prikryl, J., Watkins, K.P., Friso, G., van Wijk, K.J., and Barkan, A.** (2008). A member of the Whirly family is a multifunctional RNA- and DNA-binding protein that is essential for chloroplast biogenesis. *Nucleic Acids Res.* **36**: 5152–5165.
- Probst, A.V., Desvoyes, B., and Gutierrez, C.** (2020). Similar yet critically different: the distribution, dynamics and function of histone variants. *J. Exp. Bot.*: eraa230.
- Pružinská, A., Shindo, T., Niessen, S., Kaschani, F., Tóth, R., Millar, A.H., and van der Hoorn, R.A.L.** (2017). Major Cys protease activities are not essential for senescence in individually darkened *Arabidopsis* leaves. *BMC Plant Biol.* **17**: 4.
- Puchta, H.** (2005). The repair of double-strand breaks in plants: mechanisms and consequences for genome evolution. *J. Exp. Bot.* **56**: 1–14.
- Puchta, H. and Hohn, B.** (2012). In Planta Somatic Homologous Recombination Assay Revisited: A Successful and Versatile, but Delicate Tool. *Plant Cell* **24**: 4324–4331.
- Qin, X.Q., Chittenden, T., Livingston, D.M., and Kaelin, W.G.** (1992). Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev.* **6**: 953–964.
- Ramirez-Parra, E., Fründt, C., and Gutierrez, C.** (2003). A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* **33**: 801–811.
- Ravid, T. and Hochstrasser, M.** (2008). Degradation signal diversity in the ubiquitin-proteasome system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 679–690.
- Reiland, S., Messerli, G., Baerenfaller, K., Gerrits, B., Endler, A., Grossmann, J., Gruissem, W., and Baginsky, S.** (2009). Large-Scale *Arabidopsis* Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. *Plant Physiol.* **150**: 889–903.
- Ren, H., Santner, A., del Pozo, J.C., Murray, J.A.H., and Estelle, M.** (2008). Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **53**: 705–716.
- Riera, A., Barbon, M., Noguchi, Y., Reuter, L.M., Schneider, S., and Speck, C.** (2017). From structure to mechanism—understanding initiation of DNA replication. *Genes Dev.* **31**: 1073–1088.
- Roa, H., Lang, J., Culligan, K.M., Keller, M., Holec, S., Cognat, V., Montané, M.-H., Houlné, G., and Chabouté, M.-E.** (2009). Ribonucleotide reductase regulation in response to genotoxic stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **151**: 461–471.

- Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M.** (1999). Megabase Chromatin Domains Involved in DNA Double-Strand Breaks in Vivo. *J. Cell Biol.* **146**: 905–916.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M.** (1998). DNA Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX Phosphorylation on Serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**: 5858–5868.
- Roitinger, E., Hofer, M., Köcher, T., Pichler, P., Novatchkova, M., Yang, J., Schlögelhofer, P., and Mechtler, K.** (2015). Quantitative phosphoproteomics of the ataxia telangiectasia-mutated (ATM) and ataxia telangiectasia-mutated and rad3-related (ATR) dependent DNA damage response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Proteomics MCP* **14**: 556–571.
- Romero-Barrios, N., Monachello, D., Dolde, U., Wong, A., Clemente, H.S., Cayrel, A., Johnson, A., Lurin, C., and Vert, G.** (2020). Advanced Cataloging of Lysine-63 Polyubiquitin Networks by Genomic, Interactome, and Sensor-Based Proteomic Analyses. *Plant Cell* **32**: 123–138.
- Rosenberg, B., Vancamp, L., and Krigas, T.** (1965). INHIBITION OF CELL DIVISION IN *ESCHERICHIA COLI* BY ELECTROLYSIS PRODUCTS FROM A PLATINUM ELECTRODE. *Nature* **205**: 698–699.
- Rosenthal, F., Wislicki, L., and Kollek, L.** (1928). Über die Beziehungen von Schwersten Blutgiften zu Abbauprodukten des Eiweisses: Ein Beitrag zum Entstehungsmechanismus der perniziösen Anämie. *Klin. Wochenschr.* **7**: 972–977.
- Roskoski, R.** (2019). Cyclin-dependent protein serine/threonine kinase inhibitors as anticancer drugs. *Pharmacol. Res.* **139**: 471–488.
- Rotin, D. and Kumar, S.** (2009). Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 398–409.
- Rousset-Roman, A., Rebolloso-Gómez, Y., and Olivares-Illana, V.** (2019). Expression and purification of the recombinant full-length retinoblastoma protein and characterisation of its interaction with the oncoprotein HDM2. *Protein Expr. Purif.* **162**: 62–66.
- Rozan, L.M. and El-Deiry, W.S.** (2007). p53 downstream target genes and tumor suppression: a classical view in evolution. *Cell Death Differ.* **14**: 3–9.
- Rubin, S.M.** (2013). Deciphering the Rb phosphorylation code. *Trends Biochem. Sci.* **38**: 12–19.
- Rubin, S.M., Gall, A.-L., Zheng, N., and Pavletich, N.P.** (2005). Structure of the Rb C-Terminal Domain Bound to E2F1-DP1: A Mechanism for Phosphorylation-Induced E2F Release. *Cell* **123**: 1093–1106.
- Rupnik, A., Lowndes, N.F., and Grenon, M.** (2010). MRN and the race to the break. *Chromosoma* **119**: 115–135.
- Russell, P. and Nurse, P.** (1986). *Schizosaccharomyces pombe* and *saccharomyces cerevisiae*: A look at yeasts divided. *Cell* **45**: 781–782.
- Rutkowski, R., Hofmann, K., and Gartner, A.** (2010). Phylogeny and Function of the Invertebrate p53 Superfamily. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**.
- Sabelli, P.A. and Larkins, B.A.** (2009). Regulation and function of retinoblastoma-related plant genes. *Plant Sci.* **177**: 540–548.
- Sadasivam, S., Duan, S., and DeCaprio, J.A.** (2012). The MuvB complex sequentially recruits B-Myb and FoxM1 to promote mitotic gene expression. *Genes Dev.* **26**: 474–489.
- Sage, E. and Shikazono, N.** (2017). Radiation-induced clustered DNA lesions: Repair and mutagenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **107**: 125–135.
- Sanchez, M. de la P., Costas, C., Sequeira-Mendes, J., and Gutierrez, C.** (2012). Regulating DNA Replication in Plants. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**.
- Sanidas, I., Morris, R., Fella, K.A., Rumde, P.H., Boukhali, M., Tai, E.C., Ting, D.T., Lawrence, M.S., Haas, W., and Dyson, N.J.** (2019). A Code of Mono-phosphorylation Modulates the Function of RB. *Mol. Cell* **73**: 985–1000.e6.
- Santocanale, C., Neecke, H., Longhese, M.P., Lucchini, G., and Plevani, P.** (1995). Mutations in the Gene Encoding the 34 kDa Subunit of Yeast Replication Protein A Cause Defective S Phase Progression. *J. Mol. Biol.* **254**: 595–607.
- Santra, M.K., Wajapeyee, N., and Green, M.R.** (2009). F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature* **459**: 722–725.
- Sanz, L. et al.** (2011). The *Arabidopsis* D-Type Cyclin CYCD2;1 and the Inhibitor ICK2/KRP2 Modulate Auxin-Induced Lateral Root Formation[C][W][OA]. *Plant Cell* **23**: 641–660.
- Sarikas, A., Hartmann, T., and Pan, Z.-Q.** (2011). The cullin protein family. *Genome Biol.* **12**: 220.
- Saurin, A.J., Borden, K.L.B., Boddy, M.N., and Freemont, P.S.** (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* **21**: 208–214.
- Schnittger, A. and De Veylder, L.** (2018). The Dual Face of Cyclin B1. *Trends Plant Sci.* **23**: 475–478.

- Schnittger, A., Schöbinger, U., Bouyer, D., Weinl, C., Stierhof, Y.-D., and Hülskamp, M.** (2002). Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in *Arabidopsis* trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 6410–6415.
- Schnittger, A., Weinl, C., Bouyer, D., Schöbinger, U., and Hülskamp, M.** (2003). Misexpression of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor ICK1/KRP1 in Single-Celled *Arabidopsis* Trichomes Reduces Endoreduplication and Cell Size and Induces Cell Death. *Plant Cell* **15**: 303–315.
- Schuermann, D., Fritsch, O., Lucht, J.M., and Hohn, B.** (2009). Replication Stress Leads to Genome Instabilities in *Arabidopsis* DNA Polymerase δ Mutants. *Plant Cell* **21**: 2700–2714.
- Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., and Livingston, D.M.** (1997). Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell* **90**: 425–435.
- Sdek, P., Ying, H., Chang, D.L.F., Qiu, W., Zheng, H., Touitou, R., Allday, M.J., and Jim Xiao, Z.-X.** (2005). MDM2 Promotes Proteasome-Dependent Ubiquitin-Independent Degradation of Retinoblastoma Protein. *Mol. Cell* **20**: 699–708.
- Serralbo, O., Pérez-Pérez, J.M., Heidstra, R., and Scheres, B.** (2006). Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of HOBBIT, an *Arabidopsis* CDC27 homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 13250–13255.
- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., and Pessarakli, M.** (2012). Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *J. Bot.*
- Sharp, P.M. and Li, W.-H.** (1987). Ubiquitin genes as a paradigm of concerted evolution of tandem repeats. *J. Mol. Evol.* **25**: 58–64.
- Shen, W.-H., Parmentier, Y., Hellmann, H., Lechner, E., Dong, A., Masson, J., Granier, F., Lepiniec, L., Estelle, M., and Genschik, P.** (2002). Null Mutation of AtCUL1 Causes Arrest in Early Embryogenesis in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1916–1928.
- Shimotohno, A., Ohno, R., Bisova, K., Sakaguchi, N., Huang, J., Koncz, C., Uchimiya, H., and Umeda, M.** (2006). Diverse phosphoregulatory mechanisms controlling cyclin-dependent kinase-activating kinases in *Arabidopsis*. *Plant J.* **47**: 701–710x.
- Shu, Z., Row, S., and Deng, W.-M.** (2018a). Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly. *Trends Cell Biol.* **28**: 465–474.
- Shu, Z., Row, S., and Deng, W.-M.** (2018b). Endoreplication: The Good, the Bad, and the Ugly. *Trends Cell Biol.* **28**: 465–474.
- Shultz, R.W., Tatineni, V.M., Hanley-Bowdoin, L., and Thompson, W.F.** (2007). Genome-Wide Analysis of the Core DNA Replication Machinery in the Higher Plants *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol.* **144**: 1697–1714.
- Singh, A. and Xu, Y.-J.** (2016). The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes* **7**.
- Sinha, R.P. and Häder, D.-P.** (2002). UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.* **1**: 225–236.
- Sjogren, C.A., Bolaris, S.C., and Larsen, P.B.** (2015). Aluminum-Dependent Terminal Differentiation of the *Arabidopsis* Root Tip Is Mediated through an ATR-, ALT2-, and SOG1-Regulated Transcriptional Response[OPEN]. *Plant Cell* **27**: 2501–2515.
- Skaar, J.R., Pagan, J.K., and Pagano, M.** (2013). Mechanisms and function of substrate recruitment by F-box proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 369–381.
- Smith, J. and Rothstein, R.** (1995). A mutation in the gene encoding the *Saccharomyces cerevisiae* single-stranded DNA-binding protein Rfa1 stimulates a RAD52-independent pathway for direct-repeat recombination. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 1632–1641.
- Sofroni, K., Takatsuka, H., Yang, C., Dissmeyer, N., Komaki, S., Hamamura, Y., Böttger, L., Umeda, M., and Schnittger, A.** (2020). CDKD-dependent activation of CDKA;1 controls microtubule dynamics and cytokinesis during meiosis. *J. Cell Biol.* **219**: e201907016.
- Sohn, S.Y. and Cho, Y.** (2009). Crystal Structure of the Human Rad9–Hus1–Rad1 Clamp. *J. Mol. Biol.* **390**: 490–502.
- Sorrell, D.A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, R.J., Rogers, H.J., and Francis, D.** (2002). A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**: 518–522.
- Sozzani, R., Maggio, C., Varotto, S., Canova, S., Bergounioux, C., Albani, D., and Cella, R.** (2006). Interplay between *Arabidopsis* Activating Factors E2Fb and E2Fa in Cell Cycle Progression and Development. *Plant Physiol.* **140**: 1355–1366.

- Spycher, C., Miller, E.S., Townsend, K., Pavic, L., Morrice, N.A., Janscak, P., Stewart, G.S., and Stucki, M.** (2008). Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11–RAD50–NBS1 complex to damaged chromatin. *J. Cell Biol.* **181**: 227–240.
- Stokes, M.P. et al.** (2007). Profiling of UV-induced ATM/ATR signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 19855–19860.
- Stracke, R., Werber, M., and Weisshaar, B.** (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 447–456.
- Stubbe, JoAnne. and Kozarich, J.W.** (1987). Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation. *Chem. Rev.* **87**: 1107–1136.
- Stuttman, J., Lechner, E., Guérois, R., Parker, J.E., Nussaume, L., Genschik, P., and Noël, L.D.** (2009). COP9 Signalosome- and 26S Proteasome-dependent Regulation of SCFTIR1 Accumulation in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **284**: 7920–7930.
- Sun, C.W. and Callis, J.** (1993). Recent stable insertion of mitochondrial DNA into an *Arabidopsis* polyubiquitin gene by nonhomologous recombination. *Plant Cell* **5**: 97–107.
- Sun, P., Li, S., Lu, D., Williams, J.S., and Kao, T.-H.** (2015). Pollen S-locus F-box proteins of *Petunia* involved in S-RNase-based self-incompatibility are themselves subject to ubiquitin-mediated degradation. *Plant J.* **83**: 213–223.
- Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., Lowe, K.S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J., and Larkins, B.A.** (1999). Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**: 4180–4185.
- Sung, S., Li, F., Park, Y.B., Kim, J.S., Kim, A.-K., Song, O., Kim, J., Che, J., Lee, S.E., and Cho, Y.** (2014). DNA end recognition by the Mre11 nuclease dimer: insights into resection and repair of damaged DNA. *EMBO J.* **33**: 2422–2435.
- Swatek, K.N. and Komander, D.** (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res.* **26**: 399–422.
- Takahashi, I., Kojima, S., Sakaguchi, N., Umeda-Hara, C., and Umeda, M.** (2010). Two *Arabidopsis* cyclin A3s possess G1 cyclin-like features. *Plant Cell Rep.* **29**: 307–315.
- Takahashi, N., Kajihara, T., Okamura, C., Kim, Y., Katagiri, Y., Okushima, Y., Matsunaga, S., Hwang, I., and Umeda, M.** (2013). Cytokinins Control Endocycle Onset by Promoting the Expression of an APC/C Activator in *Arabidopsis* Roots. *Curr. Biol.* **23**: 1812–1817.
- Takatsuka, H., Ohno, R., and Umeda, M.** (2009). The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase-activating kinase CDKF1 is a major regulator of cell proliferation and cell expansion but is dispensable for CDKA activation. *Plant J.* **59**: 475–487.
- Takatsuka, H., Umeda-Hara, C., and Umeda, M.** (2015). Cyclin-dependent kinase-activating kinases CDKD1 and CDKD3 are essential for preserving mitotic activity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **82**: 1004–1017.
- Tanaka, K.** (2009). The proteasome: Overview of structure and functions. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* **85**: 12–36.
- Tedesco, D., Lukas, J., and Reed, S.I.** (2002). The pRb-related protein p130 is regulated by phosphorylation-dependent proteolysis via the protein-ubiquitin ligase SCFSkp2. *Genes Dev.* **16**: 2946–2957.
- Thrower, J.S., Hoffman, L., Rechsteiner, M., and Pickart, C.M.** (2000). Recognition of the polyubiquitin proteolytic signal. *EMBO J.* **19**: 94–102.
- Todorova, T., Miteva, D., and Chankova, S.** (2019). DNA susceptibility of *Saccharomyces cerevisiae* to Zeocin depends on the growth phase. *Int. Microbiol.* **22**: 419–428.
- Tominaga, Y., Li, C., Wang, R.-H., and Deng, C.-X.** (2006). Murine Wee1 Plays a Critical Role in Cell Cycle Regulation and Pre-Implantation Stages of Embryonic Development. *Int. J. Biol. Sci.* **161**: 161–170.
- Trolet, A., Baldrich, P., Criqui, M.-C., Dubois, M., Clavel, M., Meyers, B.C., and Genschik, P.** (2019). Cell Cycle-Dependent Regulation and Function of ARGONAUTE1 in Plants. *Plant Cell* **31**: 1734–1750.
- Tsvetkov, L.M., Yeh, K.-H., Lee, S.-J., Sun, H., and Zhang, H.** (1999). p27Kip1 ubiquitination and degradation is regulated by the SCFSkp2 complex through phosphorylated Thr187 in p27. *Curr. Biol.* **9**: 661–S2.
- Tuteja, N., Ahmad, P., Panda, B.B., and Tuteja, R.** (2009). Genotoxic stress in plants: Shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **681**: 134–149.
- Tuteja, N., Singh, M.B., Misra, M.K., Bhalla, P.L., and Tuteja, R.** (2001). Molecular Mechanisms of DNA Damage and Repair: Progress in Plants. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **36**: 337–397.
- Uchida, C., Miwa, S., Kitagawa, K., Hattori, T., Isobe, T., Otani, S., Oda, T., Sugimura, H., Kamijo, T., Ookawa, K., Yasuda, H., and Kitagawa, M.** (2005). Enhanced Mdm2 activity inhibits pRB function via ubiquitin-dependent degradation. *EMBO J.* **24**: 160–169.
- Uemukai, K., Iwakawa, H., Kosugi, S., de Uemukai, S., Kato, K., Kondorosi, E., Murray, J.A., Ito, M., Shinmyo, A., and Sekine, M.** (2005). Transcriptional activation of tobacco E2F is repressed by co-transfection with

- the retinoblastoma-related protein: cyclin D expression overcomes this repressor activity. *Plant Mol. Biol.* **57**: 83–100.
- Umeda, M., Shimotohno, A., and Yamaguchi, M.** (2005). Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-dependent Kinase-activating Kinases in Plants. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1437–1442.
- Umezawa, H., Maeda, K., Takeuchi, T., and Okami, Y.** (1966). New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiot. (Tokyo)* **19**: 200–209.
- User Guide: Zeocin Selection Reagent.**
- Van Leene, J. et al.** (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* **6**: 397.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., and Inzé, D.** (2002). Genome-Wide Analysis of Core Cell Cycle Genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14**: 903–916.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T.S., Gruijssem, W., Van de Peer, Y., Inzé, D., and De Veylder, L.** (2005a). Genome-Wide Identification of Potential Plant E2F Target Genes. *Plant Physiol.* **139**: 316–328.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G.T.S., Gruijssem, W., Van de Peer, Y., Inzé, D., and De Veylder, L.** (2005b). Genome-Wide Identification of Potential Plant E2F Target Genes. *Plant Physiol.* **139**: 316–328.
- Vanneste, S. et al.** (2011). Developmental regulation of CYCA2s contributes to tissue-specific proliferation in *Arabidopsis*. *EMBO J.* **30**: 3430–3441.
- Varshavsky, A.** (1991). Naming a targeting signal. *Cell* **64**: 13–15.
- Varshavsky, A.** (2006). The early history of the ubiquitin field. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **15**: 647–654.
- Vélez-Cruz, R. and Johnson, D.G.** (2017). The Retinoblastoma (RB) Tumor Suppressor: Pushing Back against Genome Instability on Multiple Fronts. *Int. J. Mol. Sci.* **18**.
- Venclovas, C. and Thelen, M.P.** (2000). Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res.* **28**: 2481–2493.
- Verkest, A. et al.** (2014). A Generic Tool for Transcription Factor Target Gene Discovery in *Arabidopsis* Cell Suspension Cultures Based on Tandem Chromatin Affinity Purification1[W][OPEN]. *Plant Physiol.* **164**: 1122–1133.
- Verkest, A., Manes, C.-L. de O., Vercruyssen, S., Maes, S., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Genschik, P., Kuiper, M., Inzé, D., and De Veylder, L.** (2005a). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor KRP2 Controls the Onset of the Endoreduplication Cycle during *Arabidopsis* Leaf Development through Inhibition of Mitotic CDKA₁ Kinase Complexes. *Plant Cell* **17**: 1723–1736.
- Verkest, A., Weinl, C., Inzé, D., De Veylder, L., and Schnittger, A.** (2005b). Switching the Cell Cycle. Kip-Related Proteins in Plant Cell Cycle Control. *Plant Physiol.* **139**: 1099–1106.
- Veylder, L.D., Segers, G., Glab, N., Van Montagu, M., and Inzé, D.** (1997). Identification of proteins interacting with the *Arabidopsis* Cdc2aAt protein. *J. Exp. Bot.* **48**: 2113–2114.
- Vierstra, R.D.** (2009). The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**: 385–397.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., and Cook, W.J.** (1987). Structure of ubiquitin refined at 1.8Å resolution. *J. Mol. Biol.* **194**: 531–544.
- Vijay-Kumar, S., Bugg, C.E., Wilkinson, K.D., and Cook, W.J.** (1985). Three-dimensional structure of ubiquitin at 2.8 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 3582–3585.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., dePamphilis, C.W., and Ma, H.** (2004). Genome-Wide Analysis of the Cyclin Family in *Arabidopsis* and Comparative Phylogenetic Analysis of Plant Cyclin-Like Proteins. *Plant Physiol.* **135**: 1084–1099.
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L.C.** (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* **24**: 613–623.
- Wang, L., Chen, H., Wang, C., Hu, Z., and Yan, S.** (2018). Negative regulator of E2F transcription factors links cell cycle checkpoint and DNA damage repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: E3837–E3845.
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z., Liu, J., and Qu, L.-J.** (2012a). The *Arabidopsis* APC4 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is critical for both female gametogenesis and embryogenesis. *Plant J.* **69**: 227–240.
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z.-L., Liu, J., and Qu, L.-J.** (2013). The *Arabidopsis* Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Subunit 1 is Critical for Both Female Gametogenesis and Embryogenesis. *J. Integr. Plant Biol.* **55**: 64–74.

- Wang, Y., Zheng, Z., Zhang, J., Wang, Y., Kong, R., Liu, J., Zhang, Y., Deng, H., Du, X., and Ke, Y. (2015). A Novel Retinoblastoma Protein (RB) E3 Ubiquitin Ligase (NRBE3) Promotes RB Degradation and Is Transcriptionally Regulated by E2F1 Transcription Factor. *J. Biol. Chem.* **290**: 28200–28213.
- Wang, Z., Fukushima, H., Inuzuka, H., Wan, L., Liu, P., Gao, D., Sarkar, F.H., and Wei, W. (2012b). Skp2 is a promising therapeutic target in breast cancer. *Front. Oncol.* **1**.
- Ward, J.F. (2000). Complexity of damage produced by ionizing radiation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **65**: 377–382.
- Ward, J.F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **35**: 95–125.
- Waterworth, W.M., Altun, C., Armstrong, S.J., Roberts, N., Dean, P.J., Young, K., Weil, C.F., Bray, C.M., and West, C.E. (2007). NBS1 is involved in DNA repair and plays a synergistic role with ATM in mediating meiotic homologous recombination in plants. *Plant J.* **52**: 41–52.
- Weimer, A.K. et al. (2016). The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in Arabidopsis. *EMBO J.* **35**: 2068–2086.
- WENZEL, D.M., STOLL, K.E., and KLEVIT, R.E. (2010). E2s: Structurally Economical and Functionally Replete. *Biochem. J.* **433**: 31–42.
- Weston, K. (1998). Myb proteins in life, death and differentiation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**: 76–81.
- Whitfield, M.L., Sherlock, G., Saldanha, A.J., Murray, J.I., Ball, C.A., Alexander, K.E., Matese, J.C., Perou, C.M., Hurt, M.M., Brown, P.O., and Botstein, D. (2002). Identification of Genes Periodically Expressed in the Human Cell Cycle and Their Expression in Tumors. *Mol. Biol. Cell* **13**: 1977–2000.
- Wiborg, O., Pedersen, M.S., Wind, A., Berglund, L.E., Marcker, K.A., and Vuust, J. (1985). The human ubiquitin multigene family: some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO J.* **4**: 755–759.
- Willems, A., Heyman, J., Eekhout, T., Achon, I., Garcia, J.P., Zhu, T., Li, L., Vercauteren, I., Van den Daele, H., van de Cotte, B., De Smet, I., and De Veylder, L. (2020). The Cyclin CYCA3;4 Is a Post-Prophase Target of the APC/CCCS52A2 E3-Ligase Controlling Formative Cell Divisions in Arabidopsis. *Plant Cell*.
- Williams, C., Fernández-Calvo, P., Colinas, M., Pauwels, L., and Goossens, A. (2019). Jasmonate and auxin perception: how plants keep F-boxes in check. *J. Exp. Bot.* **70**: 3401–3414.
- Wirbelauer, C., Sutterlüty, H., Blondel, M., Gstaiger, M., Peter, M., Reymond, F., and Krek, W. (2000). The F-box protein Skp2 is a ubiquitylation target of a Cul1-based core ubiquitin ligase complex: evidence for a role of Cul1 in the suppression of Skp2 expression in quiescent fibroblasts. *EMBO J.* **19**: 5362–5375.
- Woelk, T., Sigismund, S., Penengo, L., and Polo, S. (2007). The ubiquitination code: a signalling problem. *Cell Div.* **2**: 11.
- Wold, M.S. (1997). REPLICATION PROTEIN A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-Binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 61–92.
- Wolf, D.H. and Hilt, W. (2004). The proteasome: a proteolytic nanomachine of cell regulation and waste disposal. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1695**: 19–31.
- Wood, D.J. and Endicott, J.A. (2018). Structural insights into the functional diversity of the CDK–cyclin family. *Open Biol.* **8**.
- Wu, J. et al. (2012). Skp2 E3 Ligase Integrates ATM Activation and Homologous Recombination Repair by Ubiquitinating NBS1. *Mol. Cell* **46**: 351–361.
- Wu, L., Lee, S.Y., Zhou, B., Nguyen, U.T.T., Muir, T.W., Tan, S., and Dou, Y. (2013). ASH2L Regulates Ubiquitylation Signaling to MLL: trans-Regulation of H3 K4 Methylation in Higher Eukaryotes. *Mol. Cell* **49**: 1108–1120.
- Wu, L., Luo, K., Lou, Z., and Chen, J. (2008). MDC1 regulates intra-S-phase checkpoint by targeting NBS1 to DNA double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 11200–11205.
- Xiao, B., Spencer, J., Clements, A., Ali-Khan, N., Mitnacht, S., Broceño, C., Burghammer, M., Perrakis, A., Marmorstein, R., and Gamblin, S.J. (2003). Crystal structure of the retinoblastoma tumor suppressor protein bound to E2F and the molecular basis of its regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 2363–2368.
- Xiao, Y. and Weaver, D.T. (1997). Conditional gene targeted deletion by Cre recombinase demonstrates the requirement for the double-strand break repair Mre11 protein in murine embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **25**: 2985–2991.
- Xiao, Z.-X., Chen, J., Levine, A.J., Modjtahedi, N., Xing, J., Sellers, W.R., and Livingston, D.M. (1995). Interaction between the retinoblastoma protein and the oncoprotein MDM2. *Nature* **375**: 694–698.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J., and Gutiérrez, C. (1996). Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *EMBO J.* **15**: 4900–4908.

- Xie, Z., Lee, E., Lucas, J.R., Morohashi, K., Li, D., Murray, J.A.H., Sack, F.D., and Grotewold, E. (2010). Regulation of Cell Proliferation in the Stomatal Lineage by the Arabidopsis MYB FOUR LIPS via Direct Targeting of Core Cell Cycle Genes[W]. *Plant Cell* **22**: 2306–2321.
- Xin, F. and Radivojac, P. (2012). Post-translational modifications induce significant yet not extreme changes to protein structure. *Bioinformatics* **28**: 2905–2913.
- Xu, M., Bai, L., Gong, Y., Xie, W., Hang, H., and Jiang, T. (2009). Structure and Functional Implications of the Human Rad9-Hus1-Rad1 Cell Cycle Checkpoint Complex. *J. Biol. Chem.* **284**: 20457–20461.
- Xu, Y., Ashley, T., Brainerd, E.E., Bronson, R.T., Meyn, M.S., and Baltimore, D. (1996). Targeted disruption of ATM leads to growth retardation, chromosomal fragmentation during meiosis, immune defects, and thymic lymphoma. *Genes Dev.* **10**: 2411–2422.
- Yamano, H. (2019). APC/C: current understanding and future perspectives. *F1000Research* **8**.
- Yang, M., Hu, Y., Lodhi, M., McCombie, W.R., and Ma, H. (1999). The Arabidopsis SKP1-LIKE1 gene is essential for male meiosis and may control homologue separation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 11416–11421.
- Yee, D. and Goring, D.R. (2009). The diversity of plant U-box E3 ubiquitin ligases: from upstream activators to downstream target substrates. *J. Exp. Bot.* **60**: 1109–1121.
- Yen, H.-C.S., Xu, Q., Chou, D.M., Zhao, Z., and Elledge, S.J. (2008). Global Protein Stability Profiling in Mammalian Cells. *Science* **322**: 918–923.
- Yi, D. et al. (2014). The Arabidopsis SIAMESE-RELATED Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors SMR5 and SMR7 Regulate the DNA Damage Checkpoint in Response to Reactive Oxygen Species[W]. *Plant Cell* **26**: 296–309.
- Yokota, Y., Shikazono, N., Tanaka, A., Hase, Y., Funayama, T., Wada, S., and Inoue, M. (2005). Comparative Radiation Tolerance Based on the Induction of DNA Double-Strand Breaks in Tobacco BY-2 Cells and CHO-K1 Cells Irradiated with Gamma Rays. *Radiat. Res.* **163**: 520–525.
- Yoshiyama, K., Conklin, P.A., Huefner, N.D., and Britt, A.B. (2009). Suppressor of gamma response 1 (SOG1) encodes a putative transcription factor governing multiple responses to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 12843–12848.
- Yoshiyama, K.O. (2015). SOG1: a master regulator of the DNA damage response in plants. *Genes Genet. Syst.* **90**: 209–216.
- Yoshiyama, K.O., Kaminoyama, K., Sakamoto, T., and Kimura, S. (2017). Increased Phosphorylation of Ser-Gln Sites on SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE1 Strengthens the DNA Damage Response in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **29**: 3255–3268.
- Yoshiyama, K.O. and Kimura, S. (2018). Ser-Gln sites of SOG1 are rapidly hyperphosphorylated in response to DNA double-strand breaks. *Plant Signal. Behav.* **13**: e1477904.
- Yoshiyama, K.O., Kobayashi, J., Ogita, N., Ueda, M., Kimura, S., Maki, H., and Umeda, M. (2013a). ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. *EMBO Rep.* **14**: 817–822.
- Yoshiyama, K.O., Sakaguchi, K., and Kimura, S. (2013b). DNA Damage Response in Plants: Conserved and Variable Response Compared to Animals. *Biology* **2**: 1338–1356.
- Young, C.W. and Hodas, S. (1964). Hydroxyurea: Inhibitory Effect on DNA Metabolism. *Science* **146**: 1172–1174.
- Yu, Z.-K., Gervais, J.L.M., and Zhang, H. (1998). Human CUL-1 associates with the SKP1/SKP2 complex and regulates p21CIP1/WAF1 and cyclin D proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 11324–11329.
- Yumimoto, K., Yamauchi, Y., and Nakayama, K.I. (2020). F-Box Proteins and Cancer. *Cancers* **12**.
- Zarkowska, T. and Mittnacht, S. (1997). Differential Phosphorylation of the Retinoblastoma Protein by G1/S Cyclin-dependent Kinases. *J. Biol. Chem.* **272**: 12738–12746.
- Zhang, X., Jayaweera, D., Peters, J.L., Szecsi, J., Bendahmane, M., Roberts, J.A., and González-Carranza, Z.H. (2017). The Arabidopsis thaliana F-box gene HAWAIIAN SKIRT is a new player in the microRNA pathway. *PLoS ONE* **12**.
- Zhao, X., Harashima, H., Dissmeyer, N., Pusch, S., Weimer, A.K., Bramsiepe, J., Bouyer, D., Rademacher, S., Nowack, M.K., Novak, B., Sprunck, S., and Schnittger, A. (2012). A General G1/S-Phase Cell-Cycle Control Module in the Flowering Plant Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* **8**.
- Zheng, B., Chen, X., and McCormick, S. (2011). The Anaphase-Promoting Complex Is a Dual Integrator That Regulates Both MicroRNA-Mediated Transcriptional Regulation of Cyclin B1 and Degradation of Cyclin B1 during Arabidopsis Male Gametophyte Development[C][W]. *Plant Cell* **23**: 1033–1046.
- Zhou, J. et al. (2018). Regulation of Arabidopsis brassinosteroid receptor BRI1 endocytosis and degradation by plant U-box PUB12/PUB13-mediated ubiquitination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**: E1906–E1915.
- Zhou, P. and Howley, P.M. (1998). Ubiquitination and Degradation of the Substrate Recognition Subunits of SCF Ubiquitin-Protein Ligases. *Mol. Cell* **2**: 571–580.

- Zhou, R., Kroczyńska, B., Hayman, G.T., and Miernyk, J.A.** (1995). AtJ2, an Arabidopsis Homolog of Escherichia coli dnaJ. *Plant Physiol.* **108**: 821–822.
- Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S., and Fowke, L.C.** (2003). Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in Arabidopsis thaliana. *Planta* **216**: 604–613.
- Zhu, J., Petersen, S., Tessarollo, L., and Nussenzweig, A.** (2001). Targeted disruption of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to early embryonic lethality in mice. *Curr. Biol.* **11**: 105–109.
- Zhu, L.** (2010). Skp2 knockout reduces cell proliferation and mouse body size: and prevents cancer? *Cell Res.* **20**: 605–607.
- Zhu, L., Enders, G., Lees, J.A., Beijersbergen, R.L., Bernards, R., and Harlow, E.** (1995). The pRB-related protein p107 contains two growth suppression domains: independent interactions with E2F and cyclin/cdk complexes. *EMBO J.* **14**: 1904–1913.
- Zhu, Y. et al.** (2020). The Arabidopsis Nodulin Homeobox Factor AtNDX Interacts with AtRING1A/B and Negatively Regulates Abscissic Acid Signaling. *Plant Cell* **32**: 703–721.
- Zhuang, X., Wang, H., Lam, S.K., Gao, C., Wang, X., Cai, Y., and Jiang, L.** (2013). A BAR-Domain Protein SH3P2, Which Binds to Phosphatidylinositol 3-Phosphate and ATG8, Regulates Autophagosome Formation in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**: 4596–4615.
- Zielke, N., Edgar, B.A., and DePamphilis, M.L.** (2013). Endoreplication. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol.* **136**: 2621–2632.
- Zou, L., Cortez, D., and Elledge, S.J.** (2002). Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev.* **16**: 198–208.
- Zou, L. and Elledge, S.J.** (2003). Sensing DNA Damage Through ATRIP Recognition of RPA-ssDNA Complexes. *Science* **300**: 1542–1548.
- Zuin, A., Isasa, M., and Crosas, B.** (2014). Ubiquitin Signaling: Extreme Conservation as a Source of Diversity. *Cells* **3**: 690–701.

Annexes

A. E2FA (AT2G36010):

MSGVVRSSPGSSQPPPPPHPPSSPVPVTSTPVIPIRRHLAFASTKPPFHPSSDDYHRFNPSSLSNNNDRSFVHG
CGVVDREEDAVVVRSPIFPSEIGLEIRGCFGDFDCYLLLLSLIQKLSVRLSSIRVNFCLFSFAMSRKRKATMDMVV
APSNNGFTSSGFTNIPSSPCQTPRKGGRVNIKSKAKGNKSTPQTPISTNAVRSFYEIFMSRVTSLLTKKFVNLIKQA
KDGMLDLNKAETLEVQKRRIYDITNVLEGIDLIEKPFKNRILWKGVDACPGDEDADVSVLQLQAEIENLAL EEQA
LDNQIRWLFVTEEDIKSLPGFQNTLIQKAPHGTTLEVDPDEAADHPQRRYRIILRSTMGPIDVYLSEFEGKFE
DTNGSGAAPPACLPASSSGSTGHHDIEALTVDNPETAIVSHDHPHPQPGDTS DLNQLQEQVGGMLKITPSDVEN
DESDYWLLSNAEISMTDIWKTD SGIDWDYGIADVSTPPPGMGEIAPTAVDSTPR

B. E2FB (AT5G22220):

MSEEVQQFPSSKRQLHPSLSSMKPPLVAPGEYHRFDAAETRGGGAVADQVVSDAIVIKSTLKRKTDLVNQIVEV
NELNTGVLQTPVSGKGGKAKKTSRSKSNKSGTLASGSNAGSPGNNFAQAGTCRYDSSLGLLTKKFINLIKQAE
GILDLNKAADTLEVQKRRIYDITNVLEGIGLIEKTLKNRIQWKGLDVSKPGETIESIANLQDEVQNLAAEEARLDDQI
RESQERLTSLEDENNRLLFVTENDIKNLPCFQNKTLIAVKAPHGTTLEVDPDEAGGYQRRYRIILRSTMGPIDV
YLVSQFEESFEDIPQADEPSNVPDEPSNVPDVPSNLPSTSGLPENHDVSMMPMKEESTERNMETQEVD D TQRVYS
DIESHDFVDGIMKIVPPDLDMGV DYWFRSEVGEVSITDMWPDES GPDWNQMITFDQDHAGPSDNKILEQPQT
PSSPTPEESTATRSPTGS

C. E2FC (AT1G47870):

MAATSNSGEDPTLSYHHRSPFRFELLQSISSSDPRYSSLTPSSTNRPFVSQSLPNSQLSPLISPHWDDSYSQITQKV
QKSRKNHRIQLGSIANMSGGESIDIAKVIVKQESSPQNVKRVYNKSKGGTKLLKAGKRMANGEVQNGGLNGASI
NCRYDSSLGLLTKKFVKLIQEAEDGTL D LNYCAVVLEVQKRRIYDITNVLEGIGLIEKTTKNHIRWKGADNLGQKDL
GDQISRLKSEVESMQSEESRLDDLIRERQEALRSLEDDYCRYMFMTEEDITSLPRFQNTLLAIKAPTASYIEVPD
PDEMSFPQQYRMVIRSRMGPIDVYLLSKYKGDSAETSDKLGNESDQKAPVGVDTPSLKIVTSDTDLKADYWFES
DAEVSLTDLWSNFNS

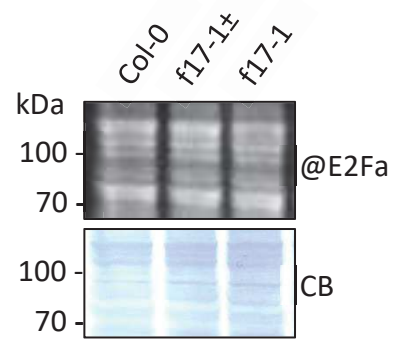
Annexe 1: Comparaisons des séquences peptidiques de E2Fa (A), E2Fb (B) et E2Fc (C).

Les peptides tryptiques communs entre les séquences sont mis en évidence en jaune.

- A** AT1G07790-HTB1
MAPRAEKKPAEKKTAERPVEENKAAEKAPAEKKPKAGKKLPKEAGDKKKKRSKKNVETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLAQESSKLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- AT5G22880-HTB2
MAKADKKPAEKKPAEKTAAEPAAAAEKKPKAGKKLPKEAGAGDKKKKRSKKNVETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLAGESSKLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- AT2G28720-HTB3
MAPKAGKKPAEKKPAEKAPAEKKVAEKAPAEKKPKAGKKLPKEAVTGGVEKKKKRVKKSTETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLAQEASKLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- AT5G59910-HTB4
MAPKAEKKPAEKKPAEKPVEEKSAAEKAPAEKKPKAGKKLPKEAGAGGDKKKKMKKKSVETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLAQEASKLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- AT3G45980-HTB9
MAPRAEKKPAEKKPAEKPVEEKSAAEKAPAEKKPKAGKKLPKEAGAGGDKKKKMKKKSVETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLASESSKLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- AT3G46030-HTB11
MAPKAEKKPAEKKPVEEKSAAEKAPAEKKPKAGKKLPKEAGAGGDKKKKMKKKSVETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLASESSKLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- B** AT2G37470-HTB5
MAPKAAEKKPAEKKPAGKAPAEKLPKAEKKISKDAGGSEKKKKKSKKSVETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLAQESSKLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- AT3G53650-HTB6
MAPKAAEKKPAGKKPAEKAPAEKLPKAEKKITKEGGSEKKKKKSKKNIETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLAQESSRLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELSKHAVSEGTKAVTKFTSS
- AT3G09480-HTB7
MAPKAEKKPSEKAPKADKKITKEGGSERKKKTKKSTETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKIALESSRLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- AT5G02570-HTB10
MAPKAEKKPAEKAPAPKAEKKIAKEGGTSEIVKKKKKTKKSTETIKYIFKVLKQVHPDIGISSKAMGIMNSFINDIFEKLAQESSRLARYNKKPTITSREIQTAVRLVLPGELAKHAVSEGTKAVTKFTSS
- C** AT1G08170-HTB8
MAPRKPVVSVTKKKKVVEETIKVTVTEEGDPCVITETANDQETQDLTFSIPVGENVTVEIPVEVPDERSLPVGENVTTVKIPVDDRDESSPQPPETPVEVRDEPSPQPPETPASKSEGLTKKTDKVEKKQENKKKKKKKKRRDDLAGEYRRYVYKVMKQVHPDLGIFSKAMTVVNMFMGDMFERIAQEAAARLSDYTKRRRLSSREIEAAVRLVLPGELSRHAVAEGSKAVSNFVGYSRKR

Annexe 2: Comparaisons des séquences peptidiques des 11 variants de l'histone H2B

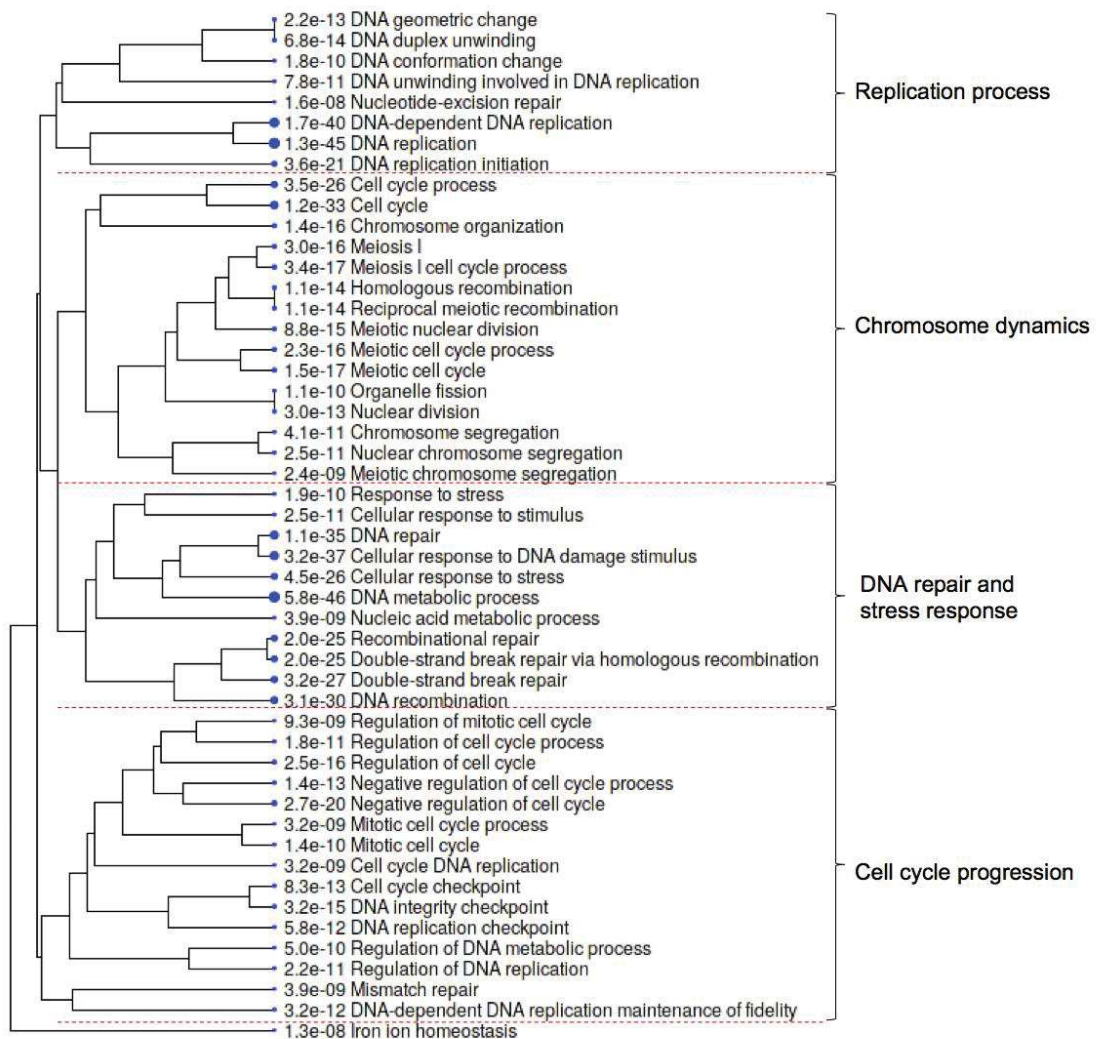
L'algorithme Mascot (version 2.5) a identifié les protéines HTB1, HTB2, HTB3, HTB4, HTB9 et HTB11 comme des « sameset » (A), les protéines HTB5, HTB6, HTB7, et HTB10 comme des « subset » (B) et HTB8 n'est pas identifiée (C). (A-C) Les peptides tryptiques communs entre les séquences sont mis en évidence en jaune, rose, bleus et rouge foncé. Les modifications d'acide aminé sont mises en évidence en vert et rouge.



Annexe 3: Niveau protéique de E2Fa dans le fond mutant *fbl17*

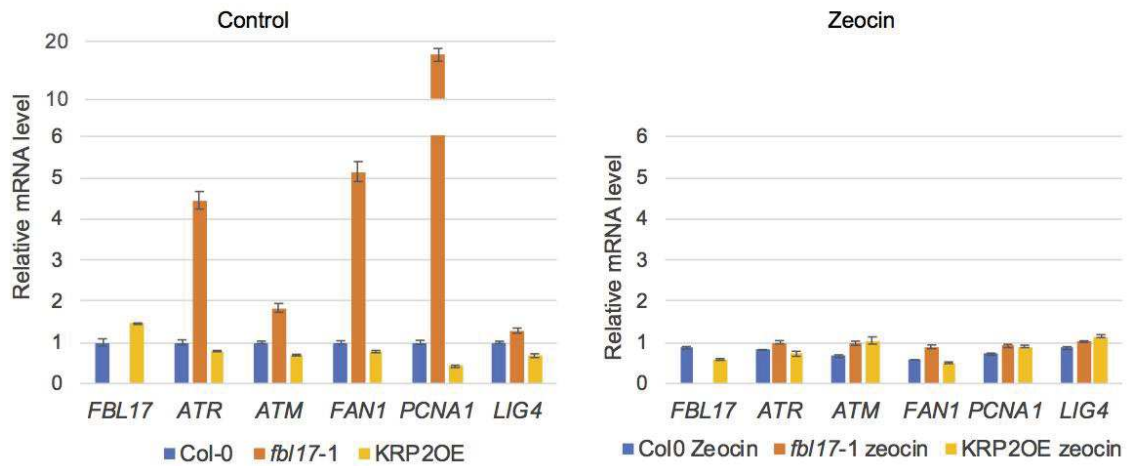
Western Blot des protéines E2Fa des plantules Col-0, *fbl17-1* et *fbl17-1⁺* de 20 jours.

Annexe 4: Supplemental Figure Gentric et al, (2020).



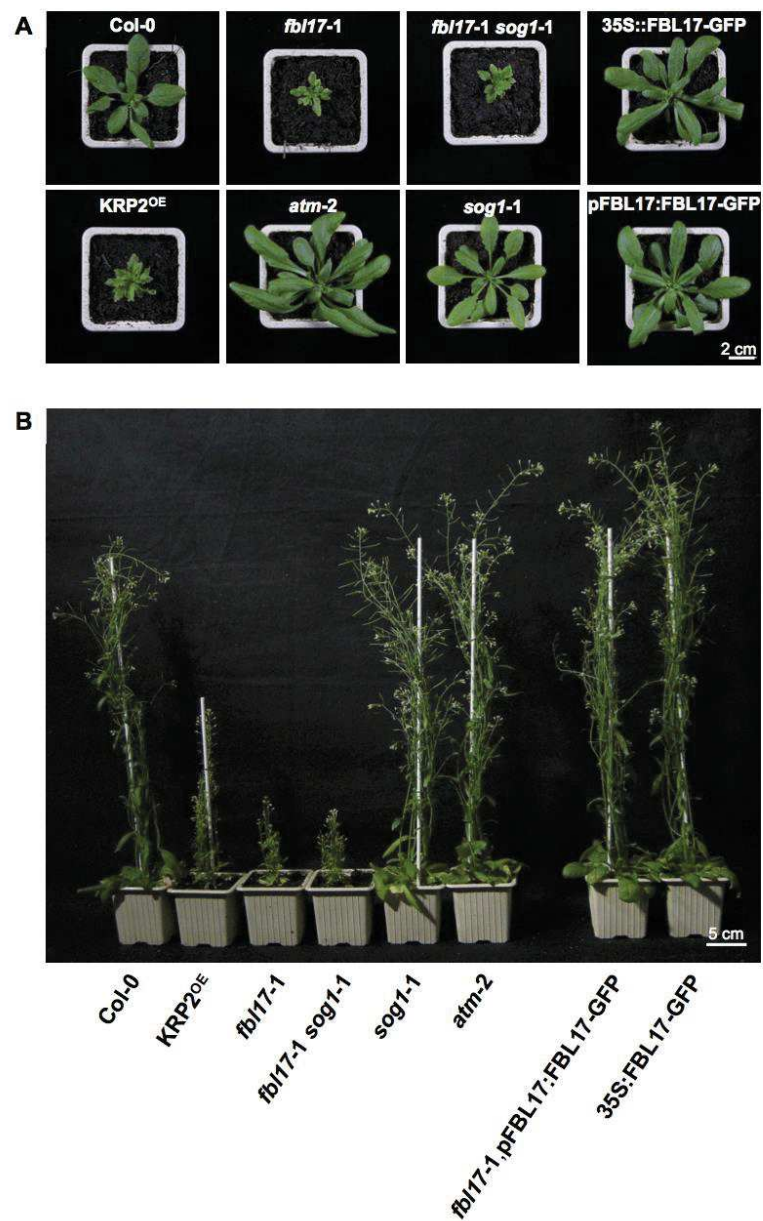
Supplemental Figure S1. Details of the Gene Ontology (GO) functional analysis of DEGs in *fb17* exhibiting a \log_2FC absolute value > 1.5 (i.e. 1,443 genes) illustrated in Figure 1B. The GO enrichment analysis is based on Biological Process functional categories of the ShinyGo v0.61 software. The 50 most significant terms are shown using a hierarchical clustering tree summarizing the correlation among pathways with many shared genes. Larger blue dots indicate smaller p-values.

Annexe 4: Supplemental Figure Gentric et al, (2020).



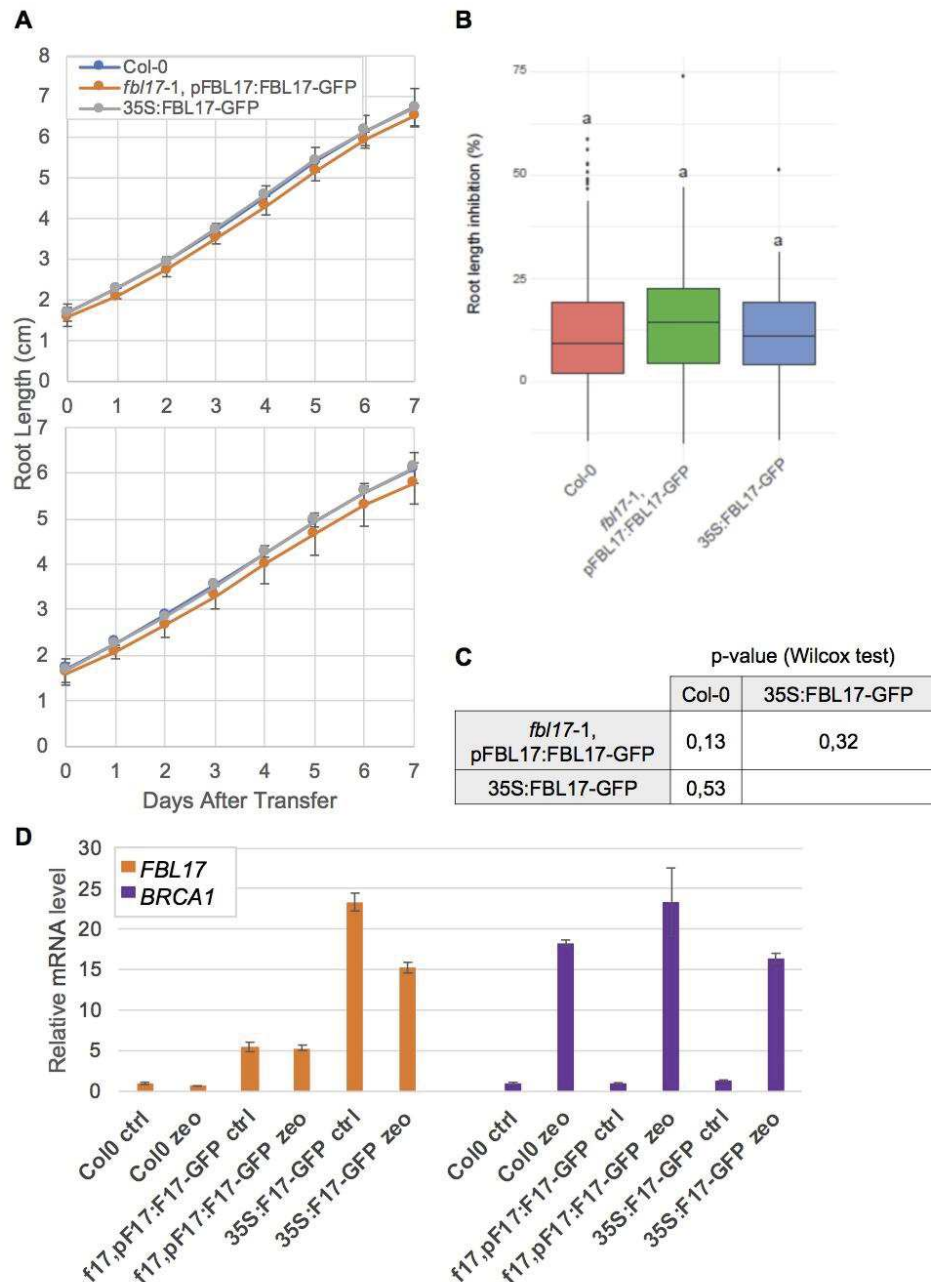
Supplemental Figure S2. Gene expression analysis under standard condition and upon zeocin treatment. Relative expression levels of gene transcripts in 8-day-old *in vitro* plants grown under standard condition ("Control" panel) and after 3 hours of 20 μ M zeocin treatment ("Zeocin" panel) of the indicated genotypes as determined by RT-qPCR. The bar graph depicts expression level mean values of the indicated transcripts of one independent replicate (\pm SE of the technical triplicate). The experiment was repeated two times with similar results.

Annexe 4: Supplemental Figure Gentric et al, (2020).



Supplemental Figure S3. The *fbl17-1 sog1-1* double mutant exhibits the same phenotype as the *fbl17* single mutant. Plants of the indicated genotypes were grown on soil for 5 (**A**; scale bar = 2 cm) and 7 weeks (**B**; scale bar = 5 cm). Scale bars are as indicated.

Annexe 4: Supplemental Figure Gentric et al, (2020).



Supplemental Figure S4. FBL17-GFP reporter lines exhibit the same sensitivity as Col-0 under zeocin treatment. **(A)** Root growth elongation of the indicated genotypes of 5-day-old seedlings grown under standard condition and transferred on medium not supplemented (upper panel) or containing 5 μ M zeocin (lower panel) for further 7 days of culture. Error bars indicate the standard deviation of the mean value of three independent experiments (9 < N per genotype < 35). **(B)** Percentage of root length inhibition for the experiment described in (A). **(C)** Statistical significance table for (B). The statistical significance analysis has been calculated by using the Wilcoxon-Mann-Whitney test. **(D)** Relative expression levels of gene transcripts in 8-day-old *in vitro* plants grown under standard condition and after 3 hours of 20 μ M zeocin treatment of the indicated genotypes as determined by RT-qPCR. For the "Control conditions" (ctrl), data are compared to the Col-0 value normalized at 1 and, for the "Zeocin conditions" (zeo), data are compared to the value of the same genotype under "Control" conditions normalized at 1. The bar graph depicts expression level mean values of the indicated transcripts of one independent replicate (\pm SE of the technical triplicate). The experiment was repeated two times with similar results.

Annexe 5: Supplemental Table Gentric et al, (2020).

Supplemental Table S3. KEGG pathway enrichment analysis based on DEGs in *fb17* compared to Col-0 (log2FC>1.5 absolute value; i.e. 1,443 genes). Are indicated the number of DEGs in *fb17* (Number of DEGs) compared to the total number of genes (Total genes) taken into account in the corresponding pathway, and the statistical significance of this categorization (enrichment False Discovery Rate with a p-value cut-off at 0.01). This functional category analysis was performed using the ShinyGo software.

Enrichment FDR	Number of DEGs	Total genes	Functional Category	Genes
1.64248812518606e-20	27	50	DNA replication	AT1G07370 AT1G08130 AT1G08260 AT1G44900 AT1G63160 AT1G67320 AT1G67630 AT1G77470 AT1G78650 AT2G07690 AT2G16440 AT2G24490 AT2G27120 AT2G29570 AT3G02920 AT3G52630 AT4G02060 AT4G19130 AT4G20325 AT5G08020 AT5G22110 AT5G26680 AT5G41880 AT5G44635 AT5G45400 AT5G46280 AT5G63960
1.60436941319462e-13	19	39	Mismatch repair	AT1G07370 AT1G08130 AT1G18090 AT1G29630 AT1G63160 AT1G77470 AT1G78650 AT2G24490 AT2G29570 AT3G02920 AT3G18524 AT3G24495 AT3G52630 AT4G02070 AT4G19130 AT4G25540 AT4G35520 AT5G08020 AT5G45400
1.08713256952862e-11	22	66	Homologous recombination	AT1G04020 AT1G05490 AT1G20720 AT1G20750 AT1G78650 AT2G24490 AT2G28560 AT2G45280 AT3G02920 AT3G05740 AT3G19210 AT3G24340 AT3G32920 AT3G52630 AT4G00020 AT4G19130 AT4G21070 AT5G01630 AT5G08020 AT5G45400 AT5G63920 AT5G63960
3.66981809566981e-06	16	69	Nucleotide excision repair	AT1G07370 AT1G08130 AT1G08260 AT1G19750 AT1G63160 AT1G77470 AT1G78650 AT2G24490 AT2G27120 AT2G29570 AT3G02920 AT3G52630 AT4G19130 AT5G08020 AT5G22110 AT5G45400
8.29327374703069e-06	12	42	Base excision repair	AT1G07370 AT1G08130 AT1G08260 AT1G10520 AT1G52500 AT1G78650 AT2G27120 AT2G29570 AT3G18630 AT4G02390 AT5G22110 AT5G26680
0.000361057049353584	17	110	Pyrimidine metabolism	AT1G08260 AT1G67320 AT1G67630 AT1G78650 AT2G15400 AT2G21790 AT2G27120 AT3G07800 AT3G27060 AT3G27440 AT3G46940 AT3G48540 AT4G23900 AT5G22110 AT5G41880 AT5G63960 AT5G67100

Annexe 5: Supplemental Table Gentric et al, (2020).

Supplemental Table S4. Statistical significance table for Figure 4A regarding the root length of *fb17-1* and *fb17-1 sog1-1* under standard condition (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

		Control							
		<i>fb17-1</i> (N=44)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
<i>fb17-1,sog1-1</i> (N=15)	0	0.1053							
	1		0.04216						
	2			0.00141					
	3				0.0003837				
	4					0.003411			
	5						0.0003834		
	6							0.004128	
	7								0.3138

Supplemental Table S5. Statistical significance table for Figure 4A regarding the root length of *fb17-1* and *fb17-1 sog1-1* under zeocin condition (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

		Zeocin							
		<i>fb17-1</i> (N=58)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
<i>fb17-1,sog1-1</i> (N=19)	0	0.1053							
	1		0.4015						
	2			0.01375					
	3				0.01613				
	4					0.005975			
	5						1.032e-05		
	6							NA	
	7								NA

Supplemental Table S6. Statistical significance table for Figure 4B, root length inhibition (Wilcoxon Mann-Whitney test).

	<i>atm-2</i> (N= 48)	Col-0 (N= 88)	<i>fb17-1</i> (N= 58)	<i>fb17-1,sog1-1</i> (N= 19)	KRP2 ^{OE} (N= 45)
Col-0	1.4e-15				
<i>fb17-1</i>	2.7e-14	< 2e-16			
<i>fb17-1,sog1-1</i>	0.00059	1.5e-09	0.70098		
KRP2 ^{OE}	< 2e-16	0.25672	< 2e-16	1.4e-10	
<i>sog1-1</i> (N= 48)	< 2e-16	0.05970	< 2e-16	2.3e-12	0.00618

No significant differences
P value < 0.05 = *
P value < 0.01 = **
P value < 0.001 = ***

Annexe 5: Supplemental Table Gentric et al, (2020).

Supplemental Table S7. Statistical significance table for the Figure 4D, cell death quantification (Wilcoxon-Mann-Whitney test).

	<i>atm</i> -2 Control N= 30	<i>atm</i> -2 Zeocin N= 30	Col-0 Control N= 30	Col-0 Zeocin N= 31	<i>fb</i> 17 -1 Control N= 27	<i>fb</i> 17 -1 Zeocin N= 28	<i>fb</i> 17 -1, <i>sc</i> Control N= 23	<i>fb</i> 17 -1, <i>sc</i> Zeocin N= 20	KRP2 ^{OE} Control N= 30	KRP2 ^{OE} Zeocin N= 31	<i>sog</i> 1 -1 Control N= 30
<i>atm</i> -2 Zeocin	4.703e-11										
Col-0 Control	0.06324	1.676e-10									
Col-0 Zeocin	2.197e-06	3.13e-06	9.711e-05								
<i>fb</i> 17 -1 Control	1.69e-09	5.831e-05	1.388e-08	0.06456							
<i>fb</i> 17 -1 Zeocin	3.992e-11	0.004514	6.932e-11	2.079e-09	3.46e-11						
<i>fb</i> 17 -1, <i>sog</i> 1 -1 Control	8.746e-08	4.533e-06	4.639e-06	0.8267	0.07001	1.232e-11					
<i>fb</i> 17 -1, <i>sog</i> 1 -1 Zeocin	1.907e-09	0.00921	6.386e-09	7.318e-07	1.383e-05	0.3665	1.64e-07				
KRP2 ^{OE} Control	0.1093	2.153e-11	0.2223	4.806e-06	5.555e-11	3.734e-11	2.013e-08	1.402e-09			
KRP2 ^{OE} Zeocin	5.684e-08	8.991e-07	5.138e-06	0.7193	0.05925	9.049e-10	0.9372	5.808e-07	1.108e-08		
<i>sog</i> 1 -1 Control	0.4296	2.265e-11	0.00898	2.005e-07	6.593e-11	4.405e-11	7.554e-09	1.746e-09	0.03072	1.556e-09	
<i>sog</i> 1 -1 Zeocin N= 30	0.03989	5.718e-09	1	0.002854	4.638e-06	2.097e-10	0.0004119	3.473e-08	0.4357	0.0003241	0.01021
No significant differences											
P value < 0.05 = *											
P value < 0.01 = **											
P value < 0.001 = ***											

Annexe 5: Supplemental Table Gentric et al, (2020).

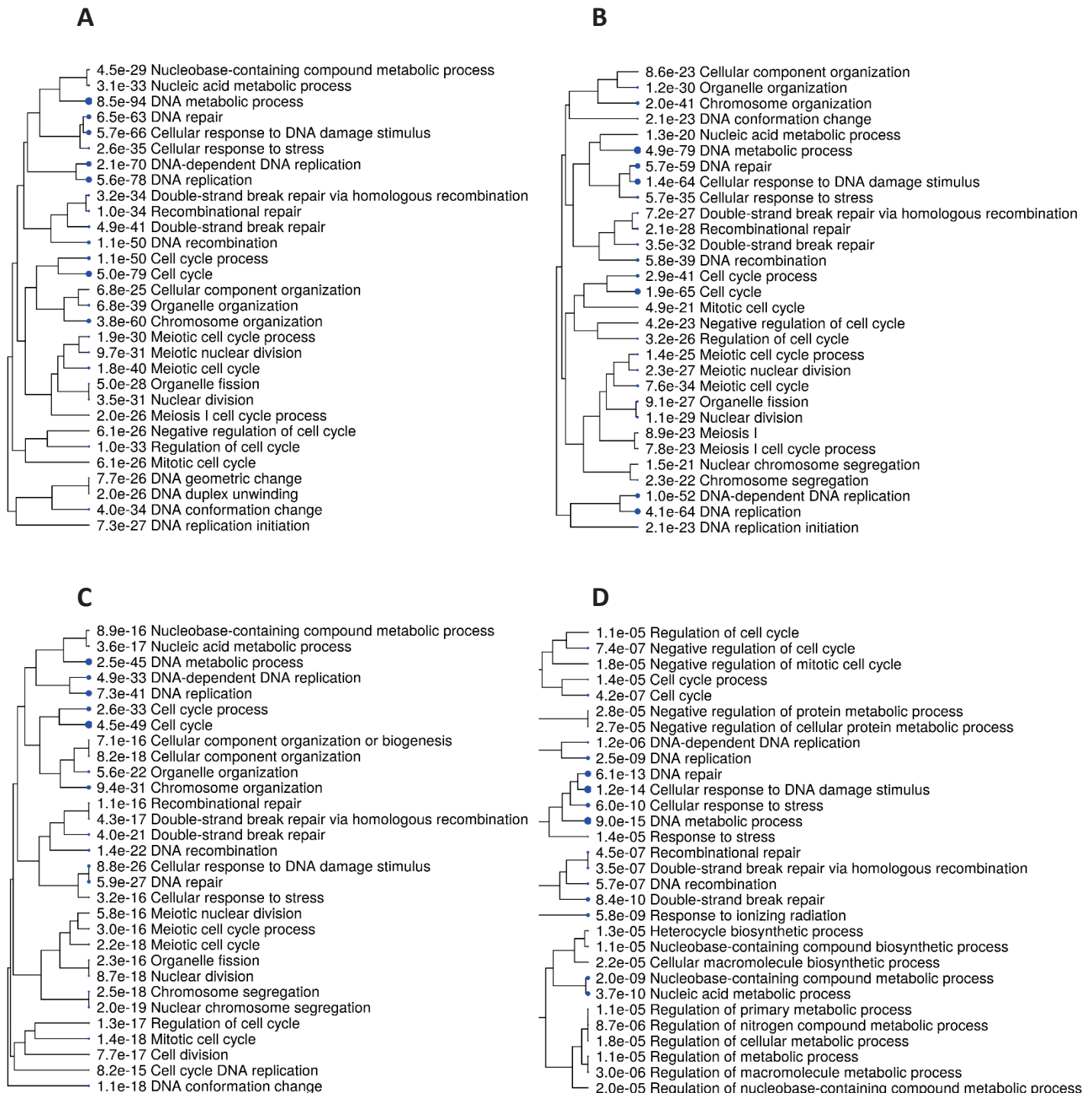
Supplemental Table S8. Statistical significance analysis of the FBL17-, RBR1-, and γ H2AX- signal co-localization (Pearson's coefficient and Mander's coefficient).

		Pearson's Coefficient:	Manders' Coefficients
Upper Focus	FBL17 – RBR1	r=0.858	M1=0.822 (fraction of FBL17 overlapping RBR1)
			M2=0.818 (fraction of RBR1 overlapping FBL17)
	FBL17 - γ H2AX	r=0.583	M1=0.252 (fraction of FBL17 overlapping γ H2AX)
			M2=0,57 (fraction of γ H2AX overlapping FBL17)
Lower Focus	FBL17 – RBR1	r=0.93	M1=0.956 (fraction of FBL17 overlapping RBR1)
			M2=0.709 (fraction of RBR1 overlapping FBL17)
	FBL17 - γ H2AX	r=0.602	M1=0.391 (fraction of FBL17 overlapping γ H2AX)
			M2=0.559 (fraction of γ H2AX overlapping FBL17)

Supplemental Table S9. Frequency of nuclei showing γ H2AX-, RBR1- and/or FBL17- foci compared to the total number of nuclei with foci (upper table), and frequency of foci showing γ H2AX-, RBR1- and/or FBL17- foci compared to the total number of foci (lower table).

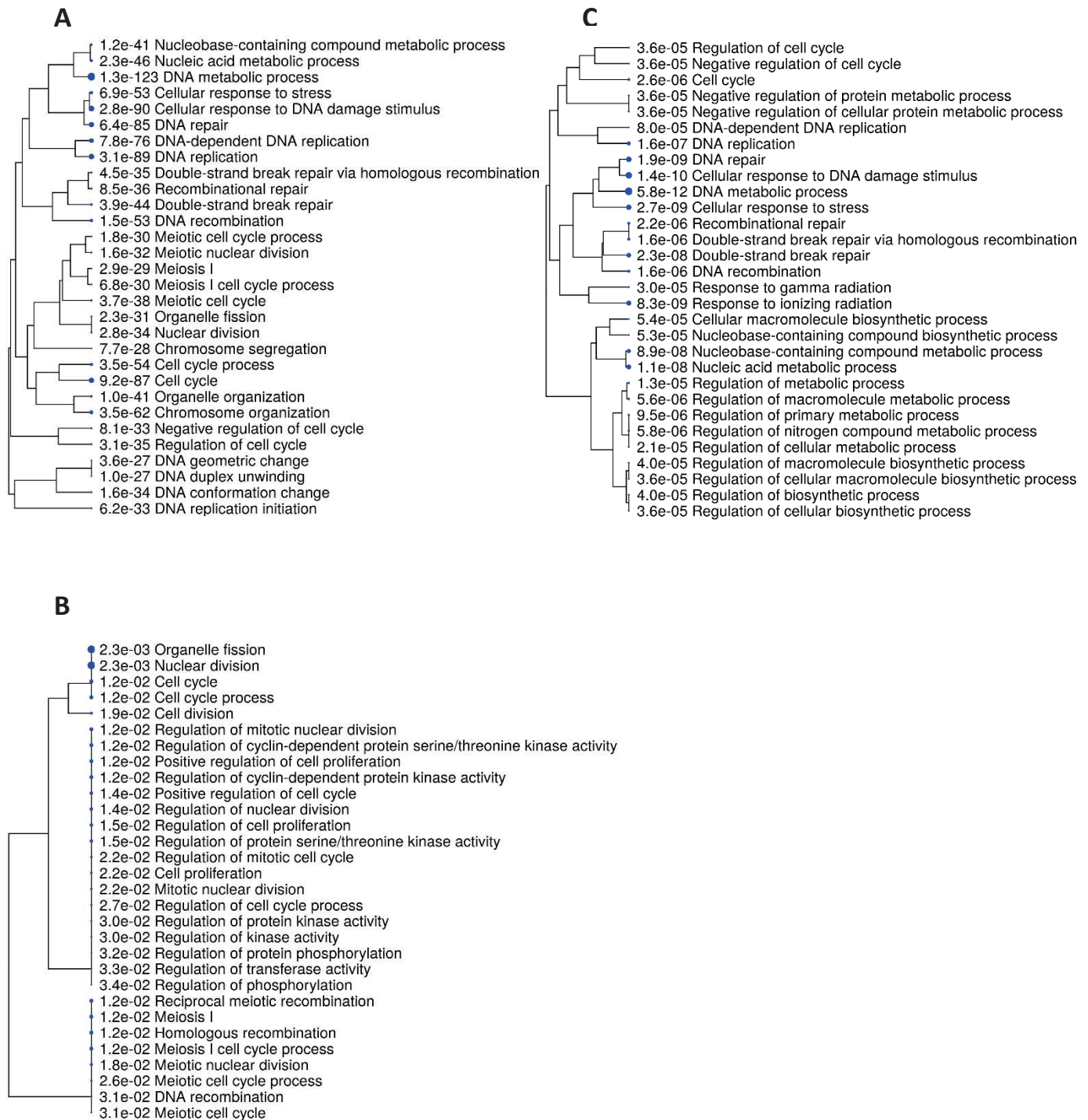
Frequency of nuclei									
	replicate 1	Percentage replicate 1	replicate 2	Percentage replicate 2	replicate 3	Percentage replicate 3	mean	SD	Ratio Mean (%)
Nuclei (total)	272		212		335				
Nuclei (without foci)	81		68		106				
Nuclei (with foci)	191	100%	144	100%	229	100%	188	43	100%
γ H2AX (alone)	68	36%	45	31%	77	34%	63	17	33%
RBR1 (alone)	43	23%	57	40%	83	36%	61	20	33%
FBL17 (alone)	4	2%	1	1%	0	0%	2	2	1%
γ H2AX + RBR1	45	24%	14	10%	42	18%	34	17	17%
γ H2AX + FBL17	3	2%	2	1%	0	0%	2	2	1%
RBR1 + FBL17	18	9%	20	14%	19	8%	19	1	11%
γ H2AX + FBL17 + RBR1	10	5%	5	3%	8	3%	8	3	4%

Frequency of foci									
	replicate 1	Percentage replicate 1	replicate 2	Percentage replicate 2	replicate 3	Percentage replicate 3	mean	SD	Ratio Mean (%)
Foci (total)	865	100%	709	100%	758	100%	777	80	100%
γ H2AX (alone)	456	53%	379	53%	351	46%	395	54	51%
RBR (alone)	153	18%	169	24%	234	31%	185	43	24%
FBL17 (alone)	13	2%	11	2%	10	1%	11	2	1%
γ H2AX + RBR	66	8%	24	3%	39	5%	43	21	5%
γ H2AX + FBL17	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
RBR + FBL17	36	4%	42	6%	35	5%	38	4	5%
γ H2AX + FBL17 + RBR	13	2%	6	1%	5	1%	8	4	1%



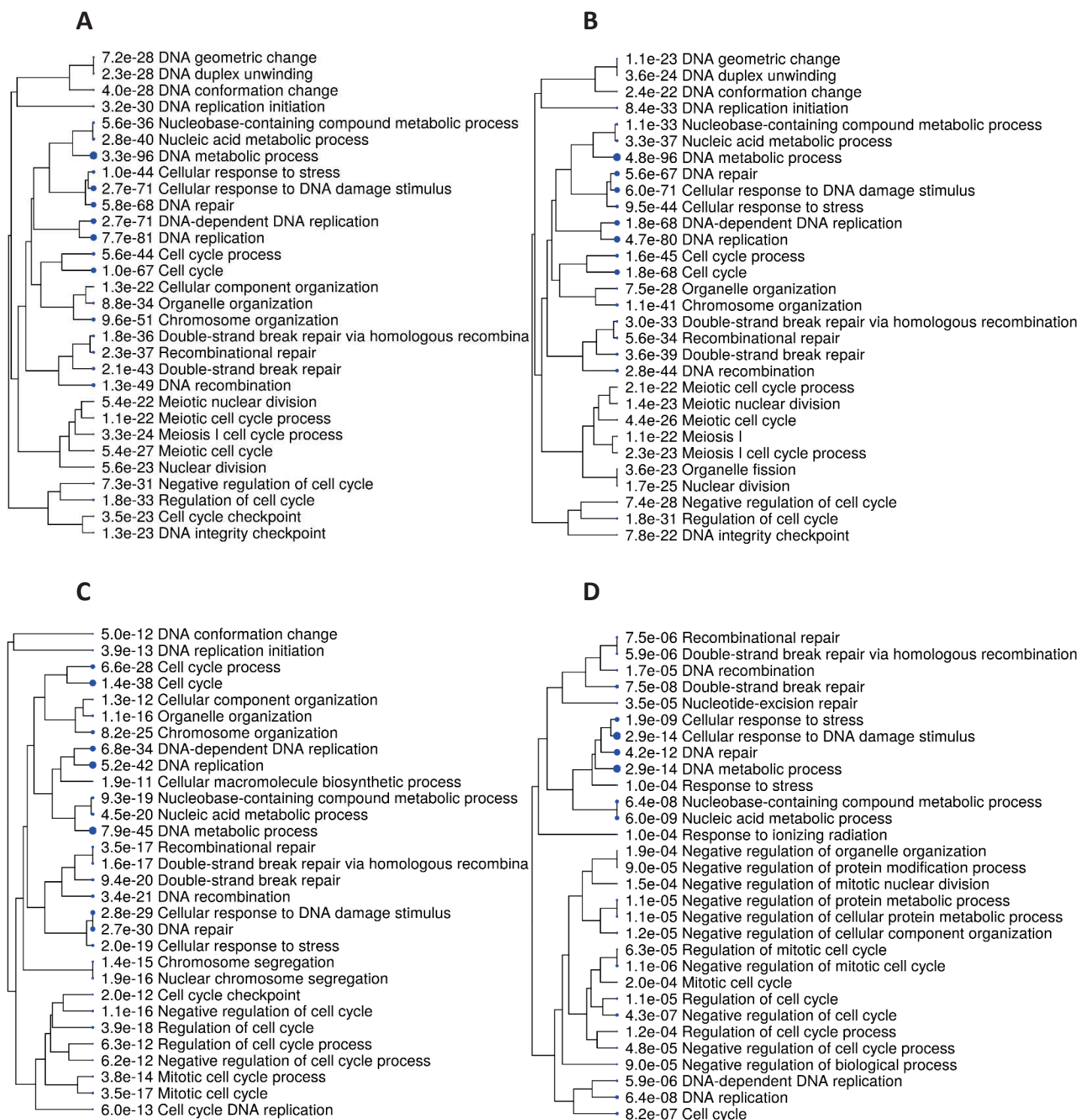
Annexe 6: Analyse GO des gènes ciblés par RBR1 et les facteurs de transcription E2FA, MYB3R3 et SOG1 et DE chez *fb17*.

Analyse de l'ontologie des gènes ciblés par RBR1 (N=483; **A**) et les facteurs de transcription E2FA (N=910; **B**), MYB3R3 (N=175; **C**) et SOG1 (N=96; **D**) et DE chez *fb17* (sur les 6804 gènes DE). L'analyse de l'enrichissement des GO est basée sur des catégories de fonction de processus biologique du logiciel ShinyGO v0.61. Les 30 enrichissements les plus significatifs sont montrés en utilisant un regroupement hiérarchique résumant la corrélation des gènes partagés entre les différentes voies. Plus les points bleus sont gros plus la p-values est petite.



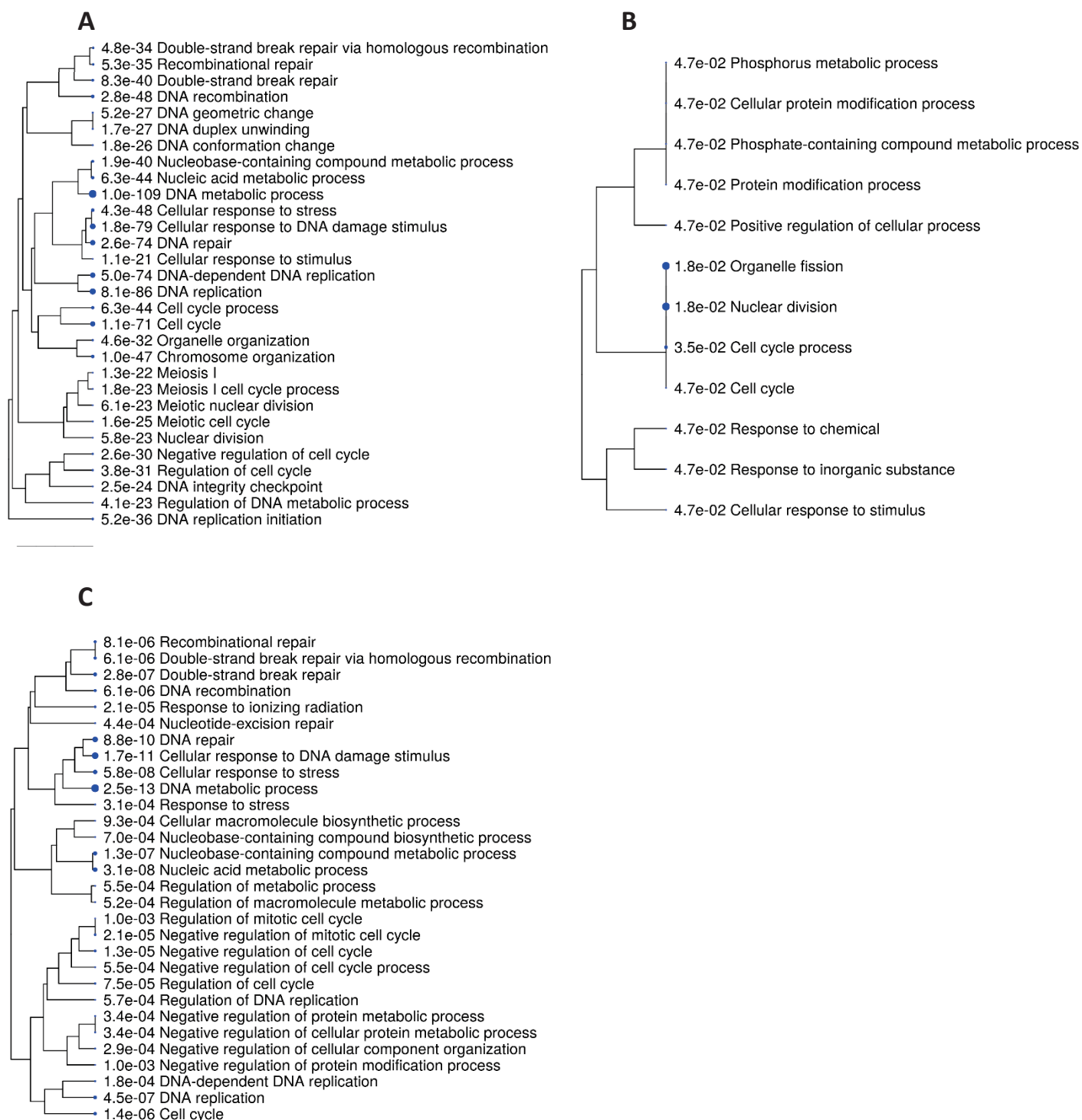
Annexe 7: Analyse GO des gènes régulés les facteurs de transcription E2FA, MYB3R3 et SOG1 et DE chez *fb17*.

Analyse de l'ontologie des gènes ciblés par les facteurs de transcription E2FA (N=321; **A**), MYB3R3 (N=20; **B**) et SOG1 (N=174; **C**) et DE chez *fb17* (sur les 6804 gènes DE). L'analyse de l'enrichissement des GO est basée sur des catégories de fonction de processus biologique du logiciel ShinyGO v0.61. Les 30 enrichissements les plus significatifs sont montrés en utilisant un regroupement hiérarchique résumant la corrélation des gènes partagés entre les différentes voies. Plus les points bleus sont gros plus la p-values est petite.



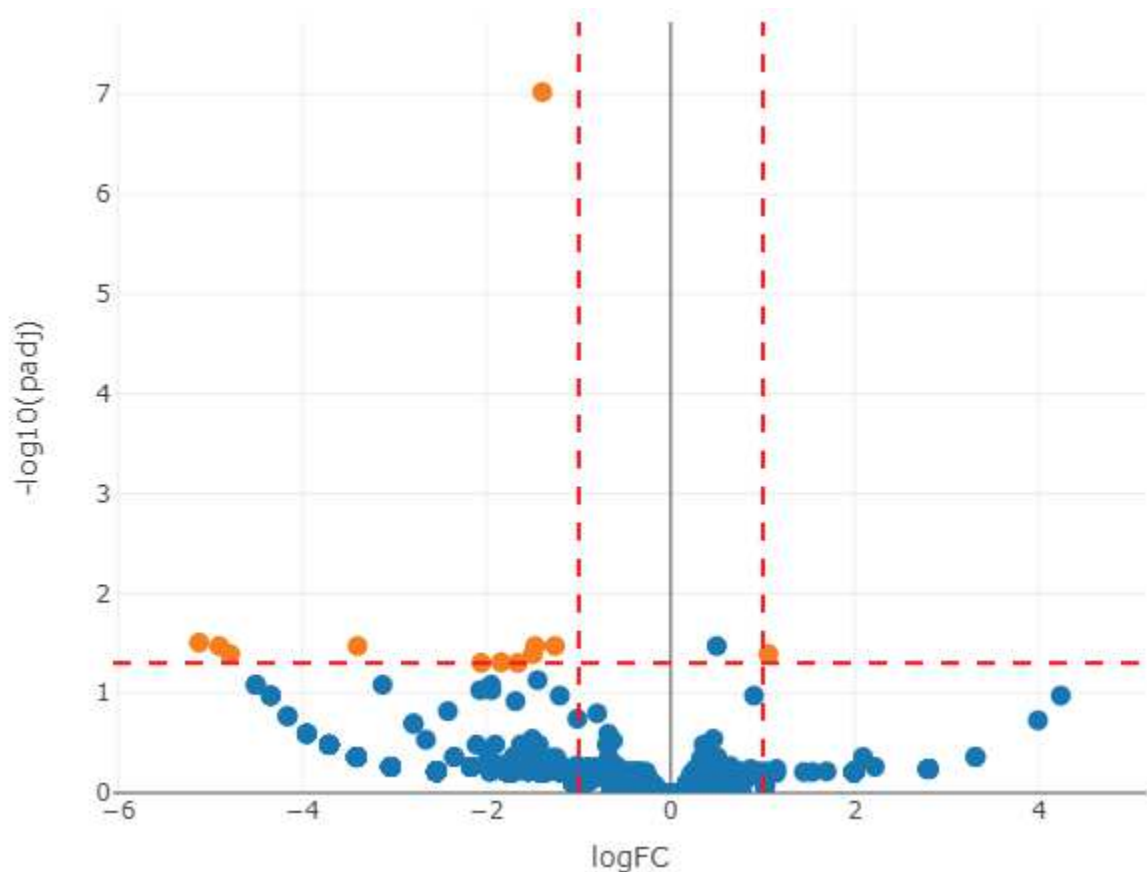
Annexe 8: Analyse GO des gènes ciblés par RBR1 et les facteurs de transcription E2FA, MYB3R3 et SOG1 et DE chez *fb17*.

Analyse de l'ontologie des gènes ciblés par RBR1 (N=244; **A**) et les facteurs de transcription E2FA (N=320; **B**), MYB3R3 (N=95; **C**) et SOG1 (N=51; **D**) et DE chez *fb17* (sur les 1443 gènes DE). L'analyse de l'enrichissement des GO est basée sur des catégories de fonction de processus biologique du logiciel ShinyGO v0.61. Les 30 enrichissements les plus significatifs sont montrés en utilisant un regroupement hiérarchique résumant la corrélation des gènes partagés entre les différentes voies. Plus les points bleus sont gros plus la p-values est petite.



Annexe 9: Analyse GO des gènes régulés les facteurs de transcription E2FA, MYB3R3 et SOG1 et DE chez *fbI17*.

Analyse de l'ontologie des gènes ciblés par les facteurs de transcription E2FA (N= 225; **A**), MYB3R3 (N= 6; **B**) et SOG1 (N= 89; **C**) et DE chez *fbI17* (sur les 1443 gènes DE). L'analyse de l'enrichissement des GO est basée sur des catégories de fonction de processus biologique du logiciel ShinyGO v0.61. Les 30 enrichissements les plus significatifs sont montrés en utilisant un regroupement hiérarchique résumant la corrélation des gènes partagés entre les différentes voies. Plus les points bleus sont gros plus la p-values est petite.



Annexe 10: Représentation graphique obtenue à partir de l'analyse protéomique représentant les protéines enrichies avec FBL17-GFP après un traitement à la Zéocine (à gauche) et FBL17-GFP en condition standard (à droite).

Les protéines identifiées dans le réplicat 1 sont classées dans un volcanoplot en fonction de leur rapport d'abondance (FBL17 +/- Zéocine) et l'analyse statistique a été réalisée par une régression binominale négative (valeur P ajustées). Pour chaque protéines le nombre moyen de spectres des échantillons GFP-BPM6 (n = 3) a été comparé au nombre moyen de spectres des échantillons de FBL17-GFP (n = 3). Les lignes pointillées rouges verticales affichent des changements de Fold Change de grande ampleur (axe x, FC <0,5, gauche; FC > 2, droite) tandis que la ligne pointillée rouge horizontale affiche une signification statistique élevée (axe y, valeur P ajustée <0,05 au-dessus de la ligne). Les points orange représentent des protéines enrichies de façon significative, tandis que les points bleus représentent des protéines qui ne le sont pas. Les protéines enrichies de façon significatives dans ce réplica ne le sont pas dans le deuxième.

Naomie GENTRIC

Entre cycle cellulaire et réponse aux dommages à l'ADN:

Fonctions de la protéine F-box FBL17 chez *Arabidopsis thaliana*

La protéine F-box FBL17 est un régulateur clef de la progression du cycle cellulaire chez *Arabidopsis thaliana*. Elle est notamment impliquée dans la dégradation des protéines inhibitrices de CDK, ce qui conduit chez le mutant *fb17* à des phénotypes développementaux sévères et une réduction drastique de l'activité de division cellulaire dans les méristèmes. Si l'implication de FBL17 dans le cycle cellulaire a été bien caractérisée, son répertoire de substrats et ses autres fonctions biologiques restent encore méconnus.

Durant cette thèse, l'interactome de FBL17 a été mis en évidence et son implication dans la réponse aux dommages à l'ADN (DDR) a été étudiée. Le mutant *fb17* présente une DDR constitutive associée à une augmentation du nombre de lésions de l'ADN, et l'induction de gènes de la DDR de façon SOG1-indépendante. Au niveau protéique, en condition de stress génotoxique, FBL17 est recrutée au niveau des sites de lésions de l'ADN où elle co-localise avec la protéine RBR1. Ces données supportent un rôle de FBL17 dans le maintien de l'intégrité génétique des cellules.

Mots clefs : F-box, Cycle cellulaire, Réponse aux dommages à l'ADN, RBR1, E2F, *Arabidopsis thaliana*.

In *Arabidopsis thaliana*, the F-box protein FBL17 is a key regulator of the cell cycle. FBL17 is especially implicated in the degradation of CDK inhibitor protein, which result in strong developmental phenotypes in *fb17* loss-of-function mutants, as well as a drastic reduction of cell division activity in meristems. While FBL17 involvement in cell cycle has been well described, its whole substrate's repertoire and its other biological implications remain poorly understood.

During this PhD, the FBL17 interactome has been established and its implication in DNA damage response (DDR) has been demonstrated. The *fb17* mutant presents a constitutive DDR associated with a higher frequency of DNA lesions and the induction of DDR genes in a SOG1-independant manner. At the protein level, upon genotoxic stress, FBL17 protein is recruited at DNA lesion sites where it colocalizes with RBR1. All these data support the implication of FBL17 in the maintenance of cell genome integrity.

Keywords: F-box, Cell Cycle, DNA damage response, RBR1, E2F, *Arabidopsis thaliana*.