

Université Louis Pasteur, Strasbourg I

2006

THESE

présentée à

la Faculté des Sciences de la Vie

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Louis Pasteur

Domaine : Aspect Moléculaire et Cellulaire de la Biologie

par

Frédéric LINCKER

**Rôle du facteur de transcription E2F dans la régulation de
l'expression des gènes codant pour la
Ribonucléotide Réductase**

Soutenue le 1^{er} décembre 2006 devant la Commission d'Examen

M. François-Yves BOUGET

M. Philippe CARBON

M. Michel CASTROVIEJO

Mme. Marie-Edith CHABOUTÉ

M. Charles WHITE

Rapporteur externe

Rapporteur interne

Examineur

Directrice de thèse

Rapporteur externe

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

À mon Papa...

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury, Messieurs Bouget, Carbon, Castroviejo et White, pour avoir accepté de lire et juger ce travail.

Je tiens également à remercier ma sacrée chef Marie-Édith Chabouté de m'avoir accueilli dans son laboratoire qui ne ressemblait pas tout à fait à ce qu'il est devenu aujourd'hui...

Merci aux membres et ex-membres du labo 512. Merci à Guy pour ses nombreux conseils et notamment au cours de la rédaction de ce manuscrit, Hélène, Sarah et Valérie pour leur bonne humeur quotidienne, Julien pour sa loquacité (...), Roxana pour son aide dans mon travail, Bernadette et Céline. Merci également aux nombreux stagiaires d'avoir permis de faire progresser ce travail plus rapidement. Merci également aux petits nouveaux, Lenin et Ondrej, à qui je souhaite beaucoup de réussite.

Merci également à nos voisins du 509. Merci à Anne-Catherine, Etienne, Jean, Jean-Luc Evrard, Natacha et Virginie.

Merci à ceux qui ont permis de faire progresser ce travail, Herrade pour les hectolitres de milieu BY-2 que j'ai pu utiliser, Michèle pour les tonnes de vaisselle nettoyées et stérilisées et Philippe pour son aide précieuse dans la réalisation des gels 2D.

Je remercie aussi Martine Devic, Valérie Delorme et Arnaud Ronceret pour nos collaborations fructueuses.

Bien sûr je n'oublie pas de remercier tous ceux et celles qui m'ont permis de rendre ces années à l'IBMP bien plus agréables... Un grand Merci à Alban, Aurélia, Ben et Cécile, Clarisse et son meilleur ami Fred H, Elodie et Delphine, Etienne, Gabrielle, Hélène, Pierre « le Pounk », Sarah et Valérie, sans vous tous ces cinq années n'auraient pas été aussi extraordinaires.

Je remercie également François Paulus qui, un jour de fin de maîtrise, a su me conseiller de faire un stage à l'IBMP, me permettant ainsi de me retrouver aujourd'hui entraîné d'écrire les remerciements de ma thèse.

Merci également à mes amis non scientifiques et basketteurs pour tous les bons moments passés ensemble et particulièrement pour m'avoir soutenu dans les moments difficiles au début de la thèse. Mille mercis à Dom et Sabou, Shavo, Malain, Julius, Clarence (bon courage pour la rédaction), Joe et Wally, Frelon et Christiane.

Je remercie infiniment mes parents pour m'avoir permis de faire ces longues études et pour m'avoir soutenu, encouragé et avoir cru en moi pendant ces nombreuses années. Merci également à mon frère Mich, à ma belle-sœur Mayon et à leur petite Laulau pour leur soutien et leur encouragement ainsi qu'à ma belle-famille, les PapMam Meyer, Etienne et Jacques.

Enfin, je te remercie énormément Odile pour ta patience et ton aide pendant ces mois difficiles de rédaction...merci simplement pour être comme tu es...

ABREVIATIONS

2,4 D : acide 2,4-dichloro-phenoxyacétique
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADN-T : ADN de transfert
APS : persulfate d'ammonium
ARN : acide ribonucléique
At : *Arabidopsis thaliana*
bp, kb : paire de bases, kilo paire de bases
BisTris : Bis(2-hydroxyéthyl)imino-tris(hydroxyméthyl)méthane
BSA : sérum-albumine bovine
CHAPS : 3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate
kDa : kiloDalton
cpm : coups par minute
DAPI : 4,6-Diamidino-2-phenylindole
dNDP : désoxyribonucléoside-5'-diphosphate
dNMP : désoxyribonucléoside-5'-monophosphate
dNTP : désoxyribonucléoside-5'-triphosphate
DO_x : Densité optique à x nm
DTT : dithiothréitol
EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique
GFP : "green fluorescent protein"
GUS : β-glucuronidase
HEPES : N-(2-hydroxyéthyl)piperazine-N'-(2-éthanesulfonate) de sodium; 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-(2-éthanesulfonate) de sodium
LB : Luria broth
LB : "left border" (bordure gauche d'un ADN-T)
LUC : luciférase
MS : Murashige et Skoog
NP40 : Nonidet P-40
Nt : *Nicotiana tabacum*
(p/v) : poids/volume
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
PM : poids moléculaire
PMSF : phényl méthyl sulfonyl fluoride
PNK : polynucléotide kinase
PVDF : difluorure de polyvinylidène
qsp : quantité suffisante pour
RB : "right border" (bordure droite d'un ADN-T)
RLU : unité relative
RT-PCR : Transcription inverse puis PCR
RNR : Ribonucléotide Réductase
SDS : dodécylsulfate de sodium

Taq : *Thermus aquaticus*
 TAE : Tris Acétate EDTA
 TBE : Tris Borate EDTA
 TCA : acide trichloroacétique
 TE : Tris EDTA
 TEMED : N, N, N',N'-tétraméthyléthylène diamine
 Triton X100 : polyéthylène glycol tert-orthophényl éther; t-octylphénoxy polyéthoxyéthanol;
 4-(1,1,3,3-tétraméthylbutyl)phényl-polyéthylène glycol
 Tween-20 : polyéthylène glycol sorbitane monolaurate
 Tris : N-tris(hydroxyméthyl)aminométhane
 U : unité enzymatique
 UV : ultraviolet
 (v/v) : volume/volume
 X-gal : 5-bromo 4-chloro 3-indole 1-D-galactopyranoside

Abréviations des acides aminés

A	:	alanine	C	:	cystéine
D	:	acide aspartique	E	:	acide glutamique
F	:	phénylalanine	G	:	glutamine
H	:	histidine	I	:	isoleucine
K	:	lysine	L	:	leucine
M	:	méthionine	N	:	asparagine
P	:	proline	Q	:	glutamine
R	:	arginine	S	:	sérine
T	:	thréonine	V	:	valine
W	:	tryptophane	Y	:	tyrosine

Abréviations des acides nucléiques

A	:	dATP	:	désoxyadénosine triphosphate
C	:	dCTP	:	désoxycytidine triphosphate
G	:	dGTP	:	désoxyguanosine triphosphate
T	:	dTTP	:	désoxythymidine triphosphate

Table des matières

Introduction	1
I. Régulation de l'expression d'un gène	4
1. Régulation transcriptionnelle	4
2. Régulation post-transcriptionnelle	5
3. Régulation par modifications post-traductionnelles	5
II. Le cycle cellulaire	7
1. Les principales étapes du cycle cellulaire	7
2. Principaux acteurs intervenant dans la régulation du cycle cellulaire	8
2.1. Cyclin-dependent kinases	8
2.2. Cyclines	9
2.3. Phosphorylation et déphosphorylation	11
2.4. Les kinases inhibitrices	12
3. La transition G1/S : régulation de l'entrée en phase S	13
4. La transition G2/M	13
5. Importance du cycle cellulaire dans le développement de la plante	14
6. L'endocycle	15
III. La familles des facteurs E2F et leur rôle	16
1. Généralités	16
2. Structure protéique et modulation de l'activité	17
2.1. Chez les mammifères	17
2.2. Chez les plantes	20
a) Les facteurs E2F	20
b) Les facteurs DEL	22
3. La transition G1/S	23
IV. La réparation de l'ADN	25
1. Les dommages à l'ADN	25
1.1. Les causes	25
1.2. Nature et conséquences	26
2. Réponses moléculaires à un stress génotoxique : détection et signalisation d'un dommage à l'ADN	27
3. Rôle du facteur E2F dans la réponse à un dommage à l'ADN	29
3.1. Rôle du facteur E2F1 dans le déclenchement de l'apoptose	30
3.2. Rôle du facteur E2F1 dans la signalisation de la réparation de l'ADN	30
3.3. Chez les plantes	31
V. La Bibonucléotide réductase ou RNR	32
1. Caractéristiques générales	32
1.1. Structure	33
1.2. Régulation allostérique	33

Table des matières

2. Régulation de la ribonucléotide réductase	34
2.1. Chez la levure	34
a) Régulation transcriptionnelle	34
b) Régulation de l'activité enzymatique	35
c) Régulation de la localisation subcellulaire	35
2.2. Chez les mammifères	36
a) Régulation de l'expression	36
b) Régulation de la localisation subcellulaire	37
2.3. Chez les plantes	38
a) <i>Nicotiana tabacum</i>	38
b) <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
c) Conclusion	40
VI. Objectifs de la thèse	41
Matériels et Méthodes	42
I. Matériels	43
1. Matériels de laboratoire	43
2. Matériels vivant	43
2.1. Matériel végétal	43
a) Plants de tabac	43
b) Culture de cellules BY-2	43
c) Culture cellulaire d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
2.2. Matériel bactérien	44
a) Bactéries de type DH5 α	44
b) Agrobactéries de type LBA4404	45
3. Vecteurs	45
3.1. Vecteur pBluescript KS II (+/-)	45
3.2. Vecteur pLUK07	46
3.3. Vecteur pCGN1549	46
3.4. Vecteur pGREEN0049	46
3.5. Vecteurs pK7FWG2 et pK7GWF2	47
3.6. Vecteur pNEGX1	48
4. Oligonucléotides	48
5. Outils informatiques	48
II. Méthodes	49
1. Techniques de clonage	49
1.1. Préparation de l'ADN plasmidique	49
1.2. Séquençage de l'ADN	49
1.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)	50
1.4. Électrophorèse sur gel d'agarose	50
1.5. Purification de fragments d'ADN issus de gels d'agarose	51
1.6. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction	51
1.7. Déphosphorylation d'un vecteur	51
1.8. Ligation des fragments d'ADN	52

Table des matières

1.9. Transformation de bactéries compétentes par choc thermique ou électroporation	52
1.10. Analyse des transformants	53
1.11. Mutagenèse par PCR	53
2. Méthodes concernant les protéines	54
2.1. Préparation de complexes protéiques nucléaires de cellules BY-2	54
2.2. Préparation d'extraits protéiques totaux à partir de culture cellulaire de BY-2 ou d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	55
2.3. Quantification des protéines	55
2.4. Électrophorèse sur gel de polyacrylamide	56
a) Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	56
b) Électrophorèse bidimensionnelle (IEF-SDS-PAGE)	56
2.5. Détection des protéines	57
a) Coloration au bleu de Coomassie	57
b) Coloration au bleu colloïdal	57
c) Coloration au nitrate d'argent	58
2.6. Transfert des protéines sur membrane PVDF	59
2.7. Immunodétection (Western-Blot)	59
3. Méthodes de biochimie	60
3.1. Marquage radioactif d'un oligonucléotide double brin d'ADN	60
a) Marquage en 5' d'une sonde d'ADN double brin	60
b) Marquage par remplissage par le fragment de Klenow	60
3.2. Southwestern blot	61
3.3. Gel retard ou EMSA (Electromobility Shift Assay)	61
4. Méthodes de transformation de cellules de plantes	62
4.1. Transformation stable par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	62
4.2. Transformation transitoire par biolistique	63
4.3. Observation des cellules transformées au microscope confocale	64
5. Méthode concernant la mesure de l'activité luciférase	64
5.1. Synchronisation de cellules BY-2	64
a) Blocage à l'aphidicoline	64
b) Mesure d'index mitotique	64
c) Mesure de la synthèse d'ADN	65
5.2. Étude de la réponse transcriptionnelle d'un gène à différents traitements	66
5.3. Utilisation du kit de mesure de l'activité luciférase (Tropix, Applied Biosystems)	66
6. Méthode concernant la mesure de l'activité GUS	67
6.1. Utilisation du kit de mesure de l'activité GUS (Tropix, Applied Biosystems)	67
6.2. Analyse histochimique	67

Premier chapitre : Analyse fonctionnelle de l'expression des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire **68**

I. Structure des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* **70**

Table des matières

II. Régulation de l'expression du gène <i>NtRNR1a</i> au cours du cycle cellulaire	73
1. Étude de l'expression du gène <i>NtRNR1a</i> au cours du cycle cellulaire	73
1.1. Réalisation et clonage des différentes versions du promoteur du gène <i>NtRNR1a</i>	73
1.2. Analyse de l'activité des différentes versions du promoteur	74
1.3. Conclusion	75
2. Mise en évidence d'interactions entre les différents cis-éléments E2F et des complexes protéiques nucléaires	76
2.1. Mise en évidence et caractérisation des interactions entre les éléments dE2F et pE2F et des complexes protéiques nucléaires	76
2.2. Évolution de l'interaction entre des complexes protéiques nucléaires et les éléments dE2F et pE2F au cours du cycle cellulaire	77
2.3. Conclusion	78
III. Régulation de l'expression du gène <i>NtRNR1b</i> au cours du cycle cellulaire	79
1. Étude de l'expression du gène <i>NtRNR1b</i> au cours du cycle cellulaire	79
1.1. Réalisation et clonage des différentes versions du promoteur du gène <i>NtRNR1b</i>	79
1.2. Étude de l'activité des différentes versions du promoteur au cours du cycle cellulaire	79
1.3. Conclusion	81
2. Mise en évidence de l'interaction entre les cis-éléments Myb, E2F et Télo et des complexes protéiques nucléaires	81
2.1. Expériences de Southwestern blot	81
2.2. Expériences de retard de migration sur gel	83
IV. Expression des facteurs E2F au cours du cycle cellulaire	86
1. Étude de l'accumulation des facteurs E2F de tabac au cours du cycle cellulaire	86
2. Conclusion	87
V. Conclusions	98

Deuxième chapitre : Régulation de l'expression des gènes RNR au cours du développement du tabac **93**

I. Étude de la régulation de l'expression du gène <i>NtRNR1a</i> et <i>NtRNR1b</i> au cours du développement	95
1. Étude de l'activité du promoteur du gène <i>NtRNR1a</i> dans différents tissus de plants de tabac	95
1.1. Analyse de l'activité du promoteur du gène <i>NtRNR1a</i> dans différents tissus de plants de tabac	95
1.2. Localisation de l'expression du gène <i>NtRNR1a</i>	96
1.3. Conclusion	97
2. Étude de l'activité du promoteur du gène <i>NtRNR1b</i> dans différents tissus de plants de tabac	97

Table des matières

2.1. Analyse de l'activité du promoteur du gène <i>NtRNR1b</i> dans différents tissus de plants de tabac	98
2.2. Conclusion	99
II. Évolution de l'accumulation de facteurs E2F de tabac au cours du développement de la plante	100
1. Analyse de l'accumulation de facteurs E2F de tabac dans de jeunes feuilles et dans des feuilles matures de tabac	100
2. Conclusion	101
III. Conclusions	102
Troisième chapitre : Étude de l'induction transcriptionnelle des gènes <i>NtRNR1a</i> et <i>NtRNR1b</i> et de la localisation subcellulaire de la sous-unité R1a en réponse à un stress génotoxique	104
I. Réponse transcriptionnelle des gènes <i>NtRNR1a</i> et <i>NtRNR1b</i> à un stress génotoxique	106
1. Analyse de l'activité du promoteur du gène <i>NtRNR1a</i> en réponse à une irradiation aux rayons UV-C	106
2. Étude fonctionnelle du gène <i>NtRNR1b</i> en réponse à un stress génotoxique	107
2.1. Analyse de l'activité transcriptionnelle du gène <i>NtRNR1b</i> en réponse à une irradiation aux rayons UV-C	107
2.2. Analyse de l'activité transcriptionnelle du gène <i>NtRNR1b</i> en réponse à un traitement à la bléomycine	108
2.3. Interaction entre les cis-éléments Myb, E2F et Telo et des complexes protéiques nucléaires issus de cellules BY-2 traitées à la bléomycine	109
2.4. Étude de l'accumulation des facteurs E2F de tabac en réponse à un stress génotoxique	110
3. Conclusion	110
II. Localisation subcellulaire de la sous-unité <i>NtR1a</i> en réponse à un dommage à l'ADN	111
1. Analyse de la localisation subcellulaire de la sous-unité R1a en réponse à un stress génotoxique	112
2. Conclusion	113
III. Conclusions	114
Quatrième chapitre : Étude du facteur NtE2F	117
I. Présentation du facteur NtE2F	118
II. Étude de la localisation subcellulaire du facteur NtE2F	119
1. Fonctionnalité de la protéine de fusion NtE2F-EGFP	119
2. Localisation subcellulaire du facteur NtE2F	120

Table des matières

III. Fonctionnalité de la protéine de fusion NtE2F-EGFP	122
3. Clonage du facteur NtE2F dans le vecteur pNEG-X1	122
4. Essai de purification de protéines de tabac interagissant avec le facteur NtE2F	123
IV. Modification du facteur NtE2F en réponse à un stress génotoxique	125
1. Rappel	125
2. Conséquences d'un stress génotoxique sur le facteur NtE2F	126
V. Conclusions	128
Conclusions et perspectives	130
Bibliographie	139
Annexes	156

Introduction

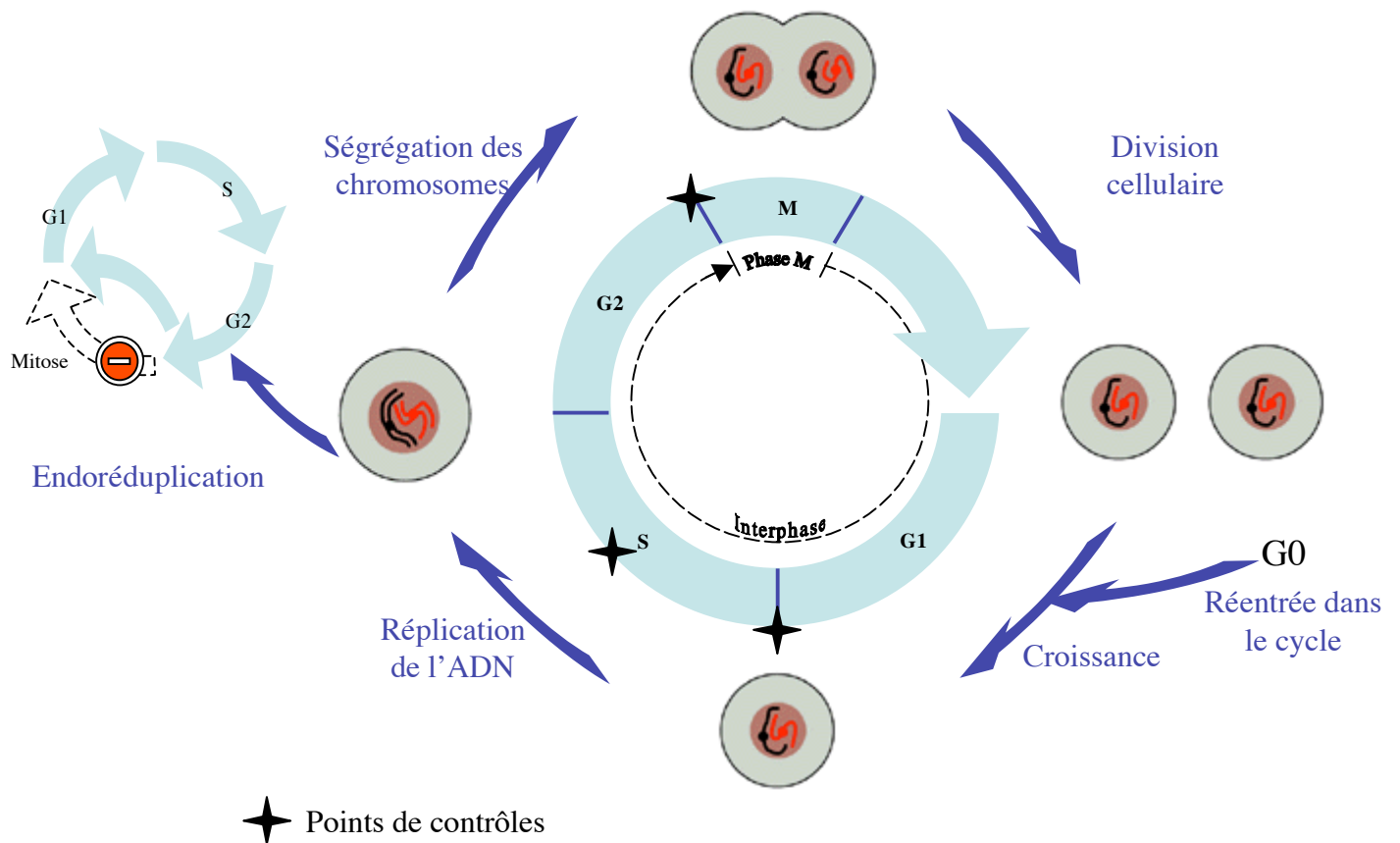


Figure 1: Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est composé de quatre principales phases: les phases G1, S, G2 et M. Les cellules en phase de quiescence (G0) peuvent réentrer dans le cycle en réponse à des signaux (hormones, facteurs de croissance).

La cellule a mis en place différents points de contrôle (transition G1/S, phase S et transition G2/M) lui permettant de surveiller l'intégrité de son génome.

Une fois que la cellule est différenciée, elle peut entrer dans un cycle alternatif: l'endoréduplication.

La division cellulaire est un processus non seulement essentiel pour le développement embryonnaire mais également pour toute la vie d'un organisme adulte. En effet, un organisme eucaryote adulte est composé de plusieurs milliards de cellules provenant toutes, par divisions cellulaires successives, d'une seule et même cellule : l'œuf fécondé. Une fois la taille adulte atteinte, un milliard de cellules doit être renouvelé tous les jours afin de remplacer celles qui sont perdues.

La division cellulaire est un mécanisme extrêmement complexe et hautement régulé par un très grand nombre de protéines. Ces protéines peuvent intervenir transitoirement ou dans un ordre précis permettant ainsi le bon déroulement des différentes étapes du cycle cellulaire. Le cycle cellulaire est principalement constitué de quatre phases, les phases G1, S, G2 et M (Figure 1). Lors de la phase S, les chromosomes sont répliqués et au cours de la phase M, ou mitose, les chromosomes se répartissent entre les deux cellules filles. Ces deux phases sont séparées par des phases de transitions appelées G1 et G2, ou « gap ». Lors de la phase G1, la cellule analyse sa taille et son environnement afin de décider à s'engager en phase S. En phase G2, la cellule s'assure que la réplication de l'ADN a bien été accomplie avant d'entrer en mitose. Les cellules se trouvant en phase G2 peuvent donc être distinguées des cellules en phase G1 par leur contenu en ADN deux fois supérieur. Les cellules filles, dès la sortie de mitose, peuvent entrer en phase G0, stade de quiescence. La plupart des cellules d'un organisme adulte sont en phase G0. Les cellules en G0 n'effectuent ni réplication d'ADN, ni mitose. Ces cellules sont en dehors du cycle cellulaire, mais elles peuvent, si elles sont stimulées par des facteurs mitogéniques, y entrer à nouveau.

Ces quatre phases ont lieu dans un ordre bien défini, et la progression du cycle cellulaire est coordonnée par des complexes protéiques spécifiques composés de cyclines et de protéines kinases appelée « cyclin-dependent kinase » ou CDK. Ces complexes protéiques sont en quelques sortes le moteur assurant la progression du cycle cellulaire. Différents complexes Cycline/CDK sont exprimés spécifiquement au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Cependant une phase donnée du cycle ne se met en place que si la phase précédente a bien été menée à terme. Ceci implique l'existence de mécanismes dont le rôle est

la vérification de « l'aptitude de passage » : il s'agit des points de contrôle ou « checkpoints ». Ces checkpoints se situent à l'entrée de la phase S (transition G1/S), en phase S et à l'entrée de la phase M (transition G2/M). Lors de ces différents points de contrôle, la cellule vérifie l'intégrité de son génome afin de ne pas transmettre de mutations aux deux cellules filles. En effet, dans la cellule, l'ADN peut en permanence être altéré par de nombreux agents génotoxiques pouvant provenir de son environnement (comme les rayons ultraviolets) ou de la cellule elle-même (comme les produits issus du métabolisme de l'oxygène). Cependant, en réponse à un dommage à l'ADN, un signal est généré et contraint le cycle cellulaire soit à s'arrêter en phase G1 ou G2 soit à ralentir en phase S. Si le cycle cellulaire est interrompu, la position de l'arrêt du cycle cellulaire dépend de la phase dans laquelle se trouvait la cellule lorsque les dommages à l'ADN ont été détectés. Les gènes impliqués spécifiquement dans la réparation de l'ADN sont alors induits. De plus, la cellule a mis en place de nombreux mécanismes permettant de réparer les dommages à l'ADN ou de supprimer les cellules trop endommagées. Ces différents mécanismes sont souvent retrouvés de la bactérie aux eucaryotes supérieurs.

La régulation de la division cellulaire est un mécanisme crucial pour le développement de tout organisme. Une des différences majeures entre un animal et une plante est que l'organogenèse ne se produit que lors de l'embryogenèse chez les animaux, alors que la formation des organes, chez les plantes, est un processus continu ayant lieu pendant toute la vie de la plante. De plus, le développement post-embryonnaire d'une plante est principalement contrôlé par la division et la différenciation cellulaire dans les méristèmes. Les méristèmes sont des tissus constitués de cellules indifférenciées permettant à la plante de croître ou de produire de nouveaux organes. Par conséquent ils sont essentiels au bon développement d'une plante.

La régulation du cycle cellulaire, à tous les niveaux, est donc essentielle à la vie de tout organisme. L'expression des gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire doit donc être finement régulée. La régulation de l'expression de ces gènes est contrôlée, entre autres, par l'organisation de leurs promoteurs, c'est-à-dire par les différents cis-éléments qu'ils contiennent ainsi que par des interactions spécifiques de protéines régulatrices avec ces cis-éléments.

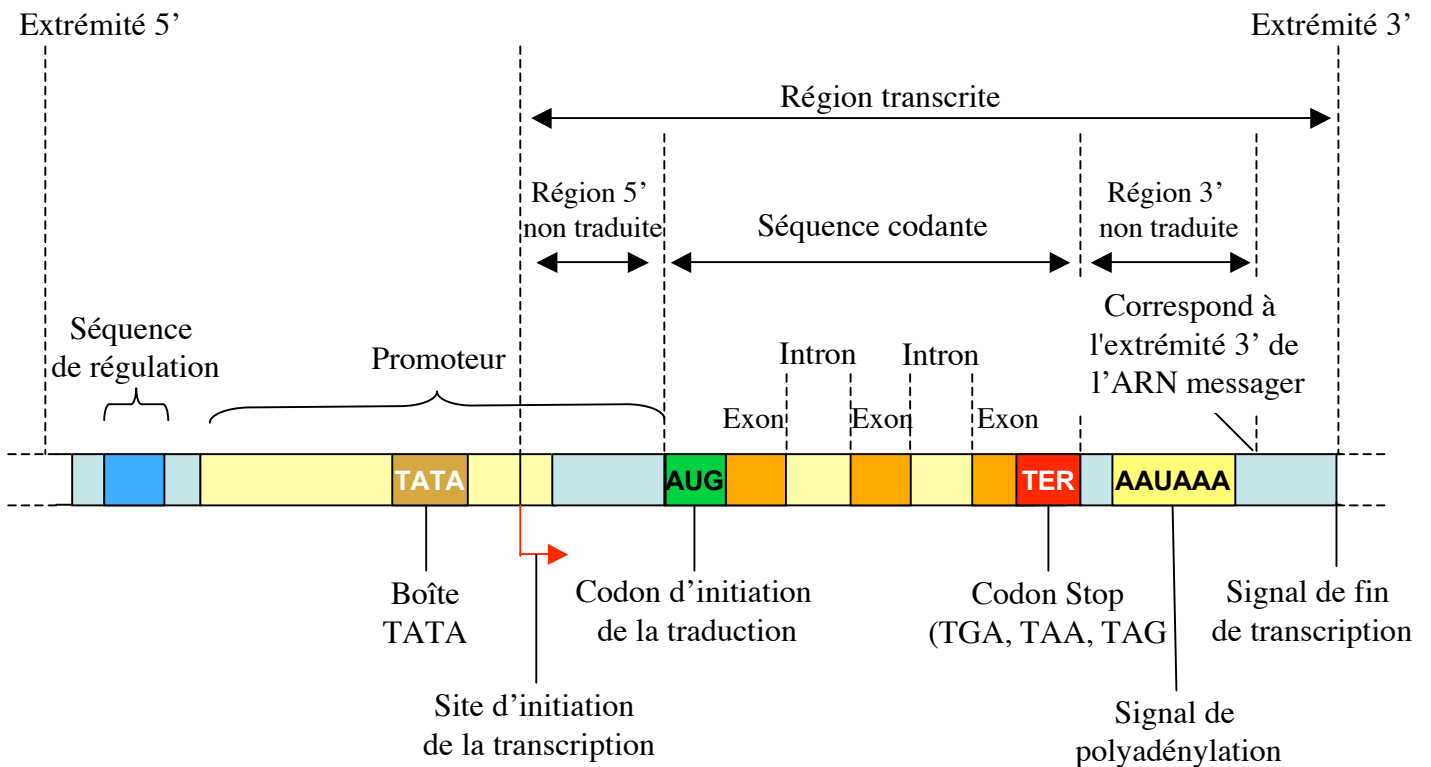


Figure 2: Structure et organisation d'un gène eucaryote.

La région transcrite est bordée à chaque extrémité, 5' et 3', de séquences non codantes jouant un rôle dans la régulation du gène. La plupart des éléments de régulation sont situés en 5'. Le promoteur du gène contient les séquences de régulation reconnues par les facteurs de transcription qui assistent l'ARN polymérase II pour les étapes d'initiation et d'élongation de la transcription.

I. Régulation de l'expression d'un gène eucaryote

Afin d'expliciter le fonctionnement détaillé du cycle cellulaire notamment au niveau de la régulation transcriptionnelle des gènes, il est nécessaire au préalable de présenter la structure, l'organisation et l'expression d'un gène eucaryote.

1. Régulation transcriptionnelle

La régulation transcriptionnelle d'un gène s'exerce par l'intermédiaire de facteurs protéiques qui interagissent avec des séquences nucléotidiques particulières situées le plus souvent en amont des gènes, c'est-à-dire en 5' du site d'initiation de la transcription (Figure 2). Cependant, ces séquences peuvent être situées après le site d'initiation de la transcription. Cette portion du gène, située en amont du codon ATG initiateur de la traduction, est appelée promoteur. Le promoteur contient divers éléments impliqués dans le recrutement de facteurs protéiques facilitant ou inhibant la transcription du gène. Les éléments localisés sur le même brin d'ADN que la région codante du gène sont appelés cis-éléments. Le cis-élément le plus fondamental est la boîte TATA (ou « TATA box »). Cette boîte est retrouvée dans la plupart des gènes eucaryotes. Elle est localisée autour de la position -30 (30 nucléotides en amont du site d'initiation de la transcription et correspond au premier nucléotide transcrit). La boîte TATA est responsable, avec la boîte « Initiator », qui détermine le site d'initiation de la transcription, du bon positionnement de l'ARN polymérase II (ARN pol II) afin d'initier correctement la transcription. Si la boîte TATA d'un promoteur est altérée, un gène sera encore capable de recruter l'ARN polymérase II mais l'efficacité d'initiation de la transcription sera fortement affectée. Les gènes inductibles contiennent souvent une boîte TATA ainsi qu'au moins deux autres cis-éléments jouant un rôle dans la transduction de signaux environnementaux. Par contre, les gènes impliqués dans la maintenance de la cellule présentent moins de diversité au niveau de leurs cis-éléments et ne contiennent pas de boîte TATA.

Les éléments régulateurs peuvent être trouvés en diverses positions comme en amont de la boîte TATA, en aval dans les régions 3' flanquante (dans les régions non traduites situées en 5' de l'ARN messenger), ou même dans les introns. La fixation de facteurs de transcription sur ces éléments permet de réguler positivement ou négativement la transcription d'un gène. Ils permettent d'amplifier la transcription ou, au contraire, de l'inhiber suivant le contexte dans lequel se trouve la cellule. En effet, la fixation de facteurs de transcription sur ces éléments permet de moduler l'expression des gènes dans l'espace (types de cellules), dans le temps (au cours du développement), sous l'effet de stress ou en fonction de l'environnement. Par exemple, le cis-élément E2F est essentiel à l'expression spécifique de gènes en phase S du cycle cellulaire. Les rôles des cis-éléments et des facteurs de transcription E2Fs seront approfondis dans la suite de cette introduction.

2. Régulation post-transcriptionnelle

Chez les eucaryotes, chacune des étapes de la maturation des ARN messagers est un site de régulation post-transcriptionnelle de l'expression d'un gène. Ainsi, un ARN messenger peut être régulé par épissage alternatif. Par ce biais, un même gène peut coder pour plusieurs protéines différentes. Un autre moyen de modifier l'expression d'un gène est de contrôler la stabilité des messagers et donc de leur durée de vie permettant ainsi de produire une quantité plus ou moins importante de la protéine codée par le messenger.

3. Régulation par modifications post-traductionnelles

La protéine traduite à partir de l'ARN messenger correspondant peut être régulée par des modifications post-traductionnelles. Une protéine peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles comme l'ajout d'un groupement chimique (phosphorylation, glycosylation, acétylation...), l'ajout d'autres protéines ou peptides (ubiquitination, SUMOylation...) ou encore des changements de la structure (pont disulfure, clivage protéolytique). Ces différentes modifications permettent, en générale, de réguler les fonctions d'une protéine en causant des changements dans son activité, sa localisation subcellulaire ou encore ces interactions avec d'autres protéines. Plusieurs modifications post-traductionnelle

Introduction

d'une protéine sont impliquées dans des voies de signalisation. Par exemple, la phosphorylation et la déphosphorylation d'une protéine sont impliquées dans l'activation ou l'inactivation de l'activité d'une enzyme ; dans la modulation des interactions entre protéines ou encore dans la stabilité d'une protéine en lui permettant d'échapper à la dégradation.

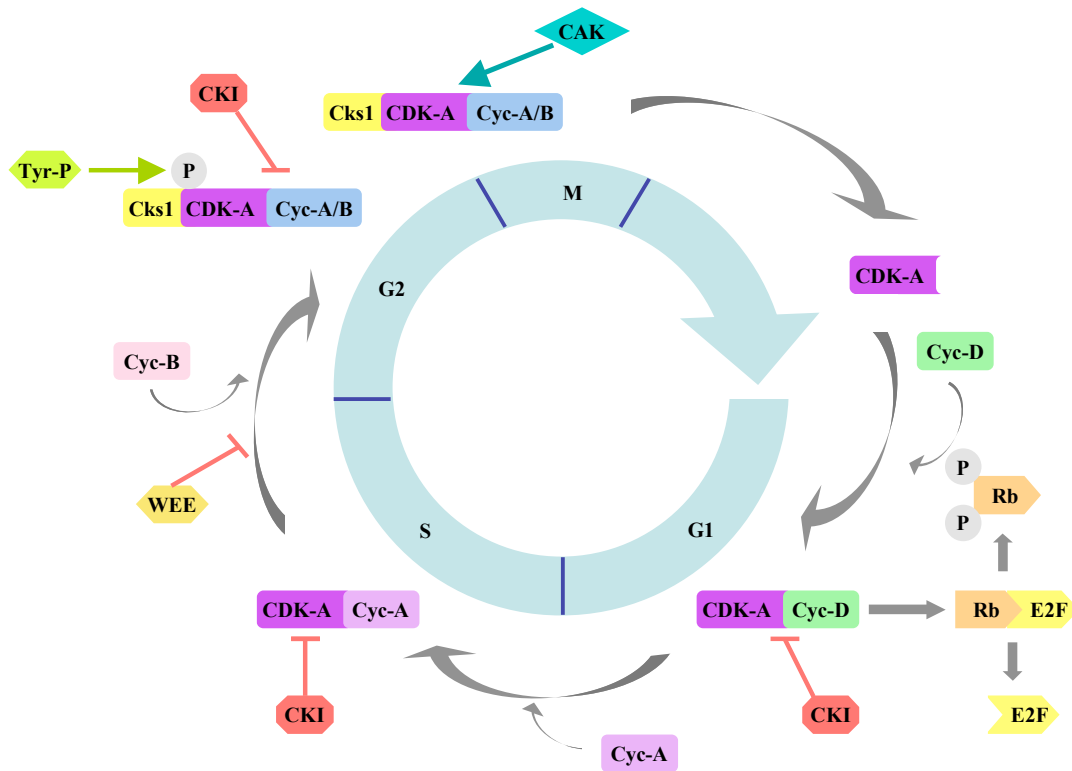


Figure 3: Contrôle du cycle cellulaire par les complexes Cyclines/CDKs chez les plantes

La progression du cycle cellulaire est assurée par des complexes protéiques composés de cyclines et de CDKs. À la transition G1/S, un complexe CYCD/CDKA phosphoryle la protéine Rb qui perd son affinité pour le facteur E2F qui va alors activer des gènes nécessaires à la phase S. À la transition G2/M, des complexes CYCA-B/CDKA vont être activés par des événements de phosphorylation/déphosphorylation permettant l'entrée en mitose. L'activité des complexes Cyclines/CDK est inhibée par les CKI.

II. Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire consiste en un ensemble de processus finement ordonnés aboutissant à la formation de cellules filles à partir d'une seule et même cellule (Figure 1). Son organisation et sa régulation sont fortement conservées entre les plantes et d'autres organismes eucaryotes. Les principaux acteurs intervenant lors de la progression et la régulation du cycle cellulaire sont des complexes protéiques composés de cyclines et de protéines kinases appelée « cyclin-dépendent kinase » (CDK). La régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle, en particulier la phosphorylation/déphosphorylation et la dégradation de ces complexes protéiques, jouent un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle.

1. Les principales étapes du cycle cellulaire

La division cellulaire nécessite un réseau de processus complexes qui doivent être exécutés de manière ordonnée dans le temps et dans l'espace chez une plante.

En effet, pendant la phase G1, la cellule intègre une multitude de signaux lui permettant de prendre la décision d'initier la réplication de l'ADN. Cette décision implique non seulement l'entrée en phase S, mais aussi l'accomplissement de la division cellulaire. Une fois que le matériel génétique a été répliqué la phase G2 débute (Figure 3). Durant cette phase, les structures mécaniques permettant la séparation des chromosomes par la réorganisation du cytosquelette doivent être mises en place. À l'entrée de la mitose, le réseau de microtubules corticaux, agencé transversalement à l'axe d'élongation de la cellule, est réorganisé afin de former un anneau cortical étroit, la bande ou l'anneau préprophasique. L'anneau préprophasique est uniquement retrouvé chez les plantes. Il consiste en une sorte de ceinture de microtubules et de filaments d'actine déterminant le futur plan de division de la cellule. Les microtubules sont ensuite réorganisés pour former le phragmoplaste permettant la synthèse de la paroi nécessaire entre les deux futures cellules filles.

2. Principaux acteurs intervenant dans la régulation du cycle cellulaire

2.1 « Cyclin-dependent kinases »

La plupart des niveaux de régulation du cycle cellulaire eucaryote est contrôlée par une classe spéciale de Sérine/Thréonine kinases appelées « cyclin-dependent kinase » ou CDK. Afin d'être actives ces kinases doivent interagir avec une protéine régulatrice appelée cycline. Les CDKs sont présentes chez tous les eucaryotes. Le rôle crucial des CDKs dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire a été démontré par l'identification du gène *cdc2* chez *Saccharomyces pombe* par Sir Paul Nurse en 1981 (Nurse and Bissett, 1981) (récompensé d'ailleurs par le prix Nobel de Physiologie & Médecine en 2001 pour cette découverte). Nurse a montré que le produit de ce gène était nécessaire à la progression du cycle cellulaire des phases G1 à S et des phases G2 à M. La protéine codée par le gène *cdc2* fait partie d'un groupe conservé au cours de l'évolution, appelé « cyclin-dependent kinase », et est le seul CDK impliqué dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire chez *Saccharomyces pombe*. L'homologue de *cdc2* chez *Saccharomyces cerevisiae* est le gène *cdc28*. Il a été montré que les CDKs présentent généralement une séquence canonique PSTAIRE (code des acides aminés à une lettre) dans leur domaine de liaison aux cyclines. Cette séquence PSTAIRE est en quelque sorte la signature des « cyclin-dependent kinases ». Chez les eucaryotes supérieurs, il existe plusieurs CDKs. Ces différents CDKs jouent des rôles différents à divers points du cycle. Entre les animaux et les plantes, ces CDKs ne sont pas conservés et présentent des variations de séquences au niveau de leur domaine de fixation aux cyclines. Par exemple, les CDK4 et 6, impliquées dans la régulation de la transition G1/S en phosphorylant la protéine pRB chez les animaux, ne sont pas retrouvés chez les plantes.

Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs types de CDKs (CDKA, B, D et F) ont été identifiés sur la base de leur structure primaire (Joubes et al., 2000) (Vandepoele et al., 2002). Les CDKAs, qui sont les homologues de CDC2 de *Saccharomyces pombe* ou de CDK1 humaine, et CDKB sont les CDKs les plus connues. Par contre, les CDKs de type D et F sont plutôt considérées comme des activateurs de CDKs (CAK). Parmi ces six types de CDKs, seules les CDK de type A et B joueraient un rôle au niveau de la régulation de la progression du cycle cellulaire. Un seul gène code pour CDKA et présente une expression constitutive au

cours du cycle cellulaire (Fobert et al., 1996). CDKA présente le motif PSTAIRE dans son domaine de liaison aux cyclines (Ferreira et al., 1991) et joue un rôle clef au cours des transitions G1/S et G2/M. Les CDKs de type B semblent être unique aux plantes. Chez *Arabidopsis thaliana*, ces CDKs sont subdivisées en deux groupes (CDKB1 et CDKB2), elles-mêmes séparées en deux sous-groupes. L'expression des CDKBs est maximale au cours des phases G2 et M du cycle cellulaire. Cette expression régulée au cours du cycle est caractéristique aux plantes et n'a pas été observée pour d'autres types de CDKs chez d'autres eucaryotes. Les CDKs de type B sont essentielles à la régulation de la transition G2/M, notamment pour réguler des événements spécifiques aux plantes comme la mise en place de l'anneau préprophasique en fin de phase G2 et l'établissement du phragmoplaste en fin de mitose (Magyar et al., 1997) (Porceddu et al., 2001).

2.2. Cyclines

Les premières cyclines ont été initialement identifiées dans les oeufs d'oursin comme étant des protéines dont le taux augmentait en interphase puis diminuait subitement à chaque division méiotique ou mitotique (Evans et al., 1983). Par la suite, les cyclines ont été identifiées chez une grande variété d'organismes allant de la levure à l'homme, en passant par les plantes. Ces protéines ont été nommées ainsi de part la fluctuation de leur niveau d'expression au cours du cycle cellulaire et de part leur expression cyclique et transitoire au cours du cycle cellulaire. La liaison d'une cycline à une CDK est le premier niveau de régulation de l'activité des CDKs. En effet, une CDK est inactive si elle n'interagit pas avec une cycline. Les cyclines sont un groupe de protéines de faible homologie entre elles, partageant une région peu conservée, impliquée dans leur interaction avec les CDKs (Noble et al., 1997). Cette région centrale d'une centaine d'acides aminés, appelée « cyclin core », présente deux repliements de cinq hélices. Le premier repliement est la région la plus conservée contenant cinq acides aminés invariables. Ce premier repliement, à la base de l'interaction des cyclines avec les CDKs, est appelé « cyclin box ».

Chez les animaux, quatre cyclines majeures sont exprimées de manière séquentielle (D, E, A et B) au cours du cycle et s'associent à différentes CDKs pour former des complexes actifs Cycline/CDK. Parmi ces cyclines majeures, la cycline D commence à s'accumuler en milieu de phase G1, alors que la cycline E n'apparaît qu'à la transition G1/S. La progression

de la phase S à la phase M nécessite la cycline A tandis que la cycline B est importante lors de la mitose.

Chez les plantes, un nombre de cyclines bien plus important est présent (Vandepoele et al., 2002) (Wang et al., 2004). Elles ont été subdivisées en classes A, B, et D suivant leur similarité de séquence avec leurs homologues animaux. Par contre, aucun homologue de la cycline E n'a été identifié (Renaudin et al., 1996) (Vandepoele et al., 2002). Malgré son génome de petite taille, *Arabidopsis thaliana* contient au moins 32 cyclines ayant un rôle putatif dans la régulation de la progression du cycle cellulaire. L'annotation du génome d'*Arabidopsis thaliana* a permis d'identifier 10 cyclines de type A, 11 de type B, 10 de type D et une de type H (Vandepoele et al., 2002) (Wang et al., 2004).

Les dix cyclines de type D identifiées chez *Arabidopsis thaliana* sont divisées en sept groupes (Vandepoele et al., 2002). Les cyclines de type D permettent d'intégrer des signaux environnementaux au niveau du cycle cellulaire. En effet, l'expression de plusieurs cyclines D est régulée par la disponibilité en nutriments et par des hormones. Par exemple, la cycline D3 n'est plus exprimée si la cellule est privée de sucrose (Healy et al., 2001) alors que son expression est induite lorsque la concentration en cytokinine est forte (Riou-Khamlichi et al., 1999). L'analyse de leur expression dans des cellules synchronisées a montré que l'expression de la plupart des cyclines D augmente lors de la réentrée dans le cycle cellulaire, résultat en accord avec leur rôle dans la réponse à des signaux environnementaux. Le principal partenaire des cyclines D est CDKA;1, la seule CDK présentant la signature PSTAIRE (Vandepoele et al., 2002). Les cyclines D sont actives en phases G1 grâce à leur association avec les CDKs de type A (Figure 3).

Contrairement à ce qui se passe chez les mammifères, plusieurs cyclines A existent chez les plantes et sont subdivisées en trois sous-groupes : Cycline A1 (CYCA1), Cycline A2 (CYCA2) et Cycline A3 (CYCA3). Des membres de ces trois sous-groupes ont été découverts chez plusieurs plantes dont *Arabidopsis thaliana* et le tabac (Chaubet-Gigot, 2000). L'expression transcriptionnelle des cyclines de type A de tabac a été analysée en utilisant des cellules BY-2 de tabac synchronisées. Ces résultats montrent que les gènes codant pour les cyclines de type A1 et A2 sont induits au milieu de la phase S et que leur taux de transcrits diminue autour du milieu de la mitose comme chez leurs homologues animaux. Il est intéressant de noter que les gènes codant pour les cyclines de type A3, dont les transcrits sont induits avant ceux des gènes *CYCA1* et *CYCA2*, sont induits à la transition G1/S du cycle cellulaire et que leur taux de transcrits diminue à un niveau très faible lorsque les cellules

entre en mitose (Reichheld et al., 1996) (Vandepoele et al., 2002). Chez le tabac, il a été montré que la surexpression de la CYCA3;2 induisait la transition G1/S et réduisait l'endoréduplication (Yu et al., 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, CYCA2;3 régule négativement l'endocycle et est un régulateur clef du niveau de ploïdie (Imai et al., 2006). Ces données indiquent que les cyclines de type A sont impliqués à la fois dans la régulation de la transition G1/S et de l'endoréduplication (Figure 3).

Les cyclines de type B sont également appelées cyclines mitotiques de type B. Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que dans des cellules, le niveau de transcrits en cyclines B est nul jusqu'en phase S, augmente en phase G2 pour atteindre un niveau maximal à la fin de cette phase et au début de la mitose. Ce taux diminue rapidement au cours de la progression de la mitose (Ito, 2000). Ces résultats indiquent un rôle essentiel dans la régulation de l'entrée en mitose (Figure 3).

2.3. Phosphorylation et déphosphorylation

Les « Cyclins-dependant kinases » ne sont pas uniquement régulées par leur association avec des cyclines mais également par de mécanismes de phosphorylation-déphosphorylation. Ces mécanismes constituent le second niveau de régulation des CDKs.

L'activation ultime des CDKs, chez tous les organismes étudiés jusqu'à présent, implique la déphosphorylation des résidus thréonine 14 et/ou tyrosine15 (T14 et Y15) par la phosphatase CDC25 et la phosphorylation du résidu thréonine 160 (T160) (Lew and Kornbluth, 1996) catalysée par une enzyme appelée « CDK-activating kinase » ou CAK. Ces événements de phosphorylation/déphosphorylation ont été identifiés chez de nombreux organismes et permet l'accès du substrat à phosphoryler au site catalytique des CDKs. Chez les animaux, les CAKs sont des complexes hétérotrimériques composés d'une sous-unité catalytique kinase CDK7, d'une sous-unité régulatrice cycline H et d'une protéine appelée MAT1 interagissant avec CDK7 permettant de stabiliser le complexe CDK7/cyclineH (Devault et al., 1995) (Tassan et al., 1995). Les CAKs animales présentent une activité enzymatique supplémentaire permettant de phosphoryler le domaine C-terminal (CTD) de la grande sous-unité de l'ARN polymérase II (Serizawa et al., 1995) (Shiekhattar et al., 1995). Ce domaine CTD est impliqué dans la régulation de l'initiation de la transcription. Les CAKs pourraient donc jouer des rôles dans la régulation de la transcription.

Chez les plantes, deux classes distinctes de CAKs ont été identifiées : l'une connue sous le nom de CDKD est l'homologue de CDK7 (Joubes et al., 2000) et l'autre, appelée CDKF est spécifique aux plantes (de Jager et al., 2005). Chez *Arabidopsis thaliana*, trois gènes codant pour des CDKDs ont été identifiés : *AtCDKD;1*, *AtCDKD;2*, et *AtCDKD;3* (Umeda et al., 2005) (Shimotohno et al., 2003).

L'activité des CDKs peut être également régulée négativement par la phosphorylation du résidu thréonine 14 (T14) et/ou du résidu tyrosine 15. Cette phosphorylation est réalisée par une protéine kinase appelée Wee1. De plus, ces deux résidus peuvent être déphosphorylés par la phosphatase CDC25 permettant de réactiver l'activité kinase des CDKs. Des orthologues de Wee1 et de CDC25 ont été identifiés chez *Arabidopsis thaliana* (de Jager et al., 2005). Ces phénomènes de phosphorylation-déphosphorylation réalisés par les kinases Wee1/CDC25 jouent un rôle essentiel dans le déclenchement de la transition G2/M (Figure 3). En effet, plus une cellule est proche d'entrer en mitose, plus l'abondance de CDK1 phosphorylées au niveau de T14 et/ou Y15 diminue et plus celle phosphorylée au niveau de T160 augmente (Lew and Kornbluth, 1996).

2.4. Les kinases inhibitrices

Un troisième niveau de régulation des complexes Cyclines/CDKs est apparu avec la découverte des inhibiteurs de CDKs, les CKIs. Les CKIs exercent leur activité inhibitrice en s'associant aux CDKs ou aux complexes Cyclines/CDKs (Figure 3). Elles peuvent bloquer l'engagement d'une phase, mais peuvent également agir au cours d'une phase du cycle cellulaire.

Chez les mammifères, les CKIs sont réparties en deux groupes : la famille des INK4 (« inhibitor of CDK4 ») et la famille des KIP/CIP. Ces deux familles de CKIs ont chacune leur propre spécificité de CDK et leur propre structure.

Chez *Arabidopsis thaliana*, sept gènes codent pour des protéines du groupe Kip/Cip-like, et sont désignés par les noms KRP1 à KRP7 (pour « Kip Related Proteins ») (De Veylder et al., 2001). Toutefois, aucun homologue de la famille INK4 n'a été découvert. Il a également été démontré que toutes ces protéines KRPs pourraient interagir avec les complexes CYCD2/CDKA et CYCD2/CDKB, via une région C-terminal conservée avec les protéines KIP/CIP des mammifères, et pourraient ainsi inhiber l'activité kinase des CDKs (Nakai et al., 2006).

3. La transition G1/S : régulation de l'entrée en phase S

Il existe deux barrières moléculaires empêchant la cellule d'entrer en phase S. Il s'agit des CKIs, qui inhibent l'activité enzymatique des complexes Cyclines/CDKs et des protéines appelées Retinoblastome ou Rb. Ces deux barrières constituent le point de restriction. Pour passer de G1 à S, il faut donc bloquer l'action inhibitrice des CKIs et de Rb.

Des CDKs et des cyclines spécifiques sont impliquées dans le contrôle de la transition G1/S chez les plantes. À l'entrée de la phase G1 et au cours de la transition G1/S, la voie pRb/E2F est la principale cible de complexes CYC/CDK dont l'activité peut être inhibée par les CKIs. Les cyclines de type D sont essentielles au passage de la phase G1 à la phase S. La transcription des cyclines D est activée par des signaux extracellulaires conduisant à la formation de complexes CYCD/CDKA actifs. Ces complexes phosphorylent la protéine Rb qui perd alors son affinité pour le facteur de transcription E2F, avec lequel elle interagissait, qui pourra alors activer la transcription de gènes qu'il contrôle (Figure 8). Le facteur E2F est alors capable d'activer la transcription de gènes impliqués dans la phase S ainsi que d'autres processus impliqués dans le cycle cellulaire et la croissance (Chaboute et al., 2002) (De Veylder et al., 2002). La voie E2F/Rb sera développée plus précisément dans la suite de cette introduction.

4. La transition G2/M

La transition G2/M, chez les plantes, est contrôlée par le niveau d'activité kinase des complexes CDK/CYCB, et par l'inhibition de CDKs bloquant les cellules en phase G2. Pendant la phase G2, le taux de transcrits codant pour la cycline de type B augmente et ces cyclines B s'associent aux CDKA et CDKB1. La régulation de l'activité kinase par des CKI (« CDKs inhibitors), par la phosphorylation inhibitrice effectuée par Wee1 et par la phosphatase CDC25, est probable. Il a été montré que AtCDC25 est capable d'activer *in vitro* un complexe Cycline/CDK (Landrieu et al., 2004) et que l'expression du gène *AtCDC25* chez la levure permet d'accélérer la mitose (Sorrell et al., 2005). Toutefois, bien qu'un homologue de CDC25, capable de phosphoryler *in vitro* des CDKs, ait été identifié, les plantes,

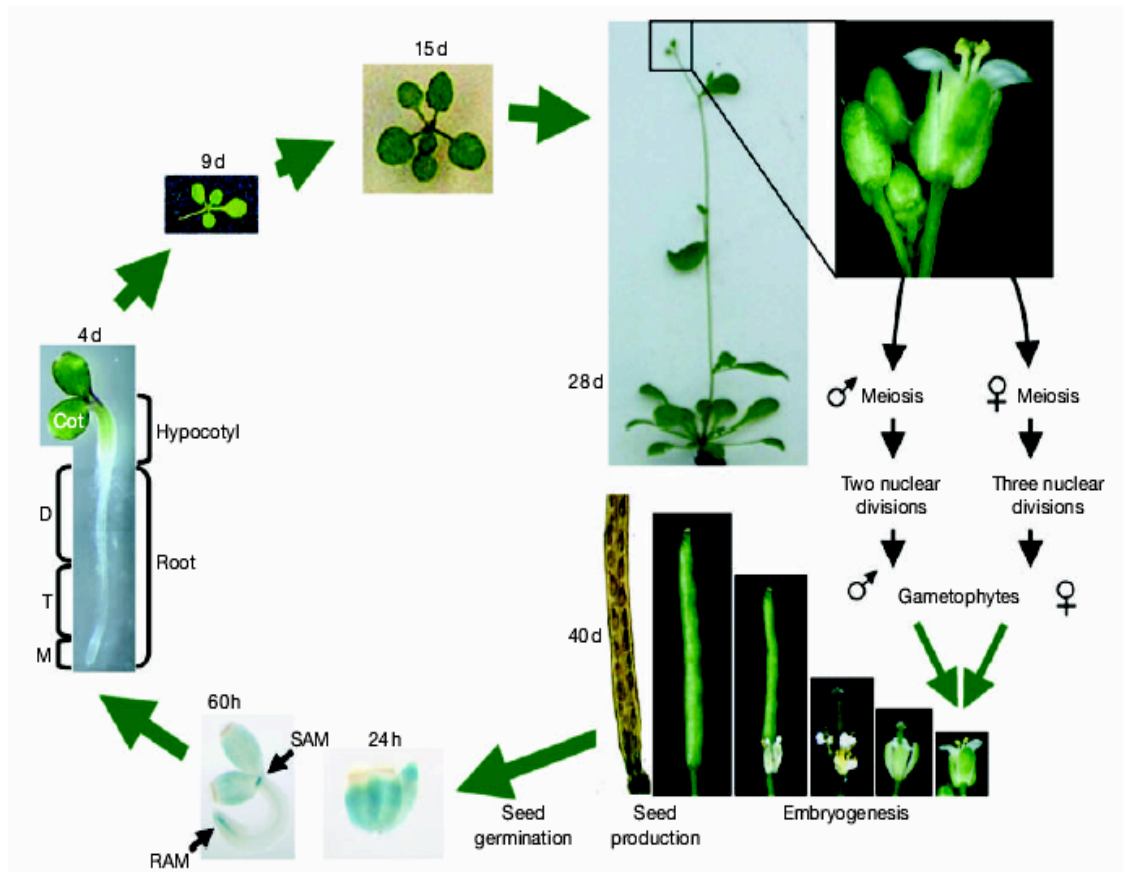


Figure 4: Le cycle de la vie d'*Arabidopsis thaliana*

Après germination, la plantule se développe rapidement et les méristèmes racinaire et apical sont en place (60 heures après germination). Quatre jours après germination (4d), la racine contient déjà trois régions: le méristème (M), la zone d'élongation cellulaire (T) et la zone différenciée (D). Dans la partie aérienne, l'hypocotyle et les cotylédons peuvent être distingués. Les jours suivants, la rosette se développe et les fleurs apparaissent 28 jours après germination (28D). Dans la fleur, des cellules spécialisées génèrent les cellules germinales permettant après méiose d'obtenir les gamétophytes mâles et femelles. Après fertilisation, l'embryogenèse se produit puis les graines et les siliques se développent.

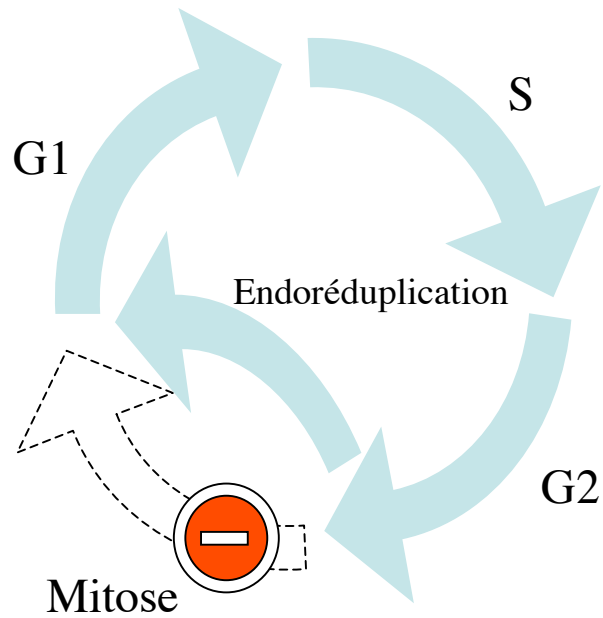
D'après Crisanto Gutierrez, Nature, 2005

surexprimant ou n'exprimant plus cette protéine, ne présentent pas de phénotype au niveau du cycle cellulaire (Boudolf et al., 2006).

5. Importance du cycle cellulaire dans le développement de la plante

Le développement d'une plante est caractérisé par une perpétuelle croissance et formation d'organes ainsi que par l'intégration de signaux environnementaux (Figure 4). Ceci nécessite une relation fine entre le contrôle du cycle cellulaire et de la différenciation. Le développement d'une plante diffère de celui d'un animal par quatre principaux aspects : les méristèmes, la production d'organes au cours de toute sa vie, l'importance de la réponse à l'environnement de part l'immobilité de la plante et les parois pecto-cellulosiques interdisant la migration de cellules.

Le contrôle de la prolifération cellulaire et de la différenciation au cours du développement dépend, dans la plupart des cas, de l'action concertée des hormones. Les auxines et les cytokinines sont les hormones les mieux documentées et peuvent directement intervenir dans la régulation du cycle cellulaire. L'auxine joue des rôles cruciaux en particulier dans la division et l'expansion cellulaire, la dominance apicale, le développement des racines et des tissus vasculaires (Leyser, 2002). De plus, l'auxine est suffisante pour induire l'expression de CDKA;1, par contre son activité kinase, et donc son rôle dans l'entrée en mitose, est stimulée uniquement par addition de cytokinine (Zhang et al., 1996). La cytokinine est impliquée dans des processus essentiels à la croissance comme l'induction de la division cellulaire. Cette hormone régule la progression du cycle cellulaire à la fois aux transitions G1/S et G2/M. L'activation de la cycline D3 par la cytokinine est la principale preuve de son implication dans la régulation de la transition G1/S (Soni et al., 1995). D'autres hormones sont également impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Par exemple, l'acide abscissique est un inhibiteur de la synthèse d'ADN et bloque ainsi le cycle cellulaire à la transition G1/S en augmentant le niveau de KRP1 (Wang et al., 1998) et en régulant négativement l'expression de gènes impliqués dans la réplication de l'ADN (Castellano Mdel et al., 2004). Les brassinostéroïdes, les gibbérelines, l'éthylène ou l'acide jasmonique, jouent des rôles spécifiques dans l'expansion cellulaire, le développement des organes reproducteurs, la réponse à une blessure ou la sénescence. Les hormones jouent donc des rôles essentiels dans le développement de la plante en induisant ou en réprimant l'expression de gènes



Noyau à 2C

Noyau à 4C

Noyau à 8C

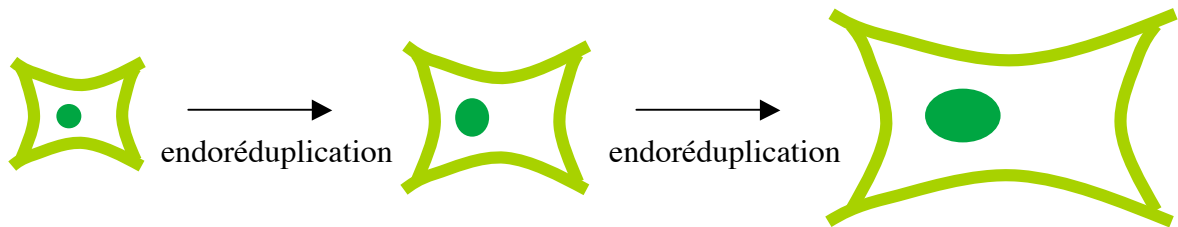


Figure 5: L'endocycle

Ce phénomène est caractérisé par une augmentation de la ploïdie nucléaire résultant de la répétition de la phase S sans passage par une étape de mitose.

impliqués dans la régulation de la division cellulaire (Cyclines, CDKs, CKIs, E2Fs). L'expression spatiale et temporelle de ces gènes permet le couplage de la prolifération cellulaire avec le développement et le « modelage » de la plante. En effet, il existe de nombreux exemples de conséquences phénotypiques résultant de l'altération de l'expression de régulateurs du cycle cellulaire. Par exemple, la surexpression des facteurs AtE2Fa et AtDPa chez *Arabidopsis thaliana*, induit division cellulaire et endoréduplication dans des organes comme les feuilles et les hypocotyles (De Veylder et al., 2002).

6. L'endocycle

Les cellules de plantes différenciées présentent un cycle alternatif particulier appelé endoréduplication (Figure 5). Ce phénomène est caractérisé par une augmentation du niveau de la ploïdie nucléaire résultant de la répétition de la phase S sans l'intervention de la mitose. L'endoréduplication se produit lorsqu'une cellule a cessé ses cycles mitotiques. Une fois que de l'endoréduplication a eu lieu dans une cellule, elle ne peut plus réintégrer un cycle cellulaire mitotique. L'endoréduplication est caractéristique d'une phase de différenciation se situant entre les phases mitotiques et l'arrêt de toute activité cyclante de la cellule. Chez *Arabidopsis thaliana*, certains types de cellules foliaires peuvent atteindre une ploïdie de 32C, c'est-à-dire 32 copies de son génome, mais peuvent être surpassés largement par des cellules de l'endosperme d'*Arum maculatum* qui peuvent atteindre une ploïdie de 24576C. Toutefois, ce phénomène est seulement caractéristique de quelques de types de cellules spécialisées comme les trichomes ou l'endosperme. L'endoréduplication devrait donc permettre d'amplifier la capacité métabolique de la cellule.

Par ailleurs, l'endoréduplication se produit également dans des conditions particulières dans des cellules humaines comme les mégacaryocytes (lignée sanguine à l'origine des plaquettes) ou encore dans les fibroblastes au cours de la cicatrisation.

III. La famille des facteurs E2F et leur rôle

1. Généralités

À ce jour, de nombreux travaux ont montré le rôle essentiel du facteur de transcription E2F dans le contrôle de l'expression de gènes importants tant pour la réplication de l'ADN que pour la progression du cycle cellulaire à la transition G1/S. Ce mode de régulation associée au facteur E2F, est conservé entre les animaux et les plantes, mais par contre il n'est pas présent chez la levure.

Le facteur de transcription E2F a été initialement identifié comme étant une protéine active pouvant se lier au promoteur du gène E2 de l'adénovirus (Kovesdi et al., 1986). L'activation du gène E2 par E2F nécessite les produits des gènes E1A et E4 de l'adénovirus. Par la suite, il a été montré que le facteur E2F était associé à d'autres protéines cellulaires dans des cellules non infectées et que la protéine E1A était capable de dissocier ce complexe (Bagchi et al., 1990). Il semble que cette capacité de E1A à dissocier le complexe E2F dépende du domaine de liaison à la protéine Rb de la protéine virale E1A. Cette découverte a conduit à la conclusion que E2F interagissait avec Rb dans des cellules non infectées (Bagchi et al., 1991) (Bandara and La Thangue, 1991). L'interaction entre la protéine Rb et le facteur de transcription E2F conduit aussi à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de E2F et est directement liée à la capacité de la protéine Rb à arrêter le cycle cellulaire en phase G1 (Hiebert, 1993) (Qin et al., 1992).

Le facteur de transcription E2F est actif sous la forme d'un hétérodimère avec les membres de la famille « Dimerization Partner » (DP). Les premières études ont montré l'implication de l'hétérodimère E2F/DP dans l'activation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire. Cependant, ces dernières années de nombreuses publications ont montré que ce rôle d'E2F n'était qu'une facette de son activité. En effet, il est dorénavant évident qu'en plus de ses rôles de transactivateur ou de répresseur de la transcription au cours du cycle cellulaire, le facteur E2F a des fonctions importantes dans des processus anti-

Fonctions

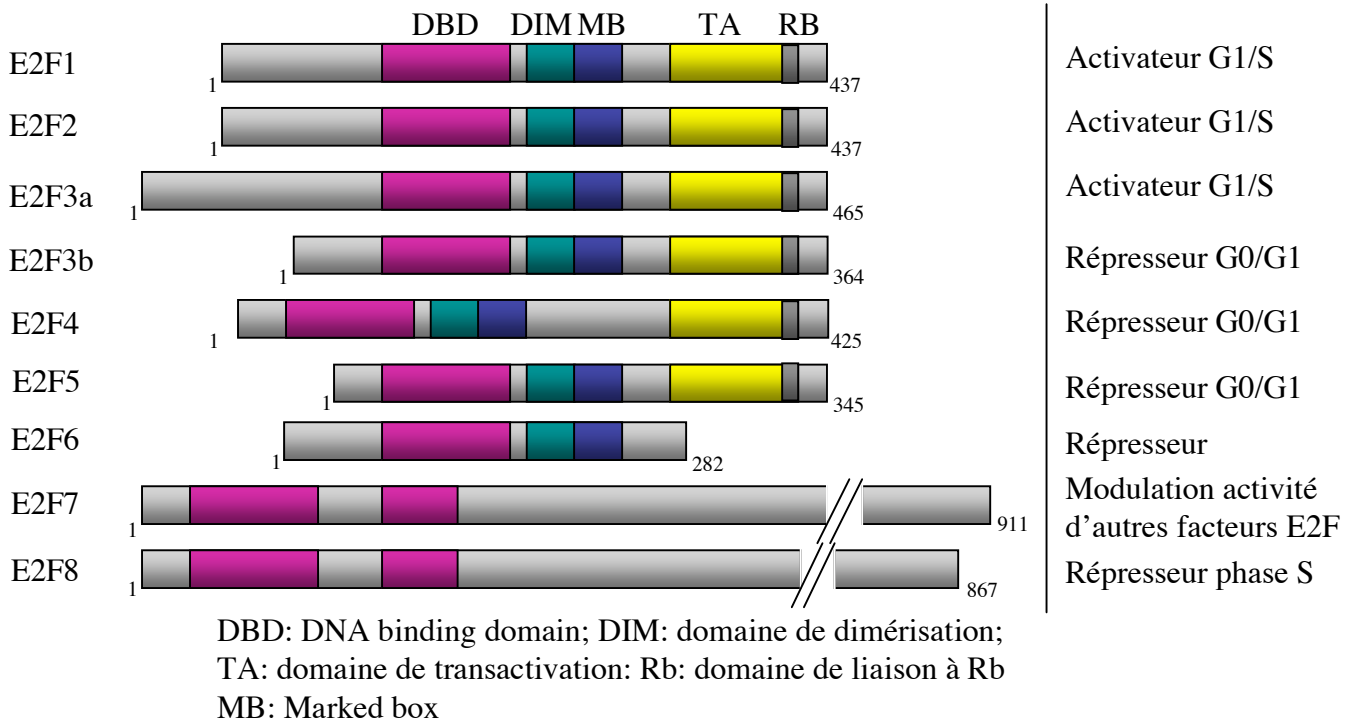


Figure 6: Organisation structurale des facteurs E2F chez les mammifères.

Les protéines E2F ont des domaines de liaison à l'ADN et de dimérisation très conservés. Les séquences nécessaires à l'activation transcriptionnelle et à la fixation des protéines de la famille Rb sont uniquement présentes chez E2F1, 2, 3, 4 et 5. E2F6 diverge considérablement des autres E2Fs, n'ayant que très peu d'homologie en dehors des domaines de dimérisation et de fixation à l'ADN. Les facteurs E2F7 et 8 portent deux domaines de liaison à l'ADN imitant le domaine de liaison à l'ADN formé par l'hétérodimère E2F/DP. Le nombre de résidus composant chaque facteur est indiqué.

prolifératifs comme la sénescence et l'apoptose ou encore dans la réponse à un dommage à l'ADN (Dimova and Dyson, 2005).

2. Structure protéique et modulation de l'activité

2.1. Chez les mammifères

Le premier facteur E2F à avoir été identifié est le facteur E2F1 (Kosugi and Ohashi, 2002c, 2003) (Figure 6). Depuis, d'autres facteurs ont été découverts et la famille comprend actuellement six membres structurellement proches (E2F1-6) et deux membres de structure particulière (E2F7 et 8). Les facteurs E2F peuvent être subdivisés en quatre sous-groupes suivant leurs fonctions principales.

Les facteurs E2F1-3 sont des facteurs dits activateurs. Ils sont nécessaires à la transactivation de gènes cibles à la transition G1/S, et par conséquent à la progression du cycle cellulaire. En effet, la perte de ces facteurs E2Fs activateurs conduit à l'arrêt du cycle cellulaire (Wu et al., 2001). De plus, la surexpression des facteurs E2F1, 2 ou 3 dans des fibroblastes quiescents est suffisante pour les faire entrer en phase S du cycle cellulaire (Johnson et al., 1993) (Lukas et al., 1996).

Pour le facteur E2F3, les choses sont un peu plus complexes. Le locus d'E2F3 code, par épissage alternatif, pour deux protéines différentes, les facteurs E2F3a et E2F3b, qui diffèrent dans leurs fonctions et leurs expressions. Le facteur E2F3a est un activateur transcriptionnel principalement exprimé au cours de la phase S, alors que le facteur E2F3b a plutôt un rôle de répresseur transcriptionnel présentant une expression constitutive au cours du cycle (Leone et al., 2000) (Adams et al., 2000).

Les facteurs E2F4 et 5 présentent une activité inhibitrice. Ces facteurs sont localisés dans le cytoplasme sauf au cours des phases G0/G1 où ils sont localisés transitoirement dans le noyau. Ces protéines peuvent également interagir avec les membres de la famille des protéines Rb (Muller et al., 1997) (Verona et al., 1997). Conformément à ces résultats, la surexpression de ces facteurs E2Fs ne permet pas de diriger des fibroblastes quiescents en phase S du cycle (Lukas et al., 1996). Ainsi, les rôles majeurs des facteurs E2F4 et 5 semblent être liés à la différenciation de la cellule (Lindeman et al., 1998) (Gaubatz et al., 2000) (Humbert et al., 2000) (Rempel et al., 2000).

Les facteurs E2F1 à 5 présentent la même structure en domaines, c'est-à-dire un domaine de liaison à l'ADN (DBD), un domaine de dimérisation avec leur partenaire DP (Dimerization Partner), la marked box permettant aux facteurs E2F d'interagir avec d'autres protéines, un domaine de transactivation et un domaine de liaison avec les protéines de la famille Rb (Figure 5).

Le facteur E2F6 forme un sous-groupe à lui seul. Ce facteur présente une structure particulière. En effet, E2F6 ne comporte pas de domaine de transactivation ce qui lui confère un rôle de répresseur transcriptionnel (Trimarchi et al., 1998). Le rôle de E2F6 reste flou, mais il semblerait que E2F6 jouerait un rôle dans la quiescence.

Le dernier sous-groupe est constitué des facteurs E2F7 et 8 récemment identifiés. Contrairement aux facteurs E2F1 à 6, les facteurs E2F7 et 8 ne se lient pas à l'ADN sous forme d'hétérodimère avec DP. Ces facteurs E2F présentent une structure particulière. En effet, ils ont un domaine de liaison à l'ADN dupliqué, ayant des similarités avec celui trouvé chez les autres facteurs E2Fs, mais ils n'ont pas de domaine de liaison avec les protéines de la famille Rb. Ce double domaine de liaison à l'ADN permet de mimer le domaine de liaison à l'ADN formé par l'hétérodimère E2F/DP. Les rôles des facteurs E2F7 et 8 ne sont pas encore très clairs, mais il semblerait qu'E2F7 pourrait moduler l'activité transcriptionnelle d'autres facteurs E2Fs (Logan et al., 2004). Le facteur E2F8 est exprimé 5 à 20 fois plus faiblement qu'E2F7 et permettrait de réprimer la transcription de gènes cibles de facteurs E2F comme les gènes *E2F1* et *CDC6*, au cours de la phase S. Cette répression serait nécessaire à une régulation équilibrée et temporaire de gènes nécessaires à la traversée de la phase S (Di Stefano et al., 2003) (Christensen et al., 2005).

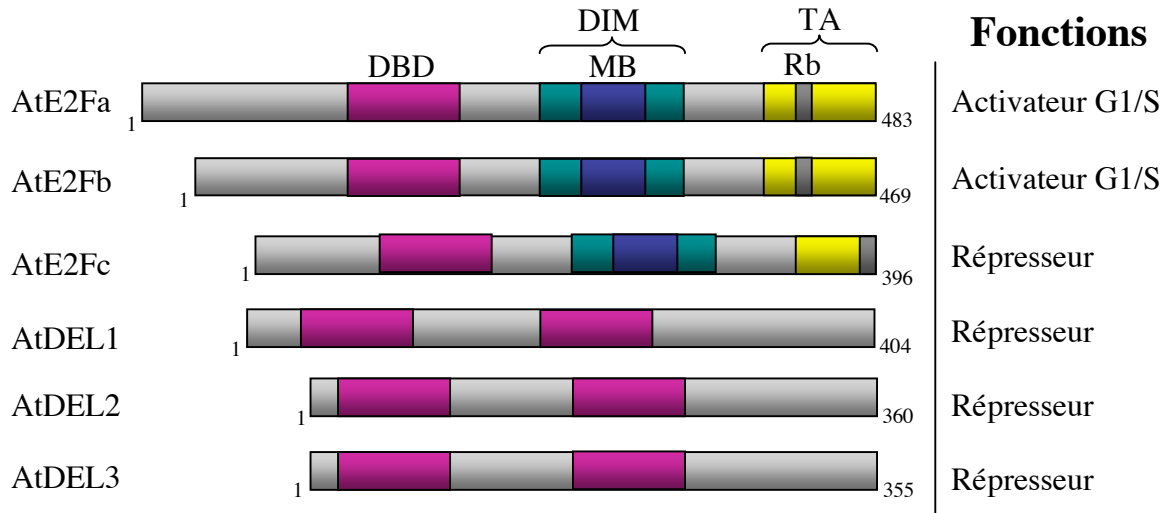
L'activité transcriptionnelle de E2F est modulée par des mécanismes d'interactions protéiques. Nous avons vu précédemment qu'une interaction physique avec une protéine de la famille Rb inhibe l'activité transcriptionnelle de E2F. Ce modèle de régulation a été conservé au cours de l'évolution. Cette interaction affecte l'activité transcriptionnelle de E2F de deux manières : soit par blocage de la transactivation induite par E2F, soit par répression de la transcription par recrutement sur le complexe pRb/E2F/DP de complexes de remodelage de la chromatine (Frolov and Dyson, 2004).

Chez les mammifères, trois gènes codant pour des protéines de la famille Rb ont été identifiés à ce jour. Il s'agit des protéines pRb, p107 et p130. Les facteurs E2F1, 2 et 3 interagissent uniquement avec la protéine pRb, le facteur E2F4 avec p107 et p130, le facteur

E2F5 avec p130 alors que les facteurs E2F6, 7 et 8 n'interagissent avec aucune des protéines de la famille Rb, puisqu'ils n'ont pas de domaine de liaison à pRb (Dimova and Dyson, 2005). La formation du complexe pRb/E2F est régulée au cours du cycle cellulaire par des modifications post-traductionnelles. Au cours du cycle cellulaire, certains complexes cyclines/CDKs, exprimés en phase G1, vont activer leurs kinases et phosphoryler les protéines de la famille Rb. Une fois phosphorylées, les protéines de la famille Rb perdent leur affinité pour les facteurs E2F, libérant le complexe E2F/DP et permettant ainsi la transcription de gènes cibles de E2F. L'activité transcriptionnelle de E2F est donc modulée de manière temporelle au cours du cycle cellulaire. Afin de sortir de la phase S, les cellules ont besoin d'inactiver E2F. Cette étape d'inactivation implique trois processus. Le premier correspond à la phosphorylation de DP et de E2F1-3, inhibant ainsi la fixation à l'ADN de ce complexe. Le deuxième est provoqué par la dégradation de E2F par ubiquitination. Enfin, le troisième mécanisme potentiel serait la fixation des E2F6-8 aux promoteurs cibles de E2F réprimant ainsi leur transcription (Trimarchi et al., 1998).

La modulation de l'activité transcriptionnelle des facteurs E2Fs activateurs (E2F1-3a) n'est pas seulement contrôlée par l'interaction physique entre un facteur E2F et un membre de la famille des protéines Rb mais également par son interaction avec d'autres facteurs de transcription via un domaine protéique de E2F appelé « Marked Box ». L'interaction de E2F avec un autre facteur de transcription déterminerait donc la spécificité de fonction du facteur E2F. Par exemple, l'interaction entre les facteurs E2F3a avec la protéine RYBP (**R**ing1-and **Y**Y1-**b**inding **p**rotein) permet l'interaction avec le facteur de transcription YY1 et, la stabilisation de cette interaction entre les deux facteurs de transcription, E2F et YY1, avec leur séquence cible sur l'ADN, et active la transcription du gène *cdc6* (Schlisio et al., 2002). L'activité du promoteur du gène *cdc6* est donc dépendante de la « marked box » du facteur E2F3a. Le domaine « marked box » est également essentiel à la fonction apoptotique du facteur E2F1. En effet, l'interaction de E2F1 avec le facteur Jab1, via la « marked box », est essentielle pour activer la transcription de gènes cibles de l'apoptose (Hallstrom and Nevins, 2006).

A.



B.



DBD: DNA binding domain; DIM: domaine de dimérisation; TA: domaine de transactivation; Rb: domaine de liaison à Rb; MB: marked box.

Figure 7: Organisation structurale des facteurs E2F chez les plantes.

A. Les facteurs E2F d'Arabidopsis thaliana

Les facteurs *AtE2Fa*, *b* et *c* présentent une organisation de domaines similaires aux facteurs E2F1 à 5 de mammifères, c'est-à-dire un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation avec DP incluant la « Marked Box » et un domaine de transactivation incluant un domaine de liaison à Rb. Par contre, *E2Fc* présente un domaine de transactivation tronqué lui conférant un rôle de répresseur. Les facteurs *AtDEL1*, 2 et 3 ont, quant à eux, une structure similaire aux facteurs E2F7 et 8 de mammifères.

B. Le facteur NtE2F

Jusqu'à présent seul un facteur E2F a été identifié chez *Nicotiana tabacum*, appelé NtE2F. Ce facteur présente de forte similarité avec les facteurs *AtE2Fa* et *AtE2Fb* ainsi qu'une organisation en domaines similaire aux facteurs E2F activateurs.

Le nombre de résidus composant de chaque facteur est indiqué.

2.2. Chez les plantes

a) Les facteurs E2F

Des gènes codant pour des facteurs E2F ont également été identifiés chez plusieurs espèces de plantes comme le blé, la carotte, le riz, le tabac et *Arabidopsis thaliana*. Dans le génome *Arabidopsis thaliana*, six gènes codant pour des facteurs E2F ont été identifiés, ainsi que deux gènes codant pour le partenaire de E2F, DP. L'analyse du génome d'*Arabidopsis thaliana* a montré qu'il n'y aurait probablement pas de gènes additionnels codant pour des facteurs E2F ou DP (Vandepoele et al., 2002). De plus, deux gènes codant pour des facteurs E2F ont été identifiés chez le riz, et un chez le blé, la carotte et le tabac (Ramirez-Parra et al., 1999) (Sekine et al., 1999) (Albani et al., 2000) (Magyar et al., 2000) (Ramirez-Parra and Gutierrez, 2000) (de Jager et al., 2001) (Kosugi and Ohashi, 2002a) (Kosugi and Ohashi, 2002c) (Mariconti et al., 2002). Les facteurs E2Fs identifiés chez *Arabidopsis thaliana* peuvent être divisés en deux groupes suivant leur structure et leur fonction : le premier groupe composé des facteurs E2Fa-c et le second groupe composé des facteurs DEL1-3 (Figure 7).

Les facteurs *AtE2Fa-c* présentent une organisation similaire à celle des facteurs E2F1-5 des mammifères (Figure 7), toutefois le domaine de transactivation du facteur *AtE2Fc* est tronqué et aucune étude n'a montré jusqu'à présent l'importance de la « Marked box » dans la spécificité de fonction des facteurs de transcription E2Fs de plantes. Les facteurs E2Fa et b jouent un rôle d'activateur transcriptionnel alors que le facteur E2Fc a un rôle de répresseur. Ces trois facteurs peuvent interagir avec l'homologue de la protéine Rb, appelée pRBR (pour « Rb related ») (de Jager and Murray, 1999) (de Jager et al., 2001) (del Pozo et al., 2002). Tout comme chez les animaux, l'activité transcriptionnelle des facteurs E2Fs est réprimée par leur association avec la protéine pRBR. En effet, le domaine de liaison de E2F avec pRBR se situe dans son domaine de transactivation. Cette interaction masque alors le domaine de transactivation de E2F, inhibant ainsi l'activité transcriptionnelle de E2F (Huntley et al., 1998). Il a également été montré que pRBR peut être phosphorylée par des CDKs libérant ainsi le complexe E2F/DP (Nakagami et al., 2002) (Espinosa-Ruiz et al., 2004).

Les premiers gènes à avoir été montrés comme étant régulés par un facteur E2F sont les gènes codant pour la ribonucléotide réductase (RNR) chez le tabac (Chaboute et al., 2000). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que la surexpression, dans des protoplastes, du

gène codant pour *AtE2Fa* induisait la progression de cellules quiescentes (en phase G0) en phase G1 (Rossignol et al., 2002). De plus, la surexpression du gène *AtE2Fa* dans des plants d'*Arabidopsis thaliana* induit une division cellulaire ectopique tandis que la surexpression simultanée de *AtE2Fa* et de *AtDPa* peut, en fonction du contexte cellulaire ou du stade de développement, induire soit de l'endoréduplication, soit de la prolifération cellulaire (De Veylder et al., 2002). De plus, la surexpression combinée de *AtE2Fa* et *AtDPa* régule positivement l'expression de gènes spécifiques de la phase S, tel que le gène codant pour l'ADN polymérase α (*AtDNApol α*), le gène *ATCDC6* (cell division cycle 6), le gène *AtORC1* (origin recognition complex 1) et le gène *AtMCM3* (minichromosome maintenance 3) (Vandepoele et al., 2005). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les gènes *AtE2Fa* et *AtDPa* ont été surexprimés dans des plants de tabac (Kosugi and Ohashi, 2003). La surexpression des gènes *AtE2Fa* et *AtDPa*, chez *Arabidopsis thaliana*, induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans divers processus autres que la transition G1/S, comme la structure de la chromatine (*HMGB7*) ou encore la réparation de l'ADN (*MSH6-1*, *RAD1-like*, *RAD17*) (Vandepoele et al., 2005). Conformément à son rôle essentiel dans l'activation de gènes spécifiques de la phase S, le gène *AtE2Fa* est fortement exprimé dans le méristème apical et le primordium foliaire (De Veylder et al., 2002). Il est également exprimé dans l'épiderme et le cortex de l'hypocotyle, tissu présentant un niveau élevé d'endoréduplication (De Veylder et al., 2002). Ce gène *AtE2Fa* est donc fortement exprimé dans les tissus où la phase S est essentielle tels que les tissus en divisions actives ou les tissus présentant de l'endoréduplication. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus par RT-PCR démontrant une expression maximale du gène *AtE2Fa* en fin de phase G1 et au début de la phase S (Mariconti et al., 2002).

Contrairement au facteur E2Fa, le facteur E2Fc est plutôt un répresseur transcriptionnel (Kosugi and Ohashi, 2002b). L'expression du gène *AtE2Fc* est régulée au cours du cycle cellulaire et est localisée dans les zones méristématiques ainsi que dans des tissus nouvellement différenciés au cours du développement. De plus, la surexpression du gène *AtE2Fc* régule négativement l'expression du gène *AtCDC6* et affecte le cycle cellulaire ainsi que la taille des cellules. Le facteur AtE2Fc est régulé par son interaction avec pRBR et également par une phosphorylation effectuée par AtCDKA;1. Il est également régulé par le protéasome via la voie de l'ubiquitine. AtE2Fc aurait donc un rôle de répresseur au niveau de la prolifération cellulaire. (del Pozo et al., 2002).

Le facteur AtE2Fb n'a pas été aussi étudié que les facteurs AtE2Fa et AtE2Fc. Des données structurales ainsi que des résultats d'expression transitoire suggèrent qu'AtE2Fb jouerait un rôle d'activateur fort de la transcription (Mariconti et al., 2002). Une étude récente a montré que l'abondance et la stabilité des facteurs AtE2Fb étaient augmentées suite à un traitement à l'auxine, et que seule la surexpression du facteur AtE2Fb avec AtDPa était suffisante pour permettre aux cellules de proliférer dans un milieu privé d'auxine. Par contre, contrairement à AtE2Fa, AtE2Fb réprimerait l'endoréduplication ainsi que l'augmentation de la taille de la cellule dans un milieu sans auxine (Magyar et al., 2005). Une autre étude récente a montré que le facteur AtE2Fb était un activateur de gènes marqueurs de la transition G1/S et de la transition G2/M, suggérant, comme chez les mammifères, que les facteurs E2Fs chez les plantes jouent des rôles similaires mais distincts au cours du cycle cellulaire et du développement (Sozzani et al., 2006).

Chez le tabac, un seul facteur E2F a été identifié jusqu'à présent. Ce facteur E2F de tabac (NtE2F) (Figure 7) partage de fortes similarités avec les facteurs AtE2Fa (60%) et AtE2Fb (63%) ainsi qu'avec le facteur E2F3 humain (41%) (Sekine et al., 1999). Le facteur NtE2F présente une organisation en domaines similaire aux autres facteurs E2F activateurs, c'est-à-dire un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de dimérisation incluant la « marked box » et un domaine de transactivation incluant un domaine de liaison à une protéine de la famille Rb (Figure 7). Ce facteur E2F présente une expression maximale en fin de phase G1 et au début de la phase S. Des expériences de double hybride ont également montré que le facteur NtE2F était capable d'interagir avec une protéine Rb. Enfin, des expériences de transactivation ont montré que le facteur NtE2F était capable de transactiver l'expression d'un gène rapporteur (Sekine et al., 1999).

b) Les facteurs DEL

Arabidopsis thaliana exprime un second groupe de facteurs E2Fs appelé DEL, pour « DP-E2F-like », composé de trois facteurs, AtDEL1, AtDEL2 et AtDEL3 (E2Fe, E2Fd, E2f, ou E2L3, E2L1, E2L2, respectivement) (Figure 7). Ces facteurs présentent une structure protéique similaire à celle retrouvée chez les facteurs E2F7 et E2F8 des mammifères, c'est-à-dire uniquement deux domaines de liaison à l'ADN fortement similaires à ceux retrouvés chez les autres facteurs E2Fs et pas de domaine de transactivation. Tout comme pour les mammifères, ces deux domaines permettent aux facteurs DELs de se lier à l'ADN sous forme

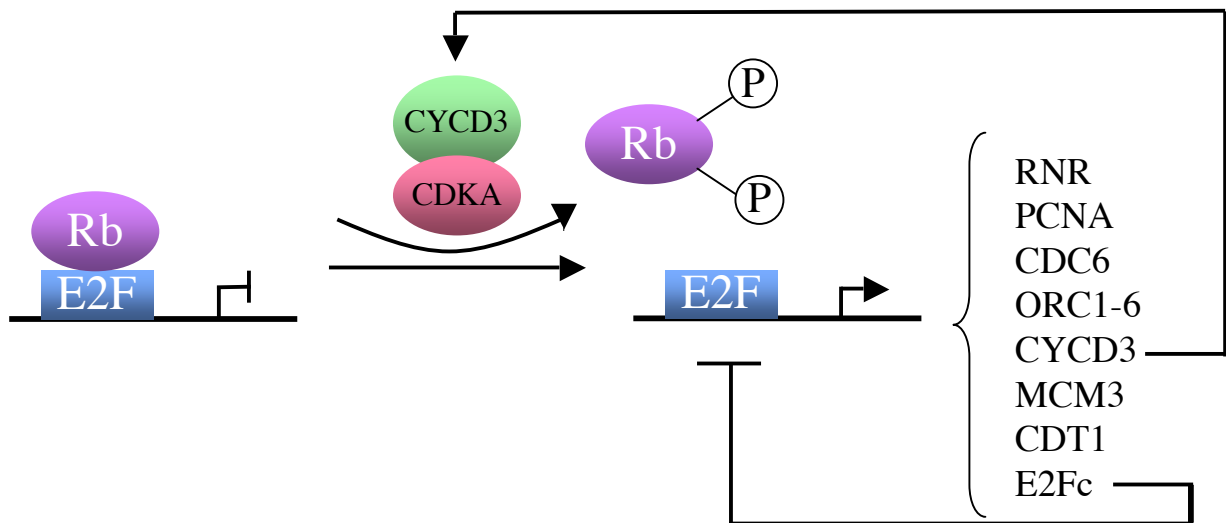


Figure 8: Modèle pour le contrôle de la transition G1/S chez les plantes

À la fin de la phase G1, la protéine Rb est phosphorylée par le complexe CYCD3/CDKA. La forme phosphorylée de Rb perd alors son affinité pour le facteur de transition E2F qui est alors capable de transactiver, avec son partenaire DP l'expression de gène cible. L'expression de gènes régulés par le facteur de transcription E2F, tels que les gènes *RNR*, *CDC6*, *CYCD3;1* et *E2Fc*, est induite. Le contrôle de la transition G1/S implique un rétrocontrôle positif et négatif parce que le promoteur des gènes *CYCD3;1* et *E2Fc* sont des cibles des facteurs E2Fs. *E2Fc* ne présente pas d'activité de transactivation ce qui lui confère un rôle d'inhibiteur compétitif de l'activité transcriptionnelle de E2F.

de monomère, en imitant la structure formée par l'hétérodimère E2F/DP. Il a été montré que les facteurs DELs peuvent se lier à la même séquence nucléotidique cible que les autres facteurs E2Fs et peuvent donc entrer en compétition avec eux. La surexpression de ces facteurs inhibe l'activité transcriptionnelle des complexes E2F/DP. Le second domaine de liaison à l'ADN du facteur DEL3 est tronqué conduisant à une capacité de liaison à l'ADN amoindrie. Les facteurs DEL1 et 2 ont une localisation nucléaire grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) situé en C terminal de la protéine. Le facteur DEL3 est localisé dans le noyau et dans le cytoplasme, mais ne présente pas de NLS impliquant donc un mode de translocation dans le noyau différent. Ce facteur est plus abondant dans les tissus méristématiques que dans les tissus différenciés. Il pourrait donc contre-balancer l'activité transcriptionnelle des complexes E2F/DP et donc moduler la prolifération cellulaire (Kosugi and Ohashi, 2002c) (Mariconti et al., 2002).

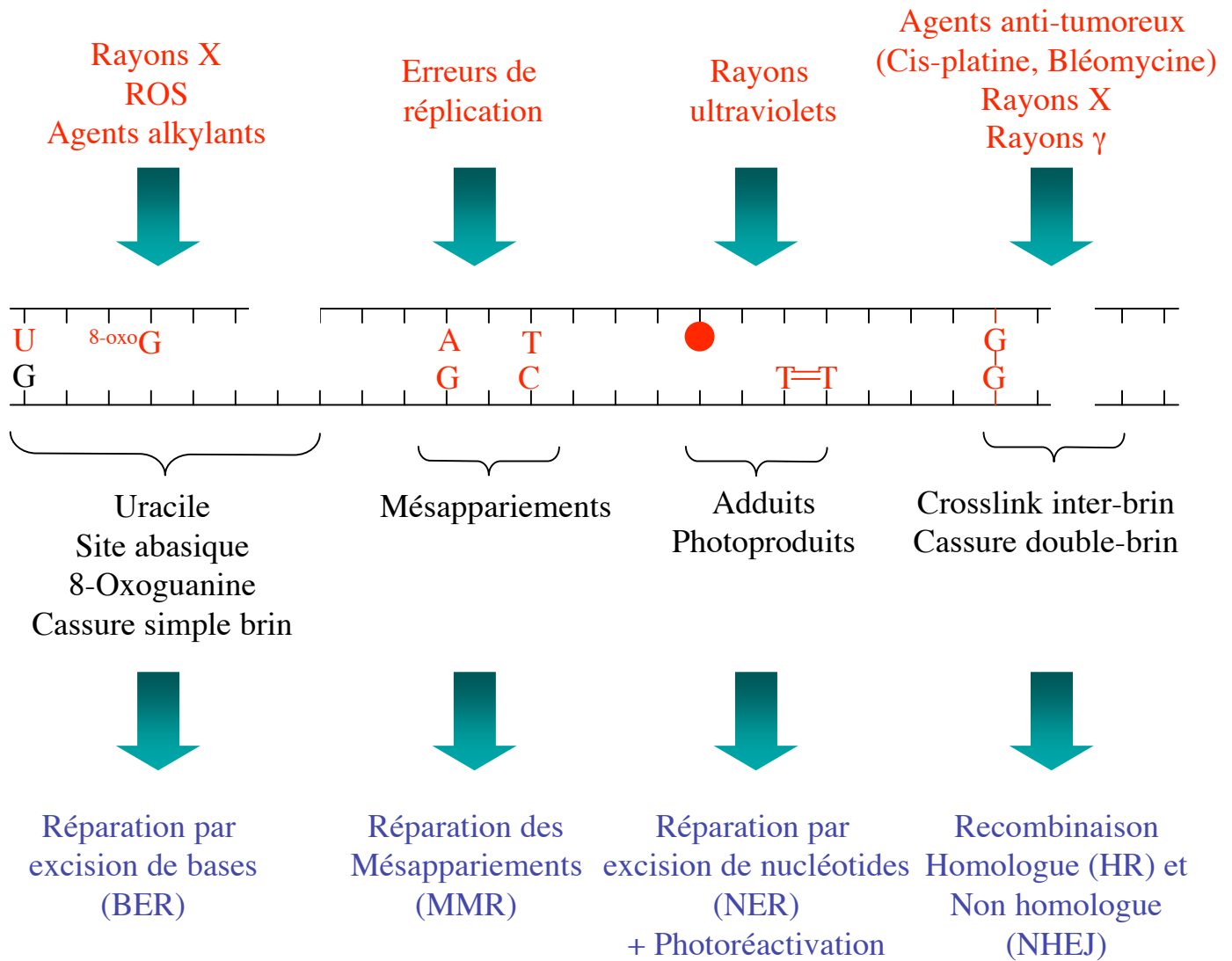
3. La transition G1/S : régulation de l'entrée en phase S

Le mécanisme qui régule la transition G1/S semble être conservé entre les mammifères et les plantes. Chez les mammifères, l'entrée en phase S du cycle cellulaire est initiée par la synthèse de cyclines de type D suite à une stimulation par des facteurs de croissance. Après complexation avec des kinases CDKs, les cyclines de type D initient la phosphorylation de la protéine Rb (Weinberg, 1995). La protéine Rb non-phosphorylée inhibe l'activité de l'hétérodimère de E2F/DP en interagissant avec le domaine de liaison à Rb de E2F et recrute des histones déacétylases rendant l'accès de facteur de transcription à l'ADN plus difficile. Ce domaine de liaison se trouve dans le domaine de transactivation de E2F. L'interaction entre E2F et Rb masque ainsi ce domaine de transactivation entraînant la perte d'activité de l'hétérodimère E2F/DP. Après phosphorylation, la protéine Rb perd son affinité pour E2F qui est alors capable de transactiver l'expression de ses gènes cibles.

Des homologues de la protéine Rb ont initialement été identifiés chez le maïs avant de l'être chez d'autres espèces végétales dont *Arabidopsis thaliana* où une seule protéine Rb a été identifiée (Ach et al., 1997) (Xie et al., 1996) (Grafi et al., 1996). Ces homologues ont été appelés RBR pour « Rb-Related ». La protéine RBR est phosphorylée par des complexes CYCD/CDKA (Boniotto and Gutierrez, 2001) (Nakagami et al., 2002) (Figure 8). La phosphorylation de Rb atteint son maximum à la transition G1/S du cycle cellulaire et reste

élevée jusqu'à la fin de la phase S. Il a été montré que la surexpression, chez *Arabidopsis thaliana*, de la cycline D3;1 (CYD3;1) stimulait le passage des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire, indiquant que CYCD3;1 est limitante pour la transition G1/S (Figure 3) (Menges et al., 2006). Au niveau du phénotype, la surexpression de CYCD3 ;1 induit une hyperprolifération des cellules foliaires, affectant la différenciation cellulaire et le développement de la plante (Nakagami et al., 2002) (Dewitte et al., 2003). De plus l'endoréduplication, qui est un marqueur de la différenciation cellulaire, est fortement inhibée par la surexpression de CYCD3;1. Les plantes surexprimant CYCD3;1 présentent ainsi une forte régulation positive de composants spécifiques de la voie CYCD/Rb/E2F. Par contre, l'expression de composants activateurs (E2Fa et E2Fb) n'est pas, ou faiblement, affectée par cette surexpression, alors que l'expression de régulateurs négatifs, comme les protéines Rb et E2Fc, est augmentée. Chez les plantes, plusieurs gènes ont été montrés comme étant régulés par un facteur E2F comme les gènes *RNR* (Chaboute et al., 2000; Chaboute et al., 2002) *PCNA* (Egelkrou et al., 2002), *MCM3* (Stevens et al., 2002) ou en encore le gène *ORC1* (Diaz-Trivino et al., 2005) (Figure 8). Les protéines Rb et E2Fc pourraient ainsi être impliquées dans un mécanisme de rétrocontrôle négatif régulant l'expression de la cycline D3;1, de part la présence d'une séquence consensus E2F sur le promoteur du gène *AtCycD3;1* (Dewitte et al., 2003). Inversement, les protéines « Kip-related » (KRPs), inhibitrices de l'activité des CDKs, peuvent empêcher la phosphorylation de Rb en inactivant l'activité du complexe CYCD3/CDK. En effet, il a été montré que la surexpression d'une protéine de tabac KRP chez *Arabidopsis thaliana* supprime totalement le phénotype obtenu par la surexpression de CYCD3 (Jasinski et al., 2002).

Sources de dommage à l'ADN



Processus de réparation de l'ADN

Figure 9: Les différents dommages à l'ADN et les processus de réparation

IV. La réparation de l'ADN

Afin qu'une cellule ne transmette pas de mutations lors de la réplication et de la division cellulaire aux deux cellules filles, son ADN ne doit pas être endommagé. Pour cela, la cellule a mis en place différentes stratégies de réparation afin de restaurer l'intégrité de son génome.

1. Les dommages à l'ADN

1.1. Les causes

Une cellule doit lutter chaque jour pour conserver l'intégrité de son matériel génétique. Toute altération de ce matériel constitue un dommage à l'ADN. Les origines des détériorations du matériel génétique sont aussi différentes que nombreuses (Figure 9). Ainsi, elles peuvent provenir aussi bien de sources extérieures à la cellule que de la cellule elle-même. Les sources exogènes sont, entre autres, les rayonnements ultraviolet, les radiations ionisantes et les substances chimiques mutagènes. La production de radicaux libres, lors des différentes étapes du métabolisme cellulaire, et les erreurs introduites dans le génome lors de la réplication de l'ADN sont les deux principales sources endogènes générant des dommages à l'ADN. De plus, la méiose est également un processus susceptible d'occasionner des dommages à l'ADN due à un taux important de remaniements chromosomiques lors de ce processus.

Les plantes sont particulièrement sujettes à l'altération de leur matériel génétique de part leur immobilité. L'ADN de plantes est continuellement endommagé par le rayonnement ultraviolet du soleil. Cependant, les plantes ont généralement une tolérance plus importante aux UV que les animaux grâce à l'absorption de ces rayonnements par des composés cireux présents à la surface de leur feuille, par la paroi pecto-cellulosique ainsi que par des composés chimiques intracellulaire comme les flavonoïdes.

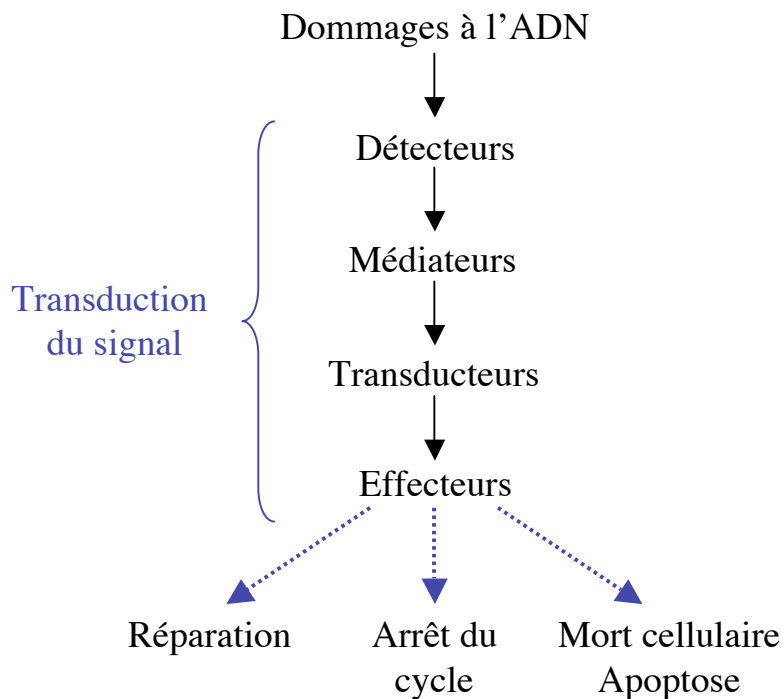


Figure 10: Organisation de la transduction du signal occasionné par un dommage à l'ADN

La lésion à l'ADN est reconnue par des protéines senseurs. Le signal est transmis à des transducteurs (principalement des kinases) qui vont inhiber des kinases effectrices, comme les CDKs, permettant alors d'arrêter la progression du cycle cellulaire au niveau des différents points de contrôle du cycle cellulaire.

(D'après Niida H et Nakanishi M, Mutagenesis 2005)

1.2. Nature et conséquences

Différents types de dommages peuvent survenir suite à l'exposition à l'une des sources décrites précédemment (Figure 9). Ainsi, les UV sont connus pour introduire des dimères de pyrimidines causant des distorsions importantes dans la double hélice d'ADN pouvant conduire à des cassures simple brin de l'ADN. De plus, la resynthèse d'ADN peut engendrer la dépurination spontanée de certaines bases à environ 2 000 à 10000 sites par cellule humaine quotidiennement (Lindahl, 1993). Les mésappariements de bases, les modifications covalentes de nucléotides ou l'apparition de cassures simple brin (SSB) peuvent également générer des dommages à l'ADN. Cependant, la cassure double brin (DSB) présente le plus de risque pour la cellule car elle peut provoquer la perte d'un morceau de chromosome ou une translocation chromosomique.

Ainsi, une cellule subit quotidiennement environ 10 000 lésions qu'elle doit pouvoir réparer afin de survivre. L'instabilité génomique est l'un des événements pouvant conduire à la perturbation de la fonction cellulaire. En effet, l'accumulation de dommages peut avoir de lourdes conséquences. Si ceux-ci surviennent à des endroits critiques dans l'ADN, ils peuvent mener à la formation de tumeurs, à l'apoptose ou à la mort cellulaire pouvant engendrer l'apparition de maladies graves comme le cancer (Khanna and Jackson, 2001), Xeroderma Pigmentosum (XP), Ataxia Telangiectasia (AT) et les syndromes de Bloom et Cockayne (Lehmann, 2003) (Thompson and Schild, 2002). Lorsque les mécanismes de réparations échouent ou commettent des impairs, des mutations apparaissent et peuvent être suffisantes pour modifier l'activité d'une protéine ou la guider vers la dégradation. Par exemple dans le cas de mutation dans un gène codant pour une protéine suppresseur de tumeur, la cellule peut être privée de mécanismes de surveillance contrôlant le cycle cellulaire et la prolifération. Pour contrer ce phénomène, la cellule dispose de plusieurs mécanismes de réparation comme la réparation par excision de base, la réparation des mésappariements, la photoréactivation, la réparation par excision de nucléotide et la réparation des cassures double brin (recombinaison homologue et non homologue).

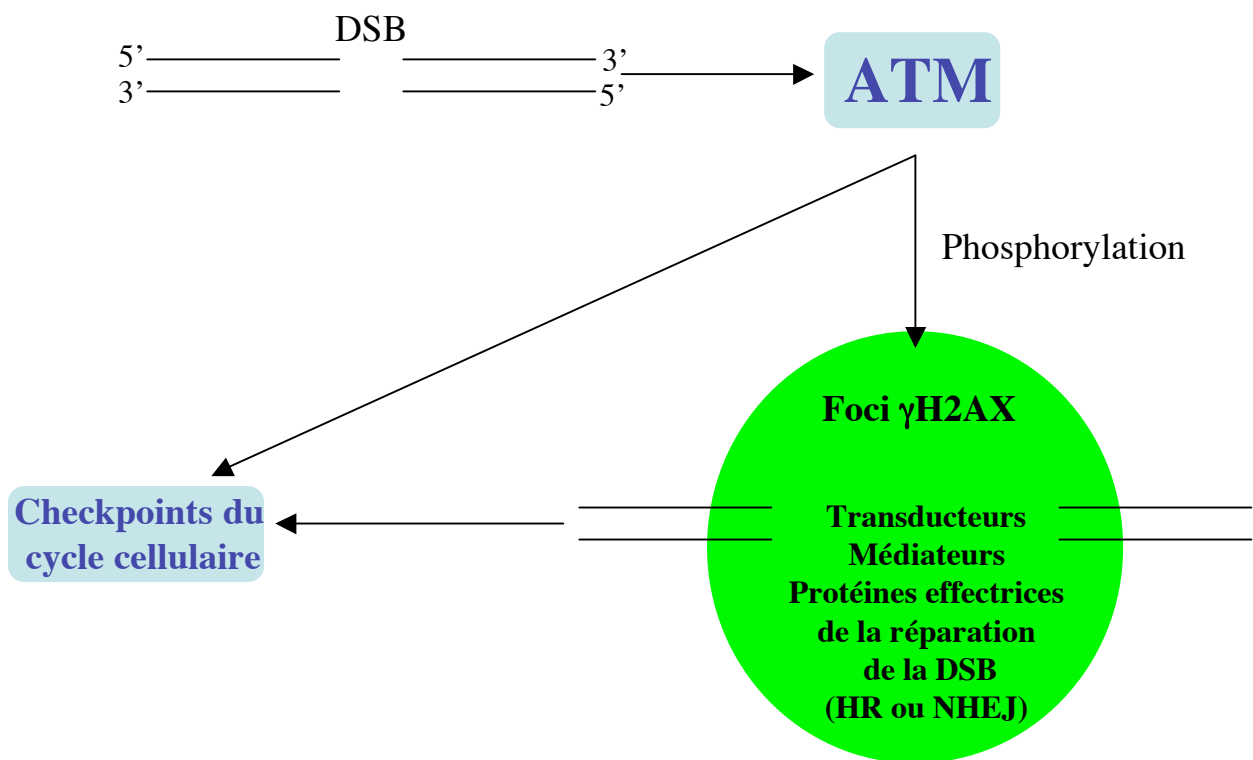


Figure 11: Représentation schématique de la signalisation d'une cassure double brin

À la suite de cassures double brins se forment les foci qui sont des structures protéiques impliquées dans la reconnaissance de la lésion ainsi que dans les réponses aux dommages à l'ADN. Un composé clef de ces foci est la kinase ATM qui va contribuer à la fois à l'activation des mécanismes de réparation et à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire.

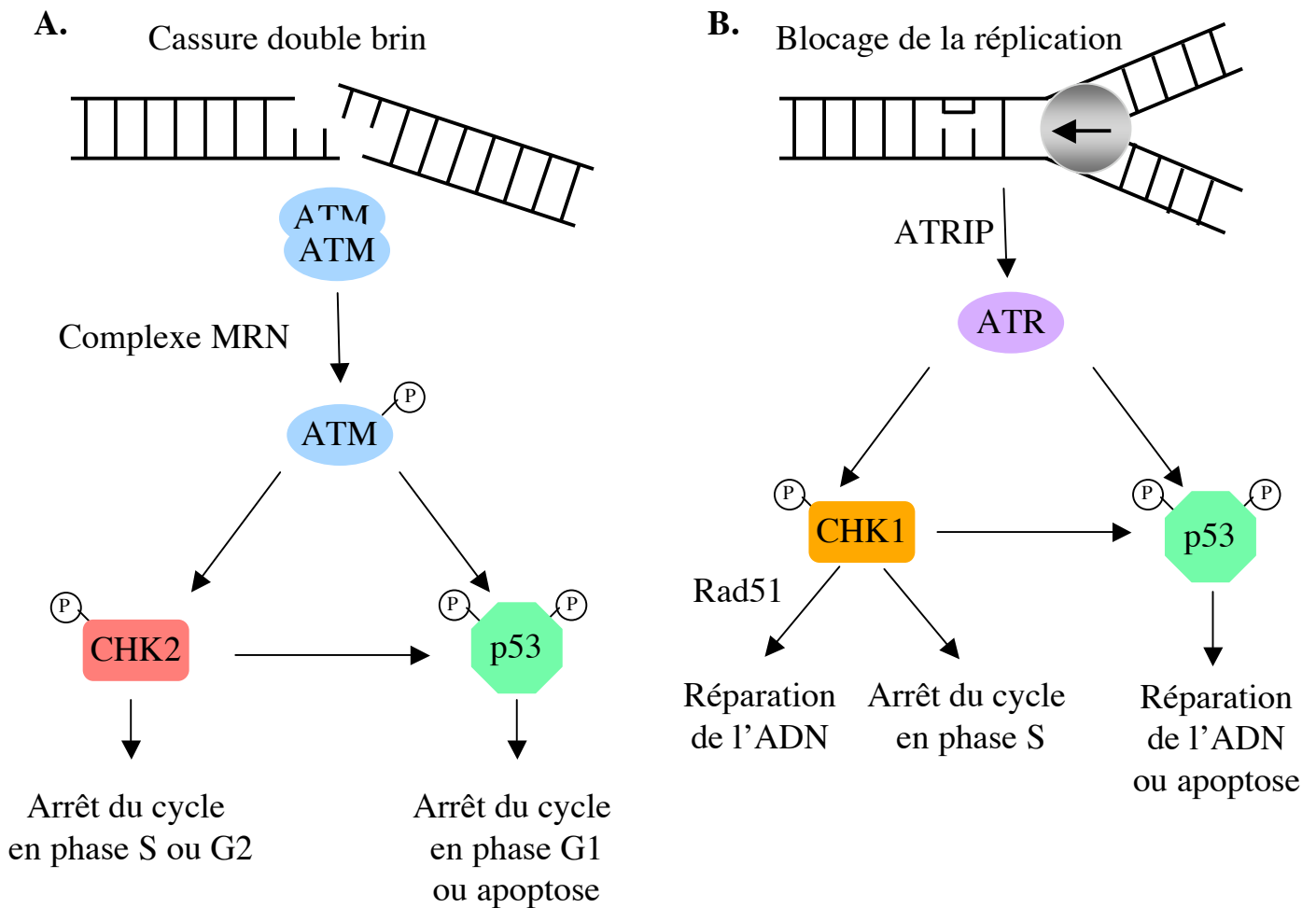


Figure 12: Réponses à une cassure double brin de l'ADN et à un stress réplcatif

A. En réponse à une cassure double brin, la kinase ATM s'autophosphoryle et va alors phosphoryler la kinase CHK2 et le facteur p53 conduisant à l'arrêt du cycle en phase S ou en phase G1 ou vers l'apoptose, respectivement.

B. En réponse à un stress réplcatif, la kinase ATR va phosphoryler la kinase CHK1 ou le facteur p53 conduisant soit à l'arrêt du cycle en phase S ou vers l'apoptose, respectivement, soit à la réparation de la lésion.

D'après Ljungman M Mutat Res 2005.

2. Réponses moléculaires à un stress génotoxique : détection et signalisation d'un dommage à l'ADN

La détection d'un dommage à l'ADN est une condition essentielle pour minimiser les effets délétères des génotoxines sur la prolifération cellulaire. L'altération de la molécule d'ADN modifie la configuration spatiale de la double hélice qui peut être détectée par la cellule. Les mécanismes de détection et de signalisation d'un dommage permettent de préserver l'intégrité du génome en retardant la progression du cycle cellulaire permettant ainsi à la cellule d'activer les voies de réparation et de réparer son génome (Figure 10). En l'absence de ces mécanismes de détection et de signalisation, la réplication de l'ADN et la mitose (ou la méiose) vont propager le dommage à l'ADN aux cellules filles.

2.1. Les principaux acteurs intervenant dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN chez les mammifères

Une des premières étapes de la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN est une modification de la chromatine. L'histone H2AX, une variante de l'histone H2A, est phosphorylée par une kinase appelée ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) (Figure 11). La forme phosphorylée de cette histone est appelée γ -H2AX (Rogakou et al., 1998). La phosphorylation de cette histone entoure la lésion sur plusieurs mégabases permettant le recrutement de facteurs protéiques facilitant la réparation du dommage. La phosphorylation et la déphosphorylation d'un facteur protéique sont des événements extrêmement importants dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN. Par exemple, la phosphorylation de facteurs de transcription, comme le facteur p53, va permettre de le stabiliser et donc de retarder sa dégradation. Son niveau protéique va donc augmenter et permettra alors d'activer la transcription de gènes spécifiques de la réparation.

La kinase ATM est impliquée dans la voie de signalisation d'un cassure double brin (Figure 12). En réponse à une cassure double brin, l'homodimère ATM s'autophosphoryle conduisant à son activation (Bakkenist and Kastan, 2003). Cependant, pour que la kinase ATM soit activée rapidement, un nombre important de facteurs protéiques est nécessaire comme le complexe MRN, composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1. Le complexe MRN permet d'amplifier l'activation de ATM (Lee and Paull, 2004). De plus, la kinase ATM est nécessaire à l'activation des points de contrôle du cycle cellulaire (Kastan and Lim, 2000).

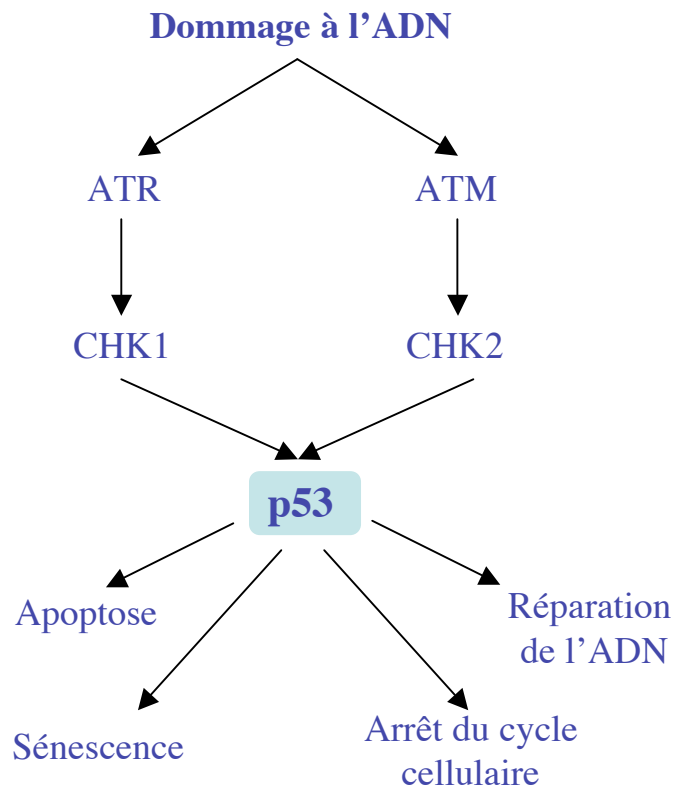


Figure 13: Rôle central du facteur p53 dans la signalisation d'un dommage à l'ADN

Le facteur p53, stabilisé par phosphorylation par les kinases CHK1 et CHK2, active la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose, la sénescence, l'arrêt du cycle cellulaire et dans la réparation de l'ADN.

ATM va phosphoryler le facteur p53 (Banin et al., 1998) induisant l'arrêt du cycle en phase G1 via l'activation transcriptionnelle de la protéine p21, un inhibiteur de CDK (Harper et al., 1993). L'arrêt du cycle cellulaire en phase S et G2 est également activé par la kinase ATM via la kinase Chk2.

La kinase ATR (ATM and Rad3 related) est, quant à elle, impliquée dans la voie de signalisation d'un stress répliatif (Figure 12). Pour être active la kinase ATR doit être sous forme d'hétérodimère avec la protéine ATRIP. Cette hétérodimère va activer le point de contrôle intra-phase S, en réponse à un stress répliatif, en phosphorylant la kinase Chk1 (Cortez et al., 2001) (Unsal-Kacmaz and Sancar, 2004). La forme phosphorylée de la kinase Chk1 va à son tour phosphoryler la phosphatase Cdc25A, la conduisant vers la dégradation et donc vers l'inhibition du déclenchement de la réplication (Jin et al., 2003) (Heffernan et al., 2002). De plus, la kinase ATR peut stimuler la réparation de l'ADN en activant le facteur p53 (Lakin et al., 1999) ou le facteur Rad51 via la kinase Chk1 (Sorensen et al., 2005). Enfin, l'activation de p53 peut également conduire à l'induction de l'apoptose permettant d'éliminer les cellules incapables de résoudre leur problème du blocage de la réplication.

La protéine suppresseur de tumeur p53, qui est également appelée TP53 pour Tumor Protein 53, est une phosphoprotéine nucléaire dont la fonction est altérée dans 50% des cancers humains (Figure 13). Il a été montré que l'irradiation de cellules de souris par les UV induisait une accumulation de la protéine p53 dans le noyau de la cellule (Maltzman and Czyzyk, 1984). Ce phénomène n'est pas limité aux UV, mais à tout type de traitement, physique ou chimique, qui provoque des lésions de l'ADN. Cette accumulation de cette protéine p53 dans le noyau peut avoir deux effets sur les cellules : un blocage transitoire du cycle cellulaire au niveau des phases G1 et G2 permettant la réparation des lésions de l'ADN ou la conduite de la cellule vers l'apoptose (Yonish-Rouach et al., 1991). Son activité transcriptionnelle est régulée par des modifications post-traductionnelles comme la phosphorylation, la sumoylation ou l'acétylation (Appella and Anderson, 2001). Dans des conditions normales, le niveau protéique de p53 est faible. Par contre, en réponse à un stress génotoxique, p53 est stabilisée par phosphorylation lui permettant d'activer l'expression de gènes nécessaires à la réparation de l'ADN comme le gène *p53R2* codant pour une sous-unité R2 de la ribonucléotide réductase (RNR) permettant d'approvisionner la cellule en dNTPs afin de réparer le dommage à l'ADN (Tanaka et al., 2000) ou encore comme le gène codant pour l'inhibiteur de CDK (p21CKI) permettant d'inhiber la transition G1/S (el-Deiry et al., 1993) (Harper et al., 1993) et ainsi d'interrompre le cycle cellulaire.

Function	Classe	Mammifère	Plantes	Références
Détection	RFC1-like	<i>Rad17</i> <i>RFC2-5</i>	<i>AtRad17</i> <i>OsRFC1-5</i>	Heitzeberg F et al Plant J 2004 Furukawa T et al Plant Mol Biol, 2003
	PCNA-like	<i>Rad9</i> <i>Rad1</i> <i>Hus1</i>	<i>AtRad9</i> <i>AtRad1-like</i> <i>AtHus1</i>	Heitzeberg F et al Plant J 2004
	Complexe MRN	<i>Mre11</i> <i>Rad50</i> <i>Nbs1</i>	<i>AtMre11</i> <i>AtRad50</i> ??	Hartung F et al Plant Physiol 1999 Callego ME et al Plant J 2001
Médiateur	Domaine BRCT	<i>BRCA1</i> <i>53BP1</i> <i>TopBP1</i> <i>MDC1</i>	<i>AtBRCA1</i> ?? <i>AtMEI1</i> ??	Lafarge S et al Nucl. Ac. Reser. 2003 Grelon M et al Plant J 2003
Transducteur	PI3 kinase-like	<i>ATM</i> <i>ATR</i>	<i>AtATM</i> <i>AtATR</i>	Garcia V et al Nucl. Ac. Reser. 2000 Culligan k et al Plant Cell 2004
	Protein kinase	<i>Chk1</i> <i>Chk2</i>	?? ??	
Effecteur	Facteur de transcription	<i>p53</i>	??	
	Phosphatase	<i>CDC25A, B, C</i>	<i>AtCDC25A, B, C</i>	de Jager et al 2005

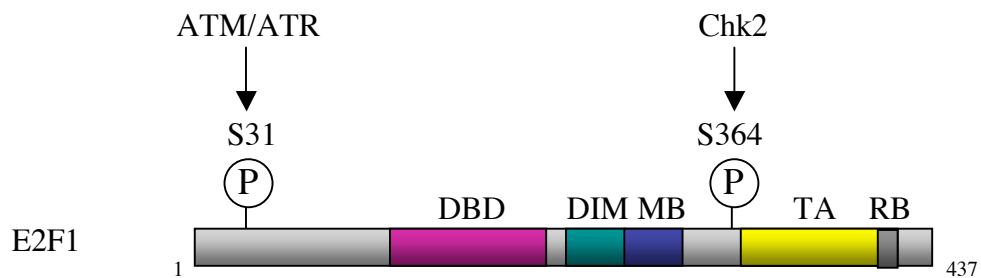
Tableau 1: Gènes impliqués dans la signalisation d'un dommage à l'ADN chez les mammifères et leurs homologues chez les plantes

2.2. Les principaux acteurs intervenant dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN chez les plantes

De nombreux homologues de facteurs protéiques, intervenant dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN chez les mammifères, ont également été identifiés chez les plantes et plus particulièrement chez *Arabidopsis thaliana* (Tableau 1). Deux gènes codant pour l'histone H2AX (*AtH2AXa* et *AtH2AXb*) ont été récemment isolés (Friesner et al., 2005). Il a été montré que les protéines AtH2AXa s'accumulaient, comme chez les mammifères, au niveau des cassures double brins après exposition à un rayonnement ionisant. Des homologues des kinases ATM et ATR ont été également caractérisés (Garcia et al., 2000) (Culligan et al., 2004). Il a été montré que des plantes n'exprimant plus la kinase ATM était hypersensible aux rayons γ mais pas aux rayons UV-B rendant ces plantes mutantes incapables d'induire la transcription de gènes impliqués dans la réparation ou à la détection d'une cassure double brin en réponse à une irradiation (Garcia et al., 2003). Les plantes mutées au niveau du gène *AtATR* présentent, suite à un stress génotoxique, une expression altérée du gène *AtRNR1* (codant pour la grande sous-unité régulatrice de la ribonucléotide réductase) ainsi qu'une altération des points de contrôles du cycle cellulaire (Garcia et al., 2003). Ces données suggèrent que les kinases ATM et ATR sont importantes dans la signalisation d'un dommage à l'ADN chez les plantes comme chez les mammifères. Cependant, certains facteurs, jouant des rôles essentiels dans cette voie de signalisation chez les mammifères, n'ont pas été identifiés chez *Arabidopsis thaliana*, comme les protéines kinases CHK1 et CHK2 intervenant dans la transduction du signal ainsi que le facteur de transcription p53 jouant un rôle de pivot dans la réponse à un dommage à l'ADN chez les mammifères. Ces données suggèrent que d'autres facteurs protéiques spécifiques aux plantes pourraient jouer le rôle de ces protéines ou encore qu'il y aurait des modifications dans la voie de signalisation de la réparation, notamment au niveau des points de contrôle.

3. Rôle du facteur E2F dans la réponse à un dommage à l'ADN

Nous avons vu que les facteurs E2F n'interviennent pas uniquement dans la régulation de l'expression de gènes à la transition G1/S du cycle cellulaire mais ils jouent également un rôle dans la réparation de l'ADN suite à un dommage. En effet, de nombreux gènes intervenant dans la réparation de l'ADN, la recombinaison ou le contrôle des « checkpoints »



DBD: DNA binding domain; DIM: domaine de dimérisation; TA: domaine de Transactivation; RB: domaine de liaison à Rb; MB: marked box

Figure 14: Site de phosphorylation de E2F1 par les kinases ATM/ATR et Chk2
 Le résidu sérine 31 peut être phosphorylé par les kinases ATM/ATR et le résidu sérine 364 peut être phosphorylé par la kinase Chk2 en réponse à un dommage à l'ADN.

ont été identifiés comme étant régulés par la voie E2F/Rb chez les animaux (Ishida et al., 2001) (Muller et al., 2001) (Dimova et al., 2003).

3.1. Rôle du facteur E2F1 dans le déclenchement de l'apoptose

En réponse à un dommage à l'ADN, une cellule peut soit subir la mort cellulaire programmée soit déclencher un checkpoint permettant au cycle cellulaire de s'arrêter pour réparer l'ADN. Des études sur des cellules de mammifères ont montré que les facteurs E2Fs pouvaient provoquer la mort cellulaire en réponse à un dommage à l'ADN ou lorsqu'ils étaient surexprimés (Asano et al., 1996). Une étude sur des souris mutantes n'exprimant plus le facteur E2F1 a montré que celles-ci développent des tumeurs dans de nombreux tissus confirmant ainsi l'hypothèse que le facteur E2F jouerait un rôle essentiel dans l'apoptose (Yamasaki et al., 1996).

Le facteur E2F1 peut déclencher l'apoptose par des mécanismes dépendants ou indépendants de la protéine p53. De plus, il a été montré que plusieurs gènes clefs de l'apoptose, tel que les gènes APAF1, CASP3, CASP7 et TP73, sont induits par le facteur E2F1 (Muller et al., 2001) (Moroni et al., 2001) (Irwin et al., 2000) (Stiewe and Putzer, 2000). Les gènes codant pour les caspases 3 et 7 (CASP3 et CASP7) sont exprimés en phases S du cycle cellulaire, sous le contrôle du facteur E2F1, dans des conditions normales de croissance, mais ces caspases sont inactives à ce stade parce qu'elles nécessitent une modification post-traductionnelle pour être actives (Boatright and Salvesen, 2003). Il est donc possible que le facteur E2F1 n'induit pas l'apoptose dans des conditions physiologiques normales, mais il permettrait plutôt de préparer la cellule à un signal apoptotique.

3.2. Rôle du facteur E2F1 dans la signalisation de la réparation de l'ADN

Un des rôles du facteur E2F1 dans la réponse à un dommage à l'ADN a été proposé suite à des expériences où des cellules traitées par des agents génotoxiques ont présenté un niveau en protéines E2F1 augmenté (Blattner et al., 1999) (Hofferer et al., 1999) (O'Connor and Lu, 2000). Cette augmentation du taux en facteurs E2F1 est due à une stabilisation de la protéine (Figure 14) par phosphorylation par les kinases ATM (ataxia-telangiectasia- mutated) et ATR (ataxia-telangiectasia and Rad3-related) (Lin et al., 2001) et par la kinase CHK2 (checkpoint kinase 2) (Stevens et al., 2003) au niveau des résidus sérines 364 et 31,

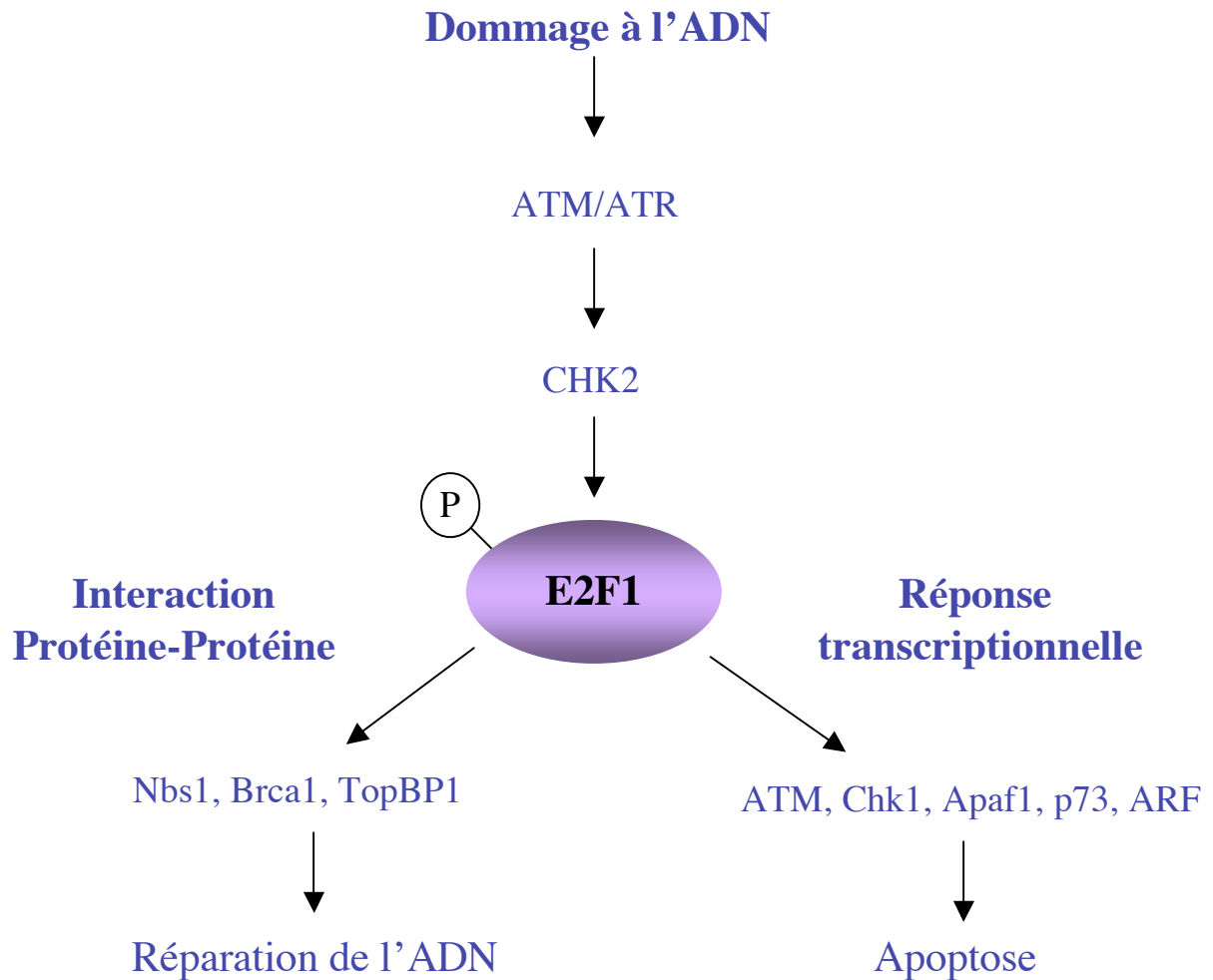


Figure 15: Rôle du facteur E2F1 dans le contrôle de l'apoptose et de la réparation chez les mammifères

En réponse à un dommage à l'ADN, le facteur E2F1 est phosphorylé par les kinases ATM/ATR et CHK2. Le facteur E2F1 est alors stabilisé et peut activer la transcription de gène impliqué dans l'apoptose ou interagir avec des facteurs protéiques afin d'intervenir dans la signalisation de la réparation de l'ADN.

respectivement. Ces événements de phosphorylation permettent d'inhiber son interaction avec l'ubiquitine-ligase Skp2 et d'échapper ainsi à la dégradation. À ce jour, il n'est pas possible de confirmer si ces deux kinases coopèrent et si ces phosphorylations régulent d'autres activités de la protéine E2F1, en plus de stabiliser la protéine. Le fait que les facteurs E2Fs activent de nombreux gènes dont les produits sont impliqués soit dans les « checkpoints » (comme CHK1, p53, ATM et BRCA1), soit dans la réparation de l'ADN (RPA1-RPA3, RAD51, RAD54, MSH2-MSH6 et MLH1) conforte l'idée que les facteurs E2Fs joueraient un rôle essentiel dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN (Figure 15). Mais, au-delà son rôle d'activateur transcriptionnel, E2F1 semble aussi jouer un rôle dans la réponse à un dommage à l'ADN en interagissant physiquement avec des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN telles que Nbs1, BRCA1 ou encore TopBP1 (Maser et al., 2001) (Liu et al., 2003).

3.3. Chez les plantes

Aucune étude fonctionnelle n'a encore démontré clairement l'implication des facteurs E2Fs de plantes dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN. Toutefois, les fortes similarités de fonctions des facteurs E2F dans la division cellulaire entre les plantes et les mammifères, ainsi que la conservation de leur organisation structurale laissent supposer que les facteurs E2F de plantes puissent également jouer un rôle dans la réponse aux dommages à l'ADN. D'autres informations renforcent cette hypothèse. Premièrement, il a été montré que les régions promotrices de différents gènes impliqués dans la réparation contiennent des motifs consensus de liaison aux facteurs E2Fs (Ramirez-Parra et al., 2003), notamment deux gènes homologues de *hBRCA2* dont la perte de fonction chez l'homme se révèle oncogène. La deuxième information provient de résultats d'analyses de microarray, comparant le profil d'expression du génome d'*Arabidopsis thaliana* six heures après traitement à la bléomycine. Ces résultats ont montré que l'expression du gène *AtE2Fa* était régulé positivement (avec un niveau deux fois plus élevé) lorsque des plantes ont été traitées par une substance génotoxique par rapport à des plantes non traitées (Chen et al., 2003). Enfin, il a été montré que la surexpression des gènes *AtE2Fa* et *AtDPa* chez *Arabidopsis thaliana* induisant l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN, comme les gènes *Rad17* ou *Rad51* ou encore les gènes *RNR* impliqués dans la synthèse de dNTPs (Vandepoele et al., 2005).

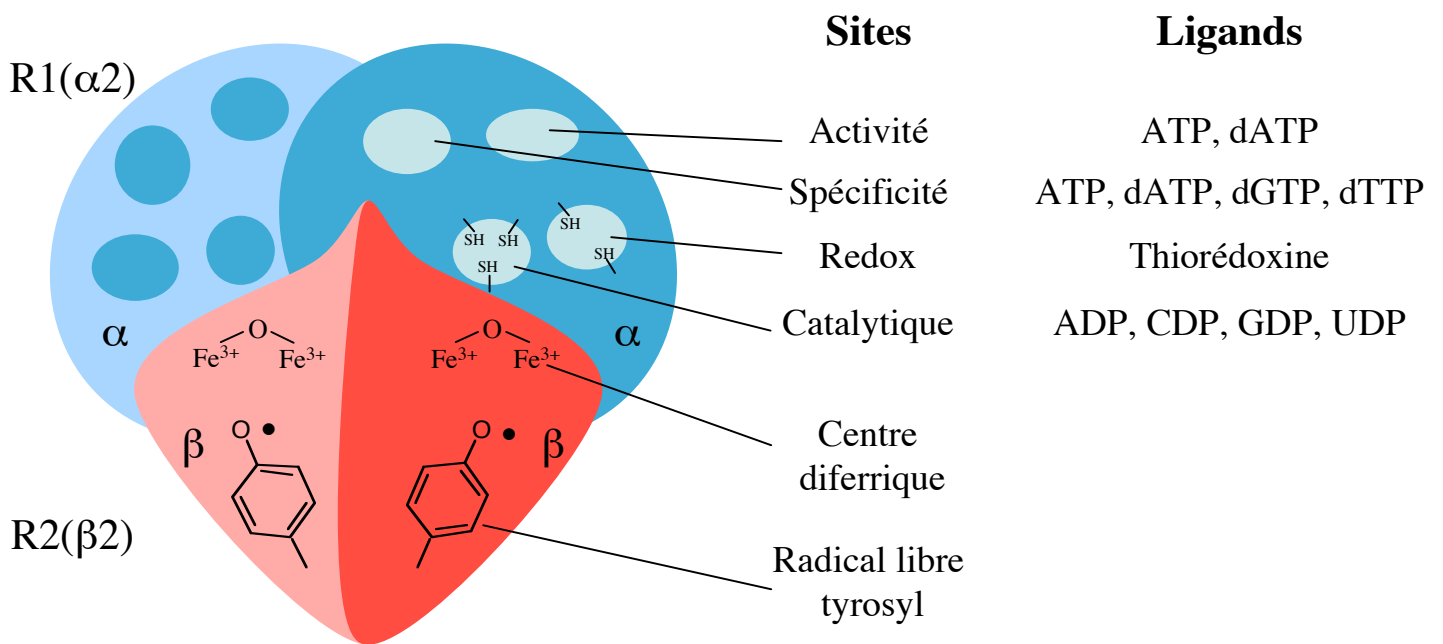
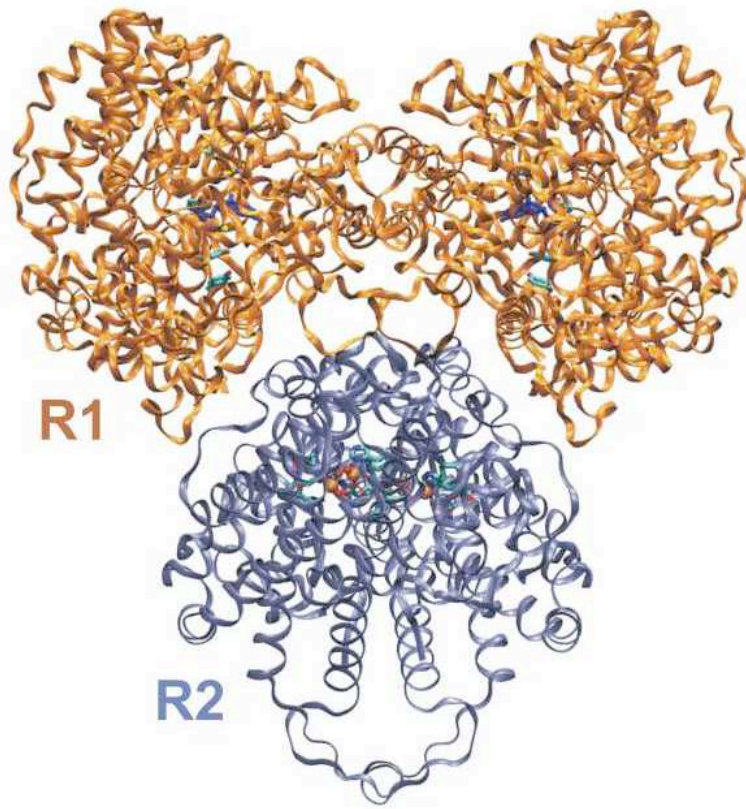


Figure 16: Structure de la Ribonucléotide Réductase

La RNR présente une structure homodimérique de type $\alpha_2\beta_2$. La sous-unité R1 est impliquée dans la régulation allostérique de l'enzyme et la sous-unité R2 dans l'activité catalytique.

D'après www.nd.edu/~aseriann/reductase.html

V. La Ribonucléotide Réductase ou RNR

Afin de pouvoir répliquer et réparer efficacement son génome, une cellule a besoin qu'un stock de dNTPs équilibré soit disponible. La ribonucléotide réductase ou RNR (Figure 16) est une enzyme catalysant l'étape limitante de la biosynthèse *de novo* de dNTPs (Reichard, 1988), c'est-à-dire la conversion des quatre ribonucléotides (NDPs) standards (5'-di-phospho-adénosine, -cytidine, -guanosine, et -uridine) en leurs homologues 2'-désoxyribonucléotides (dNDPs). Cependant, l'uridine doit être convertie en thymidine avant de pouvoir être utilisée lors de la synthèse d'ADN. Cette conversion est catalysée par la thymidylate synthase (Danenberg and Danenberg, 1979). La RNR fournit ainsi les précurseurs nécessaires à la synthèse ainsi qu'à la réparation de l'ADN. Ceci suggère que l'information génétique était initialement stockée dans les molécules d'ARN avant de l'être dans la double hélice d'ADN. De plus, le métabolisme de la cellule génère constamment des radicaux libres. Au cours de l'évolution, les cellules se sont adaptées afin de pouvoir les utiliser. En contrôlant ces radicaux libres, la ribonucléotide réductase réduit les ribonucléosides en désoxyribonucléosides (Stubbe, 1990). La RNR a donc été essentielle à l'apparition de la double hélice d'ADN.

Aussi, comme toute forme de vie stocke l'information génétique dans l'ADN, la RNR est retrouvée chez tout organisme vivant. De plus, il existe même certaines espèces de virus exprimant leur propre gène codant pour la RNR, ceci certainement afin de proliférer plus rapidement dans la cellule hôte infectée (Jordan and Reichard, 1998). En outre, la ribonucléotide réductase est une enzyme unique par le fait qu'elle utilise un radical libre lors de la réaction qu'elle catalyse.

1. Caractéristiques générales

Les différentes enzymes RNR ont été subdivisées en trois classes différentes en fonction du métal utilisé comme cofacteur pour leur activité catalytique (Reichard, 1993) (Tableau 2). La classe I utilise un cofacteur diferrique (Fe-O-Fe), la classe II utilise un cofacteur cobalamine (Vitamine B12) contenant du cobalt et le cofacteur de la classe III est

	Classe Ia	Classe Ib	Classe II	Classe III
Distribution	Bactéries/Eucaryotes	Bactéries	Bactéries	Bactéries
Aérobic/Anaérobic	Aérobic	Aérobic	Aérobic ou Anaérobic	Anaérobic
Structure protéique	$\alpha 2\beta 2$	$\alpha 2\beta 2$	$\alpha/\alpha 2$	$\alpha 2\beta 2$
Cofacteur	Fe-O-Fe	Fe-O-Fe	Cobalamine	4Fe-4S, SAM
Radical catalytique	Thiyl	Thiyl	Thiyl	Thiyl
Réductant	Thiorédoxine	Thiorédoxine	Thiorédoxine	Formate

Tableau 2: Les différentes classes de Ribonucléotide Réductase et leur caractéristiques générales

composé d'un centre fer-soufre (4Fe-4S) couplé à la S-adénosylméthionine (SAM). Malgré ces différences, ces trois classes présentent un résidu cystéine conservé au niveau du site actif qui est converti en radical thiyl impliqué ensuite dans la réduction des NDPs en dNDPs. De plus, elles partagent également une structure tridimensionnelle ainsi qu'une régulation allostérique similaire. Chez plusieurs bactéries, comme *Escherichia coli*, deux ou même trois différentes classes de RNR coexistent dans leur génome. Chaque classe sera alors exprimée en fonction des conditions environnementales de la bactérie. Dans certains cas, comme chez les espèces de *Pseudomonas*, les différentes classes peuvent être exprimées ensemble (Jordan et al., 1999). Chez les organismes supérieurs, seule la RNR de classe I est présente et elle est retrouvée chez la levure et chez les mammifères en passant par les algues et les plantes

1.1. Structure

La RNR de classe I est de type $\alpha_2\beta_2$, composée de deux homodimères R1 et R2 (Figure 16). La grande sous-unité R1 de 90 kDa (α_2) est impliquée dans la régulation allostérique de l'enzyme et porte les radicaux thiyls (Thelander et al., 1980). La petite sous-unité R2 de 45 kDa (β_2) porte le centre diférique générant le radical libre tyrosyl essentiel à l'activité catalytique de l'enzyme (Thelander et al., 1985). Ce radical tyrosyl est « quenché » spécifiquement par l'inhibiteur de la RNR, l'hydroxyurée (Nyholm et al., 1993). La RNR est une enzyme fortement conservée au cours de l'évolution. Elle partage 60 à 70 % d'identité entre les différentes RNR présentes chez les eucaryotes, et 25 à 35 % d'identité entre eucaryotes et procaryotes. Cette forte conservation au cours de l'évolution est sans doute due à la complexité ainsi qu'à la singularité de la réaction que la RNR catalyse.

1.2. Régulation allostérique

Une régulation allostérique fine de l'activité de la ribonucléotide réductase permet l'équilibrage du niveau des quatre nucléotides afin que la réplication et la réparation de l'ADN puissent avoir lieu efficacement (Reichard, 1988) (Figure 17). L'activité enzymatique générale est contrôlée par un site actif et la liaison d'ATP à ce site stimule l'activité enzymatique alors que la liaison de dATP l'inhibe (Jordan and Reichard, 1998) (Reichard et al., 2000). De plus, un site de spécificité permet à l'enzyme de sélectionner son substrat. La liaison de dATP ou d'ATP conduit à la réduction de pyrimidine ribonucléosides diphosphates

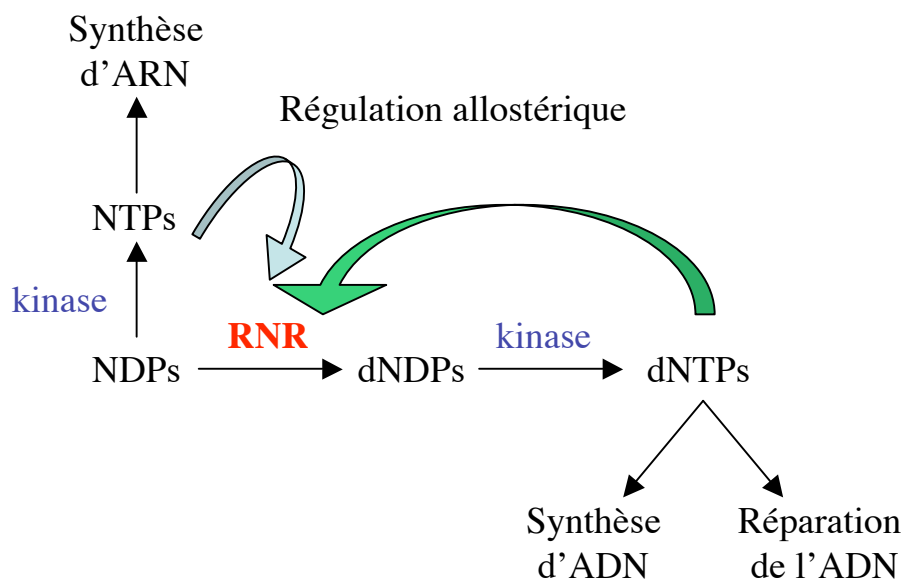
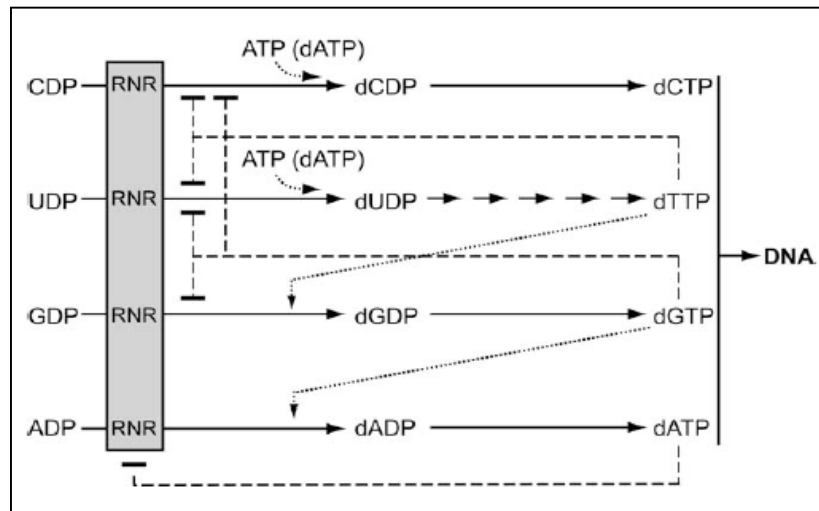
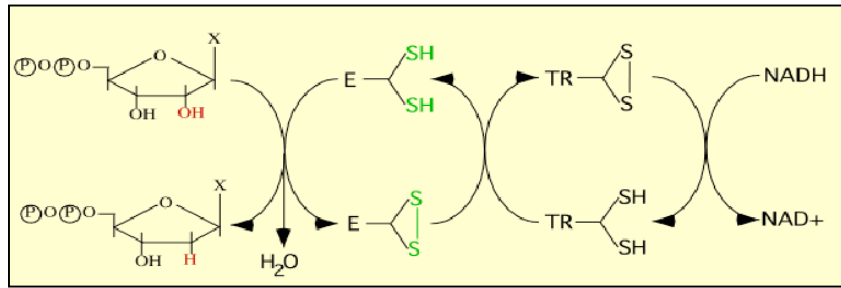


Figure 17: Régulation allostérique de l'activité de la RNR

Les NDPs sont réduits en dNDPs par la RNR qui seront convertis en dNTPs. Ces dNTPs pourront réguler allostériquement la RNR. L'activité enzymatique générale de la RNR est finement régulée par la fixation d'ATP ou de dATP sur le site actif de l'enzyme. Un site de spécificité permet à l'enzyme de sélectionner son substrat. Ces dNTPs seront soit utilisés lors de la réplication du génome, soit lors de la réparation.

(UDP, CDP). De même, la liaison de dTTP à ce site conduit à la réduction de GDP alors que la liaison de dGTP stimule la réduction d'ADP. Ces différents sites de régulation allostérique se trouvent sur la sous-unité R1 (Figure 17).

2. Régulation de la ribonucléotide réductase

La RNR peut être régulée à différents niveaux.. Dans un premier temps, la RNR est régulé au niveau transcriptionnel au cours du cycle cellulaire avec une expression maximale en phase S lorsque la cellule a besoin de dNTPs pour répliquer son génome. La RNR peut également être régulé au niveau de son activité enzymatique ou alors par sa localisation subcellulaire.

2.1. Chez la levure

a) Régulation transcriptionnelle

La levure, tout comme les autres eucaryotes possède une ribonucléotide réductase de classe I. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, deux gènes, *RNR1* et *RNR3* codent pour la grande sous-unité régulatrice R1 (Elledge and Davis, 1990) et deux gènes, *RNR2* (Elledge and Davis, 1987) (Hurd et al., 1987) et *RNR4* (Wang et al., 1997) (Huang and Elledge, 1997), codent pour la petite sous-unité catalytique R2. Cependant, le gène *RNR4* code pour une sous-unité R2 plus petite. Une cinquantaine d'acides aminés sont absents dans la partie N-terminale de la protéine R2 par rapport à la sous-unité R2 codée par le gène *RNR2*, dont cinq sont essentiels pour l'activité de l'enzyme (trois de ces résidus sont impliqués dans le centre ferrique, un pour le radical tyrosyl et un dans l'interaction avec la sous-unité R1 (Huang and Elledge, 1997).

La transcription du gène *RNR1* est fortement régulée au cours du cycle et faiblement induite en réponse à un dommage à l'ADN. Le gène *RNR1* est essentiel au bon déroulement du cycle cellulaire contrairement au gène *RNR3*. En effet, le gène *RNR3* est faiblement transcrit dans des conditions normales, mais, suite à un dommage à l'ADN, sa transcription est fortement induite (jusqu'à cent fois) (Elledge and Davis, 1990). Le gène *RNR2*, codant pour la petite sous-unité catalytique R2, est induit en phase S mais également en réponse à un

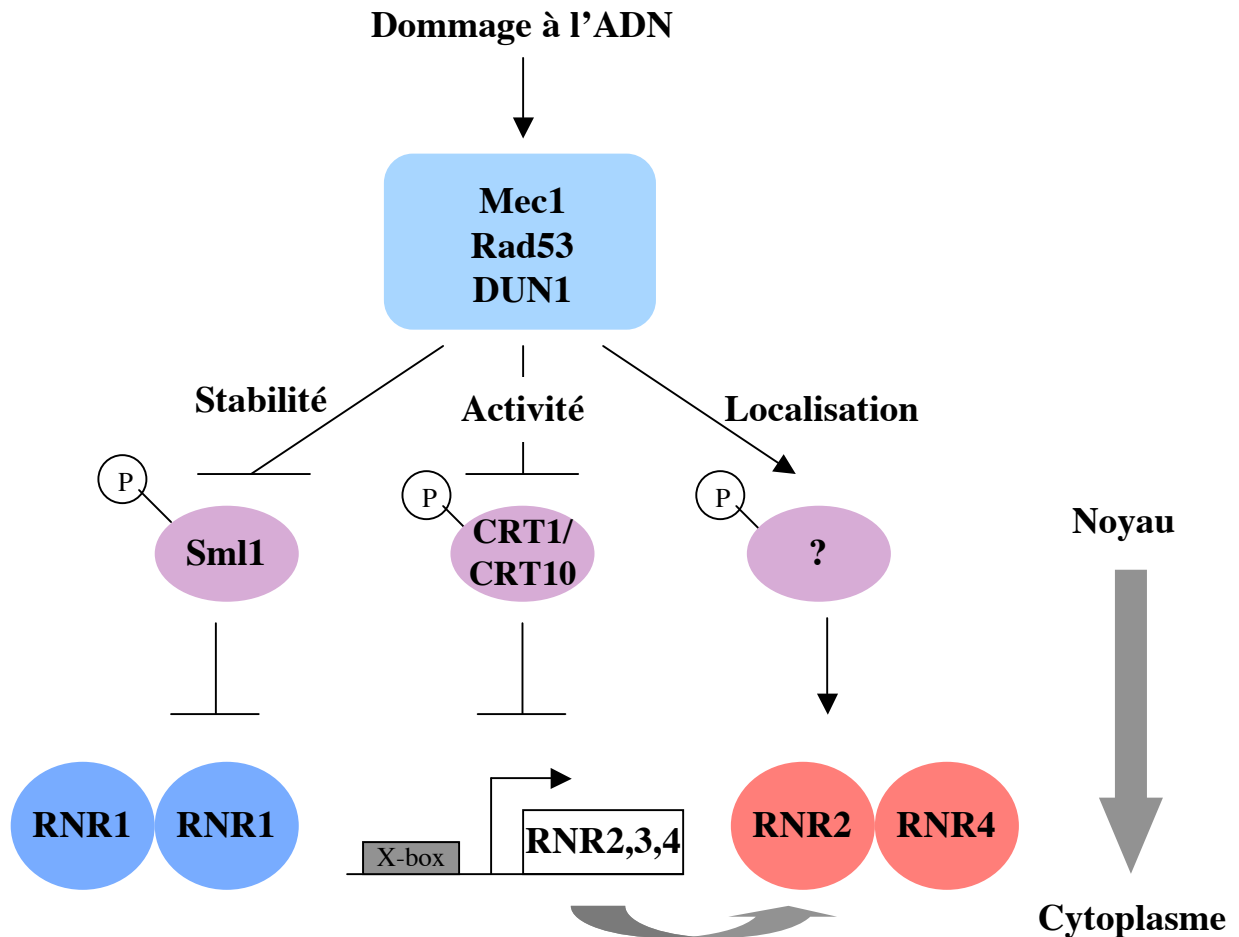


Figure 18: Les différents mécanismes impliqués dans la régulation de l'activité de la RNR en réponse à un dommage à l'ADN chez la levure

En réponse à un dommage à l'ADN, les kinases Mec1 et Rad53 active la kinase DUN1 qui va phosphoryler les répresseurs CRT1/CRT10 et alors induire la transcription des gènes RNR. Ces kinases phosphorylent également la protéine Sml1, impliquée dans l'inhibition de l'activité de la RNR, permettant alors à la RNR d'être active en phase S du cycle cellulaire et en réponse à un stress génotoxique. Enfin, suite à un dommage à l'ADN, les sous-unités Rnr2 et Rnr4 vont être relocalisées dans le cytoplasme.

(D'après Yao R. et al, 2003, Proc Natl Acad Sci)

dommage à l'ADN (Elledge and Davis, 1987). Enfin, la régulation de l'expression du gène *RNR4* est similaire à celle du gène *RNR2* (Wang et al., 1997). Toutefois, il a été montré que cette sous-unité RNR4 était impliquée dans la réponse à un traitement au psoralène et plus précisément dans la régulation de l'ADN polymérase ζ (Brendel et al., 2003). En fait, tous les gènes *RNR* sont ainsi induits, plus ou moins fortement, suite à un dommage à l'ADN (Figure 18). En réponse à un dommage à l'ADN, les kinases Mec1 et Rad53 activent une kinase appelée DUN1 qui va alors phosphoryler les protéines CRT1 et CRT10. Une fois phosphorylées, ces protéines perdent leur affinité pour un élément des promoteurs des gènes *RNR2*, *RNR3* et *RNR4* appelé X-box et la transcription de ces gènes est induite (Figure 18) (Huang et al., 1998) (Fu and Xiao, 2006). La kinase Mec1 est l'homologue de la kinase ATM et la kinase Rad53 est l'homologue de CHK2 retrouvés chez les mammifères.

b) Régulation de l'activité enzymatique

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'activité de la RNR est régulée par la protéine Sml1 qui se lie à la sous-unité R1 (Figure 18). Hors phase S, la protéine Sml1 inhibe l'activité enzymatique de la RNR. En cas de besoin en dNTPs c'est-à-dire en phase S du cycle cellulaire ou en réponse à un dommage à l'ADN, la protéine Sml1 est phosphorylée par la voie Mec1/Rad53 (intervenant également dans la signalisation de la réparation de l'ADN (Zheng et al., 1993) (Kato and Ogawa, 1994) (Weinert et al., 1994)) permettant ainsi de diriger la protéine Sml1 vers la dégradation et à la RNR de recouvrer son activité (Zhao et al., 2001).

Cependant, ce mode de régulation de l'activité enzymatique de la RNR n'est pas retrouvé ni chez les mammifères ni chez les plantes, où aucun homologue de l'inhibiteur Sml1 n'a été identifié jusqu'à présent.

c) Régulation de la localisation subcellulaire

Dans des conditions normales, les sous-unités RNR1 et RNR3 sont principalement localisées dans le cytoplasme alors que les sous-unités RNR2 et RNR4 sont essentiellement localisées dans le noyau. En réponse à un stress génotoxique, les sous-unités RNR2 et RNR4 sont relocalisées dans le cytoplasme (Figure 18). Cette relocalisation subcellulaire peut se produire en l'absence de l'induction transcriptionnelle des gènes *RNR* en réponse aux

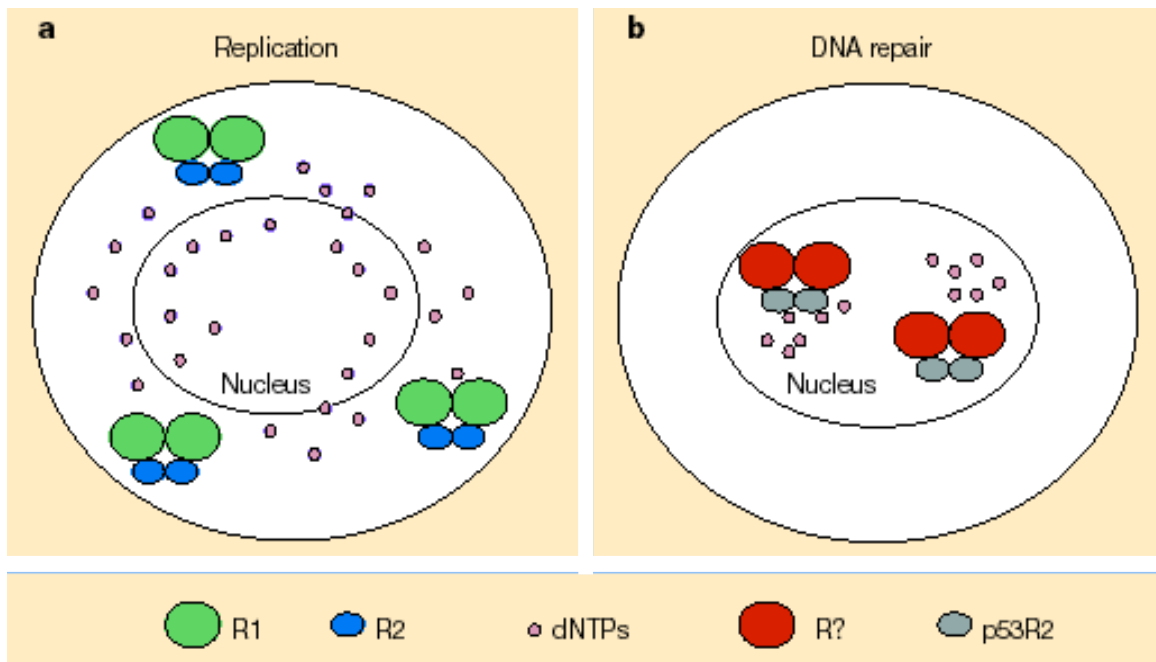


Figure 19: Régulation de la RNR en réponse à un dommage à l'ADN chez les mammifères

En réponse à un dommage à l'ADN, le facteur de transcription p53 induit la transcription du gène *p53R2* codant pour une sous-unité R2. Cette sous-unité p53R2 est localisée dans le noyau et produit des dNTPs, en association avec une sous-unité R1 inconnue, directement dans le noyau. Cette production nucléaire pourrait faciliter la réparation des dommages en augmentant la concentration en dNTPs au niveau des lésions

D'après Lozano et al, Nature, 2000

dommages à l'ADN et implique à la fois un export nucléaire actif et un blocage de l'import nucléaire (An et al., 2006).

2.2. Chez les mammifères

a) Régulation de l'expression

Chez l'homme, tout comme chez la levure, l'activité de la RNR est élevée en phase S du cycle cellulaire (Reichard, 1988). En effet, les gènes codant pour les sous-unités R1 et R2 de la RNR sont transcrits et exprimés de manière spécifique en phase S du cycle cellulaire (Bjorklund et al., 1990) (Johansson et al., 1998) (Chabes et al., 2004). Cependant, comme la protéine R1 présente une demie-vie élevée, son niveau est constant tout au long du cycle cellulaire. Ainsi, contrairement à ce qui se passe chez la levure, l'activité enzymatique de la RNR est essentiellement déterminée par le niveau en protéine R2 (Engstrom et al., 1985). La protéine R2 est stable en phase S du cycle cellulaire et dégradée en fin de mitose et en phase G0/G1. Cette dégradation est dépendante d'un domaine KEN (« KEN box »), situé dans la partie N-terminale de la protéine R2, qui est reconnu par un complexe protéique appelé Cdh1-anaphase-promoting complex (Cdh1-APC) actif en fin de mitose et lors des phases G0/G1, conduisant les protéines R2 vers la dégradation (Chabes et al., 2003). La dégradation de la sous-unité R2 en phase G0/G1 permettrait à la cellule de se protéger contre de la synthèse d'ADN non prévue.

Au cours des phases S et G2 du cycle cellulaire, un complexe RNR composé des protéines R1 et R2 assure un approvisionnement adéquat en dNTPs pour la réparation de l'ADN. Si un dommage à l'ADN se produit en dehors de ces phases une source alternative pour fournir en dNTPs la cellule doit être mise en place. En effet, les protéines R2 sont dégradées en fin de mitose et en phase G0/G1 et le niveau de protéines R1 décline lorsque la cellule arrête de proliférer. Cependant, dans des cellules quiescentes, suite à un dommage à l'ADN, la transcription du gène *R1* et du gène *p53R2* est induite. Le gène *p53R2* est induite par le facteur de transcription p53, cible de la voie ATM/ATR et CHK1/CHK2 (Tanaka et al., 2000) (Guittet et al., 2001) (Figure 19). La sous-unité *p53R2* tronquée dans sa partie N-terminale ne possède pas de domaine KEN et échappe ainsi à la dégradation par le complexe Cdh1-APC en phase G0/G1 et peut ainsi fournir des dNTPs pour réparer l'ADN au cours de ces phases (Chabes et al., 2003).

D'autres études ont montré que la transcription spécifique en phase S du cycle cellulaire du gène *R1* de la souris est contrôlée par quatre cis-éléments différents de son promoteur, les cis-éléments β , α , Inr et γ . Ces quatre éléments sont également présents dans le promoteur du gène *R1* chez l'homme. Les cis-éléments β et α contrôlent la force du promoteur alors que le cis-élément γ contrôle la spécificité cycle cellulaire-dépendante de l'expression du gène *R1* (Johansson et al., 1998).

À ce jour, la régulation de la transcription du gène *R2* est moins explicitée. Ce gène est spécifiquement exprimé en phase S du cycle cellulaire (Chabes and Thelander, 2000). Tout d'abord il a été montré que l'expression du gène *R2* était contrôlée par les facteurs E2F puisque des cellules quiescentes de souris infectées avec un vecteur viral surexprimant la protéine E2F1 présentent un niveau d'expression du gène *R2* élevé (DeGregori et al., 1995). Mais par la suite, il a été montré que la surexpression des facteurs E2F1-3 dans des cellules quiescentes était suffisante pour induire la réentrée dans le cycle cellulaire (Trimarchi and Lees, 2002). Ainsi, l'activation de l'expression du gène *R2*, suite à la surexpression de E2F1, peut être simplement la conséquence de l'entrée en phase S des cellules induites par cette surexpression et non pas suite à une activation transcriptionnelle de l'expression du gène *R2* par un facteur E2F. À l'inverse, une étude récente a montré que l'expression du gène *R2* était réprimée en dehors de la phase S par l'interaction du facteur E2F4 (qui a une activité inhibitrice) avec une région proximale de son promoteur alors qu'une région distale était essentielle à l'activation de son expression. Dans le même ordre d'idée, il a été également établi que la mutation du cis-élément E2F conduit à une activation prématurée de l'expression du gène *R2* en phase G1 (Chabes et al., 2004).

b) Régulation de la localisation subcellulaire

Dans des conditions normales, les sous-unités R1 et R2 sont localisées dans le cytoplasme et les dNTPs produits diffusent dans le noyau afin d'être utilisés lors de la réplication de l'ADN.

Cependant, la sous-unité p53R2, exprimé spécifiquement en réponse à un dommage à l'AND, est localisée dans le noyau (Figure 19). p53R2 forme alors, en association avec une sous-unité R1, une enzyme fonctionnelle. Cette enzyme produit alors des dNTPs directement

1. NTRNR1a Protéine vs. NTRNR1b Protéine

Aligned Length = 808 Gaps = 0

Identities = 752 (93%) Similarities = 37 (4%)

```

NTRNR1a Prot      1 MYVVKRDGRQEA VHF D K I T A R L K K L S Y G L S P D H C D P V L V A Q K V C A G V Y K G      50
NTRNR1b Prot      1 MYVVKRDGRQET VHF D K I T A R L K K L S Y G L S P E H C D P V L V S Q K V C A G V Y K G      50
  ***          .*****.*****.*****.*****.*****

NTRNR1a Prot     51 VTTSQLDELAEAETAAMTANHPDYACLAARIAVSNLHKTPKKSFSSETIKD    100
NTRNR1b Prot     51 VTTSQLDELAEAETAAL TANHPDYASLAARIAVSNLHKNTKKSFSSETVKD    100
  *****.*****.*****.*****.*****

NTRNR1a Prot    101 MYYHVSERSGLKAPLVSDVEVYEIIMKNAARLDSEI IYDRDFDYDFGFKT    150
NTRNR1b Prot    101 MYNHISERSGLKAPLISDEVYEIIMKNAARLDSEI IYDRDFDYDFGFKT    150
  ** *.*****.*****.*****.*****

NTRNR1a Prot    151 LERSYLLKIQGKVERPQHMLMRVSVG I H K D D I E S V I K T Y H L M S Q R W F T H    200
NTRNR1b Prot    151 LERSYLLKINGNVVERPQHMLMRVSVG I H K D D I E S A I K T Y H L M S Q R W F T H    200
  *****.* *****.*****.*****

NTRNR1a Prot    201 ASPTLFNAGTPRPQLSSCFLICMKEDSIEGIYDTLKECAVISKSAGGIGV    250
NTRNR1b Prot    201 ASPTLFNAGTPRPQLSSCFLVCMKEDSIEGIYDTLKECAVISKSAGGIGV    250
  *****.*****.*****.*****

NTRNR1a Prot    251 SVHNIRATGSYIRGTNGTNSNGI V P M L R V F N D T A R Y V D Q G G G K R K G A F A V Y    300
NTRNR1b Prot    251 SVHNIRATGSYIRGTNGTNSNGI V P M L R V F N D T A R Y V D Q G G G K R K G A F A V Y    300
  ***** *****.*****.*****.*****

NTRNR1a Prot    301 LDPWHADIFEFLLDRKNHGKEEHRARDLFYALWVPDLFMQRVQSNQWWSL    350
NTRNR1b Prot    301 LEPWHSDFEFLLDRKNHGKEEHRARDLFYALWVPDLFMERVQSNQWWSL    350
  *.***.*****.*****.*****.*****

NTRNR1a Prot    351 FCPNEAPGLADCWGEDFEKLYINYEKEGKAKKVQ A Q N L W F E I L K S Q I E T      400
NTRNR1b Prot    351 FCPSEAPGLADCWGEDFEKLYTKYEREGKAKKVQ A Q N L W F E I L K S Q I E T      400
  *** *****.***** ** *****.*****

NTRNR1a Prot    401 GTPYMLYKDT CNR K S N Q Q N L G T I K S S N L C T E I I E Y T S P A E T A V C N L A S I A      450
NTRNR1b Prot    401 GTPYMLYK D S C N R K S N Q Q N L G T I K S S N L C T E I I E Y T S P T E T A V C N L A S I A      450
  *****.*****.*****.*****

NTRNR1a Prot    451 LPRYVREKGV P S E S Q P S K L V G S R G S K N R Y F D F D K L A E V T A L V T N L N K I I      500
NTRNR1b Prot    451 LPRYVREKEVPDES Q P S K L V G S R G S K N R Y F D F A K L A E V T A L V T N L N K I I      500
  ***** ** *****.*****.*****

NTRNR1a Prot    501 DVNYYPVETAKRSNL R H R P I G I G V Q G L A D T F M L L G M A F D S R E A Q Q L N K D I      550
NTRNR1b Prot    501 DVNYYPVETAKRSNL R H R P I G I G V Q G L A D T F I L L G M S F D S P E A Q Q L N K D I      550
  *****.*****.*****.*****

```

Figure 20: Alignement des séquences des protéines *NtrNR1a* et *NtrNR1b*

* : identité
. : similarité
: divergence

dans le noyau, permettant d'augmenter la concentration en dNTPs au niveau de la cassure ce qui facilite la réparation de la lésion (Tanaka et al., 2000).

2.3. Chez les plantes

Comme chez les autres eucaryotes, la ribonucléotide réductase est également de classe I et de structure $\alpha_2\beta_2$, cependant, les connaissances concernant la régulation de l'expression des gènes codant pour la RNR chez les plantes sont limitées.

a) *Nicotiana tabacum*

Chez le tabac, trois gènes codant pour la RNR ont été isolés : deux gènes codant pour la sous-unité régulatrice R1, *NtRNR1a* et *NtRNR1b*, et un gène codant pour la sous-unité catalytique R2, *NtRNR2* (Chaboute et al., 1998). Les protéines codées par les gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* partagent 93 % d'identité (Figure 20).

Comme chez les mammifères et la levure, l'expression de ces gènes est fortement régulée au cours du cycle cellulaire. En effet, des expériences de northern blot utilisant des cellules BY-2 synchronisées par un traitement à l'aphidicoline a permis de montrer que l'expression des gènes *NtRNR1a*, *NtRNR1b* ou *NtRNR2* était induite à la transition G1/S du cycle cellulaire (Chaboute et al., 1998). Cependant, le gène *NtRNR1a* est également exprimé modérément à la transition G2/M, suggérant que les deux gènes *NtRNR1* soient régulés différemment au cours du cycle cellulaire.

Chez les plantes, seule la transcription de quelques gènes (*RNR*, *CDC6*, *PCNA*, *MCM3* et *ORC1*) a été décrite comme étant régulée par le facteur de transcription E2F (Chaboute et al., 2000) (de Jager et al., 2001) (Egelkrout et al., 2001) (Chaboute et al., 2002) (Stevens et al., 2002) (Diaz-Trivino et al., 2005). Le promoteur du gène *NtRNR2* de tabac a été le premier, chez les plantes, à être décrit comme étant régulé par le facteur E2F (Chaboute et al., 2000). En effet, le promoteur de ce gène contient deux cis-éléments E2F de séquence consensus TTTC/GC/GCGC, un élément simple et un élément composé formé d'un élément E2F et d'un élément CDE (Cell cycle Dependent Element) similaires à ceux qui sont présents sur plusieurs promoteurs de gènes de mammifères induits à la transition G1/S (Slansky and Farnham, 1996) (Figure 21). Dans le cas du promoteur du gène *NtRNR2*, il a été montré que les cis-éléments E2F peuvent interagir avec un facteur E2F purifié de tabac. De plus, il a été

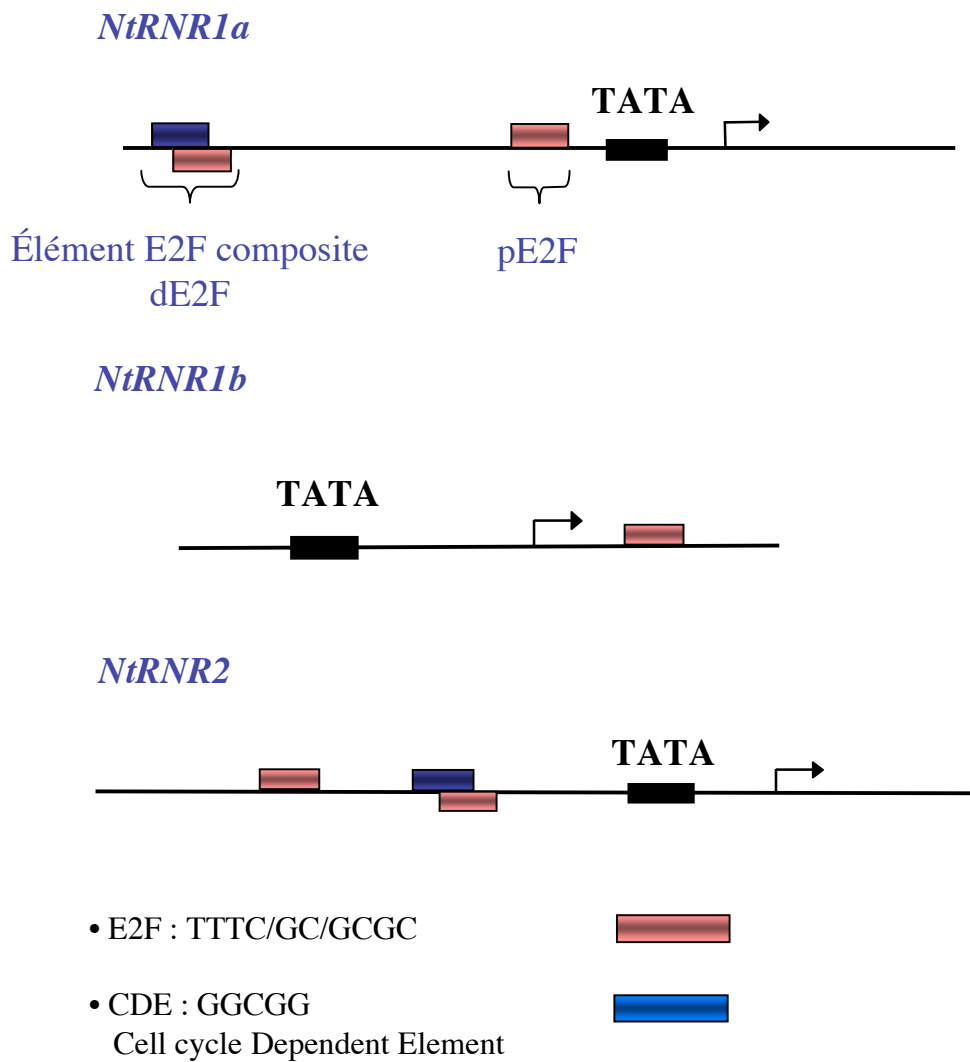


Figure 21: Les promoteurs des gènes *NtRNR*

Les promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR2* comportent deux éléments E2F: un élément E2F simple et un élément E2F composite formé d'un élément CDE et d'un élément E2F.

Le promoteur *NtRNR1b* présente un organisation plus simple. Il ne contient qu'un seul élément E2F.

```

TSO2 prot          1 MPSMPE-----EPLLTPTPDRFCMFPIHYPQIWEMYKKAESF  38
AtRNR2A prot      1 MGSLKEGQGRDMEEGESEEPDLLMAQNQRFTMFPIRYKSIWEMYKKAESF  50
ATRNR2B prot      1 MPSMPE-----EPILTPTPDRFCMFPIQYPQIWEMYKKAESF  38
                   * * . *                   **.*           **.*****.* *****

TSO2 prot          39 WTAEVDLSQDNRDWENSLNDRGERHF I KHVLAFFAASDGVLENLASRFM  88
AtRNR2A prot      51 WTAEVDLSTDVQWEALTDSEKHF I SHILAFFAASDGVLENLAARFL  99
ATRNR2B prot      39 WTAEVDLSQDNRDWENSLTNDERHF I KHVLAFFAASDGVLENLSTRFM  88
                   ***** * . **           *.*** *.*****.***.

TSO2 prot          89 SDVQVSEARAFYGFQIAIENIHSEMYSLLLDITYIKDNKERDHLFRAIETI 138
AtRNR2A prot      100 NDVQVPEARAFYGFQIAMENIHSEMYSLLLLETFIKDSKEKDRLFNAIETI 149
ATRNR2B prot      89 SDVQISEARAFYGFQIAIENIHSEMYSLLLDITYIKDNKERDHLFRAIETI 138
                   ***. *****.*****.*** **.*.* **

TSO2 prot          139 PCVAKKAQWAMKWIDGSQTF AERIIAFACVEGIFSGSFC SIFWLKKRGL 188
AtRNR2A prot      150 PCISKKAKWCLDWIQSPMSFAVRLVAFACVEGIFSGSFC AIFWLKKRGL 199
ATRNR2B prot      139 PCVTKKAEWAMKWINGSQSFAERIVAFACVEGIFSGSFC SIFWLKKRGL 188
                   **.*.* *.. **           .** *..*****.*****

TSO2 prot          189 MPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLLYTLLKTKLSEERVKSIVCDAVEIER 238
AtRNR2A prot      200 MPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLLYSLLQQLPLEKVYQIVHEAVEIET 249
ATRNR2B prot      189 MPGLTFSNELISRDEGLHCDFACLIYSLLR TKLDEDRLKAIVCDAVEIER 238
                   *****.***. .*   ... ** .*****

TSO2 prot          239 EFVCDALPCALVGMNRDLMSQYIEFVADRL LGALGYGVGTNPFDWME 288
AtRNR2A prot      250 EFVCKALPCDLIGMNSNLMSQYIQFVADRL LVTLGCERTYKAENPFDWME 299
ATRNR2B prot      239 EFVCDALPCALVGMNRELMSQYIEFVADRL LAALGCAKVYGVSNPFDWME 288
                   **** *.* *.* **.*.*** **.* . * *****

TSO2 prot          289 LISLQKTNFFEKRVDYQKASVMSSVN-GNGAFDNHVFSLDEDF 332
AtRNR2A prot      300 FISLQKTNFFEKRVG EYQKASVMSNLQNGN--QNYEFTTEEDF 341
ATRNR2B prot      289 LISLQKTNFFEKRVG EYQKASIMSSVHGNAAFNDDHVFKLDEDF 333
                   *****.***. . .           * .***

```

Figure 22: Aligement des séquences des protéines *AtRNR2*

* : identité
. : similarité
: divergence

établi que ces deux éléments étaient essentiels à l'induction du promoteur en phase S du cycle cellulaire (Chaboute et al., 2000).

Le gène *RNR1b* est également fortement exprimé au cours de la phase S du cycle cellulaire ainsi que dans les tissus méristématiques. Le promoteur du gène *RNR1b* contient un cis-élément E2F similaire au cis-élément E2F simple contenu dans le promoteur du gène *RNR2* (Figure 21). Il a été montré que ce cis-élément E2F pouvait interagir avec un facteur E2F de tabac purifié (Chaboute et al., 2002). De plus, ce cis-élément est essentiel à une induction maximale de l'expression du gène. Par contre, sa mutation ne réduit que de moitié l'activité du promoteur suggérant l'existence d'autres cis-éléments impliqués dans une corégulation associée à E2F. Cette aspect sera discuté dans cette thèse

Le gène *RNR1a* est fortement exprimé en phase S, mais est également exprimé plus faiblement en phase G2 du cycle cellulaire. Comme le promoteur du gène *RNR2*, le promoteur de ce gène contient deux cis-éléments E2F c'est-à-dire un élément simple et un élément composite (Figure 21). La régulation de l'expression de ce gène au cours du cycle cellulaire et cours du développement du tabac sera discuté dans cette thèse.

b) *Arabidopsis thaliana*

Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs gènes codant pour la ribonucléotide réductase ont également été caractérisés : un gène codant pour la grande sous-unité régulatrice R1 (*RNR1*) et trois gènes codant pour la petite sous-unité catalytique R2 (*RNR2A*, *RNR2B* et *TSO2*) (Philipps et al., 1995) (Wang and Liu, 2006). L'analyse de la séquence complète du génome suggère qu'il y en a pas d'autres.

Les protéines codées par les différents gènes *RNR2* (*RNR2A*, *RNR2B* et *TSO2*) chez *Arabidopsis thaliana* partagent entre 71% et 83% d'identité avec la sous-unité R2 codée par le gène *RNR2* de tabac (Figure 22). La sous-unité R1, quant à elle, partage 86% d'identité avec les sous-unités R1 de tabac (R1a et R1b) (Tableau 3).

Il a été montré récemment que les plantes mutantes *tso2* présentent un niveau réduit en dNTPS et sont affectées dans leur développement. Ces plantes mutantes *tso2* ainsi que les plantes double mutantes *tso2 rnr2a* sont plus sensibles aux UV-C entraînant ainsi une quantité plus élevée de dommages à l'ADN (Wang and Liu, 2006). En outre, l'expression du gène *RNR2A* est régulée au cours du cycle avec une induction à la transition G1/S du cycle cellulaire dans des cellules BY-2 synchronisées (Philipps et al., 1995).

	NtRNR2	AtTSO2	AtRNR2A	AtRNR2B
NtRNR2		83%	71%	80%
AtTSO2			70%	90%
AtRNR2A				60%
AtRNR2B				

Tableau 3 : Pourcentage d'identité entre les différentes sous-unités R2 de tabac et d'*Arabidopsis thaliana*

c) Conclusion

Comparativement aux données acquises chez la levure et les mammifères jusqu'à présent, peu d'informations sont disponibles chez les plantes sur la régulation de la ribonucléotide réductase. Les détails de la régulation transcriptionnelle des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire et du développement de la plante restent donc à être élucidés. Le rôle de la ribonucléotide réductase ainsi que sa localisation subcellulaire en réponse à un dommage à l'ADN n'a pas encore été étudiés.

VI. Objectifs de la thèse

Au vue des premiers résultats obtenus sur la régulation des gènes *NtRNR2* et *NtRNR1b* chez le tabac (Chaboute et al., 2000; Chaboute et al., 2002) et compte tenu de la bibliographie connue chez la levure et chez l'homme, un certain nombre de questions n'avait pas encore trouvé de réponses :

- 1) Comment les éléments E2F du promoteur du gène *NtRNR1a* agissent sur la régulation de son expression dans différents contextes physiologiques ?
- 2) Quels rôles jouent les éléments Myb et Télo, se trouvant dans l'environnement de l'élément E2F du promoteur *NtRNR1b*, dans la corégulation transcriptionnelle associée à l'élément E2F du gène *NtRNR1b* dans différents contextes physiologiques ?

Nous tentons de répondre à ces deux questions au cours des trois premiers chapitres de ce manuscrit sur le plan de la régulation au cours du cycle cellulaire (Chapitre I), du développement du tabac (Chapitre II) mais aussi en réponse à un dommage à l'ADN (Chapitre III).

Une autre question qui pouvait se poser était de savoir s'il existait une régulation de la localisation subcellulaire de la RNR en réponse à un stress génotoxique. Nous répondons en partie à cette question dans le troisième chapitre de ce manuscrit en analysant la localisation subcellulaire de la sous-unité R1a en réponse à un dommage à l'ADN.

Finalement, puisque les gènes *RNR* de tabac sont étroitement régulés par les facteurs E2F, il nous semblait important d'étudier le facteur NtE2F et notamment sa localisation subcellulaire, les partenaires qui lui sont associés ainsi que les éventuelles modifications post-traductionnelles subies en réponse à un dommage à l'ADN. Ce travail fait l'objet de quatrième chapitre de ce mémoire.

Matériels et Méthodes

I. Matériels

1. Matériel de laboratoire

Le matériel en verre, ainsi que les mortiers sont stérilisés pendant 2 heures dans une étuve à 200°C, et le matériel plastique par autoclavage de 30 minutes à 110°C.

Les milieux de cultures, les tampons et les solutions stocks sont autoclavés pendant 30 minutes à 120°C.

2. Matériel vivant

2.1. Matériel végétal

a) Plants de tabac

Les plants de tabac ont été cultivés *in vitro* ou en serre à 25°C avec une photopériode de douze heures de jour et douze heures de nuit.

b) Culture de cellules BY-2

La lignée de cellules de tabac *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 (BY-2) isolée initialement par Kato et coll. (1972) nous a été fournie par le Professeur Toshiyuki Nagata (Université de Tokyo, Japon). Elle est issue de cals induits à partir de jeunes plants selon Nagata et coll. (1992). Elle est repiquée tous les 7 jours: 2 mL de cellules en phase stationnaire de croissance sont transférés dans 80 mL de milieu Murashige et Skoog (MS) supplémenté frais (dilution de 1:40). Le milieu Murashige et Skoog (1962) vient de chez Duchefa (Harlem, Pays Bas). Les cellules sont cultivées sous agitation continue (154 RPM, agitateur New Brunswick Scientific, Edison, NJ, Etats-Unis), à une température ambiante de 27°C et à l'obscurité.

Les lignées BY-2 transformées de manière stable par agroinfection sont cultivées de manière similaire mais dans du milieu MS supplémenté, additionné d'antibiotique(s) en fonction du ou des gène de résistance apporté par la transformation.

Des cultures de 3 jours en phase exponentielle de croissance sont utilisées pour les expérimentations.

Milieu MS supplémenté (pour un litre) :

Micro-éléments : CoCl_2 : 0,025 mg/L ; CuSO_4 0,025 mg/L ; FeNaEDTA 36,70 mg/L ; H_3BO_3 6,20 mg/L ; KI 0,83 mg/L ; MnSO_4 16,90 mg/L ; Na_2MoO_4 0,25 mg/L ; ZnSO_4 8,60 mg/L

Macro-éléments : CaCl_2 332,02 mg/L ; KH_2PO_4 170,00 mg/L ; KNO_3 1,9 g/L ; MgSO_4 180,54 mg/L ; NH_4NO_3 1,65 mg/L

Vitamines : Glycine 2,00 mg/L ; Myo-Inositol 100 mg/L ; Acide nicotinique 0,50 mg/L ; Pyridoxine HCl 0,50 mg/L ; Thiamine HCl 0,10 mg/L.

c) Culture cellulaire d'*Arabidopsis thaliana*

La culture cellulaire d'*Arabidopsis thaliana* est cultivée dans du milieu Gamborg's B5 (Duchefa, G0210) contenant 20 g/L de saccharose et 1 mg/L de 2,4-D à pH 5,7. Les cultures sont placées sur un agitateur rotatif (125 rpm, 25°C). Les cultures sont repiquées stérilement toutes les semaines.

2.2. Matériel bactérien

a) Bactéries de type DH5 α

Le génotype de cette souche est *E44*, Δ .lac U169 (Φ 80 lac Z Δ M15), hsd R17, rec A1, end A1, gyr A 96, thi-1, rel A1). Cette souche est déficiente dans la capacité d'effectuer des recombinaisons. Cette souche est mutée dans l'opéron lactose, et le peptide β de la β -galactosidase, qu'elle exprime, peut être complétée par le peptide α codé par le vecteur pBluescript. Cette complémentation permet la sélection des plasmides recombinants par la couleur des colonies (cf. § 3.1.).

b) Agrobactéries de type LBA4404

Les agrobactéries (*Agrobacterium tumefaciens*), phytopathogènes du sol, sont les agents responsables d'une maladie appelée galle du collet. Elles présentent la particularité de pouvoir transformer génétiquement les cellules végétales cibles (Escobar and Dandekar, 2003) (Sheng and Citovsky, 1996) (Zupan et al., 2000). Elles sont en effet capables de transférer naturellement une partie de leur plasmide Ti (tumor inducing) ou ADN-T, situé entre les frontières répétées droite (RB, «right T-DNA border») et gauche (LB, «left T-DNA border») dans le génome des cellules végétales par recombinaison illégitime.

La souche LBA 4404 (Numéro d'accès auprès de la collection « The Netherlands culture collection of bacteria ») (NCCB) a été utilisée pour la transformation des cellules de tabac BY-2 ainsi que des cultures cellulaires d'*Arabidopsis thaliana*. Elle possède un plasmide Ti pAL4404 désarmé de ses gènes oncogènes. Celui-ci comprend uniquement les gènes de virulence *vir* dont les produits sont responsables de l'intégration de l'ADN-T dans le génome végétal (Ooms et al., 1981) (Hoekema *et al.*, 1983). Cette souche possède également des gènes lui conférant une résistance à la streptomycine, et se cultive à 28°C.

3. Vecteurs

3.1. Vecteur pBluescript KS II (+/-)

Le plasmide pBluescript est un dérivé de pUC19 (Yanisch-Perron et al., 1985). En plus de l'origine de répllication bactérienne ColE1, il possède une origine de répllication d'un phage filamenteux. Les – et + indiquent l'orientation du brin d'ADN qui est synthétisé lors de l'infection par un phage helper. Il contient le gène de la β -lactamase qui apporte une résistance à l'ampicilline aux bactéries transformées par ce vecteur. La cassette de clonage est située au niveau de l'extrémité 5' du gène de la β -galactosidase. Ce dernier est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par l'IPTG. Cette organisation permet de réaliser l' α -complémentation, système de sélection des colonies ayant inséré un fragment d'ADN dans la cassette de clonage. En présence d'IPTG, la β -galactosidase est exprimée et est capable d'hydrolyser le X-gal (un analogue de son substrat naturel le β -galactose) rajouté dans le milieu de culture. Cette hydrolyse libère un produit bleu qui colore les colonies bactériennes.

L'insertion d'un fragment d'ADN dans la cassette de clonage interrompt le gène de la β -galactosidase qui n'est plus produite. Ainsi en présence d'X-gal, les colonies resteront blanches. En plus, ce vecteur possède les promoteurs T3 et T7, situés de part et d'autre de la cassette de clonage. Ces promoteurs permettent la synthèse de transcrits *in vitro* en présence de l'ARN polymérase correspondante.

3.2. Vecteur pLUK07

Le plasmide pLUK07 possède également le gène de résistance à l'ampicilline. Il contient la séquence codant pour la luciférase (*Lucint*) qui comporte un intron afin que le gène de la luciférase ne puisse s'exprimer que chez les eucaryotes. Le gène *Lucint* est bordé en 5' par le promoteur 35S (P 35S) du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et en 3' le terminateur de transcription du gène de la nopaline synthase (T Nos). Le promoteur 35S est bordé par deux sites unique de restriction *KpnI* et *NcoI* afin qu'il puisse être aisément remplacé par un promoteur que l'on veut placer en amont du gène rapporteur de la luciférase.

3.3. Vecteur pCGN1549

Le plasmide pCGN1549 (Calgene) est un vecteur binaire pouvant se répliquer à la fois dans *Escherichia coli* et *Agrobacterium tumefaciens* et pouvant s'intégrer dans le génome des cellules végétales, grâce à ses bordures droite (RB) et gauche (LB) de l'ADN-T. Il porte le gène de résistance à la kanamycine (KanR) qui se trouve entre les bordures droite et gauche de l'ADN-T permettant la sélection des cellules végétales transformées, et le gène de résistance à la gentamycine (GentR) permettant de sélectionner les bactéries transformées. Le fragment d'ADN à cloner peut être inséré dans la cassette de clonage (MCS) qui se trouve entre les bordures droite et gauche de l'ADN-T.

3.4. Vecteur pGREEN0049

Le vecteur pGREEN (Hellens et al., 2000) est basé sur le vecteur de clonage pBluescript dans lequel un ADN-T, contenant une cassette de clonage ainsi qu'un gène *LacZ'*, bordé par les séquences LB et RB, a été introduit. Il contient ainsi une origine de répllication (ColE1) dans *Escherichia coli*. Le gène de résistance à l'ampicilline a été remplacé par le

gène *NptI* (conférant la résistance à la kanamycine).

3.5. Vecteurs pK7FWG2 et pK7GWF2

Les plasmides pK7FWG2 et pK7GWF2 sont des vecteurs binaires de destination Gateway™ (Karimi et al., 2002). Ces vecteurs permettent de produire une protéine de fusion où la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) est placée en C-terminal de la protéine d'intérêt ou en N-terminal, respectivement. Les sites de recombinaisons *attR1* et *attR2*, situés de part et d'autre du gène *CcdB* permettent de remplacer ce gène par la région codante d'un gène d'intérêt en utilisant la technique de clonage Gateway™. Le gène de résistance à la spectinomycine (SpR) permet la sélection du vecteur dans les bactéries transformées et le gène de résistance à la kanamycine (KanR) permet la sélection des cellules végétales transformées.

La Green Fluorescent Protein (GFP) est une protéine de 27 kDa de la méduse *Aequoria victoria*. Elle émet une fluorescence verte lorsqu'elle est excitée par une lumière ultraviolette. Elle possède un pic majeur d'absorption à 395 nm et un pic mineur à 475 nm (utilisé pour exciter la GFP avec un laser 488 nm présent sur le microscope confocal), et un spectre d'émission avec un pic se situant à 509 nm. La détermination de la structure tridimensionnelle de la protéine (238 acides aminés), par diffraction aux rayons X, a révélé une forme en tonneau composé de 11 feuillets β et 4 hélices α (Ormo et al., 1996) (Yang et al., 1996a). Le chromophore situé à l'intérieur de ce tonneau résulte de la cyclisation autocatalytique de trois acides aminés, sérine 65, tyrosine 66 et glycine 67 (Yang et al., 1996a). Cette étape de cyclisation s'effectue sans l'intervention de cofacteurs ou d'enzymes. Une fluorescence peut être directement obtenue par excitation par une lumière ultra-violette ou bleue.

La GFP native n'a pas de propriétés pour une utilisation comme marqueur de protéines dans des systèmes hétérologues. Des mutations ont été introduites dans la séquence codant pour la GFP sauvage afin de modifier ses propriétés spectrales et son intensité de fluorescence. Trois types de mutations ont été appliquées à la GFP pour obtenir l'Enhanced GFP ou EGFP : 1) les mutations qui modifient le spectre d'absorption, c'est le cas de l'isoleucine 167 en thréonine qui augmente fortement l'absorption à 475 nm ; 2) les mutations qui affectent le spectre d'absorption et les caractéristiques de la protéine (acides aminés du chromophore ou proche du chromophore) ; 3) les mutations qui modifient les spectres

d'absorption et d'émission de la protéine (Yang et al., 1996b).

La structure en tonneau de la GFP lui confère une très grande stabilité. Elle est capable de résister à différents traitements dénaturants sans que la fluorescence soit affectée (Bokman et Ward, 1981), et à une large gamme de pH (5,5 à 12). De plus, l'observation de la GFP peut se faire directement sur tissus vivants.

3.6. Vecteur pNEGX1

Le vecteur pNEGX1, développé par le Dr Évrard de l'IBMP, est basé sur le vecteur pUC et apporte une résistance à l'ampicilline. Ce vecteur contient la séquence codante de la EGFP fusionné à l'étiquette E-tag. Cette séquence est bordée en 5' par le promoteur 35S (P 35S) du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et en 3' le terminateur de transcription du gène de la nopaline synthase (T Nos).

4. Oligonucléotides

Les oligonucléotides synthétiques ont été fournis par Eurogentec, Sigma, GibcoBRL et Invitrogen. Les températures d'hybridation ont été calculées grâce au logiciel 'Primer 3' (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi).

Les séquences de tous les oligonucléotides utilisés lors de ces travaux sont données en Annexe ?.

5. Outils informatiques

Les comparaisons de séquences, alignements de séquences et analyses de restriction ont été réalisées à l'aide du logiciel MacVector 8.0 (Oxford Molecular Group).

Les principaux sites utilisés pour les recherches dans les bases de données et les alignements de séquences sont :

NCBI : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

pSORT : <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>

II. Méthodes

1. Techniques de clonage

1.1. Préparation de l'ADN plasmidique

Mini-préparation

Deux mL de milieu de culture LB (Bactotryptone 10g/L, extrait de levure 5g/L, NaCl 10g/L, pH 7,4) contenant l'antibiotique adéquat sont ensemencés à partir d'une colonie bactérienne recombinante. Après une nuit à 37°C sous agitation, le milieu de culture est centrifugé à 10 000 g pendant 2 minutes puis le culot bactérien est resuspendu dans 150 µL de tampon A. Les bactéries sont ensuite lysées par ajout de 300 µL de tampon B et incubées dans la glace pendant 5 minutes. Ce traitement dénature l'ADN chromosomique et les protéines. Les protéines, l'ADN chromosomique et les ARN de poids moléculaires élevés sont précipités par addition de 275 µL de tampon C. Après homogénéisation, les tubes sont placés dans la glace pendant 10 minutes puis centrifugés 10 min à 15000 g à 4°C. L'ADN plasmidique contenu dans le surnageant est extrait avec un volume de phénol/chloroforme 1/1 (v/v) puis précipité par addition de 2,5 volumes d'éthanol 100%. Après lavage à l'éthanol 70% pour éliminer les traces de sel, le culot est séché et repris dans de l'eau stérile (d'après Sambrook et al 1989).

Tampon A : 50 mM glucose, 25 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA

Tampon B : 0,2 M NaOH, 1 % SDS

Tampon C : 5 M acétate de potassium

1.2. Séquençage de l'ADN

Le séquençage de l'ADN a été réalisé par P. Hamann et M. Alioua (service de

séquençage de l'IBMP) avec un appareil 'Applied Biosystems 373 DNA sequencer' (Perkin Elmer). La méthode utilisée est basée sur la technique de Sanger (Sanger et al., 1977).

1.3. Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

Cette technique permet d'amplifier un fragment d'ADN, déterminé par le choix des amorces, de manière exponentielle par des cycles répétés de dénaturation-hybridation-élongation. Un milieu réactionnel de 50 µL comprend :

- 5 pmol de chaque amorce
- 1,5 à 2,5 µM MgCl₂
- 5 µL de tampon PCR 10X (GibcoBRL)
- 200 µM de dNTP
- 1 U de Taq polymérase (n'ayant pas d'activité 5'-3'exonucléase)
- 1-100 ng de la matrice (ADN plasmidique, fragment d'ADN) à amplifier.

La température d'hybridation est choisie dans une plage de 4°C en dessous de la température de fusion des amorces. La PCR sur colonies bactériennes permet de tester rapidement les clones transformés avec le fragment d'ADN d'intérêt. Les bactéries sont prélevées avec un cure-dent qui est trempé dans le milieu réactionnel de PCR puis déposé dans un tube stérile contenant du milieu LB afin d'ensemencer une culture pour préparer l'ADN plasmidique des clones positifs.

Tampon PCR 10x : 200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl

1.4. Électrophorèse sur gel d'agarose

Cette technique permet de séparer des molécules d'ADN selon leur taille. Du tampon de charge A est additionné à la solution d'ADN, qui est ensuite chargée sur un gel d'agarose (0,7 à 2%, selon la résolution désirée) dans lequel a été incorporé du bromure d'éthidium 0,5 µg/mL. L'électrophorèse est effectuée dans du tampon TAE à 10 V/cm. L'ADN, coloré par le bromure d'éthidium intercalé entre les plateaux de bases, est visualisé sous ultraviolets.

Tampon de charge A : 50 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 50% (v/v) glycérol, 0,1 M EDTA, 0,1%

(p/v) SDS, 0,05% (p/v) bleu de bromophénol, 0,05% (p/v) xylène cyanol

Tampon TAE : Tris-acétate 40 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM

1.5. Purification de fragments d'ADN issus de gels d'agarose

Des fragments de gel d'agarose contenant l'ADN d'intérêt peuvent être découpés sous UV. L'ADN est ensuite extrait à l'aide du kit Concert® (Gibco BRL). L'agarose est solubilisé dans du perchlorate de sodium puis l'ADN est retenu par une membrane de silice. L'agarose et les sels du tampon d'électrophorèse résiduels sont éliminés lors d'un lavage avec un tampon contenant de l'éthanol. L'ADN est finalement élué de la membrane par de l'eau stérile ou du tampon TE.

Tampon TE : 30 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA

1.6. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction

Ces endonucléases coupent les molécules d'ADN bicaténaire au niveau de séquences spécifiques et génèrent des fragments avec des extrémités cohésives 5' sortantes, 3' sortantes ou des extrémités franches. Chaque enzyme de restriction présente une activité optimale dans un tampon spécifique et à une température donnée. En général, l'incubation se déroule pendant 2 heures à 37°C.

1.7. Déphosphorylation d'un vecteur

La déphosphorylation empêche un vecteur linéarisé de se refermer sur lui-même lors de l'étape de ligation et favorise ainsi l'insertion du fragment à cloner. La déphosphorylation peut être réalisée par action de la phosphatase alcaline d'intestin de veau qui élimine les phosphates 5' terminaux. Cette enzyme, thermostable, ne présente pas de spécificité étroite pour un tampon d'incubation et peut donc être utilisée immédiatement après digestion par une enzyme de restriction. Classiquement, la phosphatase alcaline est rajoutée au milieu réactionnel à raison de 0,1 U pour 1 µg d'ADN. L'incubation se poursuit pendant 20 minutes à 37°C dans le cas d'extrémité 5' sortantes ou à 55°C dans le cas d'extrémités 3' sortantes ou franches.

1.8. Ligation des fragments d'ADN

Deux fragments d'ADN, digérés avec des enzymes de restriction donnant des extrémités cohésives, peuvent être reliés grâce à l'ADN ligase du bactériophage T4. La quantité d'ADN nécessaire est calculée selon la formule suivante (pour un fragment 1 plus petit que le fragment 2, excès molaire du plus petit fragment : 5 x) :

Quantité de fragment 1 (en ng) = 5 x quantité de fragment 2 (en ng) x (taille du fragment 1 / taille du fragment 2)

La réaction est réalisée dans du tampon ligation avec 3 unités de T4 ADN ligase, 15 h à 15°C. L'ADN est ensuite précipité à l'éthanol, repris dans un petit volume d'eau et une fraction (généralement 1/10^{ème}) de cet ADN est utilisé pour transformer des bactéries compétentes.

Tampon ligation : 30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP

1.9. Transformation de bactéries compétentes par choc thermique ou électroporation

Transformation par choc thermique

Cinq µL de la ligation sont ajoutés à 80 µL de bactéries compétentes préparées selon la méthode d'Inoué *et al.* (1990). Le mélange est incubé 30 minutes dans la glace puis 1 minute 30 secondes à 42°C. Après addition de 500 µL de milieu LB, les bactéries sont incubées 1 heure à 37°C, puis étalées sur milieu LB + Agar supplémenté en antibiotique.

Transformation par électroporation

L'électrotransformation est réalisée à l'aide d'un électroporateur (BioRad) dans des cuves dont les électrodes sont distantes de 2 mm. Le contrôleur d'impulsion est réglé sur 25 µF de capacité et 2,5 kV/cm, la résistance est ajustée à 200 Ω pour des bactéries DH5α et 400

Ω pour des agrobactéries. Un µL de la ligation est ajouté à 40 µL de bactéries compétentes préparées selon la méthode de Dower *et al.* (1988) et l'ensemble est transféré dans la cuve d'électroporation. Après passage du courant électrique, 500 µL de milieu LB sont ajoutés aux bactéries qui sont incubées 30 min à 37°C puis étalées sur milieu gélosé sélectif.

1.10. Analyse des transformants

L'ADN plasmidique des transformants est analysé par électrophorèse après PCR sur colonies et/ou digestion par enzymes de restriction.

1.11. Mutagenèse par PCR

La technique de PCR est utilisée pour remplacer une séquence déterminée par une séquence mutée. Elle nécessite l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable de type Pfu (Stratagene) et de deux amorces oligonucléotidiques spécifiques phosphorylées, portant en leurs extrémités les mutations à introduire. La PCR se déroule en 25 cycles. Lors des premiers cycles, pour déterminer la température d'hybridation des amorces, les nucléotides portant la mutation en 5' des oligonucléotides ne sont pas tenus en compte. Les conditions de l'amplification sont les mêmes que pour une PCR classique.

La Pfu polymérase, purifiée à partir de la bactérie *Pyrococcus furiosus*, est connue pour posséder une activité 3'–5' exonucléase et un taux d'erreur quatre fois plus faible que celui de la Taq polymérase.

Après la réaction de PCR, le produit amplifié correspondant au plasmide linéaire muté est ligué.

2. Méthodes concernant les protéines

2.1. Préparation de complexes protéiques nucléaires de cellules BY-2

La culture cellulaire de BY-2, en phase exponentielle de croissance, est centrifugée 5 minutes à 2000 g. Le culot de cellules est lavé par 3 fois avec du tampon PBS 1X, puis la suspension cellulaire est filtrée sous vide sur du papier Wattman. Les cellules filtrées sont

ensuite broyées en présence d'azote liquide dans un mortier. La poudre ainsi obtenue est alors remise en suspension dans 10 volumes de tampon NGB froid. La suspension est filtrée sur toile à bluter 50 µm et le filtrat est centrifugé 10 minutes à 2000 g à 4°C. Le culot est repris dans 2 volumes de tampon NWB froid et la suspension est centrifugée pendant 30 minutes à 3000 g à 4°C. Cette étape de lavage est répétée trois fois. Après le dernier lavage, les noyaux peuvent être repris soit dans 2 volumes de tampon NWB (en considérant le volume du culot) et 2 volumes de glycérol 100% stérile afin de conserver les noyaux à – 20°C pour de futures expériences, soit repris dans 0,5 volume de tampon NLB afin d'extraire les protéines contenues dans les noyaux. Les noyaux repris dans le tampon NLB sont transférés dans un microtube et soumis à un traitement au sulfate d'ammonium à une concentration finale de 0,5 M. Les tubes sont mis à agiter pendant 30 minutes à 4°C sur roue. Après une centrifugation d'une heure à 5600 g, le surnageant, enrichi en complexes protéiques est dialysé contre du tampon C, à raison de deux changements de tampon en 4 heures.

Les protéines sont ensuite quantifiées par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), puis stockées à – 80°C après congélation dans l'azote liquide.

Tampon PBS 1X : NaCl 140 mM ; KCl 2,7 mM ; K₂H₂PO₄ 1,5 mM ; Na₂HPO₄ pH7,4 6,5 mM

Tampon NGB : Hexylène glycol 1M ; PIPES/KOH pH 7,0 10 mM ; MgCl₂ 10 mM ; Triton X100 0,2 % ; β-mercaptoethanol 5mM ; PMSF 0,8 mM

Tampon NWB : Hexylène glycol 0,5 M ; PIPES/KOH pH 7,0 10 mM ; MgCl₂ 10 mM ; Triton X100 0,2 % ; β-mercaptoethanol 5mM PMSF ; 0,8 mM

Tampon NLB : KCl 110 mM ; HEPES/KOH pH 7,5 15 mM ; MgCl₂ 5 mM ; DTT 1 mM ; PMSF 0,8 mM.

Tampon C : HEPES/KOH pH 8,0 25 mM ; MgCl₂ 5 mM ; KCl 50 mM ; EDTA 0,1 mM ; Glycérol 10 % ; PMSF 0,8 mM ; Pepstatine 0,25 µg/mL ; Leupeptine 0,5 µg/mL.

2.2. Préparation d'extraits protéiques totaux à partir de culture cellulaire de BY-2 ou d'*Arabidopsis thaliana*

Cinquante mL de culture cellulaire de BY-2 ou d'*Arabidopsis thaliana* en phase exponentielle de croissance sont lavés 3 fois par du tampon PBS puis filtrés sous vide sur du papier Whatman. Les cellules filtrées sont broyées dans de l'azote liquide à l'aide d'un mortier. La poudre ainsi obtenue est remise en suspension dans 2 mL de tampon UTCTT dans

un tube conique de 50 mL et incubée une heure dans la glace. La solution obtenue est transférée dans un microtube de 2 mL et centrifugée à 19000 g pendant 30 minutes à 4 °C. Le surnageant est alors précipité par l'ajout de 9 volumes d'acétone pendant la nuit à -20 °C. Le lendemain, le tube est centrifugé pendant 20 minutes à 3000 g à 4 °C. Le culot est lavé par deux fois avec de l'acétone 80 %. Après centrifugation, le culot est repris dans 500 µL de tampon UTCTT puis centrifugé 45 minutes à 50000 à 4 °C. Ces extraits protéiques totaux ont été utilisés pour les expérience d'électrophorèse bidimensionnelle.

La quantité de protéines est quantifiée par la méthode de Bradford.

Tampon UTCTT : Urée 7M ; Thiourée 2M ; CHAPS 4 % ; Triton X100 0,2% ; Tris HCl (pH 8) 20 mM

2.3. Quantification des protéines

La concentration d'une solution de protéine est estimée en utilisant la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Le réactif de Bradford, qui contient du bleu de Coomassie, a une couleur brune à cause du pH bas de cette solution. Le pKa du bleu de Coomassie change lorsqu'il se fixe sur une protéine, et le colorant devient bleu. La concentration en protéine d'une solution est estimée en mesurant son absorbance à 595 nm, en présence du réactif de Bradford (100 µg/L d'échantillon + 1 mL de réactif), et en comparant la valeur obtenue à une courbe standard obtenue avec des concentrations connues de BSA.

Réactif de Bradford : 0,01% (p/v) bleu de Coomassie G-250, 4,7% (v/v) éthanol, 8,5% (v/v) acide orthophosphorique.

2.4. Électrophorèse sur de gel de polyacrylamide

a) Électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les gels utilisés en SDS-PAGE sont composés de deux parties: un gel de concentration et un gel de séparation. Les gels de séparation utilisés sont soit des gels à concentration uniforme (12%, 15%, 20%) ou des gels gradients (10-17% ou 12-20%). Un volume de tampon de charge P X 2 est ajouté aux échantillons et le tout est chauffé 5 min à 100°C. Le β-mercaptoéthanol va réduire les ponts disulfures et le SDS va dénaturer les

protéines et, en se fixant sur les chaînes peptidiques, attribuer une charge nette négative qui va être fonction de la taille de la protéine. Ainsi les protéines sont séparées selon leur masse moléculaire. La migration est réalisée dans du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) sous un ampérage constant de 25 mA.

Gel de concentration : 5% acrylamide/bisacrylamide 37,5/1, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1% (p/v) SDS, 0,1% (v/v) APS, 0,01% (v/v) TEMED

Gel de séparation à x% : x% acrylamide/bisacrylamide 37,5/1, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1% (p/v) SDS, 0,1% (v/v) APS, 0,008% (v/v) TEMED

Tampon de charge P x2 : 100 mM Tris-HCl pH 6,8, 2% (p/v) SDS, 10% (v/v) glycérol, 3% (v/v) β -mercaptoéthanol, 0,1% (p/v) bleu de bromophénol

Tampon Laemmli : 25 mM Tris-base, 250 mM glycine pH 8,3, 0,1% (p/v) SDS

b) Électrophorèse bidimensionnelle (IEF-SDS-PAGE)

Cette méthode permet de séparer des protéines selon leur pI puis d'après leur poids moléculaire. Les protéines sont précipitées 15 h avec de l'acétone 100%. Après centrifugation 10 min à 15000 g, le culot est lavé avec de l'acétone 80%, séché à l'air puis repris dans du tampon de réhydratation (300 μ L pour les gels de 17 cm, 150 μ L pour les gels de 7 cm).

La première dimension est réalisée dans des bandelettes à gradient de pH (ReadyStrip™ IPG, Biorad). Ces bandelettes sont composées d'un gel déshydraté fixé sur un support solide. Le gel est réhydraté de manière active (8-10 h à 50 V) avec la solution protéique. Puis la migration des protéines est réalisée, selon les instructions du fournisseur, en trois étapes : conditionnement à 250 V pendant 1 h, montée en voltage pendant 2 à 5 h jusqu'au voltage maximum (8000 V pour les bandelettes de 7 cm, 10000 V pour les bandelettes de 17 cm) puis fin de focalisation au voltage maximum pendant 1 h. Pendant la migration, l'ampérage est maintenu constant à 50 μ A/bandelette.

Les protéines présentes dans les bandelettes sont ensuite réduites dans du tampon de réduction (15 min à 20°C) et alkylées dans du tampon d'alkylation (15 min à 20°C) puis elles sont déposées sur un gel de séparation SDS-PAGE. De l'agarose 1% permet de sceller la bandelette sur le gel de concentration. La migration est réalisée selon les conditions habituelles pour un gel SDS-PAGE.

Tampon de réhydratation : 8 M urée, 2% (p/v) CHAPS, 0,5% (p/v) ampholytes Bio-Lyte® 3/10 ou 7/10 (BioRad), 0,001% bleu de bromophénol

Tampon de réduction : 6 M urée, 2% (p/v) SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 20% (p/v) glycérol, 2% (p/v) DTT

Tampon d'alkylation : 6 M urée, 2% (p/v) SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 20% (p/v) glycérol, 2,5% iodoacétamide, 0,001% bleu de bromophénol

2.5. Détection des protéines

a) Coloration au bleu de Coomassie

Après migration, les protéines séparées sur gel de polyacrylamide peuvent être fixées et colorées avec une solution de coloration. L'excès de colorant est éliminé dans un mélange Ethanol 20% (v/v)/Acide acétique 10% (v/v).

Solution de coloration : 0,125% (p/v) bleu de Coomassie, 10% (v/v) acide acétique, 25% (v/v) éthanol

b) Coloration au bleu colloïdal

Cette méthode dérivée du protocole de Neuhoff (Neuhoff et al., 1988) est plus sensible que la coloration au bleu de Coomassie. Le gel de polyacrylamide est fixé, après migration, une heure dans du TCA 12% (v/v). Après élimination du TCA, le gel est coloré avec la solution G250 sous légère agitation. Le temps de coloration (12 h à une semaine) dépend de la sensibilité désirée, la solution G250 est remplacée toutes les 24 heures. Après coloration, le gel est rincé avec une solution de méthanol 25% (v/v) pour nettoyer la surface du gel.

Solution G250 : 3% (v/v) acide orthophosphorique 85%, 6% (p/v) sulfate d'ammonium, 0,1% G250 stock.

G250 stock : Cette préparation est une suspension obtenue par dissolution d'une pépète de bleu de Coomassie dissoute dans 50% (v/v) éthanol, 10% (v/v) acide acétique. La pépète de bleu de Coomassie se prépare de la manière suivante : 10 g de bleu de Coomassie G250 sont repris dans 250 mL d'acide acétique 7,5% (v/v) à 70°C, puis du sulfate d'ammonium est rajouté jusqu'à ce que la solution devienne claire. La solution est refroidie à 20°C et le surnageant est

éliminé.

c) Coloration au nitrate d'argent

La coloration au nitrate d'argent permet de détecter une faible quantité de protéines présente dans le gel. Cette technique est de 100 à 1000 fois plus sensible qu'une coloration au bleu de Coomassie. Cette technique repose sur la réduction, facilitée par la présence de protéines, de sels d'argent en argent métallique (qui précipite) interagissant avec la chaîne latérale des acides aminés. Cette coloration est cependant sensible à plusieurs facteurs et ne colore pas toutes les protéines de façon égale.

Les protéines sont fixées dans le gel d'acrylamide par trois bains successifs de 15 minutes dans une solution de TCA 12 %, puis par trois bains successifs de 15 minutes dans une solution de méthanol 5 % permettant de précipiter les protéines dans l'acrylamide. Le gel est ensuite plongé dans une solution de thiosulfate de sodium 40 mg/L pendant une minute à une 1 minute 30. Cette étape permettra à l'argent de se fixer à la chaîne latérale des acides aminés. Le gel est ensuite soumis à un traitement au nitrate d'argent de 30 à 40 minutes durant lequel les molécules d'argent vont se fixer sur la chaîne latérale des acides aminés. Enfin, les protéines seront révélées par un bain dans une solution de carbonate de sodium 3 % p/v. La coloration se fait progressivement jusqu'à obtention de la coloration voulue. La réaction est arrêtée par un bain dans une solution d'acide acétique 10 % / éthanol 25 % (v/v). Lors de cette réaction, les molécules d'argent fixées aux chaînes latérales des acides aminés sont réduites par le carbonate de sodium. Les protéines présentes dans le gel deviennent alors visibles.

Solutions de fixation : TCA 12 % (v/v)

Méthanol 5 %

Solution de sensibilisation : $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 40 mg/L

Solution de coloration : AgNO_3 0,2 % (p/v) ; formaldéhyde 0,075 % (v/v)

Solution de révélation : Na_2CO_3 3 % (p/v) ; formaldéhyde 0,05 % (v/v) ; $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 2 mg/L

Entre chaque étape, le gel est rincé 3 fois pendant une minute dans de l'eau.

2.6. Transfert des protéines sur membrane PVDF

Cette technique permet de transférer des protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane microporeuse de 0,45 µm de PVDF (Immobilon, Millipore). La membrane est mouillée dans du méthanol 100% puis rincée dans du tampon de transfert. Un sandwich est réalisé, avec de la cathode vers l'anode, un Scotch Brite[®], deux feuilles de papier filtre Whatman[®], le gel, la membrane et à nouveau deux feuilles de papier filtre Whatman[®] et un scotch Brite[®]. Chaque élément du sandwich a été trempé, au préalable dans du tampon de transfert. L'électrotransfert est réalisé en milieu liquide dans un container (tank transfer system, BioRad) sous un ampérage constant de 250 mA, sous agitation à 4°C pendant 70 minutes.

Après le transfert, la membrane peut être colorée dans une solution de bleu de Coomassie afin de visualiser les protéines transférées.

Tampon de transfert : 25 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 250 mM Glycine

Solution de coloration : 0,1 % (p/v) bleu de Coomassie R250, 50% (v/v) méthanol, 7% (v/v) acide acétique

Solution de décoloration : 50% (v/v) méthanol, 7% (v/v) acide acétique

2.7. Immunodétection (Western-Blot)

La membrane est incubée dans du tampon bloquant pendant une heure à température ambiante sous agitation afin de saturer les sites de fixation aspécifiques. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps primaire (de lapin ou de souris) pendant la nuit à 4°C ou deux heures à température ambiante sous agitation douce dans du tampon anticorps. Après trois lavages de 15 minutes dans du tampon PBS-T afin d'éliminer les anticorps non attachés, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire (de chèvre anti-souris ou de chèvre anti-lapin, couplé à peroxydase de raifort) dans du tampon anticorps pendant 1 heure sous agitation douce à température ambiante. La membrane est à nouveau lavée 3 fois dans du tampon PBS-T pendant 15 minutes, puis révélée par grâce au kit ECL (Enhanced Chemical Luminescence) Western blotting detection system (Amersham) d'après les indications du fournisseurs.

Dans certains cas, les membranes peuvent être réutilisées. Pour cela, les anticorps sont décrochés par incubation dans une solution contenant du Tris-HCl 1 M pH 6,8, du SDS

2% et du β -mercaptoéthanol 0,7%, 30 min à 50 °C. Les membranes sont lavées avec du PBS-T.

Tampon PBS-T : 80 mM Na_2HPO_4 , 20 mM NaH_2PO_4 pH 7,5, 100 mM NaCl, 0,2% (v/v) Tween-20

Tampon bloquant : 5% (p/v) lait écrémé en poudre dans du PBS-T

Tampon anticorps : 2% (p/v) lait écrémé en poudre dans du PBS-T

3. Méthodes de biochimie

3.1. Marquage radioactif d'un oligonucléotide double brin d'ADN

a) Marquage en 5' d'une sonde d'ADN double brin

La composition du milieu réactionnel est la suivante

- 50 pmol d'ADN à marquer
 - 5 μL de tampon Kinase 10 X
 - 1 μL de Polynucléotide Kinase T4
 - 150 μCi de γ - ^{32}P -ATP
- eau distillée qsp 50 μL

Ce milieu réactionnel est incubé pendant une heure à 37°C, puis la réaction est arrêtée par l'addition de 50 μL de tampon TE. La sonde est ensuite purifiée sur une colonne de résine SephadexTM G50 (Amersham) par centrifugation (trois minutes, 800 g à 4°C) afin d'éliminer la radioactivité libre. La radioactivité de la sonde est déterminée par comptage.

b) Marquage par remplissage par le fragment de Klenow

La composition du milieu réactionnel est la suivante :

- 50 pmol d'ADN à marquer
- 1 μL de dATP, dTTP et dGTP (10 mM stock)
- 2,5 μL de tampon Klenow
- 25 μCi de α - ^{32}P -CTP

- 1 μ L de fragment de Klenow
eau distillée qsp 25 μ L

Le milieu réactionnel est incubé pendant quarante minutes à 37°C, puis la réaction est arrêtée par l'addition de 25 μ L de tampon TE. La sonde est ensuite traitée comme précédemment.

3.2. Southwestern blot

Cette technique permet de mettre en évidence des interactions entre un oligonucléotide radiomarqué et des protéines séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane. La membrane est lavée deux fois une heure dans du tampon de renaturation, afin d'éliminer le SDS présent sur la membrane et de renaturer les protéines transférées. La membrane est ensuite saturée dans du tampon de saturation à température ambiante pendant deux heures. La réaction de fixation est réalisée dans le même tampon avec l'oligonucléotide radiomarquée (6.10^6 cpm/mL) à température ambiante pendant une heure. La membrane est alors lavée par trois fois dans du tampon de saturation ne contenant pas de lait, puis révélée par autoradiographie.

Tampon de renaturation : 50 mM NaCl ; 10 mM Tris-HCl pH 7,0 ; 20 mM EDTA ; 0,1 mM DTT ; 4 M urée

Tampon de saturation : 50 mM NaCl ; 10 mM HEPES pH 7,9 ; 0,1 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 5 % (p/v) lait écrémé en poudre

3.3. Gel retard ou EMSA (Electromobility Shift Assay)

Le gel retard est une technique permettant de mettre en évidence des interactions entre une séquence nucléotidique et une protéine (ou un complexe protéique). Cette technique est basée sur le fait qu'un complexe ADN-protéine migre plus lentement sur gel non dénaturant que l'ADN « libre ». Dans une réaction de gel retard classique, un oligonucléotide double brin marqué au 32 P contenant le site cible putatif est incubé avec un extrait protéique puis passé sur gel de polyacrylamide non dénaturant. Si une ou plusieurs protéines contenues dans l'extrait se fixent sur la séquence cible du fragment d'ADN marqué, le fragment est « retardé » dans sa migration et apparaît sur l'autoradiographie avec un poids moléculaire supérieur à celui de l'ADN libre.

La composition du mélange réactionnel est la suivante :

- x µg de protéines
 - 20 000 cpm/µL de sonde marquée au ³²P
 - 0,05 % de Nonidet NP-40
 - 1 µg Poly(dIdC)-poly(dIdC)
- tampon C qsp 20 µL

La NP-40 est un détergent dont la présence empêche la formation d'agrégats protéiques. Le Poly(dIdC)-poly(dIdC) permet de réduire les interactions aspécifiques qui pourraient se produire entre les protéines et la sonde d'ADN.

Le mélange réactionnel est ensuite incubé pendant trente minutes sur glace, puis déposé sur gel de polyacrylamide 10 % (Acrylamide/Bisacrylamide :37,5/2) non dénaturant en présence d'un microlitre de tampon de charge pour ADN. La migration s'effectue pendant quatre heures à une température de 4°C dans du tampon TBE X 0,5, sous un voltage de 8-10 V/cm.

Le gel est ensuite séché, puis exposé sous film autoradiographique ou sous une plaque de Phosphoimager afin de visualiser les signaux présents.

Tampon C : HEPES KOH pH 8,0 25 mM ; MgCl₂ 5 mM ; KCl 50 mM ; EDTA 0,1 mM ; Glycérol 10 % ; PMSF 0,5 mM ; Pepstatine 0,25 µg/mL ; Leupeptine 0,5 µg/mL.

Tampon TBE X 10 : Tris Base 0,89 M ; Acide borique 0,89 M ; EDTA 23 mM pH 8,0

4. Méthodes de transformation de cellules de plantes

4.1. Transformation stable par *Agrobacterium tumefaciens*

La souche bactérienne transgénique est mise en culture dans du milieu LB supplémenté de rifampicine (100 µg/L) et d'un antibiotique permettant la sélection du plasmide. La culture se fait à 28°C sous agitation jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 1,5. Les bactéries sont ensuite lavées par 10 mL de milieu LB puis le culot est repris, après centrifugation, par 3 mL de milieu LB.

Quatre mL de cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance sont alors mis en contact avec 50 µL d'agrobactéries dans une petite boîte de Pétri en présence

d'acétoseringone (200 μ M finale). L'acétoseringone active les gènes *vir* (gènes impliqués dans la virulence de l'agrobactérie). Les co-cultures sont incubées pendant 48 heures à 28°C et à l'obscurité.

Après 48 heures, les cellules sont transférées dans des tubes Falcon et lavées par 40 mL de milieu BY-2. Après une centrifugation de 5 minutes à 300 g, le culot de cellules est repris dans 6 mL de milieu BY-2 puis étalé sur milieu MS gélosé (1,5 % agar) supplémenté de carbénicilline (500 μ g/mL), permettant d'éliminer les bactéries et d'un antibiotique en fonction du gène de résistance apporté par la transformation.

Après 3 semaines à 28°C et à l'obscurité, des cals de quelques millimètres de diamètre apparaissent. L'ensemble des cals est alors transféré dans 100 mL de milieu BY-2 contenant de la carbénicilline et de la kanamycine (500 μ g/mL et 100 μ g/mL respectivement).

La méthode utilisée pour transformée des cellules d'*Arabidopsis thaliana* est la même que celle décrite ci-dessus.

4.2. Transformation transitoire par biolistique

Trois jours après repiquage, 4 à 5 mL de cellules BY-2 sont filtrés sur une rondelle de papier Whatman 3MM. La rondelle avec les cellules est transféré sur milieu de plasmolyse pendant deux heures à 24°C à l'obscurité.

L'ADN servant à la transformation des cellules est précipité sur des billes de tungstène. Les billes de tungstène (M17 de Bio-Rad) sont stérilisées dans 500 μ L d'éthanol absolu pendant 20 minutes. Deux mg de billes sont ensuite remises en suspension dans le milieu suivant, prévu pour deux boîtes de cellules à transformer (33 μ L de glycérol 50 % ; 8 μ g d'ADN, 33 μ L de CaCl₂ 2 M ; 15 μ L de spermidine 2 M).

Après 20 minutes d'incubation, les billes sont lavées à l'éthanol 70 %, puis à l'éthanol 100 %. Après la centrifugation du dernier lavage, les billes sont remises en suspension dans 28 μ L d'éthanol 100 %. Six μ L de billes recouvertes par l'ADN sont placés dans une buse qui va servir à les projeter sur la boîte contenant la rondelle de papier Whatman portant les cellules à bombarder. Le dispositif est placé dans la chambre de bombardement sous vide. Les billes sont alors projetées sur les cellules sous une pression de 70 bars. Deux tirs sont effectués par boîte, avec une rotation de 180° de la boîte entre chaque tir. Les cellules sont alors incubées à l'obscurité à 24°C puis observées 5 heures après bombardement.

4.3. Observation des cellules transformées au microscope confocale

Les cellules BY-2 bombardées exprimant les gènes codant pour la EGFP et présentant une fluorescence à la loupe binoculaire sont remises en suspension dans du milieu BY-2 puis déposées entre lames et lamelles. L'observation est réalisée avec un microscope confocal à épifluorescence Zeiss Axiovert 100M lié au logiciel d'acquisition d'images Zeiss LSM 510.

Afin d'exciter et d'observer spécifiquement ces composés, le microscope possède un laser Argon (476 à 501 nm) et deux lasers Hélium Néon (HeNe) (638 nm) et des filtres AOTF permettant de sélectionner les différents lasers et de régler leur intensité. Un miroir dichroïque reflète le faisceau d'excitation et laisse passer le faisceau d'émission, enfin un filtre d'arrêt contrôle les longueurs d'ondes émises par l'objet.

5. Méthode concernant la mesure de l'activité luciférase

5.1. Synchronisation de cellules BY-2

a) Blocage à l'aphidicoline

Vingt mL de cellules BY-2 en phase stationnaire (âgées de sept jours) sont repiqués dans 80 mL de milieu BY-2 contenant 3 µg/mL d'aphidicoline, bloquant les cellules dans l'étape d'élongation de la réplication de l'ADN en phase S. Après 24 heures de culture, les cellules sont filtrées sur toile à bluter de maille 45 µm, lavées vigoureusement par deux litres d'une solution de saccharose (30 g/L), afin d'éliminer l'aphidicoline, puis remises en culture dans 100 mL de milieu de BY-2. Des échantillons sont prélevés toutes les heures afin de suivre les paramètres de synchronisation, c'est-à-dire l'index mitotique et la synthèse d'ADN.

b) Mesure d'index mitotique

Pour chaque prélèvement, dix µL de culture sont mélangés à dix µL d'une solution de DAPI 0,1 µg/mL et Triton X100 0,1 % puis déposés entre lame et lamelles. Le DAPI est un fluorochrome qui se fixe sur l'ADN permettant de visualiser et de compter les cellules dans les différentes phases de mitoses par observation microscopique sous un éclairage ultraviolet

(filtre d'excitation 330-380 nm ; filtre d'émission supérieur à 420 nm). Le comptage se fait sur 300 cellules.

Index mitotique (en %) = (nombre de cellules en mitose) / (nombre total de cellules) X 100

c) Mesure de la synthèse d'ADN

Pour chaque prélèvement, un mL de suspension cellulaire est incubé avec un μCi de $[^3\text{H}]$ dTTP (Amersham, 118 Ci/mmol) pendant trente minutes à 27°C, à l'obscurité sous agitation. Après centrifugation à 2000 g pendant cinq minutes, le culot est lavé deux fois avec un mL de milieu BY-2 et centrifugé cinq minutes à 2000 g, puis congelé dans l'azote liquide et stocké à -80°C. Le culot de cellules est broyé dans 500 μL de TCA 10 % supplémenté de dTTP froid (0,1 mM finale) puis incubé une heure à 4°C pour précipiter les protéines. Après 5 minutes de centrifugation à 1200 g, le précipité est lavé par 500 μL d'éthanol 70 %, puis centrifugé 2 minutes à 1200 g et repris dans 500 μL d'éthanol 70 %. Une fraction de 50 μL est alors prélevée pour le dosage des protéines tandis que le reste de l'échantillon servira à mesurer la quantité de thymidine tritiée incorporée. Les deux fractions sont centrifugées et les culots lavés avec 500 μL d'acétone puis centrifugés 10 minutes à 2000 g avant d'être séché pendant une heure environ à 37°C.

Pour le dosage des protéines, le culot est repris dans 80 μL de NaOH 0,1 M puis laissé une nuit à 37°C. Une fraction de quelques microlitres est utilisée pour le dosage protéique par la méthode de Bradford.

Pour mesurer la quantité de thymidine tritiée incorporée, le culot est repris dans 200 μL de BTS (Beckman Tissue-Solubilizer-450), solubilisé pendant deux heures à 50°C, puis incubé à 37°C pendant la nuit. La totalité de la solution est transférée dans une fiole de comptage dans laquelle on ajoute 6 mL de liquide de scintillation NA (Beckman), puis on mesure la scintillation pendant une minute. La quantité de dTTP marqué incorporé est ensuite normalisée par rapport à la quantité de protéine contenue dans l'échantillon.

Quantité de dTTP marqué incorporé = nombre de coups par minute / quantité de protéines

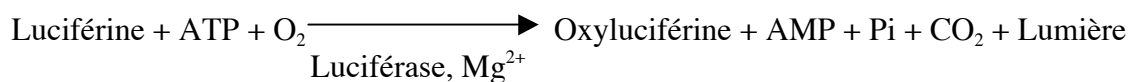
5.2 Étude de la réponse transcriptionnelle d'un gène à différents traitements

Cent mL de cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance ou vingt mL de cellules BY-2 en phase stationnaire diluée dans 80 mL de milieu BY-2 exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur étudié sont traités à la bléomycine (10^{-5} M) ou irradiés aux rayons UV-C (450 J/m^2) ou par de l'auxine (2,4-D $10 \mu\text{M}$). Le temps voulu après traitement, deux mL de suspensions cellulaires sont prélevés afin de mesurer l'activité luciférase.

5.3. Utilisation du kit de mesure de l'activité luciférase (Tropix, Applied Biosystems)

Deux mL de suspensions cellulaires sont prélevés puis lavés deux fois par du tampon PBS 1x. Le culot, obtenu après une centrifugation de cinq minutes à 2000 g, est repris dans 200 μL de tampon de lyse supplémenté de DTT (1 mM final), permettant de lyser les cellules. Après 5 minutes de centrifugation à 2000 g, le surnageant est congelé dans l'azote liquide puis stocké à -80°C .

Vingt μL du surnageant sont incubés avec 100 μL de substrat A (Tropix, contenant de l'ATP et du Mg^{2+}) pendant 10 minutes à températures ambiante. Après addition de cent μL de substrat B (Tropix, contenant le substrat de la luciférase: la luciférine), il y a émission de lumière (voir réaction ci-dessous) qui est mesurée au luminomètre (Tropix TR717, Applied Biosystems).



La quantité de lumière mesurée est proportionnelle à la quantité de luciférase présente dans le milieu réactionnel.

Tampon PBS : NaCl 140 mM ; KCl 2,7 mM ; $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 1,5 mM ; Na_2HPO_4 pH 7,4 6,5 mM

6. Méthode concernant la mesure de l'activité GUS

6.1. Utilisation du kit de mesure de l'activité GUS (Tropix, Applied Biosystems)

Les différents tissus de plantes ont été broyés dans l'azote liquide et repris par 200 μ L de tampon de lyse. Après deux minutes de centrifugation à 10 000 g, le surnageant est stocké à 4°C. Vingt μ L de chaque échantillon sont incubés avec 70 μ L de tampon de réaction (Applied Biosystems) pendant quinze minutes à température ambiante. Après addition de cent μ L de tampon accélérateur (Applied Biosystems), le signal est lu par le luminomètre. L'activité GUS mesurée a été normalisée par rapport à la quantité de protéines contenue dans les échantillons.

Tampon de lyse : Phosphate de sodium (pH 7,0) 50 mM ; EDTA 10 mM ; Sarkosyl 0,1 % ; Triton X100 0,1 %

Tampon de réaction : Phosphate de sodium (pH 7,0) 0,1 M ; EDTA 10 mM ; GlucuronTM 1X

Tampon accélérateur : tampon contenant l'amplificateur EmeraldTM

6.2. Analyse histochimique

La coloration GUS histochimique a été effectuée sur différents tissus de plantes. Les tissus ont été mis en présence d'une solution X-Gluc pendant la nuit à 37°C. L'enzyme β -glucuronidase transforme le X-Gluc en acide glucuronique et en CIBr-indigo donnant la coloration bleue. Les échantillons ont ensuite été lavés par plusieurs bains d'éthanol de pourcentage croissant (50%, 70% et 95%).

Solution X-Gluc : acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronique (X-Gluc) 1mM ; Tampon phosphate (pH 7,0) 100 mM ; EDTA 10 mM ; EDTA 10 mM ; Triton X100 0,1 % ; Ferricyanide 0,5 mM ; Ferrocyanide 0,5 mM.

Premier Chapitre

Analyse fonctionnelle de l'expression des gènes *NtRNR1a* et
NtRNR1b au cours du cycle cellulaire

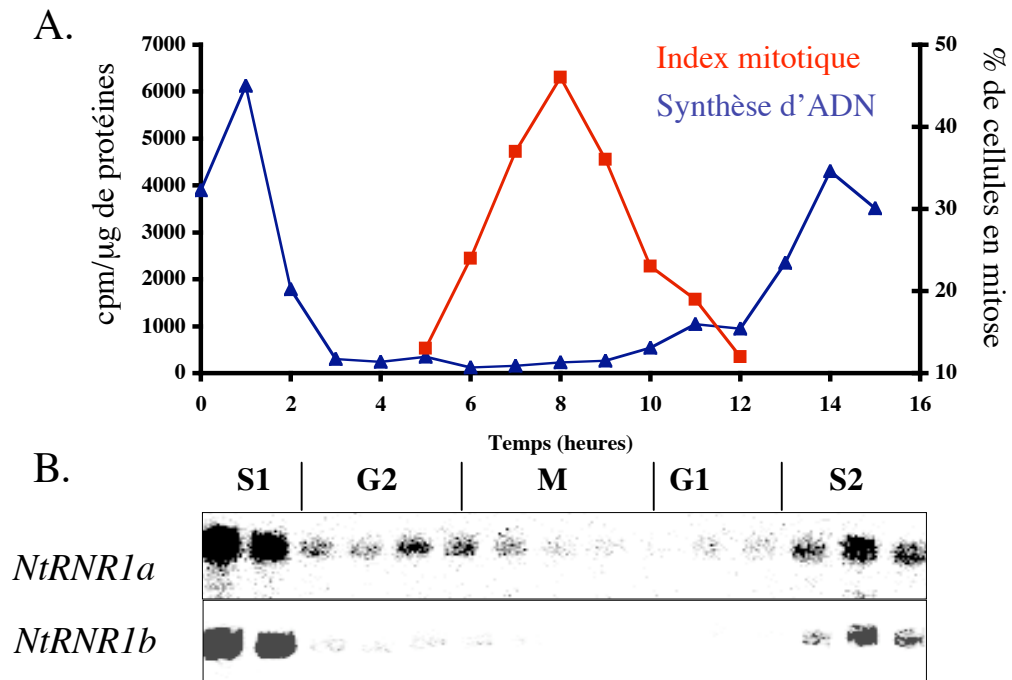


Figure 23: Variation du taux de transcrits *NtRNR1a* et *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire

Les cellules BY-2 ont été synchronisées par un traitement à l'aphidicoline.

A. L'index mitotique et la synthèse d'ADN ont été mesurés toutes les heures afin de situer les différentes phases du cycle cellulaire dans la cinétique.

B. Northern blot utilisant une sonde spécifique des transcrits *NtRNR1a* ou *NtRNR1b*

(Chabouté ME et al. 2002 JBC)

Lors de mon arrivée au laboratoire, la thématique générale du laboratoire était centrée sur l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour la ribonucléotide réductase (ou RNR) chez le tabac.

Des résultats antérieurs à mon arrivée avaient montré que l'expression des gènes *RNR* était régulée au cours du cycle cellulaire avec une expression maximale en phase S du cycle cellulaire (Chaboute et al., 1998). Toutefois, l'utilisation de sondes spécifiques permettant de détecter les transcrits des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* a permis de montrer par Northern blot que le gène *NtRNR1b* était spécifiquement exprimé en phase S (Chaboute et al., 2002) alors que le gène *NtRNR1a* était également exprimé non seulement en phase S mais également à la transition G2/M (Figure 23). Cette induction pourrait traduire l'implication de ce gène dans la réparation de l'ADN avant l'entrée en mitose.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit, nous allons traiter de la régulation transcriptionnelle au cours du cycle cellulaire des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* codant pour la grande sous-unité régulatrice R1 de la ribonucléotide réductase (RNR) chez le tabac.

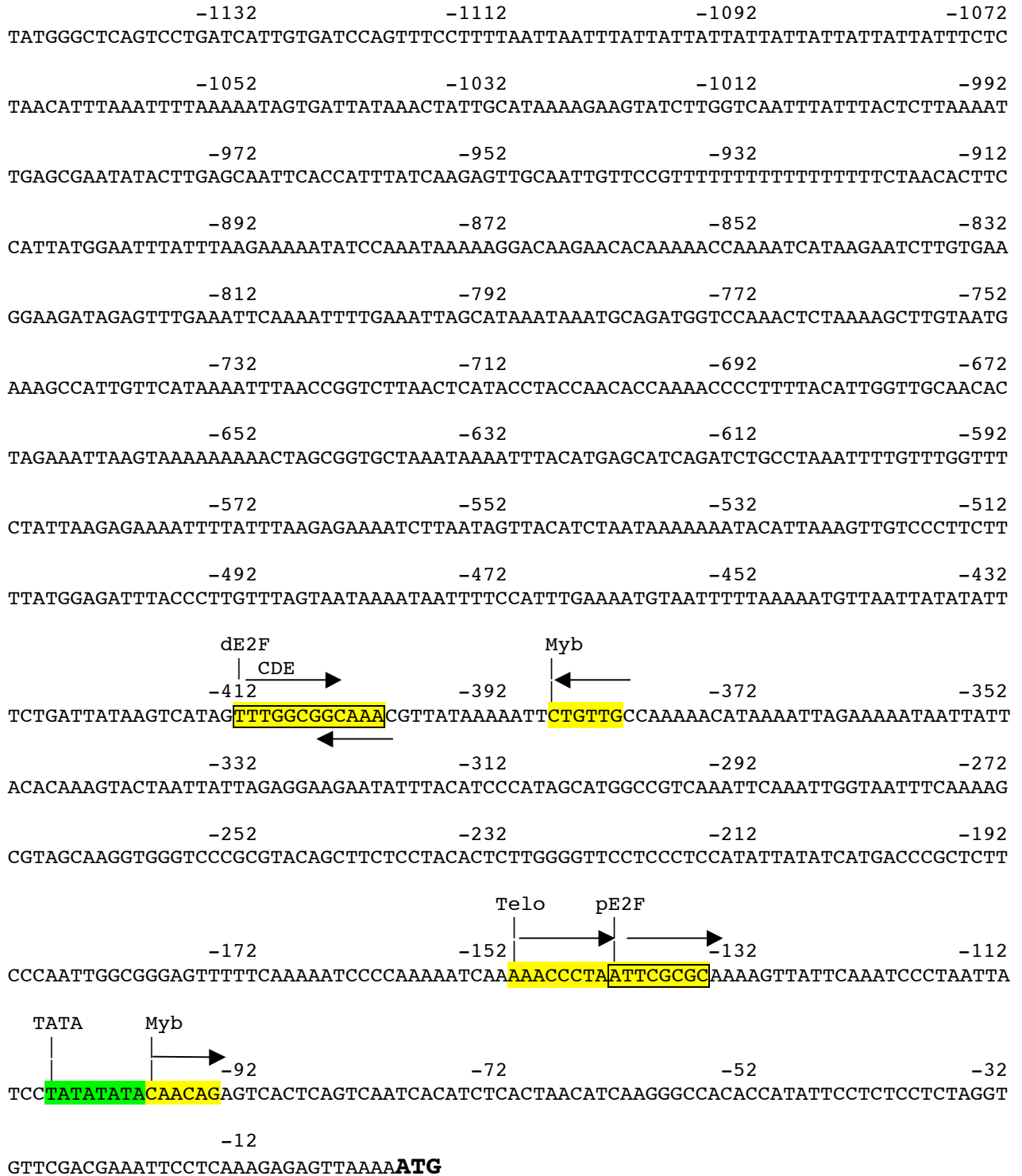


Figure 24: Séquence nucléotidique du promoteur du gène *NtRNR1a*

Les flèches indiquent les orientations des cis-éléments surlignés en jaune. La boîte TATA potentielle est surlignée en vert. Le codon ATG initiateur est en gras. La position de chaque élément est calculée de manière régressive à partir du codant ATG initiateur.

I. Structure des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b*

L'analyse de la séquence du promoteur du gène *NtRNR1a* révèle la présence de deux cis-éléments E2F comme c'est le cas dans différents promoteurs de gènes chez les plantes (Figure 24). Il a été montré que deux éléments E2F peuvent jouer des rôles différents dans la régulation de l'expression d'un gène (Ramirez-Parra et al., 2003) (Stevens et al., 2002) (Diaz-Trivino et al., 2005). Chez le promoteur *NtRNR1a*, les deux cis-éléments E2F consistent en un élément E2F proximal (pE2F) simple (ATTCGCGC) et en un élément E2F distal (dE2F) composite formé d'un élément E2F en orientation inverse chevauchant un cis-élément CDE en orientation directe (TTTGGCGGC). Ce type de cis-élément composite est également retrouvé dans le promoteur du gène *NtRNR2* (Chaboute et al., 2000) ainsi que dans le promoteur du gène *NtPCNA* (Egelkrou et al., 2001). Les éléments pE2F et dE2F se situent, respectivement, à 143 pb et à 413 pb en amont de l'ATG. En plus de ces deux cis-éléments E2F, d'autres éléments sont trouvés dans le promoteur : deux cis-éléments Myb potentiels sont retrouvés à proximité de chaque élément E2F (-100 pb et -385 pb de l'ATG), ainsi qu'un cis-élément Télo situé juste avant le cis-élément pE2F.

Jusqu'à présent, chez les plantes, il a été montré que le cis-élément Myb jouait un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les cyclines de type B à la transition G2/M du cycle cellulaire. L'élément Myb est appelé MSA (M-Specific Activator) et est nécessaire et suffisant à l'activité du promoteur à la transition G2/M du cycle. Par des expériences de double-hybride, des interactants spécifiques du cis-élément MSA ont été identifiés. Il s'agit des facteurs de transcription Myb-like (Ito et al., 2001).

Chez les plantes, le cis-élément Télo a été initialement identifié dans le promoteur de gènes codant pour des composants de l'appareil traductionnel dans des cellules en divisions, et il a été montré qu'il régule l'expression de gènes en synergie avec d'autres cis-éléments (Manevski et al., 2000). Les cis-éléments Télo ont une séquence similaire aux séquences télomériques retrouvées aux extrémités des chromosomes. Ces séquences télomériques internes peuvent donc être une relique de la fusion de deux séquences télomériques (Ijdo et

al., 1991) ou résulter d'un événement de recombinaison entre une séquence télomérique et une séquence interne (Regad et al., 1994). Une autre étude a montré que cet élément Télo pourrait interagir avec un facteur protéique appelé Pur α (Tremousaygue et al., 2003). Chez les mammifères, ce facteur Pur α pourrait interagir avec le facteur E2F1 induisant la diminution de la capacité transactivatrice du facteur E2F1 (Darbinian et al., 1999).

Le promoteur du gène *NtRNR1a* présente donc une organisation complexe. Ainsi, notre étude a consisté en l'analyse du rôle de chaque cis-élément E2F, c'est-à-dire les éléments pE2F et dE2F, dans la régulation de l'expression du gène *NtRNR1a* au cours cycle cellulaire.

L'analyse de la séquence du promoteur *NtRNR1b* a révélé la présence d'un cis-élément E2F (GCGGGAAA) dans la région 5' non traduite du gène (Figure 25). Des expériences de gel retard ont montré que ce cis-élément interagissait spécifiquement avec un complexe protéique comprenant un facteur E2F. Enfin, en utilisant le gène rapporteur codant pour la luciférase, il a été montré que le promoteur du gène *NtRNR1b* était fortement actif dans les tissus méristématiques de plantes, c'est-à-dire les tissus en fortes divisions, ainsi qu'en phase S du cycle cellulaire dans des cellules BY-2 de tabac synchronisées. La mutation du cis-élément E2F réduit fortement l'activité du promoteur dans des tissus en divisions, mais seulement de moitié l'activité de ce promoteur en phase S dans des cellules synchronisées. Par conséquent, ce cis-élément E2F est essentiel à une activité maximale du promoteur, toutefois, sa mutation ne permet pas de réduire l'activité du promoteur à son niveau basal ce qui suggère l'implication d'autres cis-éléments dans la régulation de l'activité du promoteur en phase S du cycle cellulaire (Chaboute et al., 2002). Une analyse plus fine du promoteur avait révélé la présence de cis-éléments additionnels entourant ce cis-éléments E2F : un cis-élément Myb (CAACAG) situé en aval et un cis-élément Télo (AAACCCTA) situé en amont du cis-élément E2F.

Ces données nous permettent d'émettre l'hypothèse que cet élément Télo pourrait moduler l'activité transcriptionnelle du facteur E2F sur le promoteur du gène *NtRNR1b* comme chez les mammifères. Par ailleurs, des résultats de « footprinting *in vivo* » sur le promoteur *NtRNR2* avaient montré une protection d'un élément Myb et d'un élément E2F à la transition G1/S du cycle cellulaire (Chaboute et al., 2000) suggérant que ces deux éléments pourraient être impliqués dans la régulation du promoteur *NtRNR1b*.

Comparativement aux promoteurs *NtRNR2* et *NtRNR1a*, le promoteur du gène *NtRNR1b* présente une organisation simple, c'est-à-dire un cis-élément E2F entouré par un cis-élément Myb et un cis-élément Télo (Figure 25) permettant d'étudier les rôles de ces cis-éléments dans la régulation transcriptionnelle du gène.

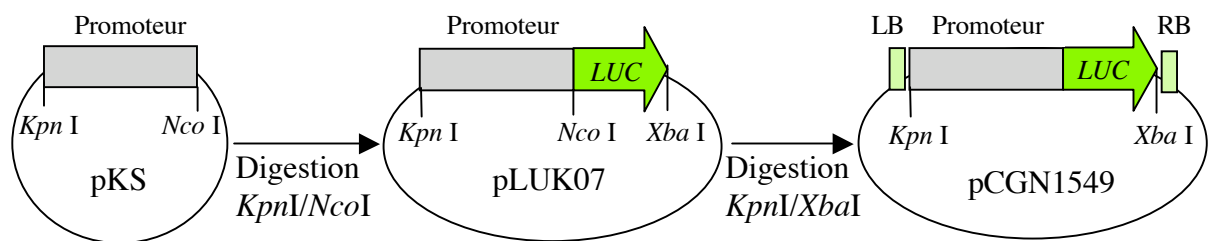


Figure 26: Les différentes étapes du clonage des promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR1b* permettant leur fusion au gène rapporteur de la luciférase
 Les différentes versions des promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR1b* clonées dans le vecteur pKS ont été digérées par les enzymes *Kpn*I/*Nco*I afin de les cloner dans le vecteur pLUK07 permettant leur fusion au gène rapporteur de la luciférase. Les différentes versions des promoteurs contrôlant le gène rapporteur de la luciférase ont ensuite été introduites dans le vecteur binaire pCGN1549 par digestion *Kpn*I/*Xba*I.

II. Régulation de l'expression du gène *NtRNR1a* au cours du cycle cellulaire

1. Étude de l'expression du gène *NtRNR1a* au cours du cycle cellulaire

1.1. Réalisation et clonage des différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1a*

Différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1a* ont été réalisées afin de caractériser les rôles des cis-éléments dE2F et pE2F. Le promoteur *NtRNR1a* sauvage cloné dans le vecteur pBluescript KS a servi de matrice pour la synthèse des versions du promoteur muté au niveau des cis-éléments dE2F ou pE2F. Par une approche par mutagenèse inverse avec des oligonucléotides appropriés (Cf. Annexe), deux nouvelles constructions ont été obtenues : la version mutée au niveau de l'élément dE2F (dMu) et la version mutée au niveau de l'élément pE2F (pMu). La construction dMu a été utilisée pour obtenir une version du promoteur doublement mutée au niveau des éléments dE2F et pE2F (dpMu). Les mutations créées en lieu et place des différents cis-éléments du promoteur correspondent à des sites de restriction uniques qui ont permis de vérifier aisément la présence de la mutation voulue par digestion enzymatique du clone recombinant. Les clones positifs ont été sélectionnés après séquençage afin de vérifier que l'étape de PCR n'avait pas introduit de mutation non désirée dans la construction. Ces constructions ont ensuite été clonées dans le vecteur pLUK07 (Figure 26).

Le vecteur pLUK07 est un vecteur portant la phase codante du gène rapporteur de la luciférase intégrant un intron sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). L'objectif de ce clonage était de remplacer le promoteur 35S (bordé en 5' et 3' des sites de restrictions *KpnI* et *NcoI* respectivement) par les différentes versions du promoteur *NtRNR1a* pour contrôler l'expression du gène rapporteur de la luciférase (LUC). Les constructions obtenues ont été contrôlées par digestion enzymatique et par séquençage.

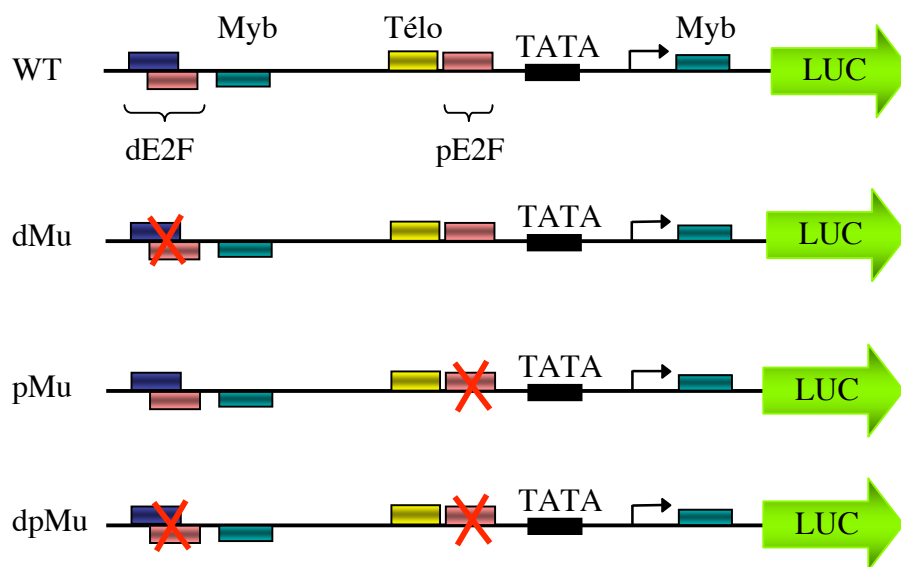


Figure 27: Les différentes versions du promoteur *NtRNRIa* utilisées

Différentes versions du promoteur *NtRNRIa* ont été fusionnées au gène rapporteur de la luciférase. Ces différentes constructions ont été transformées dans des cellules BY-2 afin d'étudier les activités de ces promoteurs

WT : promoteur sauvage

pMu : mutation de l'élément E2F proximal

dMu : mutation de l'élément E2F distal

dpMu : mutations des deux éléments E2F

Le gène de la luciférase a été choisi comme gène rapporteur car il codait pour une protéine ayant une courte demi-vie, permettant ainsi de corrélérer l'activité de l'enzyme luciférase à l'activité du promoteur. Ainsi, une augmentation ou une diminution de l'activité de l'enzyme luciférase rend compte de l'induction ou de la répression de l'activité du promoteur.

Les constructions obtenues précédemment dans le vecteur pLUK07 ont été digérées par les enzymes de restrictions *KpnI* et *XbaI* afin d'insérer le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'une de nos quatre versions du promoteur *NtRNR1a* dans le vecteur binaire pCGN1549 (Figure 26). Les constructions obtenues ont été vérifiées par digestion enzymatique et par séquençage.

Les différentes constructions du vecteur pCGN1549 établies ont été introduites dans *Agrobacterium tumefaciens* pour permettre la transformation stable de cellules BY-2. Quatre suspensions cellulaires transgéniques ont été obtenues exprimant chacune le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle d'une des quatre versions (WT, dMu, pMU et dpMu) du promoteur du gène *NtRNR1a* (Figure 27). Ces différentes cultures de cellules BY-2 transgéniques seront utilisées pour étudier le rôle des différents cis-éléments dE2F et pE2F, sur l'activité du promoteur du gène *NtRNR1a* au cours du cycle cellulaire.

1.2. Analyse de l'activité des différentes versions du promoteur

Les différentes cultures de cellules BY-2 transgéniques obtenues ont été synchronisées par un traitement à l'aphidicoline. L'aphidicoline est un composé qui arrête la réplication de l'ADN en inhibant l'ADN polymérase α , bloquant ainsi les cellules en phase S du cycle cellulaire (Berger et al., 1979). Après traitement et lavage de l'aphidicoline, les cellules progressent de manière synchrone dans le cycle cellulaire : elles passent de la première phase S aux phases G2, M et G1, avant d'entrer en deuxième phase S.

Afin de situer les différentes phases du cycle cellulaire dans la cinétique nous avons mesuré deux paramètres : l'index mitotique et la synthèse d'ADN. L'index mitotique est obtenu par comptage des cellules en mitose après coloration au DAPI, permettant de situer la phase M. La synthèse d'ADN est déterminée en mesurant le taux d'incorporation de thymidine tritiée à un temps donné et permet de situer la phase S du cycle cellulaire. Ces

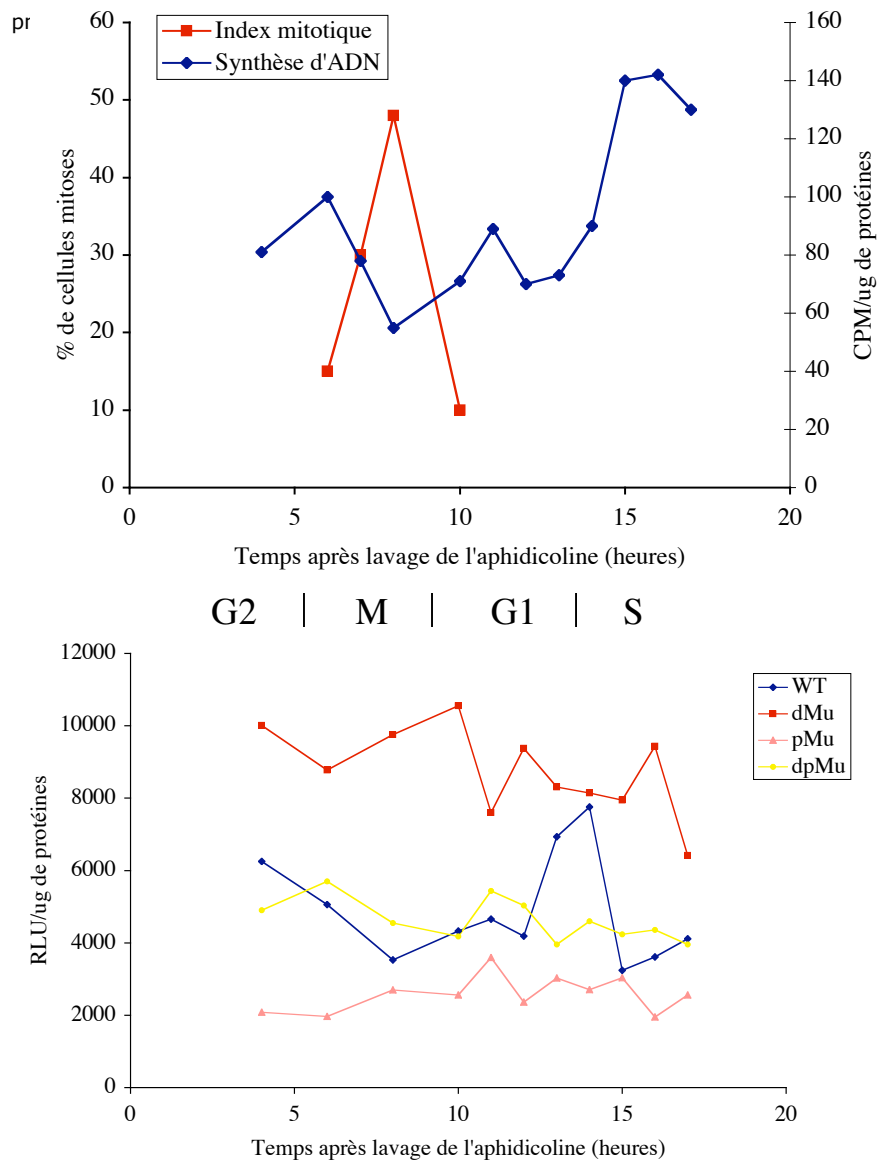


Figure 28: Activités des différentes versions du promoteur *NtRNR1a* au cours du cycle cellulaire

Des cellules BY-2 exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de différentes versions du promoteur *NtRNR1a* (WT, dMu, pMu et dpMu) ont été synchronisées par un traitement à l'aphidicoline.

A. Exemple d'index mitotique et de la synthèse d'ADN suivis au cours du temps après lavage de l'aphidicoline

B. Activité du promoteur *NtRNR1a* muté au niveau des éléments E2F (WT, dMu, pMu et dpMu) suivi au cours du temps après lavage de l'aphidicoline. L'activité est donné en RLU (Relative units)/ μ g de protéines

différents paramètres nous ont permis de situer la mitose aux alentours de huit heures et la seconde phase S à environ seize heures après lavage de l'aphidicoline (Figure 28).

Nous avons commencé la mesure de l'activité du promoteur à partir de quatre heures après le lavage de l'aphidicoline afin de ne pas analyser l'activité du promoteur perturbée par le stress répliatif engendré par le traitement à l'aphidicoline.

Le promoteur *NtRNRa* (WT) présente une induction maximale à la transition G1/S qui est environ deux fois supérieure à son activité basale (Figure 28). De plus, il est intéressant de noter une induction du promoteur en phase G2 qui peut être probablement le résultat de la réparation de l'ADN avant l'entrée en mitose.

Lorsque le cis-élément pE2F du promoteur est muté (pMu), l'activité basale du promoteur est affectée tout au long du cycle cellulaire et aucune induction de son activité n'est observée à la transition G1/S ni en phase G2 (Figure 28). La mutation du cis-élément dE2F (dMu) induit une importante augmentation de l'activité basale du promoteur, par rapport au promoteur sauvage, tout au long du cycle cellulaire sauf à la transition G1/S.

Lorsque les deux éléments E2F sont mutés (dpMu), le promoteur n'est plus induit à la transition G1/S du cycle cellulaire (Figure 28). Dans les autres phases du cycle, l'activité du promoteur dpMu est identique à celle du promoteur sauvage. L'activité du promoteur dpMu correspond donc à la moyenne des activités entre les promoteurs dMu et pMu.

1.3. Conclusion

L'ensemble de ces résultats nous permet de mieux comprendre la régulation transcriptionnelle du gène *NtRNR1a*. En effet, nous avons constaté que la mutation du cis-élément pE2F réduit l'activité basale du promoteur et inhibe son induction à la transition G1/S. Cet élément pE2F jouerait donc un rôle d'activateur transcriptionnel à la transition G1/S. Par contre, la mutation de l'élément dE2F augmente fortement l'activité du promoteur tout au long du cycle cellulaire. Cet élément dE2F semblerait donc agir comme un répresseur et permettrait au promoteur de conserver une activité basale faible tout au long du cycle cellulaire sauf à la transition G1/S où il ne jouerait plus de rôle.

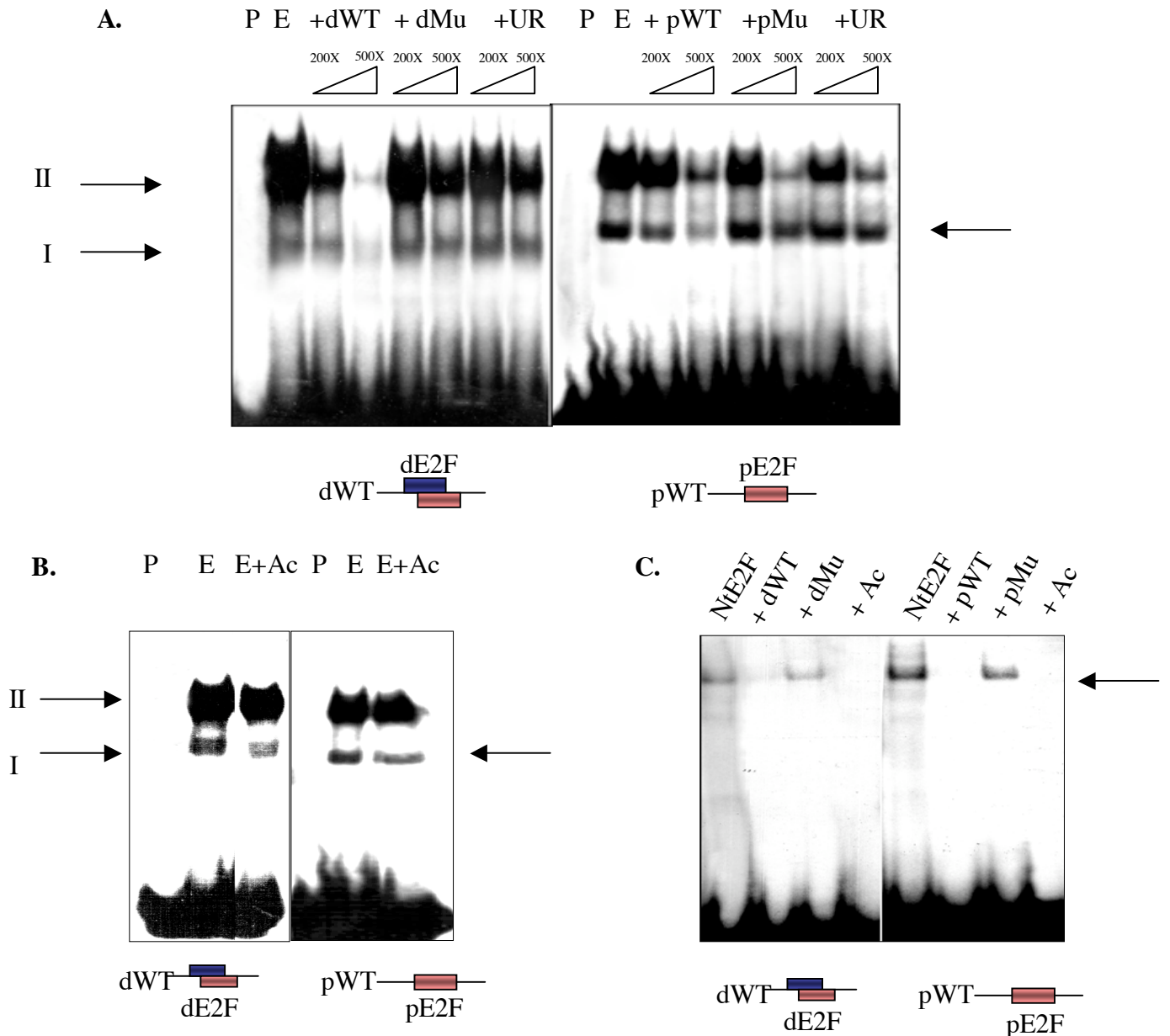


Figure 29: Mise en évidence de complexes protéiques nucléaires associés aux cis-éléments dE2F et pE2F

Six μg d'extraits protéiques nucléaires ont été incubés avec une sonde nucléotidique double brin puis séparés sur gel de polyacrylamide 4,5 %.

Les sondes utilisées correspondent à la région du promoteur *NtRNR1a* contenant les éléments dE2F ou pE2F. La sonde dWT correspond à l'élément dE2F et la sonde pWT correspond à l'élément pE2F.

A. Spécificité des complexes protéiques associés aux sondes dWT et pWT.

B. Mise en évidence de l'interaction d'un facteur E2F avec les sondes dWT et pWT.

C. Mise en évidence de l'interaction spécifique du facteur NtE2F avec les sondes dWT et pWT.

P: Sonde libre; E: Sonde + extrait protéique; +UR: sonde froide indépendante de la sonde; +dWT ou +pWT: compétition avec la sonde dWT ou pWT froide; +dMu ou +pMu: compétition avec la sonde froide dMu ou pMu; E+Ac: Sonde + extrait protéique+anticorps anti-E2F5;

2. Mise en évidence d'interactions entre les différents cis-éléments E2F et des complexes protéiques nucléaires

Afin de mettre en évidence des interactions entre les cis-éléments pE2F et dE2F du promoteur du gène *NtRNR1a* et des complexes protéiques nucléaires, nous avons réalisé des expériences de gel retard. Nous avons utilisé deux sondes nucléotidiques double brins radioactives : la région du promoteur contenant soit l'élément pE2F (pWT), soit l'élément dE2F (dWT). Ces deux sondes ont été marquées en 5' par la T4 polynucléotide kinase. La sonde dWT contient un cis-élément E2F en orientation inverse chevauchant un cis-élément CDE en orientation directe.

2.1. Mise en évidence et caractérisation des interactions entre les éléments dE2F et pE2F et des complexes protéiques nucléaires

Les résultats obtenus montrent qu'en présence de complexes protéiques nucléaires, préparés à partir de cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance, les sondes pWT et dWT s'associent à deux complexes différents appelés I et II, respectivement (Figure 29A). Afin de déterminer si les interactions entre ces complexes et les sondes étaient spécifiques, nous avons effectué des expériences de compétition avec différents oligonucléotides. Lorsque nous avons incubé un excès d'oligonucléotides non marqués dWT (excès molaire de 200 fois) avec la sonde dWT et les extraits protéiques, les interactions entre la sonde et les deux complexes I et II sont déplacées. Par contre, un excès molaire d'oligonucléotides froids dMu ou d'oligonucléotides non spécifiques (UR) (excès molaire de 200 fois) ne permet pas de déplacer les interactions entre la sonde et les deux complexes I et II. Ces expériences nous permettent de conclure que les interactions entre les complexes I et II sont spécifiques au cis-élément dE2F.

Nous avons également effectué des expériences de compétition afin de déterminer si les interactions entre les complexes I et II et le cis-éléments pE2F étaient spécifiques. Ainsi, un excès molaire de 200 fois d'oligonucléotides froids pWT déplace uniquement le complexe I, alors qu'un excès molaire de 200 fois d'oligonucléotides froids pMu déplace faiblement de manière équivalente le complexe I et II. Enfin, un excès molaire de 200 fois d'oligonucléotides froids n'ayant aucun rapport avec la sonde pWT (UR) ne déplace ni le

complexe I ni le complexe II. Il semble donc que seule l'interaction entre le cis-élément pE2F et le complexe I soit spécifique.

Afin de confirmer si un facteur E2F faisait partie des complexes I et II, nous avons ajouté dans le milieu d'incubation, avant d'ajouter la sonde, un anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain (Figure 29B). Le domaine de liaison à l'ADN des différents facteurs E2F est fortement conservé entre les espèces. Si cet anticorps reconnaît un facteur E2F, le domaine de liaison à l'ADN de ce facteur sera bloqué. Suite à l'incubation des extraits protéiques nucléaires avec l'anticorps anti-E2F5 (E+Ac), nous pouvons observer, par comparaison avec l'essai sans ajout de cet anticorps, une baisse du signal correspondant au complexe I alors que le signal correspondant au complexe II n'est pas affecté. Nous avons obtenu les mêmes résultats en utilisant les sondes dWT et pWT. Ces résultats suggèrent qu'un facteur E2F pourrait faire partie du complexe I.

Enfin, nous avons testé la capacité de ces éléments E2F à interagir avec un facteur E2F purifié de tabac (Figure 29C), fourni par le Dr Sekine. En incubant les sondes dWT ou pWT avec le facteur NtE2F purifié (NtE2F), nous avons détecté un signal dans les deux cas. Des expériences de compétitions avec l'anticorps anti-E2F5 utilisé précédemment ne permettent plus au facteur NtE2F de se fixer sur les sondes dWT et pWT (+Ac). De plus, des expériences de compétitions avec un excès de sondes froides sauvages (dWT, pWT) ou mutée (dMu, pMu), nous ont permis de conclure que les cis-éléments dE2F et pE2F pourraient interagir spécifiquement avec le facteur NtE2F de tabac.

2.2. Évolution de l'interaction entre des complexes protéiques nucléaires et les éléments dE2F et pE2F au cours du cycle cellulaire

Comme les deux éléments E2F du promoteur (dE2F et pE2F) ont des rôles différents au cours du cycle cellulaire, nous avons analysé les variations d'interactions entre des complexes protéiques et ces deux éléments au cours du cycle cellulaire. Pour cela, nous avons utilisé des complexes protéiques nucléaires provenant de cellules BY-2 synchronisées afin de réaliser des expériences de gel retard avec les sondes dWT et pWT. Des deux complexes I et II détectés avec la sonde dWT, nous pouvons observer une diminution de l'affinité du complexe I pour la sonde en phase S, alors que l'affinité du complexe II reste constante tout

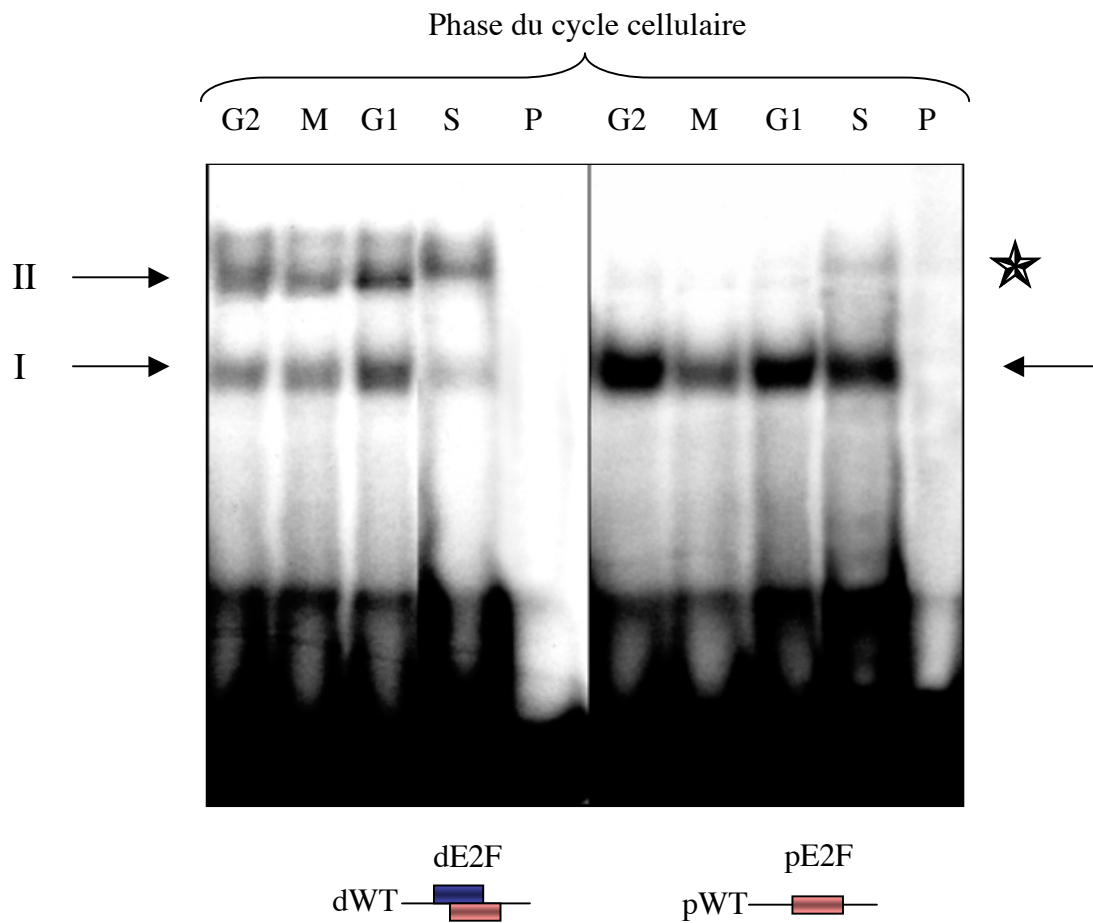


Figure 30: Affinité de complexes protéiques pour les cis-éléments dE2F ou pE2F au cours du cycle cellulaire

Six μg d'extraits protéiques nucléaires, provenant de cellules BY-2 synchronisées par un traitement à l'aphidicoline, ont été incubés avec une sonde nucléotidique double brin puis séparés sur gel de polyacrylamide 4,5 %.

Les sondes utilisées correspondent à la région du promoteur *NtRNRIa* contenant les cis-éléments dE2F ou pE2F. La sonde dWT correspond au cis-élément dE2F et la sonde pWT correspond au cis-élément pE2F.

★ : complexe détecté uniquement en phase S

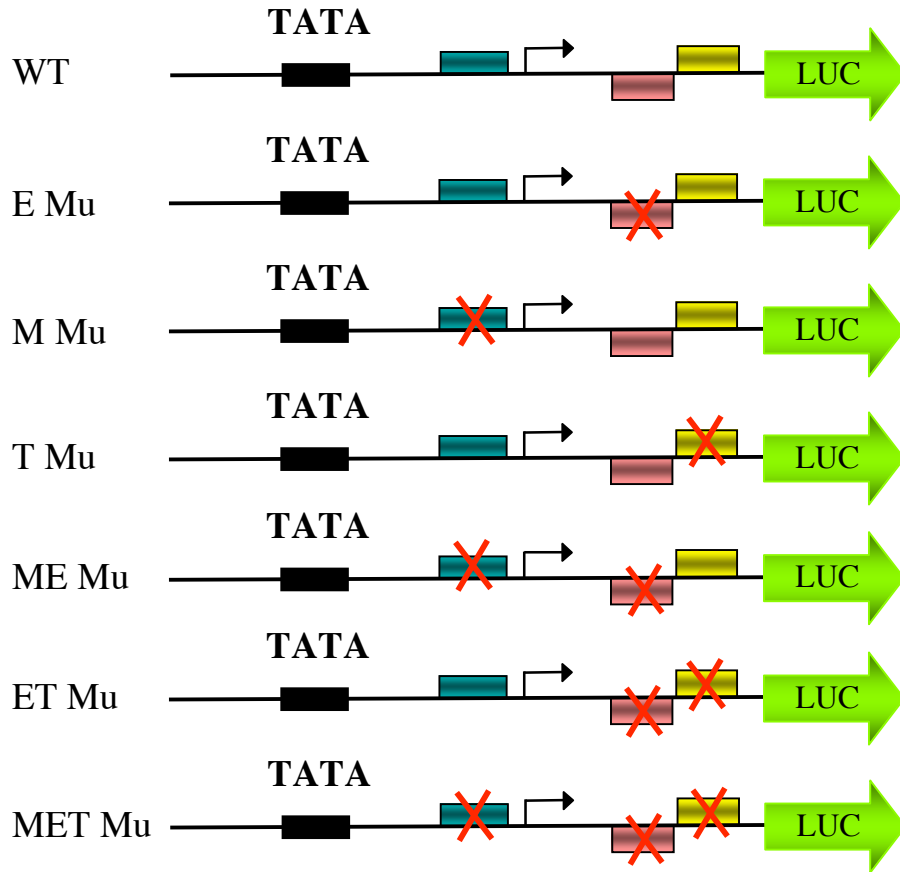
P : sonde libre

au long du cycle (Figure 30). Ce résultat suggère une diminution de l'abondance en facteurs du complexe I associé au motif dE2F qui pourrait être corrélé à la perte de la répression de l'activité du promoteur observée pour l'élément dWT et donc à l'induction du promoteur en phase S. Inversement, avec la sonde pWT seul un complexe protéique interagit avec cet élément tout au long du cycle cellulaire hormis en phase S où un complexe de poids moléculaire supérieur (★) est détecté (Figure 30). Ce résultat suggère l'existence d'un possible co-régulateur de dE2F en phase S du cycle cellulaire.

La sonde pWT que nous avons utilisée contient un cis-élément Télo accolé en 5' de l'élément pE2F. Ainsi, l'apparition en phase S d'un complexe pourrait être corrélée à la présence de cet élément Télo et donc une coopération entre les cis-éléments pE2F et Télo dans l'induction du promoteur en phase S du cycle cellulaire pourrait être possible. Toutefois, cette hypothèse reste à démontrer.

2.3. Conclusion

Grâce à ces expériences de gel retard, nous avons pu mettre en évidence l'interaction spécifique de deux complexes protéiques nucléaires avec l'élément dE2F ainsi que l'interaction spécifique entre un complexe protéique nucléaire et l'élément pE2F. Nous avons également montré l'interaction spécifique entre un facteur E2F de tabac et les éléments dE2F et pE2F. En utilisant des extraits protéiques nucléaires provenant de cellules BY-2 synchronisées, nous pouvons imaginer un rôle de répresseur du complexe I sur l'activité du promoteur du gène *NtRNR1a* en dehors de la phase S. Enfin, il semblerait qu'un potentiel co-régulateur de l'activité du promoteur interagisse avec le cis-élément pE2F. Cette co-régulation potentielle pourrait être associée à l'existence d'un élément Télo accolé en 5' de l'élément pE2F (Lincker et al., 2006).



• E2F: TTTC/GC/GCGC



• MYB: C/TAAC/TGG



• Télé : AAACCCTA



Figure 31: Les différentes versions du promoteur *NtRNR1b* utilisées

Différentes versions du promoteur *NtRNR1b* ont été fusionnées au gène rapporteur de la luciférase. Ces différentes constructions ont été transformées dans des cellules BY-2 afin d'étudier l'activités de ces promoteurs

WT : promoteur sauvage

E Mu : mutation de l'élément E2F

M Mu : mutation de l'élément Myb

T Mu : mutation de l'élément Télé

ME Mu : mutations des éléments Myb et E2F

ET Mu : mutation des éléments E2F et Télé

MET Mu : mutations des éléments Myb, E2F et Télé

III. Régulation de l'expression du gène *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire

1. Étude de l'expression du gène *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire

1.1 Réalisation et clonage des différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1b*

Comme pour l'étude de l'expression du gène *NtRNR1a*, différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1b* ont été fusionnées au gène rapporteur de la luciférase et transférées dans des cellules BY-2. Les différentes versions du promoteur *NtRNR1b* consistent en la mutation individuelle ou simultanée des différents éléments Myb, E2F et Téo. Nous avons utilisé une stratégie de clonage similaire à celle que nous avons utilisé pour le promoteur *NtRNR1a*. Ainsi, nous avons obtenu sept versions différentes de ce promoteur : le promoteur sauvage WT, les promoteurs mutés au niveau des éléments E2F (E Mu), Myb (M Mu) ou Téo (T Mu), les promoteurs doublement mutés au niveau des éléments Myb et E2F (ME Mu) et E2F et Téo (ET Mu) et le promoteur muté au niveau de chacun de ces éléments (MET Mu) (Figure 31). Les oligonucléotides utilisés pour générer ces mutations sont décrits dans l'annexe.

1.2. Étude de l'activité des différentes versions du promoteur au cours du cycle cellulaire

Afin d'étudier l'activité du promoteur au cours du cycle cellulaire, les différentes cultures de cellules BY-2 transgéniques ont été synchronisées par un traitement à l'aphidicoline. Comme nous nous intéressons à la régulation transcriptionnelle du gène *NtRNR1b* à la transition G1/S du cycle cellulaire, nous avons analysé l'activité des différentes versions de son promoteur à partir de la mitose jusqu'à la deuxième phase S.

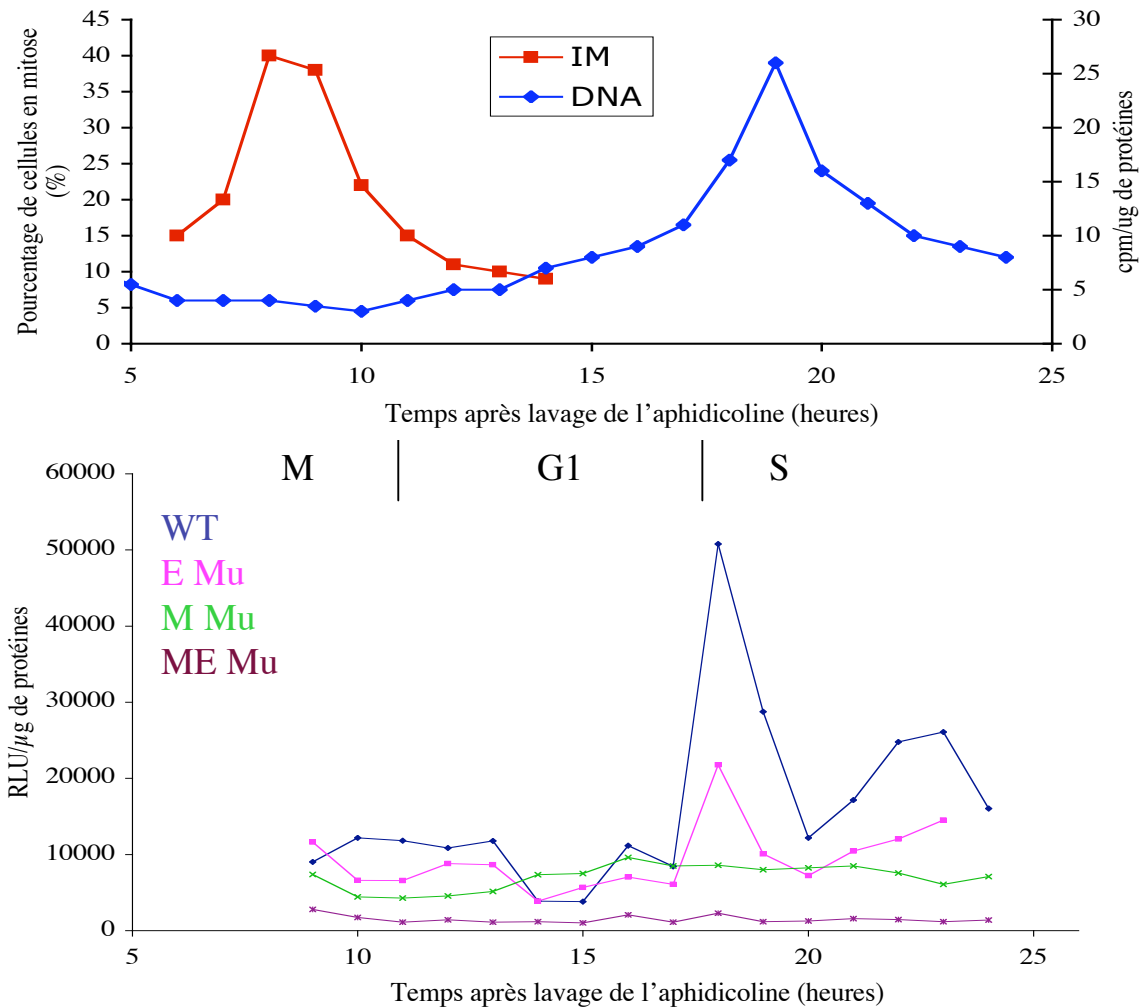


Figure 32: Activités des différentes versions du promoteur *NtRNR1b* mutés au niveau des éléments Myb et E2F au cours du cycle cellulaire
 Des cellules BY-2 exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de différentes versions du promoteur *NtRNR1b* ont été synchronisées par un traitement à l'aphidicoline.
 A. Exemple d'index mitotique (IM) et de synthèse d'ADN (DNA) suivis au cours du temps après lavage de l'aphidicoline
 B. Activité du promoteur *NtRNR1b* muté au niveau des éléments E2F et/ou Myb (WT, E Mu, M Mu et ME Mu)

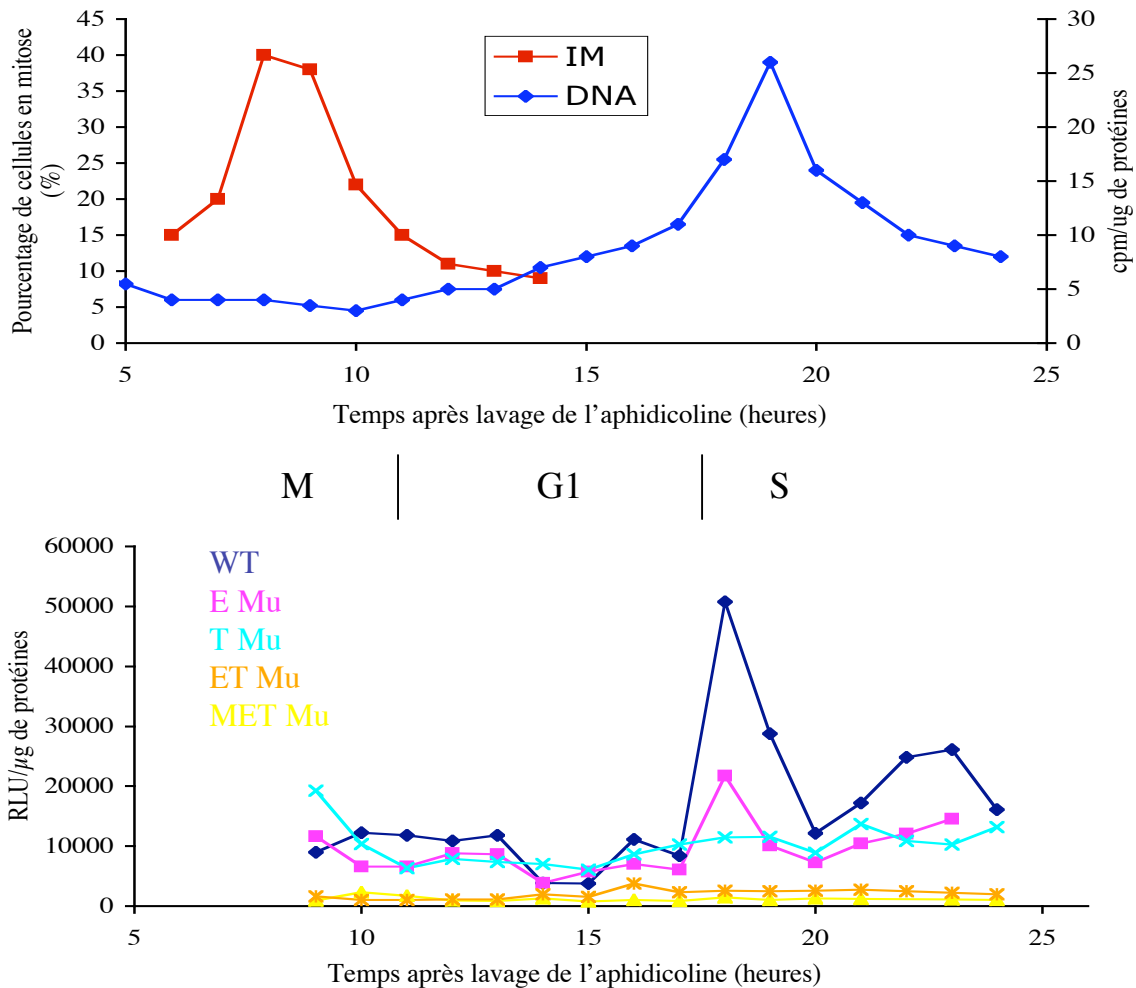


Figure 33: Activités des différentes versions du promoteur *NtRNR1b* mutés au niveau des éléments E2F et Telo au cours du cycle cellulaire
 Des cellules BY-2 exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de différentes versions du promoteur *NtRNR1b* ont été synchronisées par un traitement à l'aphidicoline.
 A. Exemple d'index mitotique (IM) et de synthèse d'ADN (DNA) suivis au cours du temps après lavage de l'aphidicoline
 B. Activité du promoteur *NtRNR1b* muté au niveau des éléments E2F et/ou Telo (E Mu, T Mu et ET Mu) ou au niveau des éléments Myb, E2F et Telo (MET Mu)

Après lavage de l'aphidicoline, la mitose a lieu à 8 heures et la seconde phase S a lieu à 17 heures (Figure 32A).

Nous avons ensuite analysé l'activité des différentes versions du promoteur. Le promoteur du gène *NtRNR1b* sauvage (WT) présente une activité basale tout au long du cycle cellulaire, hormis en phase S où il est induit (Figure 32B). Cette induction maximale du promoteur est environ cinq fois supérieure à son activité basale. Lorsque le cis-élément E2F du promoteur est muté (E Mu) son induction maximale est réduite de moitié comparé au promoteur WT. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus préalablement au laboratoire (Chaboute et al., 1998).

La mutation du cis-élément Myb (M Mu) n'affecte que légèrement l'activité basale du promoteur en mitose, par contre elle abolit toute induction en phase S du cycle cellulaire (Figure 32B). La double mutation des cis-éléments Myb et E2F (ME Mu) réduit considérablement l'activité basale du promoteur (dix fois plus faible que le promoteur WT) et ne permet plus au promoteur d'être induit en phase S (Figure 32B).

Ces résultats suggèrent l'existence d'une coopérativité entre les cis-éléments Myb et E2F dans la régulation transcriptionnelle du gène *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire puisque leur mutation concomitante affecte considérablement le niveau d'expression du promoteur.

Les résultats obtenus suite à la mutation du cis-élément Téo du promoteur (T Mu) ou de la double mutation des cis-éléments E2F et Téo (ET Mu) sont similaires à ceux obtenus avec le promoteur muté au niveau du cis-élément Myb (M Mu) ou des cis-éléments Myb et E2F (ME Mu) (Figure 33B). En effet, la mutation de l'élément Téo n'affecte pas l'activité basale du promoteur par contre le promoteur n'est plus induit en phase S. La mutation concomitante des éléments E2F et Téo (ET Mu) ne permet plus au promoteur d'être induit à l'entrée de la phase S et affecte l'activité basale du promoteur (Figure 33B).

Enfin, l'effet de la mutation des trois cis-éléments Myb, E2F et Téo du promoteur (MET Mu) est comparable à celui des doubles mutations des cis-éléments Myb et E2F (ME MU) et des cis-éléments E2F et Téo (ET Mu), c'est-à-dire qu'elles affectent l'induction du promoteur à l'entrée de la phase S ainsi que son activité basale tout au long du cycle cellulaire (Figure 33B).

1.3. Conclusion

Les mesures d'activités des différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire ont permis d'envisager une coopération entre les cis-éléments Myb, E2F, et Télo pour réguler l'activité du promoteur du gène *NtRNR1b* à l'entrée de la phase S.

Nous pouvons donc proposer un modèle de régulation de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1b* dans lequel E2F serait la pièce centrale du complexe transcriptionnel et dans lequel les facteurs associés aux éléments Myb et Télo amplifieraient l'activité transcriptionnelle induite par le facteur E2F.

Après avoir montré les rôles importants des cis-éléments Myb, E2F et Télo du promoteur du gène *NtRNR1b*, il nous a paru intéressant de mettre en évidence l'interaction entre ces différents cis-éléments et des complexes protéiques nucléaires.

2. Mise en évidence de l'interaction entre les cis-éléments Myb, E2F et Télo et des complexes protéiques nucléaires

Afin d'étudier l'interaction entre les cis-éléments Myb, E2F et Télo et des complexes protéiques nucléaires nous avons choisi d'utiliser deux techniques : le southwestern blot et la technique de retard de migration sur gel.

2.1. Expériences de southwestern blot

Le southwestern blot est une expérience permettant de détecter l'interaction entre une ou plusieurs protéines avec une séquence nucléotidique bien précise. Nous avons utilisé cette technique pour détecter l'interaction entre une ou plusieurs protéines avec les cis-éléments Myb et Télo du promoteur du gène *NtRNR1b*.

La technique de southwestern blot implique la séparation d'un extrait protéique sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante, suivie du transfert des protéines et de la renaturation des protéines transférées sur la membrane de PVDF avant hybridation avec une sonde oligonucléotidique double brin radiomarquée. Afin d'observer une éventuelle différence d'interaction entre des protéines présentes dans des cellules à différentes phases du

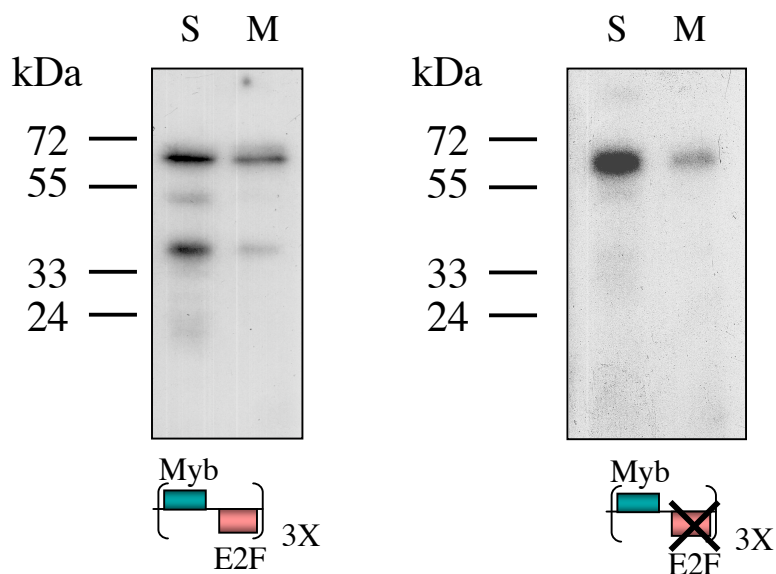


Figure 34: Mise en évidence de complexes nucléoprotéiques par Southwestern blot

Quinze μg d'extraits protéiques nucléaires issus de cellule BY-2 en phase S (S) ou en phase M (M) du cycle cellulaire ont été séparés sur gel de polyacrylamide 12%, électro-transférés sur membrane PVDF, renaturés, puis hybridés avec un fragment d'ADN double-brin. Les sondes utilisées correspondent à la région promotrice du gène *NtRNR1b* contenant les cis-éléments Myb et E2F muté au niveau de l'élément E2F ou non, répétés trois fois.

cycle cellulaire, nous avons fait migrer sur le gel des quantités équivalentes (15 µg) de deux échantillons protéiques issus de cellules en phase S et en phase M. Nous avons utilisé une sonde oligonucléotidique double brin marquée aux extrémités 5' par le fragment de Klenow correspondant aux cis-éléments Myb et E2F répétée trois fois (ME 3X) afin de pouvoir caractériser une activité « DNA binding ». En général, une bonne efficacité de fixation de l'ADN avec une protéine requiert une séquence nucléotidique additionnelle de part et d'autre des cis-éléments reconnus. Ainsi, nous avons fait synthétiser oligonucléotides simple brin complémentaires contenant les cis-éléments Myb et E2F sauvages ou mutés au niveau de l'élément E2F, bordés à chacune des extrémités 5' et 3' d'une séquence non spécifique de quelques nucléotides permettant le radiomarquage par le fragment de Klenow.

Les résultats obtenus par southwestern blot montrent que l'hybridation de la membrane avec la sonde ME 3X révèle une activité « DNA binding » avec plusieurs protéines nucléaires de cellules BY-2 en phase S ou M du cycle cellulaire (Figure 34). En effet, nous avons détecté des interactions entre la sonde et des protéines de masses moléculaires apparentes d'environ 60 kDa et 45 kDa. Ces protéines interagissent plus fortement avec la sonde ME 3X lorsque l'expérience a été effectuée avec des protéines nucléaires issues de cellules BY-2 en phase S du cycle cellulaire qu'avec des protéines issues de la phase M. Toutefois, l'interaction détectée avec la protéine d'environ 45 kDa diminue plus fortement que celle détectée avec la protéine d'environ de 60 kDa, lorsque nous utilisons des extraits protéiques issus de la phase M. De plus, il est intéressant de noter qu'une faible interaction est détectée avec une protéine d'environ 50 kDa et d'environ 24 kDa lorsque les protéines nucléaires sont issues de la phase S du cycle cellulaire alors qu'elle n'est plus décelée lorsque les protéines sont issues de cellules en mitose (Figure 34A).

Nous avons réalisé la même expérience en utilisant une sonde mutée au niveau de l'élément E2F (E Mu 3X). Cette expérience permet de détecter uniquement l'interaction entre la protéine d'environ 60 kDa qui est également plus forte avec des protéines issues de cellules en phase S qu'avec des protéines issues de cellules en phase M (Figure 34B). Il semblerait donc que cette protéine d'environ 60 kDa ne soit pas liée à une interaction avec l'élément E2F mais pourrait résulter de l'interaction avec l'élément Myb.

Nous avons également tenté d'identifier les protéines interagissant avec la sonde ME 3X, en découpant le morceau de gel correspondant au signal détecté, mais malheureusement les quantités de matériels présentent étaient trop faibles.

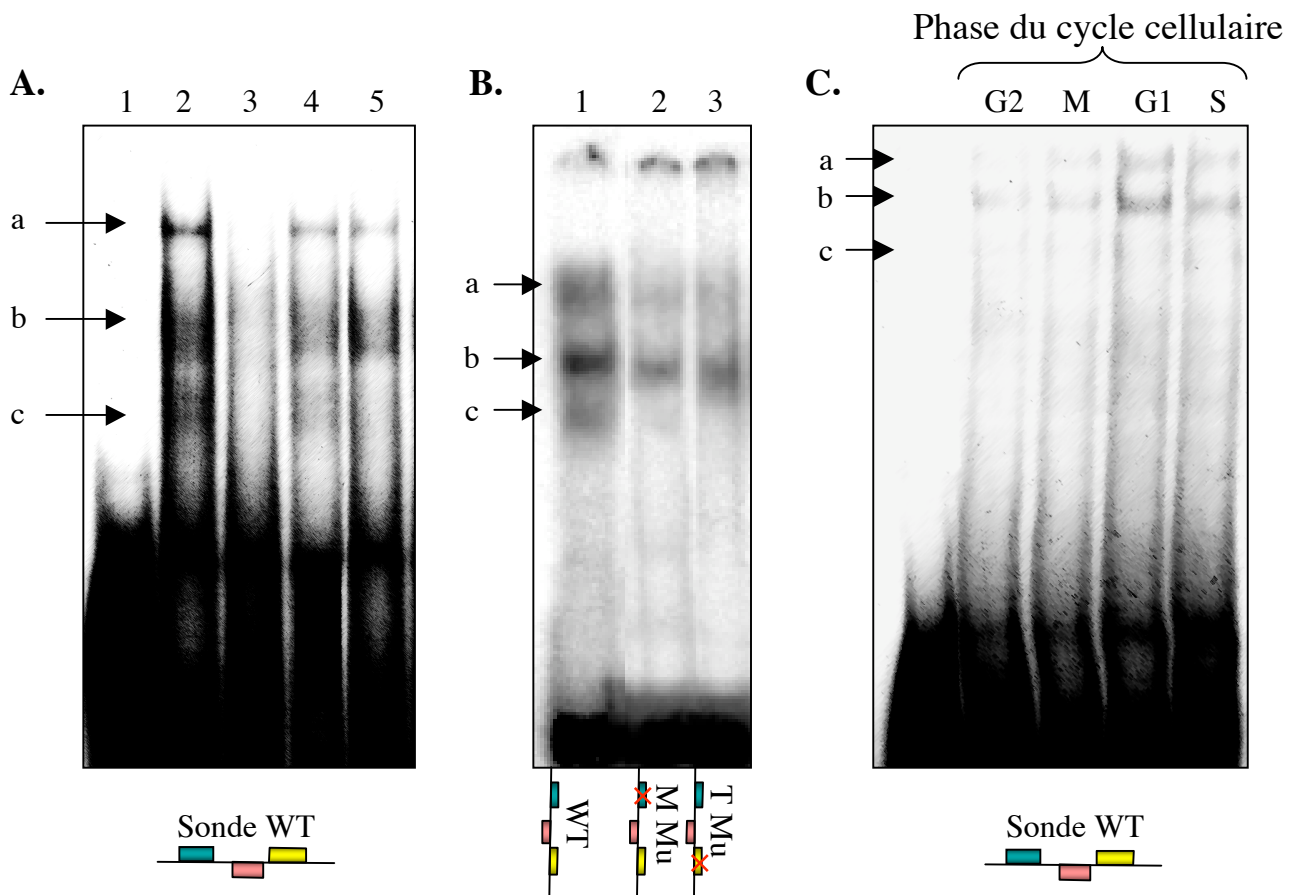


Figure 35: Mise en évidence de complexes nucléoprotéiques associés aux cis-éléments Myb, E2F et Telo

Six μg d'extraits protéiques nucléaires ont été incubés avec une sonde nucléotidique double brin puis séparés sur gel de polyacrylamide 4,5 %.

Les sondes radioactives utilisées sont représentées en dessous de chaque autoradiogramme et correspondent à la région de 63 pb du promoteur du gène *NtRNR1b* contenant les cis-éléments Myb, E2F et Telo. La sonde WT correspond aux trois cis-éléments sauvages. La sonde M Mu correspond à la mutation du cis-élément Myb et la sonde T Mu correspond à la mutation du cis-élément Telo.

A. Expériences de spécificité des complexes a, b et c

Piste 1: Sonde WT libre

Piste 2: Sonde WT + 6 μg de complexes protéiques nucléaires

Piste 3: Sonde WT + 6 μg de complexes protéiques nucléaires + excès de sonde froide MET Mu

Piste 4: Sonde WT + 6 μg de complexes protéiques nucléaires + excès de sonde froide WT

Piste 5: Sonde WT + 6 μg de complexes protéiques nucléaires + excès de sonde froide E Mu

B. Utilisation de sondes mutées

Piste 1: Sonde WT + 6 μg de complexes protéiques nucléaires

Piste 2: Sonde M Mu + 6 μg de complexes protéiques nucléaires

Piste 3: Sonde T Mu + 6 μg de complexes protéiques nucléaires

C. Expériences de retard de migration sur gel au cours du cycle

Les extraits protéiques nucléaires sont issus de cellules BY-2 synchronisées

En conclusion, les cis-éléments Myb et E2F du promoteur du gène *NtRNR1b* semblent interagir spécifiquement avec des facteurs protéiques nucléaires au cours du cycle cellulaire. Les protéines nucléaires issues de cellules BY-2 en phase S du cycle cellulaire interagissent plus fortement avec les cis-éléments Myb et E2F que les protéines nucléaires issues de cellules BY-2 en mitose. Ce dernier résultat est cohérent avec ceux obtenus lors d'expériences de mesure d'activité du promoteur montrant l'induction du promoteur *NtRNR1b* en phase S du cycle cellulaire.

2.2. Expériences de retard de migration sur gel

L'interaction entre des complexes protéiques nucléaires avec les éléments Myb, E2F et Télo du promoteur *NtRNR1b* a été aussi étudiée par la technique de gel retard.

Nous avons utilisé comme sonde radioactive la région de 63 paires de bases du promoteur du gène *NtRNR1b* contenant les trois cis-éléments Myb, E2F et Télo (sonde WT), marquée par l'addition de nucléotides radioactifs aux extrémités 3' par une réaction de remplissage utilisant le fragment de Klenow de l'ADN polymérase I (Cf. Annexe).

Les résultats obtenus par ces expériences nous montrent qu'en présence de complexes protéiques nucléaires, la sonde WT s'associe à trois différents complexes appelés complexes a, b et c (Figure 35A). Afin de déterminer si l'interaction entre ces trois différents complexes et les cis-éléments Myb, E2F et Télo sont spécifiques, nous avons effectué des expériences de compétition avec un excès de sonde WT non marquée (excès molaire de 50 fois) ainsi qu'avec un excès de sonde non marquée contenant les trois cis-éléments Myb, E2F et Télo mutés (MET Mu) (excès molaire de 50 fois).

Lorsque nous avons incubé les complexes protéiques nucléaires avec la sonde WT en présence d'un excès de sonde WT froide, les interactions entre les complexes protéiques et les cis-éléments Myb, E2F et Télo de la sonde WT sont déplacées (Figure 35A) : aucun signal n'est détecté. Par contre lorsque nous avons effectué la même expérience avec un excès de sonde MET Mu froide, les interactions des complexes a, b et c, détectés précédemment, avec la sonde WT ne sont pas déplacées. Ces expériences de compétition suggèrent que les interactions entre les trois complexes a, b et c et les cis-éléments Myb, E2F et Télo sont spécifiques. Afin de déterminer si ces trois complexes sont spécifiques du cis-éléments E2F,

nous avons effectué une expérience de compétition avec un excès de sonde non marquée mutée au niveau du cis-élément E2F (E Mu). Uniquement les deux complexes a et b sont encore détectés (Figure 35A). Ce résultat nous permet de penser que seuls les complexes a et b interagissent spécifiquement avec le cis-élément E2F du promoteur du gène *NtRNR1b*.

Pour confirmer ce dernier résultat, nous avons utilisé des sondes radioactives portant soit une mutation au niveau du cis-élément Myb (M Mu), soit au niveau du cis-élément Télo (T Mu) (Figure 35B). Dans les deux cas, uniquement les deux complexes a et b sont détectés, laissant supposer que les cis-éléments Myb et Télo ne sont pas nécessaires à la formation de ces complexes et que ces cis-éléments pourraient être impliqués dans la liaison au complexe c.

Afin de vérifier si les complexes a, b et c, détectés précédemment, se comportent différemment suivant la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve, nous avons effectué des expériences de retard de migration sur gel en utilisant des complexes protéiques nucléaires préparés à partir de cellules BY-2 synchronisée suivant la même technique utilisée lors de la mesure de l'activité du promoteur au cours du cycle cellulaire (Figure 35C). Nous avons incubé des extraits protéiques issus de cellules en phases G2, M, G1 ou S avec la sonde WT avant de séparer les complexes nucléoprotéiques sur gel de polyacrylamide non-dénaturant. Comme précédemment nous avons obtenu trois signaux correspondant aux trois complexes a, b et c (Figure 35C). Les signaux correspondant à ces trois complexes sont de faible intensité lorsque les extraits protéiques sont issus de cellules en phases G2 et M. Le signal correspondant au complexe c est faiblement détecté tout au long du cycle cellulaire. Par contre, les complexes a et b sont fortement détectés quand les extraits protéiques proviennent de cellules BY-2 en phase G1 et S (Figure 35C).

En conclusion, ces résultats nous permettent de postuler que l'augmentation de l'intensité des interactions des complexes a et b en phases G1 et S avec la sonde WT est concomitante avec l'induction du promoteur du gène *NtRNR1b* à la transition G1/S. Par ailleurs, Sekine M. et al ont montré que le facteur *NtE2F*, seul facteur E2F de tabac caractérisé jusqu'à présent, était préférentiellement exprimé au cours des phases G1 et S du cycle cellulaire (Sekine et al., 1999). Nous avons aussi montré que la formation des complexes a et b était spécifique au cis-élément E2F présent sur le promoteur du gène *NtRNR1b*. Toutes ces informations suggèrent que l'augmentation de l'intensité des signaux correspondant aux

complexes a et b pourrait être liée à l'augmentation du niveau de facteurs *NtE2F* disponibles dans la cellule et ainsi à l'induction du promoteur à la transition G1/S.

Nous avons également constaté que l'intensité du signal correspondant au complexe c ne varie pas tout au long du cycle cellulaire. On pourrait imaginer que ce complexe protéique pourrait être impliqué dans l'activité basale du promoteur au cours du cycle cellulaire. Cependant, nous n'avons actuellement pas assez d'éléments pour confirmer le rôle que pourrait jouer ce complexe c.

Nous avons également tenté d'identifier les facteurs protéiques contenus dans les différents complexes a, b et c à l'aide de la plateforme protéomique de l'IBMP/IBMC. Nous avons suivi le protocole décrit par l'équipe du Docteur Sacha Baginsky (Stenger et al., 2004), mais malheureusement cette expérience n'a pas abouti par manque de matériel contenu dans les bandes de gel. Nous avons également tenté de caractériser la présence d'un facteur E2F dans les complexes détectés. Pour cela, nous avons transféré le gel de polyacrylamide, utilisé pour l'expérience de retard sur gel, sur deux membranes : une membrane de nitrocellulose suivie d'une membrane de PVDF. La membrane de nitrocellulose fixe les protéines alors que la sonde oligonucléotidique radioactive traverse la membrane de nitrocellulose pour se fixer sur la membrane de PVDF. Nous avons alors effectué, avec la membrane de nitrocellulose contenant les protéines, un western blot classique en utilisant un anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain (Demczuk et al., 1993). Cette expérience n'est pas encore finalisée.

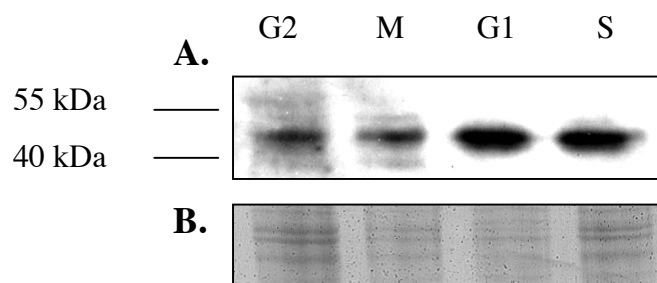


Figure 36: Accumulation de facteurs E2F au cours du cycle cellulaire chez le tabac

Les protéines nucléaires ont été extraites de cellules BY-2 à différentes phases du cycle cellulaire (G2, M, G1 et S) après synchronisation par un traitement à l'aphidicoline, puis séparées sur une gel SDS-PAGE (15 µg). Après transfert, la membrane a été incubée avec un anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain.

A. Western blot

B. Coloration au bleu de Coomassie

IV. Expression des facteurs E2F au cours du cycle cellulaire

Nous avons montré précédemment que des facteurs E2F de tabac faisaient partie des complexes protéiques nucléaires interagissant avec les différents cis-éléments E2F du promoteur des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* et que ces cis éléments étaient responsables de l'induction de ces promoteurs à l'entrée de la phase S ou encore de la répression du promoteur *NtRNR1a* en dehors de cette phase.

Afin de déterminer si la disponibilité en facteurs E2F au cours du cycle cellulaire pouvait être à l'origine de l'induction ou de la répression de l'activité du promoteur au cours du cycle, nous avons analysé l'évolution du taux de facteurs E2F de tabac au cours du cycle cellulaire.

1. Étude de l'accumulation des facteurs E2F de tabac au cours du cycle cellulaire

Nous avons extrait les protéines nucléaires issues de cellules BY-2 synchronisées afin d'étudier les variations d'expression des facteurs E2F de tabac par Western blot. Le même anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain a été utilisé (Figure 36).

Deux signaux pouvant correspondant à des facteurs E2F sont détectés en phase G2 : un signal de forte intensité aux alentours de 45 kDa, ainsi qu'un signal de très faible intensité à environ 60 kDa. L'intensité du signal de 45 kDa est fortement augmentée en phases G1 et S alors que le signal de 60 kDa n'est que très faiblement détecté en phase G2 (Lincker et al., 2006).

2. Conclusion

L'augmentation de l'intensité du signal de 45 kDa suggèrerait que le facteur E2F correspondant à ce signal pourrait être un facteur E2F de type activateur impliqué dans l'induction de l'activité du promoteur *NtRNR1a* ou *NtRNR1b* à la transition G1/S. Ce facteur E2F pourrait donc interagir avec le cis-élément E2F du promoteur *NtRNR1b* ainsi qu'avec le cis-élément pE2F du promoteur *NtRNR1a*. Au contraire, la disparition du signal de 60 kDa au cours des phases G1 et S suggère que le facteur E2F correspondant à ce signal serait un facteur E2F de type répresseur pouvant interagir avec le cis-élément composite dE2F du promoteur du gène *NtRNR1a*.

V. Conclusions

Dans ce premier chapitre, nous avons montré les rôles essentiels des cis-éléments E2F des promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR1b* dans leur régulation tant au niveau de l'induction (pour les promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR1b*) qu'au niveau de la répression (pour le promoteur *NtRNR1a*). Nous avons ainsi montré que la mutation de l'élément pE2F réduisait l'activité basale du promoteur *NtRNR1a* et inhibait son induction à la transition G1/S. L'élément pE2F pourrait jouer donc un rôle d'activateur transcriptionnel. Inversement, nous avons montré que la mutation de l'élément dE2F augmente l'activité basale du promoteur qui devient équivalente à l'activité maximale atteinte par le promoteur WT à l'entrée de la phase S. Ce cis-élément dE2F semblerait donc agir comme un répresseur et permettrait au promoteur de conserver une activité basale basse en dehors de la phase S. Comme le promoteur *NtRNR1b* présente une organisation plus simple que le promoteur *NtRNR1a*, nous avons pu préciser le rôle des cis-éléments Myb et Telo dans la corégulation associée à E2F. Ainsi, nous avons démontré que la mutation combinée des éléments Myb et E2F et/ou E2F et Telo réduisait l'activité basale du promoteur et abolissait toute induction à la transition G1/S. Ces résultats supposent l'existence d'une coopération entre ces trois éléments dans la régulation de l'expression du gène *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire. Nous avons également montré que ces différents cis-éléments E2F pouvaient interagir spécifiquement avec des complexes protéiques permettant la régulation de l'expression des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire.

La régulation de l'expression du gène *NtRNR1a* semble être similaire à celle du gène *NtRNR2*. En effet, ces deux promoteurs présentent une organisation similaire, c'est-à-dire deux éléments E2F : un élément composite et un élément simple (Chaboute et al., 2000). Il a été montré que le cis-élément E2F composite se comporte comme un répresseur en dehors de la phase S et le cis-élément E2F simple comme un activateur de cette phase. Par ailleurs, le promoteur du gène *AtPCNA* comporte également deux éléments E2F dont un est impliqué dans l'induction de l'expression du gène *PCNA* et l'autre dans la répression de cette expression régulée au cours du cycle cellulaire (Egelkrou et al., 2002). Chez la drosophile, le promoteur du gène *PCNA* comporte également deux éléments E2F impliqués dans la

régulation de l'expression de ce gène au cours du cycle cellulaire. Chez les mammifères, il a aussi été montré que le promoteur du gène *E2F1* comporte deux éléments E2F et l'expression de ce gène à la transition G1/S est dépendante de ces deux éléments E2F. Ces deux éléments E2F interagissent avec des facteurs E2F différents. En effet, l'élément E2F distal interagit avec le complexe répresseur E2F4/p130 alors que l'élément E2F proximal interagit avec les facteurs activateurs E2F1 et E2F3a, suggérant que les deux éléments E2F jouent des rôles distincts dans la régulation de l'expression du gène *E2F1* en interagissant avec différents facteurs E2F (Araki et al., 2003). De l'ensemble de ces données sur la régulation de l'expression de gènes via E2F, il est possible de postuler que l'élément composite dE2F du promoteur *NtRNR1a* puisse interagir avec un facteur E2F répresseur afin de réprimer son expression. L'élément simple pE2F interagirait lui, avec un facteur E2F activateur permettant d'induire l'expression du gène *NtRNR1a* à la transition G1/S du cycle cellulaire.

Le promoteur du gène *NtRNR1a* présente également une activité en phase G2 du cycle cellulaire. Cette activité pourrait traduire l'implication de ce gène dans la réparation de l'ADN avant l'entrée en mitose. L'analyse de la séquence du promoteur a révélé la présence de cis-éléments Myb pouvant expliquer cette faible induction du promoteur à la transition G2/M du cycle cellulaire. Il a été montré chez les plantes que les cis-éléments Myb jouaient un rôle dans l'induction transcriptionnelle de gène à la transition G2/M (Ito et al., 2001). Les cis-éléments Myb, situés à -100 et à -385 paires de bases du site ATG d'initiation de la traduction, pourraient donc être impliqués dans l'induction du promoteur à la transition G2/M du cycle cellulaire. Une étude récente chez le poulet a montré qu'une lignée cellulaire n'exprimant plus de facteurs B-Myb proliférait normalement alors que cette même lignée était plus sensible aux dommages à l'ADN (Ahlbory et al., 2005). Nous pouvons donc envisager qu'un facteur B-Myb puisse induire l'expression du gène *NtRNR1a* à la transition G2/M en réponse à un dommage à l'ADN. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que l'induction du promoteur en phase G2 soit due à une dérégulation de l'activité du promoteur via l'élément dE2F et une activation via l'élément pE2F. C'est pourquoi nous avons étudié le rôle de ces éléments E2F dans l'expression du gène *NtRNR1a* en réponse à un dommage à l'ADN (Cf. Chapitre III).

Le promoteur du gène *NtRNR1b* présente une organisation différente de celle du gène *NtRNR1a* bien que les produits de ces deux gènes partagent une forte identité (93 %). Le promoteur de ce gène contient un élément E2F entouré de part et d'autre d'un élément Myb et

un élément Télo. Nous avons montré que ces deux éléments Myb et Télo étaient fortement impliqués dans la régulation de l'expression du gène *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire et à l'entrée de la phase S. De plus, ces résultats présentent, pour la première fois chez les plantes, le rôle d'un élément Myb dans la régulation de l'expression d'un gène à la transition G1/S. Jusqu'à présent, les cis-éléments Myb de type MSA (M-Specific Activator) ont été montrés comme étant impliqués dans la régulation de l'expression d'un gène à la transition G2/M (Ito et al., 2001). Des études chez les animaux ont montré que le facteur de transcription B-Myb s'associe aux facteurs E2F1-3 afin de réguler l'expression de gènes nécessaires à la transition G2/M du cycle cellulaire (comme les gènes *CDC2* ou *CycB1*) (Zhu et al., 2004). Ce mode de régulation ne dépend pas uniquement de la présence d'un cis-élément Myb sur le promoteur mais également de la présence d'un cis-élément E2F adjacent. Récemment, chez les mammifères, il a été montré que les facteurs de transcription B-Myb étaient cruciaux en phase S du cycle cellulaire : la surexpression du facteur B-Myb induit une augmentation du nombre de cellules entrant en phase S, alors que la réduction de niveau de facteur B-Myb par l'utilisation de petits ARN interférents résulte à une diminution du nombre de cellule entrant en phase S (Garcia and Frampton, 2006). Ces données nous conduisent à supposer qu'un complexe comportant un facteur E2F activateur et un facteur B-Myb pourrait être important pour l'expression de gènes à la transition G1/S ou G2/M du cycle cellulaire (Zhu et al., 2004). De manière plus générale, dans le domaine animal, il a été montré que de nombreux gènes étaient régulés par le facteur de transcription E2F dont l'association à d'autres facteurs de transcription permet de moduler l'activité induite par E2F. Par exemple, il a été montré que l'expression du gène *cdc6*, chez les mammifères, était régulée par un complexe protéique associé à E2F2 et composé par les facteurs de transcription YY1 et RYBP (Schlisio et al., 2002) qui se lient à la marked box du facteur E2F2. Il a également été montré que le gène de la thymidine kinase était régulé par le facteur de transcription E2F associé à différents facteurs de la famille Sp1 (Rotheneder et al., 1999). Cette interaction E2F1/Sp1 sur leurs cibles respectives (sites E2F1 et site Sp1) est nécessaire pour permettre l'induction maximale du promoteur du gène *RanBP1* en phase S du cycle cellulaire (Di Fiore et al., 1999). Il apparaît donc que la spécificité d'action du facteur E2F soit due à son association combinatoire à un nombre limité de facteurs de transcription.

Chez les plantes, la surexpression du facteur Pur α en présence de E2F augmente la capacité du facteur E2F à transactiver un promoteur cible. Il est donc capable de moduler positivement son activité (Rossignol et al., 2002). Le modèle de régulation de l'activité du

promoteur du gène *RNR1b* par les éléments E2F, Myb et Téo semble être spécifique aux plantes. En effet, cette association de motifs est non seulement présente sur tous les promoteurs de gènes *RNR* de plantes connus jusqu'à présent (tabac, *Arabidopsis thaliana* et riz), mais également sur d'autres promoteurs de gènes induits en phase S, comme celui du gène *DHFR* (dihydrofolate réductase). Néanmoins pour valider ce modèle, il serait nécessaire d'identifier les différentes protéines impliquées dans l'induction de ce promoteur à la transition G1/S. Nous avons également montré que des complexes protéiques pouvaient interagir spécifiquement avec ces trois cis-éléments, et que l'affinité de ces complexes pour ces éléments variait au cours du cycle cellulaire pour atteindre un maximum en phases G1 et S du cycle cellulaire.

Bien que les tentatives de séquençage des protéines interagissant avec les sondes utilisées aient échoué jusqu'à présent, nous pouvons émettre des hypothèses quant à la nature des protéines interagissant avec les cis-éléments Myb et E2F. En effet, Ito M et al avaient identifié trois facteurs Myb-like impliqués dans la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour les cyclines de type B à la transition G2/M du cycle cellulaire (Ito et al., 2001). Ces trois facteurs Myb-like peuvent tous interagir spécifiquement avec le cis-élément MSA (M-Specific Activator) porté par le promoteur des gènes des cyclines de type B. Parmi ces trois facteurs Myb-like, le facteur *NtmybB* a une masse moléculaire apparente de 66 kDa pouvant correspondre au signal de plus haut masse moléculaire apparente détecté dans les expériences de southwestern blot. De plus, dans cette même étude, il a été montré que ce facteur Myb-like, *NtmybB*, était exprimé de manière constitutive tout au long du cycle cellulaire mais pourrait cependant être régulé de manière post-traductionnelle, alors que les deux autres facteurs Myb-like, *NtmybA1* et *NtmybA2* étaient exprimés uniquement au cours de la transition G2/M et de la phase M de la mitose. Ainsi, le facteur *NtmybB* pourrait correspondre à la protéine de 60 kDa. Toutefois, cette hypothèse reste à être validée.

Dans les expériences de southwestern blot utilisant la sonde E Mu 3X, seule la protéine d'environ 60 kDa interagit avec la sonde suggérant que des protéines d'environ 45 kDa et 50 kDa interagissent avec l'élément E2F. Des résultats de Western blot, utilisant des extraits protéiques nucléaires et un anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain, avaient permis de détecter des protéines d'environ 60 kDa ainsi qu'un doublet de poids moléculaire d'environ 45 kDa (Chaboute et al., 2000). Une des deux protéines de 45 kDa pourrait être impliquée dans cette interaction.

Une question se pose alors. Comment l'expression du gène *NtRNR1b* est-elle diminuée en dehors de la phase S ? Les variations du taux de facteurs E2F au cours du cycle cellulaire suggèrent que l'expression du gène *NtRNR1b* puisse être régulé par la disponibilité en facteur E2F au cours du cycle.

Deuxième Chapitre

**Régulation de l'expression des gènes RNR au cours du
développement du tabac**

Le développement est l'ensemble des événements qui conduisent progressivement à l'édification d'un organisme et c'est aussi le cas chez les plantes. Il implique trois processus qui s'imbriquent: la croissance, la morphogenèse et la différenciation.

La croissance est une augmentation irréversible de la taille ; elle provient de l'effet conjoint de la division des cellules et de l'augmentation de leur taille. L'apport de nouvelles cellules à l'organisme par divisions cellulaires du méristème augmente sa capacité de croissance.

La morphologie de la plante et son organisation interne sont fortement influencées à la fois par la multiplication des cellules et par l'augmentation de leur taille. Les cellules se divisent puis s'accroissent suivant des plans qui, pour une large part, déterminent l'aspect et la morphologie des différentes parties de la plante.

La différenciation, quant à elle, est un processus par lequel des cellules possédant une information génétique identique deviennent différentes les unes des autres et des cellules méristématiques dont elles proviennent.

Selon ces définitions, nous pouvons conclure que le cycle cellulaire est un processus essentiel au développement de la plante. Étant donné que l'expression des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* présente une régulation spécifique au cours du cycle cellulaire, nous avons étudié la régulation de l'expression de ces gènes au cours du développement du tabac ainsi que le rôle des différents cis-éléments E2F de leur promoteur dans cette régulation.

Dans le chapitre I, nous avons montré que les activités des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* variaient suivant la phase du cycle dans laquelle se trouvaient les cellules : les activités de ces promoteurs étaient induites à l'entrée de la phase S du cycle cellulaire. Il nous a donc paru intéressant d'étudier ces activités dans des tissus de tabac où les cellules étaient en divisions actives ou dans un état différencié.

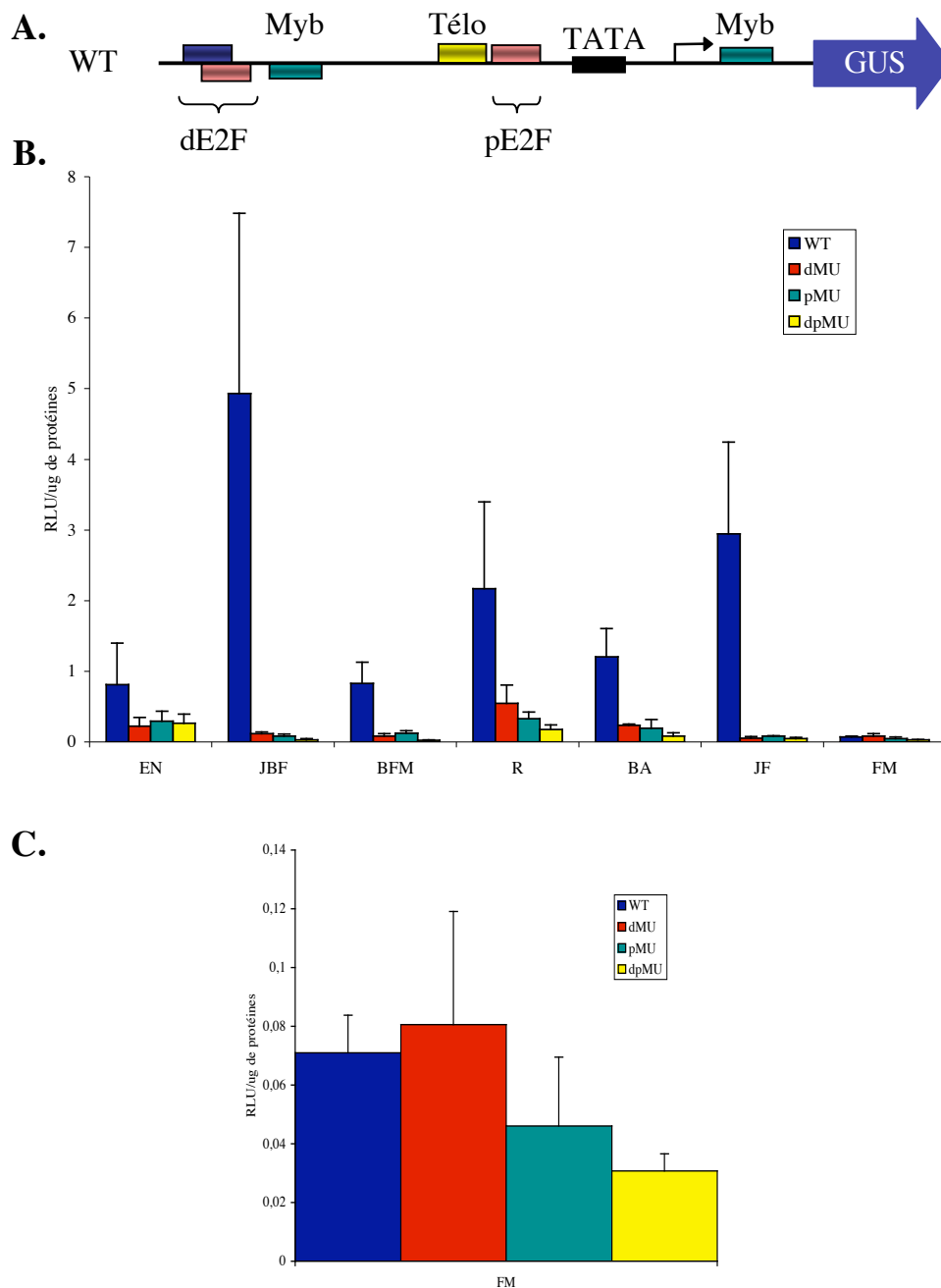


Figure 37: Activité de différentes versions du promoteur *NtRNR1a* au cours du développement du tabac

Différentes versions du promoteur *NtRNR1a* ont été fusionnées au gène rapporteur *GUS* et transformées dans des plants de tabac. Les activités des promoteur ont été mesurées grâce au gène rapporteur *GUS* via la luminescence de son activité enzymatique

EN : entrenoeud

JBF: jeune bouton floral

BFM : bouton floral mature

R : racine

BA: bourgeon axillaire

JF : jeune feuille

FM : feuille mature

A. Schéma du promoteur *NtRNR1a*

B. Activités de différentes versions du promoteur *NtRNR1a* au cours du développement du tabac

C. Activités de différentes versions du promoteur *NtRNR1a* dans les feuilles matures de tabac

I. Étude de la régulation de l'expression du gène *NtRNR1a* et *NtRNR1b* au cours du développement

1. Étude de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1a* dans différents tissus de plants de tabac

1.1. Analyse de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1a* dans différents tissus de plants de tabac

Afin d'étudier les variations d'activité du promoteur du gène *NtRNR1a*, les différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1a* utilisées précédemment (WT, pMu, dMu et dpMu) ont été clonées en amont du gène rapporteur GUS (codant pour la β -glucuronidase) au niveau des sites *XbaI-BamHI* du vecteur binaire pBI101. Les constructions ainsi obtenues ont été ensuite introduites dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 pour transformer les plants de tabacs (*Nicotiana tabacum* L. cv SR1) (Horsch et al., 1985). Les graines ont été récoltées à partir de dix plantes transgéniques indépendantes et mises à germer sur un milieu supplémenté en kanamycine pour leur analyse

Nous avons quantifié les activités des différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1a* (WT, dMu, pMu et dpMu) dans différents tissus du plant de tabac, en divisions cellulaires actives (jeune bouton floral, jeune feuille, bourgeon axillaire et racine) ou dans un état différencié (entre-nœud, bouton floral mature et feuille mature).

Le promoteur du gène *NtRNR1a* présente une forte activité dans différents tissus tels que les jeunes boutons floraux, les bourgeons axillaires, les racines ainsi que les jeunes feuilles (Figure 37B). Cette activité est donc élevée dans les tissus se divisant activement alors qu'elle est faible dans les tissus différenciés comme les feuilles matures, les boutons floraux matures ou encore les entre-nœuds.

La mutation des cis-éléments dE2F ou pE2F ainsi que la double mutation dpE2F du promoteur réduisent fortement l'activité du promoteur *NtRNR1a* (Figure 37B). De plus, nous

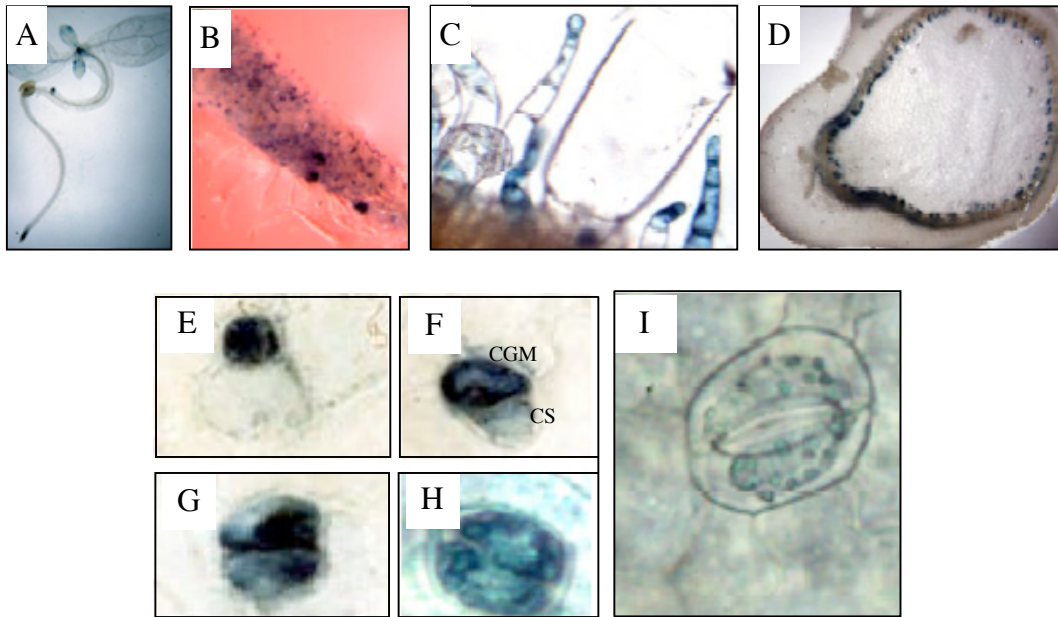


Figure 38: Localisation histochimique de l'activité GUS dans des plants de tabac exprimant le gène *GUS* sous le contrôle du promoteur *NtRNRIa*

A. Jeune plantule de tabac

B. Morceau de jeunes feuilles de tabac

C. Trichomes de jeunes feuilles de tabac

D. Coupe transversale d'un entrenoeud de la tige

E-I: Les différents stades du développement d'un stomate

E: cellule méristémoïde

F: première division d'une cellule méristémoïde

(CGM: cellule de garde mère; CS: cellule subsidiaire)

G: deuxième division d'une cellule méristémoïde

H: jeune stomate

I: stomate mature

avons observé que la double mutation dpE2F affecte encore plus sévèrement l'activité du promoteur sauf dans les entre-nœuds. Ces résultats suggèrent une coopération entre les cis-éléments E2F dans la régulation du promoteur *NtRNR1a*. Il est également important de remarquer que l'activité du promoteur WT est plus faible dans les feuilles matures que dans les jeunes feuilles. De plus, dans ce cas, la mutation du cis-élément pE2F induit une diminution de l'activité du promoteur alors que la mutation du cis-élément dE2F conduit à une légère augmentation de l'activité du promoteur par rapport à l'activité du promoteur WT (Figure 37C). Nous avons déjà observé ce phénomène lorsque nous avons analysé l'activité du promoteur *NtRNR1a* au cours du cycle cellulaire dans des cellules BY-2 synchronisées (Chapitre I Figure 28). Ce résultat suggère donc que le cis-élément dE2F pourrait jouer un rôle de répresseur sur l'activité du promoteur *NtRNR1a* dans les feuilles matures.

Nous avons également constaté que l'activité du promoteur était particulièrement élevée dans les jeunes boutons floraux (Figure 37). Ce phénomène traduit un besoin en dNTPs plus élevé que dans les autres tissus qui pourrait être lié à un taux de division cellulaire plus élevé. De récents articles ont montré que des gènes (*AtBRCA1* et *AtRad51B*) impliqués dans la réparation de l'ADN étaient aussi fortement exprimés dans les boutons floraux (Osakabe et al., 2005) (Lafarge and Montane, 2003) ce qui pourrait suggérer l'implication de *NtRNR1a* dans la réparation de l'ADN en addition de son rôle dans la division cellulaire.

1.2. Localisation tissulaire de l'expression du gène *NtRNR1a*

Afin d'avoir plus d'informations sur la localisation de l'expression du gène *NtRNR1a* dans les tissus, nous avons réalisé des tests histochimiques pour révéler l'activité GUS dans les plantes transgéniques exprimant le gène *GUS* sous le contrôle du promoteur *NtRNR1a*. Ces expériences permettent donc de localiser précisément l'expression d'un gène dans un tissu alors que le dosage enzymatique est plus particulièrement utilisé pour quantifier l'expression d'un gène dans un tissu. Les jeunes plantules de tabac présentent une activité GUS élevée au niveau de leur pointe de racine et des jeunes feuilles (Figure 38A). L'activité GUS élevée dans les jeunes feuilles (Figure 38B) se localisent au niveau des trichomes (Figure 38C) ainsi que dans les stomates en divisions (Figure 38E-I). Il a été montré chez *Arabidopsis thaliana* qu'un trichome se formait, par endoreduplication, à partir d'une seule et même cellule (Hulskamp et al., 1994). Toutefois, chez le tabac, le développement du trichome

est encore mal connu. Nous avons également détecté une coloration GUS dans les tissus vasculaires de la tige et plus particulièrement dans les cellules du phloème (Figure 38D).

En conclusion, le promoteur du gène *NtRNR1a* est actif dans de nombreux tissus en division ainsi que dans des tissus pouvant présenter de l'endoréduplication. Ainsi, l'activité de ce promoteur, en plus d'être liée au cycle mitotique, pourrait être aussi liée à de l'endoréduplication.

1.3. Conclusion

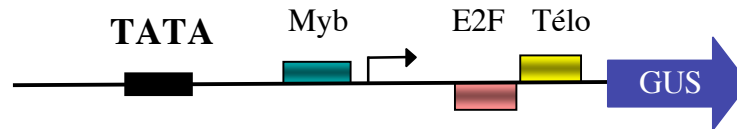
L'analyse de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1a* dans différents tissus de plants de tabac a permis de montrer que ce promoteur présentait une activité élevée dans les tissus en division comme dans les jeunes feuilles, les racines, les boutons axillaires ou encore les jeunes boutons floraux. Les jeunes boutons floraux présentent un taux de divisions cellulaires particulièrement élevé pouvant expliquer cette forte activité du promoteur. De plus, la forte expression des gènes *AtBRCA1* et *AtRad51B*, impliqués dans la voie de la réparation de l'ADN dans les boutons floraux (Osakabe et al., 2005) (Lafarge and Montane, 2003) suggère que le gène *NtRNR1a* pourrait également être impliqué dans cette voie. Les résultats de coloration GUS histochimiques ont montré que le promoteur *NtRNR1a* était actif dans les trichomes suggérant que son activité pourrait être liée à de l'endoréduplication.

La mutation de l'un ou l'autre des cis-éléments E2F (dMu et pMu) ainsi que la double mutation réduit fortement l'activité du promoteur dans la plupart des tissus analysés. En effet, dans les feuilles matures, l'activité du promoteur est plus élevée pour l'élément dE2F muté que pour le promoteur sauvage WT. Ces résultats suggèrent que l'élément dE2F agirait en tant que répresseur de l'activité du promoteur dans les feuilles matures alors que l'élément pE2F aurait un rôle d'activateur (Lincker et al., 2006).

2. Étude de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1b* dans différents tissus de plants de tabac

Différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1b* ont été clonées comme précédemment en amont du gène rapporteur GUS. Nous avons obtenu une construction avec le promoteur *NtRNR1b* sauvage (WT) et une construction avec le promoteur *NtRNR1b* muté

A.



B.

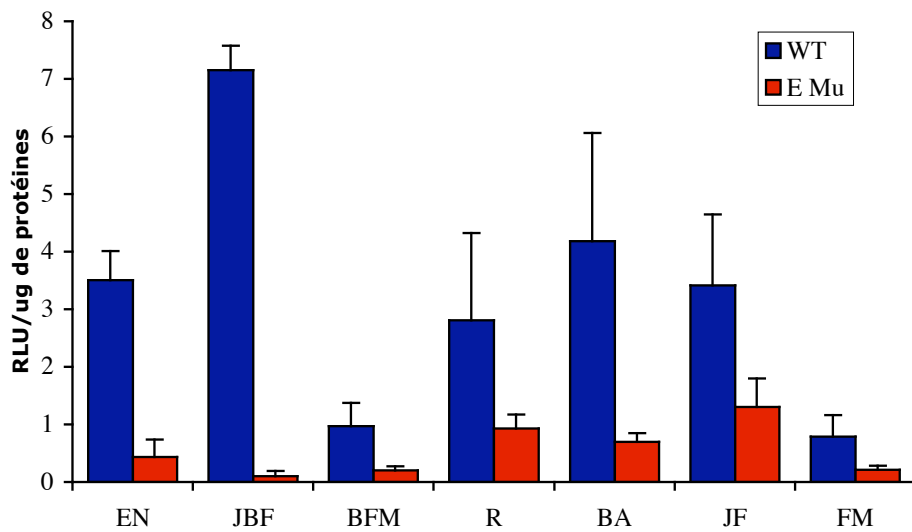


Figure 39: Activité de différentes versions du promoteur *NtRNR1b* au cours du développement du tabac

Différentes versions du promoteur *NtRNR1b* ont été fusionnées au gène rapporteur *GUS* et transformées dans des plants de tabac. Les activités des promoteurs ont été mesurées grâce au gène rapporteur *GUS* par la mesure de l'activité enzymatique *GUS* par luminescence.

EN : entrenoeud

JBF: jeune bouton floral

BFM : bouton floral mature

R : racine

BA: bourgeon axillaire

JF : jeune feuille

FM : feuille mature

A. Schéma du promoteur *NtRNR1b*

B. Activités de différentes versions du promoteur *NtRNR1b* (WT et E Mu) au cours du développement du tabac

au niveau de son cis-élément E2F (Mu). Ces constructions ont été transférées comme précédemment de manière stable dans des plants de tabac afin d'analyser l'activité du promoteur dans différents tissus de tabac.

2.1. Analyse de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1b* dans différents tissus de plants de tabac

Nous avons quantifié l'activité du promoteur du gène *NtRNR1b* dans les mêmes tissus que précédemment. Ce promoteur présente une forte activité dans les tissus avec des divisions cellulaires actives comme les jeunes boutons floraux, les bourgeons axillaires, les jeunes feuilles et les racines (Figure 39). Nous pouvons également constater que l'activité du promoteur est faible dans les tissus ne se divisant plus (Figure 39). De plus, la mutation du cis-élément E2F affecte fortement l'activité du promoteur. En effet, cette activité est diminuée de trois à quinze fois. De plus, tout comme le promoteur *NtRNR1a*, le promoteur *NtRNR1b* présente une très forte activité dans les jeunes boutons floraux. Cette forte activité observée est sans doute liée au taux de division cellulaire particulièrement élevé de ces tissus ou, comme dit précédemment, à un phénomène de réparation plus intense que dans d'autres tissus.

Il est aussi intéressant de remarquer que le promoteur *NtRNR1b* présente, contrairement au promoteur *NtRNR1a*, une forte activité dans les entre-nœuds de la tige. L'auxine circule à l'intérieur des cellules parenchymateuse du phloème de la tige, du pôle apical de la plantes vers ces racines. Par ailleurs, l'auxine régule positivement l'accumulation et la stabilité du facteur *AtE2Fb* chez *Arabidopsis thaliana* (Magyar et al., 2005). Ces données suggèrent que l'activité de ce promoteur pourrait être augmenté via une concentration en auxine plus élevée dans les entre-nœuds que dans les autres tissus étudiés. Afin de vérifier cette hypothèse, à savoir la capacité de l'auxine à induire l'activité de ce promoteur, nous avons utilisé une lignée de cellules BY-2 transgénique en phase exponentielle de croissance exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur *NtRNR1b*, que nous avons traité par de l'auxine (10 μ M) (Figure 40). Nous avons alors mesuré l'activité du promoteur 48 heures après traitement, et les résultats ont montré que l'activité du promoteur était environ deux fois supérieure à l'activité du promoteur non traité. Ces résultats suggèrent que le promoteur *NtRNR1b* pourrait être induit par l'auxine. Par conséquent, le promoteur *NtRNR1b* pourrait être régulé par un facteur E2F sensible à l'auxine. Une publication récente

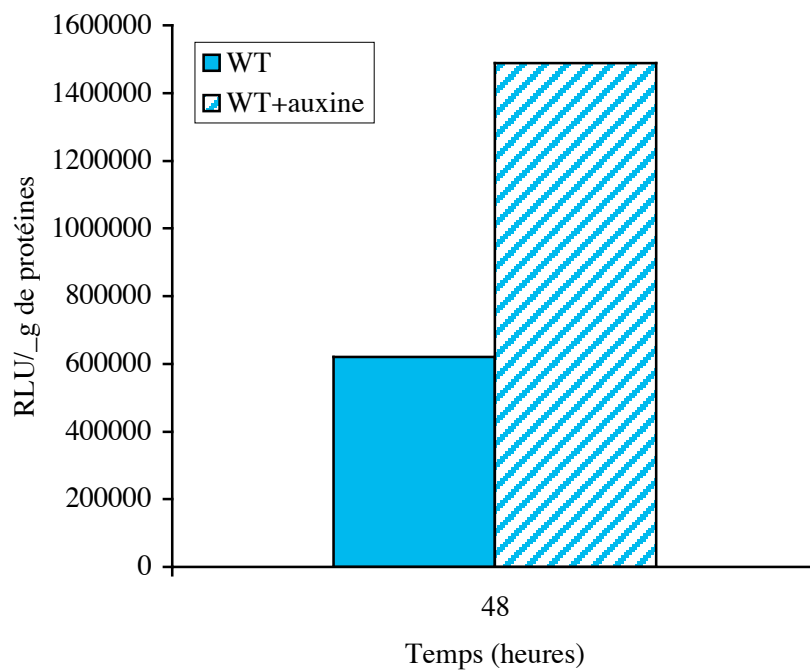


Figure 40: Activité du promoteur *NtRNR1b* suite à un traitement à l'auxine
Des cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur *NtRNR1b* ont été traitées par de l'auxine (10 μ M). L'activité luciférase a été mesurée 48 heures après le traitement à l'auxine.

a montré que l'auxine augmentait l'abondance et la stabilité du facteur AtE2Fb chez *Arabidopsis thaliana* (Magyar et al., 2005).

2.2. Conclusion

L'analyse de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1b* dans différents tissus de plantes a montré une activité élevée de ce promoteur similaire à celle observée avec le promoteur du gène *NtRNR1a* dans les tissus présentant une division cellulaire active. L'activité élevée de ce promoteur dans les jeunes boutons floraux pourraient suggérer, comme pour le promoteur *NtRNR1a*, un rôle dans la réparation de l'ADN. Le promoteur du gène *NtRNR1b* présente également une activité élevée dans les entre-nœuds de la tige ce qui suggère une régulation potentielle par l'auxine. Enfin, nous avons montré le rôle essentiel du cis-élément E2F pour l'activité du promoteur *NtRNR1b* dans les tissus analysés.

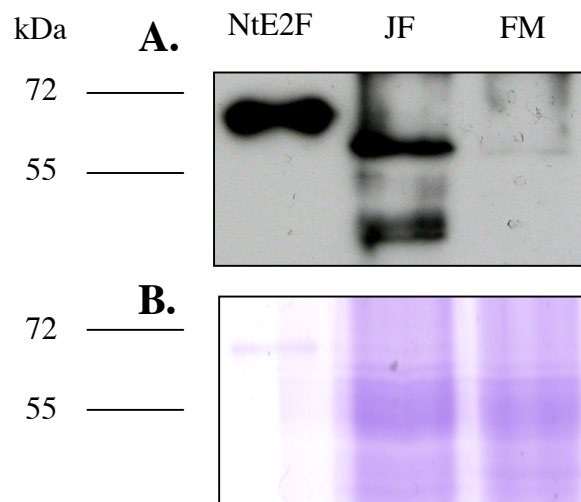


Figure 41: Accumulation de facteurs E2F au cours du développement le tabac

Les protéines totales ont été extraites de jeunes feuilles (JF) et de feuilles matures (FM) de tabac, puis séparées sur une gel SDS-PAGE (15 μ g). Dans la première piste, le facteur NtE2F purifié a été déposé. Après transfert, la membrane a été incubée avec un anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain.

A. Western blot

B. Coloration au bleu de Coomassie

II. Évolution de l'accumulation de facteurs E2F de tabac au cours du développement de la plante

1. Analyse de l'accumulation de facteurs E2F de tabac dans de jeunes feuilles et dans des feuilles matures de tabac

Nous avons montré précédemment le rôle essentiel des cis-éléments E2F dans la régulation des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b*. Nous avons constaté que les promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR1b* présentent une activité élevée dans les jeunes tissus se divisant activement (comme les jeunes feuilles, les jeunes boutons floraux, les bourgeons axillaires ou encore les racines), et une faible activité dans les tissus plus âgés ne présentant plus de divisions cellulaires (comme les feuilles matures ou les boutons floraux matures). Nous avons donc voulu vérifier si ces différences d'activités entre jeunes tissus et tissus matures pouvaient être causées par une différence d'abondance en facteurs E2F entre ces deux catégories de tissus. Afin de répondre à cette question, nous avons étudié l'accumulation de facteurs E2F de tabac dans les jeunes feuilles et dans les feuilles matures de tabac par Western blot. Nous avons utilisé l'anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain que nous avons déjà utilisé précédemment (cf. Chapitre I Figure 36).

Nous avons extrait les protéines totales de jeunes feuilles et de feuilles matures de tabac. Comme contrôle positif, nous avons utilisé le facteur *NtE2F* de tabac purifié fourni par le Dr Sekine. Après incubation avec l'anticorps, nous avons détecté deux signaux de forte intensité dans l'extrait protéique issu de jeunes feuilles de tabac à 45 kDa et à 60 kDa (Figure 41). Les poids moléculaires correspondant à ces signaux coïncident avec ceux détectés dans l'expérience de Western blot utilisant des protéines issues de cellules BY-2 synchronisées (Chapitre I Figure 36). Dans les extraits protéiques issus de feuilles matures de tabac, uniquement un signal de 60 kDa est faiblement détecté (Figure 41). Ces résultats suggèrent qu'un facteur E2F détecté autour de 60 kDa pourrait jouer un rôle dans la répression de l'activité du promoteur *NtRNR1a* dans les tissus matures.

2. Conclusion

Ces résultats montrent que l'abondance en facteurs E2F est plus élevée dans les jeunes tissus en divisions que dans les tissus matures. Ainsi, les fortes activités des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* quantifiées dans les jeunes tissus peuvent être corrélées à l'abondance de facteur E2F dans ces tissus. Au contraire, les faibles activités de ces promoteurs dans les tissus matures peuvent être liées à la faible quantité de facteur E2F répresseur ou à l'absence de facteurs E2F. De plus, dans les jeunes tissus deux signaux de 45 kDa et de 60 kDa correspondant à des facteurs E2F sont détectés alors que uniquement un faible signal de 60 kDa est détecté dans les tissus matures. Par conséquent, le facteur E2F de 45 kDa pourrait être impliqué dans l'induction de l'activité de ces promoteurs dans les jeunes tissus. Le signal détecté à 60 kDa pourrait contenir à la fois un facteur E2F activateur et un facteur E2F répresseur intervenant dans la régulation de l'expression de ces gènes, expliquant la présence de ce signal dans les jeunes tissus et les tissus matures (Lincker et al., 2006).

Il aurait été intéressant d'affiner cette étude par des expériences de gel retard avec des extraits protéiques issus de jeunes tissus et de tissus matures avec les sondes portant soit le cis-élément dE2F ou soit le cis-élément pE2F du promoteur *NtRNR1a*. En effet, les résultats de gel retard utilisant des extraits protéiques provenant de cellules BY-2 synchronisées ont montré qu'un complexe protéique, interagissant avec l'élément dE2F, pourrait être impliqué dans la répression du promoteur en dehors de la phase S alors qu'un complexe protéique, interagissant avec l'élément pE2F pourrait être impliqué dans l'induction du promoteur à l'entrée de la phase S.

III. Conclusions

L'analyse des activités des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* ont permis de montrer que ces promoteurs étaient actifs dans les jeunes tissus en division active et peu actifs dans les tissus matures différenciés. Nous avons mis en évidence une activité particulièrement élevée dans les jeunes boutons floraux, tissus présentant un taux de divisions cellulaires spécialement important. Nous avons également montré que l'activité élevée du promoteur *NtRNR1a* était localisée dans les trichomes de feuilles et pourrait être liée à de l'endoréduplication. Quant au promoteur du gène *NtRNR1b* qui est très actif dans les entrenœuds de la tige, il pourrait être régulé par l'auxine.

Les mutations des différents cis-éléments E2F des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* ont permis de montrer l'importance de ces cis-éléments pour l'activité de ces promoteurs. Néanmoins, dans les feuilles matures, le promoteur *NtRNR1a* muté au niveau de l'élément dE2F présente une activité supérieure à l'activité du promoteur sauvage ce qui suggère un rôle de répresseur pour cet élément dans ces tissus.

Enfin, la faible abondance de facteurs E2F présents dans les tissus matures en comparaison avec les jeunes tissus suggèrent que la faible activité des promoteurs dans les tissus matures pourrait être causée par une faible disponibilité en facteur E2F. De plus, les expériences de Western blot ont permis de montrer que dans les tissus matures, seul un signal de 60 kDa était détecté suggérant que le facteur E2F correspondant à ce signal pourrait être impliqué dans la répression de l'activité du promoteur en interagissant avec le cis-élément dE2F dans les tissus matures.

Plusieurs promoteurs de gènes eucaryotes comportent plusieurs éléments E2F qui peuvent avoir des rôles synergiques ou opposés sur l'activité du promoteur (Yamaguchi et al., 1995) (Zhu et al., 1995) (Di Fiore et al., 1999). Chez les plantes, plusieurs études ont également montré que les cis-éléments E2F d'un promoteur d'un gène étaient impliqués dans la régulation du gène au cours du développement. Par exemple, chez le tabac, les deux éléments E2F du promoteur du gène *NtPCNA* jouent des rôles différents sur l'activité du promoteur. La mutation de l'élément distal induit une augmentation de l'activité alors que la mutation de l'élément proximal n'a pas d'effet sur l'activité du promoteur dans les jeunes

tissus. Par contre, dans les tissus matures, la mutation d'un de ces deux éléments induit une augmentation de l'activité du promoteur. Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été montré que les cis-éléments E2F du promoteur *AtMCM3* étaient impliqués dans la régulation de ce gène au cours du cycle cellulaire ainsi qu'au cours du développement de la plante en fonction du contexte cellulaire. L'étude de la localisation de l'expression de ce gène par histochimie a révélé qu'il était fortement exprimé dans les pointes de racines et les régions méristématiques. Les mutations indépendantes de ces deux éléments E2F a permis de montrer que l'élément distal n'était que faiblement impliqué dans l'expression méristématique de ce gène alors que l'élément proximal était essentiel à cette expression (Stevens et al., 2002)

Chez *Arabidopsis thaliana*, parmi les six facteurs E2F identifiés, seuls les facteurs AtE2Fa et AtE2Fb ont été montrés comme étant clairement des activateurs de la transcription. La surexpression du facteur AtE2Fa et de AtDPa induit de la prolifération cellulaire ainsi que de l'endoréduplication. Cette surexpression induit l'expression de gènes spécifiques de la phase S comme le gène codant pour l'ADN polymérase α , le gène *AtCDC6*, le gène *AtORC1* ou encore le gène *AtMCM5* (De Veylder et al., 2002). Le facteur AtE2Fa est également exprimé dans des tissus présentant un taux d'endoréduplication élevé (De Veylder et al., 2002). La surexpression du facteur AtE2Fb induit l'expression de gènes exprimés à la transition G1/S, comme les gènes *AtRNR1* et *AtMCM3*, conduisant à des modifications de la morphologie des racines, des cotylédons et des feuilles. Ces modifications morphologiques peuvent être attribuées à la stimulation de la division cellulaire (Sozzani et al., 2006).

Contrairement aux facteurs AtE2Fa et AtE2Fb, le facteur AtE2Fc ne présente pas d'activité transactivatrice (Kosugi and Ohashi, 2002) et sa surexpression retarde la division cellulaire et réprime l'expression de gènes spécifiques de la phase S (del Pozo et al., 2002). Une étude récente du facteur AtE2Fc a montré qu'en réduisant le niveau de transcrits *AtE2Fc*, les plants d'*Arabidopsis thaliana* présentent des organes contenant des cellules plus nombreuses mais plus petites ainsi qu'une augmentation de l'activité proliférative dans les jeunes feuilles et les méristèmes (Del Pozo et al., 2006).

Nous pouvons donc envisager l'existence d'un facteur E2F de tabac de type répresseur qui pourrait inhiber l'expression des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* en dehors de la phase S et dans les tissus différenciés alors qu'un facteur E2F de type activateur induirait leur expression en phase S et dans les jeunes tissus.

Troisième Chapitre

Étude de l'induction transcriptionnelle des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* et de la localisation subcellulaire de la sous-unité R1a en réponse à un stress génotoxique

Une des conditions nécessaires à la survie d'un organisme multicellulaire est la capacité de chaque cellule à répliquer correctement son ADN et à le réparer fidèlement afin de réduire le nombre de mutations transmissibles aux cellules filles. Pour y parvenir, les cellules ont besoin d'un approvisionnement équilibré en chaque dNTPs, dont l'étape limitante de biosynthèse *de novo* est catalysée par la ribonucléotide réductase.

Dans les deux premiers chapitres de ce manuscrit, nous avons montré que l'expression des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* était fortement induite à la transition G1/S du cycle cellulaire et que ces gènes étaient fortement exprimés dans les jeunes tissus activement en division. Cependant, le promoteur du gène *NtRNR1a* est également induit à la transition G2/M. Cette activation pourrait traduire l'implication de ce gène dans la réparation de l'ADN, permettant ainsi à la cellule de ne pas transmettre de mutations aux cellules filles lors de la mitose.

Les analyses des activités des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* ont montré des activités particulièrement importantes dans les jeunes boutons floraux où coexistent un taux élevé de divisions cellulaires, mais aussi une réparation importante de l'ADN comme cela a été montré chez *Arabidopsis thaliana* pour les gènes *AtBRCA1* (Lafarge and Montane, 2003) et *AtRad51B* (Osakabe et al., 2005).

Ces différents résultats et hypothèses nous ont incité à analyser l'activité des promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* en réponse à un dommage à l'ADN.

D'autre part, chez les mammifères et la levure, il a été montré que la régulation de la RNR était également liée à la localisation subcellulaire de ces sous-unités. Ainsi, nous avons également analysé la régulation de la localisation de la sous-unité R1a en réponse à un dommage à l'ADN.

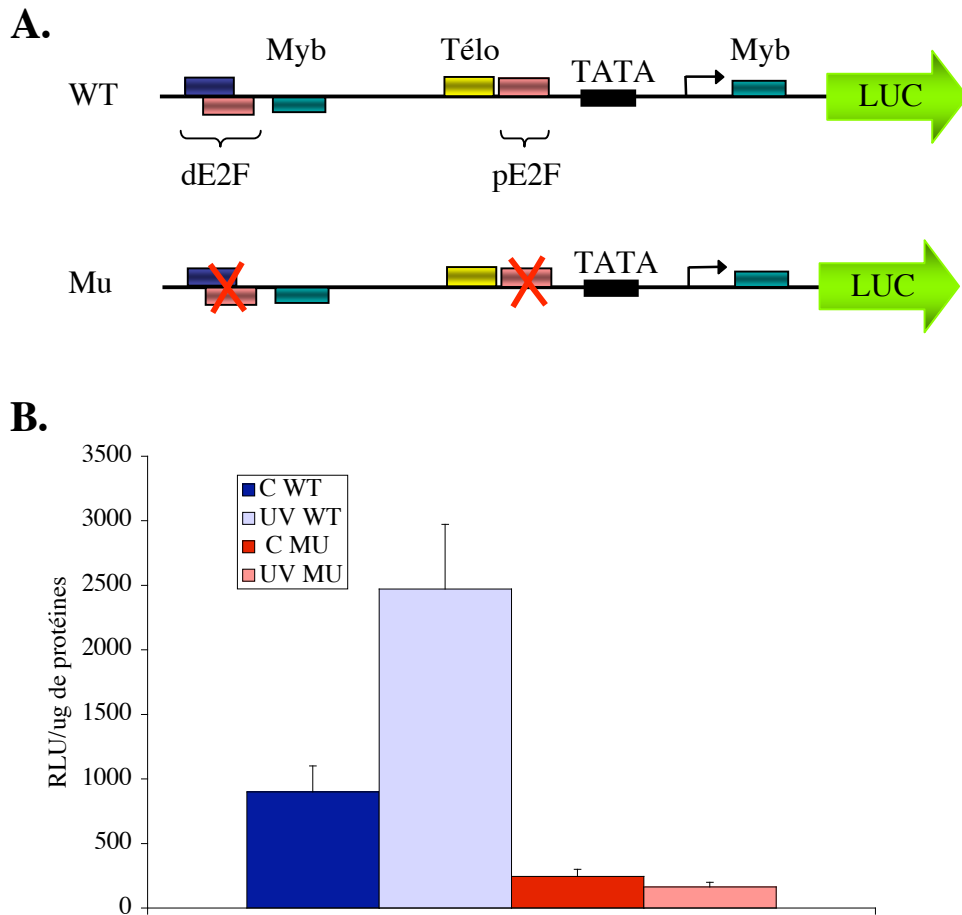


Figure 42: Activité du promoteur *NtRNRIa* en réponse à une irradiation aux UV-C

Des cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance, exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de différentes versions du promoteur *NtRNRIa* de manière stable, ont été irradiées aux UV-C (450 J/m²). Les activités des différentes versions du promoteur *NtRNRIa* (WT et Mu) ont été mesurées à quatre heures après l'irradiation.

A.Représentation schématique du promoteur *NtRNRIa*

B.Activité de différentes versions du promoteur *NtRNRIa* (WT et Mu) en réponse à une irradiation aux UV-C (C: contrôle sans irradiation; UV: irradiation aux UV-C)

I. Réponse transcriptionnelle des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* à un stress génotoxique

Dans le chapitre I, nous avons observé une induction de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1a* à la transition G2/M du cycle cellulaire. Nous avons alors proposé que cette induction pouvait être causée par un besoin en dNTPs nécessaire à la réparation de l'ADN avant l'entrée des cellules en mitose. Ceci nous a incité à étudier la réponse transcriptionnelle du gène *NtRNR1a* ainsi que les rôles des cis-éléments dE2F et pE2F contenus dans son promoteur, en réponse à un stress génotoxique.

Nous avons également étudié la réponse du gène *NtRNR1b* à un stress génotoxique, afin de vérifier si un des deux gènes codant pour la grande sous-unité R1 était spécialisé dans l'apport de dNTPs suite à un dommage à l'ADN.

1. Analyse de l'activité du promoteur du gène *NtRNR1a* en réponse à une irradiation aux rayons UV-C

Nous avons utilisé les cultures de cellules BY-2 transgéniques déjà employées pour étudier l'activité du promoteur au cours du cycle cellulaire (cf. chapitre I Figure 27), et exprimant le gène de la luciférase sous le contrôle de différentes versions du promoteur du gène *NtRNR1a* (WT et dpMu).

Nous avons traité ces différentes cultures de cellules BY-2 transgéniques en phase exponentielle de croissance par une irradiation aux UV-C (450 J/m²). Cette irradiation induit la formation de dimères de pyrimidines bloquant la progression de la fourche de réplication pouvant conduire à des cassures simple brin de l'ADN. Il avait été montré, chez *Arabidopsis thaliana*, que ces doses UV-C induisaient des dommages à l'ADN et donc de la réparation (Li et al., 2002). Nous avons mesuré l'activité du promoteur par l'intermédiaire de gène rapporteur de la luciférase quatre heures après l'irradiation aux rayons UV-C. Comparativement aux cellules non traitées à quatre heures, l'activité du promoteur des cellules irradiées est augmentée de 2,5 fois (Figure 42). Par contre, lorsque les cis-éléments

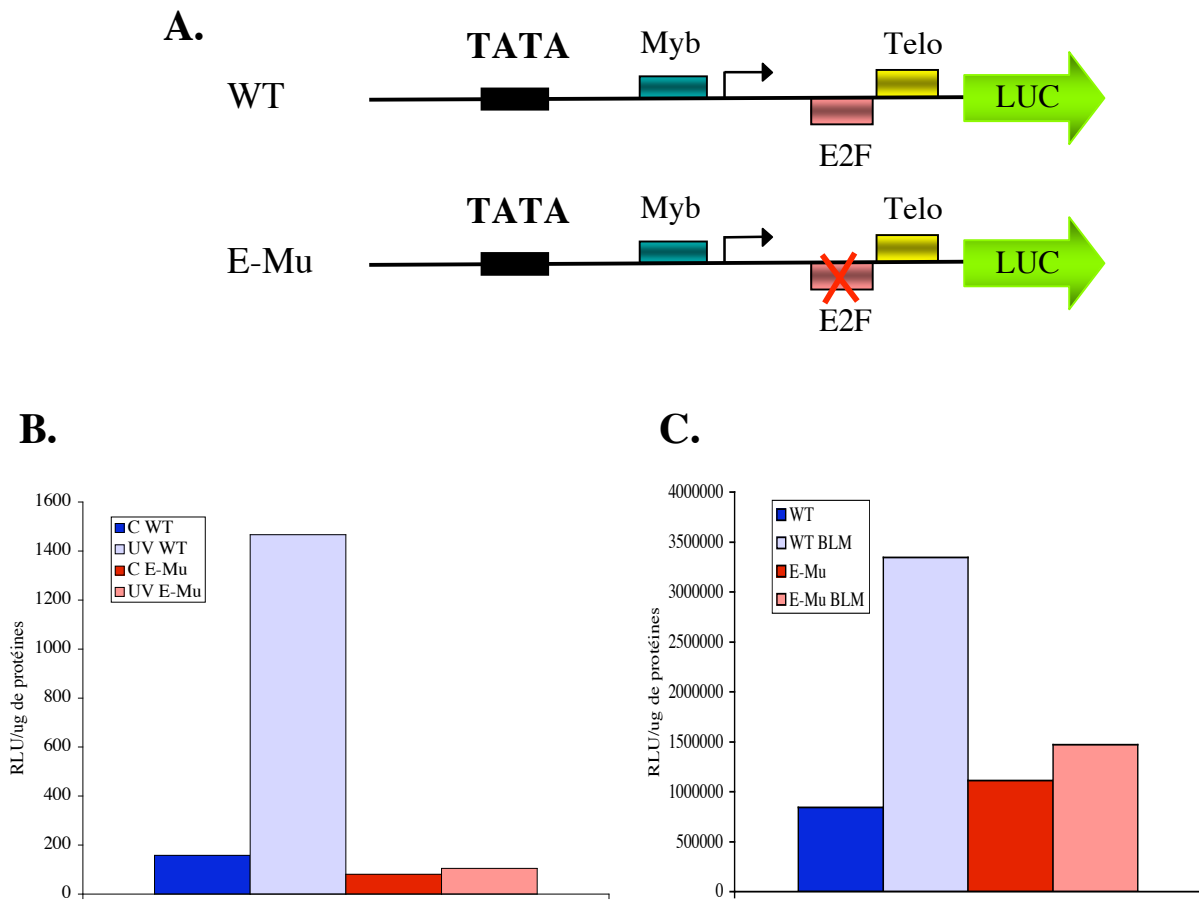


Figure 43: Activité du promoteur *NtRNR1b* en réponse à un traitement génotoxique

Des cellules BY-2, exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle de différentes versions du promoteur *NtRNR1b* de manière stable, ont été traitées à la bléomycine ($10^{-5}M$) ou irradiées par des rayons UV-C ($450J/m^2$). Les activités des différentes versions du promoteur *NtRNR1b* (WT, E-Mu et ME Mu) ont été mesurées.

A. Représentation schématique des différentes versions du promoteur *NtRNR1b* (WT et E Mu) utilisée

B. Activités du promoteur *NtRNR1b* dans des cellules BY-2 en phase stationnaire en cinq heures après irradiation aux rayons UV-C ($450J/m^2$).

C. Activités du promoteur *NtRNR1b* dans des cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance quatre heures après traitement à la bléomycine (BLM, $10^{-5}M$).

E2F du promoteur (dpMu) ont été mutées, nous n'avons pas observé d'induction de l'activité du promoteur suite à l'irradiation des cellules (Figure 42), ce qui suggère le rôle essentiel des cis-éléments E2F dans l'induction du promoteur en réponse à un stress génotoxique. Nous avons obtenu des résultats similaires lorsque nous avons utilisé des cellules en phase stationnaire.

En conclusion, nous avons montré que l'activité du promoteur du gène *NtRNR1a* était induite suite à un stress génotoxique. De plus, nous avons montré que la mutation des éléments E2F (dE2F et pE2F) induisait une diminution de l'activité du promoteur dans des cellules cyclantes mais également en réponse à l'irradiation aux UV-C. Ce résultat démontre l'importance de ces cis-éléments dans l'induction de l'activité du promoteur *NtRNR1a* en réponse à un stress génotoxique (Lincker et al., 2004). Dans le chapitre I, nous avons évoqué le rôle potentiel des éléments Myb pour l'activité de ce promoteur dans cette réponse. Ces résultats ne nous permettent pas de conclure sur leur implication dans une réponse à un stress génotoxique. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure que ces éléments jouent un rôle de coopérateur dans l'induction du promoteur *NtRNR1a* comme nous l'avons montré pour le promoteur *NtRNR1b* lors de son induction à la transition G1/S du cycle cellulaire.

2. Étude fonctionnelle du gène *NtRNR1b* en réponse à un stress génotoxique

2.1. Analyse de l'activité transcriptionnelle du gène *NtRNR1b* en réponse à une irradiation aux rayons UV-C

Puisque l'activité du promoteur *NtRNR1a* était induite suite à un stress génotoxique, nous avons voulu savoir s'il en était de même pour le promoteur *NtRNR1b* afin de déterminer si une des sous-unités R1 de la RNR de tabac était spécialisée dans l'apport de dNTPs en réponse à un stress génotoxique.

Nous avons utilisé les cultures de cellules BY-2 transgéniques en phase stationnaire exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur *NtRNR1b* sauvage (WT) ou muté au niveau de l'élément E2F (E-Mu) (Figure 43A).

Ces différentes cultures de cellules BY-2 transgéniques ont été irradiées par des rayons UV-C (450 J/m²) et nous avons mesuré les activités des différentes versions du promoteur

NtRNR1b cinq heures après traitement aux rayons UV-C (Figure 43B). Nous avons observé, comparativement aux cellules non irradiées, que l'activité du promoteur WT était fortement induit (environ sept fois) cinq heures après irradiation. Inversement, le promoteur E-Mu ne présente pas d'induction significative suite à l'irradiation aux rayons UV-C indiquant que l'élément E2F du promoteur *NtRNR1b* est essentiel à cette induction.

2.2. Analyse de l'activité transcriptionnelle du gène *NtRNR1b* en réponse à un traitement à la bléomycine

Afin d'étudier l'effet d'un autre stress génotoxique sur l'activité du promoteur *NtRNR1b*, nous avons traité les lignées de cellules BY-2, utilisées précédemment, avec de la bléomycine (10^{-5} M). Cette molécule est un peptide glycosylé produit par la bactérie *Streptomyces verticillus*, et utilisé comme agent anticancéreux. Elle induit des cassures double brin de l'ADN en chélatant des ions métalliques pour former une pseudoenzyme. Cette pseudoenzyme va réagir avec l'oxygène pour produire des superoxides et des radicaux libres qui vont cliver la molécule d'ADN. En parallèle, ces complexes vont induire la peroxydation des lipides ainsi que l'oxydation d'autres molécules cellulaires. Des études ont également suggéré que la bléomycine pourrait inhiber l'incorporation de thymine dans l'ADN (Claussen and Long, 1999).

Nous avons mesuré l'activité des deux versions du promoteur *NtRNR1b* quatre heures après traitement à la bléomycine. Nous avons observé que l'activité du promoteur sauvage (WT) était environ 3,5 fois plus importante quatre heures après traitement à la bléomycine que l'activité du promoteur WT non traité (Figure 43C). Lorsque le cis-élément E2F du promoteur a été muté, l'activité du promoteur n'est pas modifiée comme nous l'avons observé dans des cellules synchronisées. Toutefois, dans des cellules traitées à la bléomycine, l'activité du promoteur E-Mu n'est pas induite significativement, suggérant que l'élément E2F joue un rôle essentiel dans la régulation du promoteur en réponse à une cassure double brin de l'ADN.

En conclusion, nous avons montré que l'activité du promoteur du gène *NtRNR1b* était induite suite à des stress génotoxiques induisant des cassure simple (UV-C) ou double brins (bléomycine). La mutation de l'élément E2F de ce promoteur ne modifie pas l'activité du promoteur par contre cet élément est essentiel à la réponse du promoteur à un stress génotoxique.

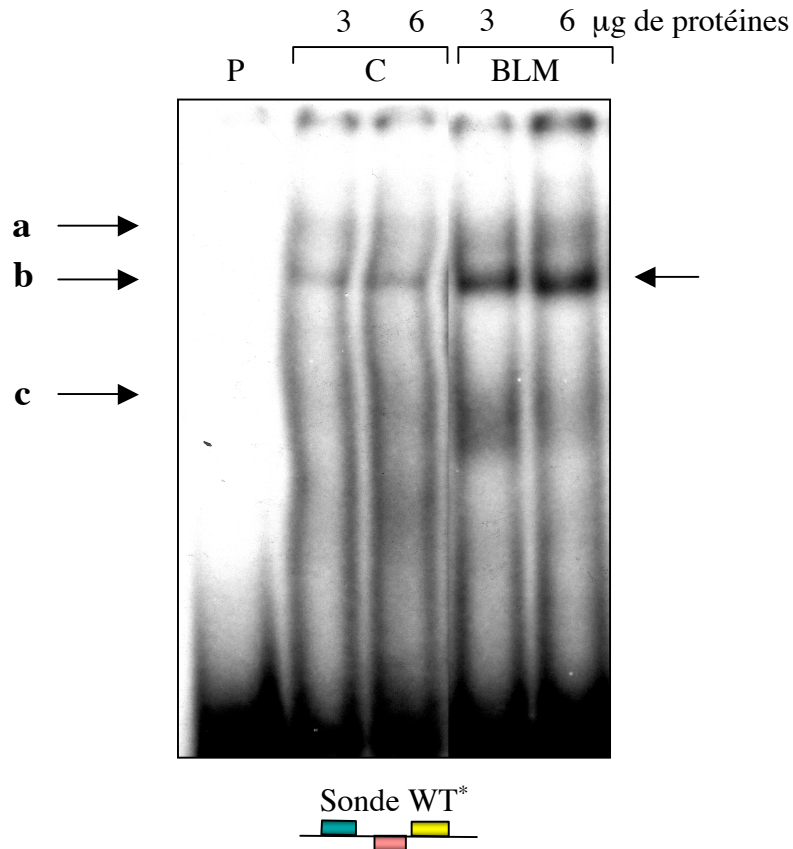


Figure 44: Interaction de complexes protéiques issus de cellules BY-2 traitées à la bléomycine avec les éléments Myb, E2F et Telo du promoteur *NtRNR1b*

Trois ou six µg d'extraits protéiques nucléaires issus de cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance traitées à la bléomycine (BLM, 90 minutes, 10^{-5} M) ou non traitées (C) ont été incubés avec une sonde nucléotidique double brin (WT) puis séparés sur gel de polyacrylamide 4,5 %.

La sonde utilisée (WT) correspond à la région de 63 pb du promoteur *NtRNR1b* contenant les cis-éléments Myb, E2F et Telo.

2.3. Interaction entre les cis-éléments Myb, E2F et Telo et des complexes protéiques nucléaires issus de cellules BY-2 traitées à la bléomycine

Nous avons montré précédemment que l'activité du promoteur *NtRNR1b* était induite suite à un traitement à la bléomycine. Nous avons donc voulu vérifier si cette induction était liée à l'augmentation de l'affinité entre des complexes nucléaires et les cis-éléments Myb, E2F et Telo contenus dans le promoteur. Ainsi, nous avons réalisé des expériences de gel retard en utilisant des complexes protéiques nucléaires issus de cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance traitées à la bléomycine (10^{-5} M) pendant 90 minutes. Nous avons utilisé des complexes protéiques nucléaires issus de cellules BY-2 non traitées comme contrôle. Ces complexes protéiques (3 μ g ou 6 μ g), de cellules BY-2 traitées ou non à la bléomycine, ont été incubés avec une sonde oligonucléotidique radiomarquée contenant la région du promoteur de 63 paires de bases contenant les trois cis-éléments Myb, E2F et Telo (Cf. Annexe). Après incubation, les complexes nucléoprotéiques ont été séparés sur gel de polyacrylamide non dénaturant.

Nous avons constaté que les trois complexes nucléoprotéiques a, b et c (Cf. Chapitre I Figure 35) étaient détectés. Cependant, lorsque nous avons incubé la sonde avec des extraits protéiques issus de cellules BY-2 traitées à la bléomycine, un signal correspondant au complexe nucléoprotéique (b) était largement plus intense que celui obtenu avec des extraits protéiques non traités à la bléomycine (Figure 44).

Précédemment (cf. Chapitre I §II), nous avons montré par des expériences de compétitions avec des sondes froides, que les complexes a et b étaient spécifiques de l'élément E2F. L'augmentation de l'intensité du signal correspondant au complexe b suggère donc que ce complexe b pourrait contenir un facteur E2F dont le taux augmente suite à un traitement à la bléomycine. Cette augmentation du taux en facteurs E2F peut résulter soit de l'augmentation de la production en facteur E2F (induction transcriptionnelle) soit de la stabilisation des facteurs E2F les détournant ainsi de la dégradation. Cependant, afin de s'assurer que le complexe fortement détecté comportait bien un facteur E2F, nous avons tenté de caractériser le contenu protéique de ce complexe par spectrométrie de masse par l'intermédiaire de la plateforme protéomique de l'IBMP/IBMC, mais nos tentatives se sont révélées infructueuses jusqu'à présent. La quantité en protéines contenue dans les morceaux de gel étaient trop faible pour obtenir une identification.

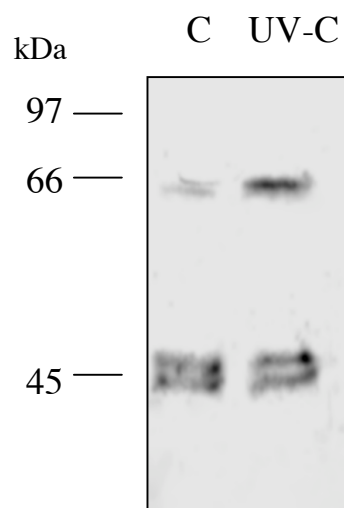


Figure 45: Accumulation de facteurs E2F de tabac en réponse à un dommage à l'ADN

Les protéines nucléaires ont été extraites de cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance, quatre heures après irradiation aux UV-C (450 J/m^2), puis séparées sur une gel SDS-PAGE ($6 \mu\text{g}$). Après transfert, la membrane a été incubée avec un anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain.

C: protéines issues de cellules non irradiées

UV-C: protéines issues de cellules irradiées

2.4. Étude de l'accumulation des facteurs E2F de tabac en réponse à un stress génotoxique

Afin de vérifier si le niveau en facteurs E2F augmentait suite à un stress génotoxique, nous avons extrait les protéines nucléaires de cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance non-irradiées ou après irradiation aux UV-C (4 heures). Nous avons ensuite séparé les protéines par SDS-PAGE afin de réaliser un Western blot avec un anticorps dirigé contre le domaine de liaison à l'ADN du facteur E2F5 humain que nous avons déjà utilisé (cf. Chapitre I et II). L'incubation de la membrane de PVDF avec cet anticorps a révélé différents signaux : un signal à environ 60 kDa, ainsi qu'un doublet à environ 45 kDa (Figure 45). Nous avons observé que le signal correspondant à un facteur E2F de 60 kDa était fortement augmenté suite à une irradiation aux UV-C suggérant que ce facteur pourrait jouer un rôle dans la réponse à un dommage à l'ADN. Cette augmentation en facteur E2F peut résulter soit d'une induction transcriptionnelle soit de la stabilisation post-traductionnelle de ce facteur suite à l'irradiation aux UV-C.

Ces résultats suggèrent qu'un facteur E2F d'environ 60 kDa interviendrait dans la réponse à un dommage à l'ADN.

3. Conclusion

En conclusion, nous avons montré que les activités transcriptionnelles des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* étaient induites, grâce à leurs éléments E2F contenus dans leurs promoteurs, en réponse à un stress génotoxique, comme une irradiation aux UV-C ou un traitement à la bléomycine. De plus, par des expériences de gel retard nous avons montré que l'affinité d'un complexe protéique pour la sonde contenant les éléments Myb, E2F et Telo du promoteur *NtRNR1b* était fortement augmenté lorsque que les extraits protéiques utilisés provenaient de cellules BY-2 traitées à la bléomycine. Par comparaison avec les résultats obtenus précédemment (Cf. Chapitre I), il semblerait qu'un facteur E2F puisse faire partie de ce complexe fortement augmenté.

II. Localisation subcellulaire de la sous-unité *NtR1a* en réponse à un dommage à l'ADN

La ribonucléotide réductase est formée de sous-unités R1 (sous-unité régulatrice) et R2 (sous-unité catalytique) codées respectivement par les gènes *RNR1* et *RNR2*. Chez la levure, deux gènes codant pour la sous-unité R1 (*RNR1* et *RNR3*) et deux gènes codant pour la sous-unité R2 (*RNR2* et *RNR4*) ont été identifiés. Chez les mammifères un seul gène codant pour la sous-unité R1 (*RNR1*) et deux gènes codant pour la sous-unité R2 (*RNR2* et *p53R2*) ont été identifiés. Au cours de l'évolution, la duplication de ces gènes a abouti à une diversification de fonction. En effet, la transcription du gène *p53R2* est induite spécifiquement par le facteur de transcription p53 en réponse à un dommage à l'ADN. La régulation de l'activité de la RNR ne se fait pas uniquement au niveau de la transcription mais également au niveau de sa localisation subcellulaire. La ribonucléotide réductase est localisée, chez les mammifères, dans le cytoplasme de la cellule et y produit les dNTPs qui diffusent dans le noyau pour la réplication de l'ADN (Engstrom et al., 1984). La protéine *p53R2* diffère de R2 de part une localisation nucléaire. Ces résultats ont conduit les chercheurs à proposer que la forme normale de la RNR, localisée dans le cytoplasme, serait impliquée dans la réplication de l'ADN, alors que *p53R2* produirait des dNTPs, en association avec une sous-unité R1, dans le noyau et permettrait d'augmenter la concentration en dNTPs à proximité de la lésion, favorisant ainsi sa réparation. Cette hypothèse a été confirmée par des expériences d'inhibition de l'expression de *p53R2* par une stratégie antisens. Il a ainsi été montré que l'incorporation de dNTPs dans l'ADN diminuait après que l'ADN ait été endommagé par un traitement aux ultraviolet (Tanaka et al., 2000). Par conséquent, les cellules n'exprimant plus *p53R2* étaient plus sensibles à agents génotoxiques comme les rayons UV, γ ou l'adriamycine, un inhibiteur des topoisomérases.

Au cours du cycle cellulaire chez la levure, les protéines Rnr1 et Rnr3 sont principalement localisées dans le cytoplasme de la cellule alors que les protéines Rnr2 et Rnr4 sont localisées essentiellement dans le noyau. Suite à un stress génotoxique, les protéines Rnr2 et Rnr4 sont relocalisées dans le cytoplasme alors que la protéine Rnr1 reste dans le

A.



B.

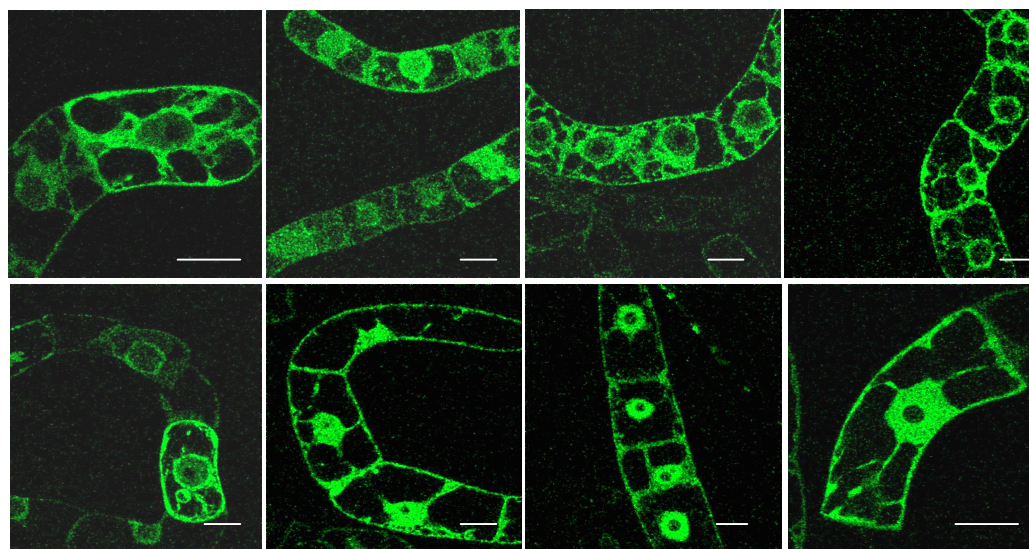
UV-C
(450 J/m²)

Contrôle

3 heures

4 heures

5 heures



Leptomycine B
(0,1 μM)

GFP contrôle

— = 10 μm

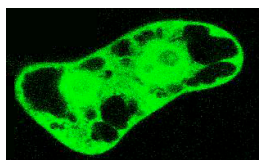


Figure 46: Localisation subcellulaire de la sous-unité R1a fusionnée à la EGFP en réponse à une irradiation aux UV-C

Des cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance, exprimant la protéine de fusion EGFP-R1a de manière stable, ont été irradiées aux rayons UV-C. La fluorescence des cellules non-irradiées a été observée ainsi que celle de cellules irradiées 3, 4 et 5 heures après l'irradiation. Parallèlement, des cellules ont été traitées à la leptomycine B (0,1 μM) avant l'irradiation.

A. Représentation de la construction utilisée

B. Localisation subcellulaire de la protéine de fusion EGFP-R1a et de la GFP seule (GFP contrôle)

cytoplasme. Les kinases Mec1/Rad53/Dun1 sembleraient jouer un rôle essentiel dans ces relocalisations (Yao et al., 2003).

Ces différents résultats, chez les mammifères et la levure, nous ont incité à étudier le comportement des sous-unités R1 et R2 de tabac suite à un stress génotoxique. Nous avons commencé notre étude par la grande sous-unité R1a.

1. Analyse de la localisation subcellulaire de la sous-unité R1a en réponse à un stress génotoxique

Afin d'étudier la localisation subcellulaire de la sous-unité régulatrice R1a de tabac en réponse à un stress génotoxique, nous avons cloné la phase codante du gène *NtRNR1a* en 3' de la phase codante de la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Nous avons réalisé ce clonage par la technique GatewayTM. Après avoir ajouté les bordures *attB* par PCR en 5' et 3' de la phase codante du gène *NtRNR1a*, le produit de PCR a été cloné dans le vecteur d'entrée pDONR201. Puis, la phase codante du gène *NtRNR1a* a été transférée par une seconde réaction de recombinaison dans le vecteur d'expression binaire pK7WGF2 afin de cloner la phase codante du gène *NtRNR1a* fusionnée en 3' de la phase codante de la EGFP dans un vecteur binaire sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV). La fusion EGFP-R1a a ensuite été transformée dans la souche d'*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 permettant alors de transformer de manière stable des cellules BY-2 de tabac. Nous avons obtenu ainsi une lignée de cellules BY-2 exprimant la fusion de la EGFP avec la sous-unité R1a sous le contrôle du promoteur 35S.

Nous avons ensuite utilisé cette lignée de cellules BY-2 transgéniques pour étudier la localisation subcellulaire de la sous-unité R1a de la RNR. Nous avons observé ces cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance au microscope confocal. Nous avons constaté que, dans des conditions normales, la sous-unité R1a était localisée dans le cytoplasme de la cellule (Figure 46). Afin d'étudier la localisation subcellulaire de cette protéine en réponse à un stress génotoxique, nous avons irradié les cellules BY-2 aux rayons UV-C (450 J/m²). Nous observons trois heures après irradiation une localisation nucléaire transitoire de la fusion EGFP:R1a. Quatre et cinq heures après irradiation, elle est à nouveau localisée dans le cytoplasme (Figure 46).

De façon intéressante, lorsque nous avons traité préalablement les cellules, avant irradiation aux UV-C, avec de la leptomycine B (0,1 μ M), un inhibiteur de l'export nucléaire, nous n'avons pas observé de relocalisation cytoplasmique de la protéine de fusion EGFP:R1a à quatre et cinq heures après irradiation. Comme contrôle, nous avons observé la localisation de la EGFP seule qui est localisée dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau (Figure 46). Ainsi, la localisation subcellulaire de la sous-unité R1a en réponse à une irradiation aux UV-C est transitoirement nucléaire avant d'être relocalisée activement vers le cytoplasme.

2. Conclusion

Nous avons montré que la sous-unité R1a était localisée transitoirement dans le cytoplasme en réponse à un stress génotoxique suggérant la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS) et d'un signal d'exportation nucléaire (NES) ou une interaction de cette sous-unité avec une protéine chaperonne permettant de la guider vers ces compartiments subcellulaires. Les NLS monopartite et bipartite sont les principaux type de NLS. Le NLS monopartite est constitué d'un groupe de sept à huit acides aminés dont cinq au moins sont basiques, alors que le NLS bipartite est constitué de deux groupements basiques de deux à trois résidus basiques chacun et ils sont séparés par environ 10 acides aminés. Ces NLS peuvent être situés aléatoirement dans la séquence de la protéine et elles se caractérisent par une succession d'acides aminés basiques (Lysine et Arginine) pouvant éventuellement contenir des Prolines (Jans et al., 2000). L'analyse de la séquence protéique de la cette protéine R1a a révélé la présence d'un potentiel NLS bipartite (**VKRDGRQEAVHFDKITARLKK**) situé dans la partie N-terminale de la protéine et d'un NES dont les fonctionnalités restent à être déterminés. Le blocage du retour de la sous-unité R1a suite à un traitement à la leptomycine B suggère la présence d'un NES dans sa séquence dont la séquence consensus est L-x(2,3)-[LIVFM]-x(2,3)-L-x-[L] (Lincker et al., 2004).

III. Conclusions

Au cours de ce chapitre, nous avons montré que les promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR1b* étaient induites en réponse à un stress génotoxique et que ces inductions étaient dépendantes de leurs cis-éléments E2F. L'induction transcriptionnelle des gènes *RNR* avaient déjà été observée chez la souris (Elledge and Davis, 1989a) (Elledge and Davis, 1989b) et la levure (Filatov et al., 1996) et plus récemment chez *Arabidopsis thaliana* (Chen et al., 2003). Nous avons également montré que l'affinité d'un complexe protéique, pour les cis-éléments Myb, E2F et Telo du promoteur *NtRNR1b*, était fortement augmentée suite à un traitement à la bléomycine. De plus, nous avons montré qu'un facteur E2F, pouvant correspondre au facteur NtE2F, s'accumulait en réponse à une irradiation aux rayons UV-C. Ces résultats suggèrent que l'augmentation du signal correspondant à l'interaction d'un complexe protéique avec la sonde WT, en réponse à un stress génotoxique, pourrait être liée à l'accumulation de ce facteur E2F. L'augmentation du taux de facteurs E2F, suite à un stress génotoxique, peut être causé par une induction transcriptionnelle de gènes codant pour des facteurs E2F et/ou par une augmentation de la stabilité de ce facteur E2F suite à une modification post-traductionnelle. En effet, chez les mammifères, il a été montré que le facteur E2F1 était phosphorylé par des protéines kinases impliquées dans la réponse à un dommage à l'ADN (ATM/ATR, Chk2). Cette phosphorylation stabilise le facteur E2F1 et conduit à son accumulation. Ceci permet à ce facteur E2F d'activer différents gènes impliqués dans l'apoptose, ou d'interagir avec des protéines telles que Nbs1, BRCA1 ou encore TopBP1 impliquées dans la réparation de l'ADN (Stevens and La Thangue, 2004).

Il est intéressant de noter que chez la souris et la levure les gènes codant pour la RNR sont également induits en réponse à un stress génotoxique. En effet, Elledge SJ et Davis RW ont montré, il y a quelques années déjà, que l'activité du promoteur du gène *RNR2* de la levure était induite par divers agents endommageant l'ADN, comme un rayonnement ultraviolet ou le méthyl méthanesulfonate (MMS) (Elledge and Davis, 1989b). De même, l'expression du gène *RNR3* est exclusivement induite en réponse à un stress génotoxique (Elledge and Davis, 1989b). Chez la souris, une étude plus récente a montré que l'activité du promoteur du gène codant pour la sous-unité R1 était induite jusqu'à trois fois suite à une

irradiation aux rayons UV alors que celle du promoteur *R2* pouvait être induite jusqu'à dix fois (Filatov et al., 1996). Chez les mammifères, l'expression d'un second gène codant pour la petite sous-unité catalytique (*p53R2*) est uniquement induite par le facteur de transcription p53 en réponse à un dommage à l'ADN (Tanaka et al., 2000). De plus, d'autres résultats ont montré, chez *Arabidopsis thaliana*, que la transcription d'un des trois gènes codant pour la sous-unité R2 (*Tso2*) était fortement induite suite à un traitement à la bléomycine (Chen et al., 2003). Ces derniers résultats ont été confirmés récemment par une étude d'un mutant *tso2* chez *Arabidopsis thaliana* montrant que ce mutant était plus sensible aux rayons UV-C et que les plantules du double mutant *tso2 rnr2a* présentaient un niveau de lésions à l'ADN plus élevée que les plantules sauvages (Wang and Liu, 2006).

Les expériences de localisation subcellulaire de la sous-unité régulatrice R1a ont montré que cette sous-unité était localisée dans le cytoplasme dans des conditions normales. Par contre, suite à un stress génotoxique, la sous-unité R1a est rélocalisée transitoirement dans le noyau. L'analyse de sa séquence protéique a révélé la présence d'un NLS bipartite et d'un NES donc les fonctionnalités restent à être déterminées.

Chez la levure, en phase S du cycle cellulaire ou suite à un stress génotoxique, la sous-unité R2, qui est localisée dans le noyau dans des conditions normales, est relocalisée dans le cytoplasme et rejoint la sous-unité R1 dont la localisation est toujours cytoplasmique (Yao et al., 2003). En réponse à un dommage à l'ADN, la sous-unité R2 est donc localisée transitoirement dans le cytoplasme. De récents résultats ont montré qu'une protéine appelée WTM1 (WD40-containing transcriptional modulator) était un régulateur de la localisation subcellulaire de la sous-unité R2. Il a été montré que l'interaction de cette protéine WTM1 avec la sous-unité R2 conduisait à la localisation nucléaire de cette sous-unité. Par contre, en phase S du cycle cellulaire ou en réponse à un dommage à l'ADN, la protéine WTM1 n'interagit plus avec la sous-unité R2 conduisant à sa relocalisation cytoplasmique. La protéine WTM1 permet donc en quelque sorte d'ancrer la sous-unité R2 dans le noyau dans des conditions normales et en dehors de la phase S (Lee and Elledge, 2006; Zhang et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la localisation nucléaire de la RNR ne nécessite pas forcément un signal de localisation nucléaire. Nous pouvons également envisager que des variations de l'affinité de la RNR pour une protéine chaperonne puissent permettre à la RNR d'être localisée dans le noyau ou dans le cytoplasme suivant les conditions physiologiques. Chez l'homme, les sous-unités R1 et p53R2 (sous-unités R2 exprimées uniquement en

réponse à un stress génotoxique) sont localisées dans le noyau en réponse à un dommage à l'ADN (Tanaka et al., 2000).

Il semble donc que la localisation de la sous-unité R1a de tabac soit intermédiaire entre ce qui se passe chez la levure et les mammifères. À l'inverse de ce qui se passe pour la sous-unité R2 de levure, nous pouvons imaginer que la sous-unité R1a de tabac, en réponse à un stress génotoxique, pourrait être dirigée vers le noyau soit via son interaction avec une protéine chaperonne soit par l'intermédiaire de son signal potentiel de localisation nucléaire.

Nous pouvons imaginer que cette localisation nucléaire transitoire permettrait d'augmenter la concentration de dNTPs au niveau de lésions afin de réparer rapidement le dommage sans toutefois augmenter trop fortement la concentration en dNTPs pouvant être préjudiciable à la cellule. Toutefois, afin de produire des dNTPs, la sous-unité R2 devrait également être localisée dans le noyau. Il serait donc essentiel d'étudier la localisation subcellulaire de la sous-unité R2.

Quatrième Chapitre

Etude du facteur NtE2F

Au cours de ce manuscrit, nous avons montré le rôle essentiel des cis-éléments E2F contenus dans les promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* dans la régulation transcriptionnelle de ces gènes. Nous avons montré que le facteur NtE2F purifié est capable d'interagir spécifiquement avec ces éléments. De nombreux résultats ont également suggéré l'intervention de facteurs E2F de tabac dans la régulation de ces gènes. Toutes ces données, nous ont donc incité à étudier plus précisément le facteur NtE2F, unique facteur E2F de tabac caractérisé à ce jour.

I. Présentation du facteur NtE2F

Le facteur NtE2F de tabac a été le premier facteur E2F isolé et caractérisé chez les plantes (Sekine et al., 1999). Le gène *NtE2F* code pour une protéine de 439 acides aminés et d'un poids moléculaire calculé de 48,5 kDa mais migrant avec un poids moléculaire apparent d'environ 60 kDa. La protéine NtE2F partage une forte identité avec le facteur E2F3 humain (41%) et les facteurs AtE2Fa (50%) et AtE2Fb (55%). En effet, les facteurs NtE2F et hE2F3 partagent 73 % d'identité au niveau de leur domaine de liaison à l'ADN ainsi que 50 % d'identité au niveau de leur «marked box », domaine essentiel dans l'interaction de E2F avec d'autres protéines d'où la réaction croisée des anticorps dirigés contre la protéine que nous avons utilisés précédemment.

L'expression du gène *NtE2F* est régulée au cours du cycle cellulaire. En effet, l'utilisation de cellules BY-2 synchronisées a permis de montrer que le gène *NtE2F* était fortement exprimé au cours de la phase G1 et au début de la phase S du cycle cellulaire (Sekine et al., 1999). Par des expériences de double hybride, il a été montré que le facteur NtE2F pouvait interagir avec la protéine Rb de tabac (NtRBR). L'utilisation d'un gène rapporteur a également permis de montrer que le facteur NtE2F en coopération avec NtDP pouvait transactiver l'expression de ce gène rapporteur. Cette activité transcriptionnelle de NtE2F est inhibée par la protéine NtRBR1 (Uemukai et al., 2005).

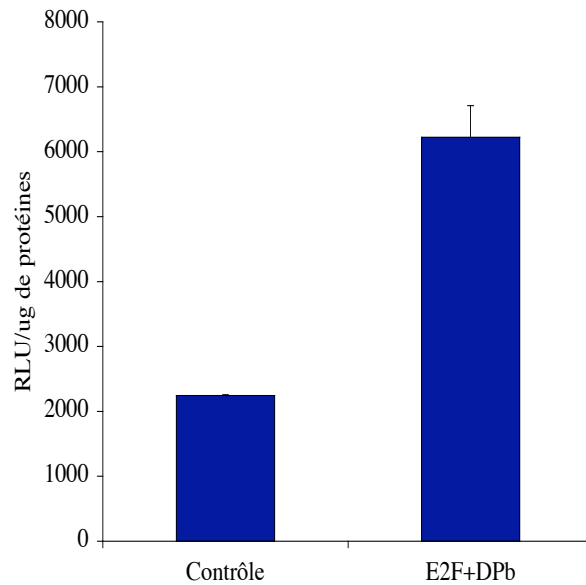


Figure 47: Test de fonctionnalité de la protéine de fusion NtE2F-EGFP

Des cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance, exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur du gène *NtRNR1b*, ont été transformées transitoirement soit par le vecteur seul (contrôle), soit par les constructions permettant d'exprimer les facteurs NtE2F-EGFP et AtDPb-EGFP (E2F+DPb). Les cellules ont été sélectionnées en fonction de leur fluorescence puis l'activité luciférase a été mesurée cinq heures après bombardement.

II. Étude de la localisation subcellulaire du facteur NtE2F

Afin d'étudier la localisation subcellulaire du facteur NtE2F, nous avons fusionné la phase codante du facteur NtE2F à celle du gène codant pour la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein).

Au laboratoire, un clone portant la phase codante du facteur NtE2F était disponible (fourni par le Dr. Sekine) et nous l'avons cloné en amont ou en aval de celle de la EGFP.

1. Fonctionnalité de la protéine de fusion NtE2F-EGFP

Nous avons tout d'abord cloné, la région codante du facteur NtE2F (sans le codon stop) dans un vecteur d'entrée. Par recombinaison entre le vecteur d'entrée et le vecteur de destination pK7FWG2, nous avons cloné la région codante du facteur NtE2F en amont de la phase codante de la protéine EGFP. Par la même technique, nous avons également réalisé la construction exprimant la protéine de fusion EGFP-AtDPb, en utilisant la région codante de DPb d'*Arabidopsis thaliana*.

Afin de vérifier la fonctionnalité de la protéine de fusion NtE2F-EGFP, nous avons testé sa capacité à transactiver, en présence d'un partenaire DP (EGFP-AtDPb) un promoteur cible, en l'occurrence le promoteur *NtRNR1b* contrôlant l'expression du gène rapporteur de la luciférase.

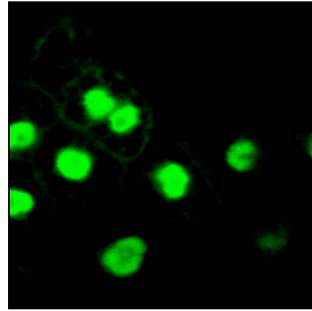
Par une approche de biolistiques, nous avons exprimé transitoirement, nos différentes constructions (NtE2F-EGFP et EGFP-AtDPb) dans une suspension de cellules BY-2 transgéniques exprimant le gène rapporteur de la luciférase sous le contrôle du promoteur *NtRNR1b* (RNR1b). Nous avons réalisé plusieurs expériences de bombardement en utilisant les cellules BY-2 RNR1b en phase exponentielle de croissance durant laquelle les cellules se divisent activement et donc durant laquelle les gènes *RNR* sont induits. Ces cellules ont été soit bombardées avec le vecteur pK7FWG2 seul, soit co-bombardées avec les vecteurs exprimant les protéines de fusion NtE2F-EGFP et EGFP-AtDPb.

A.

EGFP-NtE2F



NLS: PLKRRKSE



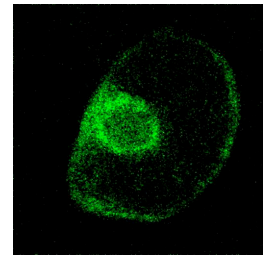
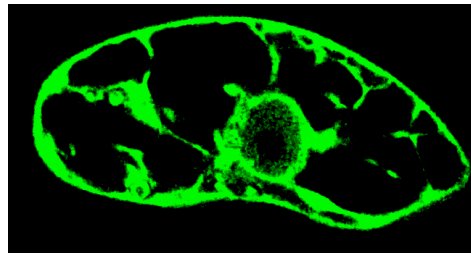
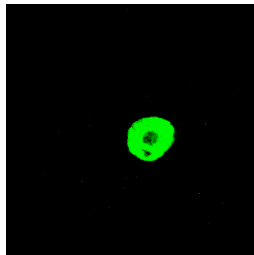
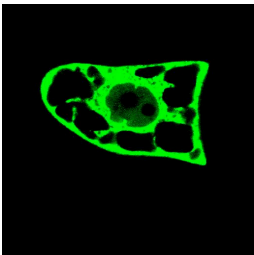
B.

- NLS

+ NLS

+ NLS muté

NtE2F (NLS muté)



NLS : PLKRRKSE

NLS muté : PLAAASE

NLS muté : PLAAASE

Figure 48: Étude de la localisation subcellulaire de la protéine de fusion EGFP-NtE2F

A. Localisation subcellulaire de la protéine de fusion EGFP-NtE2F

B. Fonctionnalité du signal de localisation nucléaire du facteur NtE2F

Le NLS sauvage ou muté au niveau de ces résidus basiques (KRR) a été fusionné à la chalcone synthase.

Cinq heures après bombardement, nous avons visualisé les cellules au microscope afin de sélectionner les cellules transformées, c'est-à-dire exprimant la EGFP. Les cellules ont été excitées à une longueur d'onde 488 nm et l'utilisation d'un filtre à large bande passante de 505 nm à 550 nm a permis d'observer le pic de fluorescence verte de la EGFP émis à 509 nm par les protéines de fusion. Les activités luciférase ont été mesurées dans les cellules BY-2 fluorescentes (Figure 47).

Lorsque les cellules BY-2 transgéniques ont été bombardées avec les vecteurs permettant d'exprimer les protéines de fusion NtE2F-EGFP et EGFP-AtDTPb, nous avons observé que l'activité du promoteur était 2,7 fois supérieure à celle détectée dans l'expérience contrôle (bombardement avec le vecteur pK7FWG2 seul) (Figure 47).

À partir de ces informations, nous avons pu conclure que la fusion NtE2F-GFP ne perturbe pas la fonctionnalité du facteur NtE2F : la protéine de fusion NtE2F-GFP est capable d'induire l'activité du promoteur *NtRNR1b* et garde son caractère transactivateur.

2. Localisation subcellulaire du facteur NtE2F

Afin d'étudier la localisation subcellulaire, la phase codante du facteur NtE2F a été fusionnée à l'extrémité C-terminale de la protéine EGFP par la technique Gateway™ en utilisant le vecteur binaire d'expression pK7WGF2. Cette construction, sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du tabac (CaMV), a été transformée de manière stable dans des cellules BY-2 de tabac par l'intermédiaire d'*Agrabacterium tumefaciens*. Nous avons utilisé cette fusion car nous avons rencontré des problèmes de stabilité de la lignée de cellules BY-2 exprimant de manière stable la protéine de fusion EGFP-E2F utilisée précédemment.

Nous avons observé ces cellules BY-2 transgéniques en phase exponentielle de croissance au microscope confocal et nous avons constaté que le facteur NtE2F était localisé dans le noyau (Figure 48) ce qui pourrait suggérer la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS). L'analyse de la séquence protéique de la séquence protéique de NtE2F nous a permis d'identifier un signal de localisation nucléaire potentiel à la position 43 de la séquence protéique. Ce NLS potentiel est caractérisé par la séquence PL**K**RKSE.

Afin d'étudier sa fonctionnalité, nous avons cloné, par PCR, la séquence correspondante de ce potentiel NLS dans le vecteur pCK-EGF-CHS (fourni par Dr Erzog)

afin de la fusionner à la EGFP et à la chalcone synthase. L'ajout de la phase codante de la chalcone synthase permet d'augmenter la taille de la construction et ainsi de s'affranchir de la diffusion passive de la EGFP dans le noyau. Nous avons observé que la protéine de fusion EGFP-CHS présentait une localisation cytoplasmique, alors que l'ajout du NLS potentiel à cette protéine de fusion la dirigeait vers le noyau suggérant que ce NLS était fonctionnel. Lorsque nous avons muté les trois résidus basiques de ce NLS potentiel, à savoir **KRK**, en Alanine (AAA), la protéine de fusion EGFP-CHS était à nouveau localisée dans le cytoplasme. Toutefois, les résultats ont montré que la protéine de fusion EGFP-NtE2F mutée au niveau de ce NLS potentiel présente malgré tout une localisation nucléaire, bien que moins intense, mais également un marquage cytoplasmique (Figure 48).

III. Purification de protéines associées au facteur NtE2F

Afin de caractériser des complexes protéiques associés au facteur NtE2F pouvant réguler l'expression des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b*, nous avons tenté de purifier des facteurs protéiques interagissant avec le facteur NtE2F. Dans ce but, nous avons utilisé différentes techniques. Tout d'abord, nous avons utilisé une approche de chromatographie d'affinité utilisant comme appât la région du promoteur *NtRNR1b* contenant les éléments Myb, E2F et Telo greffée à un groupement biotine. Ce groupement biotine permet au fragment d'ADN d'interagir avec un groupement streptavidine lié covalamment à des billes magnétiques et d'isoler ainsi les protéines interagissant avec ces différents éléments. Cependant, cette technique ne nous a pas permis d'obtenir des résultats satisfaisants. Nous nous sommes confrontés à des problèmes de spécificités. Nous avons alors utilisé une approche de purification de complexes protéiques par l'étiquette TAP-TAG. Cette étiquette a été fusionnée à la phase codante du facteur NtE2F et la construction a été transformée dans des cellules BY-2. Cette fois-ci nous n'avons pas réussi à obtenir des transformants.

Enfin, nous avons fusionné la phase codante du facteur NtE2F à l'étiquette E-Tag. L'étiquette E-Tag est un peptide de treize acides aminés de séquences GAPVPYDPLEPR situé en C-terminale du fragment variable d'anticorps simple chaîne ou « Single Chain Fragment variable » (ScFv) qui correspond au format d'expression d'anticorps le plus couramment utilisé. L'étiquette E-Tag a donc été utilisée initialement pour purifier des anticorps recombinants. Ainsi, des anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement cette étiquette ont été développés.

1. Clonage du facteur NtE2F dans le vecteur pNEG-X1

Afin de réaliser ce clonage, nous avons utilisé le vecteur pNEG-X1, fourni par le Dr. Évrard, qui permet de cloner une phase codante en C-terminale de la protéine de fusion E-Tag-GFP sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. Dans un premier temps, nous avons introduit, par PCR, des sites de restriction *MluI* et *NotI* de part et d'autre de la phase codante

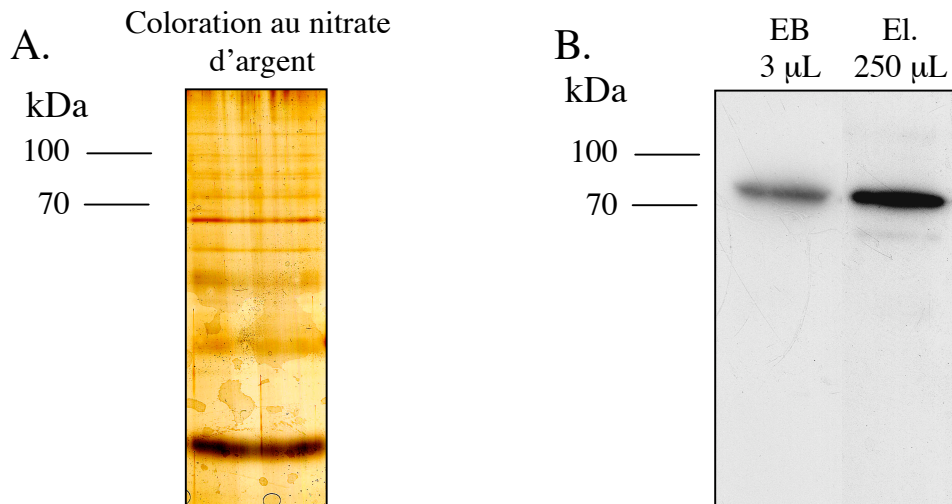


Figure 49: Purification de protéines interagissant avec la protéine de fusion E-Tag-GFP-NtE2F

Un extrait protéique nucléaire, issu de cellules BY2 en phase exponentielle de croissance exprimant la protéine de fusion E-Tag-GFP-NtE2F, a été fractionné par chromatographie d'affinité sur une colonne portant un anticorps anti-E-Tag (Amersham). Après passage de l'extrait brut (15mg, 5 mL), la colonne a été élué par 500 μ L de tampon. La moitié de l'éluat a été utilisée pour être coloré au nitrate d'argent après séparation par SDS-PAGE (A.) et l'autre moitié a été utilisée pour effectuer un western blot avec l'anticorps anti-E-Tag (Amersham) (B.).

EB: extrait brut

El: éluat

du facteur NtE2F, puis le produit de PCR obtenu a été cloné dans le vecteur TOPO™ et séquencé. Après digestion enzymatique, nous avons introduit le fragment *MluI/NotI* portant la phase codante du facteur NtE2F en position C-terminale de la protéine de fusion E-Tag-GFP. L'étape suivante a été le clonage de la construction E-Tag-GFP-NtE2F sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV dans le vecteur binaire pGREEN0029 au niveau des sites *HindIII/EcoRI*. Le vecteur pGREEN0029, portant la construction E-Tag-GFP-NtE2F, a été introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* pour permettre la transformation de cellules BY-2 ou de cellules d'*Arabidopsis thaliana*.

2. Essai de purification de protéines de tabac interagissant avec le facteur NtE2F

Afin de purifier les facteurs protéiques pouvant interagir avec le facteur NtE2F fusionné à l'étiquette E-Tag-GFP, nous avons utilisé une colonne d'affinité anti-E-Tag (RPAS Purification Module, Amersham Biosciences) consistant au couplage du ligand (l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre le peptide E-Tag) à une matrice sépharose.

Nous avons extrait les complexes protéiques nucléaires de cellules BY-2 transgéniques en phase exponentielle de croissance exprimant la protéine de fusion E-Tag-GFP-NtE2F. L'extraction de ces complexes a été réalisée dans des conditions peu stringentes (faible concentration en détergeant comme le Triton X-100 et en β -mercaptoéthanol) afin d'éviter la dénaturation des anticorps fixés covalamment sur la matrice. À partir de dix grammes de cellules nous avons obtenu environ quinze milligrammes (3 mg/mL) de complexes protéiques nucléaires. Nous avons purifié la totalité des complexes protéiques nucléaires sur la colonne d'affinité. Après lavage de la colonne, nous avons élué les protéines de fusions E-Tag-GFP-NtE2F à l'aide d'un tampon à pH acide (pH 3,0). Nous avons alors rassemblé les différentes fractions obtenues afin de les précipiter à l'acétone. Après précipitation, nous avons repris le culot de protéines dans du tampon de charge afin de les séparer sur SDS-PAGE. Les protéines ont ensuite été soit colorées au nitrate d'argent, soit transférées sur membrane de PVDF pour les soumettre à un western blot avec l'anticorps anti-E-Tag.

Suite à la coloration au nitrate d'argent, nous avons observé neuf bandes pouvant correspondre à des facteurs protéiques potentiels interagissant avec le facteur NtE2F (Figure 49). Nous avons alors tenté d'identifier les protéines contenues dans ces bandes, en

collaboration avec la plateforme de protéomique de l'IBMP/IBMC. La quantité de matériel contenue dans chacune de ces bandes n'était pas suffisante pour permettre leur identification jusqu'à présent. Cependant, le western blot a révélé que la protéine de fusion E-Tag-GFP-NtE2F d'environ 70 kDa était détectée dans l'éluat.

En conclusions, nos tentatives de purification des protéines associées au facteur NtE2F se sont avérées infructueuses. Nous avons réussi à détecter des protéines interagissant avec le facteur NtE2F, mais nous n'avons pas encore déterminé la spécificité de ces interactants ainsi que leur identité en effectuant l'expérience avec des cellules BY-2 transgéniques exprimant la protéine de fusion E-Tag-EGFP.

IV. Modification du facteur NtE2F en réponse à un stress génétoxique

1. Rappel

Les événements de phosphorylation/ déphosphorylation de facteurs protéiques jouent un rôle crucial dans la voie de signalisation de la réparation de l'ADN. La phosphorylation permet d'activer une kinase qui pourra activer une autre kinase et ainsi de suite. Cette cascade de phosphorylation est essentielle dans les voies de transduction de signaux et donc dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN. La phosphorylation ne permet pas uniquement d'activer des kinases, elle permet également de stabiliser un facteur en l'empêchant d'être dégradé. Cette stabilisation augmente le taux de facteurs dans la cellule, leur permettant alors d'activer la transcription de gènes impliqués dans la voie de réparation. Récemment, il a été montré que les fonctions des facteurs E2F n'étaient pas limitées à la régulation du cycle cellulaire mais qu'elles intervenaient également dans la réponse à un stress génotoxique. En réponse à un dommage à l'ADN, le facteur E2F1 est phosphorylé par les kinases ATM/ATR et Chk2 augmentant ainsi la stabilité du facteur E2F1 (Lin et al., 2001) (Stevens et al., 2003). L'augmentation du taux de facteurs E2F1 suite à cette modification post-traductionnelle permet alors l'activation par E2F1 de la transcription de nombreux gènes impliqués dans l'induction de l'apoptose comme les gènes *Apaf-1* (apoptosis protease-activating factor1), *ARF* (alternative reading frame), *Chk1* et *ATM* (Stevens and La Thangue, 2004).

De plus, en réponse à un stress génotoxique, le facteur E2F1 peut présenter une fonction alternative à sa fonction de facteur de transcription. La stabilisation du facteur E2F1 par phosphorylation en réponse à un dommage à l'ADN lui permet également d'interagir avec d'autres protéines comme Nbs1 (Nijmegen breakage syndrome), BRCA1 (breast cancer gene 1) et TopBP1 (DNA topoisomerase II β binding protein 1) (Liu et al., 2003) (Stevens and La Thangue, 2004).

Chez les plantes et plus particulièrement chez *Arabidopsis thaliana*, aucune étude n'a montré le rôle important joué par un facteur E2F dans la réponse à un stress génotoxique.

Cependant, quelques résultats nous laissent penser que les facteurs E2F pourraient être impliqués la réponse à un stress génotoxique (Ramirez-Parra et al., 2003) (Chen et al., 2003). Il a été montré que les promoteurs de différents gènes impliqués dans la réparation de l'ADN contenaient des cis-éléments E2F, notamment deux gènes homologues de *hBRCA2* dont la perte de fonction chez l'homme s'avère être oncogène (Ramirez-Parra et al., 2003). De plus, des résultats d'analyses de microarrays ont montré que l'expression du gène *AtE2Fa* était induit suite à un stress génotoxique (Chen et al., 2003).

Ainsi, ces données nous ont incité à étudier le facteur NtE2F en réponse à un stress génotoxique et plus particulièrement les éventuelles modifications post-traductionnelles pouvant être engendrées par ce type de stress.

2. Conséquences d'un stress génotoxique sur le facteur NtE2F

Afin d'observer d'éventuelles modifications post-traductionnelles du facteur NtE2F engendrées par un stress génotoxique, nous avons effectué des expériences de gels bidimensionnels. Ces expériences permettent de détecter les modifications post-traductionnelle d'une protéine induisant un changement du poids moléculaire et/ou du point isoélectrique (pI). Par exemple, la phosphorylation d'une protéine induit uniquement un changement du pI, alors qu'une glycosilation induira à la fois un changement du poids moléculaire et du pI.

Nous avons extrait les protéines totales des cellules d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques en phase exponentielle de croissance, exprimant la protéine de fusion E-Tag-GFP-NtE2F, traitées à la bléomycine (10^{-5} M, 1h30) ou non. Nous avons utilisé des cellules d'*Arabidopsis thaliana* exprimant cette protéine de fusion car les résultats obtenus avec des cellules BY-2 n'étaient pas satisfaisants. Nous avons rencontré des problèmes de résolution des protéines avec ce type de cellules comme d'autres personnes à l'institut. Nous avons alors séparé les protéines ainsi obtenues sur gels à deux dimensions. Les protéines ont été dans un premier temps séparées selon leur point isoélectrique (pI) dans une gamme de pH allant de pH 4,0 à pH 7,0 (le pI de la protéine de fusion est de 4,96) puis selon un gel SDS-PAGE. Nous avons préparé à chaque fois deux gels en parallèle : un gel pour une coloration au bleu colloïdale et un gel pour le transférer sur membrane de PVDF afin d'effectuer un western blot en utilisant un anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'étiquette E-Tag (Amersham).

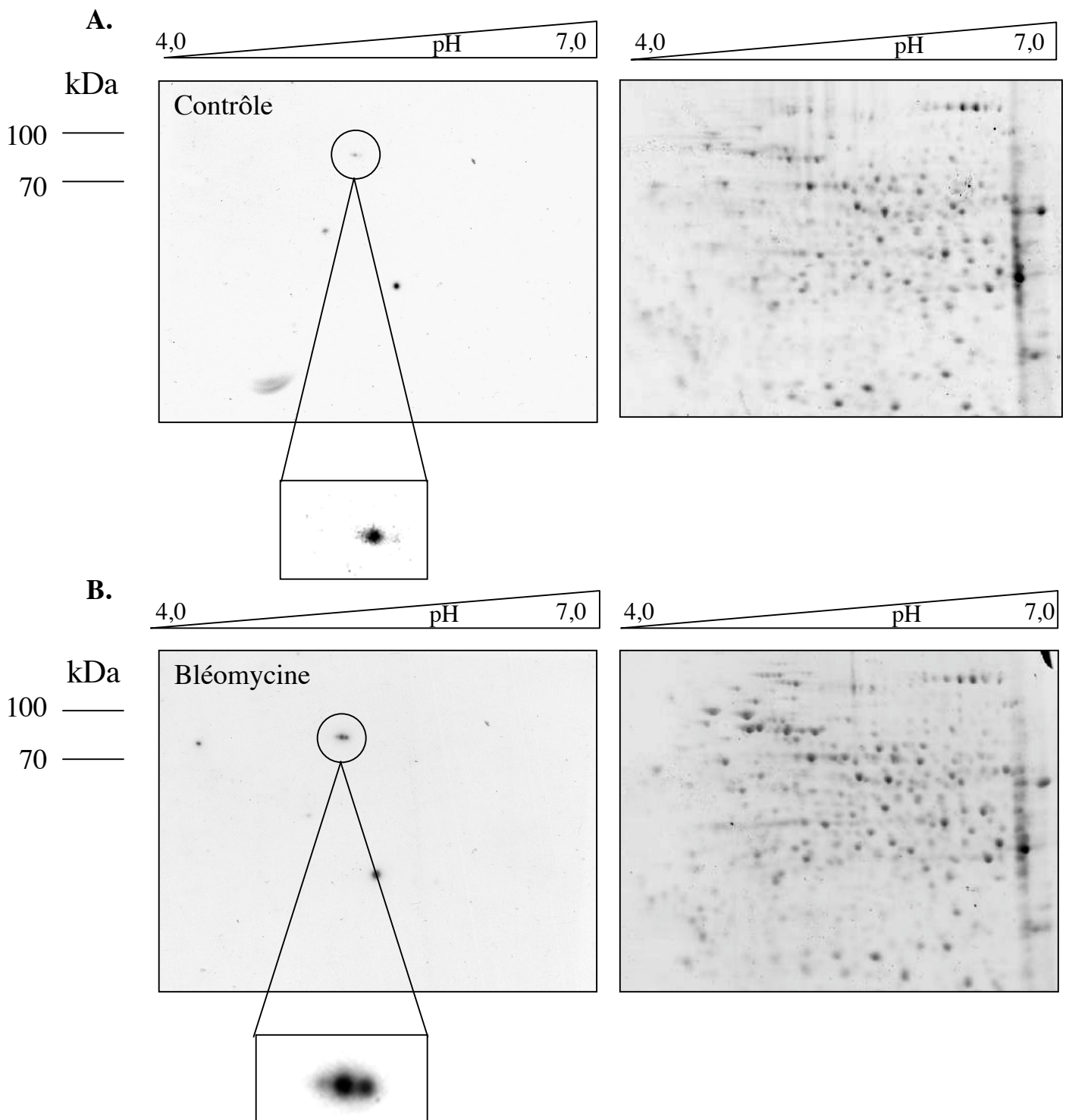


Figure 50: Mise en évidence de modifications du facteur NtE2F en réponse à stress génotoxique

Des extraits protéiques totales (75 μ g) de cellules BY-2 en phase exponentielle de croissance exprimant la protéine de fusion E-Tag-GFP-NtE2F traitées (B.) ou non traitées à bléomycine (10^{-5} M, 1h30) (A.) ont été séparés en fonction de leur point isoélectrique (entre pH 4,0 et 7,0) puis selon leur poids moléculaire. Les western blots ont été révélés avec l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'étiquette E-Tag et les gels colorés au bleu colloïdale. Pour chaque western blot, les signaux correspondant aux différentes isoformes de la protéine de fusion ont été agrandis.

La coloration du gel au bleu colloïdal permet de déterminer si la quantité de protéines utilisées pour les deux gels (contrôle et bléomycine) était équivalente et si la résolution des gels, c'est-à-dire des spots bien individualisés, était satisfaisante. Jusqu'à présent, nous avons obtenu uniquement une résolution satisfaisante avec des gels de petites tailles ne permettant pas de comparer les profils de migrations d'un extrait protéique contrôle avec un extrait traité à la bléomycine. Cette comparaison nécessiterait d'obtenir une bonne résolution avec des gels de plus grandes tailles présentant ainsi une meilleure séparation des protéines.

Nous avons observé dans l'expérience contrôle, après révélation du western blot, que l'anticorps anti-E-Tag reconnaissait un spot de poids moléculaire d'environ 80 kDa correspondant au poids moléculaire de notre protéine de fusion E-Tag-GFP-NtE2F et à un pI pouvant correspondre au pI calculée de 4,96 (Figure 50A). Lorsque nous avons utilisé des protéines issues de cellules traitées à la bléomycine (10^{-5} M, 1h30) deux spots contigus sont détectés (Figure 50B). Ces deux spots peuvent correspondre à deux isoformes de la protéine de fusion : l'isoforme déjà détectée précédemment et l'isoforme pouvant correspondre à la protéine de fusion modifiée post-traductionnellement. Ces deux isoformes ont le même poids moléculaire, mais des pI différents. Ces résultats suggèrent que cette nouvelle isoforme, détectée suite au traitement à la bléomycine des cellules, pourrait résulter de la phosphorylation de la protéine de fusion. Toutefois, afin de confirmer cette hypothèse des expériences contrôles doivent être effectuées. En effet, la désamination des résidus asparagine ou glutamine pour former des acides carboxyliques peut également générer de tels profils. Dans un premier temps, afin de déterminer si la modification post-traductionnelle a lieu sur le facteur NtE2F et non sur l'étiquette E-Tag-GFP, des expériences similaires doivent être effectuées avec des cellules exprimant uniquement cette étiquette. Ensuite, afin de déterminer si cette protéine est phosphorylée en réponse à un dommage à l'ADN, l'extrait protéique devra être traité à la phosphatase. Au laboratoire, nous avons débuté de telles expériences, cependant nous avons été confrontés à un problème de dégradation des protéines lors de l'incubation de l'extrait protéique avec la phosphatase. Les extraits protéiques doivent être incubés avec la phosphatase pendant deux heures à 37°C, température optimale pour la phosphatase mais également pour les protéases.

Même si des confirmations restent nécessaires, le facteur NtE2F semble subir des modifications post-traductionnelles en réponse à un stress génotoxique.

V. Conclusions

Au cours de ce chapitre nous avons étudié la localisation subcellulaire du facteur NtE2F, les modifications post-traductionnelles subit par ce facteur en réponse à un stress génotoxique et nous avons tenté d'identifier de potentiels facteurs protéiques interagissant avec le facteur NtE2F.

Nous avons montré que le facteur NtE2F était localisé dans le noyau de la cellule grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) situé au niveau de la position 43 de la protéine. Cependant, nous avons montré que la mutation de ce NLS n'était pas suffisante pour abolir complètement cette localisation nucléaire. Nous ne pouvons donc pas exclure la présence d'un second NLS. L'analyse de la séquence du facteur NtE2F par le logiciel pSORT II (<http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html>) a révélé la présence d'un second NLS dont la fonctionnalité reste à être étudiée. Chez les mammifères de nombreuses protéines impliquées dans la réparation de l'ADN comportent plusieurs NLS. Par exemple, la protéine XPC et l'hélicase ERCC6 comportent huit NLS et les protéines Rep-3/Duc-1, impliqué dans la réparation d'un mésappariement en comportent cinq (Boulikas, 1997).

Nous avons tenté d'identifier, par colonne d'affinité Anticorps E-Tag/Sépharose, de potentiels facteurs protéiques interagissant avec le facteur NtE2F. Nous avons réussi à détecter des interactants, mais nous n'avons pas encore déterminé leur spécificité d'interaction avec le facteur NtE2F et à les identifier par spectrométrie de masse. Une alternative à cette technique, qui nécessite une quantité importante de matériel, est l'immunoprécipitation.

Par des expériences de gels bidimensionnels, nous avons montré que la protéine de fusion E-Tag-GFP-NtE2F subissait une modification suite à un traitement à la bléomycine. Des données suggèrent que cette modification pourrait être une phosphorylation induisant une augmentation du taux de facteur NtE2F permettant à ce dernier d'activer la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose ou d'interagir avec d'autres facteurs protéiques intervenant

dans la réparation de l'ADN comme cela a été montré chez l'homme (Stevens and La Thangue, 2004). Chez l'homme, il a été montré que la phosphorylation du facteur E2F1 en réponse à un dommage à l'ADN lui permettait d'échapper à la dégradation en inhibant la liaison de l'ubiquitine ligase Skp2 (Lin et al., 2001). Cependant, des expériences supplémentaires devront être effectuées afin de déterminer si le facteur NtE2F est phosphorylé en réponse à un stress génotoxique. Afin de déterminer si la modification subit par le facteur NtE2F en réponse à un dommage à l'ADN est bien une phosphorylation, les extraits protéiques traités ou non la bléomycine devront être incubés avec une phosphatase comme la phosphatase alcaline ou la phosphatase du phage λ . Cette dernière est capable de déphosphoryler des protéines dans un tampon dénaturant comme celui utilisé pour préparer les extraits protéiques (Raggiaschi et al., 2006). Cette phosphatase permettrait donc de réaliser l'expérience directement dans le tampon dénaturant utilisé pour préparer les extraits protéique et ainsi de minimiser la dégradation des protéines par des protéases.

Des données supplémentaires, obtenues en collaboration avec le laboratoire dirigé par le Professeur Carmen Martinez à l'Université Autonome de Barcelone, conforte l'hypothèse que le facteur NtE2F pourrait être phosphorylé en réponse à un dommage à l'ADN. En effet, cette équipe a montré que le facteur NtE2F pouvait être phosphorylé *in vitro*, par la kinase CK2, kinase essentielle à la croissance d'une cellule chez les eucaryotes. De plus, cette collaboration a permis de montrer que le facteur NtE2F était phosphorylé par la kinase CK2 en C-terminal, similairement à la phosphorylation effectuée par la kinase CHK2 sur le facteur E2F1 de mammifère en réponse à un stress génotoxique (Stevens et al., 2003).

Conclusions et Perspectives

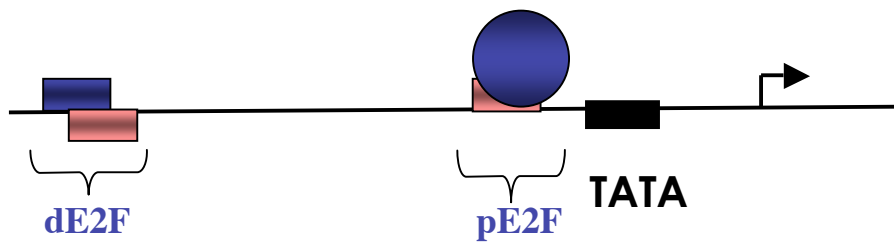
L'objectif majeur de cette thèse était de comprendre comment l'expression de la RNR de tabac était régulée lorsque la cellule nécessite des dNTPs, c'est-à-dire en phase S du cycle cellulaire, dans des tissus en division et en réponse à un dommage à l'ADN. Peu de données étaient disponibles chez les plantes en comparaison avec celles décrites chez la levure ou chez les mammifères. Afin de répondre à ces interrogations, nous avons analysé les promoteurs des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b*. Ces promoteurs contiennent, tous les deux, des éléments E2F, Myb et Télo pouvant expliquer les inductions de l'expression de ces gènes dans ces différents contextes physiologiques.

Comment l'expression des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* serait régulée au cours du cycle cellulaire et du développement du tabac ?

Au commencement de cette thèse, nous savions que les éléments E2F des promoteurs *NtRNR2* et *NtRNR1b* étaient essentiels à leur activité en phase S du cycle cellulaire (Chaboute et al., 2000; Chaboute et al., 2002). Au laboratoire, il avait été montré que les deux éléments E2F du promoteur *NtRNR2* jouait des rôles différents pour son activité. L'élément E2F composite, formé d'un élément E2F et d'un élément CDE, était impliqué dans la répression de son activité hors phase S alors que l'élément E2F simple était impliqué dans son induction en phase S. Le promoteur *NtRNR1b*, quant à lui, comporte uniquement un élément E2F qui en synergie avec les éléments Myb et Télo permet une induction maximale de ce promoteur en phase S.

Le promoteur *NtRNR1a* présente une organisation similaire au promoteur *NtRNR2*, c'est-à-dire deux éléments E2F, un élément E2F distal composite (dE2F) formé d'un élément CDE et d'un élément E2F, et un élément E2F simple. L'élément composite permettrait de réprimer l'activité du promoteur en dehors de la phase S du cycle cellulaire et dans des tissus différenciés alors que l'élément pE2F serait impliqué dans l'induction du promoteur à l'entrée de la phase S et dans des tissus en divisions. Les variations de l'activité du promoteur au cours du cycle cellulaire et du développement pourraient être liées à la disponibilité en facteurs E2F de type activateur ou répresseur. D'autres gènes de plantes sont régulés de manière similaire au gène *NtRNR1a* comme les gènes *NtRNR2* (Chaboute et al., 2000),

- En phase S du cycle cellulaire et dans de jeunes tissus en divisions



- En dehors de la phase S du cycle cellulaire et dans des tissus différenciés

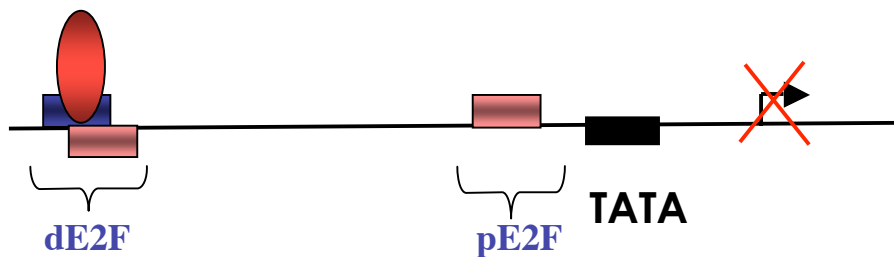


Figure 51: Modèle de régulation du promoteur *NtRNR1a* au cours du cycle cellulaire et du développement du tabac

Les facteurs activateurs sont en bleu et les facteurs répresseurs sont en rouge.

En phase S du cycle cellulaire et dans des tissus en division, l'élément pE2F interagirait avec un facteur activateur permettant d'induire l'activité du promoteur.

En dehors de la phase S et dans des tissus différenciés, l'élément dE2F interagirait avec un facteur répresseur permettant d'inhiber l'activité du promoteur.

D'autres facteurs de transcription pourraient intervenir dans cette régulation en interagissant avec les éléments Myb et Téo du promoteur. Ces éléments ne sont pas représentés sur ce schéma.

NtPCNA (Egelkroust et al., 2002), *AtMCM3* (Stevens et al., 2002) ou encore les gènes *AtORC* (Diaz-Trivino et al., 2005). Ce mode de régulation est également rencontré chez d'autres organismes comme pour le gène *PCNA* de la drosophile ou encore le gène *E2F1* de mammifère. Ces différents gènes sont exprimés spécifiquement en phase S du cycle cellulaire et dans des tissus méristématiques ou en divisions.

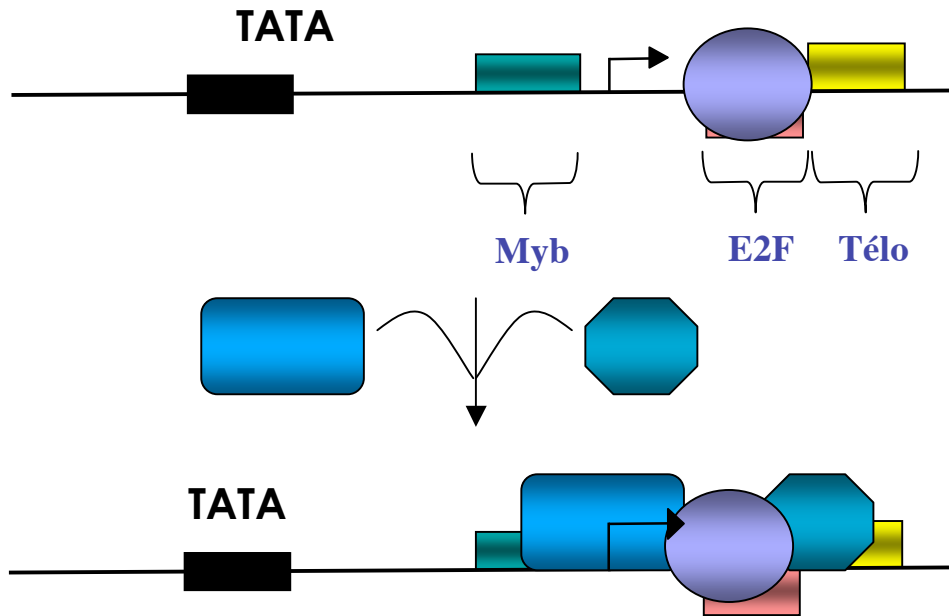
Ces différents résultats ont permis de modéliser la régulation de l'activité du promoteur *NtRNR1a* au cours du cycle cellulaire et du développement du tabac (Figure 51). En phase S du cycle cellulaire et dans de jeunes tissus en divisions, l'élément pE2F interagirait avec un facteur E2F activateur. En dehors de la phase S du cycle cellulaire, l'élément dE2F interagirait avec un facteur répresseur inhibant le recrutement d'un complexe protéique permettant d'induire l'activité du promoteur. D'autres facteurs de transcription pourraient intervenir dans cette régulation en interagissant avec les éléments Myb et Téo en particulier.

Le promoteur *NtRNR1b* présente une organisation moins complexe que le promoteur *NtRNR1a*. Cette organisation plus simple a permis l'étude du rôle des éléments Myb et Téo dans la corégulation associée à l'élément E2F. Nous avons ainsi montré, pour la première fois chez les plantes, qu'un élément Myb pouvait être impliqué dans la régulation de l'expression de gène en phase S. L'implication d'un élément Téo dans une coopérativité transcriptionnelle avait déjà été montrée chez *Arabidopsis thaliana* pour des promoteurs de gènes codant des protéines ribosomiques (Manevski et al., 2000). Un facteur Pura α , pouvant interagir avec l'élément Téo chez *Arabidopsis thaliana*, est capable également en présence de AtE2Fa d'augmenter l'activité d'un promoteur cible portant un élément E2F (Rossignol et al., 2002).

Suite à cette étude, nous pouvons modéliser la régulation du promoteur *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire et du développement du tabac (Figure 52). En phase S du cycle cellulaire et dans de jeunes tissus en divisions, nous pouvons imaginer qu'un facteur E2F est la pièce centrale du complexe transcriptionnel induisant l'activité du promoteur. L'interaction de l'élément E2F avec un facteur E2F permettrait le recrutement des facteurs de transcription interagissant avec les éléments Myb et Téo. Ces facteurs de transcriptions additionnels permettraient d'amplifier l'activité transcriptionnelle du promoteur induite par le facteur E2F.

L'étape suivante de ce travail serait de caractériser les facteurs protéiques intervenant dans la régulation du promoteur *NtRNR1a* par exemple en améliorant l'approche de

- En phase S du cycle cellulaire et dans de jeunes tissus en divisions



- En dehors de la phase S du cycle cellulaire et dans des tissus différenciés

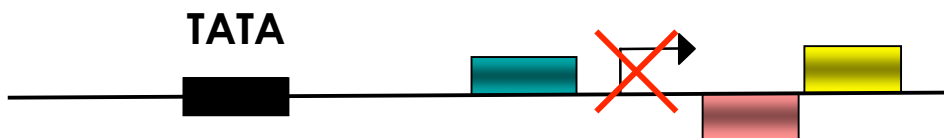


Figure 52: Modèle de régulation du promoteur *NtRNR1b* au cours du cycle cellulaire et du développement du tabac

Les facteurs activateurs sont en bleu et les facteurs répresseurs sont en rouge

En phase S du cycle cellulaire ou dans des tissus en divisions, un facteur E2F activateur interagit avec l'élément E2F facilitant le recrutement des facteurs interagissant avec les éléments Myb et Telo induisant l'activité du promoteur.

chromatographie d'affinité utilisant des oligonucléotides correspondant aux différents éléments E2F du promoteur et des extraits protéiques issus de cellules BY-2 synchronisées ou de tissus. Cette approche permettrait de purifier les facteurs protéiques interagissant avec ces éléments E2F. De plus, il serait également intéressant d'étudier les rôles des différents éléments Myb et Télo dans cette régulation. Dans un premier temps, des expériences de « footprinting » *in vivo* nous permettraient de déterminer si des complexes protéiques interagissent avec ces éléments. Puis pour compléter cette étude, nous pourrions muter ces différents cis-éléments Myb et Télo et suivre l'activité du promoteur au cours du cycle cellulaire et du développement afin d'étudier leurs rôles. Il serait également intéressant de déterminer, par immunoprécipitation de la chromatine, les cibles des différents facteurs E2F de tabac et d'*Arabidopsis thaliana* au cours du cycle cellulaire et du développement afin de pouvoir élaborer un modèle de régulation plus général chez les plantes.

Afin d'avoir une vision plus large de la régulation de l'expression de gènes en phase S du cycle via E2F nous avons établi une collaboration avec l'équipe du Dr Martine Devic, du Laboratoire Génome et Développement des Plantes, située à Perpignan. Cette collaboration visait à étudier la régulation transcriptionnelle au cours du cycle cellulaire des gènes codant pour les sous-unités catalytique (*AtPol2a*) et régulatrice (*AtDPB2*) de l'ADN polymérase ϵ et du gène codant pour la thymidilate kinase chez *Arabidopsis thaliana* (*AtTMPK*).

L'ADN polymérase ϵ participe à la réplication de l'ADN ainsi qu'à la réparation par excision de base (BER). C'est donc une enzyme indispensable au bon déroulement de la phase S du cycle cellulaire tout comme la RNR. L'ADN polymérase ϵ est composé d'une sous-unité catalytique, codée par deux gènes (*AtPOL2a* et *AtPOL2b*) et d'une sous-unité régulatrice codée par le gène *AtDPB2*. Le promoteur *AtPOL2a* contient deux éléments E2F potentiels (TTTC/GCCGC) et *AtDPB2* contient un élément E2F potentiel en orientation inverse (GCGGGAAA). Nous avons constaté que les expressions de ces gènes étaient régulées au cours du cycle cellulaire avec une induction maximale en phase S, tout comme leurs homologues humains (Huang et al., 2001) ainsi qu'une induction plus faible à la transition G2/M (Ronceret et al., 2005). Il serait donc intéressant maintenant d'étudier les rôles des cis-éléments E2F dans l'induction de ces gènes à l'entrée de la phase S. L'induction de l'activité du promoteur *AtPOL2a* à la transition G2/M pourrait être traduite l'implication de ce gène dans la réparation de l'ADN avant l'entrée en mitose. En effet, il a été montré, chez *Arabidopsis thaliana* que l'expression du gène *AtPOL2a* était induite en réponse à un

dommage à l'ADN (Chen et al., 2003). Chez *Arabidopsis thaliana*, plusieurs gènes impliqués dans la réplication de l'ADN ont été décrits comme étant induits à l'entrée de la phase S (Gutierrez et al., 2002). Ce mode d'induction à l'entrée de la phase S utilise les facteurs de transcription E2F suggérant que les cis-éléments E2F contenus dans les promoteurs des gènes *AtPOL2a* et *AtDPB2* soient fonctionnels.

La production de dTTP est principalement contrôlée par la thymidylate kinase (TMPK) qui catalyses la phosphorylation du dTMP en dTDP. C'est donc une enzyme qui participe également comme la RNR, à l'équilibre du stock de dNTPs dans la cellule. L'expression de gènes homologues au gène *AtTMPK*, chez la levure et l'homme, est induite à la transition G1/S du cycle cellulaire (Huang et al., 1994) (White et al., 1987). Nous avons ainsi étudié l'expression de ce gène au cours du cycle cellulaire. Des éléments CHR (cell cycle homology) et CDE (cell cycle dependent expression), connus comme étant impliqués dans la régulation transcriptionnelle au cours du cycle cellulaire du gène *NtRNR2* (Chaboute et al., 2000) et du gène *PCNA* (Egelkroust et al., 2002), sont présents dans le premier intron du gène *AtTMPK*. Cependant, aucun élément E2F classique n'a été trouvé dans la région promotrice. Nous avons observé que l'activité de ce promoteur était induite à l'entrée de la phase S (Ronceret et al, soumis). Ces résultats suggèrent que le promoteur du gène *AtTMPK* pourrait être régulé par dérégulation de son activité via les éléments CDE/CHR comme le promoteur du gène *Cdc2* chez les animaux (Tommasi and Pfeifer, 1997).

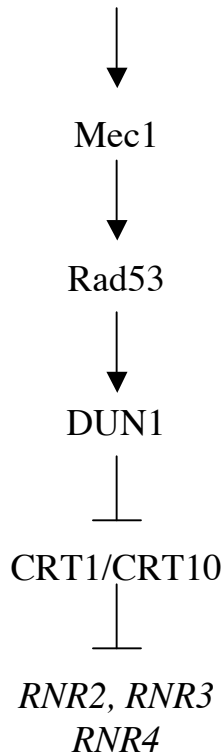
Les gènes *AtPOL2a* et *AtDPB2* semblent donc être deux autres exemples de gènes dont l'expression pourrait être régulée par des facteurs E2F, mais avec des modélisations différentes.

Comment l'expression des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* serait régulée en réponse à un dommage à l'ADN ?

La ribonucléotide réductase joue un rôle important dans l'apport de dNTPs nécessaire non seulement pour la réplication de l'ADN mais également pour sa réparation (Elledge et al., 1993). Un dysfonctionnement de la RNR dans cet apport peut conduire à des erreurs dans l'incorporation de base et donc à des mutations (Lengauer et al., 1998). Ainsi, la RNR doit être régulée finement afin de maintenir le taux des quatre dNTPs à un niveau optimale au cours de la réplication de l'ADN, mais aussi pour sa réparation. C'est pourquoi nous avons analysé la régulation des gènes *NtRNR1a* et *NtRNR1b* en étudiant leur réponse

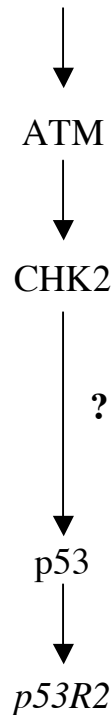
A. Levure

Domage à l'ADN



B. Mammifère

Domage à l'ADN



C. Plante

Domage à l'ADN

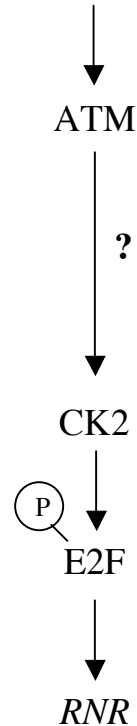


Figure 53: Similarités dans la voie de signalisation de la réponse à un dommage à l'ADN chez la levure, les mammifères et les plantes

A. Chez la levure, la kinase DUN1 est activée. DUN1 phosphoryle et inhibe alors la capacité d'inhibition des protéines CRT1 et CRT10 qui interagissent avec les promoteurs des gènes *RNR*. L'activation de DUN1 est contrôlée par MEC1 et Rad53.

B. Chez les mammifères, la kinase ATM (homologue de TEL1 chez la levure) active la kinase CHK2 (homologue de Rad53). Ces premiers événements permettent d'activer le facteur de transcription p53 qui va induire l'expression du gène *p53R2*.

C. Chez les plantes, la kinase ATM pourrait activer la kinase CK2 (par une voie non caractérisée). Le facteur de transcription E2F va alors être stabilisée par phosphorylation par la kinase CK2 et induire ainsi la transcription des gènes *RNR*.

transcriptionnelle à des stress génotoxiques. Nous avons montré que les activités de ces promoteurs étaient toutes les deux induites grâce à leurs éléments E2F suite à un dommage à l'ADN pouvant résulter de l'augmentation du taux d'un complexe protéique pouvant contenir un facteur E2F.

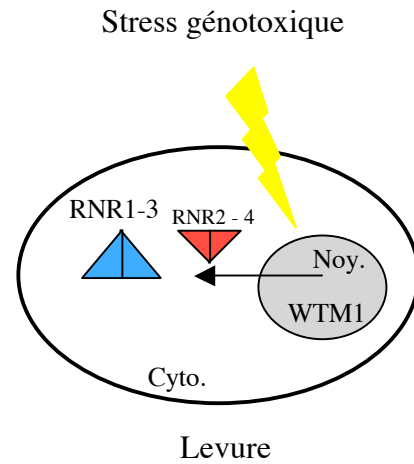
Étant donné que les éléments E2F des promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR1b* étaient essentiels à leurs inductions en réponse à un stress génotoxique, nous avons étudié le facteur NtE2F, seul facteur E2F caractérisé jusqu'à présent chez le tabac. Nous avons montré que suite à un traitement génotoxique le facteur NtE2F semblait subir une modification post-traductionnelle. Nous n'avons pas encore réussi à caractériser l'identité de cette modification, mais nous pouvons supposer que le facteur NtE2F soit phosphorylé en réponse à un dommage à l'ADN. En effet, l'équipe de Professeur Martinez de l'université autonome de Barcelone, en collaboration avec notre laboratoire, a montré que le facteur NtE2F pouvait être phosphorylé par la kinase CK2 *in vitro*.

Les gènes codant pour la sous-unité R1 de la ribonucléotide réductase chez le tabac se conduisent de manière similaire à ceux de levure ou de mammifères en réponse à un dommage à l'ADN. Toutefois, leur régulation semble être différente de celle chez la levure ou les mammifères (Figure 53B,C). En effet, chez la levure, l'activité transcriptionnelle des gènes *RNR2*, *RNR3*, et *RNR4* est réprimée par l'interaction du facteur CRT1/CRT10 avec un élément appelé X-box. (Zaim et al., 2005) (Fu and Xiao, 2006). En réponse à un dommage à l'ADN, CRT1/CRT10 est phosphorylée par la kinase DUN1 et perd alors son affinité pour l'élément X-box conduisant à l'induction de l'expression des gènes *RNR2*, *RNR3*, et *RNR4*. Chez les mammifères, en réponse à un dommage à l'ADN, le facteur de transcription p53 induit la transcription du gène *p53R2* codant pour une sous-unité R2 spécifiquement exprimée en réponse à un stress génotoxique (Tanaka et al., 2000). Chez les plantes, il semblerait donc que ce soit le facteur E2F qui induise la transcription des gènes RNR en réponse à un dommage à l'ADN (Figure 53C). En réponse à un dommage à l'ADN, la kinase CK2 pourrait être activé par les kinases ATM/ATR. Une fois activé la kinase CK2 irait phosphoryler le facteur de transcription NtE2F. Cette phosphorylation permettrait alors au facteur NtE2F d'être stabilisé et d'échapper ainsi à la dégradation. Le taux de facteurs NtE2F serait donc augmenté conduisant alors à l'induction de l'expression de ces gènes en réponse à un stress génotoxique.

Jusqu'à présent, aucune étude n'a démontré qu'un facteur E2F de plante pouvait intervenir dans la voie de signalisation de la réparation de l'ADN. Il serait donc particulièrement intéressant de démontrer, dans un premier temps, la phosphorylation *in vivo*

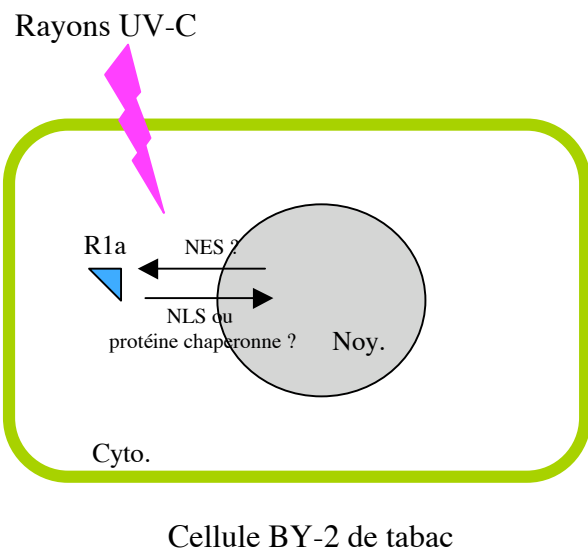
A.

Dans des conditions normales, les sous-unités RNR1 et 3 sont localisées dans le cytoplasme alors que les sous-unités RNR2 et 4 sont localisées dans le noyau via leur interaction avec la protéine WTM1. En réponse à un stress génotoxique ou en phase S, les sous-unités RNR2 et 4 perdent leur affinité pour la protéine WTM1 et sont relocalisées dans le cytoplasme.



B.

Dans des conditions normales, la sous-unité R1a est localisée dans le cytoplasme. Suite à une irradiation aux UV-C, la sous-unité R1a est localisée transitoirement dans le noyau soit par l'intermédiaire d'une protéine chaperonne soit grâce à un NLS, avant de retourner dans le cytoplasme impliquant un export actif de la protéine.



C.

En réponse à un stress génotoxique, le facteur de transcription p53 active la transcription du gène *p53R2* codant pour une sous-unité R2 de la RNR. Cette sous-unité *p53R2* est localisée dans le noyau avec une sous-unité R1 afin d'y produire des dNTPs facilitant ainsi la réparation des dommages.

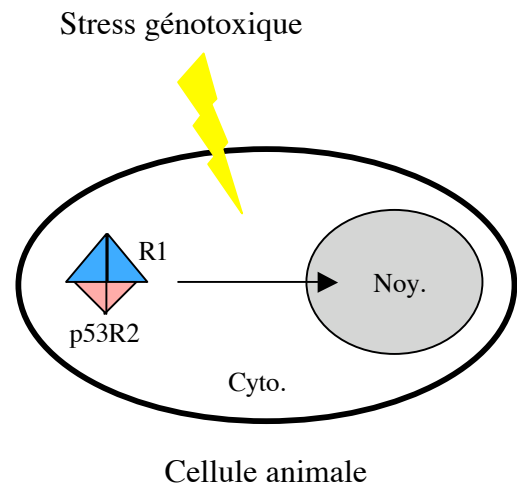


Figure 54: Localisation subcellulaire de la RNR en réponse à un stress génotoxique dans différents organismes

- A. Chez la levure
- B. Dans des cellules BY-2 de tabac
- C. Chez les mammifères

d'un facteur E2F grâce à des anticorps anti-E2F spécifiques (NtE2F, AtE2Fa ou AtE2Fb) en réponse à un stress génotoxique par des expériences de gels bidimensionnels et, dans un deuxième temps, de déterminer la ou les kinases impliquées dans cette phosphorylation comme les kinases ATM/ATR ou CK2 (qui est capable de phosphoryler le facteur NtE2F *in vitro*). De plus, au laboratoire, nous avons déjà obtenu des résultats montrant la participation du facteur NtE2F à une structure supramoléculaire visible au niveau microscopique appelée « foci » intervenant dans la réparation de l'ADN. Il serait donc intéressant de caractériser de potentiels partenaires au facteur E2F intervenant dans la voie de signalisation de la réparation par des expériences d'immunoprécipitation utilisant des anticorps dirigé spécifiquement contre un facteur E2F. S'il s'avère que les facteurs E2F soient cruciaux pour la voie de signalisation de la réparation chez les plantes, il serait intéressant d'étudier plus précisément leurs rôles en utilisant des mutants E2Fs en réponse à un stress génotoxique. Enfin, des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine, utilisant des anticorps dirigés spécifiquement contre ces facteurs E2F, permettraient d'identifier de nouvelles cibles des facteurs E2F intervenant dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN.

Existe-t'il une régulation de la localisation subcellulaire de la RNR en réponse à un stress génotoxique chez les plantes ?

Chez les mammifères comme chez la levure, la ribonucléotide réductase subit une relocalisation subcellulaire en réponse à un stress génotoxique. Chez la levure, les sous-unités R2 sont relocalisés du noyau vers le cytoplasme pour rejoindre les sous-unité R1 en phase S du cycle cellulaire ou en réponse à un stress génotoxique. Dans des conditions normales, les sous-unités R2 sont ancrées dans le noyau via l'intermédiaire de leur interaction avec la protéine WTM1. Lorsque la cellule a besoin de dNTPs, c'est-à-dire en phase S ou en réponse aux dommages à l'ADN, les sous-unités R2 perdent leur affinité pour la protéine WTM1 et rejoignent ainsi les sous-unités R1 localisées dans le cytoplasme pour produire des dNTPs (Lee and Elledge, 2006) (Zhang et al., 2006) (Figure 54A). Chez les mammifères, en réponse à un stress génotoxique, le facteur de transcription p53 active la transcription du gène *p53R2* codant pour une sous-unité R2 de la RNR. Cette sous-unité p53R2, en association avec une sous-unité R1, produirait alors des dNTPs directement dans le noyau facilitant ainsi la réparation de l'ADN (Tanaka et al., 2000) (Lozano and Elledge, 2000) (Figure 54C). Cependant, comme aucune étude similaire a été réalisée sur la localisation subcellulaire de la

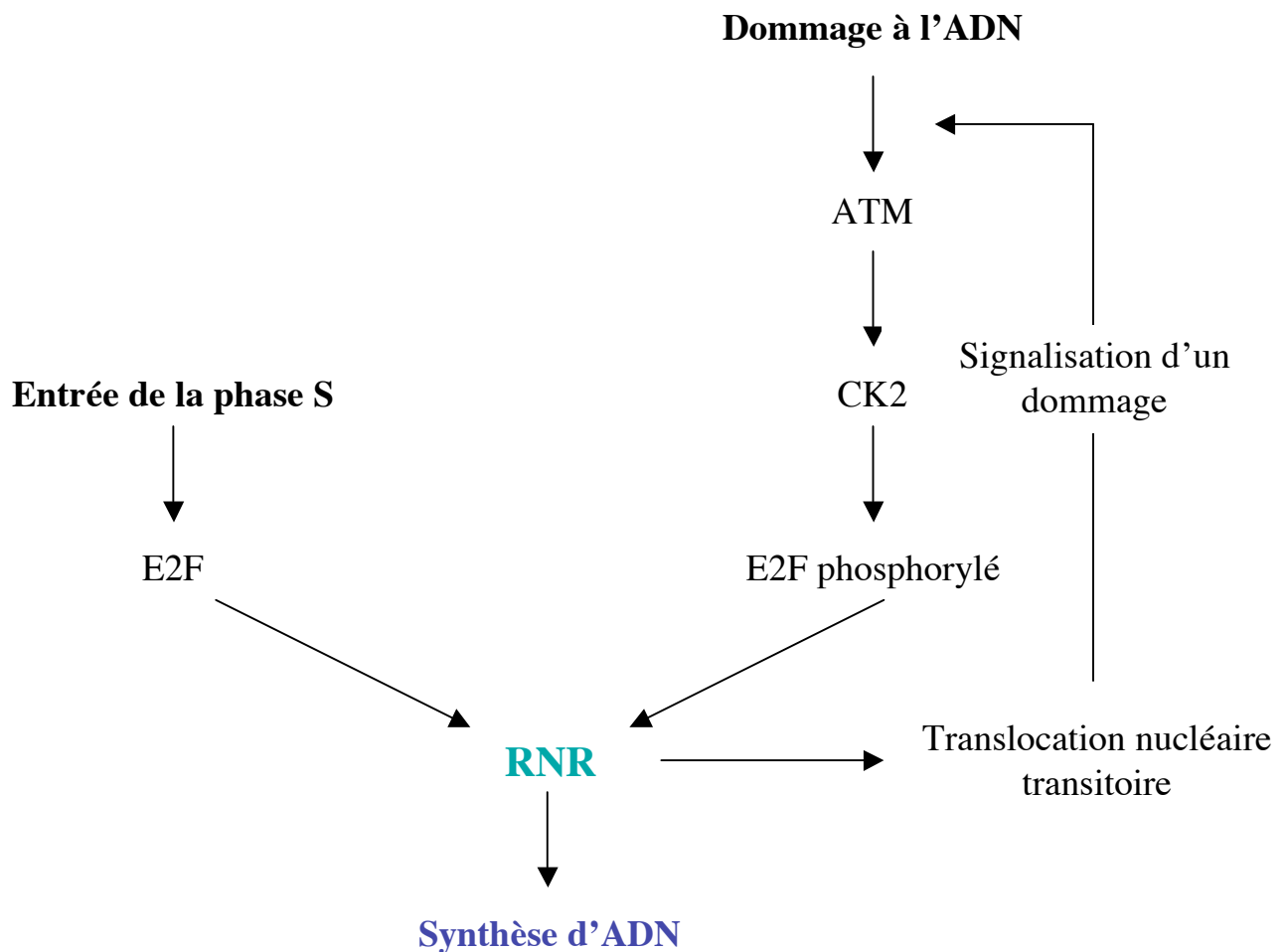


Figure 55: Modèle général de régulation de la RNR

À l'entrée de la phase S du cycle cellulaire, un facteur E2F active la transcription des gènes *RNR* permettant d'obtenir un pool de dNTPs équilibré et de répliquer fidèlement l'ADN.

En réponse à un dommage à l'ADN, la kinase ATM active la kinase CK2 qui va stabiliser un facteur E2F par phosphorylation. Cette stabilisation va permettre au facteur E2F d'activer la transcription des gènes *RNR* permettant de fournir des dNTPs supplémentaires afin de réparer efficacement les dommages à l'ADN. La RNR pourrait être également dirigée transitoirement dans le noyau afin de participer à la voie de signalisation de la réparation de l'ADN.

sous-unité R1, il n'est pas possible d'affirmer que l'activation de la RNR en réponse à un stress génotoxique résulte de la translocation de la sous-unité p53R2 vers le noyau.

Nous avons répondu partiellement à cette question en étudiant la localisation subcellulaire de la sous-unité R1a en réponse à un stress génotoxique. Cette sous-unité est localisée dans le cytoplasme. Par contre, en réponse à un stress génotoxique, cette sous-unité est relocalisée dans le noyau avant de rejoindre à nouveau le cytoplasme de la cellule (Figure 54B). Cette protéine présente un potentiel signal de localisation nucléaire (NLS) dans son extrémité N-terminale, mais sa fonctionnalité reste à déterminer. Nous pouvons imaginer également que cette relocalisation nucléaire puisse faire intervenir une protéine chaperonne lui permettant d'entrer dans le noyau. Le retour de cette sous-unité dans le cytoplasme pourrait faire intervenir un signal d'export nucléaire (NES) actif. Cette localisation nucléaire de la sous-unité R1a permettrait soit de produire des dNTPs directement dans le noyau pouvant ainsi faciliter la réparation du dommage, soit d'intervenir dans la voie de signalisation de la réparation de l'ADN étant donné que cette localisation nucléaire serait transitoire.

Pour compléter ce travail, il serait intéressant d'étudier la localisation subcellulaire des sous-unités R1b et R2 et déterminer le mode de translocation nucléaire de la sous-unité R1a en réponse à un stress génotoxique en étudiant la fonctionnalité du NLS ou en identifiant une potentielle protéine chaperonne pouvant être impliquée dans cette translocation nucléaire. Par ailleurs, il serait également intéressant de déterminer si la localisation nucléaire des sous-unités de la RNR chez *Arabidopsis*, en réponse à un dommage à l'ADN, est affectée dans des plantes mutantes n'exprimant plus certains acteurs de cette signalisation, comme ATM ou ATR.

Conclusion : modèle générale de la régulation de la ribonucléotide réductase

L'ensemble de ce travail nous permet maintenant de proposer un modèle général de la régulation de la ribonucléotide réductase au cours du cycle cellulaire et en réponse à un dommage à l'ADN chez les plantes (Figure 55). À la transition G1/S du cycle cellulaire, l'expression de la RNR est induite par un facteur E2F conduisant à un pool équilibré de dNTPs permettant la réplication de l'ADN et donc à de la synthèse d'ADN. En réponse à un dommage à l'ADN, la kinase ATM sont activé, activant à son tour la kinase CK2 qui va stabiliser un facteur E2F par phosphorylation. Cette stabilisation du facteur E2F permettrait

alors l'induction des gènes RNR pouvant conduire soit à de la synthèse d'ADN permettant la réparation des dommages, soit à la translocation transitoire vers le noyau de la RNR où elle pourrait jouer un rôle dans la voie de signalisation d'un dommage à l'ADN. Cependant, ce modèle est spéculatif et de nombreux points doivent être démontrés par l'étude de la réponse à un stress génotoxique de plantes mutées au niveau des différents gènes intervenant dans ce modèle.

Bibliographie

A

- 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. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5077-5086.
- Adams, M.R., Sears, R., Nuckolls, F., Leone, G., and Nevins, J.R.** (2000). Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 3633-3639.
- Ahlbory, D., Appl, H., Lang, D., and Klempnauer, K.H.** (2005). Disruption of B-myb in DT40 cells reveals novel function for B-Myb in the response to DNA-damage. *Oncogene* **24**, 7127-7134.
- Albani, D., Mariconti, L., Ricagno, S., Pitto, L., Moroni, C., Helin, K., and Cella, R.** (2000). DcE2F, a functional plant E2F-like transcriptional activator from *Daucus carota*. *J Biol Chem* **275**, 19258-19267.
- An, X., Zhang, Z., Yang, K., and Huang, M.** (2006). Cotransport of the heterodimeric small subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase between the nucleus and the cytoplasm. *Genetics* **173**, 63-73.
- Appella, E., and Anderson, C.W.** (2001). Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *Eur J Biochem* **268**, 2764-2772.
- Araki, K., Nakajima, Y., Eto, K., and Ikeda, M.A.** (2003). Distinct recruitment of E2F family members to specific E2F-binding sites mediates activation and repression of the E2F1 promoter. *Oncogene* **22**, 7632-7641.
- Asano, M., Nevins, J.R., and Wharton, R.P.** (1996). Ectopic E2F expression induces S phase and apoptosis in *Drosophila* imaginal discs. *Genes Dev* **10**, 1422-1432.

B

- Bagchi, S., Raychaudhuri, P., and Nevins, J.R.** (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* **62**, 659-669.
- Bagchi, S., Weinmann, R., and Raychaudhuri, P.** (1991). The retinoblastoma protein copurifies with E2F-I, an E1A-regulated inhibitor of the transcription factor E2F. *Cell* **65**, 1063-1072.
- Bakkenist, C.J., and Kastan, M.B.** (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* **421**, 499-506.
- Bandara, L.R., and La Thangue, N.B.** (1991). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* **351**, 494-497.
- Banin, S., Moyal, L., Shieh, S., Taya, Y., Anderson, C.W., Chessa, L., Smorodinsky, N.I., Prives, C., Reiss, Y., Shiloh, Y., and Ziv, Y.** (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science* **281**, 1674-1677.

- Berger, N.A., Kurohara, K.K., Petzold, S.J., and Sikorski, G.W.** (1979). Aphidicolin inhibits eukaryotic DNA replication and repair --- implications for involvement of DNA polymerase alpha in both processes. *Biochem Biophys Res Commun* **89**, 218-225.
- Bjorklund, S., Skog, S., Tribukait, B., and Thelander, L.** (1990). S-phase-specific expression of mammalian ribonucleotide reductase R1 and R2 subunit mRNAs. *Biochemistry* **29**, 5452-5458.
- Blattner, C., Sparks, A., and Lane, D.** (1999). Transcription factor E2F-1 is upregulated in response to DNA damage in a manner analogous to that of p53. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 3704-3713.
- Boatright, K.M., and Salvesen, G.S.** (2003). Mechanisms of caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 725-731.
- 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.
- Boudolf, V., Inze, D., and De Veylder, L.** (2006). What if higher plants lack a CDC25 phosphatase? *Trends Plant Sci.*
- Boulikas, T.** (1997). Nuclear import of DNA repair proteins. *Anticancer Res* **17**, 843-863.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.



- Brendel, M., Bonatto, D., Strauss, M., Revers, L.F., Pungartnik, C., Saffi, J., and Henriques, J.A.** (2003). Role of PSO genes in repair of DNA damage of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* **544**, 179-193.
- Castellano Mdel, 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.
- Chabes, A., and Thelander, L.** (2000). Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J Biol Chem* **275**, 17747-17753.
- Chabes, A.L., Bjorklund, S., and Thelander, L.** (2004). S Phase-specific transcription of the mouse ribonucleotide reductase R2 gene requires both a proximal repressive E2F-binding site and an upstream promoter activating region. *J Biol Chem* **279**, 10796-10807.
- Chabes, A.L., Pflieger, C.M., Kirschner, M.W., and Thelander, L.** (2003). Mouse ribonucleotide reductase R2 protein: a new target for anaphase-promoting complex-Cdh1-mediated proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3925-3929.
- Chaboute, M.E., Clement, B., and Philipps, G.** (2002). S phase and meristem-specific expression of the tobacco RNR1b gene is mediated by an E2F element located in the 5' leader sequence. *J Biol Chem* **277**, 17845-17851.
- Chaboute, M.E., Combettes, B., Clement, B., Gigot, C., and Philipps, G.** (1998). Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells. *Plant Mol Biol* **38**, 797-806.

- Chaboute, M.E., Clement, B., Sekine, M., Philipps, G., and Chaubet-Gigot, N.** (2000). Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell* **12**, 1987-2000.
- Chaubet-Gigot, N.** (2000). Plant A-type cyclins. *Plant Mol Biol* **43**, 659-675.
- Chen, I.P., Haehnel, U., Altschmied, L., Schubert, I., and Puchta, H.** (2003). The transcriptional response of Arabidopsis to genotoxic stress - a high-density colony array study (HDCA). *Plant J* **35**, 771-786.
- Christensen, J., Cloos, P., Toftegaard, U., Klinkenberg, D., Bracken, A.P., Trinh, E., Heeran, M., Di Stefano, L., and Helin, K.** (2005). Characterization of E2F8, a novel E2F-like cell-cycle regulated repressor of E2F-activated transcription. *Nucleic Acids Res* **33**, 5458-5470.
- Claussen, C.A., and Long, E.C.** (1999). Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev* **99**, 2797-2816.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., and Elledge, S.J.** (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science* **294**, 1713-1716.
- Culligan, K., Tissier, A., and Britt, A.** (2004). ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **16**, 1091-1104.



- Danenberg, K.D., and Danenberg, P.V.** (1979). Evidence for a sequential interaction of the subunits of thymidylate synthetase. *J Biol Chem* **254**, 4345-4348.
- Darbinian, N., Gallia, G.L., Kundu, M., Shcherbik, N., Tretiakova, A., Giordano, A., and Khalili, K.** (1999). Association of Pur alpha and E2F-1 suppresses transcriptional activity of E2F-1. *Oncogene* **18**, 6398-6402.
- de Jager, S.M., and Murray, J.A.** (1999). Retinoblastoma proteins in plants. *Plant Mol Biol* **41**, 295-299.
- de Jager, S.M., Menges, M., Bauer, U.M., and Murra, J.A.** (2001). Arabidopsis E2F1 binds a sequence present in the promoter of S-phase-regulated gene AtCDC6 and is a member of a multigene family with differential activities. *Plant Mol Biol* **47**, 555-568.
- de Jager, S.M., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S., and Murray, J.A.** (2005). The developmental context of cell-cycle control in plants. *Semin Cell Dev Biol* **16**, 385-396.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., and Inze, D.** (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1653-1668.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G.T., de Almeida Engler, J., Ormenese, S., Maes, S., Naudts, M., Van Der Schueren, E., Jacquard, A., Engler, G., and Inze, D.** (2002). Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the Arabidopsis E2Fa-DPa transcription factor. *Embo J* **21**, 1360-1368.
- DeGregori, J., Kowalik, T., and Nevins, J.R.** (1995). Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 4215-4224.
- del Pozo, J.C., Boniotti, M.B., and Gutierrez, C.** (2002). Arabidopsis E2Fc 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., Diaz-Trivino, S., Cisneros, N., and Gutierrez, C.** (2006). The Balance between Cell Division and Endoreplication Depends on E2FC-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCFSKP2A Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 2224-2235.

- Demczuk, S., Harbers, M., and Vennstrom, B.** (1993). Identification and analysis of all components of a gel retardation assay by combination with immunoblotting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2574-2578.
- Devault, A., Martinez, A.M., Fesquet, D., Labbe, J.C., Morin, N., Tassan, J.P., Nigg, E.A., Cavadore, J.C., and Doree, M.** (1995). MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and *Xenopus* CAK. *Embo J* **14**, 5027-5036.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J.M., Jacqumard, A., Kilby, N.J., and Murray, J.A.** (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**, 79-92.
- Di Fiore, B., Guarguaglini, G., Palena, A., Kerkhoven, R.M., Bernards, R., and Lavia, P.** (1999). Two E2F sites control growth-regulated and cell cycle-regulated transcription of the Htf9-a/RanBP1 gene through functionally distinct mechanisms. *J Biol Chem* **274**, 10339-10348.
- Di Stefano, L., Jensen, M.R., and Helin, K.** (2003). E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. *Embo J* **22**, 6289-6298.
- Diaz-Trivino, S., del Mar Castellano, M., de la Paz Sanchez, M., Ramirez-Parra, E., Desvoyes, B., and Gutierrez, C.** (2005). The genes encoding *Arabidopsis* ORC subunits are E2F targets and the two ORC1 genes are differently expressed in proliferating and endoreplicating cells. *Nucleic Acids Res* **33**, 5404-5414.
- Dimova, D.K., and Dyson, N.J.** (2005). The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. *Oncogene* **24**, 2810-2826.
- Dimova, D.K., Stevaux, O., Frolov, M.V., and Dyson, N.J.** (2003). Cell cycle-dependent and cell cycle-independent control of transcription by the *Drosophila* E2F/RB pathway. *Genes Dev* **17**, 2308-2320.



- Egelkrou, E.M., Robertson, D., and Hanley-Bowdoin, L.** (2001). Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* **13**, 1437-1452.
- Egelkrou, E.M., Mariconti, L., Settlage, S.B., Cella, R., Robertson, D., and Hanley-Bowdoin, L.** (2002). Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *Plant Cell* **14**, 3225-3236.
- el-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W.** (1987). Identification and isolation of the gene encoding the small subunit of ribonucleotide reductase from *Saccharomyces cerevisiae*: DNA damage-inducible gene required for mitotic viability. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 2783-2793.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W.** (1989a). Identification of the DNA damage-responsive element of RNR2 and evidence that four distinct cellular factors bind it. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 5373-5386.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W.** (1989b). DNA damage induction of ribonucleotide reductase. *Molecular and Cellular Biology* **9**, 4932-4940.
- Elledge, S.J., and Davis, R.W.** (1990). Two genes differentially regulated in the cell cycle and by DNA-damaging agents encode alternative regulatory subunits of ribonucleotide reductase. *Genes Dev* **4**, 740-751.

- Elledge, S.J., Zhou, Z., Allen, J.B., and Navas, T.A.** (1993). DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays* **15**, 333-339.
- Engstrom, Y., Rozell, B., Hansson, H.A., Stemme, S., and Thelander, L.** (1984). Localization of ribonucleotide reductase in mammalian cells. *Embo J* **3**, 863-867.
- Engstrom, Y., Eriksson, S., Jildevik, I., Skog, S., Thelander, L., and Tribukait, B.** (1985). Cell cycle-dependent expression of mammalian ribonucleotide reductase. Differential regulation of the two subunits. *J Biol Chem* **260**, 9114-9116.
- Escobar, M.A., and Dandekar, A.M.** (2003). *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends Plant Sci* **8**, 380-386.
- Espinosa-Ruiz, A., Saxena, S., Schmidt, J., Mellerowicz, E., Miskolczi, P., Bako, L., and Bhalerao, R.P.** (2004). Differential stage-specific regulation of cyclin-dependent kinases during cambial dormancy in hybrid aspen. *Plant J* **38**, 603-615.
- 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.



- Ferreira, P.C., Hemerly, A.S., Villarroel, R., Van Montagu, M., and Inze, D.** (1991). The *Arabidopsis* functional homolog of the p34cdc2 protein kinase. *Plant Cell* **3**, 531-540.
- Filatov, D., Bjorklund, S., Johansson, E., and Thelander, L.** (1996). Induction of the mouse ribonucleotide reductase R1 and R2 genes in response to DNA damage by UV light. *J Biol Chem* **271**, 23698-23704.
- Fobert, P.R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E.S., and Doonan, J.H.** (1996). Distinct classes of cdc2-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8**, 1465-1476.
- Friesner, J.D., Liu, B., Culligan, K., and Britt, A.B.** (2005). Ionizing radiation-dependent gamma-H2AX focus formation requires ataxia telangiectasia mutated and ataxia telangiectasia mutated and Rad3-related. *Mol Biol Cell* **16**, 2566-2576.
- Frolov, M.V., and Dyson, N.J.** (2004). Molecular mechanisms of E2F-dependent activation and pRB-mediated repression. *Journal of Cell Science* **117**, 2173-2181.
- Fu, Y., and Xiao, W.** (2006). Identification and characterization of CRT10 as a novel regulator of *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase genes. *Nucleic Acids Res* **34**, 1876-1883.



- Garcia, P., and Frampton, J.** (2006). The transcription factor B-Myb is essential for S-phase progression and genomic stability in diploid and polyploid megakaryocytes. *Journal of Cell Science* **119**, 1483-1493.
- Garcia, V., Salanoubat, M., Choisine, N., and Tissier, A.** (2000). An ATM homologue from *Arabidopsis thaliana*: complete genomic organisation and expression analysis. *Nucleic Acids Res* **28**, 1692-1699.
- 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.
- Gaubatz, S., Lindeman, G.J., Ishida, S., Jakoi, L., Nevins, J.R., Livingston, D.M., and Rempel, R.E.** (2000). E2F4 and E2F5 play an essential role in pocket protein-mediated G1 control. *Mol Cell* **6**, 729-735.

- Grafi, G., Burnett, R.J., Helentjaris, T., Larkins, B.A., DeCaprio, J.A., Sellers, W.R., and Kaelin, W.G., Jr.** (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.
- Guittet, O., Hakansson, P., Voevodskaya, N., Fridd, S., Graslund, A., Arakawa, H., Nakamura, Y., and Thelander, L.** (2001). Mammalian p53R2 protein forms an active ribonucleotide reductase in vitro with the R1 protein, which is expressed both in resting cells in response to DNA damage and in proliferating cells. *J Biol Chem* **276**, 40647-40651.
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M., and del Pozo, J.C.** (2002). G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 480-486.



- Hallstrom, T.C., and Nevins, J.R.** (2006). Jab1 is a specificity factor for E2F1-induced apoptosis. *Genes Dev* **20**, 613-623.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., and Elledge, S.J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Healy, J.M., Menges, M., Doonan, J.H., and Murray, J.A.** (2001). The Arabidopsis D-type cyclins CycD2 and CycD3 both interact in vivo with the PSTAIRE cyclin-dependent kinase Cdc2a but are differentially controlled. *J Biol Chem* **276**, 7041-7047.
- Heffernan, T.P., Simpson, D.A., Frank, A.R., Heinloth, A.N., Paules, R.S., Cordeiro-Stone, M., and Kaufmann, W.K.** (2002). An ATR- and Chk1-dependent S checkpoint inhibits replicon initiation following UVC-induced DNA damage. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 8552-8561.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S., and Mullineaux, P.M.** (2000). pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Plant Mol Biol* **42**, 819-832.
- 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. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 3384-3391.
- Hofferer, M., Wirbelauer, C., Humar, B., and Krek, W.** (1999). Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res* **27**, 491-495.
- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffmann, N.L., Eichholtz, D., Rogers, S.G., and Fraley, R.T.** (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* **227**, 1229-1231.
- Huang, D., Jokela, M., Tuusa, J., Skog, S., Poikonen, K., and Syvaaja, J.E.** (2001). E2F mediates induction of the Sp1-controlled promoter of the human DNA polymerase epsilon B-subunit gene POLE2. *Nucleic Acids Res* **29**, 2810-2821.
- Huang, M., and Elledge, S.J.** (1997). Identification of RNR4, encoding a second essential small subunit of ribonucleotide reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6105-6113.
- Huang, M., Zhou, Z., and Elledge, S.J.** (1998). The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell* **94**, 595-605.
- Huang, S.H., Tang, A., Drisco, B., Zhang, S.Q., Seeger, R., Li, C., and Jong, A.** (1994). Human dTMP kinase: gene expression and enzymatic activity coinciding with cell cycle progression and cell growth. *DNA Cell Biol* **13**, 461-471.

- Hulskamp, M., Misra, S., and Jurgens, G.** (1994). Genetic dissection of trichome cell development in *Arabidopsis*. *Cell* **76**, 555-566.
- Humbert, P.O., Rogers, C., Ganiatsas, S., Landsberg, R.L., Trimarchi, J.M., Dandapani, S., Brugnara, C., Erdman, S., Schrenzel, M., Bronson, R.T., and Lees, J.A.** (2000). E2F4 is essential for normal erythrocyte maturation and neonatal viability. *Mol Cell* **6**, 281-291.
- Huntley, R., Healy, S., Freeman, D., Lavender, P., de Jager, S., Greenwood, J., Makker, J., Walker, E., Jackman, M., Xie, Q., Bannister, A.J., Kouzarides, T., Gutierrez, C., Doonan, J.H., and Murray, J.A.** (1998). The maize retinoblastoma protein homologue ZmRb-1 is regulated during leaf development and displays conserved interactions with G1/S regulators and plant cyclin D (CycD) proteins. *Plant Mol Biol* **37**, 155-169.
- Hurd, H.K., Roberts, C.W., and Roberts, J.W.** (1987). Identification of the gene for the yeast ribonucleotide reductase small subunit and its inducibility by methyl methanesulfonate. *Molecular and Cellular Biology* **7**, 3673-3677.



- Ijdo, J., Baldini, A., Ward, D.C., Reeders, S.T., and Wells, R.A.** (1991). Origin of human chromosome 2: an ancestral telomere-telomere fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 9051-9055.
- 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.
- Irwin, M., Marin, M.C., Phillips, A.C., Seelan, R.S., Smith, D.I., Liu, W., Flores, E.R., Tsai, K.Y., Jacks, T., Vousden, K.H., and Kaelin, W.G., Jr.** (2000). Role for the p53 homologue p73 in E2F-1-induced apoptosis. *Nature* **407**, 645-648.
- Ishida, S., Huang, E., Zuzan, H., Spang, R., Leone, G., West, M., and Nevins, J.R.** (2001). Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 4684-4699.
- 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**, 1891-1905.



- Jans, D.A., Xiao, C.Y., and Lam, M.H.** (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport? *Bioessays* **22**, 532-544.
- 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. *Journal of Cell Science* **115**, 973-982.
- Jin, J., Shirogane, T., Xu, L., Nalepa, G., Qin, J., Elledge, S.J., and Harper, J.W.** (2003). SCFbeta-TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev* **17**, 3062-3074.

- Johansson, E., Hjortsberg, K., and Thelander, L.** (1998). Two YY-1-binding proximal elements regulate the promoter strength of the TATA-less mouse ribonucleotide reductase R1 gene. *J Biol Chem* **273**, 29816-29821.
- Johnson, D.G., Schwarz, J.K., Cress, W.D., and Nevins, J.R.** (1993). Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* **365**, 349-352.
- Jordan, A., and Reichard, P.** (1998). Ribonucleotide reductases. *Annu Rev Biochem* **67**, 71-98.
- Jordan, A., Torrents, E., Sala, I., Hellman, U., Gibert, I., and Reichard, P.** (1999). Ribonucleotide reduction in *Pseudomonas* species: simultaneous presence of active enzymes from different classes. *J Bacteriol* **181**, 3974-3980.
- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inze, D., Umeda, M., and Renaudi, J.P.** (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant Mol Biol* **43**, 607-620.

K

- Karimi, M., Inze, D., and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**, 193-195.
- Kastan, M.B., and Lim, D.S.** (2000). The many substrates and functions of ATM. *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**, 179-186.
- Kato, R., and Ogawa, H.** (1994). An essential gene, *ESR1*, is required for mitotic cell growth, DNA repair and meiotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **22**, 3104-3112.
- Khanna, K.K., and Jackson, S.P.** (2001). DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* **27**, 247-254.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (2002a). E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant J* **29**, 45-59.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (2002b). Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol* **128**, 833-843.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (2002c). E2Fs, E2F-like repressors of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *J Biol Chem* **277**, 16553-16558.
- Kosugi, S., and Ohashi, Y.** (2003). Constitutive E2F expression in tobacco plants exhibits altered cell cycle control and morphological change in a cell type-specific manner. *Plant Physiol* **132**, 2012-2022.
- Kovesdi, I., Reichel, R., and Nevins, J.R.** (1986). Identification of a cellular transcription factor involved in E1A trans-activation. *Cell* **45**, 219-228.

L

- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafarge, S., and Montane, M.H.** (2003). Characterization of *Arabidopsis thaliana* ortholog of the human breast cancer susceptibility gene 1: *AtBRCA1*, strongly induced by gamma rays. *Nucleic Acids Res* **31**, 1148-1155.
- Lakin, N.D., Hann, B.C., and Jackson, S.P.** (1999). The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene* **18**, 3989-3995.

- Landrieu, I., Hassan, S., Sauty, M., Dewitte, F., Wieruszeski, J.M., Inze, D., De Veylder, L., and Lippens, G.** (2004). Characterization of the Arabidopsis thaliana Arath;CDC25 dual-specificity tyrosine phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 734-739.
- 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, Y.D., and Elledge, S.J.** (2006). Control of ribonucleotide reductase localization through an anchoring mechanism involving Wtm1. *Genes Dev* **20**, 334-344.
- Lehmann, A.R.** (2003). DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy. *Biochimie* **85**, 1101-1111.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.** (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* **396**, 643-649.
- Leone, G., Nuckolls, F., Ishida, S., Adams, M., Sears, R., Jakoi, L., Miron, A., and Nevins, J.R.** (2000). Identification of a novel E2F3 product suggests a mechanism for determining specificity of repression by Rb proteins. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 3626-3632.
- Lew, D.J., and Kornbluth, S.** (1996). Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr Opin Cell Biol* **8**, 795-804.
- Leyser, O.** (2002). Molecular genetics of auxin signaling. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 377-398.
- Li, A., Schuermann, D., Gallego, F., Kovalchuk, I., and Tinland, B.** (2002). Repair of damaged DNA by Arabidopsis cell extract. *Plant Cell* **14**, 263-273.
- Lin, W.C., Lin, F.T., and Nevins, J.R.** (2001). Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. *Genes Dev* **15**, 1833-1844.
- Lincker, F., Philipps, G., and Chaboute, M.E.** (2004). UV-C response of the ribonucleotide reductase large subunit involves both E2F-mediated gene transcriptional regulation and protein subcellular relocalization in tobacco cells. *Nucleic Acids Res* **32**, 1430-1438.
- Lincker, F., Messmer, M., Houlne, G., Devic, M., and Chaboute, M.E.** (2006). E2F factors rate controls the dual role of CDE/E2F composite element: A model of E2F-regulated gene expression in plant development. *FEBS Lett* **580**, 5167-5171.
- Lindahl, T.** (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* **362**, 709-715.
- Lindeman, G.J., Dagnino, L., Gaubatz, S., Xu, Y., Bronson, R.T., Warren, H.B., and Livingston, D.M.** (1998). A specific, nonproliferative role for E2F-5 in choroid plexus function revealed by gene targeting. *Genes Dev* **12**, 1092-1098.
- Liu, K., Lin, F.T., Ruppert, J.M., and Lin, W.C.** (2003). Regulation of E2F1 by BRCT domain-containing protein TopBP1. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 3287-3304.
- Logan, N., Delavaine, L., Graham, A., Reilly, C., Wilson, J., Brummelkamp, T.R., Hijmans, E.M., Bernards, R., and La Thangue, N.B.** (2004). E2F-7: a distinctive E2F family member with an unusual organization of DNA-binding domains. *Oncogene* **23**, 5138-5150.
- Lozano, G., and Elledge, S.J.** (2000). p53 sends nucleotides to repair DNA. *Nature* **404**, 24-25.
- Lukas, J., Petersen, B.O., Holm, K., Bartek, J., and Helin, K.** (1996). Deregulated expression of E2F family members induces S-phase entry and overcomes p16INK4A-mediated growth suppression. *Molecular and Cellular Biology* **16**, 1047-1057.

M

- Magyar, Z., Atanassova, A., De Veylder, L., Rombauts, S., and Inze, D.** (2000). Characterization of two distinct DP-related genes from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **486**, 79-87.
- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bako, L., Inze, D., and Bogre, L.** (2005). The role of the *Arabidopsis* E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* **17**, 2527-2541.
- Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolczi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Koncz, C., and Dudits, D.** (1997). Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant Cell* **9**, 223-235.
- Maltzman, W., and Czyzyk, L.** (1984). UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Molecular and Cellular Biology* **4**, 1689-1694.
- Manevski, A., Bertoni, G., Bardet, C., Tremousaygue, D., and Lescure, B.** (2000). In synergy with various cis-acting elements, plant interstitial telomere motifs regulate gene expression in *Arabidopsis* root meristems. *FEBS Lett* **483**, 43-46.
- 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.
- Maser, R.S., Mirzoeva, O.K., Wells, J., Olivares, H., Williams, B.R., Zinkel, R.A., Farnham, P.J., and Petrini, J.H.** (2001). Mre11 complex and DNA replication: linkage to E2F and sites of DNA synthesis. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 6006-6016.
- Menges, M., Samland, A.K., Planchais, S., and Murray, J.A.** (2006). The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 893-906.
- Moroni, M.C., Hickman, E.S., Lazzerini Denchi, E., Caprara, G., Colli, E., Cecconi, F., Muller, H., and Helin, K.** (2001). Apaf-1 is a transcriptional target for E2F and p53. *Nat Cell Biol* **3**, 552-558.
- Muller, H., Moroni, M.C., Vigo, E., Petersen, B.O., Bartek, J., and Helin, K.** (1997). Induction of S-phase entry by E2F transcription factors depends on their nuclear localization. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5508-5520.
- Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D., and Helin, K.** (2001). E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis. *Genes Dev* **15**, 267-285.

N

- 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.
- 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.

- Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D., and Ehrhardt, W.** (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* **9**, 255-262.
- Noble, M.E., 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.
- Nurse, P., and Bissett, Y.** (1981). Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2 for control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292**, 558-560.
- Nyholm, S., Thelander, L., and Graslund, A.** (1993). Reduction and loss of the iron center in the reaction of the small subunit of mouse ribonucleotide reductase with hydroxyurea. *Biochemistry* **32**, 11569-11574.



- O'Connor, D.J., and Lu, X.** (2000). Stress signals induce transcriptionally inactive E2F-1 independently of p53 and Rb. *Oncogene* **19**, 2369-2376.
- Ooms, G., Hooykaas, P.J., Moolenaar, G., and Schilperoort, R.A.** (1981). Grown gall plant tumors of abnormal morphology, induced by *Agrobacterium tumefaciens* carrying mutated octopine Ti plasmids; analysis of T-DNA functions. *Gene* **14**, 33-50.
- Ormo, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., and Remington, S.J.** (1996). Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395.
- Osakabe, K., Abe, K., Yamanouchi, H., Takyuu, T., Yoshioka, T., Ito, Y., Kato, T., Tabata, S., Kurei, S., Yoshioka, Y., Machida, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Shinozaki, K., Ichikawa, H., and Toki, S.** (2005). Arabidopsis Rad51B is important for double-strand DNA breaks repair in somatic cells. *Plant Mol Biol* **57**, 819-833.



- Philipps, G., Clement, B., and Gigot, C.** (1995). Molecular characterization and cell cycle-regulated expression of a cDNA clone from *Arabidopsis thaliana* homologous to the small subunit of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett* **358**, 67-70.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., Segers, G., De Veylder, L., Barroco, R.P., Casteels, P., Van Montagu, M., Inze, 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.



- Qin, X.Q., Chittenden, T., Livingston, D.M., and Kaelin, W.G., Jr.** (1992). Identification of a growth suppression domain within the retinoblastoma gene product. *Genes Dev* **6**, 953-964.
- Raggiaschi, R., Lorenzetto, C., Diodato, E., Caricasole, A., Gotta, S., and Terstappen, G.C.** (2006). Detection of phosphorylation patterns in rat cortical neurons by combining phosphatase treatment and DIGE technology. *Proteomics* **6**, 748-756.
- Ramirez-Parra, E., and Gutierrez, C.** (2000). Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Lett* **486**, 73-78.

- Ramirez-Parra, E., Frundt, C., and Gutierrez, C.** (2003). A genome-wide identification of E2F-regulated genes in Arabidopsis. *Plant J* **33**, 801-811.
- Ramirez-Parra, E., Xie, Q., Boniotti, M.B., and Gutierrez, C.** (1999). The cloning of plant E2F, a retinoblastoma-binding protein, reveals unique and conserved features with animal G(1)/S regulators. *Nucleic Acids Res* **27**, 3527-3533.
- Regad, F., Lebas, M., and Lescure, B.** (1994). Interstitial telomeric repeats within the Arabidopsis thaliana genome. *J Mol Biol* **239**, 163-169.
- Reichard, P.** (1988). Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem* **57**, 349-374.
- Reichard, P.** (1993). From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* **260**, 1773-1777.
- Reichard, P., Eliasson, R., Ingemarson, R., and Thelander, L.** (2000). Cross-talk between the allosteric effector-binding sites in mouse ribonucleotide reductase. *J Biol Chem* **275**, 33021-33026.
- Reichheld, J.P., Chaubet, N., Shen, W.H., Renaudin, J.P., and Gigot, C.** (1996). Multiple A-type cyclins express sequentially during the cell cycle in Nicotiana tabacum BY2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 13819-13824.
- Rempel, R.E., Saenz-Robles, M.T., Storms, R., Morham, S., Ishida, S., Engel, A., Jakoi, L., Melhem, M.F., Pipas, J.M., Smith, C., and Nevins, J.R.** (2000). Loss of E2F4 activity leads to abnormal development of multiple cellular lineages. *Mol Cell* **6**, 293-306.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V., and Murray, J.A.** (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Mol Biol* **32**, 1003-1018.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A., and Murray, J.A.** (1999). Cytokinin activation of Arabidopsis cell division through a D-type cyclin. *Science* **283**, 1541-1544.
- 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.
- Ronceret, A., Guilleminot, J., Lincker, F., Gadea-Vacas, J., Delorme, V., Bechtold, N., Pelletier, G., Delseny, M., Chaboute, M.E., and Devic, M.** (2005). Genetic analysis of two Arabidopsis DNA polymerase epsilon subunits during early embryogenesis. *Plant J* **44**, 223-236.
- Rossignol, P., Stevens, R., Perennes, C., Jasinski, S., Cella, R., Tremousaygue, D., and Bergounioux, C.** (2002). AtE2F-a and AtDP-a, members of the E2F family of transcription factors, induce Arabidopsis leaf cells to re-enter S phase. *Mol Genet Genomics* **266**, 995-1003.
- Rotheneder, H., Geymayer, S., and Haidweger, E.** (1999). Transcription factors of the Sp1 family: interaction with E2F and regulation of the murine thymidine kinase promoter. *J Mol Biol* **293**, 1005-1015.



- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-5467.
- Schlisio, S., Halperin, T., Vidal, M., and Nevins, J.R.** (2002). Interaction of YY1 with E2Fs, mediated by RYBP, provides a mechanism for specificity of E2F function. *Embo J* **21**, 5775-5786.

- Sekine, M., Ito, M., Uemukai, K., Maeda, Y., Nakagami, H., and Shinmyo, A.** (1999). Isolation and characterization of the E2F-like gene in plants. *FEBS Lett* **460**, 117-122.
- Serizawa, H., Makela, T.P., Conaway, J.W., Conaway, R.C., Weinberg, R.A., and Young, R.A.** (1995). Association of Cdk-activating kinase subunits with transcription factor TFIID. *Nature* **374**, 280-282.
- Sheng, J., and Citovsky, V.** (1996). Agrobacterium-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *Plant Cell* **8**, 1699-1710.
- Shiekhatar, R., Mermelstein, F., Fisher, R.P., Drapkin, R., Dynlacht, B., Wessling, H.C., Morgan, D.O., and Reinberg, D.** (1995). Cdk-activating kinase complex is a component of human transcription factor TFIID. *Nature* **374**, 283-287.
- Shimotohno, A., Matsubayashi, S., Yamaguchi, M., Uchimiya, H., and Umeda, M.** (2003). Differential phosphorylation activities of CDK-activating kinases in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* **534**, 69-74.
- Slansky, J.E., and Farnham, P.J.** (1996). Introduction to the E2F family: protein structure and gene regulation. *Curr Top Microbiol Immunol* **208**, 1-30.
- Soni, R., Carmichael, J.P., Shah, Z.H., and Murray, J.A.** (1995). A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7**, 85-103.
- Sorensen, C.S., Hansen, L.T., Dziegielewska, J., Syljuasen, R.G., Lundin, C., Bartek, J., and Helleday, T.** (2005). The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* **7**, 195-201.
- Sorrell, D.A., Chrimes, D., Dickinson, J.R., Rogers, H.J., and Francis, D.** (2005). The *Arabidopsis* CDC25 induces a short cell length when overexpressed in fission yeast: evidence for cell cycle function. *New Phytol* **165**, 425-428.
- 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.
- Stenger, D., Gruissem, W., and Baginsky, S.** (2004). Mass spectrometric identification of RNA binding proteins from dried EMSA gels. *J Proteome Res* **3**, 662-664.
- Stevens, C., and La Thangue, N.B.** (2004). The emerging role of E2F-1 in the DNA damage response and checkpoint control. *DNA Repair (Amst)* **3**, 1071-1079.
- Stevens, C., Smith, L., and La Thangue, N.B.** (2003). Chk2 activates E2F-1 in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* **5**, 401-409.
- Stevens, R., Mariconti, L., Rossignol, P., Perennes, C., Cella, R., and Bergounioux, C.** (2002). Two E2F Sites in the *Arabidopsis* MCM3 Promoter Have Different Roles in Cell Cycle Activation and Meristematic Expression. *J Biol Chem* **277**, 32978-32984.
- Stiewe, T., and Putzer, B.M.** (2000). Role of the p53-homologue p73 in E2F1-induced apoptosis. *Nat Genet* **26**, 464-469.
- Stubbe, J.** (1990). Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *J Biol Chem* **265**, 5329-5332.



- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y., and Nakamura, Y.** (2000). A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature* **404**, 42-49.
- Tassan, J.P., Jaquenoud, M., Fry, A.M., Frutiger, S., Hughes, G.J., and Nigg, E.A.** (1995). In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *Embo J* **14**, 5608-5617.

- Thelander, L., Eriksson, S., and Akerman, M.** (1980). Ribonucleotide reductase from calf thymus. Separation of the enzyme into two nonidentical subunits, proteins M1 and M2. *J Biol Chem* **255**, 7426-7432.
- Thelander, M., Graslund, A., and Thelander, L.** (1985). Subunit M2 of mammalian ribonucleotide reductase. Characterization of a homogeneous protein isolated from M2-overproducing mouse cells. *J Biol Chem* **260**, 2737-2741.
- Thompson, L.H., and Schild, D.** (2002). Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat Res* **509**, 49-78.
- Tommasi, S., and Pfeifer, G.P.** (1997). Constitutive protection of E2F recognition sequences in the human thymidine kinase promoter during cell cycle progression. *J Biol Chem* **272**, 30483-30490.
- Tremousaygue, D., Garnier, L., Bardet, C., Dabos, P., Herve, C., and Lescure, B.** (2003). Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J* **33**, 957-966.
- Trimarchi, J.M., and Lees, J.A.** (2002). Sibling rivalry in the E2F family. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 11-20.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Verona, R., Moberg, K., Andon, N., and Lees, J.A.** (1998). E2F-6, a member of the E2F family that can behave as a transcriptional repressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 2850-2855.

U. U

- 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.
- Unsal-Kacmaz, K., and Sancar, A.** (2004). Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 1292-1300.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., and Inze, 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., Gruissem, W., Van de Peer, Y., Inze, D., and De Veylder, L.** (2005). Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol* **139**, 316-328.
- Verona, R., Moberg, K., Estes, S., Starz, M., Vernon, J.P., and Lees, J.A.** (1997). E2F activity is regulated by cell cycle-dependent changes in subcellular localization. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 7268-7282.

W

- Wang, C., and Liu, Z.** (2006). *Arabidopsis* ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development. *Plant Cell* **18**, 350-365.

- 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., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., and Fowke, L.C. (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from Arabidopsis thaliana interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* **15**, 501-510.
- Wang, P.J., Chabes, A., Casagrande, R., Tian, X.C., Thelander, L., and Huffaker, T.C. (1997). Rnr4p, a novel ribonucleotide reductase small-subunit protein. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6114-6121.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323-330.
- Weinert, T.A., Kiser, G.L., and Hartwell, L.H. (1994). Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* **8**, 652-665.
- White, J.H., Green, S.R., Barker, D.G., Dumas, L.B., and Johnston, L.H. (1987). The CDC8 transcript is cell cycle regulated in yeast and is expressed coordinately with CDC9 and CDC21 at a point preceding histone transcription. *Exp Cell Res* **171**, 223-231.
- Wu, L., Timmers, C., Maiti, B., Saavedra, H.I., Sang, L., Chong, G.T., Nuckolls, F., Giangrande, P., Wright, F.A., Field, S.J., Greenberg, M.E., Orkin, S., Nevins, J.R., Robinson, M.L., and Leone, G. (2001). The E2F1-3 transcription factors are essential for cellular proliferation. *Nature* **414**, 457-462.
- X, Y*
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A.P., Hannon, G.J., and Gutierrez, C. (1996). Plant cells contain a novel member of the retinoblastoma family of growth regulatory proteins. *Embo J* **15**, 4900-4908.
- Yamaguchi, M., Hayashi, Y., and Matsukage, A. (1995). Essential role of E2F recognition sites in regulation of the proliferating cell nuclear antigen gene promoter during Drosophila development. *J Biol Chem* **270**, 25159-25165.
- Yamasaki, L., Jacks, T., Bronson, R., Goillot, E., Harlow, E., and Dyson, N.J. (1996). Tumor induction and tissue atrophy in mice lacking E2F-1. *Cell* **85**, 537-548.
- Yang, F., Moss, L.G., and Phillips, G.N., Jr. (1996a). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **14**, 1246-1251.
- Yang, T.T., Cheng, L., and Kain, S.R. (1996b). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* **24**, 4592-4593.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**, 103-119.
- Yao, R., Zhang, Z., An, X., Bucci, B., Perlstein, D.L., Stubbe, J., and Huang, M. (2003). Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6628-6633.
- Yonish-Rouach, E., Resnitzky, D., Lotem, J., Sachs, L., Kimchi, A., and Oren, M. (1991). Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukaemic cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* **352**, 345-347.

Yu, Y., Steinmetz, A., Meyer, D., Brown, S., and Shen, W.H. (2003). The tobacco A-type cyclin, Nicta;CYCA3;2, at the nexus of cell division and differentiation. *Plant Cell* **15**, 2763-2777.

Z

Zaim, J., Speina, E., and Kierzek, A.M. (2005). Identification of new genes regulated by the Crt1 transcription factor, an effector of the DNA damage checkpoint pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**, 28-37.

Zhang, K., Letham, D.S., and John, P.C. (1996). Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* **200**, 2-12.

Zhang, Z., An, X., Yang, K., Perlstein, D.L., Hicks, L., Kelleher, N., Stubbe, J., and Huang, M. (2006). Nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* ribonucleotide reductase small subunit requires a karyopherin and a WD40 repeat protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1422-1427.

Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L., and Rothstein, R. (2001). The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *Embo J* **20**, 3544-3553.

Zheng, P., Fay, D.S., Burton, J., Xiao, H., Pinkham, J.L., and Stern, D.F. (1993). SPK1 is an essential S-phase-specific gene of *Saccharomyces cerevisiae* that encodes a nuclear serine/threonine/tyrosine kinase. *Molecular and Cellular Biology* **13**, 5829-5842.

Zhu, L., Xie, E., and Chang, L.S. (1995). Differential roles of two tandem E2F sites in repression of the human p107 promoter by retinoblastoma and p107 proteins. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 3552-3562.

Zhu, W., Giangrande, P.H., and Nevins, J.R. (2004). E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription. *Embo J* **23**, 4615-4626.

Zupan, J., Muth, T.R., Draper, O., and Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *Plant J* **23**, 11-28.

Annexes

Annexes

Nom	Taille	Séquence	Utilisation
<i>RNR1a</i>			
dWTd	29	CGAAGTCATAGTTTGGCGGCAACGTTAT	Gel retard
dWTr	29	ATAACGTTGCCGCCAAACTATGACTTCG	Gel retard
dMud	29	CGAAGTCATAGAGTTTAAAGCTCCGTTAT	Gel retard
dMUr	29	ATAACGGAGCTTTAAACTCTATGACTTCG	Gel retard
pWTd	30	CGAAACCCTAATTCGCGCAAAAGTTATTCA	Gel retard
pWTr	30	TGAATAACTTTTGCGCGAATTAGGGTTTCG	Gel retard
pE2FMud	24	AAGCTCCGTATAAAAAATTCTGTT	Mutagenèse
pE2FMur	24	ATTTGACTATGACTTATAATCAGA	Mutagenèse
dE2FMud	24	TAAAAAAAGTTATTCAAATCCCTA	Mutagenèse
dE2FMur	26	TTTATAGGGTTTTTGATTTTTGGGGA	Mutagenèse
<i>RNR1b</i>			
WTd	62	TTTACCCGCCAACAGTCACCCCGCTCTTCTATTAGGCGGGAAAAATTTTAAAACCCTAATTT	Gel retard
WTr	57	AATGAAATTAGGGTTTTAAAAATTTCCCGCCTAATAGAAGAGCGGGGGTGACTGTT	Gel retard
M Mud	66	TTTACCCGCACTAGTTCACCCCGCTCTTCTATTAGGCGGGAAAAATTTTAAAACCCTAATTTTCATT	Gel retard
M Mur	66	AATGAAATTAGGGTTTTAAAAATTTCCCGCCTAATAGAAGAGCGGGGGTGAAGCTAGTGCGGGTAA	Gel retard
E Mud	66	TTTACCCGCCAACAGTCACCCCGCTCTTCTATTAGACTTAAGCATTTTAAAACCCTAATTTTCATT	Gel retard
E Mur	66	AATGAAATTAGGGTTTTAAAAATGCTTAAGTCTAATAGAAGAGCGGGGGTGACTGTTGGCGGGTAA	Gel retard
T Mud	66	TTTACCCGCCAACAGTCACCCCGCTCTTCTATTAGGCGGGAAAAATTTTACCCGGGACATTTTCATT	Gel retard
T Mur	66	AATGAAATGTCCCGGTAATAATTTCCCGCCTAATAGAAGAGCGGGGGTGACTGTTGGCGGGTAA	Gel retard
MET Mud	66	TTTACCCGCACTAGTTCACCCCGCTCTTCTATTAGACTTAAGCATTTTACCCGGGACATTTTCATT	Gel retard
MET Mur	66	AATGAAATGTCCCGGTAATAATCGAATTCCTAATAGAAGAGCGGGGGTGAAGCTAGTGCGGGTAA	Gel retard
Myb Mud	23	AGTTCACCCCGCTCTTCTATTA	Mutagenèse
Myb Mur	24	AGTGCGGGTAAATATCAAATATGG	Mutagenèse
Tel Mud	25	GGACATTTTCATTCTTCAAATTAACG	Mutagenèse
Tel Mur	24	CGGGTAAAAATTTCCCGCCTAATA	Mutagenèse
ME3Xd	55	GGGGCAACAGTCAGCGGGAACAACAGTCAGCGGGAACAACAGTCAGCGGGAAA	Southwestern blot
ME3X	55	GGGGTTTTCCCGCTGACTGTTGTTTCCCGCTGACTGTTGTTTCCCGCTGACTGTTG	Southwestern blot

Oligonucléotides utilisés pour générer les différentes mutations des promoteurs *NtRNR1a* et *NtRNR1b* et pour les expériences de gel retard et de southwestern blot

Article 1 :

UV-C response of the ribonucleotide reductase large subunit involves both E2F-mediated gene transcriptional regulation and protein subcellular relocalization in tobacco cells

Frédéric LINCKER, Gabriel PHILIPPS et Marie-Edith CHABOUTÉ

Nucleic Acids Res. 2004 Feb 27;32(4):1430-8.

UV-C response of the ribonucleotide reductase large subunit involves both E2F-mediated gene transcriptional regulation and protein subcellular relocalization in tobacco cells

Frédéric Lincker, Gabriel Philipps and Marie-Edith Chabouté*

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, Université Louis Pasteur, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France

Received January 8, 2004; Revised and Accepted February 5, 2004

ABSTRACT

E2F factors are implicated in various cellular processes including specific gene induction at the G₁/S transition of the cell cycle. We present in this study a novel regulatory aspect for the tobacco large subunit of ribonucleotide reductase (R1a) and its encoding gene (*RNR1a*) in the UV-C response. By structural analyses, two E2F sites were identified on the promoter of this gene. Functional analysis showed that, in addition to their role in the specific G₁/S induction of the *RNR1a* gene, both E2F sites were important for regulating specific *RNR1a* gene expression in response to UV-C irradiation in non-synchronized and synchronized cells. Concomitantly, western blot and cellular analyses showed an increase of a 60 kDa E2F factor and a transient translocation of a GFP-R1a protein fusion from cytoplasm to nucleus in response to UV irradiation.

INTRODUCTION

In mammals, the E2F transcription factor plays a crucial role in various cellular processes, such as proliferation, apoptosis and differentiation (1). In this context, extensive studies have demonstrated the role of E2F transcription factors in the control of cell cycle progression and their requirement for G₁/S induction of genes linked to DNA replication (2). The mammalian E2F family consists of seven members, where E2F1 to E2F5 factors possess a *trans*-activation domain and a Rb binding domain while the E2F6 and E2F7 factors contain neither (3,4). E2F-mediated response is achieved by heterodimerization of E2F with its dimerization partner (DP) and binding to their target DNA motif, TTTSSCGC. In quiescent cells, E2F4 and E2F5 were shown to silence expression of various genes, which are in turn derepressed upon cell cycle activation. Transcriptional repression is mediated through binding of E2F4/p130 or E2F5/p107 repressor complexes to the cell cycle-dependent element (CDE) and cell cycle gene homology region (CHR) on their target gene promoters. E2F1,

E2F2 and E2F3 factors are activators of genes that are highly transcribed during S phase (5). Recent data obtained from microarray analyses extend the role of E2F to other pathways, such as DNA repair and mitosis (6).

In plants, six E2F factors have been cloned in *Arabidopsis* (7,8). Similar to their mammalian E2F1-3 counterparts, AtE2Fa-c factors can transactivate E2F targets and present conserved residues for DNA binding, dimerization, transactivation and Rb binding (7,9). The other E2F factors named DP-E2F-like factors (DEL1, 2, 3) lack dimerization, *trans*-activation and Rb binding domains but contain a duplicated DNA binding domain (DBD) (7), as recently observed for the newly identified human E2F7 factor (4). These DEL factors act as transcriptional repressors (7,10). In plants, only a few genes have been investigated for E2F-controlled transcriptional regulation. The tobacco RNR2 promoter was the first to be described to have an *in vivo* E2F-mediated regulation. According to the promoter context, E2F elements act only as activators at the entry of S phase (11) or switch from a repressor to an activator element during cell cycle progression (12). E2F elements in the tobacco PCNA promoter drive transcriptional activation in proliferating cells (13) but behave as repressors in differentiated tissues (14). An extensive analysis of potential E2F targets in the genome of *Arabidopsis* revealed that various genes belonging to different categories (e.g. stress or signal transduction) are regulated by the E2F pathway (15). Nevertheless, only limited functional data on the role of E2F elements in regulating plant promoters are available to date (16).

Ribonucleotide reductase plays an important role in providing the cell with the dNTP pool needed for DNA replication and urgent DNA repair (17). A malfunction of RNR in providing the cell with an unbalanced dNTP pool can lead to misincorporation of dNTPs into DNA and therefore to genetic abnormalities (18). Consequently, RNR is submitted to a strict regulation that maintains the four dNTPs at optimal levels during DNA replication and repair. In yeast, RNR is controlled at different levels during DNA replication as well as upon DNA damage: transcription, post-transcription (protein stability) and RNR activity (allosteric control and activity inhibitor) (19–22). In the DNA damage response, one gene encoding the large subunit, namely RNR3, is exclusively

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 388 417 297; Fax: +33 388 614 442; Email: marie-edith.chaboute@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

induced upon DNA damage. In addition to transcriptional regulation, the Mec1/Rad53 pathway, a central player in the DNA damage response, regulates RNR activity through phosphorylation of Sml1 which binds to yeast RNR and inhibits its activity (23). In mammals, activation of the small subunit RNR gene p53R2 depends on p53 after DNA damage (24). This emphasizes the importance of dNTP regulation after DNA damage in yeast and mammals and therefore the need to investigate further RNR regulation in plants.

This paper focuses on the involvement of E2F in the regulation of the tobacco *RNR1a* gene expression in both cell cycle and UV-C response. Structural analyses show that two E2F elements present on the RNR1a promoter interact with a purified tobacco E2F factor as well as with specific nuclear complexes. Functional analyses reveal that both E2F elements are important for driving RNR1a promoter induction at the G₁/S transition in synchronized BY-2 tobacco cells, as well as in response to UV irradiation in dividing non-synchronized cells and S phase cells. UV-C irradiation of mid-log phase cells led to an increase of a 60 kDa E2F factor as well as to a transient translocation of an EGFP-R1a fusion protein from cytoplasm to nucleus. Compared with mammals, the present study reports a new aspect of RNR regulation in UV-C response involving both E2F-mediated transcriptional control as well as subcellular localization of the R1a protein.

MATERIALS AND METHODS

Plant cell culture, synchronization and UV-C irradiation

The BY-2 tobacco cell suspension was maintained by weekly subculture as described (25) at 27°C. For cell synchronization, freshly sub-cultured stationary phase cells were treated with aphidicolin (3 µg/ml, Sigma) for 24 h and extensively washed with sucrose (30 g/l). DNA synthesis and mitotic index were monitored as described previously (26).

Cell irradiation was performed inside a Stratagene 2400 (Stratagene) irradiation chamber equipped with 254 nm UV-C light bulbs. Fifty millilitres of cells were irradiated in a large Petri dish without a lid. After irradiation, cells were cultured in liquid medium at 27°C.

RNA isolation and northern blot analysis

Total RNA was isolated from BY-2 cells, analysed by formaldehyde-agarose gel electrophoresis and transferred onto a Hybond N+ membrane (Amersham Biosciences) as described (11). Hybridization was performed overnight at 42°C with ³²P-labelled probes in the presence of 50% formamide.

Nuclear extracts and gel shift assays

Nuclear extracts were prepared as described previously (12). Gel shift assays were performed in the presence of 6 µg of nuclear extract or 300 ng of purified tobacco protein obtained as described (12). Protein samples were incubated with 20 000 c.p.m. of radio-labelled probes in 20 µl of binding buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 5 mM β-mercaptoethanol, 0.5 mM PMSF, 250 µg/l pepstatin, 500 µg/l leupeptin) in the presence of 0.05% Nonidet P-40 and 1 µg of poly(dI-dC)-poly(dI-dC) (Pharmacia Biotech). The unrelated oligonucleotide used in

the gel shift assay was TGCCATCACGAA-GCTTAC-TAATATGAAC. For competition assays, a molar excess of unlabelled double-stranded oligonucleotides or 2 µl of antibody (anti E2F5; Santa Cruz) was included in the reaction. The samples were electrophoresed on 4.5% polyacrylamide gels in 0.25× TBE at 4°C (8 V/cm). After electrophoresis, the gels were dried and autoradiographed.

Western blot analysis

Nuclear proteins were analysed by SDS-PAGE and transferred to Immobilon-P membranes (Millipore) using a mini transblot transfer cell apparatus (Bio-Rad). The blots were incubated with a polyclonal serum raised against the DBD of the human E2F5 factor (Santa Cruz), and immunodetection was performed using ECL chemiluminescence detection reagents (Pierce).

Cloning of the RNR1a promoter

The RNR1a promoter sequence was amplified by inverse PCR (IPCR) on tobacco genomic DNA. A fragment from -1151 bp to the ATG start codon was obtained. The DNA region from -423 to -20 bp was amplified by PCR with XbaI-BamHI linkers and was subcloned into the XbaI-BamHI sites of the pBluescript (pKS) vector to give the reference construct used in our experiments. This construct was mutated in both E2F sites (dE2F/CDE and pE2F) by PCR-based site-directed mutagenesis, using the same nucleotide changes as in gel shift assays (indicated in Fig. 2), and gave the dpE2FMU construct.

Promoter constructs and generation of transgenic cells

The WT promoter construct and its E2F-mutated version were subcloned by PCR into the KpnI-NcoI sites of the luciferase (LUC)-intron reporter gene plasmid pLuk07 (27), to replace the original CaMV 35S promoter. In addition, a minimal KpnI-NcoI promoter restricted to the TATA box (-108 to -20 bp) was similarly subcloned into the pLuk07 vector.

Then, each KpnI-XbaI fragment carrying the promoter-LUC fusion was cloned into the KpnI-XbaI sites of the binary vector pCGN1549 (Calgene). Constructs were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 and used to transform tobacco BY2 cells, as described (28). Approximately 1000 kanamycin-resistant calli were pooled and grown as suspension cultures. The transgenic cell suspensions were maintained by subculturing 2 ml of stationary phase cells in 80 ml of fresh medium supplemented with carbenicillin (500 µg/ml) and kanamycin (100 µg/ml). After four rounds of subculture, carbenicillin was omitted from the medium.

LUC assay

Two millilitres of cells were washed twice in PBS buffer (140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 4.3 mM Na₂HPO₄ pH 7.4) and lysed by a 10 min incubation at room temperature in 200 µl of lysis buffer (100 mM potassium phosphate buffer pH 7.8, 1 mM DTT and 0.2% Triton X-100). After centrifugation at 3500 g for 3 min, the supernatant was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Luciferase activity was measured using the Luciferase assay kit (Tropix) in a microplate luminometer (TR 717 Tropix Perkin Elmer Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions.

EGFP construct, observation of the GFP fluorescence and cell treatment with leptomycin B

The open-reading frame of the *RNR1a* cDNA (accession no. Y10861) was amplified with the flanking *attB* sites and subcloned into the pDONR201 vector (Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) by recombination with the *attP* sites of the vector mediated by the GATEWAY™ BP Clonase™ enzyme mix. Then, this open-reading frame was transferred downstream from the EGFP into the pK7WGF2 binary destination vector (29) by using the GATEWAY™ LR Clonase™ enzyme mix. Upon subcloning into *Agrobacterium* LBA4404, the EGFP-R1a construct was used to stably transform BY-2 cells, as described previously (28). Calli were maintained as suspension cultures in selective medium supplemented with kanamycin (100 µg/ml). GFP fluorescence was analysed using a Zeiss LSM 510 confocal laser scanning microscope with the 488 nm ray of the argon laser and a barrier filter of 505–550 nm.

As specific inhibitor of nuclear export, we used leptomycin B (LMB; Sigma). Experiments were performed on BY2 mid-log phase cells in the presence of LMB (0.1 µM). After overnight incubation at 24°C, GFP fluorescence was observed.

RESULTS

Tobacco RNR1a promoter analysis

Our previous results showed that the small multigenic RNR1 gene family was cell cycle regulated in synchronized BY2 cells (30). To investigate the specific transcriptional regulation of the RNR1a gene, a 1151 bp promoter sequence was amplified by IPCR from tobacco genomic DNA. Various potential *cis*-elements were identified upstream from the ATG codon (Fig. 1), notably a TATA box (at –108 bp), two E2F elements related to the consensus TTTSSCGC: a proximal E2F element, called pE2F (ATTTCGCGC, at –143 bp) and a distal reverse E2F element, named dE2F (GCGGCAAA) combined with a direct CDE-like element (TTTGGCGG), at –413 bp (31). A CHR-like element (CGTTAT) was identified downstream from the CDE element. Compared with the tobacco RNR2 promoter (12), the organization of E2F elements was different in the RNR1a promoter: the composite element dE2F/CDE was distal, whereas the other element was proximal and located next to a telo box (AAACCCTAA). Telo boxes were described to act in synergy with regulatory *cis*-elements in *Arabidopsis* (32,33). Potential Myb elements (CAACAG) were located next to the E2F motifs at –385 and –100 bp from the ATG, in a direct and reverse orientation, respectively (34). Interestingly, the Myb site at –385 bp was found downstream from the E2F/CDE element as for the RNR2 promoter. In the distal part of the promoter from –1115 to –1074 bp, putative scaffold attachment regions (SARs) were identified, which correspond to A/T boxes or T boxes and display intrinsic curved DNA as for animal SARs (35).

Binding properties of the E2F motifs in the RNR1a promoter

To characterize the binding capacity of the E2F sites in the RNR1a promoter, we assayed the specific *in vitro* binding of nuclear complex(es) to these sites. To this end, gel shift assays were performed with either the dWT or pWT probes, carrying,

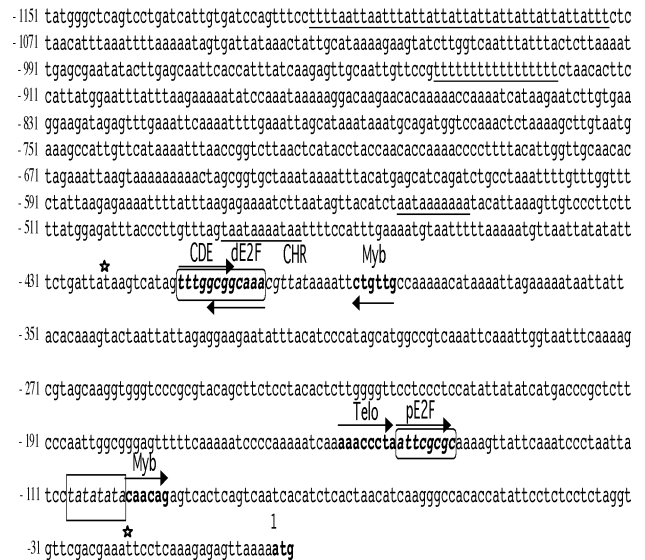


Figure 1. Nucleotide sequence of the tobacco RNR1a promoter. A –1151 bp DNA fragment upstream from the ATG was amplified by IPCR. The subcloned sequence tested for promoter activity in our experiments is delimited by stars. Putative E2F elements are boxed, the distal dE2F/CDE composite element as well as the proximal pE2F element are indicated. A putative CHR box is in italic, potential Myb and telo elements are in bold characters and a potential TATA box is framed. Orientation of the various *cis*-elements is indicated by horizontal arrows. Putative SAR elements are underlined.

respectively, the dE2F/CDE and pE2F motifs (Fig. 2A), in the presence of nuclear extracts from mid-log phase BY-2 cells. The dWT probe that contained both dE2F and CDE (repressor-like element) elements detected two specific complexes (I and II) while the pWT probe revealed a single specific complex (Fig. 2B). Binding of these specific complexes to their respective target was titrated out by an excess of their unlabelled WT probes but not by their E2F-mutated oligonucleotides (dMU and pMU oligonucleotides presented in Fig. 2A) nor by unrelated oligonucleotides (Fig. 2B). Binding of specific complexes to the pWT and dWT probes was partly prevented by a specific antibody raised against the DNA binding domain (DBD) of human E2F5 [which is well conserved between plants and animals (12)], when added to nuclear extracts prior to probe incubation (Fig. 2C). This suggests that E2F factors may belong to these complexes.

In addition, we checked the capacity of the E2F sites to bind a purified tobacco E2F protein (12). As shown in Figure 2D, binding of the tobacco E2F factor to the dWT or pWT probes was detected and could be competed, respectively, with the dWT or pWT wild-type sequences but not with the pMU or dMU mutated E2F sequences. In our experimental conditions, E2F binding might not be optimal since no DP was added, nevertheless the observed interaction is specific. A similar observation was reported when a wheat E2F factor was tested alone or in the presence of DP for interaction with specific E2F elements (36). Moreover, the antibody directed against the DNA binding domain (DBD) of human E2F5 prevented binding of the tobacco E2F factor to its target elements. Therefore, both E2F elements present in the RNR1a promoter showed binding capacity for E2F factors.

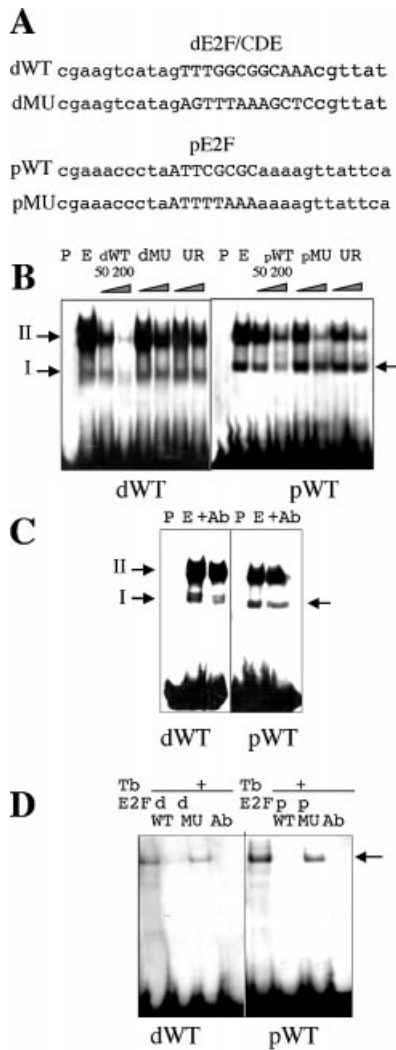


Figure 2. Binding properties of the E2F elements of the RNR1a promoter. (A) dWT and pWT oligonucleotides carrying either dE2F/CDE or pE2F motifs are indicated as well as their mutated versions in their E2F sites, dMU and pMU, respectively. (B) The WT oligonucleotides were used as probes (P) in gel shift experiments performed with nuclear extracts (E) prepared from mid-log phase BY-2 cells. The dWT probe revealed two specific complexes, I and II, whose binding was competed by a 50–200-fold molar excess of unlabelled oligonucleotides (dWT) but not by the E2F-mutated (dMU) and unrelated (UR) oligonucleotides. In contrast, a single specific complex was revealed with the pWT probe (see arrow): binding is competed by an excess of the pWT oligonucleotides but not by the pMU oligonucleotides. (C) E2F factor is part of nuclear complexes bound to E2F elements of the RNR1a promoter. Binding of specific complexes is competed by 2 μ l of antibody directed against the DBD of human E2F5 (Ab). (D) Specific interaction between E2F sites of the RNR1a promoter and a purified tobacco E2F factor (TbE2F). A complex is detected (see arrow) with both WT probes and the complex is competed by a 200-fold molar excess of the wild-type unlabelled probe (pWT or dWT) and 2 μ l of antibody raised against the DBD of human E2F5 (Ab) but not by a 200-fold excess of E2F-mutated oligonucleotides (dMU or pMU).

Specific RNR1a gene expression in tobacco BY-2 cells parallels RNR1a promoter activity

BY-2 tobacco cells were synchronized by aphidicolin and specific RNR1a mRNA levels were evaluated for 16 h following the release from the inhibitory block. Two parameters were measured during cell synchronization: the mitotic

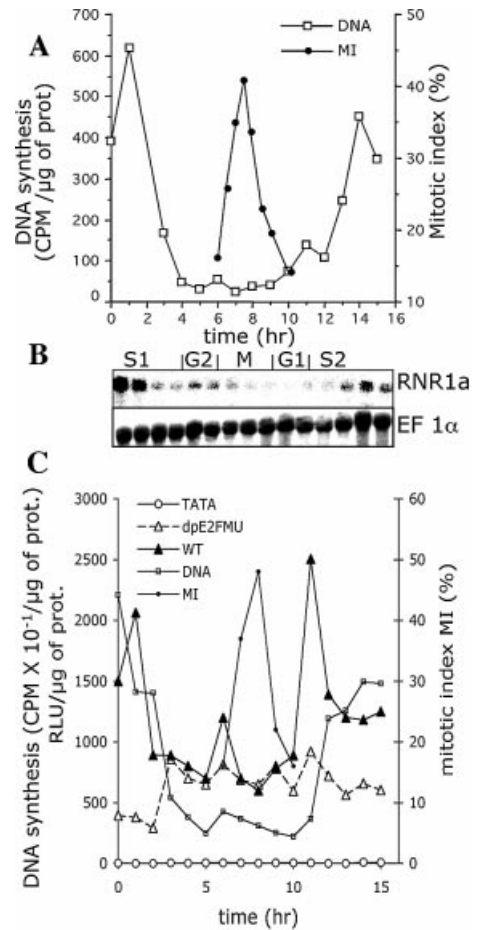


Figure 3. Specific expression of the RNR1a gene parallels its promoter activity during the cell cycle. (A) Analysis of parameters in cell cycle progression of synchronized tobacco BY-2 cells. Cells were synchronized by aphidicolin and after removal of the inhibitor, DNA synthesis was monitored by [³H]thymidine pulse labelling experiments (open squares) and mitotic index was determined by UV light microscopic analysis of cells stained with DAPI (filled circles). (B) Specific RNR1a gene expression in synchronized BY-2 cells. RNA samples (20 μ g) prepared from cells taken every hour were blotted and hybridized to the 3' specific region of the RNR1a cDNA. The constitutively expressed EF-1 α (57) was blot-hybridized for loading control. (C) RNR1a promoter activity in synchronized BY-2 cells and role of E2F elements. RNR1a promoter constructs were fused to the luciferase reporter gene: the wild-type promoter (WT), the WT promoter mutated in both dE2F/CDE and pE2F sites (dpE2FMU) and the minimal promoter reduced to the TATA box (TATA). Mutations of the composite dE2F/CDE element and pE2F site were identical to those described in bandshift experiments (Fig. 2A). Transgenic BY-2 cells harbouring the various promoter constructs were synchronized by aphidicolin. After removal of aphidicholin, cell cycle progression was monitored by measurements of DNA synthesis (open squares) and mitotic index (filled circles). Similar synchronization profiles were obtained with the different constructs. At different time-points of the cell cycle, LUC activities were measured in the transgenic cells harbouring the following promoter constructs: WT (filled triangles), dpE2FMU (open triangles, broken line), TATA (open circles). RLU, relative light unit. Results were reproducible in three independent experiments with a pool of 1000 individual clones.

index and DNA synthesis, which allowed one to delimit the progression of mitosis and S phases, respectively (Fig. 3A). S₁ represents the first S phase after release from the aphidicolin block and S₂ the second S phase. Northern blot analysis was performed with extracts prepared from cells taken at different

phases of the cell cycle. The blots were hybridized with a 3' UTR region of the *RNR1a* cDNA. The *RNR1a* mRNA level paralleled DNA synthesis in both S₁ and S₂ phases (Fig. 3B) and also increased slightly at the G₂/M transition, which could be related to *RNR1a* gene induction for DNA repair before entry into mitosis.

In order to determine if the *RNR1a* mRNA level was mainly due to transcriptional regulation, we investigated the *RNR1a* promoter activity through the cell cycle as well as the role of E2F elements in the control of its activity. Different constructs were generated: a 403 bp promoter (WT, delimited by stars in Fig. 1) containing E2F elements and most of the regulatory elements described above, a 403 bp mutated promoter (dpE2FMU) carrying both mutated E2F elements (dE2F/CDE and pE2F sites) and an 88 bp minimal promoter (TATA) reduced to the TATA box. These different constructs were fused to the luciferase reporter gene (LUC) and were stably transferred into BY-2 cells. Pools of 1000 individual clones were cultured as cell suspensions and analysed. After synchronization of the transgenic lines by aphidicolin, DNA synthesis and the mitotic index were monitored during cell cycle progression. Cell synchronization parameters were similar for the WT, dpE2FMU and TATA promoter constructs (Fig. 3C), with a maximal mitotic index (46–48%) at 8 h and a maximal second S phase at 12 h. LUC activity of the various constructs was measured concomitantly. WT promoter activity paralleled the *RNR1a* mRNA levels observed in Figure 3B. In the first S phase, after aphidicolin block release, the promoter was already induced, as we previously observed (30), then promoter activity increased slightly in the G₂/M transition (6 h), decreased in mitosis and increased concurrently with DNA synthesis in the second S phase (10–12 h) to reach a 2.5-fold maximal level of induction. Interestingly, the activity of the promoter extended to its distal part (up to –1113 bp in Fig. 1) presented an overall higher activity (5-fold higher) compared with the –403 bp promoter (WT) but had a similar induction level in S phase (data not shown). The minimal promoter presented a very low basal activity. Finally, mutation of both E2F elements prevented any induction of the promoter at the G₁/S transition. Therefore, we can conclude that E2F elements present in the 403 bp sequence are important for driving S phase induction of the *RNR1a* promoter during the cell cycle.

Involvement of E2F elements in the *RNR1a* promoter induction in non-synchronized cells upon UV-C irradiation

Since *RNR1a* mRNA levels increased concomitantly with *RNR1a* promoter activity at the G₂/M transition, we correlate such RNR induction to DNA repair activity occurring before entry into mitosis. Therefore, we investigated the transcriptional regulation of the *RNR1a* gene in the DNA damage response as well as the involvement of E2F factors.

We analysed the DNA damage response of the WT or dpE2FMU promoter fused to the LUC reporter gene in transgenic BY-2 cells. Mid-log phase cells were submitted to a 450 J/m² UV-C irradiation and LUC activity was measured at 0 and 4 h following cell irradiation. Such UV-C energy was previously shown to induce efficient DNA repair in *Arabidopsis* cells (37) and was used to test gene induction into BY-2 cells (38). As seen in Figure 4A, the activity of the

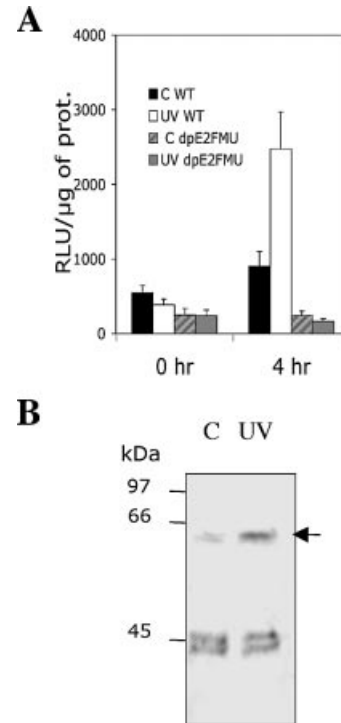


Figure 4. E2F-mediated regulation of the *RNR1a* gene in the UV-C response. (A) LUC activity was measured in mid-log phase BY-2 transgenic cells harbouring the WT (non-hatched bars) or dpE2FMU (hatched bars) promoter constructs. Transgenic cells with the WT (empty bars) or dpE2FMU constructs (fine hatched bars) were taken at 0 and 4 h following UV-C irradiation at 450 J/m². In parallel, control non-irradiated cells harbouring the WT (black bars) or dpE2FMU constructs (large hatched bars) were analysed. Results were reproducible in three individual experiments, error bars are indicated. (B) E2F factor analysis in 6 μg of nuclear extracts from mid-log phase cells which were non-irradiated (C) or taken at 4 h after irradiation (UV-C, 450 J/m²). The protein gel blot was incubated with the antibody directed against the well conserved DBD of human E2F5 factor. Various E2F factors present in the BY-2 cells were detected.

WT promoter increased to 2.5-fold at 4 h following irradiation but not for the dpE2FMU promoter. In conclusion, the *RNR1a* promoter is induced upon UV-C irradiation in BY-2 cells and E2F motifs are important in mediating such a response.

Subsequently, we analysed the level of E2F factors upon irradiation of mid-log phase BY-2 cells. Nuclear extracts were prepared from control non-irradiated cells (C) or cells taken at 4 h after UV-C irradiation (UV) at 450 J/m² (Fig. 4B). An antibody directed against the human E2F5 DBD, which is well conserved among eukaryotes, revealed the E2F factors present in the tobacco nuclear extracts with apparent molecular masses of 45 and 60 kDa (12). The levels of a 60 kDa E2F factor were considerably increased upon UV irradiation, suggesting a role for this E2F factor in the DNA damage response.

RNR1a gene response to a replication block and UV-C irradiation in synchronized S phase cells

We further investigated the DNA damage response of the *RNR1a* gene in synchronized cells. Specific *RNR1a* mRNA levels were evaluated in mid-S phase cells upon DNA

replication block mediated by hydroxyurea (HU). Two hours after aphidicolin removal, cells were treated with HU (60 mM) (Fig. 5A). The *RNR1a* mRNA level paralleled the control 1 h after HU treatment, then increased to its maximum (five times higher than the control) at 4 h after drug application. Promoter activity was also evaluated in mid-S phase transgenic cells upon DNA replication block via HU or UV-C irradiation (450 J/m²). LUC expression driven by the WT promoter construct paralleled *RNR1a* mRNA accumulation after adding HU, suggesting that the specific mRNA increase was mainly due to transcriptional activation of the *RNR1a* promoter (Fig. 5B). In response to UV-C, the WT promoter construct increased to a maximal level (4-fold compared with the non-irradiated control), 4 h after cell irradiation. As *RNR1a* promoter was similarly induced upon HU or UV-C treatment, such induction might be related to a feedback RNR

regulation due to a DNA replication block that probably involves a common signalling pathway. In addition, mutation of E2F elements prevented any promoter induction in HU- or UV-treated cells, which reinforces the important role of these *cis*-elements in the *RNR1a* HU–UV response. Moreover, a 3-fold WT promoter induction was observed 4 h after cell irradiation (Fig. 5C), even in stationary phase cells shown to be arrested in G₁ (39). No induction was detected when both E2F sites were mutated in the promoter. Thus, these data suggest that induction of the *RNR1a* promoter in G₁-arrested cells may be a direct response to UV-C irradiation.

Transient subcellular relocation of the large subunit R1a upon UV-C irradiation

To extend our study to the cellular level, we analysed the subcellular localization of the R1a large subunit encoded by the *RNR1a* gene. An EGFP:R1a protein fusion was constitutively expressed in transgenic BY-2 cells. While the GFP:R1a fusion was only located in the cytoplasm of control mid-log phase cells (Fig. 6), it transiently accumulated in the nuclei of irradiated cells, 3 h following UV-C irradiation at 450 J/m², then returned to the cytoplasm at 4 and 5 h after irradiation. Interestingly, when cells were treated before irradiation by leptomycin B (L), an inhibitor of nuclear export, no cytoplasmic relocation of the GFP:R1a was observed in irradiated cells at 4 and 5 h after irradiation. In cells expressing GFP alone, fluorescence was both detected in cytoplasm and nucleus at all times, in conditions of cell growth or after cell irradiation. Consequently, regulation of the R1a large subunit in the UV-C response involved both an active cytoplasmic–nuclear and nuclear–cytoplasmic shuttling of the R1a subunit as well as a transcriptional induction of the encoded *RNR1a* gene mediated by E2F.

DISCUSSION

Complex regulated expression of the *RNR1a* gene

Our detailed analysis during cell cycle progression revealed a complex expression pattern of the *RNR1a* gene that belongs to

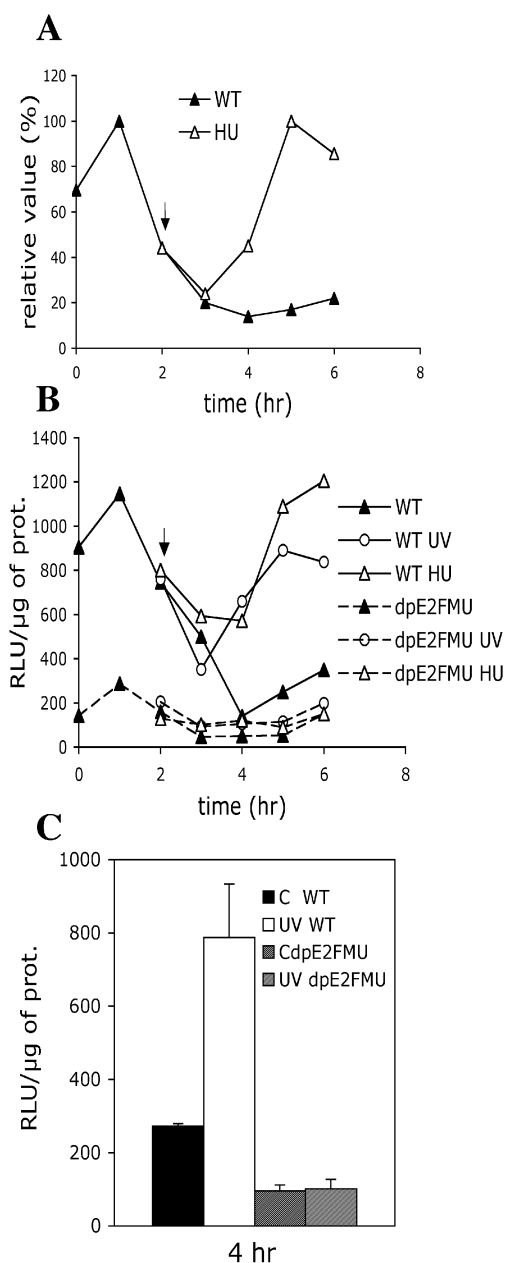


Figure 5. *RNR1a* transcript levels and promoter activity in response to a replication block or UV-C irradiation during S phase. (A) Kinetics of *RNR1a* transcript accumulation in synchronized tobacco cells following a replication block in mid-S phase. Synchronized cells were treated with HU (60 mM) 2 h after removal of aphidicolin (arrow). RNA samples from control (filled triangles) or treated cells (open triangles) were hybridized to the 3' specific probe of the *RNR1a* cDNA. Signals were standardized using the constitutively expressed *EF1 α* gene. The plotted values are relative to the maximal level obtained in the control. (B) The activity of the WT (solid line) or dpE2FMU (broken line) promoter constructs was evaluated in the synchronized BY-2 transgenic cells following a replication block in mid-S phase. Two hours after removal of aphidicolin (see arrow), cells were either treated with HU (60 mM) or UV-C (450 J/m²). LUC activity was measured in the control cells (filled triangles) and in HU (open triangles) or UV (open circles) treated cells. Results were reproducible in three individual experiments. (C) LUC activity was measured in G₁-arrested BY-2 cells (stationary phase cells). Transgenic lines carried the WT (non-hatched bars) or dpE2FMU (hatched bars) promoter constructs. Transgenic cells with the WT (empty bars) or dpE2FMU constructs (fine hatched bars) were taken at 4 h following UV-C irradiation at 450 J/m². In parallel, control non-irradiated cells harbouring the WT (black bars) or dpE2FMU constructs (large hatched bars) were analysed. Results were reproducible in three individual experiments; error bars are indicated.

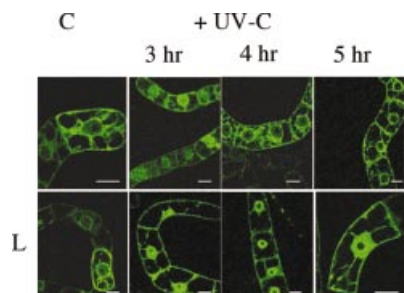


Figure 6. Transient subcellular localization of a constitutively expressed EGFP-R1a fusion upon UV-C irradiation. The EGFP:R1a fusion protein was stably expressed in transgenic BY-2 cells under the control of a 35S promoter. Fluorescence was observed in non-irradiated cells (C) or in cells at 3, 4 and 5 h following UV-C irradiation (450 J/m²). LMB (L) was added overnight (0.1 μM) before cell irradiation. These photographs are representatives of four individual experiments. Bar = 10 μm.

the small multigenic *RNR1* family in tobacco. While expression of the *RNR1b* gene was restricted to S phase (11), expression of the *RNR1a* gene was detected in both G₂ and S phases, with a higher level in S phase (Fig. 3B). This result is in agreement with the complex expression pattern of the *RNR* genes deduced from the transcriptome analysis of synchronized BY-2 cells (40). Thus, *RNR1a* gene induction before mitosis may either correspond to dNTPs synthesis for urgent DNA repair or to another RNR function, such as an activator of microtubule nucleation, as described in *Xenopus* (41).

RNR1a promoter sequence analysis (Fig. 1) revealed the presence of a composite E2F/CDE element similar to those previously described in the tobacco RNR2 and PCNA promoter sequences (12,42). The potential SAR sequences present in the distal part of the promoter might correspond to an enhancer element that increased overall activity of the promoter during the cell cycle without affecting the induction level at the G₁/S transition of the cell cycle. MAR sequences were found to act as enhancers in various tobacco genes, such as the chitinase or phaseolin genes (43,44).

Two E2F sites control cell cycle-regulated transcription of the *RNR1a* gene

Our results emphasize the important role played by the E2F elements in regulating *RNR1a* gene expression during the cell cycle. In the gel shift assays (Fig. 2), both dE2F/CDE and pE2F elements interact with specific nuclear complexes in mid-log phase cells and can bind with the purified tobacco E2F factor. Therefore, both E2F elements of the RNR1a promoter may be regulated through binding of E2F factors since cross-reacting antibody directed against the human E2F5 DBD partly prevents formation of the specific complexes. When mutated in its E2F elements, RNR1a promoter activity was considerably reduced at the entry of S phase compared with the wild-type promoter activity (Fig. 3C). That suggests that both E2F elements are important for driving S phase induction of the RNR1a promoter, as was observed for the RNR2, RNR1b promoters (11,12). Nevertheless, we cannot exclude that other *cis*-elements present on the RNR1a promoter might act as positive regulators in E2F-mediated regulation. Indeed, a telo box is found next to E2F sites in promoters of other tobacco and *Arabidopsis* genes, such as *PCNA*, *DHFR* and

RNR (45), that are similarly induced at the G₁/S transition; this raises the possibility that the telo box might be involved in a common regulation pathway in synergy with E2F for genes involved in DNA synthesis.

The diversity of the E2F family in plants (8,16) could reflect the complexity of expression regulation of various target genes. For instance, the six E2F proteins found in *Arabidopsis* can be classified as activators or repressors of gene expression, with repression being achieved by the DEL members without the need of DPs (7,13). Analysis of the specific E2F complexes associated with the E2F elements of the RNR1a promoter should give further insight in the mode of action of the various plant E2F factors in concert with specific co-regulators.

E2F-mediated transcriptional induction of the *RNR1a* gene and subcellular relocalization of the R1a protein upon UV-C irradiation

The more interesting feature is the E2F-mediated transcriptional induction of the *RNR1a* gene in the UV-C response.

Four hours after cell irradiation, RNR1a promoter activity was shown to be induced in mid-log phase cells (Fig. 4A) as well as in non-growing cells. Similar data had already been reported for yeast and mouse RNR induction in response to DNA damage by UV light (46,47). In BY-2 cells, only the auxin-regulated *arcA3* gene has been reported to be induced by UV-C, at 4 h after irradiation of the cells (38).

Mutation of both E2F elements resulted in a decreased RNR1a promoter activity in growing cells, but increased activity was no more observed in response to UV-C irradiation, thus demonstrating the importance of E2F elements in inducing the *RNR1a* gene upon UV-C irradiation. In addition, RNR genes were recently shown to be induced upon genotoxic stress in *Arabidopsis* (48), underlining that RNR induction is mediated through different DNA damaging agents.

In synchronized cells, RNR1a promoter activity was considerably induced in S phase in the presence of DNA replication blocking agents like HU or by UV-C irradiation. Enhanced promoter activity might overcome the S phase block and/or provide the dNTP pool for efficient DNA repair, as it was previously described for *RNR* genes in yeast (46). Such induction may be related to the ATR pathway, described in mammals to be involved in the S phase checkpoint (49). As E2F factors are important in mediating RNR induction in the DNA damage response, they could act as downstream signals of the ATR-DNA damage regulatory network. Specific complexes are involved in *RNR* induction DNA damage in yeast and mammals. Indeed, DNA damage responsive elements present in yeast RNR promoters are activated through derepression of CRT1 complexes (50,51), whereas the *RNR2p53* gene expression is induced via the p53 pathway in mammals (24). It will be interesting to characterize the specific E2F complexes involved in the DNA repair response in plants. In addition, the RNR1a induction upon UV-C irradiation observed in G₁-arrested cells (i.e. stationary cells) 4 h after irradiation, demonstrates that the *RNR1a* gene can be induced outside S phase by UV-induced DNA damage.

Upon UV-C treatment of the cells, we observed accumulation of an E2F factor with an apparent molecular weight of 60 kDa (Fig. 4B). This E2F factor increase could result from transcriptional induction and/or stabilization of an activator

E2F factor, as described for the *Arabidopsis* E2Fa factor upon DNA damage (48). E2F factor increase was also described in mammals where E2F1 factor was stabilized by phosphorylation in the DNA damage response (52). Upon UV irradiation, the R1a subunit is transiently translocated from cytoplasm to nucleus and may act as a signal for transcriptional induction of the *RNR1a* gene. Active shuttling of the R1a subunit between the two cellular compartments might involve potential nuclear localization and nuclear export signals identified on the protein, however, functional experiments are needed to show their implication in the R1a shuttling. Upon irradiation, R2 subunit relocated to the cytoplasm where R1 resided in yeast (53), whereas both R1 and R2p53 were shown to translocate from cytoplasm to nucleus in mammals (54). Therefore, the RNR response to UV-C in plants appears to be intermediate between that of mammals and yeast. The recent discovery of the equivalent of a human ATM pathway in plants (55) suggests that similar signalling exists between human and plants, though no p53 or Chk2 factors have been identified through the complete genome sequencing of *Arabidopsis* (56). In conclusion, these are the first results demonstrating the implication of E2F elements in specific *RNR1a* gene induction upon UV-C irradiation in plants as well as transient R1a protein shuttling from cytoplasm to nucleus and nucleus to cytoplasm.

Further investigations are required to determine whether the R1a subunit could directly associate with damaged DNA or be part of transcriptional complexes for *RNR1a* gene induction upon DNA damage. Since *RNR1a* and *RNR1b* genes showed different responses when DNA replication was blocked in S phase (11), they probably are controlled by different regulatory pathways (ATM or ATR) involving specific downstream effectors. Connection of E2F factors to these pathways will need further analyses.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr L. Mankin for supplying the LUC-int vector, Calgene for providing the PCGN vector and Dr M. Sekine and Dr D. Inze for their kind gift of purified tobacco E2F factor and pK7WGF2 binary vector, respectively. We also thank G. Vetter for helpful discussion. We thank B. Clément, M. Messmer and J. Betou for technical help. We are grateful to Dr P. Pfeiffer for critical reading of the manuscript. This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université Louis Pasteur (Strasbourg). The Inter-Institute Zeiss LSM510 confocal microscopy platform was cofinanced by the CNRS, Université Louis Pasteur, the Région Alsace, the Association de la Recherche sur le Cancer, and the Ligue Nationale contre le Cancer.

REFERENCES

- Muller, H., Bracken, A.P., Vernell, R., Moroni, M.C., Christians, F., Grassilli, E., Prosperini, E., Vigo, E., Oliner, J.D. and Helin, K. (2001) E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation and apoptosis. *Genes Dev.*, **15**, 267–285.
- Dyson, N. (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.*, **12**, 2245–2262.
- Trimarchi, J.M., Fairchild, B., Wen, J. and Lees, J.A. (2001) The E2F6 transcription factor is a component of the mammalian Bmi1-containing polycomb complex. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 1519–1524.
- de Bruin, A., Maiti, B., Jakoi, L., Timmers, C., Buerki, R. and Leone, G. (2003) Identification and characterization of E2F7, a novel mammalian E2F family member capable of blocking cellular proliferation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 42041–42049.
- Takahashi, Y., Rayman, J.B. and Dynlacht, B.D. (2000) Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families *in vivo*: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.*, **14**, 804–816.
- Ren, B., Cam, H., Takahashi, Y., Volkert, T., Terragni, J., Young, R.A. and Dynlacht, B.D. (2002) E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev.*, **16**, 245–256.
- 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.
- Vandepoole, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S. and Inze, D. (2002) Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **14**, 903–916.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y. (2002) Interaction of the *Arabidopsis* E2F and DP proteins confers their concomitant nuclear translocation and transactivation. *Plant Physiol.*, **128**, 833–843.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y. (2002) E2Ls, E2F-like repressors of *Arabidopsis* that bind to E2F sites in a monomeric form. *J. Biol. Chem.*, **277**, 16553–16558.
- Chabouté, M.E., Clément, B. and Philipps, G. (2002) S phase and meristem-specific expression of the tobacco RNR1b gene is mediated by an E2F element located in the 5' leader sequence. *J. Biol. Chem.*, **277**, 17845–17851.
- Chabouté, M.E., Clément, B., Sekine, M., Philipps, G. and Chaubet-Gigot, N. (2000) Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *Plant Cell*, **12**, 1987–2000.
- Kosugi, S. and Ohashi, Y. (2002) E2F sites that can interact with E2F proteins cloned from rice are required for meristematic tissue-specific expression of rice and tobacco proliferating cell nuclear antigen promoters. *Plant J.*, **29**, 45–59.
- Egelkrout, E.M., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L. (2001) Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell*, **13**, 1437–1452.
- Ramirez-Parra, E., Frundt, C. and Gutierrez, C. (2003) A genome-wide identification of E2F-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant J.*, **33**, 801–811.
- Gutierrez, C., Ramirez-Parra, E., Castellano, M.M. and del Pozo, J.C. (2002) G(1) to S transition: more than a cell cycle engine switch. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **5**, 480–486.
- Elledge, S.J., Zhou, Z., Allen, J.B. and Navas, T.A. (1993) DNA damage and cell cycle regulation of ribonucleotide reductase. *Bioessays*, **15**, 333–339.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643–649.
- Elledge, S.J., Zhou, Z. and Allen, J.B. (1992) Ribonucleotide reductase: regulation, regulation, regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 119–123.
- Chabes, A. and Thelander, L. (2000) Controlled protein degradation regulates ribonucleotide reductase activity in proliferating mammalian cells during the normal cell cycle and in response to DNA damage and replication blocks. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17747–17753.
- Thelander, L. and Reichard, P. (1979) Reduction of ribonucleotides. *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 133–158.
- Zhao, X., Muller, E.G. and Rothstein, R. (1998) A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol. Cell*, **2**, 329–340.
- Zhao, X., Chabes, A., Domkin, V., Thelander, L. and Rothstein, R. (2001) The ribonucleotide reductase inhibitor Sml1 is a new target of the Mec1/Rad53 kinase cascade during growth and in response to DNA damage. *EMBO J.*, **20**, 3544–3553.
- Tanaka, H., Arakawa, H., Yamaguchi, T., Shiraishi, K., Fukuda, S., Matsui, K., Takei, Y. and Nakamura, Y. (2000) A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage. *Nature*, **404**, 42–49.

25. Nagata, T., Nemoto, Y. and Hazezawa, S. (1992) Tobacco BY2 cell line as the 'Hela' cell in the cell biology of higher plants. *Int. Rev. Cytol.*, **132**, 1–30.
26. Reichheld, J.P., Sonobe, S., Clément, B., Chaubet, N. and Gigot, C. (1995) Cell cycle-regulated histone gene expression in synchronized plant cells. *Plant J.*, **7**, 245–252.
27. Mankin, S.L., Allen, G.C. and Thompson, W.F. (1997) Introduction of a plant intron into the luciferase gene of *Photinus pyralis*. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **15**, 186–196.
28. An, G. (1987) Binary Ti vectors for plant transformation and promoter analysis. *Methods Enzymol.*, **153**, 292–305.
29. Karimi, M., Inze, D. and Depicker, A. (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.*, **7**, 193–195.
30. Chabouté, M.E., Combettes, B., Clément, B., Gigot, C. and Philipps, G. (1998) Molecular characterization of tobacco ribonucleotide reductase RNR1 and RNR2 cDNAs and cell cycle-regulated expression in synchronized plant cells. *Plant Mol. Biol.*, **38**, 797–806.
31. Zwicker, J., Lucibello, F.C., Wolfraim, L.A., Gross, C., Truss, M., Engeland, K. and Müller, R. (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A, *cdc25C* and *cdc2* genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J.*, **14**, 4514–4522.
32. Regad, F., Lebas, M. and Lescure, B. (1994) Interstitial telomeric repeats within the *Arabidopsis thaliana* genome. *J. Mol. Biol.*, **239**, 163–169.
33. Manevski, A., Bertoni, G., Bardet, C., Tremousaygue, D. and Lescure, B. (2000) In synergy with various *cis*-acting elements, plant interstitial telomere motifs regulate gene expression in *Arabidopsis* root meristems. *FEBS Lett.*, **483**, 43–46.
34. Stracke, R., Werber, M. and Weisshaar, B. (2001) The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **4**, 447–456.
35. Gasser, S.M. and Laemmli, U.K. (1986) Cohabitation of scaffold binding regions with upstream/enhancer elements of three developmentally regulated genes of *D. melanogaster*. *Cell*, **46**, 521–530.
36. Ramirez-Parra, E. and Gutierrez, C. (2000) Characterization of wheat DP, a heterodimerization partner of the plant E2F transcription factor which stimulates E2F-DNA binding. *FEBS Lett.*, **486**, 73–78.
37. Li, A., Schuermann, D., Gallego, F., Kovalchuk, I. and Tinland, B. (2002) Repair of damaged DNA by *Arabidopsis* cell extract. *Plant Cell*, **14**, 263–273.
38. Perennes, C., Glab, N., Guglieni, B., Doutriaux, M.P., Phan, T.H., Planchais, S. and Bergounioux, C. (1999) Is arcA3 a possible mediator in the signal transduction pathway during agonist cell cycle arrest by salicylic acid and UV irradiation? *J. Cell Sci.*, **112**, 1181–1190.
39. Planchais, S., Glab, N., Trehin, C., Perennes, C., Bureau, J.M., Meijer, L. and Bergounioux, C. (1997) Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension. *Plant J.*, **12**, 191–202.
40. Breyné, P., Dreesen, R., Vandepoel, K., De Veylder, L., Van Breusegem, F., Callewaert, L., Rombauts, S., Raes, J., Cannoot, B., Engler, G. *et al.* (2002) Transcriptome analysis during cell division in plants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **99**, 14825–14830.
41. Takada, S., Shibata, T., Hiraoka, Y. and Masuda, H. (2000) Identification of ribonucleotide reductase protein R1 as an activator of microtubule nucleation in *Xenopus* egg mitotic extracts. *Mol. Biol. Cell*, **11**, 4173–4187.
42. Egelkrou, E.M., Mariconti, L., Settlege, S.B., Cella, R., Robertson, D. and Hanley-Bowdoin, L. (2002) Two E2F elements regulate the proliferating cell nuclear antigen promoter differently during leaf development. *Plant Cell*, **14**, 3225–3236.
43. Fukuda, Y. and Nishikawa, S. (2003) Matrix attachment regions enhance transcription of a downstream transgene and the accessibility of its promoter region to micrococcal nuclease. *Plant Mol. Biol.*, **51**, 665–675.
44. van der Geest, A.H. and Hall, T.C. (1997) The beta-phaseolin 5' matrix attachment region acts as an enhancer facilitator. *Plant Mol. Biol.*, **33**, 553–557.
45. Tremousaygue, D., Garnier, L., Bardet, C., Dabos, P., Herve, C. and Lescure, B. (2003) Internal telomeric repeats and 'TCP domain' protein-binding sites co-operate to regulate gene expression in *Arabidopsis thaliana* cycling cells. *Plant J.*, **33**, 957–966.
46. Elledge, S.J. and Davis, R.W. (1989) DNA damage induction of ribonucleotide reductase. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 4932–4940.
47. Filatov, D., Bjorklund, S., Johansson, E. and Thelander, L. (1996) Induction of the mouse ribonucleotide reductase R1 and R2 genes in response to DNA damage by UV light. *J. Biol. Chem.*, **271**, 23698–23704.
48. Chen, I.P., Haehnel, U., Altschmied, L., Schubert, I. and Puchta, H. (2003) The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress—a high density colony array study (HDCA). *Plant J.*, **35**, 771–786.
49. Shiloh, Y. (2001) ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **11**, 71–77.
50. Huang, M., Zhou, Z. and Elledge, S.J. (1998) The DNA replication and damage checkpoint pathways induce transcription by inhibition of the Crt1 repressor. *Cell*, **94**, 595–605.
51. Li, B. and Reese, J.C. (2000) Derepression of DNA damage-regulated genes requires yeast TAF(II)s. *EMBO J.*, **19**, 4091–4100.
52. Hofferer, M., Wirbelauer, C., Humar, B. and Krek, W. (1999) Increased levels of E2F-1-dependent DNA binding activity after UV- or gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 491–495.
53. Yao, R., Zhang, Z., An, X., Bucci, B., Perlstein, D.L., Stubbe, J. and Huang, M. (2003) Subcellular localization of yeast ribonucleotide reductase regulated by the DNA replication and damage checkpoint pathways. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **100**, 6628–6633.
54. Xue, L., Zhou, B., Liu, X., Qiu, W., Jin, Z. and Yen, Y. (2003) Wild-type p53 regulates human ribonucleotide reductase by protein–protein interaction with p53R2 as well as hRRM2 subunits. *Cancer Res.*, **63**, 980–986.
55. 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.
56. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **408**, 796–815.
57. Regad, F., Herve, C., Marinx, O., Bergounioux, C., Tremousaygue, D. and Lescure, B. (1995) The tef1 box, a ubiquitous *cis*-acting element involved in the activation of plant genes that are highly expressed in cycling cells. *Mol. Gen. Genet.*, **248**, 703–711.

Article 2

Genetic analysis of two Arabidopsis DNA polymerase epsilon subunits during early embryogenesis

Arnaud RONCERET, Jocelyne GUILLEMINOT, Frédéric LINCKER, Jose GADEA-VACAS, Valérie DELORME, Nicolas BECHTOLD, Georges PELLETIER, Michel DELSENY, Marie-Edith CHABOUTÉ et Martine DEVIC

Plant J. 2005 Oct;44(2):223-36

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

Genetic analysis of two Arabidopsis DNA polymerase epsilon subunits during early embryogenesis

Arnaud Ronceret, Jocelyne Guillemot, **Frédéric Lincker**, Jose Gadea-Vacas, Valérie Delorme, Nicole Bechtold, Georges Pelletier, Michel Delseny, Marie-Edith Chabouté et Martine Devic

The Plant Journal, 2005, Vol. 44, Pages 223–236

Pages 223 à 236 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur :
<http://www.blackwell-synergy.com/doi/full/10.1111/j.1365-313X.2005.02521.x?prevSearch=allfield%3A%28lincker%29>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

Article 3

E2F factors rate controls the dual role of CDE/E2F composite element: a model of E2F-regulated gene expression in plant development

Frédéric LINCKER, Guy HOULNÉ et Marie-Edith CHABOUTÉ

FEBS Lett. 2006 Oct 2;580(22):5167-71

[Signalement bibliographique ajouté par : ULP – SCD – Service des thèses électroniques]

E2F factors rate controls the dual role of CDE/E2F composite element: A model of E2F-regulated gene expression in plant development

Frédéric Lincker, Mélanie Messmer, Guy Houlné, Martine Devic et Marie-Edith Chabouté

FEBS Letters, 2006, Vol. 580, Pages 5167–5171

Pages 5167 à 5171 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Pour les utilisateurs ULP, il est possible de consulter cette publication sur le site de l'éditeur : <http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.067>

Il est également possible de consulter la thèse sous sa forme papier ou d'en faire une demande via le service de prêt entre bibliothèques (PEB), auprès du Service Commun de Documentation de l'ULP: peb.sciences@scd-ulp.u-strasbg.fr

