

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Science du Vivant

Spécialité : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

présentée

à la Faculté des Sciences de la Vie

par

**Eva DUMBLIAUSKAS**

pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université de Strasbourg

**Rôle du complexe CUL4-DDB1 dans le contrôle du développement embryonnaire chez *Arabidopsis thaliana***

Soutenue le 11 juin 2010 devant le jury composé de :

M. P. GENSCHIK	Directeur de Thèse
M. C. GUTIERREZ	Rapporteur Externe
Mme M. DEVIC	Rapporteur Externe
Prof. L. OTTEN	Rapporteur Interne
M. F. ROUDIER	Examineur
M. W.H. SHEN	Examineur

Unité de Recherche :

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP)

**UPR CNRS 2357**

ABREVIATIONS .....	1
--------------------	---

# Introduction

<b>1 LA PROTEOLYSE UBIQUITINE-DEPENDANTE .....</b>	<b>5</b>
1.1 L'UBIQUITINATION .....	5
1.1.1 L'ubiquitine .....	5
1.1.1.1 Fixation de l'ubiquitine .....	6
1.1.2 Les protéines « ubiquitin-like » .....	6
1.1.3 Les acteurs clés de l'ubiquitination : les enzymes .....	8
1.1.3.1 Les E1 : enzymes d'activation de l'ubiquitine .....	8
1.1.3.2 Les E2 : enzymes de conjugaison de l'ubiquitine .....	8
1.1.3.3 Les E3 : enzymes de liaison de l'ubiquitine .....	8
1.1.3.3.1 Les E3 ligases à domaine HECT .....	9
1.1.3.3.2 Les E3 ligases à domaine « RING finger » .....	9
1.1.3.3.2.1 Les E3 ligases SPRF .....	10
1.1.3.3.2.2 CRLs : Les E3 ligases à domaine « RING finger » multimériques .....	12
1.1.3.3.2.2.1 Le complexe SCF .....	12
1.1.3.3.2.2.2 Le complexe VBC .....	13
1.1.3.3.2.2.3 Le complexe APC (« Anaphase Promoting Complex ») ou Cyclosome .....	14
1.1.3.3.2.2.4 Le complexe CUL3-BTB .....	16
1.1.3.3.2.2.5 Le complexe CUL4-DDB1 .....	17
1.1.3.3.2.2.5.1 Le complexe CUL4-DDB1 et la réparation de l'ADN .....	19
1.1.3.3.2.2.5.2 Le complexe CUL4-DDB1 et le cycle cellulaire .....	21
1.1.3.3.2.2.5.3 Le complexe CUL4-DDB1 et la photomorphogenèse .....	22
1.2 REGULATION DE LA REACTION D'UBIQUITINATION .....	24
1.2.1 Régulation des acteurs clés de la voie de l'ubiquitination .....	24
1.2.2 Régulation par modification du substrat .....	25
1.2.3 Régulation par déubiquitination .....	26
1.3 LA DEGRADATION PAR LE PROTEASOME 26S .....	26
1.3.1 Structure du protéasome 26S .....	26
1.3.2 Les différentes étapes du mécanisme de dégradation par le 26S .....	27
<b>2 LA DIVISION CELLULAIRE ET LE DEVELOPPEMENT DES PLANTES .....</b>	<b>28</b>
2.1 CROISSANCE ET DIFFERENCIATION .....	28
2.2 LE CYCLE DE VIE DES PLANTES .....	29
2.3 LA GAMETOGENESE .....	30
2.3.1 La gamétogenèse femelle .....	30
2.3.2 La gamétogenèse mâle .....	30
2.4 LA DOUBLE FECONDATION ET L'EMBRYOGENESE .....	32
2.4.1 Le développement de l'embryon .....	32
2.4.2 Le développement de l'albumen .....	33
<b>3 LE CONFLIT PARENTAL DANS L'ALBUMEN .....</b>	<b>35</b>
3.1 L'EMPREINTE PARENTALE .....	36
3.1.1 Mécanisme moléculaire de l'empreinte parentale .....	36
3.1.2 Description et fonction des complexes Polycomb .....	37
3.1.2.1 L'empreinte paternelle du gène MEDEA .....	40
3.1.2.2 L'empreinte maternelle du gène PHERESI .....	41
<b>4 DESCRIPTION DU PROJET DE RECHERCHE .....</b>	<b>43</b>

# Résultats

<b>1 RESULTATS SOUMIS POUR PUBLICATION.....</b>	<b>45</b>
<b>2 RESULTATS NON SOUMIS POUR PUBLICATION.....</b>	<b>47</b>
2.1 CARACTERISATION MOLECULAIRE DES MUTANTS CUL4 ET DDB1 .....	47
2.2 CARACTERISATION GENETIQUE DES MUTANTS CUL4 ET DDB1 .....	48
2.3 LE COMPLEXE CUL4-DDB1 ET L'EMPREINTE PARENTALE .....	48
2.3.1 Effets de la mutation <i>cul4</i> sur l'empreinte parentale du gène <i>PHERES1</i> .....	49
2.3.2 Effets de la mutation <i>cul4</i> sur l'empreinte parentale du gène <i>MEDEA</i> .....	50
2.3.2.1 Obtention du profil d'expression des allèles parentaux de <i>MEDEA</i> par croisements directs avec différents mutants du complexe <i>CUL4-DDB1</i> .....	50
2.3.2.2 Obtention du profil d'expression de l'allèle paternel de <i>MEDEA</i> en utilisant la lignée rapportrice <i>pMEA::MEA-YFP</i> .....	51
2.4 PROFIL D'EXPRESSION DE <i>MSI1</i> DANS LE MUTANT HYPOMORPHE <i>CUL4-1</i> .....	53

# Discussion

1.1 <i>MSI1</i> EST UN CANDIDAT POTENTIEL POUR FORMER LE MODULE DE RECONNAISSANCE D'UN COMPLEXE <i>CUL4</i> CONTROLANT LE DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE .....	54
1.2 <i>MSI1</i> , UNE PROTEINE A MOTIF DWD, INTERAGIT AVEC <i>DDB1A</i> POUR FORMER LE COMPLEXE <i>CUL4-DDB1A-MSI1</i> .....	56
1.3 LE COMPLEXE <i>CUL4-DDB1A-MSI1</i> N'EST PAS IMPLIQUE DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE <i>PHERES</i> .....	56
1.4 LE COMPLEXE <i>CUL4-DDB1A-MSI1</i> SERAIT IMPLIQUE DANS LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE <i>MEDEA</i> .....	57
1.5 <i>MSI1</i> : ADAPTATEUR OU SUBSTRAT ? .....	59

# Matériel et Méthode

<b>1 MATERIEL.....</b>	<b>61</b>
1.1 MATERIEL VEGETAL .....	61
1.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> sauvage .....	61
1.1.2 <i>Arabidopsis thaliana</i> mutantes.....	61
1.1.2.1 Les mutants alléliques <i>cul4</i> .....	61
1.1.2.2 Les mutants <i>ddb1</i> .....	62
1.1.3 Autres lignées <i>Arabidopsis thaliana</i> transgéniques .....	62
1.2 BACTERIES (INVITROGEN) .....	63
1.2.1 <i>Escherichia coli</i> , souche <i>TOP10</i> .....	63
1.2.2 <i>Escherichia coli</i> , souche <i>BL21(AI)</i> .....	63
1.2.3 <i>Escherichia coli</i> , souche <i>BL21(DE3) pLysS</i> .....	63
1.3 LA LEVURE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> , SOUCHE <i>AH109</i> (CLONTECH).....	63
1.4 LES VECTEURS DE CLONAGE .....	64
1.4.1 <i>pGEM-T (Promega)</i> .....	64
1.4.2 Le <i>pDONR207 (Invitrogen)</i> .....	64
1.4.2.1 Le plasmide <i>pENT-MSI1</i> .....	64
1.5 LES VECTEURS D'EXPRESSION .....	65
1.5.1 Les vecteurs d'expression bactériens .....	65

1.5.1.1	pDEST15 (Invitrogen).....	65
1.5.1.2	pGEX-4T-1 (GE Healthcare).....	65
1.5.2	Les vecteurs d'expression dans <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	65
1.5.2.1	pGAD424gate.....	65
1.5.2.2	pGADT7 Gateway.....	65
1.5.2.3	pGBT9gate .....	66
1.5.3	Les vecteurs d'expression transitoires dans les plantes.....	66
1.5.3.1	Les vecteurs pMAV-YN, pMAV-YC et 35S-CPRF2-CFP .....	66
1.6	L'ANTICORPS ANTI-CUL4 .....	66
<b>2</b>	<b>METHODES .....</b>	<b>67</b>
2.1	TECHNIQUES RELATIVES AUX PLANTES.....	67
2.1.1	Culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	67
2.1.2	Analyse des extraits d'ADN d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	67
2.1.2.1	Le génotypage par PCR.....	67
2.1.2.1.1	Extraction d'ADN génomique .....	67
2.1.2.1.2	La PCR (« Polymerase Chain Reaction »).....	68
2.1.2.2	« Southern Blot ».....	68
2.1.2.2.1	Extraction rapide d'ADN génomique.....	68
2.1.2.2.2	Digestion, séparation et transfert des fragments d'ADN.....	69
2.1.2.2.3	Synthèse de sonde froide (DIG), hybridation et détection.....	70
2.1.3	Analyse des extraits d'ARN d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	70
2.1.3.1	« Northern Blot ».....	70
2.1.3.1.1	Extraction des ARN végétaux totaux .....	70
2.1.3.1.2	Séparation et transfert des ARN totaux .....	71
2.1.3.1.3	Synthèse de sonde froide (DIG), hybridation et détection.....	71
2.1.3.2	RT-PCR .....	71
2.1.3.2.1	La RT-PCR allèle-spécifique.....	71
2.1.3.2.2	La qRT-PCR .....	72
2.1.4	Analyse des extraits protéiques d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	73
2.1.4.1	« Western Blot ».....	73
2.1.4.1.1	Extraction des protéines totales végétales.....	73
2.1.4.1.2	Séparation et détection des protéines en SDS-PAGE.....	73
2.1.4.2	Co-Immunoprécipitation .....	74
2.1.5	Techniques d'analyses microscopiques.....	75
2.1.5.1	Analyse des embryons des mutants alléliques <i>cul4</i> par Nomarsky.....	75
2.1.5.2	Analyse des croisements par microscopie confocale.....	75
2.1.5.3	Coloration GUS ( $\beta$ -glucuronidase).....	75
2.1.5.4	BiFC (« Bimolecular Fluorescence Complementation ») .....	76
2.2	TECHNIQUES RELATIVES AUX BACTERIES .....	77
2.2.1	Préparation de bactéries compétentes .....	77
2.2.2	Transformation des bactéries par choc thermique.....	77
2.2.3	Analyse des clones bactériens .....	77
2.2.4	Mise en évidence d'interactions protéiques par « GST-Pull down » .....	78
2.2.4.1	Extraction des protéines de fusion GST exprimées dans <i>E. coli</i> .....	78
2.2.4.2	Purification des protéines de fusion GST.....	79
2.2.4.3	Transcription-Traduction in vitro .....	79
2.2.4.4	L'expérience de « Pull down » .....	79
2.3	TECHNIQUES RELATIVES AUX LEVURES .....	80
2.3.1	Transformation des levures par l'acétate de lithium.....	80
2.3.2	Test d'interaction en « double hybride ».....	80
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>82</b>

# Abréviations

<b>ACC</b>	1-AminoCyclopropane-1-Carboxylic acid
<b>ACS</b>	<b>ACC</b> Synthase
<b>ADN</b>	Acide <b>Dé</b> soxyribo-Nucléique
<b>ADN-T</b>	<b>ADN</b> -Transfer
<b>AG</b>	<b>AGAMOUS</b>
<b>AP</b>	<b>Phosphatase</b> Alcaline
<b>APC</b>	Anaphase <b>Promoting</b> Complex
<b>ARF</b>	Auxin <b>R</b> esponse <b>F</b> actor
<b>Arg</b>	<b>Arginine</b>
<b>ARN</b>	Acide <b>R</b> ibo-Nucléique
<b>ASK</b>	<i>Arabidopsis</i> <b>SKP1</b> like proteins
<b>ATP</b>	Adénosine <b>T</b> ri- <b>P</b> hosphate
<b>BET</b>	<b>Bromure</b> d' <b>E</b> thydium
<b>BiFC</b>	<b>Bimolecular</b> <b>F</b> luorescence <b>C</b> omplementation
<b>BSA</b>	Albumine de <b>S</b> érum <b>B</b> ovin
<b>BTB</b>	<b>Bric à Brac</b> , <b>T</b> ramtrack and <b>Broad</b>
°C	degré <b>C</b> elsius
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	<b>Calcium</b> <b>C</b> hloride
<b>CAF</b>	<b>Chromatin</b> <b>A</b> ssembly <b>F</b> actor
<b>CDC</b>	<b>Cell</b> <b>D</b> ependent <b>C</b> ycle
<b>CDD</b>	<b>COP10</b> , <b>DDB1A</b> et <b>DET1</b>
<b>CDH</b>	<i>Cerevisiae</i> <b>Dim1</b> <b>H</b> omologue
<b>CDK</b>	Cycline- <b>D</b> ependent <b>K</b> inase
<b>CDT</b>	<b>Cdc10</b> - <b>D</b> ependent <b>T</b> ranscript
<b>CFP</b>	<b>Cyan</b> <b>F</b> luorescent <b>P</b> rotein
<b>CLF</b>	<b>CURLY</b> <b>LEAF</b>
<b>COP</b>	<b>CO</b> nstitutive <b>P</b> hotomorphogenesis
<b>CP</b>	<b>Core</b> <b>P</b> article
<b>CRL</b>	<b>Cullin</b> - <b>R</b> ing <b>E3</b> <b>L</b> igase
<b>CSA</b>	<b>Cockayne</b> syndrome <b>A</b>
<b>CSB</b>	<b>Cockayne</b> syndrome <b>B</b>
<b>CSN</b>	<b>COP9</b> signalosome
<b>C-ter</b>	<b>Carboxy</b> - <b>terminal</b>
<b>CZE</b>	<b>ChalaZal</b> <b>E</b> ndosperm
<b>DAP</b>	<b>Day(s)</b> <b>A</b> fter <b>P</b> ollination
<b>DCAF</b>	<b>DDB1</b> - <b>CUL4</b> - <b>A</b> ssociated <b>F</b> actors
<b>DDB</b>	<b>Damaged</b> <b>DNA</b> <b>B</b> inding protein
<b>DDM</b>	<b>Decrease</b> in <b>DNA</b> <b>M</b> ethylation
<b>DIC</b>	<b>Differential</b> <b>I</b> nterference <b>C</b> ontrast
<b>DIG</b>	<b>DIG</b> oxynine
<b>DME</b>	<b>DEMETER</b>

<b>DNMT</b>	<b>DNA MethylTransferase</b>
<b>dNTP</b>	<b>désoxyriboNucléotide TriPhosphate</b>
<b>DO</b>	<b>Densité Optique</b>
<b>DTT</b>	<b>DiThioThreitol</b>
<b>DUB</b>	<b>DeUbiquitin</b>
<b>DWD</b>	<b>DDB1-binding WD40</b>
<b>EBF</b>	<b>Ethylene Response Factor</b>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	acide <b>Ethylène Diamine Tétra Acétique</b>
<b>ELISA</b>	<b>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</b>
<b>EMI</b>	<b>Early Mitotic Inhibitor</b>
<b>EMF2</b>	<b>EMBRYONIC FLOWER2</b>
<b>ESC</b>	<b>Extra Sex Combs</b>
<b>ETO</b>	<b>EThylene Overproducer</b>
<b>E(z)</b>	<b>Enhancer of zeste</b>
<b>FIE</b>	<b>Fertilization Independent Endosperm</b>
<b>FIS</b>	<b>Fertilization Independent Seed</b>
<b>FLC</b>	<b>FLOWERING LOCUS C</b>
<b>FWA</b>	<b>Flowering WAgeningen</b>
<b>g</b>	<b>gramme(s)</b>
<b>GGR</b>	<b>Global Genome Repair</b>
<b>GST</b>	<b>Glutathion-S-Transferase</b>
<b>GUS</b>	<b>GlucUronic acide (X-Gluc) as a chromogenic Substrate</b>
<b>h</b>	<b>heure(s)</b>
<b>HECT</b>	<b>Homologous to E6-AP Carboxyl Terminus</b>
<b>HEPES</b>	acide 4-(2- <b>hydroxyéthyl</b> ) -1- <b>pipérazine éthane sulfonique</b>
<b>HFR1</b>	long <b>Hypocotyl</b> in <b>Far-Red 1</b>
<b>HIF<math>\alpha</math></b>	<b>Hypoxia Inducible Factor <math>\alpha</math></b>
<b>His</b>	<b>Histidine</b>
<b>HY5</b>	elongated <b>HYpocotyl 5</b>
<b>HYH</b>	<b>HY5 Homologue</b>
<b>IPTG</b>	<b>IsoPropyl <math>\beta</math>-D-1-ThioGalactopyranoside</b>
<b>KRP</b>	<b>Kip Related Protein</b>
<b>LAF1</b>	<b>Long After Far-Red</b>
<b>LB</b>	<b>Lysogeny Broth (ou Luria-Bertani)</b>
<b>LiAc</b>	<b>Acétate de Lithium</b>
<b>LRR</b>	<b>Leucine Rich Repeat</b>
<b>-L/W/H/A</b>	<b>- Leucine/Tryptophane/Histidine/Adénine</b>
<b>Lys</b>	<b>Lysine</b>
<b>M</b>	<b>Molaire</b>
<b>MADS</b>	<i><b>MCM-Agamous-Deficiens-SRF</b></i>
<b>MATH</b>	<b>MepriN And Traff Homology</b>
<b>MCE</b>	<b>MiCropillar Endosperm</b>

<b>MCM</b>	<b>MiniChromosome Maintenance</b> protein complex
<b>MDa</b>	<b>Mega Dalton</b>
<b>MDM2</b>	<b>Murine Double Minute 2</b>
<b>MDMX</b>	<b>MDM2</b> related protein
<b>MEI1</b>	<b>MEI</b> ose 1
<b>MEL26</b>	<b>Maternal Effect Lethality</b>
<b>MET</b>	<b>ME</b> thyl <b>T</b> ranferase
<b>min</b>	<b>minute(s)</b>
<b>MSI</b>	<b>Multicopy Supressor of IRA1</b>
<b>NaOH</b>	Hydroxyde de Sodium
<b>NEDD</b>	<b>Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down-regulated</b>
<b>NER</b>	<b>Nucleotid Excision Repair</b>
<b>N-ter</b>	<b>N-terminal</b>
<b>pB</b>	<b>paire de Bases</b>
<b>PcG</b>	<b>Polycomb Groupe</b>
<b>PCNA</b>	<b>Proliferation Cellular Nuclear Antigen</b>
<b>PEG</b>	<b>PolyEthylène Glycol</b>
<b>PEN</b>	<b>Peripheral ENdosperm</b>
<b>PHD</b>	<b>Plant Homeo Domain</b>
<b>Phe</b>	<b>Phenylalanine</b>
<b>PLK</b>	<b>Polo-Like Kinase</b>
<b>PM</b>	<b>Pollen Mitosis</b>
<b>PRC</b>	<b>Polycomb Repressive Complex</b>
<b>PRE</b>	<b>PcG response elements</b>
<b>p/v</b>	<b>poids/volume</b>
<b>PVDF</b>	<b>PolyFluorure De Vinylidène</b>
<b>RBX</b>	<b>Ring BoX</b>
<b>RFP</b>	<b>Red Fluorescent Protein</b>
<b>RB</b>	<b>RetinoBlastoma</b>
<b>RBR</b>	<b>RB-Related</b>
<b>RING</b>	<b>Really Interesting New Gene</b>
<b>RP</b>	<b>Regulatory Particle</b>
<b>RPN</b>	<b>Regulatory Particle, Non-ATPase</b>
<b>RT</b>	<b>Rétro-Transcription</b>
<b>RT-PCR</b>	<b>Real Time Polymerase Chain Reaction</b>
<b>RUB</b>	<b>Related UBiquitin like</b>
<b>s</b>	<b>seconde(s)</b>
<b>SDS</b>	<b>DodécylSulfate de Sodium</b>
<b>SDS-PAGE</b>	<b>SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</b>
<b>SIC</b>	<b>Stoichiometric Inhibitor of Cdk1/CyclinB</b>
<b>SKP</b>	<b>S-phase Kinase-associated Protein</b>
<b>SOCS</b>	<b>Suppressor Of Cytokine Signalling protein</b>
<b>SPA</b>	<b>Suppressor of PhyA</b>

<b>SSC</b>	<b>Sodium-Chloride Sodium Citrate</b>
<b>STM</b>	<b>SHOOTMERISTEMLESS</b>
<b>Su(z)</b>	<b>Suppressor of zeste</b>
<b>SWN</b>	<b>SWINGER</b>
<b>TAE</b>	<b>Tris-Acétate-EDTA</b>
<b>TBS</b>	<b>Tris Buffered Saline</b>
<b>T-TBS</b>	<b>Triton - TBS</b>
<b>TCR</b>	<b>Transcription Coupled Repair</b>
<b>TE</b>	<b>Tris-EDTA</b>
<b>TIR1</b>	<b>Transport Inhibitor Resistant</b>
<b>TPR</b>	<b>TetratricoPeptide Repeats</b>
<b>Trp</b>	<b>Tryptophane</b>
<b>Tyr</b>	<b>Tyrosine</b>
<b>Ub</b>	<b>Ubiquitine</b>
<b>UBA</b>	<b>UBiquitin Activating enzyme</b>
<b>Ubc</b>	<b>Ubiquitin-conjugating</b>
<b>UBP</b>	<b>Ubiquitin-specific Processing enzymes</b>
<b>UCH</b>	<b>Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase</b>
<b>UV</b>	<b>Ultra Violet</b>
<b>v/v</b>	<b>volume à volume</b>
<b>VEL</b>	<b>VELvet</b>
<b>VHL</b>	<b>Von Hippel Linau</b>
<b>VIN</b>	<b>VERNALIZATION INSENSITIVE</b>
<b>VRN</b>	<b>VERNALIZATION</b>
<b>XP</b>	<b>Xeroderma Pigmentosum</b>
<b>XPC</b>	<b>Xeroderma Pigmentosum complementation group C</b>
<b>YFP</b>	<b>Yellow Fluorescent Protein</b>
<b>YPD</b>	<b>Yeast extract-Peptone-Dextrose</b>



# Introduction

# 1 La protéolyse ubiquitine-dépendante

La régulation de la stabilité des protéines via la protéolyse ubiquitine-dépendante est considérée comme un mécanisme majeur qui contrôle la plupart des processus cellulaires chez les eucaryotes. Ce système de régulation fait intervenir de nombreux acteurs et peut être divisé en plusieurs étapes.

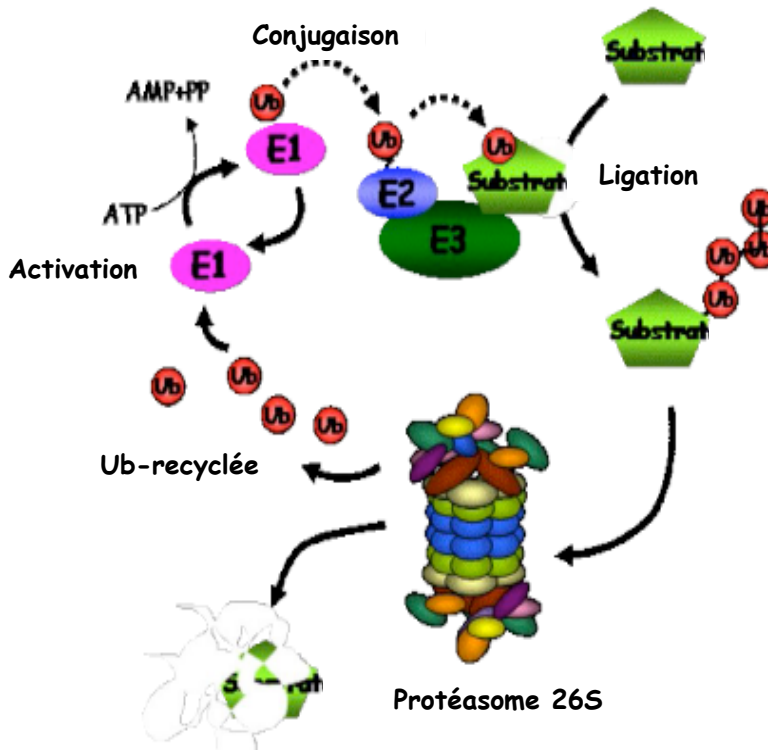
## 1.1 L'ubiquitination

L'ubiquitination d'une protéine est une réaction en cascade aboutissant à la fixation d'une petite protéine, l'ubiquitine, sur une protéine cible : le substrat. La conjugaison de l'ubiquitine au substrat se fait en trois étapes successives, faisant intervenir l'activité de trois types d'enzymes. Dans un premier temps, l'enzyme d'activation (E1) prend en charge l'ubiquitine libre et la transfère sur une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2). L'ubiquitine activée est ensuite liée au substrat par l'intermédiaire d'une enzyme de liaison de l'ubiquitine ou E3. Les protéines cibles sont ainsi modifiées par une chaîne d'au moins 4 résidus d'ubiquitine et dirigées vers le protéasome 26S, siège de leur dégradation. L'ubiquitine est alors libérée pour entrer dans un nouveau cycle d'ubiquitination (**Fig 1**) (Hershko et Ciechanover 1992, 1998, Kornitzer et Ciechanover 2000, Weissmann 2001, Smalle et Vierstra 2004).

### 1.1.1 L'ubiquitine

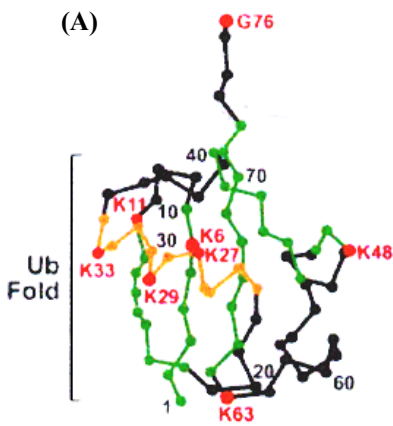
L'ubiquitine est une protéine « ubiquitaire », c'est à dire retrouvée chez toutes les espèces eucaryotes étudiées à ce jour. Elle fut découverte par Goldstein, en 1975 comme étant une hormone peptidique (Goldstein et al. 1975). En 1978, lors d'expériences effectuées sur des réticulocytes de lapin, Ciechanover et Hershko mirent en évidence un polypeptide de 76 acides aminés impliqué dans un système de dégradation des protéines ATP-dépendant. En 1980, l'équipe de Wilkinson identifia ce peptide comme étant de l'ubiquitine (Wilkinson et al. 1980).

L'ubiquitine est synthétisée sous forme de précurseur, soit en fusion avec une protéine ribosomale, soit sous forme de polyubiquitine. Dans tous les cas, le produit de la traduction subit une maturation pour donner de l'ubiquitine libre (Callis et al. 1995). La structure protéique ainsi que la séquence en acides aminés de l'ubiquitine restent très conservées d'une espèce à l'autre (Hershko et Chiechanover 1992). Seuls trois résidus diffèrent entre la séquence de la levure et celle de l'homme. Elle possède une structure globulaire, appelée « Ub-fold », où logent 5 feuillets  $\beta$  et une hélice  $\alpha$  (**Fig 2**). De nombreuses liaisons hydrogènes confèrent également une forte stabilité à l'ubiquitine, la protégeant de la protéolyse et



**Fig 1 : Mécanisme de la protéolyse ubiquitine-dépendante**

L'ubiquitine (Ub) est activée de manière ATP-dépendante par l'enzyme activatrice E1 puis transférée à une enzyme de conjugaison E2. La protéine E3 ligase intervient dans la reconnaissance spécifique des substrats. Une chaîne de poly-ubiquitine est alors générée sur les résidus Lysine des substrats. Les cibles ainsi modifiées sont reconnues par le protéasome 26S et dégradées en peptides de petite taille. Avant la dégradation, l'ubiquitine est recyclée pour entrer dans un nouveau cycle d'ubiquitination.



**Fig 2 : Structure 3D de l'Ubiquitine**

Structure globulaire de l'ubiquitine appelée «Ub-fold» comportant une hélice  $\alpha$  et 5 feuillets  $\beta$ . A l'extrémité C-terminale se trouve une glycine permettant d'établir des liaisons covalentes avec d'autres protéines. Les lysines K48 et K63 sont impliquées dans l'allongement de la chaîne de poly-ubiquitine.

(A) (Smalle et Vierstra 2004)

(B) (Vijay-Kumar et al. 1987)

favorisant ainsi son recyclage. A son extrémité C-terminale se trouve une glycine essentielle permettant d'établir des liaisons covalentes avec les acteurs de la protéolyse ubiquitine dépendante et les protéines cibles.

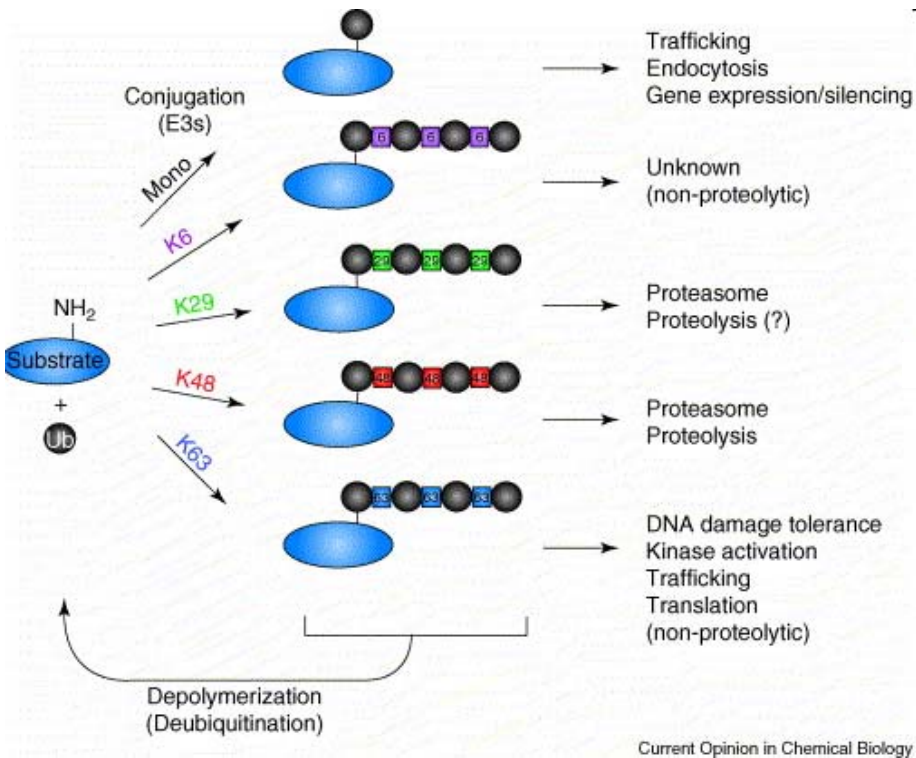
#### 1.1.1.1 Fixation de l'ubiquitine

Pour être fonctionnelle, l'ubiquitine est fixée à une lysine de la protéine cible par l'intermédiaire de sa glycine terminale. L'ubiquitine peut également établir des liaisons avec une autre molécule d'ubiquitine pour former différents types de chaînes de polyubiquitine (Peng et al. 2003). En effet, l'ubiquitine possède 7 lysines internes dont la position a été conservée au cours de l'évolution : Lys6, Lys11, Lys27, Lys33, Lys48, and Lys63. La chaîne la plus étudiée à ce jour est celle qui s'établit entre la glycine terminale et la Lys48. Elle permet la reconnaissance par le protéasome 26S des substrats ainsi polyubiquitinés et joue donc un rôle essentiel dans la dégradation des protéines. Des études sont également menées sur les chaînes impliquant la Lys63. Elles ne constituent pas cependant un signal de dégradation mais participent à des processus tels que la réparation post-répllicative de l'ADN, la régulation de la traduction ou l'endocytose. Les liaisons formées avec les autres lysines de l'ubiquitine sont moins connues (**Fig 3**). L'allongement de ces différents types de chaînes utilise la même cascade enzymatique E1, E2 et E3 et c'est l'enzyme E2 qui semble définir le type de liaison, d'où la présence d'un large éventail d'enzymes E2 chez les eucaryotes.

L'ubiquitine peut également être fixée à une protéine sous forme monomérique afin de modifier l'activité de sa cible. Ceci a été prouvé pour la monoubiquitination des histones H2A et H2B et de l'histone H1, où cette ubiquitination particulière influe sur l'état de méthylation des histones et régule ainsi la transcription de plusieurs gènes grâce à une réorganisation des chromosomes (Dover et al. 2002, Krogan et al. 2002).

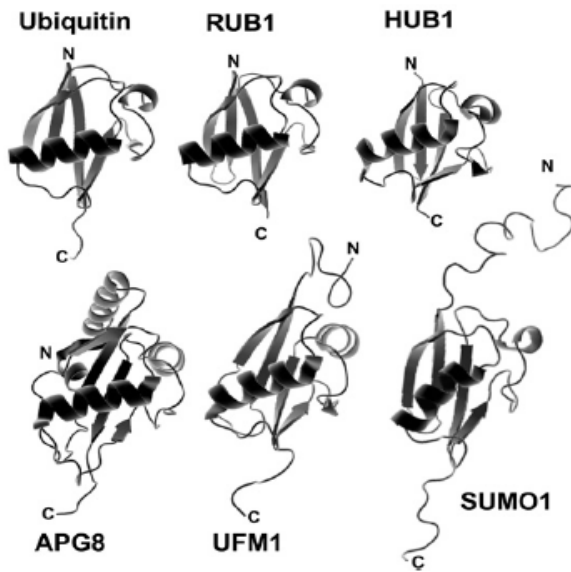
#### 1.1.2 Les protéines « ubiquitin-like »

L'ubiquitine a été le premier polypeptide identifié ayant la capacité de se lier de manière covalente à une protéine cible. Cependant, un certain nombre de petites protéines partageant des similarités de structure avec l'ubiquitine et dont la taille varie entre 72 et 186 acides aminés ont été identifiées (**Fig 4, Tableau 1**). Ces protéines « ubiquitin-like » ont été appelées HUB1 (« **H**omology to **Ub** 1 »), RUB1 (« **R**elated to **Ub** 1 » aussi nommé NEDD8), SUMO (« **S**mall **Ub**-like **M**odifier »), ATG8 (« **A**utophagy 8 »), UFM1 (« **Ub** **F**old **M**odifier 1 »). Elles utilisent également une cascade de réactions enzymatiques dans laquelle l'enzyme E3 n'est pas toujours présente ou identifiée, pour aboutir à leur fixation sur une lysine de la protéine cible (Downes and Vierstra 2005). Néanmoins, malgré une structure et un



**Fig 3 : Les différentes chaînes d'ubiquitine et leurs fonctions**

Les couleurs des carrés correspondent au différents types de chaînes de poly-ubiquitine formées. La lysine impliquée dans l'établissement de la chaîne est indiquée sur les flèches de gauche. A droite se trouvent les fonctions correspondantes des différentes chaînes de poly-ubiquitine. (Pickart et Fushman 2004)



**Fig 4 : Représentation structurale des différents homologues de l'Ubiquitine**

Structure tridimensionnelle des petites protéines homologues de l'ubiquitine qui possèdent une structure similaire à celle-ci. Les lettres N et C permettent d'identifier les parties N- et C-terminales des peptides. (Downes et Vierstra 2005)

mécanisme d'activation similaires à ceux de l'ubiquitine, la fixation de la plupart de ces protéines sur leurs substrats n'entraîne pas directement leur dégradation par le protéasome mais régule plutôt leur activité.

L'étude de SUMO, la protéine « ub-like » la plus connue, s'est intensifiée ces dernières années. Malgré des similarités structurales et mécanistiques avec l'ubiquitine, elle possède des différences fonctionnelles significatives qui ont permis de classer séparément ces protéines dans deux groupes distincts. Le génome d'*Arabidopsis* possède 8 allèles de SUMO qui se divisent en cinq familles (Kurepa et al. 2003). Plusieurs études génétiques ont conduit à l'implication de la SUMOylation dans différents processus développementaux tels que la réponse aux stress abiotiques, la signalisation hormonale, le contrôle de la floraison ou encore sa participation dans le développement embryonnaire (Saracco et al. 2007, Jin et Hasegawa 2008, Miura et al. 2008, 2009). Néanmoins, peu de choses sont connues quant aux mécanismes moléculaires exacts permettant à SUMO de réguler ces différentes voies biologiques. Une seule molécule de SUMO est généralement suffisante pour modifier les protéines cibles. La monoSUMOylation engendre des changements de conformation des substrats et contrôle ainsi leur activité. De nombreux processus cellulaires tels que la progression du cycle, la stabilité du génome où le transport et la localisation des protéines, incluent également cette modification post-traductionnelle (Hay 2005). Concernant la polySUMOylation, une E3 ligase, appelée RNF4, capable d'allonger les chaînes SUMO a été récemment identifiée. Elle contrôle la stabilité de la protéine PML impliquée dans les réponses au stress à l'arsenic (Tatham et al. 2008).

Les voies de régulation engageant SUMO croisent souvent celles de l'ubiquitine. D'une part, SUMO peut avoir un rôle antagoniste à celui de l'ubiquitine, en se fixant de manière compétitive aux résidus lysine des substrats afin de permettre leur stabilisation (Gill 2003). D'autre part, chez la levure et les cellules humaines, il a été démontré que les protéines ubiquitinées et sumoylées s'accumulent en présence d'inhibiteurs du protéasome 26S. Ceci suggère que de manière similaire à l'ubiquitine, SUMO constitue un signal de dégradation dans la protéolyse ubiquitine-dépendante, impliquant probablement une nouvelle classe d'enzymes E3 ligases (Prudden et al. 2007, Uzunova et al. 2007, Sun et al. 2007). Plusieurs protéines à domaine « RING-finger » de levures sont effectivement capables de fixer les cibles sumoylées mais la plupart ne possèdent pas d'activité E3 ligase. En fait, grâce à ce domaine d'interaction protéine-protéine, elles recrutent une ubiquitine-ligase active pour former un complexe fonctionnel capable de reconnaître les substrats sumoylés et permettre

Tag	Similarity to Ub* (%)	Identity with Ub* (%)	Number of isoforms	Length (no. of amino acids)*
Ub	-	-	1	76
RUB1	73	59	3	76
HUB1	35	21	2	72
SUMO†	30	12	9	94
UFM1	30	14	1	86
ATG12‡	30	8	2	96
ATG8‡	21	5	9	116

Biochemical Society Transactions

### Tableau 1 : Description des sept protéines « ubiquitine-like » d'*Arabidopsis*

Ce tableau comparatif regroupe les principales caractéristiques des protéines « ubiquitine-like » présentes chez *Arabidopsis*. Une divergence de leur séquence peptidique, par rapport à celle de l'ubiquitine, peut être constatée dans les colonnes qui représentent le pourcentage de similarité et d'identité. Contrairement à l'ubiquitine, ces protéines sont également présentes sous différents isoformes dont le nombre est inscrit ci-dessus. (Downes et Vierstra 2005)

par la suite leur ubiquitination (Hunter et Sun 2008). Dans ce cas particulier, SUMO établit une coopération avec l'ubiquitine afin de faciliter la conjugaison de celle-ci sur les substrats, dans un but commun (Denuc et Marfany 2010).

Concernant la protéine RUB1/NEDD8, ses cibles principales sont les protéines à domaine Culline qui constituent la charpente des enzymes E3 multimériques. RUB1/NEDD8 agirait positivement sur l'activité du complexe E3 en facilitant son interaction avec l'enzyme E2 (Gray et al. 2002, Chiba et Tanaka 2004). Contrairement aux protéines à domaine Culline, la rubylation/neddylation de p53 engendre une inhibition de l'activité de ce facteur de transcription (Xirodimas et al. 2004, Harper 2004). La modification par RUB1/NEDD8 peut donc conduire à des effets antagonistes dépendant des protéines cibles.

Quant aux autres protéines « Ub-like » mentionnées précédemment, des homologues ont été identifiés chez *Arabidopsis* mais aucune fonction potentielle ne leur a été assignée pour le moment.

### **1.1.3 Les acteurs clés de l'ubiquitination : les enzymes.**

#### **1.1.3.1 Les E1 : enzymes d'activation de l'ubiquitine**

L'enzyme monomérique E1 initie la cascade de conjugaison. Elle permet l'activation de l'ubiquitine via une réaction intramoléculaire ATP-dépendante (Hershko et al. 1980, 1981). Elle est capable de lier physiquement l'ubiquitine, en établissant une liaison thio-ester avec une de ses cystéines conservées.

Les enzymes E1 ont un très faible impact sur la spécificité du substrat cible et peuvent être utilisées par de nombreuses enzymes E2. Elles sont effectivement peu abondantes dans un organisme donné. Une seule enzyme de ce type a été identifiée chez *S. cerevisiae*, cinq chez *C. elegans* et seulement deux gènes codant pour des enzymes d'activation de l'ubiquitine (UBA1 et UBA2) sont connus chez *Arabidopsis thaliana* (Bachmair et al. 2001).

#### **1.1.3.2 Les E2 : enzymes de conjugaison de l'ubiquitine**

L'enzyme E2 joue le rôle de transporteur de l'ubiquitine active de l'enzyme E1 vers l'enzyme de liaison de l'ubiquitine appelée E3. Le transfert de l'ubiquitine de l'enzyme E1 à l'enzyme E2 se fait par une réaction de transestérification.

Ces enzymes ont été identifiées chez toutes les espèces et ont en commun un domaine conservé Ubc (« Ubiquitin-conjugating »), de 150 acides aminés, qui forme le cœur catalytique de l'enzyme renfermant le site de liaison de l'ubiquitine. Contrairement aux enzymes E1, les E2 possèdent une certaine spécificité d'interaction avec les E3. Elles sont ainsi codées par un nombre plus important de gènes dans les organismes. Chez *Arabidopsis*



*thaliana*, 36 gènes codant pour ce type d'enzyme ont été identifiés, 11 chez *S. cerevisiae* ou encore 20 chez *C. elegans* (Bachmair et al. 2001).

### 1.1.3.3 Les E3 : enzymes de liaison de l'ubiquitine

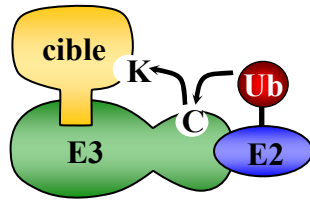
Les E3 sont les derniers acteurs de la cascade d'ubiquitination et sont responsables de l'identification spécifique des protéines cibles. Il existe différents types d'enzymes E3 que l'on peut regrouper en 2 classes, selon le mécanisme de transfert de l'ubiquitine vers le substrat. Dans le cas des enzymes monomérique à domaine HECT (« **H**omologous to **E**6-**A**P **C**-terminus »), elles prennent physiquement en charge l'ubiquitine et la transportent ensuite sur la protéine cible (Fig 5-A). En revanche, les enzymes E3 à motif « RING finger » jouent un rôle d'adaptateur permettant le rapprochement entre le substrat et l'ubiquitine portée par l'enzyme E2 (Fig 5-B). Au sein des enzymes E3 à motif « RING finger », on distingue également plusieurs groupes : celles qui sont monomériques et celles qui agissent sous forme de complexe multiprotéique (Jackson et al. 2000). Dans cette dernière classe, les complexes E3 contenant une protéine à domaine Culline sont les plus étudiés et 4 d'entre eux ont été caractérisés chez *Arabidopsis thaliana* (Thomann et al. 2005).

#### 1.1.3.3.1 Les E3 ligases à domaine HECT

Les protéines à domaine HECT sont des enzymes monomériques qui ont la particularité d'être les seules E3 capables de former une liaison covalente avec l'ubiquitine avant son transfert sur le substrat. Cette classe d'enzymes a été définie d'après la protéine E6-AP (« **E**6-**A**ssociated **P**rotein ») qui, associée à l'oncoprotéine E6 du papillomavirus, est capable d'ubiquitiner la protéine p53 (Scheffner et al. 1993). Les enzymes de ce groupe ont un domaine de 350 acides aminés similaire à la partie C-terminale de E6-AP. Cette séquence contient un domaine de liaison avec l'enzyme E2 et une cystéine conservée permettant de former la liaison thio-ester avec l'ubiquitine. Quant au côté N-terminal, il renferme différents types de motifs impliqués dans des interactions protéine-protéine tels que le motif WW, le domaine « coiled-coil » ou encore « RING-finger ». La E3 ligase à domaine HECT la mieux caractérisée est NEDD4 (« **N**eural precursor cell expressed **d**evelopmentally **d**ownregulated 4 »). Elle renferme des motifs WW qui reconnaissent ses principaux substrats que sont les sous-unités du canal sodique ENaC (« **E**pithelial **N**a **C**hannel ») (Abriel et Staub 2005).

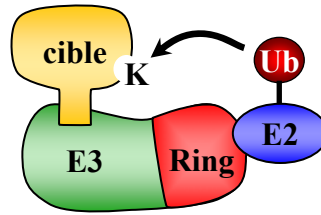
Chez *Arabidopsis*, 7 gènes codant pour des E3 ligases à domaine HECT ont été identifiés (Downes et al. 2003). Celui qui a été le plus précisément caractérisé est appelé *KAKTUS*. Le mutant présente des trichomes avec des ramifications surnuméraires, conséquence d'une

(A)



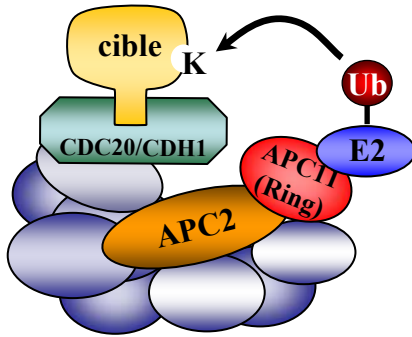
E3 à domaine HECT

(B)



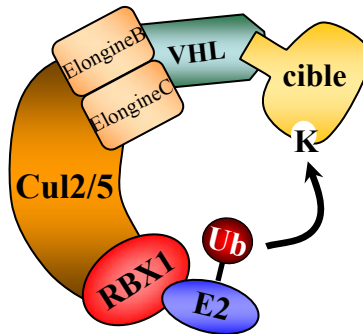
E3 à domaine RING

(C)



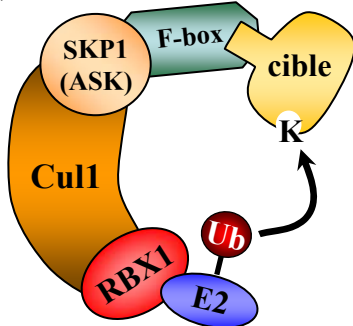
APC

(D)



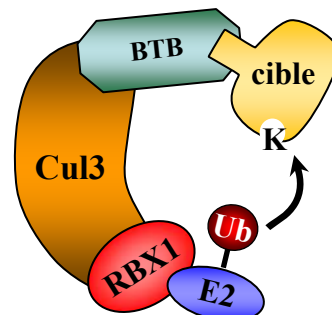
VBC

(E)



SCF

(F)



CUL3-BTB

### Figure 5 : Les différents types d'enzymes E3 ligases

Les enzymes E3 à domaine HECT (A) prennent physiquement en charge l'ubiquitine (Ub) avant de la transférer sur la protéine cible. Les E3 à motif «RING finger» permettent uniquement le rapprochement entre l'ubiquitine et le substrat (B). Les autres E3 représentées font parti de la famille des enzymes à domaine «RING finger» multimériques (C, D, E et F). Les complexes s'assemblent autour des différentes protéines à domaine culline, qui jouent le rôle de charpente de ces E3 ligases particulières.

augmentation du niveau de ploïdie (El Refy et al. 2003). Les substrats de cette ligase n'ont cependant pas encore été identifiés.

#### 1.1.3.3.2 Les E3 ligases à domaine « RING finger »

La seconde classe d'E3 ligases regroupe celles qui renferment un domaine appelé « RING finger ». Ce domaine a été décrit pour la première fois au début des années 90 comme étant un module qui participe aux interactions protéine-protéine ou protéine-acide nucléique (Lovering et al. 1993). Il est défini par la séquence consensus CX<sub>2</sub>CX(9-39)CX(1-3)HX(2-3)C/HX<sub>2</sub>CX(4-48)CX<sub>2</sub>C où les résidus cystéine (C) et histidines (H) fixent les ions Zinc (Borden 2000). Il permet l'interaction avec l'enzyme E2 et participe au processus d'ubiquitination de la protéine substrat.

En 1993, des expériences de double hybride ayant pour appât une enzyme de conjugaison E2 ont permis d'identifier une ubiquitine-E3 ligase portant un domaine « RING finger », nommée AO7. En effet, il a été prouvé *in vitro* que AO7 est capable d'ubiquitination en présence des enzymes E1 et E2 (Lovering et al. 1993). Ces résultats suggèrent que la protéine AO7 constitue une E3 ligase potentielle. Sa caractérisation a mené à l'identification d'autres protéines à domaine « RING finger », également capables d'ubiquitination E2-dépendante (Lorick et al. 1999). Malgré ces observations, nous ne pouvons pas affirmer que toutes les protéines comportant le motif « RING finger » sont des E3 ligases. En effet, un grand nombre de gènes codant pour des protéines de ce type a été mis en évidence dans les génomes séquencés, mais nous ne connaissons pas la proportion capable d'ubiquitination.

Parmi ce type d'E3 ligases, certaines sont uniquement constituées de la protéine à domaine « RING finger ». Ces monomères sont appelés SPRF (« **S**ingle **P**rotein **R**ING **F**inger »). D'autres E3 se présentent sous forme de complexes multimériques où la protéine comportant ce motif caractéristique est une sous-unité à part entière. Parmi ces dernières E3 ligases à motif « RING finger », celles contenant une protéine à domaine Culline sont les plus étudiées. La protéine CULLINE joue un rôle de charpente au sein de ces complexes et relie deux modules fonctionnels : le module impliqué dans la reconnaissance spécifique du substrat et le module catalytique qui renferme la protéine à domaine « RING finger », capable d'interagir avec l'enzyme E2 portant l'ubiquitine active. Six protéines à domaine Culline (CUL1, CUL2, CUL3, CUL4, CUL5 et CUL7) ainsi que des protéines CULLINE-like (APC2) ont été identifiées chez les eucaryotes et chacune est capable d'interagir avec plusieurs sous-unités pour former des complexes multiprotéiques appelés CRLs (« **C**ullin **R**ing **L**igase ») (Dias et al. 2002, Willems et al. 2004, Petroski et Deshaies 2005). Plusieurs

de ces complexes ont été identifiés, caractérisés et classés en fonction de la protéine CULLINE qu'ils renferment.

#### 1.1.3.3.2.1 Les E3 ligases SPRF

MDM2 (« **M**urine **D**ouble **M**inute **2** ») est une E3 ligase monomérique bien caractérisée. Elle est impliquée dans la régulation de l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose (Haupt et al. 1996, 1997, Chen et al. 1996). Des études supplémentaires ont prouvé que MDM2 régule la stabilité de la protéine p53 de manière protéasome 26S-dépendante (Kubbutat et al. 1997). Ceci suggère que MDM2 est une E3 ligase ayant pour cible la protéine p53 (Honda et al. 1997). La mise en évidence de l'activité ubiquitine-ligase RING-dépendante de MDM2 confirme cette hypothèse (Fang et al. 2000). Cette protéine contient un nombre d'éléments conservés indispensables à sa fonction. A son extrémité N-terminale se trouve le domaine d'interaction avec la protéine p53 tandis qu'à son extrémité C-terminale loge le domaine « RING finger » qui participe au transfert de l'ubiquitine sur les substrats de MDM2 (Honda et Yasuda 2000). Au centre se trouve une région acide indispensable à la dégradation MDM2-dépendante. Elle renferme des sites d'interaction avec les protéines p300 et ARF qui sont respectivement des régulateurs positifs et négatifs de la dégradation de p53. Des séquences de localisation nucléaire et d'export y ont également été identifiées. Elles influencent la capacité de MDM2 à ubiquitiner p53. En effet, la modification de p53 repose sur le transport de MDM2 du cytoplasme au noyau. Cette E3 ligase pénètre dans le noyau pour former un complexe soit avec la protéine p300, un activateur transcriptionnel qui facilite la dégradation de p53, soit avec la protéine ARF qui engendre la stabilisation de p53 (Weber et al. 1999). Ce modèle a cependant évolué ces dernières années avec l'identification de plusieurs protéines additionnelles capables d'influencer l'action de MDM2 (Michael et Oren 2003, Brooks et Gu 2006, Wang et al. 2010).

Parmi ces enzymes à domaine « RING finger », certaines répondent à la « N-end rule pathway », une voie de dégradation particulière où la demi-vie de nombreuses protéines est déterminée par la nature de leur acide aminé en N-terminal, aussi appelé « N-degron ». La demi-vie des protéines peut ainsi varier de quelques minutes à quelques jours. Les différentes E3 à domaine « RING finger » sont donc classées suivant la nature, acide ou basique, de l'acide aminé qu'elles reconnaissent. Certaines peuvent également renfermer deux sites de reconnaissance telle la E3 $\alpha$  humaine, qui peut se fixer aux résidus basiques (Arg, His, Lys) mais également aux résidus hydrophobes et encombrants (Phe, Trp, Tyr) (Varshavsky 1997).

De nombreuses autres protéines à domaine « RING finger » sont également venues élargir la liste des ubiquitine-E3 ligases monomériques. La plupart d'entre elles possèdent la capacité de transférer l'ubiquitine et participent ainsi à la régulation de nombreux processus cellulaires indispensables à la vie des organismes. D'autres RING interagissent avec ces E3 ligases et stimulent ainsi l'activité d'ubiquitination de ces dernières (Deshaies et Joazeiro 2009).

#### **1.1.3.3.2.2 CRLs : Les E3 ligases à domaine « RING finger » multimériques**

##### **1.1.3.3.2.2.1 Le complexe SCF**

Le complexe SCF est l'enzyme E3 la mieux caractérisée (Cardozo et Pagano 2004). Il a été découvert chez la levure et son nom provient des trois premières sous-unités identifiées: SKP1 (« S-phase Kinase-associated Protein 1), CDC53 (ou CULLINE1) et protéine à « F-box ». Une quatrième sous-unité, dotée d'un domaine « RING-finger » et appelée RBX1 (« Ring-BOX protein 1 ») ou ROC1 (« Regulator Of Cullin1 »), a été ajoutée par la suite aux membres du complexe (Fig 5-E) (Kamura et al. 1999, Ohta et al. 1999, Seol et al. 1999, Skowyra et al. 1999). L'architecture des complexes SCF a été mise en évidence grâce à des études cristallographiques menées sur la levure (Zheng et al. 2002). Tous les complexes SCF possèdent une structure conservée et ont en commun les sous-unités SKP1, CULLINE1 et RBX1. Cet ensemble recrute alors différentes protéines à « F-box » pour former des complexes multimériques fonctionnellement différents (Lechner et al. 2006).

L'analyse de la structure tridimensionnelle du SCF indique que la protéine CULLINE1 interagit en C-ter avec la sous-unité catalytique RBX1 et en N-ter avec le module impliqué dans la reconnaissance spécifique des substrats, constitué des sous-unités SKP1 et protéine à « F-box ». SKP1 joue avant tout le rôle d'adaptateur entre la protéine à « F-box » et la Culline1, alors que la protéine à « F-box » est directement impliquée dans l'interaction spécifique avec le substrat cible (Skowyra et al. 1997).

Contrairement à la levure qui possède un gène SKP1 unique, la plupart des autres organismes ont plusieurs gènes « SKP1-like ». Le génome d'*Arabidopsis* possède des gènes uniques codant pour les sous-unités CULLINE1 et RBX1 formant la base du complexe (Lechner et al. 2002), mais compte 21 gènes codant pour SKP1, appelés ASK (« *Arabidopsis* SKP1 like protein ») (Takahashi et al. 2004). La CULLINE1 est capable d'interagir avec les différentes protéines ASK qui contribuent ainsi au large répertoire des complexes SCF. Il a été démontré que certaines ASKs peuvent être exprimées dans différents types d'organes ou de tissus, suggérant ainsi une spécificité de localisation et d'action des complexes SCF (Zhao et al. 2003, Liu et al. 2004, Takahashi et al. 2004.). Une protéine ASK peut également

interagir avec plusieurs protéines à « F-box » (Potuschak et al. 2003, Yang et al. 2004). Ce sont ces dernières qui apportent la plus grande variabilité aux complexes SCF car il existe plus de 60 gènes codant pour ce type de protéine chez la plupart des animaux et 16 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Winston et al. 1999). Le nom du motif « F-box » provient de la protéine où ce motif a été initialement caractérisé : la Cycline F (Bai et al. 1996). C'est une séquence d'environ 40 acides aminés à majorité hydrophobes qui se situe habituellement dans la partie N-terminale des protéines et permet l'interaction avec SKP1 (Xu et al. 2009). En général, la partie C-terminale des protéines à « F-box » contient un autre domaine d'interaction protéine-protéine qui permet la reconnaissance spécifique des substrats. Les protéines à F-box sont classées dans différentes familles, suivant le type du second domaine d'interaction protéine-protéine, pouvant être des répétitions « WD40 », des LRR (« **L**eucine **R**ich **R**epeat ») ou encore des « Kelch repeat » (Andrade et al. 2001, Cenciarelli et al. 1999, Kuroda et al. 2002). Chez *Arabidopsis*, plus de 700 gènes codant des protéines à « F-box » ont été identifiés (Gagne et al. 2002). Ce nombre est nettement plus élevé chez les plantes supérieures que chez les autres organismes eucaryotes, ce qui montre l'importance de l'ubiquitination SCF-dépendante dans les mécanismes de régulation et dans les voies de signalisation. Plusieurs implications du complexe SCF ont ainsi été mises en évidence chez les végétaux où il joue un rôle important dans différentes signalisations et réponses hormonales (auxine, éthylène, gibbéréline, jasmonate) (Itoh et al. 2003, Gagne et al. 2004, Memlink 2009, Tan et al. 2009, Memlink 2009). D'autres processus physiologiques tels que la sénescence, le rythme circadien, la photomorphogenèse, les mécanismes de résistance aux pathogènes, la division cellulaire ou encore le développement floral et la viabilité du pollen impliquent la protéolyse SCF-dépendante (Dharmasiri et al. 2005, Gusti et al. 2009, Santner et Estelle 2010).

#### **1.1.3.3.2.2.2 Le complexe VBC**

Le nom du complexe VBC correspond aux initiales des trois principales sous-unités qui le constituent : la protéine VHL (« **V**on **H**ippel **L**inau ») et les protéines Elongine **B** et **C** (Kamura et al. 1999). Le complexe VBC est bâti sur un schéma très similaire à celui du SCF. La CULLINE2 ou 5 remplace la CULLINE1 et joue le rôle de charpente du complexe. Comme dans le complexe SCF, la partie C-terminale des CULLINE2 ou 5 interagit avec RBX1 tandis que du côté N-terminal, la protéine SKP1 est remplacée par un hétérodimère formé par les protéines Elongine B et C (**Fig 5-D**). L'Elongine C ayant des similarités de séquence avec SKP1, interagit avec la CULLINE tandis que l'Elongine B établit une liaison

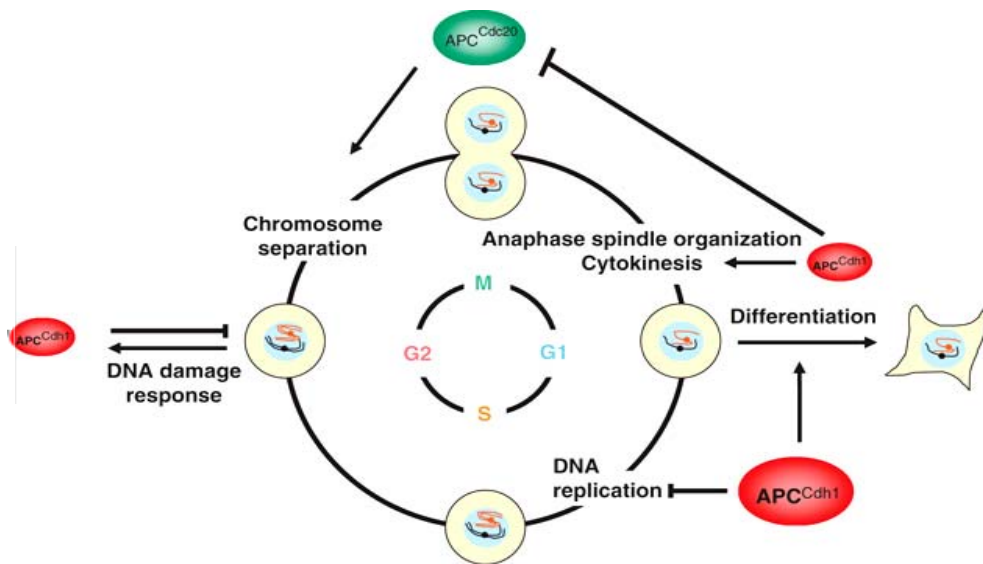
avec la protéine VHL. La protéine VHL joue un rôle similaire à celui des protéines à « F-box » du SCF, qui consiste à recruter les substrats cibles. L'interaction entre l'Elongine B et la protéine VHL s'établit via un domaine appelé SOCS-box (« **S**uppressor **O**f **C**ytokine **S**ignalling protein ») présent dans la protéine VHL.

Le complexe VBC a uniquement été décrit chez les animaux. Contrairement aux nombreuses protéines à « F-box », une seule protéine VHL a été identifiée. Des mutations de celle-ci entraînent une dérégulation des gènes normalement induits par l'hypoxie et sont à la source de certaines tumeurs (Kim et Kaelin 2003, Pugh et Ratcliffe 2003).

#### **1.1.3.3.2.2.3 Le complexe APC (« Anaphase Promoting Complex ») ou Cyclosome**

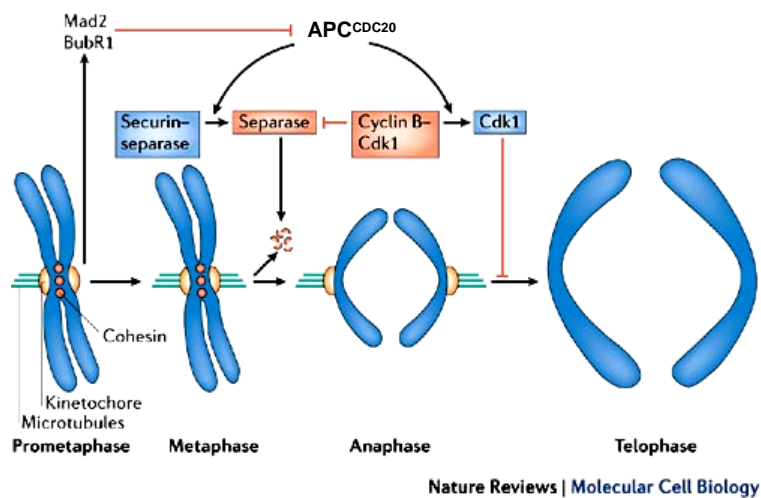
L'APC ou cyclosome, formée d'au moins 11 sous-unités, est le plus grand complexe E3 ligase identifié. L'intérêt porté à ce complexe est dû à son implication dans le contrôle du cycle cellulaire. La base du complexe est constituée par la protéine APC2, un membre éloigné de la famille des CULLINES (Zachariae et al. 1998). APC2 interagit avec la sous-unité catalytique APC11 qui possède le motif « RING finger ». Il s'associe de manière transitoire aux facteurs CDC20 (« **C**ell **D**ependent **C**ycle ») ou FIZZY (FZY), et CDH1 (« **C**erevisiae **D**im1 **H**omologue1 ») ou FIZZY-related (FZR) (**Fig 5-C**). CDC20 active l'APC en début de mitose tandis que CDH1 est responsable de l'activité du cyclosome en fin de mitose et à la transition G1/S (Glotzer et al. 1991, Fang et al. 1998, Peters 2006). Ces cofacteurs sont indispensables pour la régulation de l'activité du complexe car ils permettent la reconnaissance des protéines cibles de l'APC. Ils font partie de la famille des protéines CDC20 dont chaque membre possède à leur extrémité C-terminale, sept répétitions du type WD40 (Page et Hieter 1999). Ces répétitions forment une structure en hélice renfermant les domaines d'interaction protéine-protéine. Des motifs particuliers ont également été caractérisés dans les cibles de l'APC. Il s'agit d'un motif dégénéré de 9 acides aminés (RXXLXXXXN), la D-box, majoritairement présent dans les substrats de l'APC<sup>CDC20</sup> (Pfleger et Kirschner 2000). Un autre signal de destruction a également été identifié, la KEN-box. Cette séquence consensus (KENXXXN/D) est plus spécifiquement reconnue par le complexe APC<sup>CDH1</sup> (Leismann et Lehner 2003).

La régulation de l'activité de l'APC au cours du cycle cellulaire est extrêmement complexe. L'activation de l'APC durant la mitose repose principalement sur la disponibilité de CDC20. Or la protéine CDC20 est elle-même sujette à la dégradation APC-dépendante car elle constitue une des cibles du complexe APC<sup>CDH1</sup> en fin de mitose (**Fig 6**) (Pagano et Benmaamar 2003). Il a également été démontré chez l'animal que durant la progression



**Figure 6 : Contrôle APC-dépendant du cycle cellulaire**

Le complexe APC est activé par la protéine CDH1 de la fin de la mitose jusqu'à la fin de la phase G1. L'APCCDH1 contrôle la progression au cours de la phase G1, permet la différenciation et prépare les cellules à subir un nouveau cycle de division. En G2, l'APCCDH1 peut être activé en réponse à des lésions induites sur l'ADN afin de bloquer l'entrée en mitose pour permettre préalablement la réparation de l'ADN. Lors de la mitose, l'APC est activé par le facteur CDC20. L'APCCDC20 contrôle la séparation chromosomique et initie la sortie de la mitose. Au cours de l'anaphase, l'APCCDH1 inactive le complexe APCCDC20 afin de contrôler la dynamique du fuseau anaphasique et permettre la cytokinèse. Ces deux complexes interviennent au cours des phases de transition cruciales du cycle cellulaire. (Wäsch et al. 2010)



**Figure 7 : Régulation APC<sup>CDC20</sup>-dépendante de la mitose**

En métaphase, l'APCCDC20 assure l'ubiquitination des sécurines et de la cycline B pour permettre l'activation de la protéase séparase et l'inactivation de la kinase CDK1. La séparase clive alors le complexe cohésine (cercles rouges) qui maintient les chromatides sœurs et permet ainsi leur séparation. L'inactivation de CDK1 conduit à la déphosphorylation des substrats de la kinase par des phosphatases, engendrant la sortie de la mitose. Chez les vertébrés, l'inactivation de CDK1 contribue également à l'activation de la séparase. (Peters et al. 2006)



G1-S-G2 du cycle, l'APC<sup>CDC20</sup> et l'APC<sup>CDH1</sup> sont inhibés par EMI1 (« **E**arly **M**itotic **I**nhibitor 1 »), une protéine à « F-box » (Reimann et al. 2001, Miller et al. 2006). Cette inhibition est nécessaire au maintien d'un niveau élevé des cyclines mitotiques qui permettent d'initier l'entrée en mitose et bloquer la re-réplication de l'ADN (Di Fiore et Pines 2007,2008). En fin de prophase, EMI1 est phosphorylée par la kinase PLK1. Suite à cette modification, elle est reconnue par le complexe SCF<sup>TrCP</sup>, ubiquitinée et dirigée vers le protéasome. Sa dégradation permet la libération des protéines CDC20 et CDH1, indispensables à l'activation de l'APC. Il est également établi que plusieurs sous-unités de l'APC sont phosphorylables. C'est le cas des protéines APC1, CDC27, CDC16 et CDC23. Ces phosphorylations seraient réalisées par plusieurs kinases dont la CyclineB/CDK1 (Golan et al. 2002). De manière générale, ces phosphorylations activeraient l'APC tandis que l'action de différentes phosphatases réduirait l'activité du complexe (Rudner et Murray 2000).

L'implication de l'APC dans le cycle cellulaire passe par la dégradation de différents régulateurs du cycle tels que la sécurine ou la CyclineB. La dégradation de la sécurine est indispensable pour la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase (Nasmyth et al. 2000, Yanagida 2000) (**Fig 7**). En effet, après la réplication, les chromatides restent associées à des complexes protéiques connus sous le nom de cohésines. En début d'anaphase, la cohésine est détruite après phosphorylation, par une caspase particulière, la séparase, afin de permettre la séparation des chromatides. Au cours du cycle, la séparase est en fait maintenue sous forme inactive par association avec une autre protéine, la sécurine. Le complexe APC<sup>CDC20</sup> induit l'ubiquitination de la sécurine, conduisant à sa destruction par le protéasome. La dégradation de la sécurine conduit à la libération d'une séparase active qui engendre la dissociation du complexe cohésine et la séparation des chromatides sœurs.

L'APC<sup>CDC20</sup> est également en partie responsable de la destruction de la cycline B. C'est un événement qui a plusieurs conséquences physiologiques importantes, dépendant toutes directement de la chute de l'activité CDK1 : la disparition du fuseau, le déclenchement de la cytokinèse ou encore la transition vers la phase G1 (Irniger 2002).

Chez *Arabidopsis*, toutes les sous-unités de l'APC sont codées par un seul gène sauf la protéine CDC27 (Capron et al. 2003). Deux homologues ont été identifiés, appelés CDC27a et CDC27b (« Hobbit » ou HBT). Les plantes portant une mutation dans le gène *HBT* présentent des défauts de division et de différenciation cellulaire dans les méristèmes (Willemsen et al. 1998). L'analyse des racines et des feuilles de ces mutants révèlent, en plus des perturbations de la division cellulaire, des défauts d'endoréplication (Serralbo et al. 2006,

Perez-Perez et al. 2008, Marrocco et al. 2009). Quant aux activateurs CDC20 et CDH1, ils sont également conservés chez les végétaux. Cependant, contrairement aux mammifères, ils sont codés par plusieurs gènes : six pour CDC20 et trois pour CDH1 (Tarayre et al. 2004). Des études menées sur les plantes confirment que dans ces organismes, l'APC participe au contrôle du cycle cellulaire (Genschik et al. 1998, Cebolla et al. 1999, Criqui et al. 2000, Kwee et Sunderasan 2003). Malgré cela, les connaissances sur l'APC des plantes restent limitées. Nous savons cependant que dans le règne végétal, l'APC est capable d'interagir avec de nombreux activateurs différents (CDC20, CDC52, CDC27) pour permettre l'ubiquitination d'un large éventail de substrats, impliqués à des stades distincts du cycle cellulaire (Fulop et al. 2005). Cette hypothèse peut également être confirmée par les profils d'expression différents de chaque sous-unité du complexe. Ceux-ci suggèrent qu'il existe plusieurs assemblages fonctionnels de l'APC, capables d'accomplir différents rôles au cours du développement (Eloy et al. 2006). Ces observations démontrent la complexité du niveau de régulation du complexe APC végétal dont la fonction dépend de la disponibilité de ses sous-unités dans des tissus ou compartiments cellulaires spécifiques.

#### **1.1.3.3.2.2.4 Le complexe CUL3-BTB**

Le complexe CUL3-BTB contient la protéine à domaine Culline la plus conservée parmi tous les génomes eucaryotes : la CULLINE3. Son extrémité C-terminale interagit toujours avec RBX, le module catalytique. Le module permettant la reconnaissance spécifique a été identifié après des études de mutants *cul3* menées sur des nématodes. Ces travaux montrent que la CULLINE3 interagit avec MEL26, une protéine contenant un domaine BTB (« **B**ric à **B**rac, **T**ramtrack and **B**road »), et que cette protéine est responsable du substrat à ubiquitiner, la protéine « catanine-like » MEI1 (Pintard et al. 2003). Ceci suggère que les protéines à domaine BTB fonctionnent comme des adaptateurs des substrats cibles des complexes CUL3 (Fig 5-F) (Pintard et al. 2004). C'est grâce à ce domaine d'interaction protéine-protéine que s'établit la liaison avec la partie N-terminale de la CULLINE3. La plupart des protéines BTB possèdent un autre domaine d'interaction protéine-protéine, en amont ou en aval du domaine BTB. Ces domaines additionnels permettraient la fixation des substrats cibles ou bien d'autres protéines adaptatrices. Parmi eux, on trouve le domaine MATH (« **M**ephrin **A**nd **T**raff **H**omology »), Armadillo (ARM), TPR (« **T**etratricopeptide **R**epeats ») ou encore le domaine Ankyrin. Les protéines à domaine BTB sont classées dans des familles distinctes, en fonction de la nature du domaine additionnel.

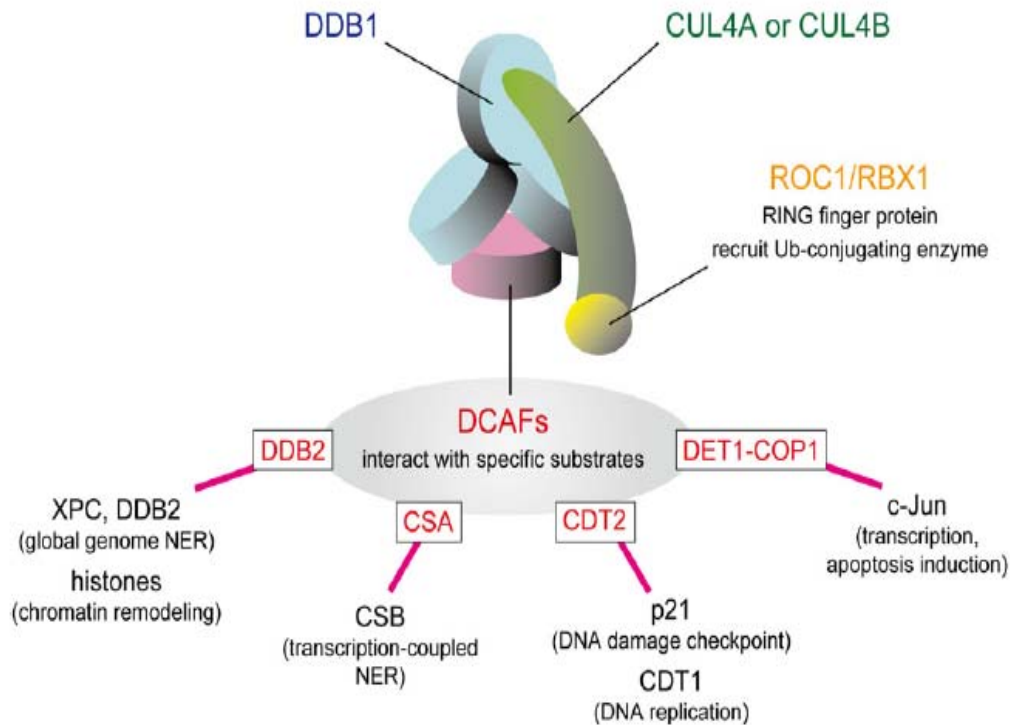
L'analyse des génomes met en évidence 208 protéines à domaine BTB chez l'homme, uniquement 3 chez la levure, 141 chez la drosophile et 80 chez *Arabidopsis*. Il est intéressant de noter que l'évolution a privilégié certains complexes dans les différents organismes modèles. Ainsi, le génome d'*Arabidopsis* renferme plus de 700 protéines à « F-box » pour 80 BTB, contrairement à l'homme qui possède « seulement » 109 protéines à F-box mais 208 BTB. Ceci ne signifie pas pour autant que le rôle joué par les complexes CUL3-BTB serait plus important chez l'homme que chez les plantes. Afin de répondre à cette question, des études plus poussées des complexes CUL3-BTB ont été menées chez *Arabidopsis*. A la différence des autres eucaryotes, le génome d'*Arabidopsis* possède deux gènes, *CUL3A* et *CUL3B*, qui codent pour des protéines CULLINE3 identiques à 88% (Figuroa et al. 2005). Chez la plupart des eucaryotes, le gène *CUL3* est essentiel à leur survie tandis que chez les plantes, le phénotype d'embryon létalité est observé uniquement lorsque les deux gènes sont mutés, suggérant que *CUL3A* et *CUL3B* possèdent des fonctions redondantes (Thomann et al. 2005, 2005). En effet, chez *Arabidopsis*, elles sont toutes les deux capables de former des complexes CUL3-E3 ligases (Dieterle et al. 2005, Weber et al. 2005, Gingerich et al. 2005). Différents rôles du complexe ont été mis en évidence chez les animaux. Il est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire car des souris « knock out » présentent une accumulation de la Cycline E (Singer et al. 1999). Il participe également au développement et à la formation des organes, ainsi qu'à la croissance et à la survie des cellules de la drosophile (Mistry et al. 2004). Quant aux végétaux, il joue un rôle important dans l'embryogenèse, la morphogenèse de la racine primaire et la biosynthèse hormonale, notamment celle de l'éthylène (Dieterle et al. 2005, Thomann et al. 2005, 2009). C'est la caractérisation de l'une des protéines à domaine BTB qui a permis de lier une fois de plus la voie de l'ubiquitine à celle des hormones. En effet, il a été montré qu'*eto1*, un mutant surproduisant de l'éthylène et présentant le phénotype caractéristique de « triple réponse », est affecté dans une protéine à domaine BTB (Wang et al. 2004). ETO1 interagit avec la CUL3 et contrôle la stabilité d'ACS5 (« ACC Synthase 5 »), une enzyme catalysant l'étape limitante dans la biosynthèse de l'éthylène. ACS5 serait ainsi le premier substrat du complexe CUL3-BTB identifié chez les plantes (Chae et Kieber 2005, Yoshida et al. 2005, Christians et al. 2009, Thomann et al. 2009.)

#### **1.1.3.3.2.5 Le complexe CUL4-DDB1**

Ce complexe E3 repose sur la présence de la Culline 4, une protéine conservée au cours de l'évolution, dont des orthologues sont retrouvés dans différentes espèces. Un seul gène code

cette protéine chez *S. pombe*, *C. elegans*, *Drosophila*, ou *Arabidopsis* tandis que les cellules animales, possèdent deux paralogues appelés *CUL4A* et *CUL4B*. Chez les mammifères, les protéines issues de ces gènes ont 80% d'identité, ce qui complique les analyses génétiques menant à la caractérisation fonctionnelle de la CUL4. Une mutation nulle du gène *CUL4A* chez la souris, donne un phénotype de létalité embryonnaire et une mutation conditionnelle conduit à de nombreux défauts d'organes provoquant la mort des souris adultes (Li et al. 2002). La protéine *CUL4B* est fonctionnelle dans ces mutants mais elle est incapable de compléter les effets de la mutation du gène *CUL4A*. Ainsi, malgré des similarités de séquences, il semble exister une certaine divergence fonctionnelle entre les protéines *CUL4A* et *CUL4B*. La caractérisation d'un mutant *cul4b* de souris permettrait de vérifier cette hypothèse. Il a toutefois été prouvé que la protéine *CUL4B* humaine participe à l'inactivation du chromosome X. En effet, plusieurs patients atteints de déficience mentale, liée à un profil d'inactivation inexact du chromosome X, ont des mutations au niveau du gène *CUL4B* (Zou et al. 2007, Tarpey et al. 2007, 2009).

Ces dernières années, la structure et la fonction des E3 ligases contenant la CUL4 ont été décrites de manière plus détaillée. Elles forment la grande famille des complexes CUL4 (« Cullin4-Ring E3 Ligase ») dont le cœur est constitué de trois sous-unités principales : CUL4, la charpente du complexe, ROC1/RBX1, la protéine à domaine « RING-finger » et DDB1 (« **D**amaged **D**N**A** **B**inding protein1 »), une protéine hautement conservée, d'environ 125 kDa, jouant le rôle d'adaptateur de substrat (Bernhardt et al. 2006, Chen et al. 2006, Lee et al. 2008, Wang et al. 2008, Zhang et al. 2008). L'extrémité C-terminale de la CUL4 interagit avec ROC1/RBX1, qui recrute l'enzyme E2 portant l'ubiquitine active, pour former le module catalytique. A ce moment là, l'architecture du complexe CUL4 se modifie pour positionner le substrat vis-à-vis de l'enzyme de conjugaison E2 et faciliter ainsi le transfert de l'ubiquitine sur la protéine cible (Zheng et al. 2002, Angers et al. 2006, Li et al. 2006). Quant à l'extrémité N-terminale de la CUL4, elle fixe la sous-unité DDB1. Des études cristallographiques ont permis de caractériser plusieurs domaines d'interaction protéine-protéine au sein de DDB1 (Angers et al. 2006, Scrima et al. 2008). L'un établit l'interaction avec la CUL4 et un autre est capable d'interagir avec un large éventail de protéines à domaine WD40. Différentes approches (protéomiques, bioinformatiques et structurales) ont effectivement permis d'identifier une cinquantaine de ces interactants particuliers appelés DWD (« **D**DB1-binding **W**D**40** ») ou DCAF (« **D**DB1-**C**UL4-**a**ssociated **f**actors ») (Fig 8) (He et al. 2006, Higa et al. 2006, Angers et al. 2006, Jin et al. 2006, Lee et Zhou 2007). La



### Fig 8 : Architecture moléculaire des complexes CUL4-E3 ligases

Les CUL4-E3 ligases sont composées de 4 sous-unités de base (RBX1, CUL4, DDB1 et DCAF). De manière similaire aux autres membres de la famille des Cullines, la partie N-terminale de la CUL4 interagit avec la sous-unité adaptatrice DDB1, tandis que son domaine C-terminal fixe une petite protéine à domaine «RING finger» (RBX1), qui permet de recruter l'enzyme de conjugaison E2 portant l'ubiquitine active. Ensembles, elles forment le centre catalytique de l'enzyme E3. DDB1 interagit avec des protéines additionnelles, nommées DCAFs, parmi lesquelles se trouvent DDB2, CSA ou encore CDT2. Elles complètent le module de reconnaissance des substrats des complexes CUL4 et permettent leur ubiquitination. Parmi les cibles identifiées, on retrouve différents facteurs impliqués dans des processus divers du développement des organismes. (Sugasawa 2009)

majorité de ces DCAF renferment un motif supplémentaire, nommé WDxR, qui participe à leur reconnaissance par le complexe CUL4-DDB1. Des études de mutagenèse ont plus exactement démontré que le résidu arginine de ce motif est important, mais pas suffisant, à la mise en place de cette interaction (Angers et al. 2006, Jin et al. 2006).

Le génome d'*Arabidopsis* possède tous les gènes codant le cœur du complexe CUL4-E3 ligase. Chez les plantes, une réduction du niveau d'expression du gène CUL4 entraîne également l'apparition de nombreux défauts du développement (Bernhardt et al. 2006, Chen et al. 2006). La différence avec les autres organismes réside dans le fait qu'*Arabidopsis* possède deux homologues de *DDB1* dénommés *DDB1A* et *DDB1B*. Aucun phénotype particulier n'a été associé à la mutation *ddb1a* tandis que le mutant *ddb1b* présenterait une létalité embryonnaire (Schroeder et al. 2002). Récemment, 85 protéines à domaine WD40 ont été identifiées chez *Arabidopsis*. Elles comportent un ou deux motifs conservés de 16 acides aminés, appelé « DWD-box », qui participe à l'interaction avec la sous-unité DDB1 afin de former conjointement le module de reconnaissance des protéines cibles (Lee et al. 2008, Zhang et al. 2008).

L'ensemble de ces résultats suggèrent l'existence *in vivo* d'une grande variété de complexes CUL4-DDB1<sup>DCAF/DWD</sup>-E3 ligases, potentiellement impliqués dans des aspects différents du développement des organismes.

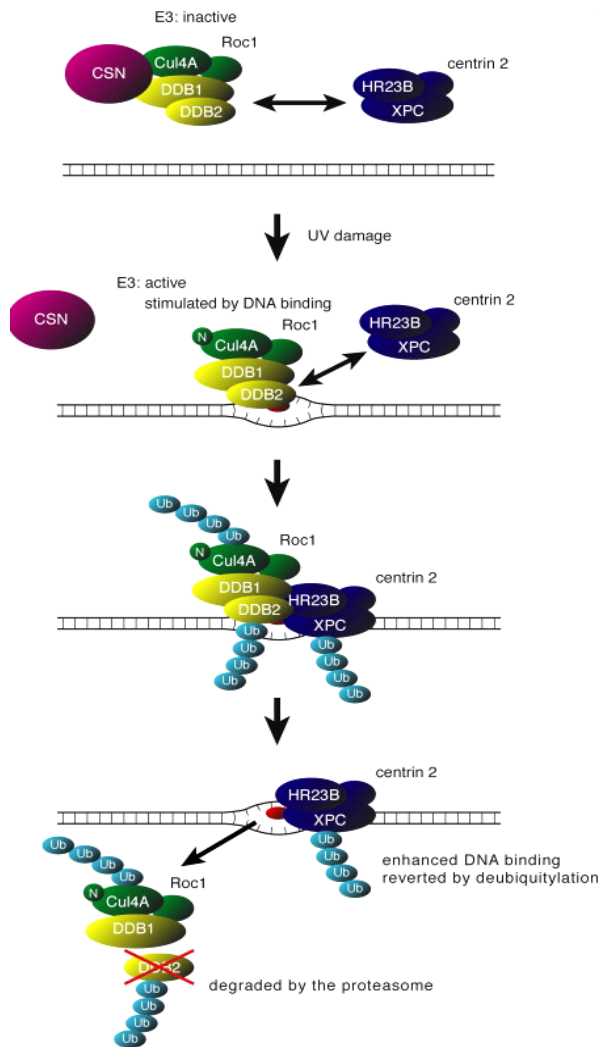
#### 1.1.3.3.2.2.5.1 Le complexe CUL4-DDB1 et la réparation de l'ADN

Tous les organismes vivants sont continuellement soumis à des facteurs environnementaux portant atteinte à l'intégrité de leur génome. La réparation par excision de nucléotide (NER : « Nucleotid **E**xcision **R**epair ») est la voie principale destinée à éliminer les lésions de l'ADN (Shuck et al. 2008). Elle est composée de 5 étapes : la reconnaissance de la lésion, ouverture du complexe de pré-incision, excision sur le brin endommagé d'un segment de plusieurs nucléotides encadrant la lésion, polymérisation et ligation du nouveau brin synthétisé. Des défauts héréditaires de ce processus de réparation sont à l'origine d'une maladie autosomale récessive appelée **X**eroderma **p**igmentosum (**XP**). Les patients atteints présentent une hypersensibilité aux UVs et sont prédisposés à développer un cancer de la peau induit généralement par les rayonnements solaires.

On distingue deux types de mécanismes de réparation par excision de nucléotides: le mécanisme réparant les lésions sur l'ensemble du génome, appelée GGR (« **G**lobal **G**enome **R**epair »), et celui réparant les lésions présentes uniquement sur les portions d'ADN transcrites, appelé TCR (« **T**ranscription **C**oupled **R**epair »). Dans le GGR, la reconnaissance

des lésions est assurée par le complexe DDB1-DDB2 (XPE) qui recrute les protéines essentielles à l'initiation de la réparation. Un lien a été établi entre la protéolyse ubiquitine dépendante et la NER grâce à l'identification d'une CUL4-E3 ligase incluant les sous-unités DDB1-DDB2 (Groisman et al. 2003). DDB2 est une protéine à domaine WD40 à motif DWxR, comportant un domaine de liaison à l'ADN (He et al. 2006, Higa et al. 2006). Elle possède toutes les caractéristiques pour former le module de reconnaissance du complexe CUL4-E3 ligase décrit précédemment. En effet, dans un groupe de patients atteints du syndrome XP, une mutation ponctuelle du gène DDB2, affectant le résidu arginine du motif DWxR, réduit l'activité du complexe XPE et semble être à l'origine de la maladie (Rapic-Otrin et al. 2003). Une des protéines essentielles à l'initiation de la réparation appelée XPC serait une cible directe du complexe CUL4-DDB1<sup>DDB2</sup>. Il a effectivement été prouvé que suite à des irradiations UV, l'activation du complexe CUL4-E3 ligase correspondant, engendrait l'ubiquitination de XPC, de DDB2 et des histones H2A, H3 et H4 (Kapetanaki et al. 2006, Wang et al. 2006, Sugasawa et al. 2005). Ce mécanisme reste toutefois peu compris même si un modèle se précise (**Fig 9**). Il décrit qu'en absence de lésions, le complexe CUL4-DDB1<sup>DDB2</sup> est maintenu à l'état inactif par le complexe CSN (« COP9 signalosome »). Lorsque l'ADN est endommagé, la E3 ligase s'assemble sur le site de la lésion via une interaction directe entre l'ADN et la sous-unité DDB2. Le complexe de réparation composée des protéines XPC, Rad23B et la Centrine, est recruté à son tour au niveau de la lésion via une interaction avec DDB2 (Groisman et al. 2003, Wang et al. 2004). Le COP9 signalosome se dissocie alors du complexe CUL4-DDB1<sup>DDB2</sup> par un mécanisme encore inconnu qui engendre l'activation de la E3 ligase. Ainsi, elle permet l'ubiquitination de sa cible XPC mais également du récepteur de substrat DDB2 et de la CUL4 elle-même. Alors que l'ubiquitination de DDB2 diminue son affinité de liaison à l'ADN et la dirige vers la dégradation, l'ubiquitination de XPC augmente son affinité avec le site de la lésion sans pour autant la conduire au protéasome 26S (El-Mahdy et al. 2006). Quant à l'ubiquitination des histones, cette modification est supposée affecter la structure de la chromatine dans le but de faciliter le recrutement des complexes de réparation (Kapetanaki et al., 2006, Wang et al., 2006).

Il existe un autre complexe similaire à la ligase CUL4-DDB1<sup>DDB2</sup> où la sous-unité DDB2 est remplacée par la protéine à domaine WD40, CSA (« Cockayne syndrome A »). Une mutation induite au niveau de cette protéine est à l'origine d'une maladie similaire à Xeroderma pigmentosum, appelée Cockayne syndrome. De la même manière, elle est associée à un défaut de réparation de l'ADN. En effet, les patients atteints de cette anomalie



**Fig 9 : Mécanisme d'initiation de la réparation (NER) des lésions de l'ADN induites par les rayons UVs**

En absence de lésion, le complexe E3 ligase CUL4-DDB1-DDB2 est inactivé par son association avec le COP9 signalosome (CSN). Dans ce cas, malgré une interaction possible entre la CUL4-E3 ligase et le complexe d'initiation de la réparation, la sous-unité XPC n'est pas ubiquitinée. Suite à des irradiations UVs, le complexe CUL4-DDB1-DDB2 reconnaît l'ADN endommagé et se fixe directement à l'endroit de la lésion. Il est activé par la dissociation avec le complexe CSN et la modification post-traductionnelle de la CUL4 (neddylation/rubylation). Son activité est également stimulée par la fixation sur l'ADN endommagé. Ainsi, la CUL4 recrute XPC, et les sous-unités lui étant associées, via une interaction protéine-protéine. XPC, DDB2 et la CUL4 sont alors ubiquitinées sur le site de la lésion. Suite à cette modification, le complexe CUL4-DDB1-DDB2 perd son affinité de liaison à la lésion tandis que la polyubiquitination de XPC permet de renforcer la fixation du complexe d'initiation de la réparation au site endommagé. La sous-unité DDB2 est dégradée par le protéasome 26S et conduit à la dissociation du complexe CUL4. Lorsque la fonction de XPC est accomplie, la protéine retrouve sa forme initiale grâce à des enzymes de déubiquitination. (Sugasawa *et al.* 2005)



souffrent généralement d'une hypersensibilité aux UVs, additionnée d'une neurodégénérescence précoce (Bootsma et al. 1995, Cleaver et al. 2009). Contrairement au complexe CUL4-DDB1<sup>DDB2</sup>, cette E3 ligase est impliquée dans la réparation TCR. Dans ce mécanisme, elle participe à la reconnaissance de la lésion mais sans former de lien direct avec l'ADN endommagé. Tout d'abord, le complexe CUL4-DDB1<sup>CSA</sup> reconnaît l'ARN PolyméraseII dont la progression est stoppée par la lésion. Il fixe ensuite la protéine CSB, qui constitue le substrat de cette E3 ligase, et permet le recrutement des complexes de la voie de réparation NER (Fousteri et al. 2006).

Contrairement aux mammifères, les plantes possèdent un système efficace de réparation des lésions, n'impliquant pas l'excision de brin d'ADN. Ce mécanisme est régulé par des protéines appelées photolyases (Jiang et al. 1997, Nakajima et al. 1998). Elles permettent, en présence de lumière, la réparation des lésions induites exclusivement par les rayons UVs. Malgré le fait que ce mécanisme semble constituer la voie principale de réparation chez les plantes, le génome d'*Arabidopsis* renferme des homologues de tous les gènes codant pour les sous-unités du complexe CUL4-DDB1<sup>DDB2</sup>. Nous avons démontré que ce complexe pouvait s'assembler *in vivo* et de manière similaire aux cellules animales, participer au maintien de l'intégrité du génome chez les plantes (Molinier et al. 2008). Plus récemment, un homologue du gène *CSA* a été caractérisé chez *Arabidopsis* qui de manière semblable aux mammifères, agirait dans les processus de réparation de l'ADN (Biedermann et Hellmann 2010).

#### 1.1.3.3.2.5.2 Le complexe CUL4-DDB1 et le cycle cellulaire

L'intégrité du génome est maintenue par les mécanismes de reconnaissance et de réparation des lésions mais implique également la duplication fidèle du génome. Une propagation des mutations intervient lorsque les mécanismes, contrôlant la phase S du cycle cellulaire, sont altérés. Une défaillance des systèmes permettant une seule duplication de l'ADN au cours d'un cycle peut également modifier la ploïdie des cellules et engendrer une instabilité génomique.

La protéine CDT1 est un facteur crucial du maintien de l'équilibre cellulaire (Zhong et al. 2003, Arias et al. 2005). Elle s'associe au complexe de pré-réplication (preRC) et permet le recrutement du complexe MCM, essentiel à la réplication de l'ADN pendant la phase S (Nishitani et al. 2002, Machida et al. 2005). Pour éviter une ré-initiation de la réplication au cours d'un même cycle, la dégradation ou l'inactivation de CDT1 est donc indispensable.

Des études chez *C. elegans* ont permis de mettre en évidence le rôle de la CUL4 dans l'initiation de la réplication via la régulation de la stabilité de CDT1 (Zhong et al. 2003).

Quant aux mammifères, ils possèdent deux complexes E3 ligase indépendants, SCF<sup>SKP2</sup> et CUL4<sup>DDB1</sup>, capables d'ubiquitiner CDT1 et de le diriger vers la dégradation par le protéasome 26S (Li et al. 2003, Nishitani et al. 2006). Cependant, en réponse aux lésions induites sur l'ADN ainsi qu'au cours de la phase S, seule la CUL4-E3 ligase semble être requise à la protéolyse de CDT1 (Higa et al. 2003, Hu et al. 2004, Takeda et al. 2005).

D'autres acteurs participent également à cette régulation. D'une part, la protéine CDT1 possède un domaine d'interaction protéine-protéine qui lui permet d'interagir avec une protéine connue pour améliorer la processivité des ADN Polymérase, nommée PCNA. En fin de la phase S et lorsque des lésions de l'ADN sont présentes, ce motif joue un rôle dans la reconnaissance de CDT1 par la ligase CUL4-DDB1 (Hu et al. 2006, Nishitani et al. 2006, Senga et al. 2006). Des études supplémentaires ont démontré que l'assemblage du complexe CUL4<sup>DDB1</sup> sur la chromatine est effectivement dépendant de l'interaction entre PCNA et CDT1 (Arias et al. 2006). Etant donné que PCNA est uniquement présente au cours de la réplication de l'ADN ou lorsque l'ADN subit des réparations, elle constitue le signal pour la modification et la dégradation de CDT1. D'autre part, CDT1 interagit avec la protéine CDT2, une sous-unité du complexe CUL4-DDB1 (Jin et al. 2006). CDT2 est une protéine à domaine WD40 et apparaît comme un module de reconnaissance des substrats du complexe CUL4-E3 ligase (Higa et al. 2006). En fait, en présence du signal de réplication, CDT1 interagit avec PCNA et recrute la protéine CDT2 au sein du complexe CUL4-DDB1 (Jin et al. 2006). Lorsque la réplication est achevée, le facteur CDT1 est dégradé pour empêcher une re-réplication du génome. La E3 ligase doit être activée pour accomplir sa fonction et initier la protéolyse ubiquitine-dépendante de CDT1. Cependant, les mécanismes de régulation intervenant dans cette activation restent à clarifier.

Chez *Arabidopsis*, deux homologues de *CDT1*, *CDT1A* et *CDT1B*, sont présents. *CDT1A* est le plus proche homologue du gène *CDT1* de levure. Il semble jouer un rôle dans la réplication de l'ADN et sa régulation implique la voie de la protéolyse ubiquitine-dépendante (Castellano et al. 2004). Cependant, aucun complexe E3 ligase n'a été associé à la reconnaissance et l'ubiquitination de CDT1.

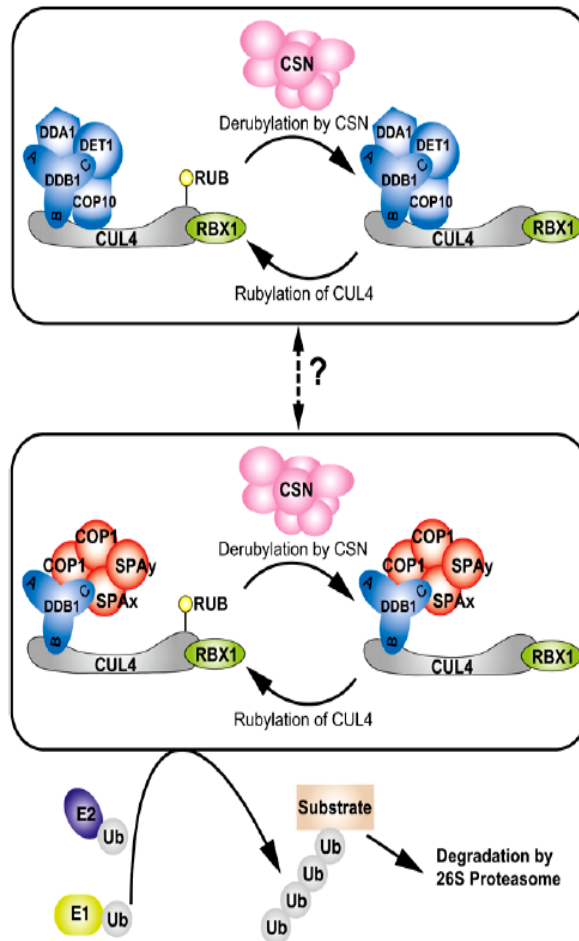
#### 1.1.3.3.2.5.3 Le complexe CUL4-DDB1 et la photomorphogénèse

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

l'obscurité. L'ensemble de ces réponses physiologiques à la lumière est appelé photomorphogénèse. Des études génétiques ont identifié plusieurs mutants affectés dans cette voie, appelés *cop* (« constitutive photomorphogenic »), *det* (« de-etiolated ») ou *fus* (« Fusca ») (Strickland et al. 2006). Les protéines issues de la famille des gènes *COP/DET/FUS* appartiennent à trois complexes majeurs, impliqués dans l'ubiquitination et la dégradation de régulateurs positifs de la photomorphogénèse (Osterlund et al. 2000, Holm et al. 2002, Yi et Deng 2005). Ces complexes sont : le COP9 signalosome (CSN), le complexe COP1 et le complexe CDD («COP10, DDB1A et DET1»).

La protéine COP1 a été caractérisée pour la première fois chez *Arabidopsis*, comme étant un régulateur négatif de la croissance des plantes. Elle loge au sein d'un complexe d'environ 700 kDa qui agit en tant qu'ubiquitine E3 ligase dont les cibles sont des facteurs permettant l'initiation de la photomorphogénèse (Saijo et al. 2003, Yi and Deng 2005). Parmi eux, on compte au moins quatre facteurs de transcription : HY5, HYH, LAF1 et HFR1 (Saijo et al. 2003, Holm et al. 2002, Seo et al. 2003, Jang et al. 2005, Yang et al. 2005). De plus, COP1 est une protéine à domaine WD40 sans motif WDxR, qui s'associe d'une part, avec le complexe CUL4-DDB1 et d'autre part, avec une protéine nucléaire de 62kDa, DET1 (He et al. 2006). Il a été démontré que ce complexe régule l'ubiquitination et la dégradation du facteur de transcription c-Jun, dans les cellules animales (Wertz et al. 2004). Chez les plantes, une interaction génétique a été mise en évidence entre DET1, également un inhibiteur de la photomorphogénèse, et COP1, mais aucun lien physique entre ces deux protéines n'a été démontré (Pepper et al. 1994, Osterlund et al. 2000, Chen et al. 2006). Etant donné qu'elles semblent jouer des rôles importants dans une même voie biologique chez les végétaux, elles font probablement parti de deux complexes CUL4-E3 ligase distincts (Chen et al. 2010). En effet, un complexe CUL4-DDB1 renfermant les sous-unités COP1 et SPA1, un acteur supplémentaire de la répression de la photomorphogénèse, a été mis en évidence chez *Arabidopsis* (Hoecker 2005, Nixdorf et Hoecker 2010, Chen et al. 2010). Cependant, le mécanisme d'action de ce complexe dans la régulation de la photomorphogénèse n'a pas encore été élucidé (Fig 10).

Concernant la protéine DET1, elle appartient au complexe CDD qui siège au sein d'un autre complexe d'environ 350 kDa (Schroeder et al. 2002). Suite à l'identification, par différentes approches biochimiques et génétiques d'une interaction directe entre DET1 et DDB1A, des études supplémentaires ont été menées dans les plantes et les cellules humaines, afin d'identifier les autres interactants de ce complexe. Ainsi, il a été établi que DDB1 et



**Fig 10 : Modèle de régulation de la photomorphogenèse chez les plantes**

Le complexe RBX1-CUL4 et le complexe CDD (« COP10, DDB1, DET1 ») forment une E3 ligase fonctionnelle tandis que le complexe RBX1-CUL4-DDB1 interagit avec COP1-SPA pour former un autre type de E3 ligase, également impliquée dans les réponses à la lumière. La modification post-traductionnelle (rubylation («RUB»)) de ces CUL4-E3 ligases est assurée par le complexe CSN. Leur activité permet ainsi de contrôler en aval, la dégradation des facteurs impliqués dans la photomorphogenèse. Un lien fonctionnel existe entre ces deux CUL4 mais il nécessite d'avantage d'investigations («?»). (Ub : ubiquitine, E1 : enzyme d'activation de l'ubiquitine, E2 : enzyme de conjugaison de l'ubiquitine). (Chen et al. 2010)

DET1 s'associaient aux protéines COP10, CUL4 et RBX1 pour former un complexe CUL4-E3 ligase impliqué dans la régulation des réponses à la lumière (**Fig 10**) (Wertz et al. 2004, Yanagawa et al. 2004, Bernhardt et al. 2006, Chen et al. 2006). Le complexe CUL4 participe à cette voie biologique, notamment par son interaction avec la sous-unité COP10. COP10 est une enzyme E2-like, possédant une activité de conjugaison de l'ubiquitine, qui est impliquée dans la répression de la photomorphogenèse en absence de lumière (Suzuki et al. 2002). Elle a également la capacité d'augmenter l'activité de plusieurs E3 ligases (Lau et Deng 2009).

Le CSN est également un complexe connu pour intervenir dans l'activation des enzymes CULLINE-E3 ligases par son action de dé-neddylation/dé-rubylation (Lyapina et al. 2001, Schwechheimer et al. 2001). Il est composé de 8 sous-unités dont 6 sont de la famille des protéines COP/DET/FUS (Wei et al. 1994, Serino et Deng, 2003). Les mutants *csn* présentent un phénotype similaire aux mutants *cop/det/fus*, confirmant son implication dans la régulation de la photomorphogenèse probablement via l'activation de l'enzyme CUL4-E3 ligase (**Fig 10**).

Des expériences de coimmunoprécipitation ont effectivement prouvé l'existence d'une association *in vivo* entre le complexe CDD et les complexes CSN et COP1. Ces résultats suggèrent que ces trois complexes agissent ensembles sur la régulation de la protéolyse ubiquitine dépendante des acteurs de la photomorphogenèse (**Fig 10**) (Yanagawa et al. 2004). Cependant, l'action de chaque complexe dans cette voie de régulation ainsi que les mécanismes exacts de leur activité concertée, sont inconnues à ce jour.

## **1.2 Régulation de la réaction d'ubiquitination**

Etant donné le nombre important d'intervenants dans la voie de l'ubiquitination, sa régulation est un processus complexe pouvant intervenir à différentes étapes. Son contrôle peut se faire au niveau des acteurs principaux de l'ubiquitination telles les enzymes E1, E2 ou E3, ou bien au niveau du substrat lui-même. D'autres enzymes sont également capables de réguler la dégradation des protéines cibles après leur ubiquitination.

### **1.2.1 Régulation des acteurs clés de la voie de l'ubiquitination**

Exceptée l'enzyme E1, qui est constitutivement active, ce sont donc les enzymes E2 et E3 qui déterminent le contrôle de l'ubiquitination des substrats. Cette régulation peut intervenir au niveau de la transcription des E2 ou E3. Elle peut également impliquer des modifications post-traductionnelles de ces enzymes, un changement de leur localisation, ou leur association avec d'autres protéines régulatrices.

Un exemple de régulation transcriptionnelle est la protéine à « F-Box » humaine SKP2. Elle est régulée au cours du cycle cellulaire avec un pic d'accumulation de ses transcrits durant les phases G1 et S. Dans cet intervalle de temps, elle permet la dégradation du substrat P27 et l'activation de la kinase CDK. L'expression différentielle des gènes ASK au cours du développement des plantes illustre ce type de régulation (Liu et al. 2004, Zhao et al. 2003).

La modification post-traductionnelle des complexes E3 joue également un rôle dans le contrôle du mécanisme d'ubiquitination. La protéine CDH1, sous-unité de l'APC responsable de la reconnaissance des substrats, est phosphorylée par le complexe CDK. Cette phosphorylation empêche l'interaction de CDH1 avec l'APC, rendant le complexe APC<sup>CDH1</sup> inactif. La liaison ne peut être établie que si CDH1 a été au préalable déphosphorylée par la phosphatase CDC14 (Zachariae et al. 1998).

La relocalisation de certaines protéines peut aussi influencer la dégradation des substrats. Ceci a été démontré pour la protéine MDMX, un régulateur de p53, qui est normalement localisé dans le cytoplasme. Lorsque des lésions sont induites au niveau de l'ADN, MDMX est phosphorylée et importée dans le noyau. Sa nouvelle localisation permet sa reconnaissance par une E3 ligase nucléaire à domaine « RING finger » appelée MDM2, qui l'ubiquitine et la dirige vers le protéasome, lieu de sa dégradation (LeBron et al. 2006).

Dans le cas des complexes E3 contenant la Culline, c'est l'état de neddylation/rubylation de cette dernière qui va influencer son activité. La protéine NEDD/RUB est conjuguée sur un résidu lysine conservé des Cullines par un mécanisme similaire à celui de l'ubiquitination, qui implique également 3 types d'enzymes : E1-, E2- et E3-like. Chez *Arabidopsis*, RUB est tout d'abord activée par l'hétérodimère AXR1-ECR1 et sa conjugaison est assurée par l'enzyme E2-like, RCE1. La fixation de RUB sur la Culline est facilitée par la sous-unité RBX1, qui joue ainsi le rôle de la ligase E3-like (Gray et al. 2002). Un autre régulateur des E3, le complexe COP9/signalosome, initialement découvert chez les plantes en tant que répresseur de la photomorphogénèse, participe également à la régulation de l'ubiquitination. Il catalyse le clivage entre la Culline et les protéines NEDD/RUB, conduisant à une inhibition du complexe E3 (Lyapina et al. 2001). Le signalosome permettrait également de protéger les sous-unités de ces complexes en l'absence de leurs substrats (Schwechheimer 2004).

Un nouveau type de régulation de l'activité des complexes E3 a été mis en évidence avec la découverte d'un récepteur de l'auxine : la protéine à « F-box » TIR1 (Dharmasiri et al. 2005). Il s'agit du premier exemple de régulation par fixation d'une molécule signal directement sur le complexe SCF<sup>TIR1</sup> (Dharmasiri et al. 2005, Tan et al. 2007).

### 1.2.2 Régulation par modification du substrat

La modification de la protéine cible est également un mécanisme essentiel au contrôle de sa propre dégradation. Jusqu'à présent, la phosphorylation est la modification la plus couramment rencontrée parmi les substrats de la voie de l'ubiquitination. C'est le cas de la protéine de levure SIC1, un inhibiteur des complexes Cycline/CDK, qui doit être phosphorylée sur plusieurs résidus pour pouvoir être finalement reconnue par le complexe SCF<sup>CDK4</sup> et dégradée par le protéasome. Cette dégradation libère l'activité kinase du complexe Cycline/CDK, indispensable à la transition G1/S du cycle cellulaire (Verma et al. 1997, Sedgwick et al. 2006).

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

D'autres modifications post-traductionnelles, telles que la N-glycosylation ou l'hydroxylation de certains acides aminés, participent aussi au contrôle de la reconnaissance des protéines cibles. Ces deux modifications interviennent respectivement dans le transport reticulo-endoplasmique et dans la dégradation du facteur de transcription HIF1 $\alpha$  (Kim et Kaelin 2003, Yoshida et al. 2006).

### 1.2.3 Régulation par déubiquitination

Il existe un certain nombre d'enzymes capables de déubiquitiner une protéine. Elles sont appelées DUB (« DeUbiquitin ») et on en compte une trentaine codées par le génome d'*Arabidopsis* (Doelling et al. 2001). Elles sont divisées en deux classes. D'une part, les enzymes UCH (« Ubiquitin Carboxy-terminal Hydrolase »), qui clivent les précurseurs de l'ubiquitine au cours de leur synthèse et d'autre part, les enzymes UBP (« Ubiquitin-specific Processing enzymes »), qui sont impliquées dans la coupure des chaînes d'ubiquitine. Ces dernières permettent non seulement le recyclage des molécules d'ubiquitine après dégradation du substrat auquel elles étaient fixées, mais peuvent également modifier la longueur de la chaîne d'ubiquitine afin de réguler la dégradation de la protéine cible (Amerik et Hochstrasser 2004).

## 1.3 La dégradation par le protéasome 26S

Après avoir été ubiquitinées, les protéines sont dirigées vers le protéasome 26S, lieu de leur dégradation. Pour cela, les substrats doivent porter au moins 4 résidus d'ubiquitine, branchés sur les lysines 48.

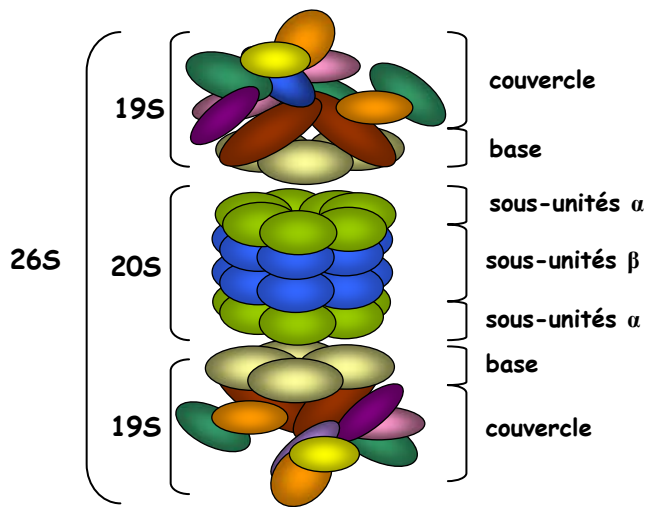
### 1.3.1 Structure du protéasome 26S

Le protéasome eucaryote est un gros complexe protéique de 2 MDa, à activité protéolytique (Smalle et al. 2004) (Fig 11). Il est composé de deux parties différentes : le complexe 20S ou CP (« **C**ore **P**article ») et le complexe 19S ou RP (« **R**egulatory **P**article »). Le complexe 19S est également appelé « coiffe » et comporte deux parties distinctes : la base (« **B**ase »), un anneau formé de six sous-unités, et le couvercle (« **L**id ») comportant 9 protéines. Les sous-unités du couvercle sont responsables de la reconnaissance et de la déubiquitination du substrat, tandis que celles de la base permettent de dénaturer la protéine cible afin qu'elle puisse pénétrer dans le tunnel central du complexe 20S. Ce dernier est composé de quatre anneaux de sept sous-unités chacun. Les deux anneaux externes sont formés de sous-unités de type  $\alpha$  tandis que les deux anneaux internes comportent des sous-unités de type  $\beta$ . Cette structure en tonneau définit un tunnel renfermant l'activité protéolytique. Les substrats y sont réduits en peptides ayant une taille variable (Glickman et al. 1998, Glickman et Ciechanover 2002).

### 1.3.2 Les différentes étapes du mécanisme de dégradation par le 26S

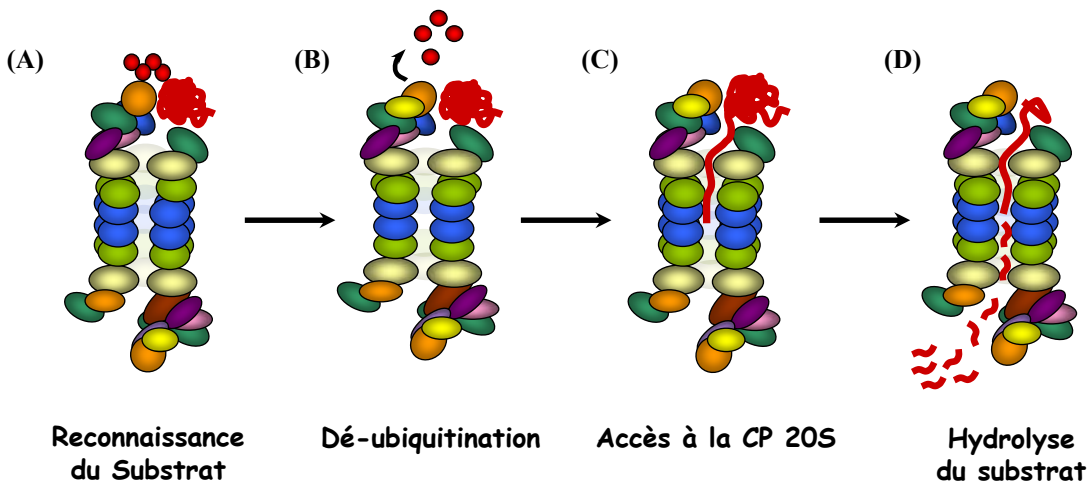
Pour pouvoir atteindre l'activité protéolytique située dans la partie CP 20S, les substrats doivent au préalable être reconnus et modifiés de façon à permettre leur pénétration dans le tunnel (Fig 12). La coiffe semble être responsable de ces étapes. En effet, les sous-unités RPN1 (« **R**egulatory **P**article **N**on-ATPase ») et RPN10 du couvercle peuvent lier l'ubiquitine et seraient ainsi capables de reconnaître les protéines polyubiquitinées (Elsasser et al. 2002, 2004). Une fois reconnues, les cibles sont déubiquitinées. Les sous-unités du couvercle RPN11 et RPN13 ont des activités protéolytiques compatibles avec cette fonction (Verma et al. 2002, Yao et Cohen 2002). Le substrat doit ensuite être linéarisé. En effet, des études structurales du complexe 20S indiquent que seul un polypeptide linéaire peut entrer dans le tunnel, dont l'accès central est bloqué par les parties N-terminales des sous-unités  $\alpha$  (Groll et al. 1997). Par conséquent, il doit exister un mécanisme actif d'importation du substrat dans la CP 20S. Cette étape nécessite la dénaturation du substrat, action que la « base » pourrait accomplir (Braun et al. 1999). Quant au mécanisme d'entrée de la chaîne polypeptidique dans le protéasome, il est encore mal compris. Une fois internalisée, la protéine est clivée en peptides de 7 à 9 acides aminés, la taille exacte restant sujette à discussion (Wenzel et Baumeister 1995, Kisselev et al. 1998, 1999). Ce sont les différentes activités protéolytiques (chymotrypsine, trypsine, « peptidylglutamyl peptide hydrolyzing) du complexe 20S qui





**Fig 11 : Organisation du protéasome 26S**

Le protéasome est composé de deux complexes distincts : le complexe 19S et le complexe 20S. Le complexe 20S, composé de quatre anneaux de 7 sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$ , renferme l'activité protéolytique. Le complexe 19S ou coiffe, est formé de deux parties différentes appelées la «base» et le «couvercle» qui permettent la reconnaissance et la dénaturation des protéines cibles polyubiquitinées.



**Figure 12 : Mécanisme d'action du protéasome 26S**

Les protéines poly-ubiquitinées sont d'abord reconnues par le «couvercle» (RP19S) (A), dé-ubiquitinées (B), puis importées dans la partie centrale du complexe 20S (CP20S) où elles sont danaturées (C), puis hydrolysées en peptides de taille moyenne de 7 et 9 acides aminés.

permettent l'hydrolyse des protéines cibles (Rivett 1989). Les peptides générés sont relargués par le complexe grâce à un mécanisme encore inconnu.

## **2 La division cellulaire et le développement des plantes**

La division cellulaire est le mode de multiplication de toute cellule. Sa régulation est importante pour la croissance des êtres vivants et pour le maintien des caractéristiques essentielles d'une espèce au fil des générations. Elle assure également un brassage génétique au sein d'une population grâce aux processus cellulaires que sont la méiose et la fécondation.

Au cours de l'embryogenèse animale, les structures de l'embryon mettent progressivement en place le plan de formation de l'organisme. Les différents organes, incluant les gamètes, sont complètement définis à la fin de ce processus. Quant aux végétaux, leur plan de formation n'est établi que partiellement au cours de l'embryogenèse et leur morphogenèse est finalisée de manière post-embryonnaire. Pour cela, les plantes renferment des amas de cellules indifférenciées appelés méristèmes. Les méristèmes apicaux permettent la formation de toute la structure aérienne de la plante, tandis que le méristème racinaire donne naissance aux parties souterraines. La formation des organes sous-entend la formation d'ébauches au niveau du méristème, c'est-à-dire de massifs de cellules programmées pour évoluer en un organe particulier, qui vont croître jusqu'à former cet organe. Ainsi, la forme complète de la plante n'est jamais déterminée à l'avance et garde une certaine plasticité tout au long de la vie de celle-ci. Ceci s'explique par le fait que les végétaux sont des organismes sessiles qui doivent pouvoir s'adapter aux conditions environnantes afin de maintenir les caractéristiques de leur propre espèce.

### ***2.1 Croissance et Différenciation***

A la fin de l'embryogenèse, la plantule possède l'organisation de base de la plante. On distingue habituellement les méristèmes apicaux et le méristème racinaire qui renferment des amas cellulaires en prolifération. Ces amas sont appelés primordiums d'organes et constituent donc les précurseurs de ces derniers. Ils assurent la croissance de la plante en longueur, au niveau de la tige, des feuilles et des racines. Cette croissance associe deux phénomènes : la division cellulaire (mitose au niveau du méristème) et l'élongation des cellules produites.

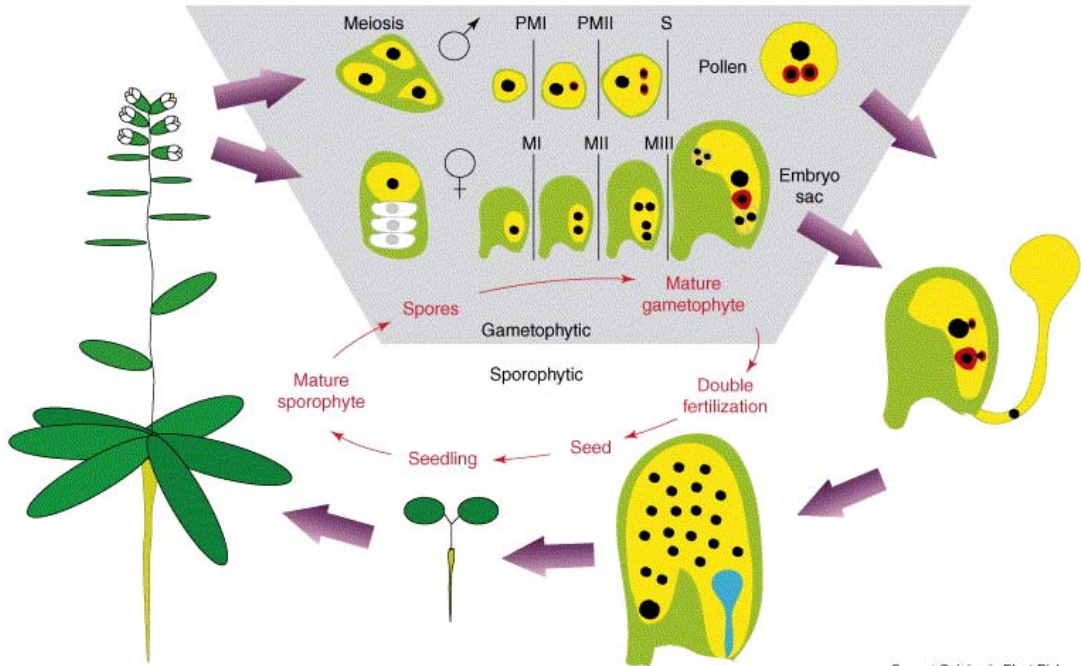
A un certain stade de l'organogenèse, les cellules cessent de se diviser, entrent dans la zone d'élongation et acquièrent finalement des caractères spécifiques en liaison avec leur fonction : c'est la différenciation. Chez les végétaux, la plupart des différenciations cellulaires sont suivies d'un processus d'endoréplication qui permettrait d'augmenter la masse et la taille de la cellule. Une fois les cellules différenciées, elles arrêtent leur division. Certaines sont toutefois capables de se remultiplier après induction. C'est notamment le cas des cultures stationnaires de cellules végétales qui reprennent leur division après ajout d'un nouveau nutriment.

L'organogenèse met également en jeu des équilibres hormonaux. L'auxine n'est pas la seule hormone végétale nécessaire au développement et à la croissance : les cytokinines interviennent également dans la division cellulaire ainsi que les gibbérellines, l'acide abscissique ou encore l'éthylène. La culture *in vitro* des cellules végétales illustre bien l'intervention conjuguée de ces hormones. En effet, si on met un fragment de plante avec autant d'auxine que de cytokinines, on stimule la prolifération cellulaire mais il n'y a pas d'apparition d'organe ; on obtient dans ce cas des cals qui sont des amas de cellules indifférenciées. Si l'on met plus d'auxine que de cytokinines, on observe le développement des racines. A l'inverse, on obtient des bourgeons. La mise en place des organes végétaux est donc essentiellement contrôlée par les proportions des hormones végétales auxine et cytokines.

## ***2.2 Le cycle de vie des plantes***

Les plantes sont caractérisées par des processus originaux de développement. À la différence de la majorité des animaux, il n'existe pas de ségrégation d'une lignée germinale au cours de l'embryogenèse. La mise en place des cellules sexuelles est spécifiée au cours du développement post-embryonnaire. De ce fait, leur cycle de reproduction comporte une alternance entre la génération dite sporophytique (ou végétative), qui représente l'individu développé dans la majorité des cas, et la génération dite gamétophytique (ou générative) (**Fig 13**). Comme son nom l'indique, la génération gamétophytique est celle qui produira les cellules sexuelles, autrement dit les gamètes.

Le cycle biologique des plantes supérieures comporte majoritairement la génération sporophytique, qui est diploïde. La prédominance de la phase sporophytique se traduit morphologiquement par la taille incomparablement plus grande des sporophytes par rapport aux gamétophytes. Quant au cycle génératif, il débute lorsque des cellules spécialisées entrent en méiose et génèrent la macrospore et la microspore. La macrospore et la microspore sont



### Figure 13 : Cycle de vie des plantes à fleurs

La majeure partie du cycle de vie des plantes à fleurs est de nature sporophytique (plante verte). Dans les fleurs, le sporophyte génère de manière asexuée les spores mâles et femelles. C'est le début de la phase gamétophytique. Celle-ci se poursuit jusqu'à ce que les spores donnent naissance aux gamètes mâles et femelles suite à différents processus de maturation. Les gamètes ainsi obtenus vont fusionner au cours de la double fécondation pour donner d'une part le zygote diploïde (bleu) et l'albumen triploïde (jaune). La double fécondation met un terme à la phase gamétophytique et représente le début de la phase sporophytique. (Berger *et al.* 2006)

des cellules haploïdes, à l'origine respectivement du gamétophyte femelle et du gamétophyte mâle. Ces gamétophytes donnent naissance aux gamètes, dont l'union forme un nouvel individu sporophytique.

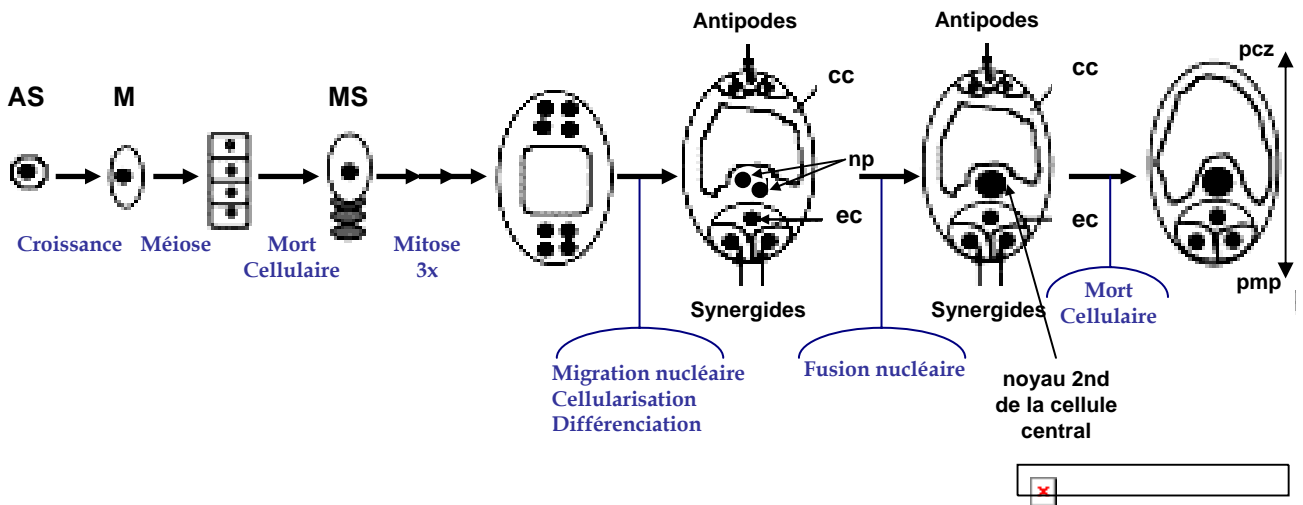
Durant la méiose se produisent des échanges entre les chromosomes d'une même paire avant que ces chromosomes ne se séparent et engendrent une diversité au sein des gamètes. La méiose joue ainsi un rôle important dans le brassage génétique et est à l'origine d'une variété importante dans le règne végétal.

## **2.3 La gaméto-genèse**

### **2.3.1 La gaméto-genèse femelle**

Les organes femelles de la fleur sont enfermés dans le pistil. Dans sa partie centrale, le placenta porte des ovaires dont une cellule, la cellule mère de la mégaspore, va donner le sac embryonnaire renfermant les cellules sexuelles femelles matures. La première étape est une méiose de la cellule mère de la mégaspore donnant quatre cellules haploïdes (**Fig 14**). Trois de ces cellules vont dégénérer, ne laissant plus qu'une seule cellule, la mégaspore. Son noyau (haploïde) va alors se diviser trois fois sans cytokinèse pour former un sac embryonnaire à huit noyaux haploïdes. Deux de ces noyaux vont rester dans la partie centrale et les six autres vont migrer aux pôles de la cellule, trois à chaque pôle, et vont se cellulariser pour donner un sac à huit noyaux et sept cellules. Les deux noyaux de la cellule centrale fusionnent ensuite, terminant le processus de maturation du sac embryonnaire. Le sac embryonnaire mature contient les deux gamètes : la cellule centrale diploïde et l'oosphère, ainsi que des cellules additionnelles : deux synergides et trois antipodes. La cellule centrale et l'oosphère vont être fécondées par les cellules sexuelles du pollen pour donner respectivement l'albumen et le zygote. Quant aux synergides, elles jouent un rôle de soutien de l'oosphère. Elles permettent de guider le tube pollinique et participent à la réception des cellules spermatiques. Les antipodes n'ont pas encore de fonction définie et dégèrent rapidement avant la fécondation.

Le sac embryonnaire est protégé par des couches de tissus végétatifs appelés téguments. L'ensemble de cette structure forme un ovule. Le pistil d'*Arabidopsis* est capable de produire environ 40 à 70 ovules, chacun d'entre eux étant alignés et connectés individuellement au tissu placentaire qui leur délivre les nutriments nécessaires à leur développement. La fécondation de ces ovules est suivie d'un durcissement des téguments et d'une forte déshydratation des tissus qui aboutissent à la formation de graines. Le pistil qui renferme ces graines matures est appelé silique (Boavida et al. 2005).



**Figure 14 : La gamétogenèse femelle chez *Arabidopsis thaliana***

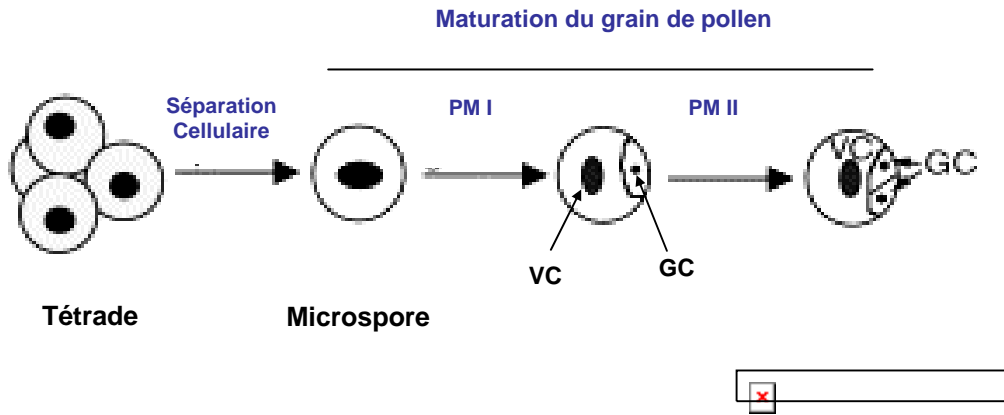
Le sac embryonnaire se développe à partir de l'archéspore (AS) qui s'accroît pour donner le méiocyte (M). Le méiocyte subit une division méiotique pour donner 4 cellules haploïdes. Trois d'entre elles dégènèrent et une seule forme la mégaspore femelle (MS) qui subit trois divisions mitotiques afin de former un sac à 8 noyaux. Suite à des processus de migration nucléaire, de cellularisation et différenciation, deux des 8 noyaux haploïdes (np=noyaux polaires) fusionnent pour former la cellule centrale diploïde (cc). Le résultat final de la gamétogenèse est un sac embryonnaire contenant 3 antipodes, 2 synergides entourant l'oosphère (ec=«egg cell») et une cellule centrale diploïde. Les antipodes résident dans le pôle chalazal (pcz) du sac embryonnaire tandis que les deux synergides se trouvent du côté du pôle mycropillaire (pmp). Adapté de (Yang et Sundaresan 2000).

### 2.3.2 La gamétogenèse mâle

La gamétogenèse mâle se produit dans les anthères des étamines. Dans les anthères, les sacs polliniques renferment des cellules spécialisées qui vont subir simultanément deux divisions méiotiques pour donner quatre cellules haploïdes. A l'issue de la méiose, ces quatre cellules sont enfermées dans la paroi de la cellule mère qui leur a donné naissance, formant une tétrade (Fig 15). Chaque cellule haploïde (microspore) est alors libérée dans le sac pollinique par la destruction de la paroi de la cellule mère. Chaque microspore passe alors par une phase de maturation pour donner un grain de pollen. Cette maturation comprend deux divisions successives du noyau haploïde pour former trois noyaux haploïdes indépendants. La première division mitotique, PMI (« **P**ollen **M**itosis **I** »), est asymétrique et donne une grande cellule, la cellule végétative. La petite cellule, dite générative, va alors subir une deuxième division, PMII (« **P**ollen **M**itosis **II** »), pour donner deux cellules sexuelles. Ces trois cellules et leurs noyaux auront des rôles différents lors de la fécondation. Par ailleurs, la maturation du grain de pollen comprend aussi le dépôt d'une paroi rigide d'intine et d'exine et finalement une déshydratation qui permet au grain de pollen mature de survivre pendant de longues périodes.

Plusieurs gènes responsables du développement du pollen ont été récemment caractérisés. Les gènes impliqués dans le déroulement du cycle cellulaire peuvent en effet affecter soit l'étape de la méiose, soit les deux divisions mitotiques successives. C'est le cas de KRP6 dont l'expression d'une version fluorescente sous la dépendance de son propre promoteur montre que cette protéine est dégradée dans la cellule générative, contrairement à la cellule végétative. Ceci suggère que KRP6 joue un rôle d'inhibiteur dans la cellule végétative afin d'empêcher des divisions supplémentaires de celle-ci (Kim et al. 2008). De plus, lorsque KRP6 est sur-exprimé sous la dépendance de LAT52, un promoteur fort du pollen, de fortes perturbations du cycle cellulaire sont détectées (Liu et al. 2008).

D'autres mutants d'*Arabidopsis* sont capables de produire du pollen ayant une seule cellule sexuelle, contrairement aux individus sauvages, qui en possèdent deux. Ceci a été observé dans les mutants *cdkA* et *caf1* (« **C**hromatin **A**ssembly **F**actor **I** ») qui, en perturbant la PMII, produisent du pollen à une cellule sexuelle unique. Dans le mutant *caf1*, cette cellule semble être capable de fertiliser indifféremment la cellule centrale ou l'oosphère, tandis que dans le mutant *cdkA*, elle aurait une préférence pour la fécondation de l'oosphère (Nowack et al. 2006, Chen et al. 2008). Cette double fécondation reste cependant un sujet de débat permanent.



**Figure 15 : La gamétogenèse mâle chez *Arabidopsis thaliana***

Les tétrades sont formées de 4 cellules haploïdes issues de méioses successives. Chaque cellule de la tétrade se sépare et suite à plusieurs étapes de maturation, donne des grains de pollen individualisés. La première étape est une mitose asymétrique (**PM I**) qui permet de générer une grande cellule végétative (**VC**) et une cellule générative (**GC**) de taille moins importante. Cette cellule générative va continuer une second division mitotique (**PM II**) afin de former deux cellules sexuelles mâles identiques. Adapté de (Yang et Sundaresan 2000).



D'autres études récentes chez *Arabidopsis* ont démontré que les deux cellules sexuelles du pollen fertilisent indifféremment les deux cellules jumelles de l'oosphère, caractéristiques des mutants *rb*. Cette fécondation particulière donne naissance à deux embryons jumeaux et prouve que les deux cellules spermatiques du pollen ont la même capacité à fertiliser l'oosphère (Ingouff et al. 2009).

#### **2.4 La double fécondation et l'embryogenèse**

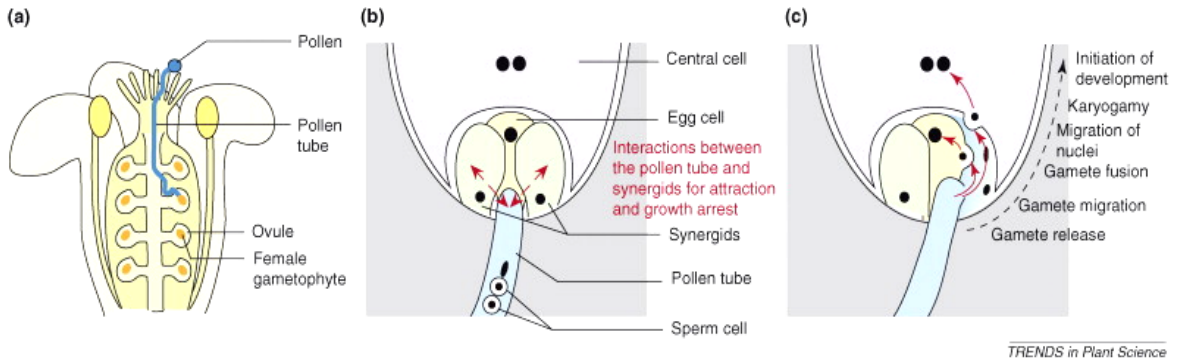
La double fécondation est un processus qui a évolué il y a des millions d'années et caractérise la reproduction des angiospermes.

Au contact des stigmates, situés à l'extrémité du pistil, le grain de pollen germe et émet un fin prolongement appelé tube pollinique. Celui-ci s'allonge progressivement le long du pistil et conduit le noyau reproducteur haploïde jusqu'au contact d'un ovule (**Fig 16-a**). Cette migration du tube pollinique à travers les tissus du pistil puis de l'ovaire est un processus actif. Lorsque le tube pollinique arrive au contact du micropyle, un petit canal au sommet de l'ovule, il libère les noyaux des deux cellules sexuelles (**Fig 16-b**) (Higashiyama et al. 2003). L'un assure la fécondation de l'oosphère tandis que l'autre noyau mâle fusionne avec la cellule centrale du sac embryonnaire (**Fig 16-c**). Ce processus est appelé double fécondation (Wilson et Yang 2004, Boavida et al. 2005). La fertilisation de l'oosphère donne alors un oeuf principal diploïde, qui se développe en embryon sporophytique à l'origine de la nouvelle descendance. Quant à la fécondation de la cellule centrale, elle permet de former l'albumen, qui s'accroît par mitoses successives pour donner un tissu nourricier triploïde aux dépens duquel l'embryon se développe (Chaudhury et al. 2001).

Quant aux tissus entourant le sac embryonnaire, ils se transforment en enveloppe de la graine. Cette enveloppe, formée de couches successives composées de parties provenant du sporophyte maternel, croît de manière synchrone avec l'embryon et l'albumen tout au long de l'embryogenèse (Berger et al. 2006).

##### **2.4.1 Le développement de l'embryon**

Chez la plante, le développement précoce de l'embryon s'effectue suivant un plan précis de divisions cellulaires. Après la fécondation, la cellule œuf ou zygote s'allonge fortement et se divise de manière asymétrique pour donner naissance à une grande cellule, dite cellule basale, et une autre plus petite, dite cellule apicale (**Fig 17-a**). L'évolution à venir de ces deux cellules diffère profondément. La petite cellule apicale forme l'embryon proprement dit, tandis que la grande cellule basale continue à se diviser transversalement pour constituer une pile de 7 à 9 cellules formant le suspenseur qui relie l'embryon à la plante-mère (**Fig 17-b**).



### **Figure 16 : Modèle schématique de la double fécondation**

(a) Entrée du tube pollinique à l'intérieur du pistil, après pollinisation. Lorsqu'un grain de pollen viable est déposé sur le sommet du pistil, celui s'hydrate et germe. Le tube pollinique émergent du pollen, s'allonge et pénètre dans le pistil jusqu'à ce qu'il rencontre le gamétophyte femelle enfermé dans l'ovule. Les tissus maternelles contrôlent l'orientation du tube pollinique.

(b) Attrait et arrêt de la croissance du tube pollinique par les synergides. Lorsque le tube pollinique atteint les alentours du gamétophyte femelle, les deux synergides positionnées de part et d'autre de l'oosphère (« egg cell ») attirent le tube pollinique par un mécanisme encore non identifié. A l'arrivée, cette interaction directe entre le tube pollinique et les synergides conduit à l'arrêt de la croissance du tube.

(c) La double fécondation proprement dite. Lorsque les deux cellules spermatisées sont libérées par le tube pollinique, l'une va féconder l'oosphère pour former l'embryon et l'autre fusionne avec la cellule centrale du sac embryonnaire pour former l'albumen. De nombreuses étapes telles que la migration et la fusion des gamètes et des noyaux ou encore l'initiation active de la transcription, sont nécessaires pour une double fécondation réussie. (Berger et al. 2008)

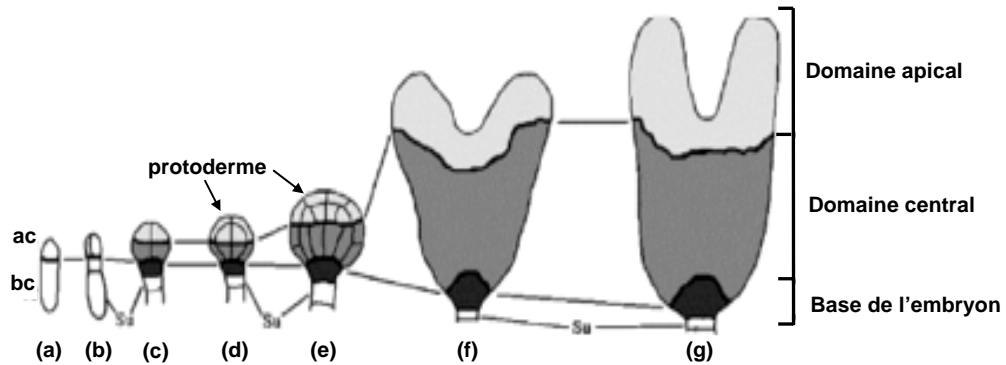
L'hypophyse est une zone qui se situe entre le suspenseur et l'embryon et donne naissance au méristème racinaire.

Concernant la cellule apicale, elle subit plusieurs divisions longitudinales jusqu'à la formation d'un pro-embryon octo-cellulaire (Fig 17-c). Ce dernier évolue vers un stade appelé dermatogène par l'intermédiaire de divisions périclines qui permettent la mise en place du protoderme (le futur épiderme) (Fig 17-d,e). Les cellules de l'embryon véritable continuent à se diviser selon des plans longitudinaux et transversaux pour aboutir à un stade globulaire puis au stade cœur (ou cordiforme) (Fig 17-f). Ce dernier est caractérisé par l'émergence de deux lobes symétriques qui donneront les futurs cotylédons. La poussée cotylédonaire continue au cours du stade torpille qui est caractérisé par la maturation des cotylédons (Fig 17-g). A ce stade, les primordiums des organes majeurs de la plante sont également mis en place (Park et Harada 2008, Bowman et Floyd 2008).

Après 10 jours de croissance, l'embryon est formé d'une vingtaine de milliers de cellules et mesure environ 0,5 mm. Il possède un plan morphologique défini, mais en miniature, identique à celui des plantules d'*Arabidopsis*. L'embryon, protégé par une enveloppe, se retrouve alors à un stade quiescent, attendant sa dissémination sous forme de graine.

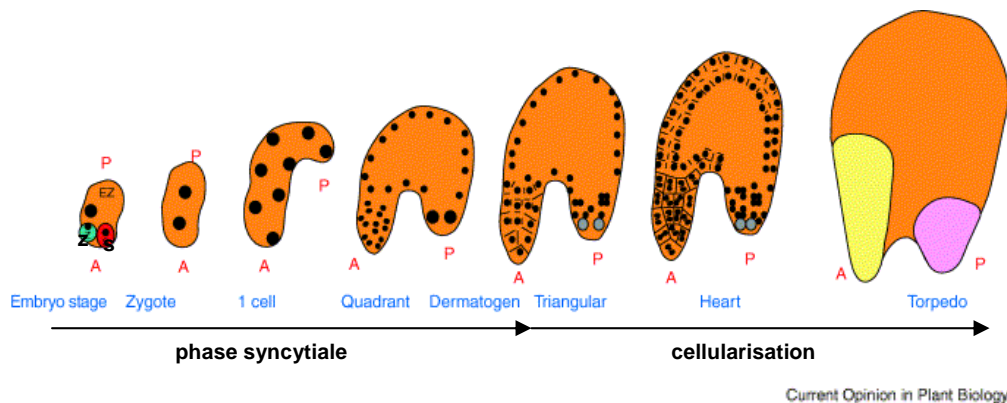
#### 2.4.2 Le développement de l'albumen

L'albumen est un type de tissu de réserves nutritives de la graine chez les angiospermes. Comme décrit précédemment, il est issu de la fusion d'un gamète mâle avec la cellule centrale binucléée du gamète femelle et est de nature triploïde. Suite à cette fécondation, la cellule centrale subit des centaines de divisions nucléaires sans engendrer de cellularisation cytoplasmique (Fig 18). Cette phase de croissance unique aux plantes, appelée phase syncytiale, permet la formation d'une cellule multi-nucléée appelée cénocyte. Lorsque l'embryon diploïde atteint le stade de quatre cellules, l'albumen est organisé en plusieurs zones : l'albumen micropylaire (MCE : « **m**icropillar **e**ndosperm ») entoure l'embryon, l'albumen périphérique (PEN : « **p**eripheral **e**ndosperm ») est organisé autour de la vacuole centrale, le long des téguments, et l'albumen chalazal (CZE : « **c**halazal **e**ndosperm ») se situe à l'opposé de l'endosperme micropylaire, formant une masse cytoplasmique très dense. Au stade cœur de l'embryon, l'albumen entre dans la phase de différenciation, qui se caractérise par l'acquisition d'un cytoplasme propre à chaque noyau, suivie d'une cellularisation (Fig 18). Cette vague de cellularisation part du micropyle, gagne l'albumen périphérique et termine sa course dans la partie chalazale. L'albumen chalazal reste cependant sous forme syncytiale jusqu'à un stade tardif de la maturation de la graine. Cette étape de différenciation est cruciale



**Figure 17 : Représentation schématique du développement embryonnaire d'*Arabidopsis thaliana***

L'embryon est issu de la fécondation entre une cellule spermatique et l'oosphère. (a) Embryon 2-cellules. (b) Embryon 4-cellules. (c) Embryon octo-cellulaire. (d) Stade dermatogène. (e) Stade globulaire. (f) Stade cœur (cordiforme). (g) Stade torpille. (ac, cellule apicale; bc, cellule basale; su, suspenseur). (Park et Harada 2008)



**Figure 18 : Représentation schématique du développement de l'albumen d'*Arabidopsis thaliana***

Après fécondation, la cellule centrale du sac embryonnaire se divise de manière syncytiale pour donner une cellule multi-nucléée. La cellularisation intervient à la transition entre le stade dermatogène et triangulaire (stade cœur très précoce) de l'embryon diploïde. L'albumen peut être divisé en trois domaines distincts allant du pôle antérieur (A) au pôle postérieur (P). Ces domaines sont respectivement : l'albumen micropylaire (jaune), l'albumen périphérique (orange) et l'albumen chalazal (rose). La cellularisation débute au niveau de l'albumen micropylaire, parcourt l'albumen périphérique et termine sa course au niveau de l'albumen chalazal.. Adapté de (Berger 2003).

non seulement pour le développement des cellules de l'albumen, mais également pour la croissance propre de l'embryon. Ceci a été démontré dans les mutants *fis* d'*Arabidopsis*, dont l'albumen se divise continuellement sans connaître de différenciation et de cellularisation, aboutissant fréquemment à une létalité embryonnaire (Chaudhury et al. 1997). L'organisation de l'albumen est notamment contrôlée par les gènes FIS (« **F**ertilization **I**ndependent **E**ndosperm »), qui codent des protéines présentant des homologies avec les protéines du groupe Polycomb. C'est l'empreinte génétique exercée sur les gènes FIS du génome paternel qui semble importante dans la régulation du développement de l'embryon. L'albumen se développerait donc sous le contrôle exclusif du gamétophyte femelle.

Le rôle vital de l'albumen, qui consiste à nourrir l'embryon au cours de son développement, a été récemment démontré dans les mutants *cdkA*. L'albumen de ces mutants arrête de se diviser au cours de la phase syncytiale et bloque ainsi le développement de la graine renfermant majoritairement des embryons au stade globulaire (Nowack et al. 2006). En plus de ce rôle nourricier, l'albumen est susceptible d'établir une communication réciproque avec les téguments afin de déterminer la taille finale de la graine. La nature des signaux n'a pas encore été identifiée, mais certains gènes affectant le développement de l'albumen et de l'enveloppe tégumentaire ont été caractérisés. Les mutants de ces gènes présentant une diminution ou une augmentation de la croissance de l'albumen conduisent respectivement à une inhibition ou une stimulation de la croissance des téguments (Garcia et al. 2005, Lou et al. 2005). Réciproquement, des mutations tégumentaires affectent non seulement le développement de l'albumen mais également celui de l'embryon (Ray et al. 1996, Garcia et al. 2005, Schruff et al. 2006). En résumé, ces études démontrent que la taille finale des graines n'est pas uniquement déterminée par la croissance de l'albumen et de l'embryon, mais également par le développement des tissus sporophytiques maternels que constituent les téguments. L'albumen sert donc de lien de communication entre l'embryon et les tissus sporophytiques entourant le sac embryonnaire (Berger 2003).

### 3 Le conflit parental dans l'albumen

Chez les angiospermes, l'état triploïde de l'albumen est le résultat d'une double contribution du génome maternel contre une seule du génome paternel (2m:1p). Cette polyploïdie particulière de l'albumen semble être indispensable au bon développement de la graine. Concernant les processus ayant pu conduire à sa mise en place, ils sont basés sur l'existence d'un conflit mâle/femelle portant sur l'allocation maternelle des ressources à la graine. La théorie du conflit parental explique que l'intérêt paternel consiste à stimuler la croissance des descendants portant son génome, contrairement à l'intérêt maternel qui préfère distribuer équitablement ses ressources à la totalité de sa descendance (Stewart-Cox et al. 2004). Des exemples de modifications de l'équilibre 2m:1p dans l'albumen illustrent parfaitement l'existence de cette théorie du conflit. Chez *Arabidopsis* ou le maïs, une augmentation de la contribution paternelle (2m:2p) accélère la prolifération et retarde la cellularisation de l'albumen. A l'inverse, l'augmentation de la contribution maternelle (4m:1p) donne une activité mitotique réduite et une cellularisation précoce, conduisant à une diminution éventuelle de la taille de l'albumen et de la graine finale (Scott et al. 1998). Quant aux croisements effectués entre des graines possédant des ploïdies de l'albumen différentes, ils donnent rarement une descendance viable (Birchler 1993). C'est le cas des mutants *cdkA*, où l'absence de fertilisation de la cellule centrale mime ce type de croisement, qui donne un endosperme 2m:0p. Ceci correspond au cas où la contribution femelle se trouve en excès, menant à des graines de très petite taille (Nowack et al. 2006).

En plus de ces contributions différentielles, les nombreux constituants cytoplasmiques maternels (transcripts, protéines et organelles) et les différentes régulations transcriptionnelles existant entre les génomes maternel et paternel contribuent également au bon développement de l'albumen (von Wangenheim et Peterson 2004).

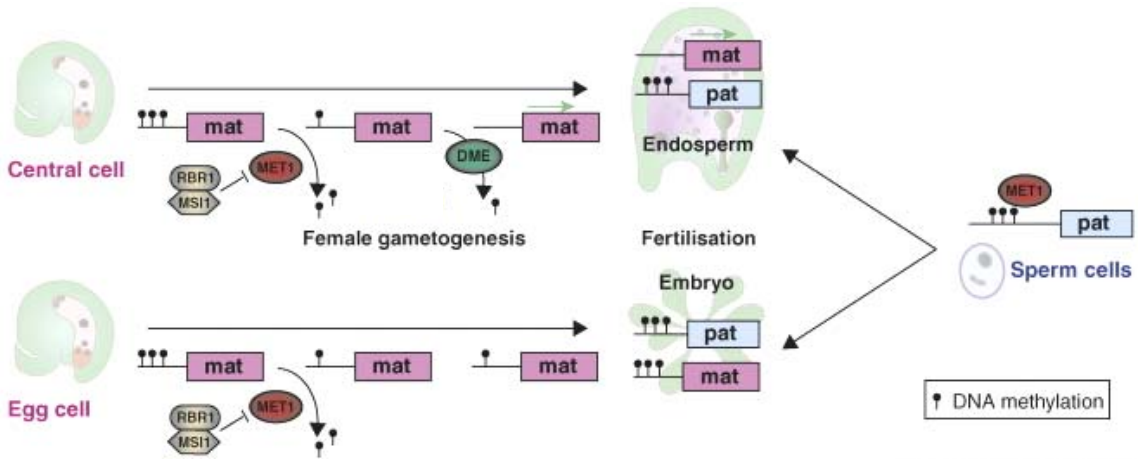
Cependant, la ploïdie de l'albumen n'est pas la seule raison du conflit parental chez les plantes. Le conflit est également gouverné par un mode de contrôle particulier de l'expression des gènes : l'empreinte génétique parentale. Certains gènes, dits « imprimés », sont exprimés principalement par l'un des deux allèles parentaux et ce de façon stable au cours du développement embryonnaire et, dans certains cas, chez l'adulte. Cette expression monoparentale résulte de modifications de l'environnement de la séquence codante du gène imprimé, consistant essentiellement en des modifications d'ADN et/ou d'histones.

### 3.1 L'empreinte parentale

L'épigénétique est l'ensemble des modifications de l'expression des gènes, sans altération de la séquence d'ADN, qui sont réversibles et transmissibles d'une génération à l'autre. L'empreinte parentale est un mécanisme de régulation épigénétique qui existe chez les mammifères et les plantes à fleurs (Morison et al. 2005). Elle désigne tout processus qui mène à l'expression différentielle de certains gènes de l'albumen selon le type de gamètes par lesquels ils sont transmis : mâles ou femelles (Köhler et Grossniklaus 2005). Il existe alors un déséquilibre du niveau d'expression des allèles parentaux où, dans les cas extrêmes, un allèle peut être exprimé tandis que l'autre allèle est conservé dans un état silencieux. Par conséquent, chaque génome maternel exprime un ensemble de gènes « maternels » qui inhibent la cellule centrale et influence la croissance de l'albumen. Ces gènes sont maintenus à un état silencieux dans le génome paternel. La même règle s'applique pour l'ensemble des gènes « paternels » qui stimulent la croissance de l'albumen. Alors qu'ils sont exprimés dans le génome paternel, leur expression reste inhibée dans le génome maternel (Scott et Spielman 2006).

#### 3.1.1 Mécanisme moléculaire de l'empreinte parentale

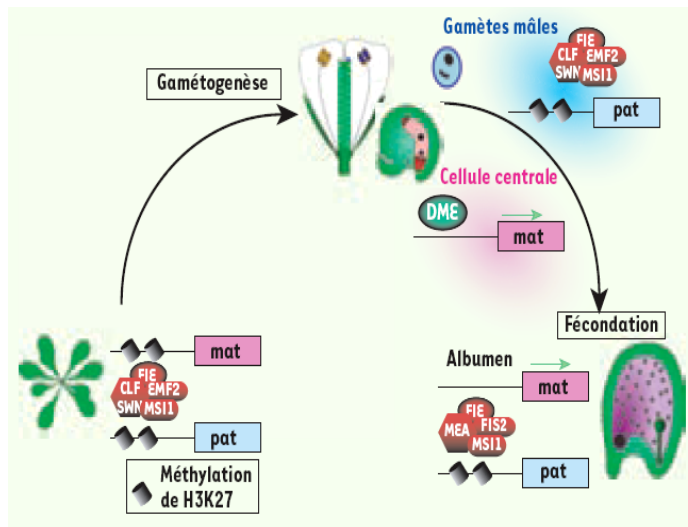
L'empreinte parentale consiste principalement en des mécanismes de méthylation de l'ADN qui permettent de maintenir l'état silencieux d'un gène. Cette méthylation affecte les résidus cytosines associés à un résidu guanine (CG) (Chan et al. 2005, Jullien et Berger 2008, 2009). Ainsi, l'allèle silencieux d'un gène particulier est marqué par la méthylation des CG tandis que cette méthylation est absente sur l'autre allèle. Chez *Arabidopsis*, la méthylation des CG est régulée par la méthyltransférase MET1, homologue de la méthyltransférase DNMT1 (« **D**N**A** **M**ethyl**T**ransf**é**r**a**s**e** **1** ») des mammifères, et par DDM1 (« **D**ecrease in **D**N**A** **M**ethyl**a**t**i**o**n**1 ») (Vielle-Calzada et al. 1999, Finnegan et al. 1996, 2000). Par conséquent, l'empreinte est essentiellement basée sur le maintien d'une différence de méthylation entre les deux allèles parentaux. L'expression des gènes soumis à ce type de régulation, implique également une voie de régulation supplémentaire, appelée « **R**etinoblastoma (RB) pathway ». Il existe chez *Arabidopsis* un homologue de RB qui porte le nom de RBR1 (« **R**etinoblastoma **R**elated **1** ») (Fig 19). RBR1 interagit avec la protéine MSI1 (**M**ulticopy **S**upressor of **I**RA1) pour permettre l'activation, au sein de la cellule centrale, des allèles maternels *FIS2* et *FWA*. RBR1 et MSI1 forment un complexe qui se fixe sur le promoteur du gène *MET1* afin d'inhiber l'expression de ce dernier dans les tissus



Current Opinion in Plant Biology

### Figure 19 : L’empreinte parentale liée à la méthylation de l’ADN chez *Arabidopsis*

La méthyltransférase MET1 est exprimée au cours de la gamétogenèse mâle ainsi que dans les cellules spermatiques du pollen. MET1 permet de maintenir l’état méthylé de l’ADN au niveau de l’allèle paternel des gènes soumis à l’empreinte parentale. Chaque cellule spermatique («sperm cell») féconde l’un des deux gamètes femelles que sont la cellule centrale («central cell») et l’oosphère («egg cell»). Au cours de la gamétogenèse femelle, l’expression de MET1 est inhibée par le « Retinoblastoma pathway » qui implique la protéine RBR1 et sa partenaire MSI1. Cette répression permet de réduire la méthylation au niveau de l’allèle maternel. Cependant ce mode de déméthylation n’est pas suffisant pour l’expression des gènes cibles. C’est uniquement dans la cellule centrale mature que la glycosylase DME est exprimée et permet de supprimer activement les marques de méthylation au niveau de l’allèle maternel. Celui-ci est alors exprimé dans l’albumen. DME n’est pas exprimé dans l’oosphère d’où l’état silencieux des deux allèles parentaux dans l’embryon. Adapté de (Jullien et Berger 2009).



### Figure 20 : Cycle général de l’empreinte parentale liée à la méthylation de l’histone 3 sur la Lysine 27 (H3K27) chez *Arabidopsis thaliana*

Durant la croissance végétative d’*Arabidopsis*, le complexe Polycomb de type 2, constitué de 4 sous-unités, maintient l’allèle paternel et l’allèle maternel inactifs en méthylant H3K27. Pendant la gamétogenèse femelle, la glycosylase DEMETER (DME) active l’expression de l’allèle maternel par un mécanisme inconnu. Dans le pollen, la méthylation de H3K27 reste maintenue par le même complexe Polycomb de type 2, sur l’allèle paternel inactif. Après la fécondation, le gène est uniquement exprimé à partir de l’allèle maternel tandis que l’inhibition de l’allèle paternel est assuré par un autre complexe Polycomb de type 2 (Jullien et Berger 2008).



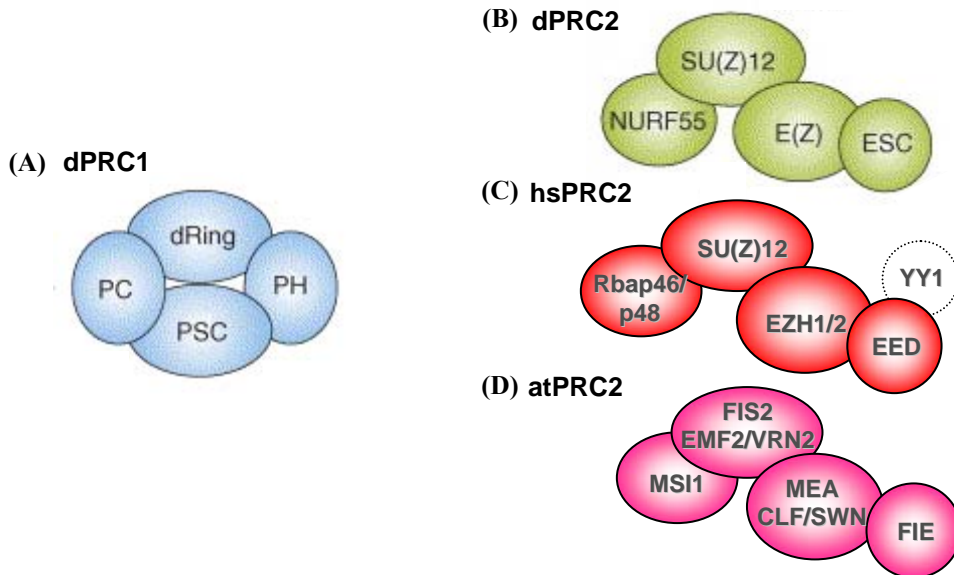
végétatifs et les gamètes femelles. Par conséquent, aucune expression de *MET1* ne peut être détectée dans les gamètes maternels (Jullien et al. 2008).

Un mécanisme additionnel, lié à l’empreinte génétique parentale mais indépendant de la méthylation de l’ADN, a été récemment démontré. Ce mécanisme repose sur d’autres types de marques transmises au cours des divisions cellulaires et affecte les histones 2A, 2B, 3 et 4 qui constituent les nucléosomes autour desquels est enroulé l’ADN. Ces histones possèdent toutes des extensions amino-terminales qui peuvent être modifiées par une grande variété de complexes multiprotéiques. Ces modifications forment un code interprété par d’autres complexes protéiques qui régulent l’accessibilité des promoteurs aux facteurs de transcription (Prouteau et Colot 2005). Parmi les divers types de modifications, la méthylation des résidus lysine de l’histone H3 est l’un des codes les mieux caractérisés. La méthylation sur le résidu lysine 27 de l’histone H3 (H3K27me) est assurée par un complexe Polycomb de type 2 (Guitton et Berger 2005) (Fig 20). Les complexes Polycomb, conservés chez tous les eucaryotes pluricellulaires, assurent la mise en place d’une répression transcriptionnelle. Grâce à leur rôle inhibiteur, ils sont désignés par le terme PRC pour « **P**olycomb **R**epressive **C**omplex ».

Il est également important de retenir que, chez les mammifères, l’empreinte est maintenue pendant le développement embryonnaire et, pour certains gènes, se poursuit au-delà, allant jusqu’à l’état adulte. Chez les plantes, l’empreinte génomique reste un mécanisme restreint au développement de l’albumen et ne peut être transmise à la descendance, puisque l’albumen ne participe pas directement au développement embryonnaire (Feil et Berger 2007).

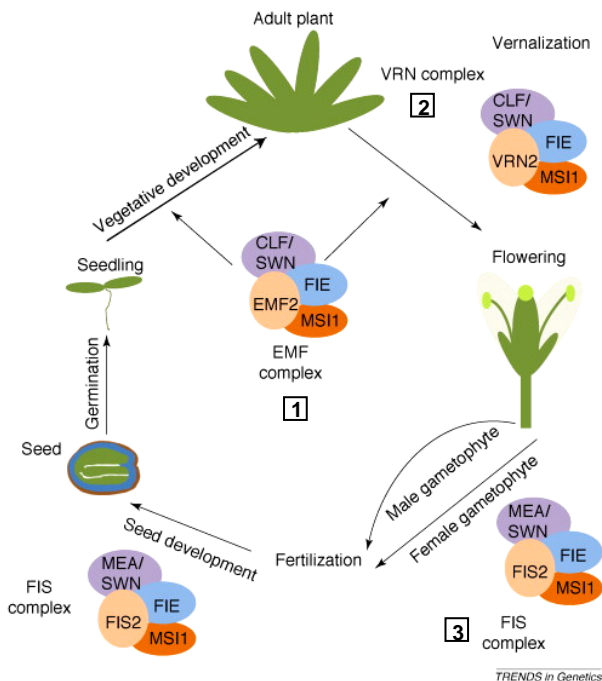
### 3.1.2 Description et fonction des complexes Polycomb

Les protéines du groupe Polycomb (PcG) sont des facteurs chromatinien connus pour maintenir l’état transcriptionnel réprimé de leurs gènes cibles au cours du développement. Ces facteurs agissent au niveau de leurs gènes cibles sous forme de larges complexes multimériques appelés « **P**olycomb **R**epressive **C**omplex » (PRC). Ces complexes contrôlent la transcription de leurs gènes cibles en se fixant sur l’ADN au niveau de séquences régulatrices appelées « **P**cG response elements » (PRE). La structure et la fonction des deux principaux complexes identifiés (PRC1 et PRC2) sont conservées de la drosophile jusqu’à l’Homme (Fig 21). Après recrutement sur un PRE par des facteurs de transcription précoces, le complexe PRC2 est capable d’ajouter trois groupes méthyles à la lysine 27 de l’histone H3 (H3K27me<sub>3</sub>) des nucléosomes. Cette marque épigénétique permet le recrutement du complexe PRC1 qui maintient la répression des gènes cibles associés au PRE soit par



**Figure 21 : Les différents complexes Polycomb et leurs homologues**

Plusieurs homologues des gènes codant pour les différentes sous-unités des complexes PRC existent chez la drosophile, les mammifères et *Arabidopsis*. Dans chacun des complexes, les sous-unités sont associées de la même manière. Les complexes PRC2 humains et d'*Arabidopsis* ne contiennent pas nécessairement tous les homologues inscrit sur chaque sous-unité représentée. (A) Le complexe PRC1 de drosophile. (B), (C) et (D) représentent respectivement le complexe PRC2 de drosophile, le complexe PRC2 humain et celui d'*Arabidopsis*.



**Figure 22 : Diversité des complexes PRC et leur implication dans le cycle de développement des plantes**

Les différents complexes PRC-like agissent à différentes étapes du cycle de vie d'*Arabidopsis*. (1) Le complexe EMF (CLF/SWN, EMF2, FIE et MSI1) permet d'initier le développement végétatif de la plante ainsi que la floraison et de maintenir la différenciation cellulaire. (2) Le complexe VRN (CLF/SWN, VRN2, FIE et MSI1) engendre l'inhibition épigénétique du gène *FLC* suite à la vernalisation et conduit à la floraison de la plante. (3) Le complexe FIS (MEA/SWN, FIS2, FIE et MSI1) empêche le développement de la graine en absence de fécondation. Il est donc indispensable au développement normal de la graine. (Hennig et Derkacheva 2009).

compaction de la chromatine, soit par interaction directe avec la machinerie transcriptionnelle au niveau du promoteur du gène cible (Bantignies et Cavalli 2006). Grâce à cette méthylation particulière, le complexe PRC2 participe essentiellement à l'inactivation du chromosome X chez les mammifères (Wang et al. 2001). Cette capacité à méthyler les résidus lysine des histones lui est conférée par une de ses sous-unités possédant une activité méthyltransférase.

Chez *Arabidopsis*, la régulation de l'empreinte parentale dans l'albumen est assurée par un complexe homologue au PRC2 de la drosophile (**Fig 21-B**), appelé complexe FIS (« **Fertilization Independent Seed** ») (**Fig 21-D**). Ce complexe est composé de quatre sous-unités protéiques principales : MEDEA (MEA), homologue de la protéine E(z) pour « **Enhancer of zeste** », FIS2 (« **Fertilization Independent Seed 2** »), homologue de Su(z)12 (« **Suppressor of zeste 12** »), FIE (« **Fertilization Independent Endosperm** »), homologue de ESC (« **Extra Sex Combs** ») et MSI1 (« **Multicopy Suppressor of IRA1**), homologue de la protéine Nurf55 de drosophile. L'activité méthylytransférase du complexe est portée par la sous-unité MEDEA. La protéine FIS2 possède un domaine « Zinc finger » qui permet de recruter les substrats du complexe PRC2. MSI1, quant à elle, est une protéine à domaine WD40 dont la fonction au sein du complexe reste à identifier (Grossniklaus et al. 2001, Guitton and F. Berger 2005).

Le rôle essentiel du complexe FIS est de réprimer la prolifération de la cellule centrale binucléée dans les gamètes femelles matures avant fécondation (**Fig 22-3**). Lorsque la cellule centrale est fertilisée par la cellule spermatique, cette répression est levée et engendre une division rapide de la cellule triploïde. Cette action répressive a pu être attribuée au complexe FIS, grâce à l'identification de mutants de chacune de ses sous-unités. En effet, ces mutants, appelés *fis*, ont la particularité de développer une structure similaire à une graine en absence de fécondation (Ohad et al. 1999, Chaudhury et al. 1998). Ce phénotype se caractérise par un développement des téguments, la division de la cellule centrale qui forme un albumen diploïde multinucléé et concernant le mutant *msi1*, par l'apparition d'une structure semblable à un embryon, due à la division de l'oosphère (Chaudhury et al. 1997, Köhler et al. 2003, Guitton et Berger 2005). Ce phénotype parthénogénétique est à l'origine de l'appellation de ces complexes FIS (« **Fertilization Independent Seed** »). De plus, tous les mutants *fis* présentent également un effet gamétophytique maternel c'est-à-dire que chaque individu, qui hérite d'une mutation *fis* du côté femelle, connaît un retard de croissance menant à l'arrêt total de son développement. Ces graines renferment majoritairement un embryon au stade cœur, de taille anormalement élevée, entouré d'un albumen non cellularisé et indifférencié

(Grossniklaus et al. 2001, Kiyosue et al. 1999). Ce phénotype peut être interprété de deux manières : soit l'allèle paternel des gènes *FIS* n'est pas exprimé et est donc incapable de compléter le phénotype mutant, soit les gènes *FIS* agissent avant la fertilisation et que le phénotype observé après fécondation est une conséquence de l'absence d'expression de ces gènes dans le gamétophyte femelle. La première hypothèse a été privilégiée et elle a démontré que de nombreux gènes, dont certains codant pour des sous-unités du complexe FIS, sont exprimés préférentiellement à partir de l'allèle paternel ou maternel. Ces observations confirment l'implication principale des complexes FIS dans l'empreinte parentale de plusieurs gènes (Köhler et Makarevich 2006).

Contrairement aux mammifères, les protéines du groupe PcG végétales sont codées par des gènes appartenant à de petites familles multigéniques. Chez *Arabidopsis*, deux homologues de *MEDEA*, appelés *CURLY LEAF (CLF)* et *SWINGER (SWN)*, ont été identifiés ainsi que deux homologues de *FIS2*, nommés *VERNALIZATION2 (VRN2)* et *EMBRYONIC FLOWER2 (EMF2)*, et 4 homologues de *MSI1 (MSI2 à 5)* (Guitton et Berger 2005, Hennig et al. 2005). Ces indications génétiques suggèrent, qu'en plus du complexe FIS, il existe différents complexes PRC2-like chez les plantes, capables de réguler différents aspects du développement. Des études basées sur l'analyse de mutants ont permis de mettre en évidence deux autres complexes PRC2-like impliqués dans le contrôle de l'expression de plusieurs gènes. Au sein de ces complexes, les protéines CLF et/ou SWN semblent jouer un rôle primordial.

Dans un premier temps, CLF intervient dans la répression du gène *AGAMOUS (AG)*, un régulateur essentiel de l'organogenèse florale (Goodrich et al. 1997, Katz et al. 2004, Bowman et al. 1989). Une interaction directe entre CLF et le locus d'*AG* a été démontrée. Elle est caractérisée par la présence des marques H3K27me3. Dans un mutant *clf*, la diminution de ces marques indique que CLF possède une activité histone-méthyltransférase et semble indispensable à la tri-méthylation d'*AG* (Schubert et al. 2006). De manière similaire, une mutation du gène *EMF2*, codant pour une protéine du groupe PcG impliquée dans le contrôle négatif de la floraison, entraîne également une diminution des marques H3K27me3 au niveau du locus d'*AG*. Etant donné qu'il existe une interaction directe entre CLF et *EMF2* ainsi qu'entre *SWN* et *EMF2*, l'ensemble de ces protéines forment un complexe PRC2-like, appelé complexe EMF, qui contrôle la transition et l'organogenèse florale via l'inhibition d'*AG* (Chanvivattana et al. 2004, Pien et Grossniklaus 2007) (Fig 22-1). De la même manière, ce complexe participe également à l'inhibition du gène *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*, un

régulateur important de la formation et du maintien des méristèmes apicaux (Long et al. 1996).

Dans un deuxième temps, la mise en évidence d'une interaction entre CLF/SWN et la protéine VRN2 suggère l'existence d'un troisième complexe PRC2-like renfermant ces différentes sous-unités (Gendall et al. 2001). Il a été appelé complexe VRN et participe à l'inhibition de l'expression du gène *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), en réponse à la vernalisation (Levy et al. 2002) (Fig 22-2). Une avancée majeure dans les mécanismes de régulation de *FLC* a été obtenue grâce à la découverte de protéines interagissant avec le complexe VRN de base. Ces sous-unités additionnelles sont les protéines VIN3 (VERNALIZATION INSENSITIVE 3), VRN5 et VEL1 qui appartiennent à une petite famille protéique caractérisée par la présence d'un domaine «PHD finger» (Sung et al. 2006, Greb et al. 2007). En association avec le complexe VRN, elles forment le complexe PHD-VRN lorsque les plantes sont soumises à un stress de froid prolongé (Wood et al. 2006, DeLucia et al. 2008). Ce complexe permet d'apposer des marques de tri-méthylation H3K27me3 sur le locus de *FLC* afin de modifier la structure chromatinienne du gène, dans le but de maintenir celui-ci à un état silencieux aux cours de la vernalisation (Finnegan et Dennis 2007).

D'après ces observations, nous pouvons conclure qu'il existe trois complexes PRC2-like majeurs chez *Arabidopsis*, avec une composition protéique variable. Leur mode d'action consiste essentiellement en la tri-méthylation des histones H3K27. Ils sont ainsi responsables de la répression spécifique de plusieurs gènes cibles impliqués dans le contrôle de la différenciation et la prolifération cellulaire ainsi que dans les différentes transitions développementales. Bien que ces complexes semblent avoir des rôles distincts, ils partagent un certain nombre de cibles communes (Pien et Grossniklaus 2007, Hennig et Derkacheva 2009). Dans le cas du complexe FIS, l'expression de *MEDEA* est régulé par un complexe PRC2-like renfermant la protéine issue du gène. De plus, la quasi totalité des sous-unités du complexe FIS sont soumises à l'empreinte parentale. *MEA*, *FIS2* et *FIE* sont uniquement exprimés du côté maternel tandis que l'allèle paternel correspondant est maintenu à l'état silencieux. Toutes ses particularités montrent la complexité du système impliquant les protéines du groupe PcG.

### **3.1.2.1 L'empreinte paternelle du gène *MEDEA***

Les analyses génétiques ont montré que la contribution maternelle du gène *MEDEA* (*MEA*) est nécessaire au développement normal de la graine, où elle jouerait un rôle

modérateur de la croissance, en accord avec la théorie du conflit parental (Grossniklaus et al. 1998). Des expériences de RT-PCR et d'hybridation *in situ* ont confirmé que si les deux copies d'origine maternelle sont exprimées dans l'albumen, la copie paternelle est silencieuse (Gehring et al. 2004). Bien que les données concernant l'embryon demeurent controversées, notamment en raison de l'absence apparente d'expression du génome d'origine paternelle lors des deux premiers jours suivant la formation du zygote, nous savons néanmoins que les copies maternelles et paternelles du gène *MEA* sont transcrites après germination, et donc non soumises à l'empreinte à ce stade du développement (Vielle-Calzada et al. 2000, Gehring et al. 2004).

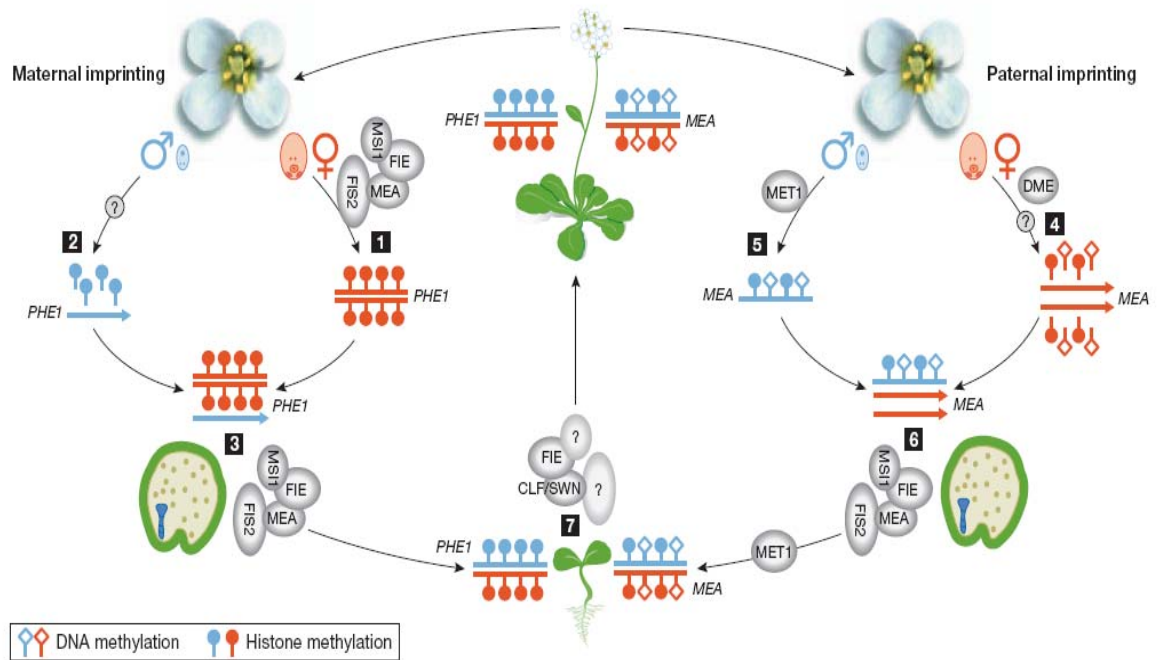
Au sein du gamétophyte, l'activation de l'allèle *MEA* femelle est dépendante de l'activité du gène *DEMETER* (*DME*) (Kinoshita et al. 2004) (Fig 23-4). Ce gène, qui code une ADN glycosylase, présente lui-même un profil d'expression tout à fait spécifique, puisqu'il n'est actif que dans la cellule centrale, et seulement avant fécondation de celle-ci par l'un des deux noyaux spermatiques (Choi et al. 2002, Jullien et al. 2006). Même si la fonction de la protéine DME demeure inconnue, les données génétiques indiquent qu'elle pourrait agir comme déméthylase de l'ADN. En effet, son action sur le gène *MEA* est contrecarrée par celle de la protéine MET1, principale méthyltransférase de maintenance présente chez *Arabidopsis* (Fig 23-5). De plus, cette régulation implique probablement l'action conjointe d'un complexe PRC2-like (Xiao et al. 2003).

Après fécondation, l'expression de *MEA* dans l'albumen se fait spécifiquement à partir du génome d'origine maternelle. Quant à l'inhibition de la copie paternelle, elle est assurée par un complexe PRC2-like où la protéine MEDEA est une sous unité à part entière (Fig 23-6). Dans ce cas, c'est le complexe PRC2-like FIS qui régule la triméthylation des histones H3 sur le résidu lysine 27 (H3K27me3) et est à l'origine de la répression transcriptionnelle de l'allèle paternel de *MEA* (Choi et al. 2004, Baroux et al. 2006, Gehring et al. 2006, Jullien et al. 2006, Makarevich et al. 2006).

Sur la base de ces observations, il a été proposé que les mécanismes épigénétiques de régulation, associés à la méthylation de l'ADN et des histones, ne puissent agir qu'à «sens unique» chez les plantes, et donc exclusivement dans des tissus ne contribuant pas à la lignée germinale, tel que l'albumen.

### **3.1.2.2 L'empreinte maternelle du gène *PHERES1***

Le gène *PHERES1* (*PHE1*) code un facteur de transcription du type MADS-box. Avant fécondation, aucune expression significative de *PHE1* n'est détectée dans le gamétophyte



**Figure 23 : Contrôle de l’empreinte parentale des gènes *MEDEA* et *PHERES1* d’*Arabidopsis thaliana***

L’allèle maternel du gène *PHERES1* (*PHE1*; rouge) est réprimé dans le gamétophyte femelle par le complexe PRC2-like, FIS, qui contient les sous-unités *MEDEA* (*MEA*), *FIE*, *FIS2* et *MSI1*. Cette inhibition est due au maintien des marques de méthylation des histones H3 sur leur résidu lysine 27 (H3K27; 1). Ces marques doivent être supprimées sur l’allèle *PHE1* paternel (*PHE1*: bleu) afin de permettre son expression. Le mécanisme impliqué dans cette déméthylation n’a pas encore été identifié (2). Dans l’albumen, la répression de l’allèle maternel de *PHE1* est maintenue par le complexe FIS (3).

Dans la cellule centrale du gamétophyte femelle, *DEMETER* participe activement à la déméthylation de l’allèle *MEA* maternel (rouge) (4). Dans ce cas également, le mécanisme de suppression des marques H3K27 n’est pas exactement identifié. L’allèle paternel de *MEA* (bleu) est méthylé par *MET1*. Nous ne savons pas si la méthylation des histones est également maintenue sur l’allèle mâle (5). La répression de cette allèle est maintenue dans l’albumen par le complexe FIS (6). Dans les tissus végétatifs, l’état silencieux des deux gènes, *PHE1* et *MEA* est maintenu par le complexe PRC2-like comportant les sous-unités *CURLY LEAF* (*CLF*), *SWINGER* (*SWN*) et *FIE*. Il permet le maintien des méthylation H3K27 (7). (Köhler et Makarevich 2006)

femelle. L'expression de *PHE1* intervient 2 jours après fertilisation, lorsque l'embryon se trouve au stade globulaire précoce. Elle décroît à partir du 3<sup>ème</sup> jour du développement embryonnaire pour être réduite à l'albumen chalazal au cours du développement tardif. Dans les mutants *fis*, le niveau d'expression de *PHE1* est plus important comparé à celui détecté dans les plantes sauvages. En effet, *PHE1* est exprimé directement après pollinisation et son expression se poursuit dans la totalité de l'albumen jusqu'au stade globulaire tardif (Köhler et al. 2003). Ce profil d'expression particulier rappelle celui observé chez la Drosophile (Goodrich et Tweedie 2002). L'activité de *PHE1* permet donc de promouvoir la prolifération cellulaire dans l'albumen et contribue ainsi au phénotype de développement parthénogénétique des mutants *fis* (Schubert et Goodrich 2003).

Ce gène est effectivement soumis à l'empreinte parentale mais contrairement à *MEDEA*, son expression est détectée dans l'albumen et l'embryon, et se fait à partir de l'allèle paternel. Les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression de *PHE1* du côté mâle n'ont pas encore été identifiés (Fig 23-2). Quant à la copie maternelle, elle est maintenue à un état quasi silencieux, avant et après fécondation. Des mutations du gène *MEA* conduisent à une surexpression de l'allèle *PHE1* maternel, sans engendrer d'effet sur l'allèle paternel, et suggèrent que le maintien de l'état silencieux est spécifiquement assurée par le complexe FIS (Köhler et al. 2005) (Fig 23-1). En effet, de façon similaire à *MEA*, le locus *PHE1* comporte de nombreuses marques de tri-méthylation H3K27me3 qui augmentent fortement juste avant la fécondation (Makarevich et al. 2006). Le complexe FIS assure ainsi la mise en place de l'empreinte parentale de *PHE1* dans le gamétophyte femelle, grâce à la méthylation des histones. Etant donné que les gènes FIS sont exprimés au cours du développement précoce de l'embryon, le maintien de l'empreinte de *PHE1* est également établi par ce même complexe après la fécondation (Fig 23-3) (Luo et al. 2000). De plus, cette répression dépend également de l'état méthylé d'une région située à plus de 2kb en aval du gène (Makarevitch et al. 2008).

Dans le cas des deux gènes *MEDEA* et *PHERESI*, la mise en place et le maintien de la répression dans les tissus sporophytiques sont assurés par un autre type de complexe Polycomb capable d'apposer des marques H3K27me. Ce dernier renferme certaines sous-unités du complexe FIS telles que FIE et probablement MSI1 mais également des sous-unités supplémentaires : deux homologues de *MEA* appelés CURLY LEAF (CLF) et SWINGER (SWN) et une protéine inconnue qui doit être identifiée (Fig 23-7) (Chanvivattana et al. 2004).



## 4 Description du projet de recherche

Le laboratoire où j'ai effectué mon doctorat, travaille sur l'implication de la protéolyse ubiquitine dépendante dans différents processus physiologiques, chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Il s'intéresse principalement aux rôles des complexes CULLINE-E3 ligases dans la signalisation hormonale, le cycle cellulaire ou les mécanismes de réparation de l'ADN (Potuschak et al. 2003, Achard et al. 2009, Thomann et al. 2009, Marrocco et al. 2009, Molinier et al. 2008). Mon projet de recherche consiste plus particulièrement à établir une caractérisation fonctionnelle du complexe CUL4-DDB1 chez les plantes, en analysant différents mutants des gènes *CUL4* et *DDB1*.

La E3 ligase comportant la sous-unité CUL4 reste le complexe le moins bien caractérisé jusqu'à présent. De nombreuses études ont toutefois permis de préciser sa composition ainsi que son rôle primordial dans le développement des organismes (Bernhard et al. 2006, Zhang et al. 2008). En effet, des facteurs additionnels, appelés DCAF, ont été identifiés en tant que sous-unités à part entière des complexes CUL4-DDB1. Ils interagissent avec la sous-unité DDB1 pour former le module de reconnaissance des substrats (He et al. 2006, Higa et al. 2006). Les DCAFs ont la particularité d'être des protéines à domaine WD40 comportant un sous-motif important pour établir l'interaction avec DDB1 (Lee et al. 2008, Zhang et al. 2008). Ce motif, nommé WDxR, est une séquence d'environ 16 acides aminés terminée par un résidu arginine essentiel. Chez *Arabidopsis*, il existe plus de 80 protéines à domaine WD40. Parmi ces possibilités, nous avons isolé, grâce à des analyses bio-informatiques, une famille de gènes codant pour ce type de protéines, comportant un ou deux sous-motifs WDxR. Cette famille est composée de 5 membres appelés MSI1 à MSI5. Chez la levure, MSI1 est associée à deux autres protéines pour former le complexe CAF-1 (« Chromatin Assembly Factor 1 »). CAF-1 joue un rôle primordial dans le maintien d'un état constitutivement inactif de l'hétérochromatine (Kaufman et al. 1997). Des études chez les plantes suggèrent que la fonction de ce complexe est vraisemblablement conservée chez tous les eucaryotes (Hennig et al. 2003). Elles permettent également d'émettre l'hypothèse que toutes les protéines MSI-like sont capables de participer à l'assemblage de la chromatine (van Nocker 2003). Néanmoins, d'autres défauts physiologiques, non liées à la chromatine, ont été détectés, notamment chez les mutants *msi1* et *msi4*, suggérant l'existence d'autres fonctions des protéines correspondantes. En effet, MSI4 participe à la régulation de l'expression du gène *FLC*, un acteur majeur de l'initiation de la floraison (Sheldon et al. 1999). Quant à *MSI1*, une mutation de ce gène conduit à des défauts variés du développement de la plante, essentiellement liés à

l'expression ectopique de nombreux gènes (Hennig et al. 2003, Köhler et al. 2003). Chez les végétaux, la protéine MSI1 fait effectivement parti d'un autre complexe, le complexe FIS, similaire au complexe PRC2 de drosophile, qui permet d'inhiber le développement de l'albumen en absence de fertilisation. Au cours de l'embryogenèse, FIS régule essentiellement l'empreinte parentale des gènes *PHERESI* et *MEDEA* en maintenant les marques de triméthylation H3K27me3 (Baroux et al. 2006, Gehring et al. 2006, Jullien et al. 2006). Ainsi, l'expression de *PHERESI* se fait préférentiellement à partir du génome paternel car la répression intervient au niveau de l'allèle maternel, tandis que *MEDEA* est exprimé à partir du génome maternel car, dans ce cas, c'est l'allèle paternel qui est maintenu à un état silencieux. Néanmoins, peu de choses sont connues sur les mécanismes exacts de régulation de l'activité du complexe FIS et par conséquent, de l'expression de ces deux gènes.

D'après l'ensemble des connaissances acquises sur les CRL4s, nous avons testé l'hypothèse d'un complexe CUL4-DDB1<sup>MSI1</sup> en utilisant différentes approches. En plus d'un lien physique, nous avons tenté de prouver l'existence d'un lien fonctionnel entre la CUL4-E3 ligase et le complexe FIS contenant la sous-unité MSI1. Par conséquent, nous avons évalué les effets des différentes mutations du complexe CRL4 sur les cibles directes du complexe FIS : *PHERESI* et *MEDEA*, afin d'établir un lien entre les CRL4s et les complexes PRC2-like, pouvant éventuellement être conservé chez tous les eucaryotes.



# Résultats



# 1 Résultats soumis pour publication

Cet article rapporte les résultats obtenus concernant le gène *CUL4* d'*Arabidopsis*. Il traite du complexe CUL4-DDB1 qui, associé à la protéine MSI1, semble jouer un rôle dans la régulation de l'empreinte parentale du gène *MEDEA*.

Pour cela, nous avons utilisé une approche de génétique reverse qui consiste à analyser différents mutants d'insertion ADN-T d'*Arabidopsis* dans les gènes *CUL4* et *DDB1*. Ces mutants présentent un phénotype embryonnaire létal, avec un stade d'arrêt précoce du développement de l'embryon. Le profil d'expression de *CUL4* établi par hybridation *in situ*, confirme l'expression de ce gène dans l'embryon et l'albumen.

Sachant que le complexe CUL4-DDB1 s'associe majoritairement aux DCAFs (« DDB1-CUL4 Associated Factors ») comportant un domaine WD40 et participe au maintien de l'intégrité du génome notamment par sa proximité avec l'ADN et la chromatine, nous avons cherché parmi les protéines à domaine WD40 d'*Arabidopsis*, des « récepteurs » potentiels des complexes CUL4s, c'est à dire possédant également le domaine de liaison à DDB1, appelé WDxR. Parmi ces protéines, MSI1 nous a semblée particulièrement intéressante pour ses fonctions chromatinienne connues. Elle fait effectivement parti des complexes CAF-1 et PRC2 qui sont respectivement impliqués dans l'assemblage de l'hétérochromatine et le maintien à l'état silencieux de plusieurs gènes soumis à l'empreinte parentale (Kaufman et al. 1997, Hennig et al. 2003, Baroux et al. 2006, Gehring et al. 2006, Jullien et al. 2006).

Nous avons donc testé l'interaction entre l'adaptateur DDB1 et MSI1 à la fois en « double hybride » chez la levure et *in planta*. Ces deux protéines peuvent interagir et former un complexe CUL4-DDB1<sup>MSI1</sup> potentiel.

Le rôle principal de MSI1 est accompli au sein du complexe PRC2 qui permet le maintien de la répression de l'allèle mâle du gène *MEDEA* dans l'albumen. Nous avons testé cette répression dans les mutants *cul4* par croisement entre deux écotypes, présentant un polymorphisme sur le gène *MEDEA*, et entre des lignées rapportrices pMEA::MEA-YFP introduites dans le fond génétique des mutants. Les deux approches prouvent que l'allèle mâle est réactivé dans les mutants *cul4* et ceci peut être expliqué par une diminution des marques chromatiniennes H3K27me sur le gène *MEDEA*.

Afin de déterminer si le complexe CUL4-DDB1<sup>MSI1</sup> régule *MEDEA* de manière transcriptionnelle et/ou post-transcriptionnelle, nous avons étudié l'accumulation des transcrits du gène ainsi que de la protéine MEDEA dans les mutants *cul4*. La qRT-PCR prouve une accumulation des transcrits du gène *MEDEA* plusieurs jours après pollinisation. Cette stabilité

est également visible au niveau protéique dans les lignées pMEA::MEA-YFP introgressées dans les mutants *cul4*. L'ensemble des résultats suggère l'implication du complexe CRL4<sup>MSI1</sup> dans la régulation épigénétique PRC2-dépendante de *MEDEA*.

Ce projet représente la majeure partie de mon travail de thèse. J'y ai fait l'analyse génétique et cytologique des différents mutants alléliques *cul4* et du double mutant *ddb1a-ddb1b*, prouvé l'interaction entre DDB1 et MSI, effectué et analysé les différents croisements et étudié la stabilité des transcrits et de la protéine issus du gène *MEDEA*. L'ensemble de ces travaux sont présentés dans l'article ci-joint qui est soumis pour publication.

## **The *Arabidopsis* CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain *MEDEA* parental imprinting**

Eva Dumbliauskas<sup>1</sup>, Esther Lechner<sup>1</sup>, Maghsoud Pazhouhandeh<sup>1</sup>, Malek Alioua<sup>1</sup>, Valerie Cognat<sup>1</sup>, Vladimir Brukhin<sup>2,4</sup>, Csaba Koncz<sup>3</sup>, Ueli Grossniklaus<sup>2</sup>, Jean Molinier<sup>1</sup> and Pascal Genschik<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 2357, Conventionné avec l'Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France.

<sup>2</sup>Institute of Plant Biology & Zürich-Basel Plant Science Center, University of Zürich, Zollikerstrasse 107, 8008 Zürich, Switzerland

<sup>3</sup>Max Planck Institute for Plant Breeding Research, Carl-von-Linné-Weg 10, 50829 Köln, Germany

<sup>4</sup>Current address: Aberystwyth University, IBERS, Edward Llwyd Building, Penglais, Aberystwyth, Ceredigion SY23 3DA, United Kingdom

\*Correspondence to: Pascal Genschik, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (CNRS), 12, rue du Général Zimmer 67084 Strasbourg, France. Tel.: +33 3 88 41 72 78; Fax: +33 3 88 61 44 42; E-mail: [pascal.genschik@ibmp-cnrs.unistra.fr](mailto:pascal.genschik@ibmp-cnrs.unistra.fr)

Running title: Ubiquitin ligase and chromatin-level regulation



## **Abstract**

Protein ubiquitylation regulates a broad variety of biological processes in all eukaryotes. Recent work identified a novel class of cullin-containing ubiquitin ligases (E3s) composed of CUL4, DDB1, and one WD40 protein, believed to act as a substrate receptor. Strikingly CUL4-based E3 ligases play important functions at the chromatin level, including responses to DNA damage in metazoans and plants and, in fission yeast, in heterochromatin silencing. Among putative CUL4 receptors we identified MSI1, which belongs to an evolutionary conserved protein family. MSI1-like proteins contribute to different protein complexes, including the epigenetic regulatory *Polycomb* Repressive Complex2 (PRC2). Here we provide evidence that *Arabidopsis* MSI1 physically interacts with DDB1A and is part of a multimeric protein complex including CUL4. CUL4 and DDB1 loss-of-function lead to embryo lethality and loss of parental imprinting of *MEA*, a target gene of the *Arabidopsis* PRC2 complex. In addition, after pollination both *MEA* transcript and protein accumulate in a *cul4* mutant background. Overall, our work provides the first evidence of a physical and functional link between an E3 ligase and a PRC2 complex thus indicating a role of ubiquitylation in the repression of gene expression.

Key words: *Arabidopsis*/ *CUL4*/ imprinting/ *Polycomb* Repressive Complex 2/ seed development

## **Introduction**

Regulation of protein stability by the ubiquitin proteasome system participates in a broad variety of physiologically and developmentally controlled processes in all eukaryotes (Ciechanover et al., 2000; Smalle and Vierstra, 2004). In this pathway, a critical step involves ubiquitin ligases (E3s), which facilitate the transfer of ubiquitin moieties to a substrate protein, the preparative step for degradation via the 26S proteasome. Among the different E3 enzymes, the composition of CUL4-based E3 ligases (CUL4s) was only recently identified (Higa and Zhang, 2007). CUL4 binds RBX1 to recruit a specific E2 ubiquitin conjugating enzyme, and also binds DDB1, an adaptor protein, which itself associates with a substrate receptor. Affinity purification of CUL4s from mammalian cells identified various WD40

proteins as possible substrate receptors (Angers et al., 2006; Jin et al., 2006; Higa et al., 2006; He et al., 2006). Many of these proteins, also called DDB1 and CUL4-associated factors (DCAFs), contain WDxR motifs that are required for efficient DDB1 binding. However, for most of them, their roles and substrates remain unknown. In human, about 90 different DCAFs have been predicted (He et al., 2006), suggesting the existence of a large number of CRL4s. A similar number of WD40 repeat proteins harboring at least one WDxR motif have also been identified in the model plant *Arabidopsis thaliana* (Lee et al., 2008). One of the predicted *Arabidopsis* DCAFs is MSI1, which belongs to an evolutionary conserved protein family (reviewed in Hennig et al., 2005), whose founding member is MULTI-COPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1) from yeast (Ruggieri et al., 1989). In both metazoans and plants, MSI1-like proteins are part of several protein complexes involved in diverse chromatin functions (reviewed in Hennig et al., 2005). In particular, MSI1 has been proposed to maintain epigenetic memory during development by targeting silencing complexes to chromatin.

In *Arabidopsis*, MSI1 is essential for plant reproductive development (Köhler et al., 2003; Guitton et al., 2004). In *msi1* mutants, seeds abort when the mutant allele is inherited from the mother regardless the paternal contribution. In such seeds, the endosperm – an embryo nourishing tissue - does not cellularize, whereas the embryo exhibits cell cycle and developmental defects. *msi1* mutants have a strong penetrance of autonomous endosperm development in the absence of fertilization and form rare parthenogenetic embryos (Köhler et al., 2003; Guitton and Berger, 2005). MSI1 is part of the FIS-PRC2 complex together with at least three other proteins, MEDEA (MEA), FERTILIZATION-INDEPENDENT SEED 2 (FIS2), FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE), which is required for normal seed development (Köhler et al., 2003). *MEA* encodes a SET-domain-containing histone methyltransferase homologous to *Drosophila* Enhancer of zeste (Grossniklaus et al., 1998) and regulates the imprinted expression of itself, as well as of its target gene *PHERES1* (*PHE1*), encoding a MADS-domain transcription factor (Köhler et al., 2005). Imprinting regulation by FIS-PRC2 involves the silencing of the paternal allele of *MEA* and the maternal allele of *PHE1*, respectively (Baroux et al., 2005; Gehring et al., 2006; Jullien et al., 2006; Köhler et al., 2005). In contrast, auto-repression of the maternal *MEA* allele is PRC2-independent (Baroux et al., 2005).

Here we report that all WD40 repeat MSI1-like proteins from various organisms carry at least one conserved WDxR motif, a signature of DCAFs. *Arabidopsis* MSI1 physically

interacts with DDB1A and is part of a CUL4-DDB1A-MSI1 protein complex. Functional analysis revealed that CUL4, as well as the *Arabidopsis* DDB1-homologs, are essential for seed production, but do not lead to autonomous endosperm development. However, CUL4 is required to maintain the paternal *MEA* allele silent, supporting a role of this E3 ligase in the control of parental imprinting.

## Results

### MSI-like proteins are evolutionary conserved WD40 proteins that carry WDxR motifs

Recent work identified DDB1 and DCAFs as possible substrate receptors of CUL4 E3 ligases (reviewed in Lee and Zhou, 2007). The largest class of DCAFs are WD40 repeat proteins, which interact with DDB1 via one or several conserved WDxR motifs. The *Arabidopsis* genome encodes 237 WD40 repeat proteins; however, only a subset of them (~80 proteins) carry one or more WDxR motif(s) (Lee et al., 2008 and our unpublished data). Among these proteins we identified MSI1 and four other *Arabidopsis* MSI1-related proteins, named MSI2-MSI5 (reviewed in Hennig et al., 2005). When all MSI1-like proteins from plant and non-plant organisms were compared, it appeared that most of them share a highly conserved WDxR motif (Figure 1). In metazoans, MSI1-like proteins exhibit also a second WDxR motif, which is less conserved in plants, but is also present in fungi. Therefore, most if not all MSI1-like proteins are structurally related to DCAFs.

### MSI1 associates with DDB1A and CUL4 in *Arabidopsis*.

We first investigated whether MSI1 interacts with DDB1A in a yeast two-hybrid assay. Similarly to DDB2 (Molinier et al., 2008), which served as a positive control, MSI1 and DDB1A interacted, although the interaction was weak as yeast growth was only detected on (-LWH) medium (Figure 2A). We further confirmed this interaction by an *in vitro* pull-down assay. In this experiment, a fusion protein between glutathione-S-transferase (GST) and DDB1A, GST-DDB1A, was incubated with *in vitro* translated, 35S-methionine-labeled MSI1 or DDB2. Consistently, MSI1 and DDB2 co-precipitated with GST-DDB1A, but not with GST alone (Figure 2B). To provide evidence for a physical interaction between both proteins in plant cells, we carried out bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments. Plasmids YC-MSI1 and YN-DDB1A were co-bombarded into etiolated mustard hypocotyls. A strong YFP signal was observed in the nucleus of 81% examined cells (35/43;

Figure 2C). These data are similar to those obtained with cells transformed with the positive control YN-DDB1A + YC-DDB2 (43/46). Only a weak fluorescence signal was observed after bombardment with the following plasmid combinations YN-DDB1A + YC-BPM3 (9/35) and YN-BPM3 + YC-MSI1 (2/27), where BPM3 (BTB/POZ-MATH3 protein encoded by *At2g39760*) is a nuclear CULLIN-RING UBIQUITIN LIGASE3 (CLR3) receptor, used here as a negative control. Taken together, our data clearly demonstrate a physical interaction between DDB1A and MSI1.

Next, we tested whether MSI1 is also part of a protein complex containing *Arabidopsis* CUL4. Thus, we immunoprecipitated *Arabidopsis* CUL4 from plants expressing the MSI1-RFP fusion protein under the control of its own promoter (Chen et al., 2008). Hence, MSI1 was successfully co-immunoprecipitated in this assay (Figure 2D). Collectively, our results support the existence of a CUL4-DDB1A-MSI1 protein complex in *Arabidopsis*.

#### **CUL4 and its adaptors DDB1A and DDB1B are required for embryogenesis.**

In *Arabidopsis*, loss-of-function of *MSI1* causes maternal effect embryo lethality leading to seed abortion early in development (Köhler et al., 2003). We have previously isolated a T-DNA mutant, *cul4-1* (Bernhardt et al., 2006), in which *CUL4* expression was severely down-regulated. Homozygous *cul4-1* mutants show various developmental abnormalities (Bernhardt et al., 2006), and when selfed, *cul4-1/cul4-1* homozygote plants exhibit a delay and eventually arrest of seed development (Figure 3). Because of the pleiotropic and hypomorphic nature of the *cul4-1* allele, we aimed to identify amorphic *CUL4* loss-of-function mutants. As no such mutants were available in public collections, we screened a collection of *Arabidopsis* T-DNA insertion lines (Rios et al., 2002). Two T-DNA insertions were identified within the coding region of *CUL4*, called *cul4-2* and *cul4-3* (Supplemental Figure S1). Both *cul4-2* and *cul4-3* mutants were backcrossed to the wild type and Southern blots confirmed single T-DNA insertions. Although we genotyped 137 and 72 progeny from selfed *cul4-2* and *cul4-3* mutant plants, respectively, we were unable to identify homozygous mutants, suggesting that *CUL4* is an essential gene in *Arabidopsis*.

As both lines contained single T-DNA insertions with integral hygromycin selection markers, we self-pollinated *cul4-2* and *cul4-3* heterozygous plants and analyzed the segregation of this marker among their progeny (Table 2). This genetic analysis revealed a segregation ratio close to 2:1 consistent with nearly fully penetrant zygotic embryo lethality. Because the segregation ratio of the marker was slightly below 2:1 for the *cul4-2* allele,

suggesting a weak defect in gametophytic transmission, we performed reciprocal crosses with wild-type plants. The transmission efficiency (TE) of the marker was only slightly reduced through both male and female gametophytes (Table 2).

Next, we examined mature siliques for the presence of aborted seeds. The number of aborted seeds was consistent with zygotic embryo lethality, where a segregation of aborted:normal seeds of 1:3 is expected (Figure 3A; Table 1). To further investigate at which developmental stage embryogenesis is arrested, we analyzed cleared seed specimens from siliques of selfed *cul4-2* and *cul4-3* mutant plants. The embryos arrested development at the early globular stage (Figure 3B). They exhibited abnormal shapes and cell division defects in the suspensor and embryo proper. Moreover, the endosperm was underdeveloped in homozygous seeds of both mutant alleles. When siliques were analyzed at later stages, harbouring bent-cotyledon stage or mature wild-type sibling embryos, the arrested seeds had degenerated (not shown), indicating a strict arrest and not a delay in seed development.

Because CUL4 interacts with DDB1 to form CUL4 E3 complexes, we also investigated whether DDB1 is required for embryogenesis. The *Arabidopsis* genome encodes two expressed DDB1-related proteins, named *DDB1A* (*At4g05420*) and *DDB1B* (*At4g21100*), exhibiting 89% sequence identity at the amino acid level. *DDB1A* loss-of-function mutants are viable (Molinier et al., 2008). Therefore, we searched for T-DNA insertion mutants in the related *DDB1B* gene and identified one mutant, named *ddb1b-1*, from the SALK collection (SALK 061944). In the *ddb1b-1* allele, the T-DNA interrupts the coding sequence in the last exon (Supplemental Figure S1). Homozygous *ddb1b-1* mutant plants developed normally and were fully fertile. To test whether *DDB1A* and *DDB1B* act redundantly during embryogenesis, the *ddb1a-2* mutant was used to pollinate a homozygous *ddb1b-1* mutant plant. Among the progeny of this cross we selected F2 plants that were *DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1/ddb1b-1* (referred as *DDB1A/ddb1a ddb1b*) and *ddb1a-2/ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1* (referred as *ddb1a DDB1B/ddb1b*). Because both *ddb1a-2* and *ddb1b-1* mutants carry the same selection marker, we used PCR-based genotyping for further genetic analyses. Among the progeny of self-pollinated *DDB1A/ddb1a ddb1b* and *ddb1a DDB1B/ddb1b* plants no double mutant were identified, despite the analysis of ~60 plants for each genotype (Table 3).

Next, we evaluated the effect of both *DDB1*-related genes on male and female gametophytic transmission (Table 3). Reciprocal crosses between the different genotypes revealed that the two genes do not contribute equally to gametophyte development and/or function as indicated by unequal transmission defects: while in the absence of *DDB1B*,

*DDB1A* is required for normal transmission through the male, the converse is true for the female gametophyte. Moreover, we also observed degenerated embryo sacs in the siliques of *ddb1a DDB1B/ddb1b* and *DDB1A/ddb1a ddb1b* self-pollinated mutants (Figure 3Bi), further supporting gametophytic defects.

The number of aborted seeds was consistent with zygotic embryo lethality in self-pollinated *ddb1a DDB1B/ddb1b* plants (Table 1). Light microscopic observations of cleared seeds revealed that double homozygous *ddb1a ddb1b* embryos derived from selfed *DDB1A/ddb1a ddb1b* (not shown) or *ddb1a DDB1B/ddb1b* (Figure 3Bk) mutants arrest at the early globular stage, with a phenotype reminiscent of the *cul4* mutants. Thus, both *CUL4* and *DDB1A/B* functions are required for normal development of embryo and endosperm.

### **CUL4 is expressed during embryogenesis**

To determine the expression pattern of *CUL4* in reproductive tissues and during embryogenesis, we performed mRNA *in situ* hybridization experiments on sections of flower buds and developing siliques using *CUL4*-specific antisense and sense control probes (Supplemental Figure S2). *CUL4* transcripts were detected in the tissues of young flower buds, i.e. in petals, stamens, and carpels (Supplemental Figure S2A). A distinctive signal was observed in emerging ovules (Supplemental Figure S2B), but not in the developing embryo sac (Supplemental Figure S2E). After fertilization the expression level of *CUL4* was prominent in the developing embryo (Supplemental Figure S2C-D, G-L). The signal intensity decreased after the heart stage (Supplemental Figure S2I-G). This expression pattern correlates with the requirement of *CUL4* for embryo development. In endosperm cells the hybridization signal was low but detectable at all stages of seed development (Supplemental Figure S2C-D, G-L). Overall, *CUL4* expression pattern in developing seeds is consistent with the *CUL4* loss-of-function phenotype.

### **Imprinted expression of MEA is lost in *cul4* mutants**

MSI1 is a component of the FIS-PRC2 complex, which is required for seed development (Köhler et al., 2003). However, MSI1 was also found in other protein complexes potentially involved in chromatin functions (Hennig et al., 2005). Thus, we wondered whether loss of *CUL4* and/or *DDB1* activity affects PRC2-like functions during plant reproduction. Based on our genetic analyses, *CUL4* mutation does not show a parent-of-origin-dependent seed abortion phenotype, which is observed for mutants affecting the FIS-PRC2 complex.

Moreover, *cul4* mutants do neither show autonomous endosperm development nor parthenogenetic embryo formation (Supplemental Figure S3) as observed for the *fis*-class mutants (Kölher et al., 2003, Guitton et al., 2004; Guitton and Berger, 2005). Thus, loss of *CUL4* activity does not phenocopy FIS-PRC2 deficient plants.

Next, we investigated whether mutations of *CUL4* affect parental imprinting of *MEDEA* and/or *PHERES*, two genes which are regulated by the FIS-PRC2 complex (Baroux et al., 2006; Gehring et al., 2006; Jullien et al., 2006; Köhler et al., 2003). We used sequence polymorphisms between different Arabidopsis accessions to distinguish parental alleles. Whereas the maternal *PHE1* allele is not de-repressed in the *cul4-1* mutant, we detected paternal *MEA* expression (Figure 4A). It is noteworthy that repression of the paternal *MEA* allele in the control experiment was not complete, as a weak but detectable expression was observed when Columbia (Col-0) pollen was used. Indeed, previous genetic analyses suggested that Col-0 carries a paternal modifier of *mea* seed abortion (Vielle-Calzada et al., 1999) and it is possible that this leads to a weak de-repression of the paternal *MEA* allele. However, full expression of paternal *MEA* allele was only observed when *cul4-1* or *cul4-1 ddb1a* pollen was used.

To further investigate the loss of repression of the paternal *MEA* allele in the *cul4-1* or *cul4-1 ddb1a* mutants, we introgressed the *pMEA::MEA-YFP* reporter gene (Wang et al., 2006) into the *cul4-1* and *cul4-2* mutant backgrounds. When *pMEA::MEA-YFP* line a Col-0 background was used to pollinate Col-0 plants, we observed by confocal microscopy a detectable fluorescence signal in the endosperm of about half of the seeds (Figure 4B; Table 4). This result is inconsistent with a full repression of the paternal *MEA* allele in the Col-0 background, but is in agreement with our results using sequence polymorphisms (see above). A similar result was observed when the *cul4-1* hypomorphic mutant was used as a female and pollinated with wild-type pollen carrying the *pMEA::MEA-YFP* reporter. However, when we used the *cul4-2 pMEA::MEA-YFP* pollen to fertilize Col-0 plants, we observed a much stronger fluorescence signal in some seeds (Figure 4B), supporting a reactivation of the paternal *pMEA::MEA-YFP* reporter gene if derived from *cul4* mutant pollen.

To better deplete *CUL4* activity in such experiments, we combined the weak *cul4-1* with the strong *cul4-2* alleles. When homozygous *cul4-1* plants were used as a female and pollinated with pollen from *cul4-2* heterozygote plants, we observed a category of seeds (about 50%), which arrested at the late globular stage, thus corresponding to *cul4-1/cul4-2* homozygous embryos. In these seeds, the underdeveloped endosperm contained large

coenocytic cells (Supplemental Figure S4) and degenerated at 4 days after pollination (DAP). Interestingly, ~ 70% of seeds were scored for a fluorescent signal when the *cul4-1* mutant was pollinated with pollen from *cul4-2 pMEA::MEA-YFP* plants (Table 4). The fluorescence signal was particularly strong in the aberrant endosperm of arrested *cul4-1/cul4-2* seeds at 2 and 3 DAP (Figure 4B). This finding was further supported by the accumulation of paternally expressed MEDEA-YFP protein in this cross, as detected by Western blotting (Figure 4C). Overall our results indicate that *CUL4* is necessary to maintain repression of the paternal *MEA* allele and support a role of CUL4-DDB1 in the regulation of the FIS-PRC2 complex.

Because MSI1 protein associates with additional protein complexes such as Chromatin Assembling Factor 1 (CAF-1) and a complex with the RETINOBLASTOMA-RELATED protein (RBR) (Exner et al., 2006; Jullien et al., 2008), we do not exclude the possibility that CUL4-DDB1 acts at more than one level.

### **MEA transcript and protein accumulate in *CUL4*-deficient seeds**

With respect to these new findings, we investigated kinetics of both *MEA* transcripts and protein accumulation. The Col-0 *pMEA::MEA-YFP* line was self-pollinated and *MEA*-YFP mRNA and protein levels were determined before and during the first 3 DAP. While the *MEA* mRNA level gradually decreased after pollination, *MEA* protein quickly disappeared and was hardly detectable at 2 DAP (Figure 5B). Thus, the *MEA* protein level is highly dynamic and seems under both transcriptional and post-transcriptional control. Therefore, we investigated *MEA*-YFP protein accumulation in *cul4* mutant plants. Strikingly, in the *cul4-1* background, *MEA*-YFP protein was detected at all time points (Figure 5A). However, because *MEA* transcript levels did not decay in the *cul4-1* mutant (Figure 5B), it is unclear whether *MEA*-YFP protein accumulation reflects transcriptional and/or post-transcriptional regulation by *CUL4*. Nevertheless, our results clearly demonstrate that *CUL4* activity is necessary to restrict *MEA* expression during seed development.

PRC2 complexes maintain *MEA* transcription silent throughout the vegetative plant life cycle (Jullien et al., 2006). In order to test whether *CUL4* could also regulate *MEA* expression during vegetative development, we investigated *MEA* expression in homozygous *cul4-1* knockdown plants (Figure 5C). Interestingly, *MEA* expression was detected in this mutant background, though to a lesser extent than in a mutant compromised in the SET domain protein CURLY LEAF (CLF) used here as positive control. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis revealed that *MEA* reactivation was correlated with a



decrease in H3K27 trimethylation (Figure 5D) further supporting a role of CUL4 in PRC2-mediated epigenetic regulation.

## Discussion

Ubiquitylation has already been linked to *Polycomb*-mediated repression (reviewed in Niessen et al., 2009). Indeed the human PRC1 complex exhibits an E3 ligase activity for histone H2A (Wang et al., 2004), which is triggered by two of its subunits, RING1 and RNF2 (also referred to RING1B or RING2) (de Napoles et al. 2004; Buchwald et al., 2006). Histone H2A ubiquitylation seems to occur after H3K27 trimethylation by PRC2 (Cao et al., 2005), although it is still unclear how H2A ubiquitylation influences the silencing process.

Here we establish for the first time a link between an ubiquitin E3 ligase and a PRC2 complex. Whether CUL4 and DDB1 only associate transiently or are more stable components of the FIS-PRC2 complex will need further investigations. However, it is noteworthy that MSI1 together with FIE, MEA, and FIS2 were found in a very large protein complex of about 650 kDa (Köhler et al., 2003), leading the authors to speculate that other proteins associate with FIS-PRC2. Another intriguing observation is that the PRC2 core component FIE, which is also part of various other forms of PRC2 in *Arabidopsis* (Pien and Grossniklaus, 2008), was predicted to interact with DDB1 based on its structure (Lee et al., 2008). Thus, not only one but even two components may recruit CUL4 to the FIS-PRC2 complex and act as substrate receptors. Moreover, because metazoan homologs of *Arabidopsis* MSI1-like proteins, such as the Retinoblastoma-binding proteins P55 in *Drosophila* and RbAp48 in mammals, have structural feature of typical CUL4 substrate receptors, it is probable that our finding will extend to other organisms beyond plants.

The protein targets of the CUL4-DDB1<sup>MSI1</sup> E3 ligase remain unknown. Since MEA protein does not decay after pollination in *cul4* mutants, it is possible that ubiquitylation controls the stability of some FIS-PRC2 components, possibly the MEA protein itself. Hence, unscheduled MEA protein accumulation may alter FIS-PRC2 activity by, for example, titrating some of its components or associated proteins. This may also explain the paradox, why in the presence of more MEA protein, repression of the paternal *MEA* allele is lost.

However, it is also possible that CUL4-DDB1 acts at the FIS-PRC2 level by a mechanism that does not imply protein degradation. In this respect, it is well established that CUL4 E3 ligases trigger different kinds of non-proteolytic ubiquitylation reactions, including

the assembly of K63-linked polyubiquitin chains and monoubiquitylation. Thus, in the process of Nucleotide Excision Repair after UV-damage, a CUL4-DDB1<sup>DDB2</sup> E3 ligase (DDB2 being a WD40 substrate receptor) triggers non-proteolytic ubiquitylation of XPC (Xeroderma Pigmentosum complementation group C) to permit its binding to damaged DNA (Sugasawa et al., 2005) and induces histone ubiquitylation, presumably to modify the chromatin structure at the sites of DNA lesions (Wang et al., 2006; Kapetanaki et al. 2006). Interestingly, the fission yeast Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase and is required for RNAi-mediated heterochromatin formation (Hong et al., 2005; Jia et al., 2005), although the CUL4-mediated modifications, which are involved in this process, remain unknown. Future investigations will identify CUL4-DDB1<sup>MSH1</sup> E3 substrates and clarify its function(s) in PRC2-dependent epigenetic regulation.

## Materials and methods

### Plant Material and Growth Conditions

*Arabidopsis ddb1a-2* mutant is described in Molinier et al. (2008). The *ddb1b-1* (SALK 061944) mutant was identified using the web-assisted program: <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>. The precise location of the T-DNA in *ddb1b-1* mutant was determined by sequencing, showing an insertion after nucleotide 6211 in the last exon of *DDB1B*. The *cul4-1* (GABI-KAT 600H03) mutant is described in Bernhardt et al. (2006). The *cul4-2* (Koncz 42460) and *cul4-3* (Koncz 57891) mutants were identified by PCR-screening the Köln *Arabidopsis* T-DNA mutant collection (Rios et al., 2002). The precise location of the T-DNA in *cul4-2* and *cul4-3* was determined by sequencing, showing respectively an insertion after nucleotide 4478 in the 14<sup>th</sup> exon and after nucleotide 2718 in the 7<sup>th</sup> intron of *CUL4*.

For *in vitro* culture, seeds were surface sterilized with ethanol method, plated on GM medium (MS salts (Duchefa, The Netherlands), 1% sucrose, 0.8% agar, pH 5.8) in the presence or absence of a selectable agent, stored 2 to 3 days at 4°C in the dark, and then transferred to a plant growth chamber under a 16h/8h photoperiod (22uC/20uC). For soil cultured plants, seeds were sown (20/pot) and put at 4°C in the dark during 3 days. The pots were transferred in greenhouse and kept under a regime of 16h/8h photoperiod (20uC/16uC; 70% humidity).

### Yeast-two hybrid

The DDB2 and MSI1 cDNAs were cloned as fusions to the GAL4 activation domain and the DDB1A cDNA fused to the GAL4 binding domain, respectively, in Gateway-compatible pGAD424gate and pGBT9gate (Ghent plasmids collection, <http://bccm.belspo.be/index.php>) yeast two-hybrid vectors. The yeast strain AH109 (Clontech) was transformed with the appropriate combinations of bait and prey vectors. Transformants were selected on synthetic (SD)/-Leu/-Trp (-LW) and interactions were tested on SD/-Leu/-Trp/-His (-LWH) or SD/-Leu/-Trp/-Ade (-LWA) media, allowing growth for 4 days at 30°C.

### GST pull-down assay

Full-length DDB1A cDNA was cloned into Gateway vector pDEST15 (Invitrogen) by recombination for expression in *E.coli* BL21AI (Invitrogen). In this construct GST is placed

in frame at the N-terminus of DDB1A protein. After 4 hours of 0,2% Arabinose induction at 16°C, the fusion proteins were purified on bulk glutathione-Sepharose following manufacturer instructions (GE Healthcare). For GST pull down assays, DDB2 and MSI1 proteins were translated *in vitro*, using TNT7 coupled wheat germ extract system (Promega) and radio-labelled with [<sup>35</sup>S]-methionine. Purified GST-DDB1A or control GST proteins, immobilized on glutathione sepharose beads, were incubated for 2 hr at 4°C with equal amounts of <sup>35</sup>S-methionine-labelled DDB2 and MSI1 protein following manufacturer instructions (GE Healthcare). Labelled DDB2 and MSI1 proteins were detected by autoradiography.

### **Bimolecular Fluorescence Complementation**

The DDB1A, DDB2 and MSI1 coding sequences were cloned into the split YFP destination vectors by recombination (Invitrogen) in order to obtain YN-DDB1A, YC-DDB2 and YC-MSI1 constructs. YN-, YC- and 35S-CPRF2-CFP vectors and split YFP experiment was performed as described in Stolpe et al. (2005). Vectors bearing YN or YC either alone or fused to BPM3 (At2g39760) were used as negative controls. Images were recorded 20 h after bombardment with a Nikon fluorescent stereo-microscope E800 equipped with a 40x water immersion optic by using CFP- and YFP-specific filters.

### **Immunoprecipitation experiment**

Total soluble protein were extracted from pMSI1::MSI1-RFP plants (Chen et al. 2008) using buffer A (100 mM NaHPO<sub>4</sub> pH 8.0, 1% Triton x100, protease inhibitor mix (Complete; Roche Molecular Biochemical)). Immunoprecipitation assay was performed using anti-CUL4 polyclonal antibody coupled to ProteinA-Sepharose beads. The MSI1-RFP protein was detected using anti-DsRed antibodies (Clontech Laboratories Cat#632496) diluted 1:1,000 (v:v).

### **Histology and microscopy**

Developing seeds were prepared from siliques of different developmental stages and directly mounted on microscope slides in a clearing solution of 8:2:1 Chloral Hydrate: distilled water: glycerol as described in Grini et al. (2002). Observations were performed with a Zeiss Axiophot microscope under differential interference contrast (DIC) 20x and 40x optics.

For YFP marker analysis, seeds from dissected siliques at different days after pollination (DAP) were mounted in a 1:10 glycerol: distilled water. Specimens were observed under a Zeiss confocal laser-scanning microscope.

### ***In situ* Hybridization**

Hybridisation was performed on the 10 µm Paraplast Plus (Sigma) sections as described in Brukhin et al. (2005). For the probe the fragment spanning the region of the CUL4 (At5g46210) cDNA from 1501 to 2000 (500 bp) sequence was used. The fragment was inserted into the pGemT plasmid (Promega). Sense and antisense digoxigenin-UTP-labeled riboprobes were generated by run-off transcription using T7 and Sp6 RNA polymerases. The probes were hydrolyzed into 120 bp fragments in carbonate buffer, pH 10,2 for 59 min at 60°C.

### **RNA extraction and RT-PCR analysis**

RNAs from siliques at 3 days after pollination (DAP) and from 17-day old plantlets were prepared with Trizol reagent (Invitrogen). 5 µg of total RNA were treated with Dnase1 kit (Fermentas) and reverse transcribed with Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). To detect PHERES and MEDEA mRNA, allele-specific RT-PCR was performed as described previously in Kinoshita et al. (1999). Primers used to amplify the control GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) RNA, were GAPDH3' (5'-GTAGCCCCACTCGTTGTCGTA-3') and GAPDH5' (5'-AGGGTGGTGCCAAGAAGGTTG-30).

### **Q-PCR**

Total RNA for Q-PCR was extracted from inflorescences and siliques at different DAP of pMEA::MEA-YFP plants in respectively Col-0 and *cul4-2* heterozygous mutant backgrounds using the kit RNeasy MINI PLUS (Quiagen). 2 µg of total RNA were reverse transcribed with Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen). PCR was performed using gene-specific primers in a total volume of 10 µL SYBR Green Master mix (Roche) on a Lightcycler LC480 apparatus (Roche) according to the manufacturer's instructions.

The mean value of three replicates was normalized using the ACTIN2 (AT3G18780), GAPDH (AT3G26650) genes as internal controls.

Primer list:

MEA: GCAGGACTATGGTTTGGATG and CACCTTGAGGTAACAATGCTC  
YFP : ATATCATGGCCGACAAGCA and GAACTCCAGCAGGACCATGT  
ACTIN2: CTTGCACCAAGCAGCATGAA and CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT  
GAPDH : TTGGTGACAACAGGTCAAGCA and AAACCTTGTCGCTCAATGCAATC

### **Chromatin immunoprecipitation (ChIP)**

ChIP experiments were performed as described by Jiang *et al.* (2008) using 17-day old plants. Five ml mixed tissues powder was prepared after cross-linking DNA with proteins by Formaldehyde. Preparation of chromatin, sonication and immunoprecipitation using the rabbit polyclonal anti-trimethyl-histone H3K27 (07-449 Millipore) were carried out using Millipore ChIP kit according to the manufacturer instructions. The immunoprecipitated DNA was analyzed by real time qPCR using MEA primers (region -700-1500). FUSCA primers were used as internal standard for normalisation. Data analysis was done as described in Mutskov and Felsenfeld (2004). Experiment was performed three times using independent biological samples.

### **Protein extraction and Immunoblotting**

Total proteins were extracted from Col 0 and *cul4* siliques at 1, 2 and 3 DAP using denaturing buffer described in Büche *et al.* (2000). Total protein extracts were separated on SDS-PAGE gels and blotted onto Immobilon-P membrane (Millipore). The MSI1-RFP protein was detected by using the anti-DsRed antibody (Clontech Laboratories Cat#632496) diluted 1:1,000 (v:v) whereas the MEA-YFP protein was identified by using a Rabbit anti-GFP polyclonal antibody diluted 1:10000 (v/v).

### **Acknowledgements**

We would like to acknowledge M. Bureau for help with confocal imaging. Funding was provided by the CNRS, the French National Research Agency ANR (BLAN07-3\_188961) and the EU NoE (Rubicon LSHG-CT-2005-018683). Work in U.G.'s laboratory was supported by the University of Zürich and the Novartis Foundation.

### **Figure Legends**

### Figure 1: Alignments of MSI1-like proteins and WDxR motifs

All five *Arabidopsis* MSI1-like protein sequences (MSI1, AT5G58230; MSI2, AT2G16780; MSI3, AT4G35050; MSI4, AT2G19520 and MSI5, AT2G19540) were used to identify MSI1-like proteins by blast (Altschul, 1990). We used the following databases: for *Oryza sativa* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>; Os03g43890; Os09g36900; Os01g51300); *Vitis vinifera* (<http://www.genoscope.cns.fr/spip/Vitis-vinifera-whole-genome.html>; Vv-1 GSVIVP00030810001; Vv-2 GSVIVP00036121001; Vv-3 GSVIVP00016560001; Vv-4 GSVIVP00034167001); *Lycopersicon esculentum* (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Le-MSI1 O22466.1); *Nicotiana tabacum* (NCBI; Nt-MSI1 ABY84675.1); *Homo sapiens* (NCBI; Hs-RBBP4 NP\_005601.1; Hs-RBBP7 NP\_002884.1); *Mus musculus* (NCBI; Mm-RBBP4 NP\_033056.2; Mm-RBBP7 NP\_033057.3); *Gallus gallus* (NCBI; Gg-RBBP4 Q9W715.3; Gg-RBBP7 Q9I8G9.1); *Drosophila melanogaster* (NCBI; Dm-CAF1 NP\_524354.1); *Caenorhabditis elegans* (NCBI; Ce-lin53 NP\_492552.1; Ce-Rba1 NP\_492551.1); *Xenopus laevis* (NCBI; Xl-RBBP4B Q6INH0.3; Xl-RBBP4A O93377.3; Xl-RBBP7 Q8AVH1.1); *Chlamydomonas reinhardtii* (<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>; Cr-NRF XP\_001696907.1); *Populus trichocarpa* ([http://genome.jgi-psf.org/Poptr1\\_1/Poptr1\\_1.home.html](http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html); Pt-1 estExt\_fgenes4\_pg.C\_LG\_II1945; Pt-2 estExt\_fgenes4\_pg.C\_LG\_XIV1179; Pt-3 gw1.IX.1159.1; Pt-4 estExt\_fgenes4\_pg.C\_LG\_IV1464; Pt-5 eugene3.00440093; Pt-6 gw1.145.113.1; Pt-7 eugene3.02850001); *Schizosaccharomyces pombe* (NCBI; Sp-RbAp48 O14021.1; Sp-YEC6 Q9Y825.1; Sp-Mis16 NP\_587881.1); *Saccharomyces cerevisiae* (NCBI; Sc-HAT2 P39984.1; Sc-MSI1 P13712.1; Sc-RBP 1919423A), and *Neurospora crassa* (NCBI; Nc-HAT2 Q7S7N3.2). All proteins identified were aligned using the program Muscle v3.6 (Edgar, 2004). Non-conserved protein regions were removed by GBlocks v0.91b (Castrena, 2000) using the following settings: minimum number of sequences for a conserved position: 21; minimum number of sequences for a flanking position: 34; maximum number of contiguous non-conserved positions: 8; minimum length of a block: 5; allowed gap positions: with half. The positions of two conserved WDxR motifs are indicated (Box1 and Box2).

### Figure 2: MSI1 forms a complex with DDB1A and CUL4.

A. Yeast two-hybrid experiments showing MSI1 interaction with DDB1A. Dilution series of yeast cells co-expressing the indicated proteins were grown for 3 days at 28°C on LWH- 3AT

(low stringency selection) and on LWA (high stringency selection). As a positive control, we used DDB2.

B. The interactions from the Y2H were confirmed by using bacterially expressed GST or GST-DDB1A proteins in pull-down in vitro assays. Upper panel shows GST-DDB1A protein (left) and 5 $\mu$ L of in vitro translated <sup>35</sup>S-Met-labelled MSI1 and DDB2 proteins (right) used for pull-downs (lower panels).

C. BiFC of YN-DDB1A/YC-MSI1. Different combinations of plasmids expressing the indicated YN- and YC-fusion proteins were bombarded into hypocotyls of dark-grown mustard seedling. The nuclear-localized CUL3 receptor BPM3 protein was used here as a negative control. A transfection control CPRF2 expressing a fused CFP targeted to the nucleus (nu) was systematically included to identify transformed cells. Images were recorded 5 h after bombardment via CFP- (left panels) and YFP-specific filters (right panels). Differential interference contrast (DIC) images are shown (middle panels). Reconstitution of functional YFP as detected by YFP fluorescence occurs only in the nucleus with both MSI1 and DDB2. Scale bars represent 20 $\mu$ m.

D. *In vivo* pull-down with CUL4 and MSI1. MSI1-RFP expressing and control wild-type plants were used for immunoprecipitation (IP) assays using anti-CUL4 antibody. Both CUL4 (upper right panel) and MSI1-RFP (lower right panel) were detected in the IPs, using CUL4 and RFP antibodies, respectively.

### **Figure 3: Seed and embryo development is affected in *cul4* and *ddb1a ddb1b* mutant seeds**

A. Silique phenotype of wild-type and mutant plants. Arrowheads indicate aborted seeds.

B. Cleared seeds of *cul4* and *ddb1a ddb1b* mutant seeds.

a Normal seed from the same silique as the seed in (b)

b *cul4-1/cul4-1 homozygote* mutant embryo arrested at the globular stage

c Normal seed from the same silique as the seed in (d)

d Arrested *cul4-2* early globular embryo with non-productive and abnormal endosperm. The right panel is a magnification of the embryo in the same picture.

e Normal seed from the same silique as the seed in (f)

f Arrested *cul4-3* early globular embryo. The right panel is a magnification of the embryo in the same picture.

g Degenerated embryo sac in a silique of a *DDB1A/ddb1a ddb1b* self-pollinated mutant.



h Normal seed from the same silique as the seed in (i)

i Arrested early globular embryo in a silique of a *ddl1a DDB1B/ddb1b* self-pollinated mutant.

The right panel is a magnification of the embryo on the same picture.

Bar = 25  $\mu\text{m}$  (a-b); 50  $\mu\text{m}$  (c-d); 20  $\mu\text{m}$  (e-k);

#### **Figure 4: MEA but not PHE1 paternal repression is lost in cul4 mutants**

A. Parental allele-specific expression analysis of *PHE1* (left panel) and *MEA* (right panel) in wild-type, *cul4-1* and *cul4-1 ddb1a-2* seeds at 3 DAP. For *PHE1* expression, Col-0 was crossed with C24, whereas for *MEA* expression Col-0 was crossed with the RLD accession.

B. Representative confocal and corresponding DIC images showing *pMEA::MEA-YFP* detection in various crosses at 2 DAP. A strong fluorescence signal was detected in the abnormally large coenocytic endosperm cells resulting from the *cul4-1 cul4-2 pMEA::MEA-YFP* crosses. Bar = 50  $\mu\text{m}$

C. Paternally expressed MEA-YFP protein accumulation in two different crosses, as indicated. Protein extracts were analyzed by immunoblotting using the anti-GFP antibody. Coomassie blue staining used as a loading control.

#### **Figure 5: MEA expression in developing seeds and cul4 plants**

A-B. MEA-YFP mRNA and protein levels in developing fruits of self-fertilized Col-0 (A) and *cul4-2* heterozygote mutant plants (B). Relative levels of total *MEA* (blue bars) and *MEA-YFP* (red bars) transcripts determined by quantitative RT-PCR are shown on the upper panels. Data are means  $\pm$  SE. MEA-YFP protein levels are shown in the lower part. 40  $\mu\text{g}$  of total protein extracts were analyzed by immunoblotting using an anti-GFP antibody.

B. Relative MEA mRNA level ( $\pm$ SD) of *cul4-1* and *clf29* versus Col0 in 17 day-old plants. SD is the standard deviation from three replicates. Experiments were repeated three times in biologically independent manner.

C. Relative enrichment/input ( $\pm$ SD) of H3K27me3 of a particular MEA region (-700 -1500, see materials and methods for details) in immunoprecipitated chromatin of wild type Col0, *cul4-1* and *clf29* 17 day-old plants. Signal is normalized by the amplification of the FUSCA gene. SD is the standard deviation from three replicates. Experiments were performed three times using independent biological samples.

## References

- Angers S, Li T, Yi X, MacCoss MJ, Moon RT, Zheng N (2006) Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* **443**: 590-593
- Baroux C, Gagliardini V, Page DR, Grossniklaus U (2006) Dynamic regulatory interactions of *Polycomb* group genes: *MEDEA* auto-regulation is required for imprinted gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & Dev.* **20**: 1081-1086
- Bernhardt A, Lechner E, Hano P, Schade V, Dieterle M, Anders M, Dubin MJ, Benvenuto G, Bowler C, Genschik P, Hellmann H (2006) CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **47**: 591-603.
- Brukhin V, Gheyselinck J, Gagliardini V, Genschik P, Grossniklaus U (2005) The RPN1 subunit of the 26S proteasome in *Arabidopsis* is essential for embryogenesis. *Plant Cell* **17**: 2723-2737
- Büche C, Poppe C, Schäfer E, Kretsch T (2000) *eid1*: a new *Arabidopsis* mutant hypersensitive in phytochrome A-dependent high-irradiance responses. *Plant Cell* **12**: 547-558
- Buchwald G, van der Stoop P, Weichenrieder O, Perrakis A, van Lohuizen M, Sixma TK (2006) Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of *Polycomb* proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J.* **25**: 2465-2474
- Cao R, Tsukada Y, Zhang Y (2005) Role of Bmi-1 and Ring1A in H2A ubiquitylation and *Hox* gene silencing. *Mol Cell* **20**: 845-854
- Chen Z, Tan JL, Ingouff M, Sundaresan V, Berger F (2008) Chromatin Assembly Factor1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **135**: 65-73

Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* **22**: 442-451

de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, Appanah R, Nesterova TB, Silva J, Otte AP, Vidal M, Koseki H, Brockdorff N (2004) *Polycomb* group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* **7**: 663-676

Exner V, Taranto P, Schönrock N, Grussem W, Hennig L (2006) Chromatin Assembly Factor CAF-1 is required for cellular differentiation during plant development. *Development* **133**: 4163-4172

Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, Penterman J, Choi Y, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (2006) DEMETER DNA glycosylase establishes *MEDEA Polycomb* gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* **124**: 495-506

Grini PE, Jürgens G, Hülskamp M (2002) Embryo and endosperm development is disrupted in the female gametophytic capulet mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* **162**: 1911-1925

Grossniklaus U, Vielle-Calzada, J-P, Hoepfner MA, Gagliano WB (1998) Maternal control of embryogenesis by *MEDEA*, a *Polycomb*-group gene in *Arabidopsis*. *Science* **280**: 446-450

Guitton AE, Page DR, Chambrier P, Lionnet C, Faure JE, Grossniklaus U, Berger F (2004) Identification of new members of FERTILISATION INDEPENDENT SEED *Polycomb* group pathway involved in the control of seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **131**: 2971-2981

Guitton AE, Berger F (2005) Loss of function of *MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1* produces nonviable parthenogenetic embryos in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **15**: 750-754

He YJ, McCall CM, Hu J, Zeng Y, Xiong Y (2006) DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev* **20**: 2949-2954

Hennig L, Bouveret R, Grussem W (2005) MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends Cell Biol* **15**: 295-302

Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, Zhang H (2006) CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol* **8**: 1277-1283

Higa LA, Zhang H (2007) Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Div* **2**: 5

Hong EJ, Villén J, Gerace EL, Gygi SP, Moazed D (2005) A cullin E3 ubiquitin ligase complex associates with Rik1 and the Clr4 histone H3-K9 methyltransferase and is required for RNAi-mediated heterochromatin formation. *RNA Biol* **2**: 106-111

Jia S, Kobayashi R, Grewal SI (2005) Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin. *Nat Cell Biol* **7**: 1007-1013

Jiang D, Wang Y, Wang Y, He Y (2008) Repression of FLOWERING LOCUS C and FLOWERING LOCUS T by the Arabidopsis Polycomb repressive complex 2 components. *PLoS One* e3404.

Jin J, Arias EE, Chen J, Harper JW, Walter JC (2006) A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell* **23**: 709-721

Jullien PE, Katz A, Oliva M, Ohad N, Berger F (2006) Polycomb group complexes self-regulate imprinting of the Polycomb group gene *MEDEA* in *Arabidopsis*. *Curr Biol* **16**: 486-492

Jullien PE, Mosquna A, Ingouff M, Sakata T, Ohad N, Berger F (2008) Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* **6**: e194.

Kapetanaki MG, Guerrero-Santoro J, Bisi DC, Hsieh CL, Rapić-Otrin V, Levine AS (2006) The DDB1-CUL4ADDB2 ubiquitin ligase is deficient in Xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2588-2593

Kinoshita T, Yadegari R, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL (1999) Imprinting of the *MEDEA Polycomb* gene in the *Arabidopsis* endosperm. *Plant Cell* **11**: 1945-1952

Köhler C, Hennig L, Bouveret R, Gheyselinck J, Grossniklaus U, Gruissem W (2003) *Arabidopsis* MSI1 is a component of the MEA/FIE *Polycomb* group complex and required for seed development. *EMBO J* **22**: 4804-4814

Köhler C, Page DR, Gagliardini V, Grossniklaus U (2005) The *Arabidopsis thaliana* MEDEA *Polycomb* group protein controls expression of *PHERES1* by parental imprinting. *Nat Genet* **37**: 28-30

Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, Chen H, He YJ, Xiong Y, Deng XW (2008) Characterization of *Arabidopsis* and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell* **20**: 152-167

Lee J, Zhou P (2007) DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. *Mol Cell* **26**: 775-780

Molinier J, Lechner E, Dumbliauskas E, Genschik P (2008) Regulation and role of *Arabidopsis* CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *PLoS Genet* **4**: e1000093

Mutskov V, Felsenfeld G (2004) Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J* **23**: 138-149

Niessen HE, Demmers JA, Voncken JW (2009) Talking to chromatin: post-translational modulation of *Polycomb* group function. *Epigenetics Chromatin* **2**: 10

Pien S, Grossniklaus U (2007) *Polycomb* and *trithorax* group proteins in *Arabidopsis*. *BBA – Gene Structure and Expression* **1769**: 375-382

Ríos G, Lossow A, Hertel B, Breuer F, Schaefer S, Broich M, Kleinow T, Jásik J, Winter J, Ferrando A, Farrás R, Panicot M, Henriques R, Mariaux JB, Oberschall A, Molnár G, Berendzen K, Shukla V, Lafos M, Koncz Z, Rédei GP, Schell J, Koncz C (2002) Rapid identification of *Arabidopsis* insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *Plant J* **32**: 243-253

Ruggieri R, Tanaka K, Nakafuku M, Kaziro Y, Toh-e A, Matsumoto K (1989) MSI1, a negative regulator of the RAS-cAMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 8778-8782

Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 555-590

Stolpe T, Süsslin C, Marrocco K, Nick P, Kretsch T, Kircher S (2005) *In planta* analysis of protein-protein interactions related to light signaling by bimolecular fluorescence complementation. *Protoplasma* **226**: 137-146

Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi R, Matsuda N, Chu G, Mori T, Iwai S, Tanaka K, Tanaka K, Hanaoka F (2005) UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* **121**: 387-400

Vielle-Calzada J-P, Thomas J, Spillane C, Coluccio A, Hoepfner MA, Grossniklaus U (1999) Maintenance of genomic imprinting at the *Arabidopsis* *MEDEA* locus requires zygotic *DDMI* activity. *Genes Dev* **13**: 2971-2982

Wang H, Wang L, Erdjument-Bromage H, Vidal M, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2004) Role of histone H2A ubiquitination in *Polycomb* silencing. *Nature* **431**: 873-878

Wang D, Tyson MD, Jackson SS, Yadegari R (2006) Partially redundant functions of two SET-domain *Polycomb*-group proteins in controlling initiation of seed development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 13244-13249

Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y (2006) Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Mol Cell* **22**: 383-394

Figure 1

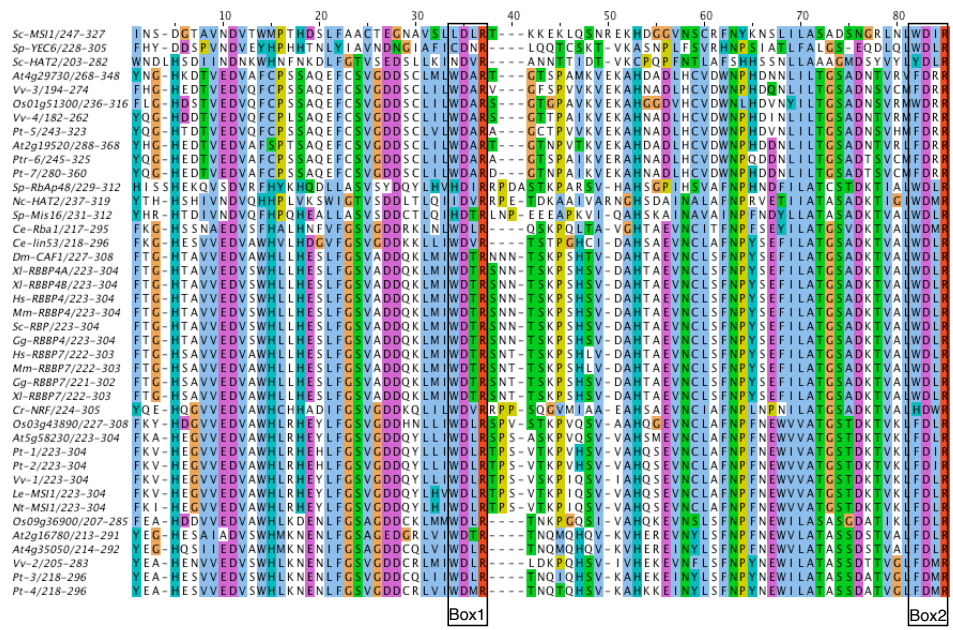




Figure 2

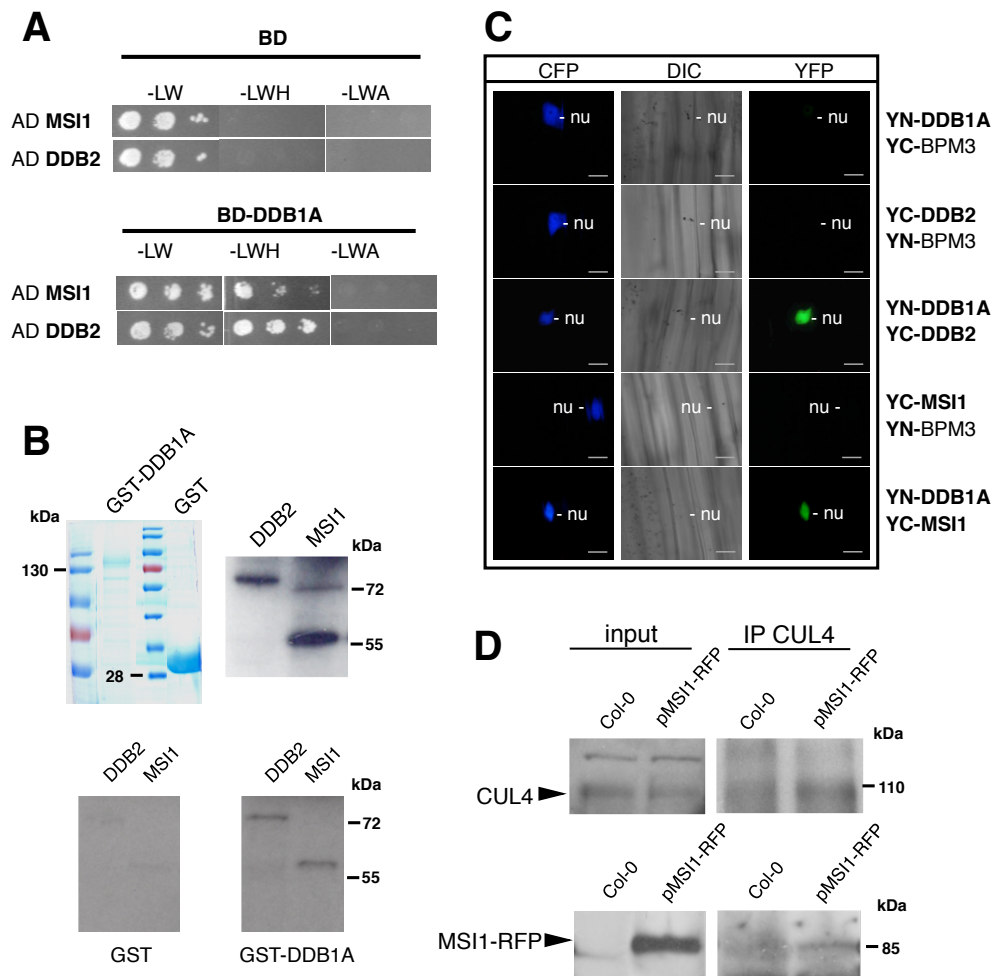


Figure 3

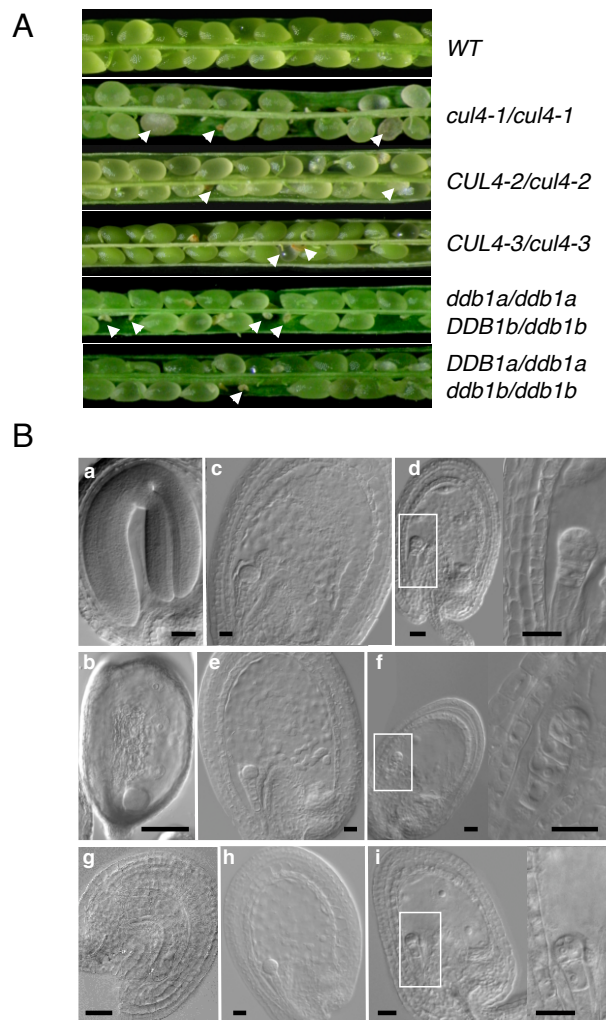


Figure 4

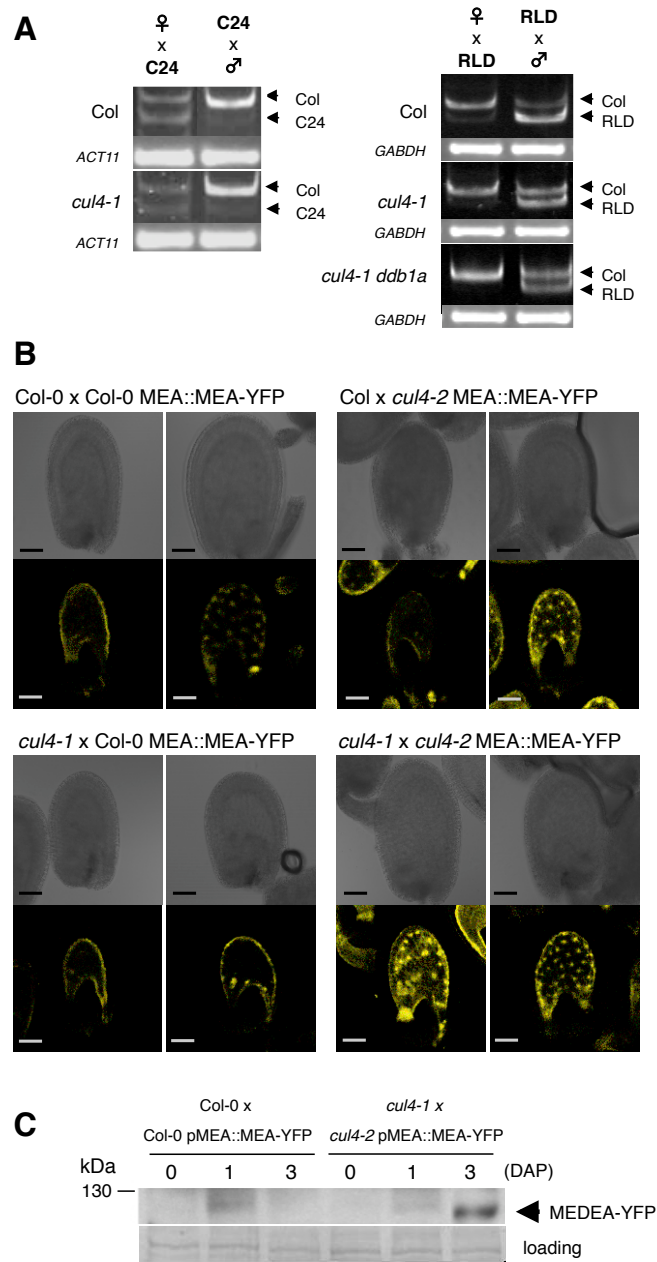
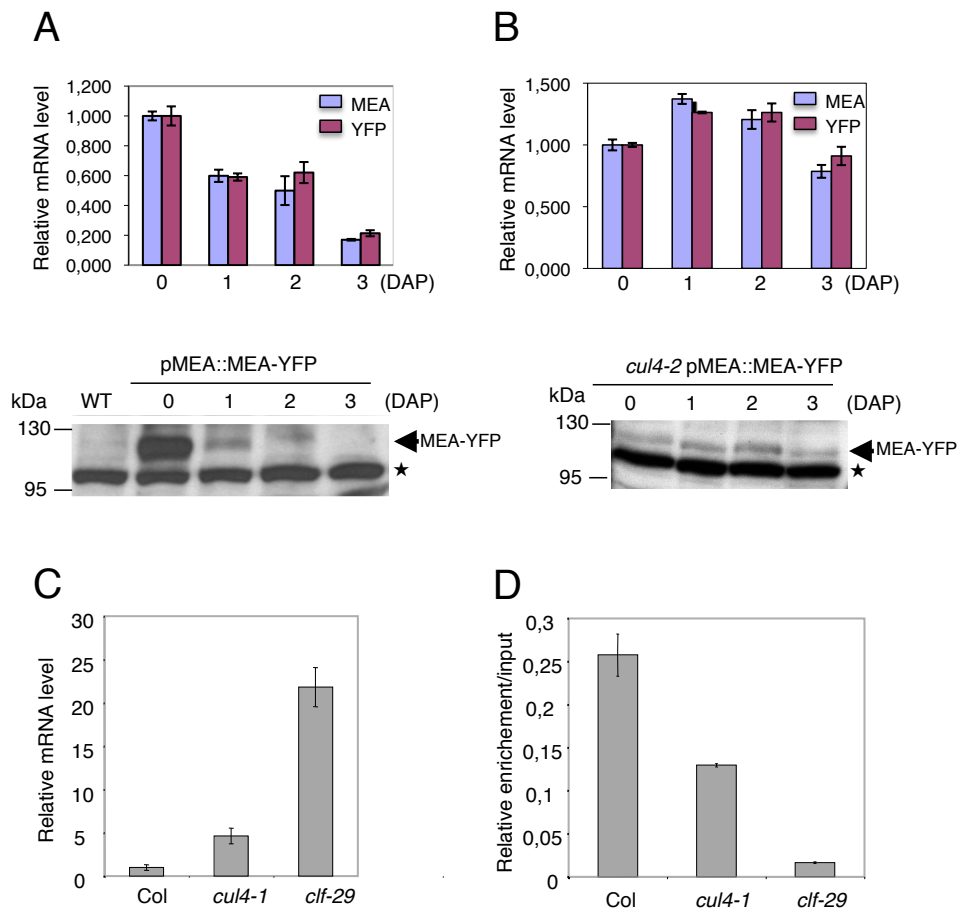


Figure 5



**Table I. Analysis of mature siliques**

Parental genotype (female x male)	Normal seeds	Aborted seeds	Seeds scored	P-Value
<i>Col-0</i> x <i>Col-0</i>	512	8 (1.5%)	520	NA
<i>cul4-2</i> <sup>+/-</sup> ( <i>selfed</i> )	1,129	444 (28.2%)	1,573	0.003
<i>cul4-3</i> <sup>+/-</sup> ( <i>selfed</i> )	1,030	383 (27.1%)	1,413	0.0653
<i>ddb1a-2</i> <i>DDB1B/ddb1b-1</i> ( <i>selfed</i> )	215	81 (27.4%)	296	0.3474

Mature siliques were analysed for the presence of aborted seeds. P-Value, based on a 3:1 ratio as expected for zygotic embryo lethality. At P-value of less than 0.05 the null hypothesis is rejected.

**Table II. Genetic analysis of *cul4* mutant plants**

Parental genotype (female x male)	Hyg <sup>R</sup>	Hyg <sup>S</sup>	n	p-value	TE <sub>F</sub> (%)	TE <sub>M</sub> (%)
<i>cul4-2</i> ( <i>selfed</i> )	470	296	766	0.0017	NA	NA
<i>cul4-3</i> ( <i>selfed</i> )	474	236	710	0.9366	NA	NA
<i>Col-0</i> x <i>cul4-2</i>	213	251	464	0.077	NA	84.9%
<i>cul4-2</i> x <i>Col-0</i>	198	236	434	0.068	83.9%	NA

Resistance to Hygromycin (Hyg<sup>R</sup>, Hygromycin resistant seedlings; Hyg<sup>S</sup>, Hygromycin sensitive seedlings) was used for the *cul4-2* and *cul4-3* plants. Transmission efficiencies were calculated according to Howden *et al.* (1998): TE = Hyg<sup>R</sup>/Hyg<sup>S</sup> x 100%. P-Value, based on a 2:1 segregation ratio as expected for a zygotic embryo lethal mutation and 1:1 for the reciprocal crosses as expected for normal transmission; TE<sub>F</sub>, female transmission efficiency; TE<sub>M</sub>, male transmission efficiency; NA, not applicable. At P-value of less than 0.05 the null hypothesis is rejected.

**Table III. Genetic analysis of *ddb1a ddb1b* mutant plants**

Genotyping	Doubly homozygous (-/- ; -/-)	Heterozygous for one allele (+/- ; -/-)	WT allele (+/+ ; -/-)	n	p-value	TE <sub>F</sub> (%)	TE <sub>M</sub> (%)
<i>DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1</i> (selfed)	0	36	20	56	0.567	NA	NA
<i>ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1</i> (selfed)	0	38	25	63	0.285	NA	NA
<i>ddb1b-1 x DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1</i>	0	26	68	94	< 0.0001	NA	38.2%
<i>ddb1b-1 x DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1</i>	0	44	45	89	0.9156	97.8%	NA
<i>ddb1a-2 x ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1</i>	0	43	41	84	0.8273	NA	104.8%
<i>DDB1B/ddb1b-1 ddb1a-2 x ddb1a-2</i>	0	20	66	86	< 0.0001	30.3%	NA

The progeny of *DDB1A/ddb1a ddb1b* and *ddb1a DDB1B/ddb1b* plants were genotyped. No double mutant was identified. P-Value, based on a 2:1 segregation ratio as expected for a zygotic embryo lethal mutation and 1:1 for the reciprocal crosses as expected for normal transmission. At P-value of less than 0.05 the null hypothesis is rejected.

TE<sub>F</sub>, female transmission efficiency; TE<sub>M</sub>, male transmission efficiency; NA, not applicable

**Table IV. Paternal MEA-YFP signal detection in wild-type and *cul4* mutants**

Parental genotype (female x male)	Negative	Positive (%)
Col-0 x Col-0 <i>MEA ::MEA-YFP</i>	14	15 (51.7%)
Col-0 x <i>cul4-2 MEA ::MEA-YFP</i>	13	15 (54.6%)
<i>cul4-1</i> x Col-0 <i>MEA ::MEA-YFP</i>	13	14 (51.9%)
<i>cul4-1</i> x <i>cul4-2 MEA ::MEA-YFP</i>	11	26 (70.2%)

## Supplemental Figure Legends

### Supplemental Figure S1: CUL4 and DDB1B T-DNA insertion mutant lines

A. Schematic representation and molecular characterization of CUL4 T-DNA insertions. For *cul4-2* and *cul4-3*, T-DNAs are inserted in the 14<sup>th</sup> exon and 7<sup>th</sup> intron, respectively. *CUL4* transcript level (lower panel) was determined by Northern blot and found reduced in both *cul4-2* and *cul4-3* heterozygous plants.

B. Schematic representation and molecular characterization of the DDB1B T-DNA insertion. This mutant was identified in the SALK T-DNA collection (SALK 061944). In *ddb1b-1*, the T-DNA is inserted in the 19<sup>th</sup> and last exon. RT-PCR analyses were performed for *DDB1B* expression in wild-type, *ddb1a-2* (Molinier et al., 2008) and *ddb1b-1* plants using the specific a-b primers. No *DDB1B* signal was detected even after 35 cycles. However, *DDB1A* expression was detected in *ddb1b-1* using the previously described *DDB1A*-specific e-f primers (see Molinier et al., 2008). *RPL4* primers were used as control.

### Supplemental Figure S2. CUL4 expression in floral tissues and developing seeds analyzed by *in situ* hybridization

A. Longitudinal section of the young flower bud.

B. Flower bud with ovule primordia.

C and D. Embryo at the globular stage.

E and F. Mature embryo sac.

G and H. Embryo at the heart shape stage.

I and J. Embryo at torpedo stage.

K and L. Embryo at walking stick stage

AS - antisense probe; S - sense control probe; C - carpel; CC - central cell; E - embryo; EC - egg cell; Ov - ovules; P - petals; Sp - sepals; St - stamens. Bar = 50  $\mu$ m.

### Supplemental Figure S3. Autonomous seed development in *cul4* and *msi1* mutants

A. Representative siliques of wild-type and mutant plants as indicated. None of the *cul4* mutants undergo fertilization-independent silique elongation. Siliques were observed at 6 and 7 DAP or non-pollinated (NP).

B. Microscopic analyses of wild-type and mutant seeds. Unfertilized *msi1* ovules initiate seed development and contain multicellular endosperm. This phenotype was not observed in Col-0 or *cul4* mutants. Bar = 20  $\mu$ m

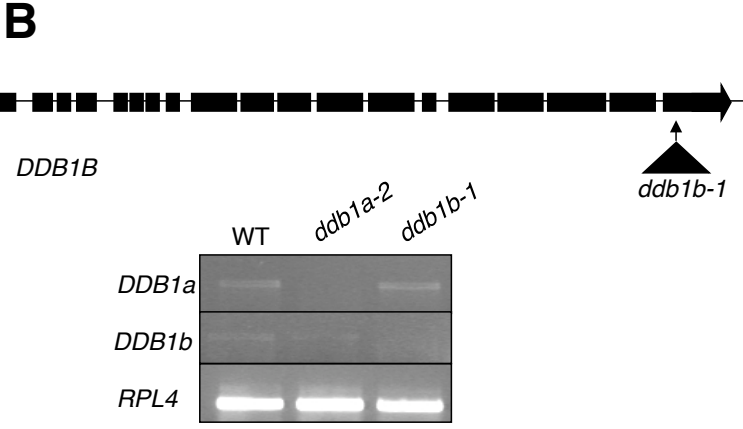
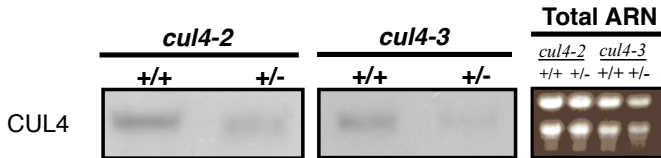
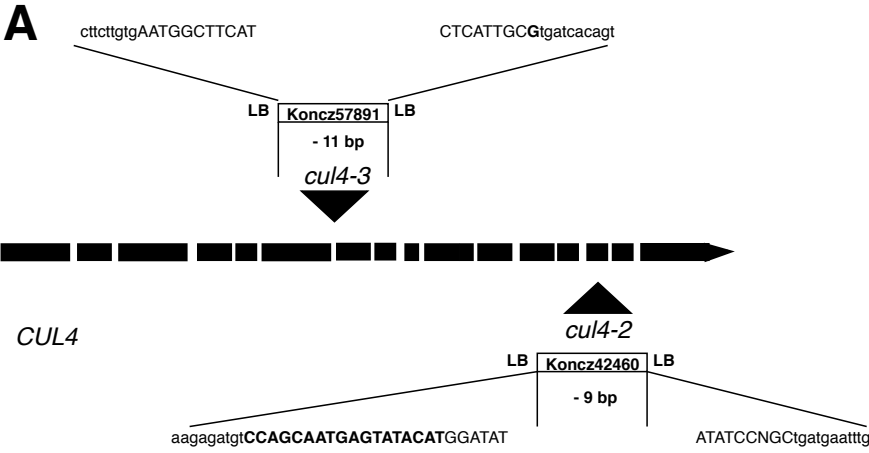
**Supplemental Figure S4. Seed and embryo development in the *cul4-1 cul4-2* progeny**

a Normal seed from the same silique as the seed in (b and c)

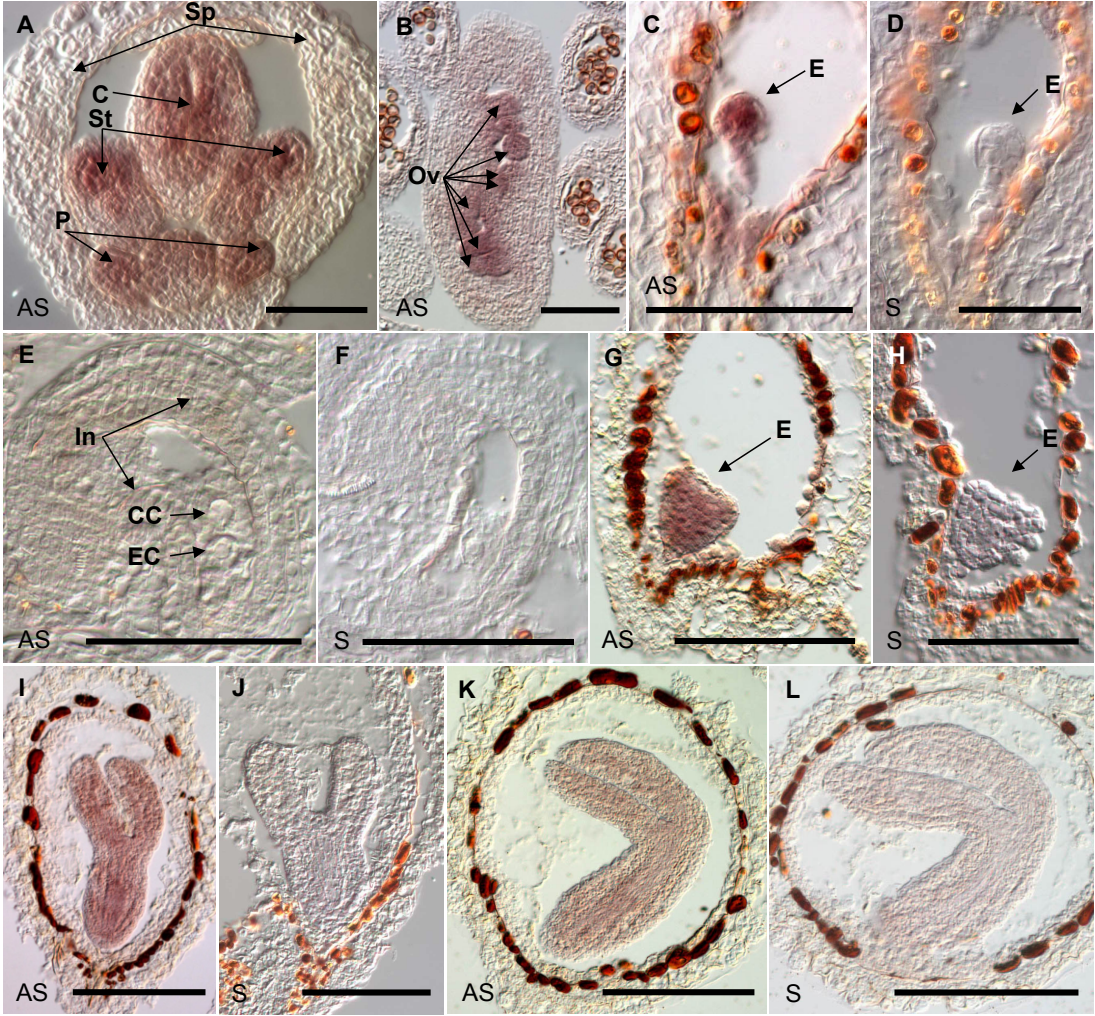
b and c Arrested globular embryo phenotype observed in ~ 50% of seeds in siliques of *cul4-1* used as a female and pollinated with *cul4-2* pollen. Bar = 20  $\mu$ m



SUP Figure 1



SUP Figure 2

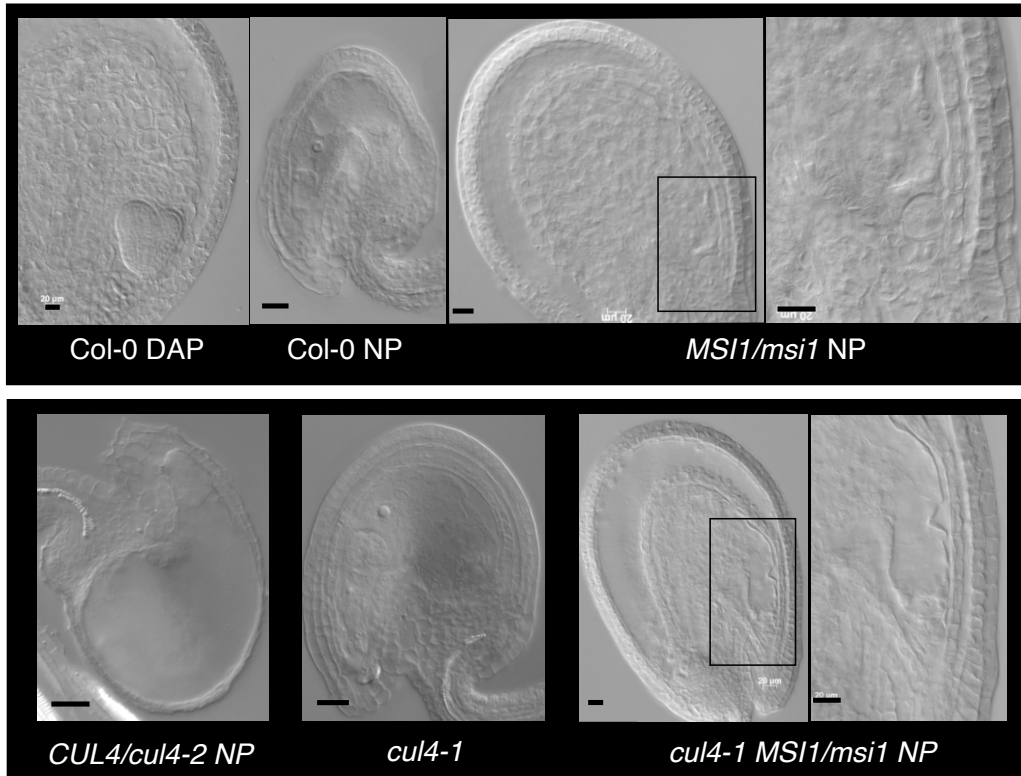


SUP Figure 3

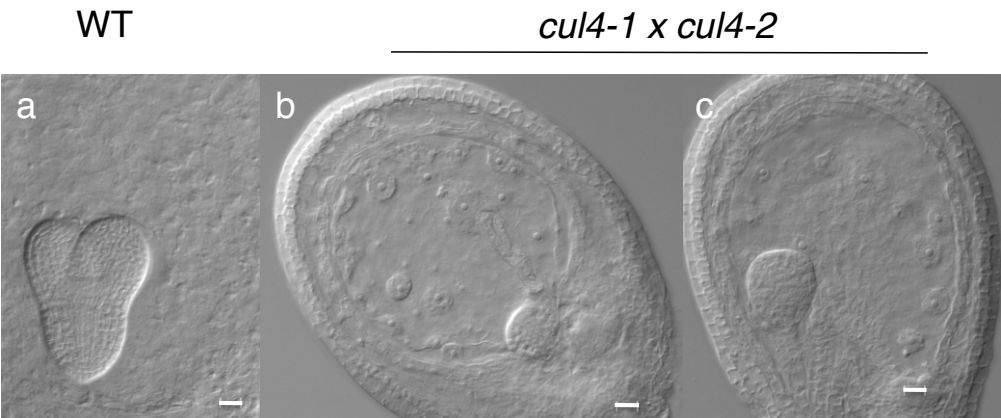
**A**



**B**



SUP Figure 4





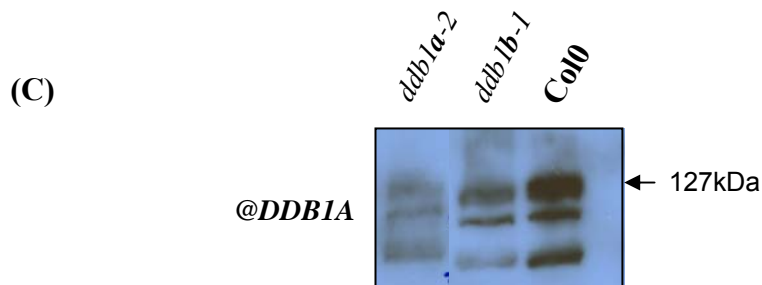
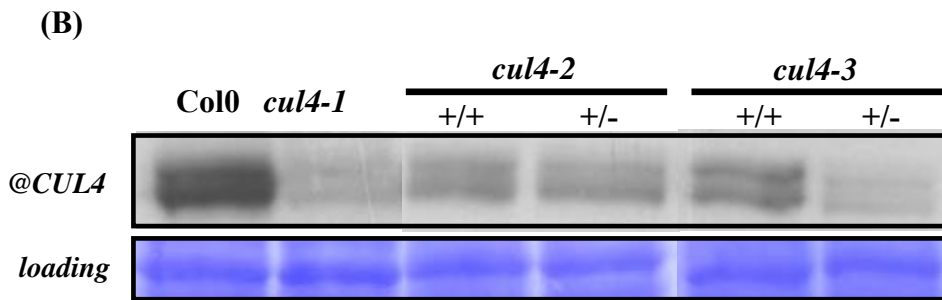
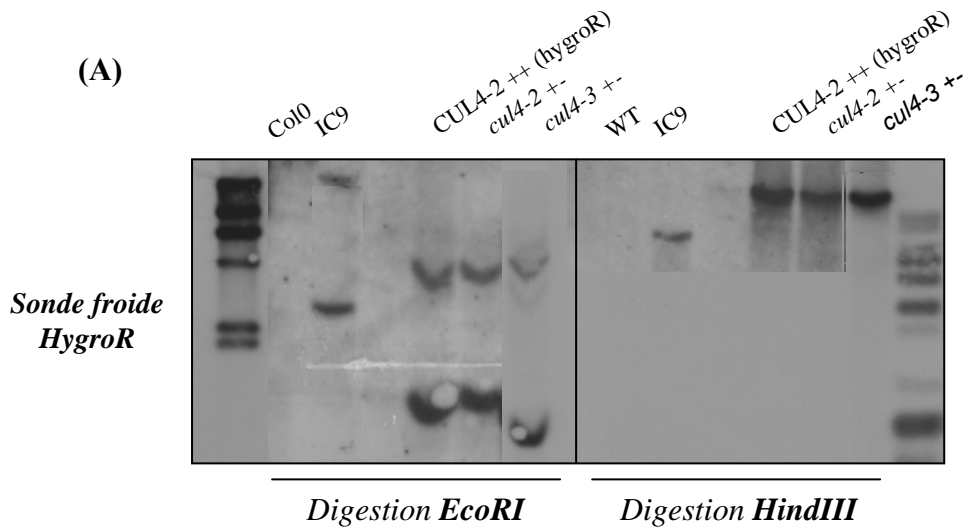
## 2 Résultats non soumis pour publication

### 2.1 Caractérisation moléculaire des mutants *cul4* et *ddb1*

Pour étudier le rôle du complexe CUL4-DDB1 *in planta* nous disposons de 5 mutants d'insertion ADN-T portant le gène de résistance à la sulfadiazine, pour le mutant *cul4-1*, celui de résistance à l'hygromycine, pour les mutants *cul4-2* et *cul4-3*, et le gène de résistance à la kanamycine, pour les mutants *ddb1a-1* et *ddb1b-1*. Afin de pouvoir décrire plus en détail les mutants nuls *cul4-2* et *cul4-3*, nous avons tout d'abord vérifié par « Southern-blot » s'ils contenaient une seule insertion ADN-T. Pour cela, nous avons utilisé une sonde marquée dirigée contre le gène de résistance à l'hygromycine. Les extraits d'ADN totaux ont été au préalable digérés par deux enzymes de restriction. Eco R1 coupe 1 seule fois le gène de résistance à l'hygromycine permettant de révéler 2 fragments d'ADN en cas d'insertion unique. Quant à la digestion avec Hind III, elle permet également de confirmer la présence d'une seule insertion en révélant un fragment unique. En effet, ce site de restriction est absent dans le gène de résistance à l'hygromycine mais présent dans le gène *CULA* de part et d'autre de l'insertion ADN-T. Après comparaison des profils obtenus pour les mutants testés et la lignée témoin IC9 résistante à l'hygromycine, nous avons confirmé qu'une insertion ADN-T unique dans le gène *CULA* était à l'origine des mutations *cul4-2* et *cul4-3* (Fig 24-A).

A l'état hétérozygote, tous ces mutants ne présentent pas de phénotype sporophytique particulier. Nous avons alors testé le niveau protéique des mutants *cul4* et *ddb1* par « Western-blot », en utilisant les anticorps appropriés. Le mutant *cul4-1* est un mutant hypomorphe qui exprime de manière réduite la protéine CUL4. Cette réduction est également observée dans le mutant hétérozygote *cul4-3* mais ne conduit pas à un phénotype visible dans ces individus (Fig 24-B). Contrairement à la souris (Waning et al. 2008), la mutation du gène *CULA* ne semble pas haploinsuffisante chez *Arabidopsis*. De façon générale ce terme s'applique à tout gène dont une seule copie n'est pas suffisante pour assurer sa fonction normale.

Pour les mutants *ddb1*, l'anticorps utilisé est dirigé contre la protéine DDB1A (Molinier et al. 2008). Etant donné que DDB1A et DDB1B sont identiques à environ 90%, cet anticorps ne permet pas une détection spécifique de l'une des deux protéines DDB1 présentes chez *Arabidopsis*. Ainsi, dans le mutant *ddb1a-2* l'anticorps révèle la protéine DDB1B tandis que dans le mutant *ddb1b-1*, c'est la protéine DDB1A qui est détectée (Fig 24-C). Ainsi, nous ne pouvons conclure sur le niveau d'expression de chacune des protéines DDB1 dans les mutants correspondants.



**Fig 24 : Caractérisation moléculaire des mutants *cul4* et *ddb1***

(A) Analyse par « Southern-blot » des insertions ADN-T dans les mutants *cul4-2* et *cul4-3* comparées au contrôle négatif sauvage et au contrôle positif IC9.

(B) Analyse par « Western-blot » de l'expression de la protéine CUL4 dans les différents mutants *cul4* comparée au contrôle Col0.

(C) Expression de la protéine DDB1A dans les mutants *ddb1a-2* et *ddb1b-1*.

## **2.2 Caractérisation génétique des mutants *cul4* et *ddb1***

Les résultats obtenus au cours des expériences qui ont permis la caractérisation génétique des différents mutants du complexe CUL4-DDB1, sont exposés dans l'article soumis pour publication. Ils confirment le caractère essentiel des gènes *CULA* et *DDB1A/B*.

L'analyse des siliques a également permis de démontrer qu'en absence d'activité des gènes *CULA* et *DDB1*, le développement précoce de la graine connaît des perturbations diverses. Afin de confirmer un arrêt strict de la croissance de l'embryon, des analyses de siliques à un stade plus tardif (coeur) ont été effectuées. Ces siliques renferment des graines sauvages ayant eut un développement normal et des graines dégénérées, qui permettent de rejeter l'hypothèse d'un retard éventuel du développement des mutants *cul4* et *ddb1* (Fig 25-a-b,c-d,e-f,h-i,k-l).

Afin de pouvoir établir un lien direct entre MSI1 et le complexe CUL4-DDB1, nous avons testé le développement parthénogénétique des différents mutants de la CUL4-E3 ligase. Ce phénotype particulier caractérise le mutant *msi1* et sa mise en évidence consiste en une expérience relativement aisée. Pour cela, les fleurs des différents mutants ont été émasculées afin d'empêcher la pollinisation du pistil. Après 6 jours de croissance, le gamétophyte femelle a été prélevé pour des analyses microscopiques (Fig 25-g, j, m). En absence de fécondation, les ovules de ces mutants renferment une cellule centrale intacte, incapable de se diviser pour former un albumen multi-nucléé. Comparé au témoin sauvage, le mutant *cul4-3* et les doubles mutants *ddb1* ne semblent pas présenter de développement parthénogénétique comme c'est le cas pour le mutant *msi1* (Köhler et al. 2003).

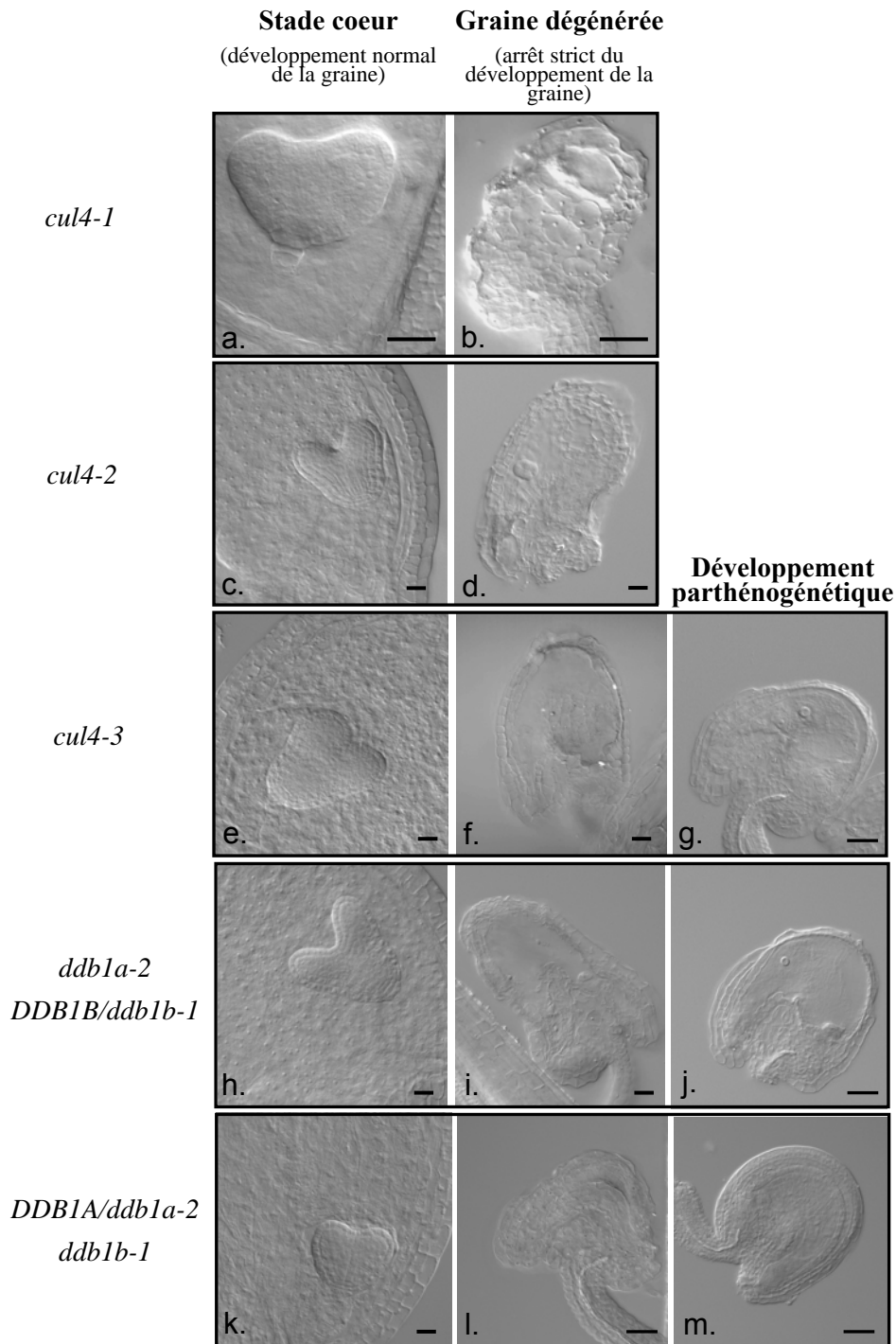
## **2.3 Le complexe CUL4-DDB1 et l'empreinte parentale**

L'absence de phénotype parthénogénétique chez les mutants du complexe CUL4-DDB1 indique que ce complexe n'est pas associé à toutes les fonctions de *MSI1*. Comme *MSI1* est un constituant d'un complexe PRC2 d'*Arabidopsis* qui contrôlent directement l'empreinte parentale de différents gènes, dont *PHERES1* et *MEDEA* (Köhler et al. 2003, 2005, Jullien et al. 2006, 2008), nous nous sommes penchés sur les effets que pouvaient avoir les mutations de la CUL4-E3 ligase sur l'expression différentielle de ces gènes.

### **2.3.1 Effets de la mutation *cul4* sur l'empreinte parentale du gène *PHERES1***

Les croisements réciproques réalisés entre les écotypes Columbia et C24 n'ont pas permis de mettre en évidence une dérégulation de l'empreinte parentale du gène *PHERES1* dans le mutant hypomorphe *cul4-1* (Fig 26-A). Nous avons tout d'abord effectué ce test à 3 jours après pollinisation sans obtenir de différence notable avec le contrôle sauvage. L'expérience a





**Fig 25 : Analyse du développement de la graine des mutants *cul4* et *ddb1***

(a, c, e, h et k) Embryons au stade coeur tardif, renfermés dans des graines de phénotype sauvage, issues de siliques de chacun des mutants analysés. Les observations ont été effectuées 8 jours après pollinisation.

(b, d, f, i et j) Graines dégénérées provenant de la même silique que les graines saines. Ces graines correspondent aux individus homozygotes mutants présentant le phénotype de létalité embryonnaire.

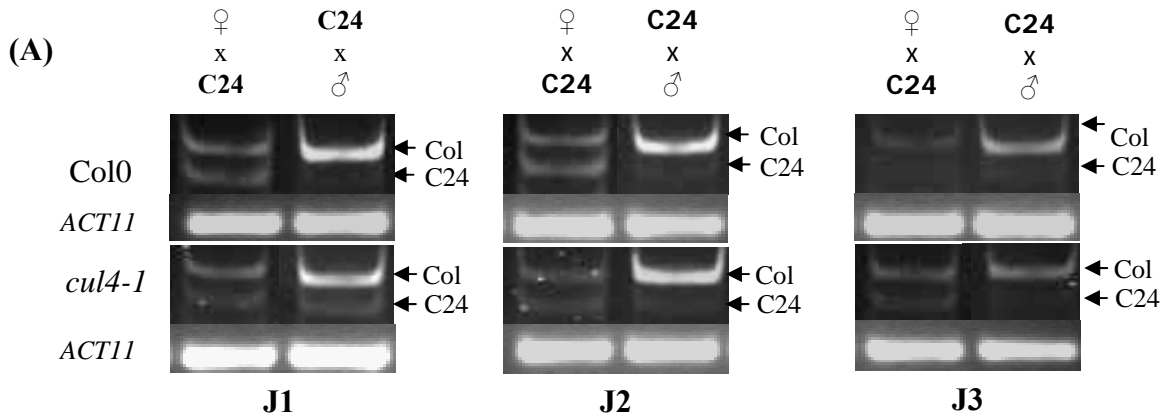
(g, j et m) Développement parthénogénétique des mutants nuls *cul4-3*, *ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1* et *DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1*. Les observations ont été réalisées 6 jours après émasculatation des fleurs.

Barre d'échelle : 20µm

également été réalisée aux jours 1 et 2 après pollinisation afin de vérifier si l’empreinte parentale de *PHERES1* restait inchangée au cours du développement embryonnaire précoce. Aucune différence n’a été relevée aux jours correspondants suggérant que la mutation *cul4* n’affecte pas le profil d’expression de *PHERES1*.

Une approche similaire utilisant la lignée rapportrice pPHE::GUS a pour but de confirmer ce que nous avons observé précédemment. Des croisements réciproques entre les différents mutants du complexe CUL4-DDB1 et la lignée pPHE::GUS ont été analysés à 3 jours après pollinisation (Fig 26-B). Le contrôle négatif Col0 présente une forte coloration de l’albumen lorsqu’il est utilisé en tant que femelle et seul l’endosperme chalazal est marqué lorsqu’il apporte le pollen. Malgré la variabilité de l’intensité de coloration, ces deux populations de graines forment à 100% les siliques issues du croisement réciproque. Celui-ci permet de vérifier que le gène *PHERES1* est effectivement exprimé dans l’albumen du côté mâle comme cela a été prouvé dans Köhler et al. 2005. Quant au mutant *msi1-1*, il a servi de contrôle positif. Etant donné que la protéine MSI1 fait parti du complexe PRC2 qui permet l’inhibition directe de l’allèle femelle de *PHERES1*, nous avons analysé le croisement où le mutant *msi1-1* est donneur des gamètes mâles. Les siliques issues de ce croisement comportent deux populations de graines distinctes : celle dont l’albumen est coloré (156 = 54,2%) et celle dont la coloration est restreinte à l’albumen chalazal (132 = 45,8%) comme dans le contrôle négatif Col0. Les individus comportant cette faible coloration correspondent très vraisemblablement au génotype sauvage. Quant aux graines dont la totalité de l’albumen est marqué, elles correspondraient aux individus de génotype *MSI1/msi1-1* possédant l’allèle mâle *msi1-1* muté. Cette coloration est donc due à l’expression de l’allèle femelle du gène *PHERES1* et confirme l’implication de *MSI1* dans l’établissement de l’inhibition de celui-ci au cours de l’embryogenèse. Il faut noter que le résultat du croisement où le mutant *msi1-1* sert de femelle n’est pas représenté. C’est le développement parthénogénétique rencontré dans celui-ci qui empêche d’obtenir une population de graines homogène et facilement analysable.

Nous avons ensuite comparé ces résultats à ceux obtenus après analyse des croisements réciproques effectués avec les mutants du complexe CUL4-DDB1. Malgré une différence d’intensité, le croisement où les mutants sont utilisés en tant que femelle est semblable au contrôle négatif Col0, tandis que celui où ils sont utilisés en tant que mâle est plus proche du résultat observé avec le mutant *msi1-1*. Contrairement à l’expérience de croisement réciproque entre les deux écotypes, les résultats obtenus avec la lignée rapportrice



(B)

Croisement ♂ ou ♀	♀ x pPHE::GUS	pPHE::GUS x ♂
	Col 0	
<i>msi1-1</i>		
<i>cul4-2</i>		
<i>ddb1a-2</i> <i>DDB1B/ddb1b-1</i>		

**Fig 26 : L’empreinte parentale du gène *PHERES1* dans les mutants du complexe CUL4-DDB1**

(A) Cinétique comparative de l’empreinte parentale du gène *PHERES1* entre le contrôle sauvage Col0 et le mutant hypomorphe *cul4-1*. L’analyse des extraits d’ARN de siliques a été effectuée aux jours 1, 2 et 3 après pollinisation

(B) Analyse des graines issues des croisements réciproques avec la lignée transgénique pPHE::GUS, 3 jours après pollinisation.

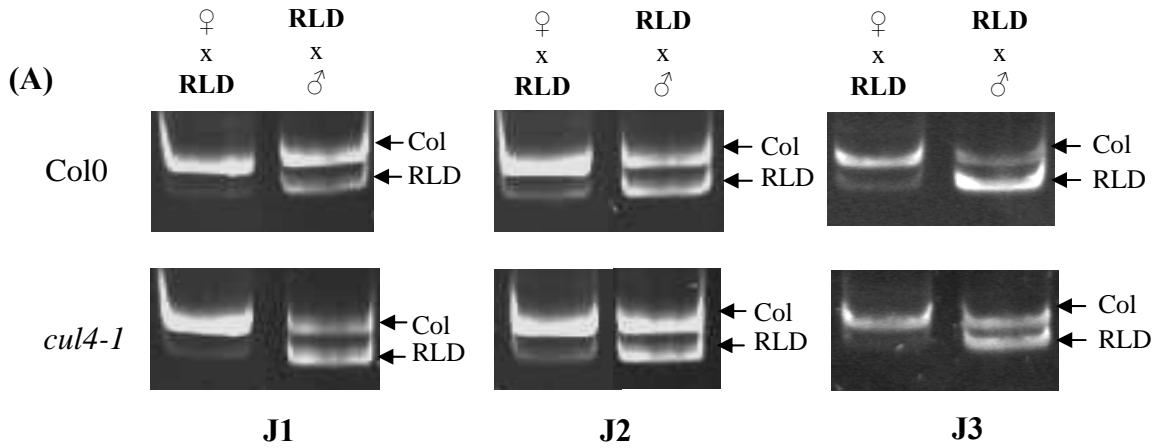
pPHE::GUS suggèrent une levée de l’empreinte parentale du gène *PHERES1* dans les mutants *cul4* et *ddb1*.

### 2.3.2 Effets de la mutation *cul4* sur l’empreinte parentale du gène *MEDEA*

#### 2.3.2.1 Obtention du profil d’expression des allèles parentaux de *MEDEA* par croisements directs avec différents mutants du complexe *CUL4-DDB1*.

Nous avons utilisé la même méthode de croisement que pour le gène *PHERES1* afin de mettre en évidence le profil de l’empreinte parentale de *MEDEA* dans le mutant hypomorphe *cul4-1*. Dans ce cas, l’écotype présentant un polymorphisme au niveau du gène *MEDEA*, comparé à Columbia, est RLD. L’analyse a été effectuée pendant le développement embryonnaire précoce à 1, 2 et 3 jours après pollinisation (Fig 27-A). Au cours des deux premiers jours, les croisements réciproques réalisés avec le contrôle Col0 et le mutant *cul4-1* ne présentent pas de différence particulière. De plus, contrairement à l’écotype RLD, lorsque l’écotype Columbia fournit les gamètes femelles, nous obtenons un résultat plus net de l’expression du côté maternel du gène *MEDEA*. C’est au jour 3 après pollinisation, qu’une différence d’expression des allèles mâles et femelles a été relevée. En effet, le croisement réciproque réalisé avec le contrôle Col0 démontre clairement l’expression préférentielle de *MEDEA* du côté maternel. Cependant, cette expression n’est pas exclusive étant donné que la bande correspondant à l’allèle mâle est détectée. Quant au croisement réciproque fait avec le mutant *cul4-1*, l’intensité des deux bandes correspondant à l’expression de *MEDEA* est équivalente et suggère que l’expression du gène se fait à partir des deux allèles parentaux. L’empreinte parentale de *MEDEA* est donc dérégulée dans le mutant *cul4-1* et la *CUL4* participerait ainsi à l’inhibition de l’allèle mâle de *MEDEA*.

Nous nous sommes ensuite servis de la lignée pMEA::GUS pour confirmer les résultats obtenus dans l’expérience précédente. Les analyses ont été effectuées 3 jours après pollinisation pour pouvoir comparer avec la levée de l’empreinte paternelle de *MEDEA* observée précédemment (Fig 27-B). Les croisements réciproques avec le témoin Col0 et *msi1-1* ont permis de certifier que l’expression de *MEDEA* dans l’albumen, se fait à partir du génome maternel comme il l’a été prouvé dans Kinoshita *et al.* 1999. Toujours à cause de l’effet parthénogénétique du mutant *msi1-1*, nous n’avons pu confirmer par cette approche l’implication du complexe PRC2 dans l’inhibition directe de l’allèle mâle de *MEDEA*. Quant au résultat des croisements réciproques réalisés avec les deux mutants forts *cul4*, ils sont quasi identiques à celui obtenu avec le témoin sauvage. En effet, les graines issues du croisement où les mutants sont utilisés en tant que femelles, ne présentent qu’une très faible coloration au



(B)

Croisement ♂ ou ♀	♀ x pMEA::GUS	pMEA::GUS x ♂
Col 0		
<i>msi1-1</i>		
<i>cul4-2</i>		
<i>cul4-3</i>		

**Fig 27 : L'empreinte parentale du gène *MEDEA* dans les mutants du complexe *CULA4-DDB1***

(A) Cinétique comparative de l'empreinte parentale du gène *MEDEA* entre le contrôle sauvage Col0 et le mutant hypomorphe *cul4-1*. L'analyse des extraits d'ADN de siliques a été effectuée aux jours 1, 2 et 3 après pollinisation.

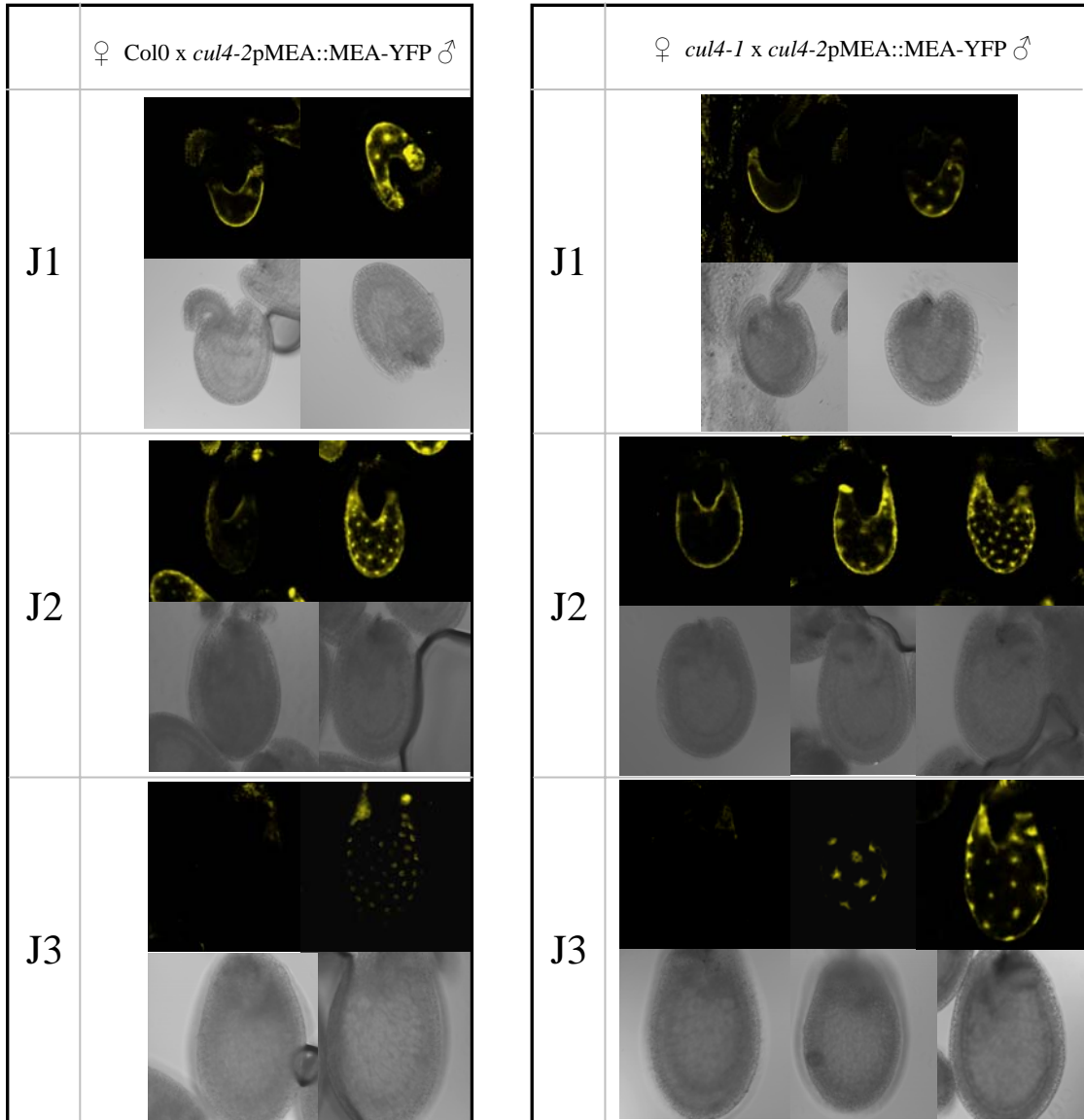
(B) Analyse des graines issues des croisements réciproques avec la lignée transgénique pMEA::GUS, 3 jours après pollinisation.

niveau de la zone micropylaire. Ce même marquage est observé quand Col0 apporte les gamètes femelles et ne permet pas d'affirmer que la CUL4 participe à l'inhibition de l'allèle mâle de *MEDEA* dans l'albumen. Ce résultat différent peut en partie s'expliquer par le comportement hétérogène de la lignée pMEA::GUS. Etant donné que *MEDEA* est exprimé du côté maternel, lorsque la lignée pMEA::GUS se retrouve en tant que femelle, la totalité des graines issues d'un tel croisement doivent en théorie, comporter un albumen coloré dans sa totalité. Ceci est effectivement observé pour Col0 et *msi1-1*, or deux populations se distinguent au sein d'une même silique, pour les croisements faits avec les mutants *cul4*. Par conséquent, cette approche ne constitue pas le meilleur moyen pour confirmer la dérégulation de l'empreinte parentale de *MEDEA* dans les mutants *cul4*.

### **2.3.2.2 Obtention du profil d'expression de l'allèle paternel de *MEDEA* en utilisant la lignée rapportrice pMEA::MEA-YFP**

Une autre expérience de croisements utilisant la lignée pMEA::MEA-YFP, a été choisie afin d'observer l'effet de la mutation *cul4* sur l'empreinte parentales de *MEDEA*. Cette fois-ci nous avons le promoteur de *MEDEA* ainsi que la région codante du gène fusionnée traductionnellement à l'YFP (Wang et al. 2006). Cette lignée a été introgressée à l'état homozygote dans le mutant fort *cul4-2*. Pour identifier le comportement de l'allèle mâle de *MEDEA* dans le fond génétique du mutant *cul4*, nous avons croisé le mutant homozygote *cul4-1* avec la lignée *cul4-2*pMEA::MEA-YFP (Fig 28). Ce croisement entre le mutant hypomorphe et le mutant nul permet d'étudier des graines de génotype *cul4-1/cul4-2*, possédant une activité CUL4 réduite par rapport à celle du mutant hypomorphe mais non absente, comparée au mutant perte de fonction *cul4-2*.

Nous avons tout d'abord analysé par microscopie confocale et en utilisant les mêmes réglages d'observation, le croisement témoin réalisé avec le contrôle sauvage Col0. Etant donné qu'on souhaite connaître le comportement de l'allèle mâle de *MEDEA*, Col0 est utilisé en tant que femelle et la lignée *cul4-2*pMEA::MEA-YFP sert de donneur des gamètes mâles. Deux populations de graines cohabitent dans les siliques issues d'un tel croisement. Ces deux populations sont présentes aux jours 1, 2 et 3 après pollinisation mais leur proportion varie au cours du développement embryonnaire précoce. En effet, au premier jour, les graines exprimant la construction pMEA::MEA-YFP dans les noyaux de l'albumen représentent un taux d'environ 25% contre 75% de celles qui possèdent un albumen non marqué. Aux jours 2 et 3, un équilibre entre ces deux populations, de 50%-50%, est atteint. Nous pouvons noter qu'au jour 3, l'intensité de l'expression du transgène est plus faible comparée à celle



**Fig 28 : Mise en évidence de l’empreinte parentale de *MEDEA* par croisement avec la lignée rapportrice *cul4-2pMEA::MEA-YFP***

Représentation des différentes populations de graines d’une même silique qui ont été analysées par microscopie confocale. Ces graines sont issues d’un croisement contrôle Col0x*cul4-2pMEA::MEA-YFP* et du croisement test *cul4-1*x*cul4-2pMEA::MEA-YFP*. Les observations ont été effectuées au cours d’une cinétique de pollinisation aux jours 1, 2 et 3.

rencontrée aux jours 1 et 2. Ce résultat confirme que *MEDEA* n'est pas exprimé exclusivement du côté femelle comme nous l'avons remarqué dans les croisements réciproques impliquant deux écotypes différents. L'allèle mâle semble être exprimé de manière progressive au cours du développement embryonnaire précoce, avec un niveau d'expression très faible 3 jours après pollinisation.

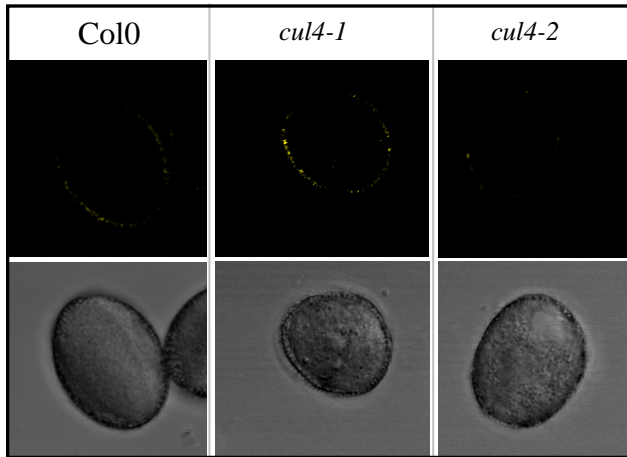
Lorsque Col0 est remplacé par le mutant hypomorphe *cul4-1*, deux populations de graines sont présentes au jour 1 tandis qu'aux jours 2 et 3, un troisième type de marquage fluorescent a été identifié. Celui-ci est localisé dans des noyaux de l'albumen ayant une taille anormalement élevée. Ce phénotype est vraisemblablement retrouvé dans les graines de génotype *cul4-1/cul4-2* et suggère une accumulation de la protéine de fusion MEA-YFP, due à une expression anormale de l'allèle mâle du gène *MEDEA*. A 3 jours après pollinisation, l'intensité d'expression du transgène est également plus forte lorsque le mutant *cul4-1* joue le rôle de femelle. L'inhibition de l'allèle *MEDEA* paternel semble donc inefficace en absence de la CUL4. Ceci permet une fois de plus de mettre en évidence l'implication de cette protéine dans la régulation de l'empreinte parentale de *MEDEA*.

Contrairement à l'expérience précédente, les résultats obtenus dans cette démarche montrent que la levée de l'empreinte parentale est détectée à partir du deuxième jour après pollinisation. Malgré le fait qu'aucun effet n'est détecté au premier jour de l'embryogenèse, nous avons tout de même analysé les grains de pollen des différentes lignées transgéniques afin de vérifier si l'expression de *MEDEA* dans les mutants *cul4* pouvait intervenir en amont de la fécondation (**Fig 29**). Après avoir diminué au maximum l'autofluorescence des grains de pollen, nous avons utilisé ces mêmes réglages d'observation pour comparer l'expression de la protéine de fusion MEA-YFP entre le contrôle Col0 et les lignées *cul4-1pMEA::MEA-YFP* et *cul4-2pMEA::MEA-YFP*. Une faible fluorescence entoure les grains de pollen du contrôle Col0. Un marquage identique est détecté au sein des lignées transgéniques mutées. Ces observations indiquent que l'allèle paternel de *MEDEA* reste inhibé dans les gamètes mâle des mutants *cul4* et que la levée de la répression que nous avons mise en évidence, intervient uniquement après fécondation.

#### **2.4 Profil d'expression de MSII dans le mutant hypomorphe *cul4-1***

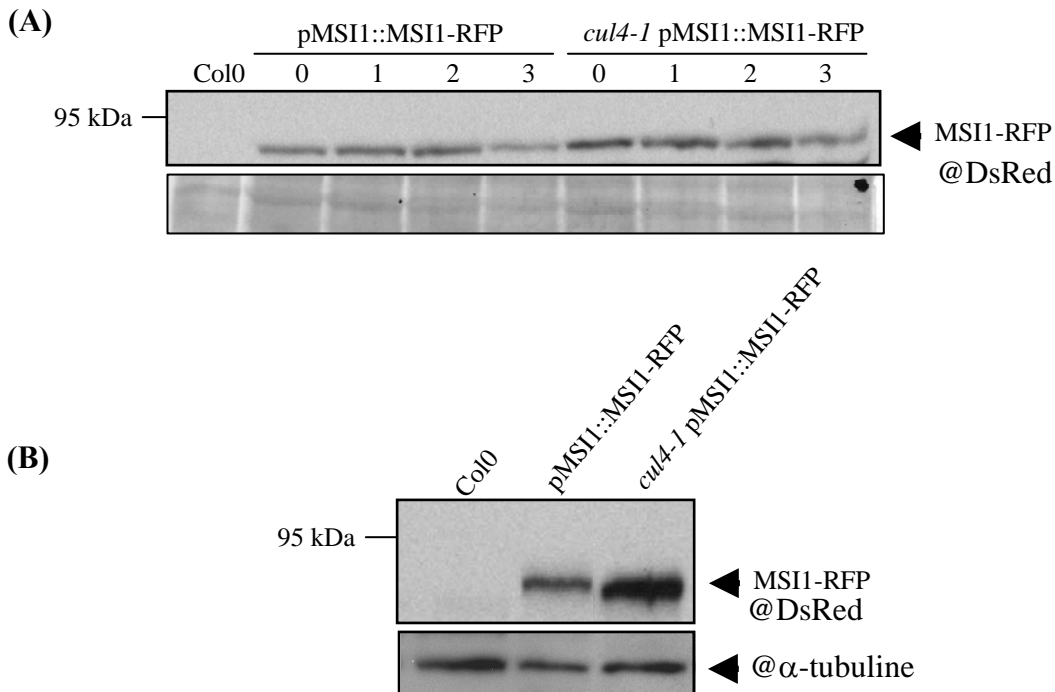
Le maintien de l'empreinte parentale de *MEDEA* est directement lié au complexe PRC2 qui renferme la protéine clé MSI1, dont nous avons prouvé l'interaction avec le complexe CUL4-DDB1A. Nous avons émis l'hypothèse que MSI1 est un « récepteur » des CRL4s E3 ligases et pourrait donc conduire à l'ubiquitination d'une autre protéine cible. Néanmoins





**Fig 29 : Analyse des grains de pollen des mutants *cul4* renfermant le transgène pMEA::MEA-YFP**

Les images obtenues par microscopie confocale permettent la comparaison des grains de pollen des lignées rapportrices *cul4-1*pMEA::MEA-YFP (*cul4-1*) et *cul4-2*pMEA::MEA-YFP (*cul4-2*) avec la lignée transgénique sauvage pMEA::MEA-YFP (Col0).



**Fig 30 : Expression de MSI1 dans le mutant hypomorphe *cul4-1* au cours du développement embryonnaire et sporophytique**

(A) Analyse par western-blot du niveau d'expression de la protéine de fusion MSI1-RFP dans le contrôle Col0 et le mutant hypomorphe *cul4-1*. Les extractions protéiques ont été effectuées à partir de siliques issues d'auto-croisements à différents jours après pollinisation (0, 1, 2 et 3).

(B) Étude de la stabilité de la protéine de fusion MSI1-RFP dans le mutant hypomorphe *cul4-1*. Les protéines ont été extraites à partir de tissus végétatifs de plantules transgéniques de 10 jours.

certain récepteur de E3 ligases sont également des substrats de ces E3 ligases auxquelles ils appartiennent (Molinier et al. 2008). Nous avons donc étudié la stabilité de cette protéine au sein du mutant hypomorphe *cul4-1*. Puisque nous ne possédons pas d'anticorps dirigés directement contre MSI1, nous avons introgressé la lignée pMSI1::MSI1-RFP dans le fond génétique du mutant *cul4-1*. Après avoir sélectionnée une lignée homozygote pour la mutation et le transgène, nous avons comparé le profil d'expression de la protéine de fusion MSI1-RFP dans le fond génétique du mutant par rapport à son profil d'expression dans Col0 (Fig 30-A). L'expérience a été réalisée au cours d'une cinétique de pollinisation. Au temps 0, 1 et 2 jours, la protéine de fusion MSI1-RFP est exprimée à des niveaux équivalents. Cette expression diminue au cours du troisième jour après pollinisation. Un profil d'expression similaire est observé dans le mutant hypomorphe *cul4-1*. La mutation au niveau du gène *CULA* ne semble pas affecter le comportement de la protéine MSI1. Cependant, nous pouvons remarquer que le niveau d'expression de MSI1 dans le mutant hypomorphe est sensiblement plus fort au cours du développement embryonnaire précoce. MSI1 serait stabilisé dans le mutant *cul4-1* et pourrait ainsi être une cible potentielle du complexe *CUL4<sup>DDB1A</sup>*. Nous avons vérifié cette hypothèse en testant le comportement de la protéine MSI1-RFP dans des tissus végétatifs de plantules de 12 jours (Fig 30-B). La lignée utilisée pour l'expérience présente une accumulation plus forte de la protéine MSI1 dans le fond génétique du mutant *cul4-1*, comparée au contrôle Col0. Cette observation suggère que MSI1 soit une cible de la *CUL4*-E3 ligase. Or, à ce stade du développement, le maintien de l'empreinte parentale sur les gènes *PHRES1* et *MEDEA* est assurée par un autre complexe du type PRC2, qui contiendrait éventuellement la protéine MSI1 et des sous-unités additionnelles telles que CLF/SWN et FIE (Köhler et al. 2006).



Discussion  
et  
Perspectives



### ***1.1 MSII est un candidat potentiel pour former le module de reconnaissance d'un complexe CRL4 contrôlant le développement embryonnaire***

Dans les organismes eucaryotes, la protéolyse ubiquitine dépendante est un mécanisme hautement conservé qui joue un rôle central dans de nombreux processus physiologiques. Il permet l'ubiquitination des protéines cibles dans le but d'altérer leur stabilité et leur fonction dans les cellules. Chez les plantes, l'ubiquitination spécifique est principalement assurée par les enzymes E3-ligase contenant les protéines CUL1, 3 et 4, chacune étant liées au contrôle de nombreux processus cellulaires. Contrairement aux autres complexes, le mécanisme de reconnaissance des substrats par la E3-ligase contenant la sous-unité CUL4 est encore peu connu. Plusieurs études ont cependant permis de préciser la structure et la fonction des CRL4 (Angers et al. 2006, Higa et al. 2006, He et al. 2006, Jin et al. 2006, Lee et Zhou 2007). Nous avons analysé deux mutants nuls *cul4* qui ont permis de confirmer le caractère essentiel du gène chez *Arabidopsis*. En effet, ces mutants perte de fonction présentent un phénotype de létalité embryonnaire dont les graines contiennent un embryon arrêté à un stade globulaire très précoce. La CULLIN4 interagit avec une sous-unité très conservée au sein de ces complexes, appelée DDB1. C'est une protéine d'environ 120 kDa qui sert d'adaptateur de substrat (Bernhardt et al. 2006; Chen et al. 2006, Lee et al. 2008, Molinier et al. 2008, Wang et al. 2008, Zhang et al. 2008). Le génome d'*Arabidopsis* compte deux gènes codant pour DDB1 appelés *DDB1a* et *DDB1b*, contrairement au génome humain qui possède un gène *DDB1* unique. Après étude des mutants d'insertion ADN-T dans les gènes *DDB1* d'*Arabidopsis*, aucun phénotype particulier n'a été déterminé chez le mutant *ddb1a* (Schroeder et al. 2002, Bernhardt et al. 2006). Quant au mutant *ddb1b*, une mutation perte de fonction semble conduire à une létalité embryonnaire suggérant le rôle crucial de ce gène au cours du développement de la plante (Schroeder et al. 2002). Dans notre cas, aucun phénotype n'a été observé pour le mutant *ddb1a* et, contrairement à ce qui a été indiqué, il en est de même pour le mutant *ddb1b*. Dans nos conditions de culture, seule la perte de fonction commune de ces deux gènes mène à l'arrêt du développement embryonnaire et suggère le caractère essentiel conjoint des gènes *DDB1*. De manière similaire à *CUL4*, cette double mutation mène à l'arrêt du développement de l'embryon au stade globulaire précoce. En plus des expériences d'interaction, cela constitue une preuve génétique supplémentaire de l'activité conjointe des gènes *CUL4* et *DDB1* au sein d'un même complexe (Angers et al. 2006, Bernhardt et al. 2006, Li et al. 2006).

Des analyses tridimensionnelles de la E3-ligase CUL4-DDB1 ont mis en évidence deux domaines d'interaction particuliers au sein de la protéine adaptatrice, DDB1. L'un permet l'interaction avec la CUL4 et l'autre sert à la fixation des protéines renfermant un domaine appelé DWD (« DDB1 binding WD40 ») (He et al. 2006, Lee et al. 2008, Sigma et al. 2007). Ces dernières sont communément appelées DCAFs (« DDB1-CUL4 Associated factors ») et représentent des candidats potentiels pour la reconnaissance des substrats des complexes CRL4. Dans les cellules animales, la plupart de ces protéines renferment la DWD-box (ou WDxR ou DxR). Ce motif semble indispensable à l'établissement de l'interaction entre les DCAFs et DDB1 (Angers et al. 2006). Suite à des analyses bioinformatiques, nous avons sélectionné chez *Arabidopsis*, une famille de protéines à domaine WD40 comportant ce motif particulier. C'est la famille des protéines MSI1 qui compte 5 membres appelés MSI1 à MSI5 (Hennig et al. 2005). La caractérisation de MSI1 a été effectuée par différents groupes qui l'ont identifié comme étant une sous-unité du complexe PRC2, impliquée dans le contrôle du développement embryonnaire d'*Arabidopsis* (Köhler et al. 2003, Guitton et al. 2004). En effet, une mutation du gène *MSI1* conduit à l'arrêt de la croissance de l'embryon majoritairement au stade cœur. Des arrêts plus précoces aux stades pré-globulaire et globulaire, similaires à ceux observés chez les mutants du complexe CRL4, ont également été relevés. De plus, un phénotype parthénogénétique a été associé aux mutants *msi1* qui se définit par le développement de l'albumen, voire d'une structure similaire à un embryon, en absence de pollinisation (Köhler et al. 2003). Etant donné que MSI1 est un interactant potentiel de la CUL4-E3 ligase, nous avons testé ce phénotype chez les différents mutants du complexe en notre possession. Aucun d'entre eux ne présente le phénotype parthénogénétique. La comparaison des analyses de transmission des gènes *CUL4*, *DDB1* et *MSI* constitue une difficulté supplémentaire pour identifier un lien direct entre MSI1 et la CUL4-E3 ligase. En effet, *MSI1* est un gène à effet gamétophytique femelle car la copie mutée paternelle de *MSI1* n'engendre aucune conséquence dans la descendance. Dans notre cas, les mutants *cul4* ne présente que de très faibles défauts de transmission et seule la mutation simultanée des gènes *DDB1a* et *DDB1b* montre de faibles anomalies de transmission mâle et femelle. L'effet incontestable de la mutation *msi1* comparée à la mutation *cul4* peut s'expliquer par le fait que la CUL4 est un membre permanent de toutes les CUL4-E3 ligases tandis que MSI1 ne ferait parti que de certaines d'entre elles. Quant à DDB1 dont l'effet des mutations se situe entre *cul4* et *msi1*, il ferait partie intégrante du complexe mais à un niveau de spécificité plus élevé que la CUL4. Une autre alternative serait la

participation de MSI1 dans le développement embryonnaire et d'autres processus cellulaires de manière indépendante de la CUL4-E3 ligase.

### **1.2 MSI1, une protéine à motif DWD, interagit avec DDB1a pour former le complexe CUL4-DDB1a-MSI1**

Lorsque la protéine MSI1 est associée à FIE, MEDEA et FIS2, elle fait parti d'un complexe Polycomb FIS appartenant à un autre complexe d'environ 600 kDa dont la structure exacte reste inconnue (Köhler et al. 2003). L'ensemble de ses sous-unités correspond à 254 kDa suggérant qu'elles sont capables d'interagir avec des protéines additionnelles. Nous avons mis en évidence une interaction entre CUL4-DDB1a et MSI1, faisant du complexe CUL4-DDB1a un candidat plausible pour venir compléter ce grand complexe protéique de 600 kDa. Cette hypothèse doit être validée par des études supplémentaires d'interaction protéine-protéine entre les différentes sous-unités de la E3-ligase et celles du complexe FIS. Quant au mécanisme de fixation de MSI1 sur le complexe CUL4-DDB1a, son identification reste un point important afin de préciser la fonction du complexe. En effet, il a été prouvé que la DWD-box joue un rôle majeur dans l'assemblage des CUL4 chez les mammifères (Angers et al. 2006, He et al. 2006). C'est essentiellement le résidu Arginine en 16<sup>ème</sup> position du motif qui est nécessaire à cette interaction (Jin et al. 2006). Chez les plantes, l'étude des protéines comportant ce domaine a confirmé l'importance du motif DWD-box (Lee et al. 2008). De manière similaire à ce qui a été décrit dans Lee et al. 2008, il serait intéressant de tester l'interaction entre les protéines DDB1 d'Arabidopsis et la protéine MSI1 mutée dans le motif DxR. En plus des techniques courantes d'interaction protéine-protéine, un test de complémentation du mutant *msi1* avec une construction comportant une mutation dans le sous-motif DxR, prouverait l'importance de la DWD-box *in vivo*.

Il serait également intéressant de tester l'interaction entre DDB1 et les autres membres de la famille MSI afin de déterminer si ils peuvent former des complexes CUL4-DDB1-MSI potentiels. L'analyse des mutants *msi* permettrait de clarifier l'implication de ces complexes dans différents processus cellulaires et développementaux.

### **1.3 Le complexe CUL4-DDB1a-MSI1 n'est pas impliqué dans la régulation de l'expression de PHERES**

Le gène *PHERES1* est une cible directe du complexe FIS. En effet, l'expression de *PHERES1* est dérégulée dans les mutants *mea* et *fie*, deux gènes codant pour des sous-unités du complexe, au sein duquel se trouve la protéine MSI1 (Köhler et al. 2003). Ce gène est soumis à l'empreinte parentale. Son expression se fait majoritairement à partir de l'allèle mâle



tandis que l'allèle femelle est inhibé par le complexe FIS, avant et après fécondation (Köhler et al. 2005). En se basant sur les études réalisées, nous avons testé de la même manière, l'effet de la mutation hypomorphe *cul4-1* sur l'empreinte parentale de *PHERES1*, sans obtenir de résultats concluants. Le complexe CUL4-DDB1a-MSI1 identifié précédemment ne semble pas agir directement sur l'expression de *PHERES1*. Cependant nous avons utilisé dans cette étude le mutant hypomorphe *cul4-1* dont l'effet faible peut constituer un obstacle à une mise en évidence nette de la levée de l'empreinte parentale de *PHERES1* CUL4-dépendante. Comme le complexe FIS régule l'expression de *PHE1* grâce à une interaction directe avec le promoteur du gène (Köhler et al. 2003), la lignée pPHE1::GUS a permis d'observer la suppression de l'expression préférentielle de *PHERES1* du côté mâle dans les mutants perte de fonction du gène *CUL4*. En présence de résultats contradictoires, nous ne pouvons pas affirmer que l'empreinte parentale de *PHERES1* implique le complexe CUL4-DDB1a-MSI1. Il a effectivement été prouvé que la méthylation de l'ADN d'une région régulatrice située dans la partie 3' du gène est indispensable à l'inhibition de l'allèle maternel de *PHERES1* (Makarevich et al. 2008). Afin de confirmer l'implication de la CUL4 dans le contrôle de l'expression paternelle de *PHERES1*, la même expérience doit être réalisée avec la lignée rapportrice décrite dans Makarevich et al. 2008.

Malgré les observations controversées, nous avons privilégié la conclusion initiale de l'absence d'implication du complexe CUL4-DDB1 dans l'empreinte parentale de *PHERES1*. En effet, dans l'expérience mettant en jeu le polymorphisme dans deux écotypes différents, les individus possèdent la partie 3' qui permet de maintenir la répression de l'allèle *PHE1* maternelle. Ainsi, les différents effets observés reflètent ce qui se passe réellement *in vivo*. Quant au résultat obtenu avec la lignée rapportrice, aussi excitant qu'il puisse paraître, il est probablement dû à l'absence de l'environnement régulateur de *PHE1*. Ces résultats n'ont pas été décrits dans l'article soumis pour publication, en parti pour le manque de précision sur l'effet de la région 3' de *PHERES1* dans les mutants nuls *cul4*.

#### **1.4 Le complexe CUL4-DDB1a-MSI1 serait impliqué dans la régulation de l'expression de MEDEA**

Le gène *MEDEA* est une autre cible directe du complexe FIS. Ce gène est également soumis à l'empreinte parentale et son expression se fait à partir de l'allèle maternel. L'inhibition de la copie paternelle est assurée par le complexe FIS qui permet le maintien des marques de triméthylation d'histone H3K27me3 (Gehring et al. 2006, Jullien et al. 2006). Trois jours après pollinisation, une expression de l'allèle paternel dans le mutant *cul4*

hypomorphe, prouve l'implication de la protéine CUL4 dans la régulation de l'empreinte parentale de *MEDEA*, à ce stade de l'embryogenèse. Malgré des rapports contradictoires, il a été démontré que *MEDEA* est exprimé à partir des deux allèles parentaux dans l'embryon et c'est uniquement dans l'albumen, que l'expression de l'allèle paternelle est significativement réduite (Vielle-Calzada et al. 1999, Kinoshita et al. 1999). Dans notre expérience, nous n'avons pas différencié ces deux entités de la graine d'où l'impression que *MEDEA* est exprimé à partir des deux allèles parentaux. Afin de tester l'effet du mutant *cul4* sur la dépression réelle de l'allèle paternel, des microdissections de l'albumen seraient indispensables. Ainsi, nous pourrions confirmer si les résultats obtenus à 1 et 2 jours après pollinisation, sont réellement identiques au contrôle ou si la levée de l'empreinte parentale de *MEDEA* intervient exclusivement 3 jours après fécondation.

Une approche utilisant une lignée rapportrice GUS sous la dépendance du promoteur de *MEDEA* (pMEA::GUS), n'a pas permis de confirmer l'implication de la CUL4 dans l'établissement de l'empreinte parentale de *MEDEA*. Contrairement à *PHERESI*, aucune région régulatrice n'a à ce jour été identifiée dans le locus de *MEDEA* mais seule l'étude du promoteur n'est peut être pas suffisante pour pouvoir affirmer que l'empreinte de *MEDEA* s'établit indépendamment de la CUL4. De plus, le fait d'avoir croisé deux écotypes différents (Ler, pour la lignée rapportrice et Col, pour le mutant) peut également influencer les observations de cette expérience. En effet, les plantes Ler paraissent plus résistantes et possèdent des grains de pollen plus volumineux que ceux de l'écotype Columbia. Ainsi, le croisement est facilité lorsque l'écotype Ler est utilisé en tant que femelle tandis que la pollinisation semble perturbée lorsqu'il joue le rôle de mâle. Les grains de pollen auraient donc plus de difficulté à féconder les ovules de l'écotype Col qui sont enfermés dans un pistil plus fin. D'où la présence probable de résultats hétérogènes lorsqu'on souhaite connaître l'effet maternel de la mutation *cul4* sur l'expression paternelle de *MEDEA*.

De la même manière que pour *PHERESI*, nous avons retenue le résultat lié au polymorphisme du gène. Dans ce cas, toutes les parties régulatrices éventuelles de *MEDEA* sont présentes et reflètent ce qui se passe *in vivo*. En tenant compte des possibles régions régulatrices indispensables à l'empreinte parentale de *MEDEA*, la lignée transgénique exprimant une protéine de fusion MEA-YFP sous la dépendance du promoteur pMEA a permis de confirmer l'implication de la CUL4 dans l'inhibition de l'allèle *MEA* paternel. Comme aucune expression du transgène n'a pu être détectée dans le pollen, cette levée de la répression paternelle semble intervenir à partir du deuxième jour suivant la fertilisation. Il

aurait toutefois été plus judicieux d'utiliser pour cette expérience, une lignée *mea* complétement. Quant à l'étude d'une protéine fluorescente au sein du pollen, elle implique de nombreuses contraintes techniques. Le pollen est une entité possédant une forte autofluorescence qui doit être diminuée au maximum pour pouvoir effectuer des comparaisons significatives entre le contrôle sauvage et les mutants testés.

A partir des différentes observations, nous pouvons émettre l'hypothèse que *MEDEA* soit une cible directe du complexe CUL4-DDB1a<sup>MSI1</sup> identifié précédemment. Pour pouvoir l'affirmer, une immunoprécipitation efficace du complexe CUL4-DDB1a-MSI1-MEDEA, en présence d'un inhibiteur du protéasome 26S, devrait être envisagée. Nous avons tenté d'isoler ce complexe en utilisant la lignée transgénique pMEA::MEA-YFP mais sans obtenir de résultats concluants. En effet, *MEDEA* est un gène exprimé très faiblement dans les siliques, dont les tissus donnent initialement des extractions pauvres en protéines. Afin d'amplifier la détection de *MEDEA*, l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre la protéine serait un atout supplémentaire.

### **1.5 MSI1 : Adaptateur ou substrat ?**

D'après les connaissances grandissantes sur le lien entre les protéines à domaine WD40 et les résultats d'interaction obtenus, MSI1 formerait avec DDB1a le module de reconnaissance des substrats du complexe CUL4-DDB1 dont *MEDEA* serait une cible. Cependant, certaines des protéines à domaine WD40, dans un contexte particulier, peuvent devenir elles-mêmes des cibles ubiquitinées et dégradées par le protéasome 26S. C'est le cas de la protéine DDB2, dont l'accumulation a été relevée dans le mutant *cul4*, suite à des lésions d'ADN induites par les UV (Huang et D'Andrea 2006, Molinier et al. 2008). Dans notre cas, le comportement de MSI1 au cours de l'embryogenèse n'est pas affecté par la mutation *cul4*, confirmant le rôle d'adaptateur de cette protéine à ce stade de développement. Cependant une faible stabilisation de celle-ci suggère qu'elle pourrait aussi être une cible intervenant à un autre niveau de la régulation de l'empreinte parentale de *MEDEA* FIS-dépendante. En effet, MSI1 interagit avec la protéine RBR1 pour former un complexe inhibiteur de la méthyltransférase MET1. Cette inhibition est indispensable pour initier l'expression de l'allèle maternel des gènes *FIS2* et *FWA* dans le gamétophyte femelle (Jullien et al. 2008). Bien que certains rapports suggèrent que l'expression de *MEDEA* est régulée par la protéine MET1 (Xiao et al. 2003, Gehring et al. 2006), l'activation dans la cellule centrale de l'allèle *MEA* femelle est indépendante de la protéine RBR1 (Jullien et al. 2008). Une possibilité serait de tester d'une part, l'interaction entre la CUL4-E3 ligase et le complexe MSI1-RBR1 et d'autre part, l'effet de la mutation

*cul4* sur l'expression des gènes *FIS2* et *FWA*. Cela permettrait de mettre en évidence une seconde voie de régulation de l'expression des gènes soumis à l'empreinte parentale impliquant le complexe CUL4-DDB1a<sup>MSI1</sup>.

Etant donnée que l'empreinte parentale de *MEDEA* est également assurée par un complexe PRC2-like au cours du développement sporophytique, nous avons évalué la stabilité de MSI1 dans les tissus végétatifs. Une accumulation de la protéine intervient dans le mutant *cul4* et suggère que MSI1 soit une cible directe du complexe CUL4-DDB1a. A ce stade du développement, MSI1 fait parti de plusieurs complexes PRC2-like impliqués dans de nombreux processus tels que la différenciation cellulaire ou la floraison. Toutes ses possibilités élargissent encore une fois, le champ d'investigations de la caractérisation fonctionnelle du complexe CUL4-DDB1a<sup>MSI1</sup>.

De manière générale, nous avons mis en évidence l'implication du complexe CUL4-DDB1 dans le contrôle de l'expression de l'allèle paternel de *MEDEA*. Cette étude établit pour la première fois, un lien entre la dégradation ubiquitine-dépendante et les complexes PRC2-like, pouvant s'appliquer à d'autres organismes eucaryotes. Cependant, le mécanisme exact de cette régulation doit être précisé. En effet, malgré l'existence d'un complexe CUL4-DDB1a<sup>MSI1</sup>, nous ne pouvons affirmer à ce stade que la régulation de l'expression de *MEDEA* est directement liée à cette E3 ligase. Une stabilisation de *MEDEA* a été relevée dans le mutant *cul4*, suggérant que c'est une cible directe d'un complexe CUL4. Le mode d'action semble impliquer les modifications d'histones. Ce complexe jouerait probablement un rôle important au niveau du remodelage de la chromatine qui impliquerait des marques supplémentaires comme il l'a été démontré chez les animaux. De plus, un nombre important de protéines à domaine WD40 existe chez *Arabidopsis*, toutes susceptibles de faire parti d'un complexe CUL4. Bien que certaines semblent jouer des rôles importants dans le développement des plantes, la fonction de la plupart reste inconnue. La caractérisation phénotypique et fonctionnelle de mutants d'insertion ADN-T de chacun des gènes codant pour des protéines WD40 d'*Arabidopsis*, permettrait d'accroître nos connaissances sur le mode d'action des CUL4-E3 ligases végétales dans l'ubiquitination sélective des protéines cibles, destinées à la dégradation.



# Matériel et Méthodes



# 1 Matériel

## 1.1 Matériel végétal

### 1.1.1 *Arabidopsis thaliana* sauvage

Des plantes de l'écotype Columbia (Col-0) ont été utilisées en tant que contrôle dans les différentes expériences. Les écotypes sauvages RLD et C24, présentant un polymorphisme pour certains gènes, ont été utilisés dans les croisements avec différents mutants Columbia.

### 1.1.2 *Arabidopsis thaliana* mutantes

#### 1.1.2.1 Les mutants alléliques *cul4*

Le mutant *cul4-1*(GABI\_600H03) est décrit dans *Bernhardt et al. 2006*. C'est un mutant hypomorphe provenant de la collection GABI-Kat (« GenomAnalyse im Biologischen-Kölner *Arabidopsis* T-DNA lines »). Cette collection a été obtenue par agro-transformation de l'écotype Columbia avec un ADN-T portant un gène de résistance à la sulfadiazine qui permet la sélection *in vitro*.

Les mutants alléliques *cul4-2* (Koncz 42460) et *cul4-3* (Koncz 57891) proviennent d'une autre collection décrite dans *Rios et al. 2002*. Cette collection a été obtenue par agro-transformation de l'écotype Columbia avec un ADN-T possédant un gène de résistance à l'hygromycine. La localisation précise de l'insertion a été déterminée par séquençage. Pour le mutant *cul4-2*, l'ADN-T est inséré après le nucléotide 4478 dans le 14<sup>ème</sup> exon du gène *CUL4*. Les 9 nucléotides suivants ont été remplacés par 18 nucléotides de la séquence codante de l'ADN-T, suivie de 20 nucléotides (GGATATATTCAATTGTAAAT) de la « bordure gauche ». Cette insertion génère un codon stop et donne une protéine plus courte de 751 acides aminés au lieu des 792 habituels. Quant au mutant *cul4-3*, l'ADN-T est inséré après le nucléotide 2718 dans le 7<sup>ème</sup> intron du gène *CUL4*. Les 11 paires de bases suivantes ont été délétées et remplacées par 3 nucléotides de la « bordure gauche » de l'ADN-T (AAT) donnant une protéine légèrement plus courte.

Mutant	Nom et séquence des amorces	Génotype	Couple
<i>cul4-1</i>	Cul4 LPup : 5'- GCTGAGAAATCCATGATCTC -3'	WT	Cul4 LPup
	Cul4 RPdown : 5'- TCCCACAAGCAAGCGACTGC -3'	Mutant (ADN-T)	Cul4 RPdown
	T-DNA GABI : 5'- CCCATTTGGACGTGAATGTAGACAC -3'		T-DNA GABI
<i>cul4-2</i>	4057 : 5'- TTTGGTATGGCTTTTACTTCCTG -3'	WT	4057
	4741 : 5'- TGAGTTCCTTGATGGTTACGGC -3'		4741
	Fish1 : 5'-CTGGAATGGCGAAATCAAGGCATC-3'	Mutant (ADN-T)	4057
			Fish1



Mutant	Nom et séquence des amorces	Génotype	Couple
<i>cul4-3</i>	2301 : 5'- TGTTCGTGGATGTAGGGAAG -3' 2968 : 5'- GCAATTTGGCTGTACAGAAGC -3' Fish1 : 5'-CTGGGAATGGCGAAATCAAGGCATC-3'	WT	2301 2968
		Mutant (ADN-T)	2301 Fish1

### 1.1.2.2 Les mutants *ddb1*

Les mutants *ddb1a-2* (SALK\_038757) et *ddb1b-1* (SALK\_061944) proviennent de la collection du SALK. Cette collection a également été obtenue par agro-transformation de l'écotype Columbia avec un ADN-T portant un gène de résistance à la kanamycine qui permet sa sélection *in vitro*. Le mutant *ddb1a-2* est décrit dans *Molinier et al. 2008*. Pour le mutant *ddb1b-1*, le site d'insertion a été déterminé par séquençage des régions entourant l'ADN-T. Il est situé après le nucléotide 6211 dans le dernier exon du gène *DDB1B*. Le mutant *ddb1b-1* est un mutant perte de fonction car aucun transcrite du gène *DDB1B* n'y est détecté.

Un croisement entre les mutants *ddb1a-2* et *ddb1b-1* a permis de sélectionner dans la génération F2 des plantes ayant les génotypes doubles mutants *DDB1A/ddb1a-2 ddb1b-1* et *ddb1a-2 DDB1B/ddb1b-1*.

Mutant	Nom et séquence des amorces	Génotype	Couple
<i>ddb1a-2</i>	RP 1a : 5'- GATGTGCAAAGCCCACTATTG -3' LP 1a : 5'- TGAGAGACCATAACCATCTTCTAGC -3' LBa1 : 5'- GAGCTTGGATTTGCTTCAGTG -3' LBb1 : 5'- TGAGTTCTTGATGGTTACGGC -3'	WT	RP 1a LP 1a
		Mutant (ADN-T)	LP 1a LBa1 + LBb1
<i>ddb1b-1</i>	RP 1b : 5'- GAGCTTGGATTTGCTTCAGTG -3' LP 1b : 5'- TGTTCGTGGATGTAGGGAAG -3' LBb1 : 5'-TAGCATCTGAATTTTCATAACCAATCTC -3'	WT	RP 1b LP 1b
		Mutant (ADN-T)	RP 1b LP 1b + LBb1

### 1.1.3 Autres lignées *Arabidopsis thaliana* transgéniques

La lignée pMSI1::MSI1-mRFP et la lignée complétée *msi1-lpMSI1::MSI1-mRFP* sont respectivement décrites dans *Chen et al. 2008* et *Jullien et al. 2008*.

Les lignées transgéniques pPHE::GUS et pMEA::GUS sont respectivement décrites dans *Köhler et al. 2003* et *Luo et al. 2000*.

La lignée pMEA::MEA-YFP est décrite dans *Wang et al. 2006*.

L'introduction des différentes lignées transgéniques dans le fond génétique des mutants s'est faite par croisement. L'identification des individus homozygotes pour la mutation et le transgène a été réalisée sur les milieux sélectifs correspondants.

## 1.2 Bactéries (Invitrogen)

### 1.2.1 *Escherichia coli*, souche TOP10

Cette souche est de génotype *F*- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ( $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*)  $\Delta$ *lacX74 nupG recA1 araD139  $\Delta$ (*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1*  $\lambda$ -. Elle est utilisée pour le clonage et l'amplification de plasmides.*

### 1.2.2 *Escherichia coli*, souche BL21(AI)

Cette souche est de génotype *F* *ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) araB::T7RNAP-tetA*. Elle est utilisée pour la production de protéines recombinantes. Leur déficience en protéases *lon* et *ompT* permet une meilleure stabilité des protéines exogènes. Cette souche porte le gène de la T7 ARN Polymérase au niveau du locus *araB* de l'opéron *araBAD*. Les plasmides contenant des gènes sous la dépendance d'un promoteur T7, transformé dans cette souche, seront maintenus dans un état inactif. Leur expression est induite par le L-arabinose.

### 1.2.3 *Escherichia coli*, souche BL21(DE3) pLysS

Cette souche est de génotype *F*- *ompT gal hsdSB(rB- mB-) dcm (DE3) pLysS (Cam<sup>R</sup>)*. Elle est recommandée pour une induction et une expression importante des plasmides renfermant des gènes sous la dépendance d'un promoteur T7. L'absence des protéases *lon* et *ompT* permet de réduire la dégradation des protéines hétérologues exprimées dans cette bactérie. Cette souche est lysogène pour le phage DE3, un dérivé du phage  $\lambda$ . Le génome de celui-ci renferme le gène de la T7 RNA polymérase, placé sous le contrôle du promoteur *lacUV5* inductible par l'IPTG (« IsoPropyl  $\beta$ -D-1-ThioGalactopyranoside »). Cette souche dispose également du plasmide pLysS qui confère une résistance au chloramphenicol (Cam<sup>R</sup>) et code pour le lysozyme du phage T7, un inhibiteur naturel de la T7 polymérase. Il permet d'inhiber toute activité transcriptionnelle due à une expression basale de la T7 polymérase, avant induction par l'IPTG. Ce système est utilisé pour stabiliser les vecteurs d'expression renfermant des gènes dont les produits peuvent être toxiques pour la bactérie.

## 1.3 La levure *Saccharomyces cerevisiae*, souche AH109 (Clontech)

Cette souche a été utilisée pour les tests d'interaction en double hybride sur les milieux sélectifs -LW, -LWH et -LWA avec *AtDDDB1A* et *AtMSII*. Ses caractéristiques sont :

*MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 $\Delta$ , gal80 $\Delta$ , LYS2::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ.*

## 1.4 Les vecteurs de clonage

### 1.4.1 pGEM-T (Promega)

Ce plasmide d'environ 3000 pB permet de cloner de manière très efficace des produits de PCR. C'est la présence des thymidines en 3' de chaque extrémité du vecteur qui facilite l'insertion des produits PCR qui possèdent des désoxyadénosines à leur extrémité 3', ajoutées par un grand nombre de Taq polymérases. Le pGEM-T contient le gène de résistance à l'ampicilline, le gène *lacZ* codant pour le peptide  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidase et une cassette de clonage insérée au début de la séquence du gène *lacZ*. De part et d'autre de cette cassette, se trouvent les séquences promotrices de l'ARN polymérase des phages T7 et Sp6.

Ce plasmide a essentiellement été utilisé pour les étapes de sous-clonage.

### 1.4.2 Le pDONR207 (Invitrogen)

Le plasmide donneur pDONR207 a une taille de 5585 pB et est utilisé dans la technologie « Gateway ». Il comporte le gène de résistance à la gentamycine et les sites de recombinaison *attP1* et *attP2*. Entre ces deux sites se trouve le gène *ccdB* et le gène de résistance au chloramphénicol. Les fragments d'ADN à cloner doivent posséder de part et d'autre les sites *attB1* et *attB2* qui, par recombinaison avec les sites *attP1* et *attP2*, permettent leur insertion. Le kit « BP-clonase », utilisé selon les recommandations du fabricant, permet cette réaction de recombinaison. Le plasmide ainsi obtenu, appelé pENTRY, comporte alors les sites *attL1* et *attL2* et sert de vecteur d'entrée pour les différents vecteurs d'expression disponibles dans la technologie « Gateway ».

#### 1.4.2.1 Le plasmide pENT-MSI1

La séquence codante du gène MSI1 a été amplifiée par PCR avec le couple d'amorces ED612*attB1*FMSI1 et ED612*attB2*RMSI1 à partir d'une banque de cDNA d'inflorescences. Les fragments ainsi obtenus comportent à leurs extrémités les sites de recombinaison *attB* nécessaires au clonage dans le vecteur pDONR207. Ils sont introduits dans le vecteur grâce au kit « BP-Clonase » d'Invitrogen pour obtenir le pENT-MSI1.

Nom	Séquence
ED612 <i>attB1</i> FMSI1	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCATGGGGAAAGACGAAGAGGAAATG -3'
ED612 <i>attB2</i> RMSI1	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCTAAGAAGCTTTTGATGGTTCTTCCC -3'

## **1.5 Les vecteurs d'expression**

### **1.5.1 Les vecteurs d'expression bactériens**

Les vecteurs décrits dans ce paragraphe ont été utilisés pour l'expérience de « GST-pull down » afin de tester une éventuelle interaction entre deux protéines.

#### **1.5.1.1 pDEST15 (Invitrogen)**

Ce vecteur de destination (7013 pB) permet d'ajouter l'épitope GST (« Glutathione-S-Transferase ») en N-terminal de la phase codante du gène cloné grâce à la technologie « Gateway ». Le gène d'intérêt est alors placé sous la dépendance du promoteur T7 et terminé par le terminateur T7. Il porte également le gène de résistance à l'ampicilline qui permet sa sélection dans *E. coli*.

Le vecteur pDEST15-DDB1a est une construction déjà existante au laboratoire.

#### **1.5.1.2 pGEX-4T-1 (GE Healthcare)**

Ce plasmide est également un vecteur d'expression permettant la fusion d'un gène avec celui de la GST. Il possède une cassette de clonage en aval de la séquence codant la GST, contenant 6 sites de restriction pour 6 endonucléases différentes, ainsi que la séquence protéique de coupure par la Thrombine. Le promoteur inductible en amont du gène GST ainsi que la séquence codant l'inhibiteur de l'opéron lactose permettent l'induction massive de l'expression du gène de fusion chez *E.coli*. Le gène de résistance à l'ampicilline permet la sélection des bactéries transformées. Ce plasmide a été utilisé dans notre cas pour la production de la protéine GST seule.

### **1.5.2 Les vecteurs d'expression dans *Saccharomyces cerevisiae***

Les deux vecteurs suivants permettent de tester des interactions en double hybride dans *Saccharomyces cerevisiae*.

#### **1.5.2.1 pGAD424gate**

Ce vecteur permet la fusion de la phase codante du gène cloné avec le domaine d'activation de GAL4 grâce à la technologie « Gateway ». Ce plasmide porte deux marqueurs de sélection : le gène de résistance à l'ampicilline pour sa sélection dans *E. coli* et le gène *LEU2* pour sa sélection dans la levure. Il est issu de la collection de plasmides de Ghent (<http://bccm.belspo.be/index.php>).

#### **1.5.2.2 pGADT7 Gateway**

C'est un autre vecteur du type « Gateway » qui permet également la fusion de la phase codante du gène cloné avec le domaine d'activation de GAL4. Ce plasmide porte deux marqueurs de sélection : le gène de résistance à l'ampicilline, pour sa sélection dans *E. coli*, et

le gène *LEU2*, pour sa sélection dans la levure. Par conséquent, il peut être utilisé dans des tests d'interaction double hybride. Les vecteurs pGADT7-DDB2 et pGADT7-MSI ont été obtenus par une réaction de recombinaison dite « LR » (kit « LR-Clonase » d'Invitrogen) à partir des plasmides pENT-DDB2 (construction préexistante dans le laboratoire) et pENT-MSI1.

De plus ce vecteur porte la séquence du promoteur T7 en aval du domaine d'activation de GAL4, ce qui nous permet de l'utiliser comme matrice pour des transcriptions et des traductions *in vitro* (voir paragraphe méthode 2.2.4.3). Ainsi, les plasmides pGADT7-MSI1 et pGADT7-DDB2 ont servi à la production des protéines MSI1 et DDB2.

### 1.5.2.3 pGBT9gate

Ce vecteur permet la fusion de la phase codante du gène cloné avec le domaine de fixation à GAL4 grâce à la technologie « Gateway ». Il porte deux marqueurs de sélection : le gène de résistance à l'ampicilline pour sa sélection dans *E. coli* et le gène *TRP1* pour sa sélection dans la levure. Ce plasmide est également issu de la collection de Gand.

## 1.5.3 Les vecteurs d'expression transitoires dans les plantes

Ces vecteurs permettent d'exprimer, de manière transitoire, des protéines dans des cellules végétales. De ce fait, ils peuvent être utilisés pour mettre en évidence des interactions protéines-protéines *in vivo*. Dans notre cas, ils nous ont servi pour la technique du BiFC (voir paragraphe méthode 2.1.5.4).

### 1.5.3.1 Les vecteurs pMAV-YN, pMAV-YC et 35S-CPRF2-CFP

Les vecteurs pMAV-YN, pMAV-YC et 35S-CPRF2-CFP sont décrits dans *Stolpe et al. 2005*. Les séquences codantes des gènes *DDB1a*, *DDB2* et *MSI1* sont introduits par recombinaison « LR », dans les vecteurs d'expression « Gateway » pMAV-YN et pMAV-YC, afin d'obtenir les constructions YN-DDB1a, YC-DDB2 et YC-MSI1. Les vecteurs YN-BPM3 et YC-BPM3 ont été réalisés par Esther Lechner pour un autre projet du laboratoire et ont servi de contrôle négatif.

## 1.6 L'anticorps anti-CUL4

Cet anticorps polyclonal a été produit chez le lapin à partir d'un peptide de synthèse dirigé contre la partie N-terminale (SFDLESLYQAVDNLC) de la protéine CUL4. L'immunoserum a été purifié grâce à une colonne HiTrap NHS-activated de 1 ml (GE Healthcare) sur laquelle 5mg de peptide ont été fixés. La purification a été effectuée selon les instructions du fabricant.

## 2 Méthodes

### 2.1 Techniques relatives aux plantes

#### 2.1.1 Culture d'*Arabidopsis thaliana*

Les graines d'*Arabidopsis* sont stérilisées par un traitement à l'éthanol 70% en présence d'une goutte de détergent Tween 20. Elles sont placées sous agitation pendant 15 min puis lavées 3 fois à l'éthanol 98% pendant 5 min. Les graines sont ensuite séchées sous une hotte à flux laminaire. Ces dernières sont étalées sur milieu Murashige & Skoog (MS255 de Duchefa, agarose 0.8%, pH 5.8) supplémenté de 1% (p/v) de saccharose et contenant un agent de sélection si nécessaire. Les boîtes sont alors placées à l'obscurité, à 4°C pendant 48h afin d'obtenir une germination synchrone des graines. Elles sont ensuite transférées en logettes (22°C, 16h de jour) pour permettre la croissance optimale des plantules. Après 10 jours de culture, les plantules sont mises en terre dans des pots individualisés, placées au préalable dans une logette d'acclimatation avant leur transfert en serre où la photopériode est de 16h de jour et 8h de nuit (20°C/16°C, 70% d'humidité). Deux à trois semaines après le repotage, les plantes développent une hampe florale dont les fleurs servent aux croisements.

#### 2.1.2 Analyse des extraits d'ADN d'*Arabidopsis thaliana*

##### 2.1.2.1 Le géotypage par PCR

###### 2.1.2.1.1 Extraction d'ADN génomique

Pour la préparation d'ADN, des échantillons de plantes d'*Arabidopsis* sont placés dans des tubes en polypropylène de type « Safe Lock » (Eppendorf) et réduits en poudre en présence de billes de verre (diamètre 1mm) dans un broyeur Silamat® S5 (Ivoclar, Vivadent) après leur congélation dans l'azote liquide. L'ADN est ensuite extrait en utilisant un détergent ; le CTAB (« bromure d'hexadécyltriméthylammonium »), selon le protocole de *Rogers et Bendich 1985*. L'ADN extrait est dissout dans 100µL de tampon TE.

Une autre technique d'extraction d'ADN de plante a été utilisée pour l'analyse de mutants par PCR. L'ADN génomique est isolé à partir d'une feuille unique de jeune plantule de 12 jours grâce au kit « REDExtract-N-Amp™ Plant PCR » (SigmaAldrich) selon les instructions du fabricant.

Tampon TE	Tris-HCl pH 8.0	10 mM
	EDTA	1 mM

#### 2.1.2.1.2 La PCR (« Polymerase Chain Reaction »)

Cette technique permet l'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN de manière exponentielle grâce à l'utilisation de l'ADN Polymérase thermostable isolée de *Thermus aquaticus* (Taq). Elle nécessite l'utilisation de deux amorces oligodésoxyribonucléotidiques spécifiques de la séquence à amplifier. Elle permet également de rajouter aux extrémités de cette séquence des sites de recombinaison (ou de restriction) indispensables au clonage. Cette réaction se déroule en 20 ou 30 cycles comportant une étape de dénaturation de la matrice d'ADN (95°C, 30s), une étape d'hybridation des amorces avec les brins matrices (30s, température définie selon la température de fusion des deux amorces), suivie d'une étape d'élongation des amorces (72°C, la durée varie en fonction de la taille du fragment à amplifier).

Pour toutes les PCR de contrôle et de génotypage, la Taq polymérase DyNAzyme (Finnzymes) a été utilisée dans les conditions suivantes : amorces 1µM, dNTP 200µM, Tampon 1x, Taq 20 u/ml. Les analyses de l'ADN amplifié s'effectuent après séparation des fragments d'ADN par migration sur gel d'agarose 1% contenant du bromure d'éthidium, dans un tampon TAE.

Les génotypages concernant un nombre important de plantes ont été réalisés avec le kit « REDEExtract-N-Amp™ Plant PCR » (SigmaAldrich) selon les instructions du fabricant.

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

#### 2.1.2.2 « Southern Blot »

##### 2.1.2.2.1 Extraction rapide d'ADN génomique

Environ 100 mg de plantules sont prélevés et introduits dans un tube Eppendorf contenant des billes de verre (diamètre 1mm). Le broyage des tissus s'effectue dans le broyeur Silamat® S5 (Ivoclar, Vivadent) après leur congélation dans l'azote liquide. 1 ml de tampon d'extraction est ajouté à la poudre obtenue et le mélange est homogénéisé à l'aide d'un Vortex. L'addition de 130 µl de détergent SDS 10% permet de favoriser la lyse cellulaire à 65°C pendant 15 min. Après ce temps d'incubation, le milieu réactionnel est neutralisé par 300µl d'acétate de potassium 5M et le tube est placé dans de la glace pendant 30 min afin de permettre la précipitation des protéines. Après centrifugation 5 min à 5000 x g, le surnageant est transféré dans un nouveau tube en présence d'isopropanol (v/v) pour permettre la précipitation de l'ADN. Une nouvelle centrifugation de 15 min à 11000 x g permet d'obtenir

un culot d'ADN. Ce dernier est séché et repris dans 50µl d'eau bidistillée stérile. La concentration en ADN est évaluée par mesure d'absorbance à 260 nm (1 unité de DO à 260 nm correspond à 50 µg/ml d'ADN).

Tampon d'extraction	Tris-HCl pH 8.0	100 mM
	EDTA pH 8.0	50 mM
	NaCl	500 mM
	β-mercaptoethanol	0,07%

#### 2.1.2.2.2 Digestion, séparation et transfert des fragments d'ADN

Environ 500 ng d'ADN génomique est digéré par les enzymes de restriction appropriés. Cette digestion permet d'identifier si une seule ou plusieurs insertions de l'ADN-T sont présentes dans un mutant donné. A la fin de la réaction de digestion, le milieu réactionnel est additionné de phénol/chloroforme (v/v) afin de permettre la purification de l'ADN digéré. Après agitation rapide, le mélange est centrifugé à 4°C pendant 5 min à 16000 x g. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube en présence d'éthanol absolu froid (2,5v/v) et d'acétate de sodium 3M (0,1v/v). La précipitation de l'ADN s'effectue à -20°C pendant 1h. Le précipité obtenu est centrifugé à 4°C, pendant 20 min à 16000 x g. Le culot est lavé une fois avec de l'éthanol 70% et dilué dans 20µl d'eau distillée. Cette solution est ensuite déposée sur un gel d'agarose à 0,7% pour la séparation des fragments digérés. Après migration, le gel est placé sous une légère agitation dans une solution de dénaturation (2 fois 15 min). Après un bref rinçage, il est transféré dans une solution de neutralisation également 2 fois 15 min. Les ADN sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-N (GE Healthcare) par capillarité avec un système TurboBlotter (Schleicher & Schuell) dans une solution SSC 20x pendant la nuit puis fixés sur la membrane par irradiation UV à l'aide du Stratalinker (Stratagene).

Solution de dénaturation	NaOH	4 N
	NaCl	0,6 M
Solution de neutralisation	Tris-HCl pH 7.5	0,5 M
	NaCl	1,5 M
SSC 20x (pH 7.0)	NaCl	3 M
	Citrate de sodium	300 mM



### 2.1.2.2.3 Synthèse de sonde froide (DIG), hybridation et détection

La sonde spécifique dirigée contre le gène de résistance à l'hygromycine est obtenue par réaction PCR à l'aide du kit « PCR DIG Labeling Mix » de Roche, selon les instructions du fabricant. Les fragments d'ADN marqués à la digoxigénine (DIG) sont utilisés à une concentration finale de 20 ng/ml dans le tampon « DIG Easy Hyb » (Roche). La préparation de la sonde nécessite une étape de dénaturation de 5 min à 95°C, avant d'être placée dans la bouteille d'hybridation.

En vue de l'hybridation, la membrane est pré-hybridée dans 25 ml de solution « DIG Easy Hyb » (Roche) à 42°C au maximum 2h puis la sonde dénaturée, encore chaude, est ajoutée. L'hybridation se fait durant 16h à 54°C. La membrane est d'abord lavée 2 fois dans des conditions de faible stringence (SSC 2x, 0,1% SDS) pendant 10 min à température ambiante puis dans des conditions de stringence plus fortes (SSC 0,5x, 0,1% SDS), deux fois 15 min à 68°C. La membrane est prête pour la détection par chemiluminescence.

Elle est tout d'abord lavée sous agitation dans 50 ml de tampon de lavage. La membrane est ensuite mise en présence de l'anticorps conjugué anti-DIG-AP. La détection des sondes est une réaction de chemiluminescence qui fait intervenir un substrat particulier, le CDP-Star (Posphate de Dioxétane) issu du kit « DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter II » (Roche), utilisé selon les instructions du fabricant. La membrane est alors scellée et mise au contact d'un film d'autoradiographie.

Tampon de lavage	Acide maléique	100 mM
	NaCl	150 mM
	Ajustement du pH à 7.5 avec NaOH	

## 2.1.3 **Analyse des extraits d'ARN d'*Arabidopsis thaliana***

### 2.1.3.1 « Northern Blot »

#### 2.1.3.1.1 Extraction des ARN végétaux totaux

Environ 200 mg de plantes sont introduits dans un tube Eppendorf de type « safe lock » puis congelés dans l'azote liquide et broyés en fine poudre dans le broyeur Silamat, en présence de billes de verre. Les ARN totaux sont extraits à l'aide du kit « TRIzol® Reagent » (Invitrogen) en suivant les indications du fabricant. Ce réactif, une solution monophasique de phénol et d'un agent chaotropique (l'isothiocyanate de guanidine), maintient l'intégrité des ARN et permet leur extraction par dénaturation des composants cellulaires. L'addition de chloroforme suivie d'une étape de centrifugation sépare la solution en une phase aqueuse et une phase organique. Les ARN se trouvent exclusivement dans la phase aqueuse. Après

précipitation à l'isopropanol, le culot est lavé à l'éthanol 70% puis dissout dans 30 µl d'eau bidistillée. La concentration en ARN est évaluée par mesure de l'absorbance à 260 nm (1 unité de DO équivaut à 40 µg/ml d'ARN).

#### 2.1.3.1.2 Séparation et transfert des ARN totaux

Un gel d'agarose 1% (p/v), formaldéhyde 1,1 M est préparé avec du tampon HEPES 1x et 77µg/l de BET pour la séparation des ARN. 20µg d'ARN totaux sont mélangés avec 3 volumes de tampon de dénaturation puis le tout est placé à 65°C pendant 15 min. 4 µl de tampon de charge sont ajoutés et l'échantillon est chargé sur le gel. La migration est réalisée sous une tension de 60V dans le tampon HEPES 1x. Les ARN sont transférés sur une membrane de nylon Hybond-N (GE Healthcare) par capillarité avec un système TurboBlotter dans une solution SSC 10X pendant 2h puis fixés sur la membrane par irradiation sous un rayonnement UV pendant 5 min.

HEPES 10x (pH 7.2)	Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1- pipérazine éthane sulfonique	200 mM
	EDTA	10 mM
	Acétate de sodium	50 mM
Tampon de dénaturation	HEPES 10x	100 µl
	Formamide déionisé	500 µl
	Formaldéhyde	160 µl
Tampon de charge	Acétate de sodium pH 5.2	5 M
	Bleu de Bromophénol	0,04% (p/v)

#### 2.1.3.1.3 Synthèse de sonde froide (DIG), hybridation et détection

La synthèse de la sonde froide d'environ 300 nucléotides, marquée à la digoxigénine et dirigée contre les messagers du gène *CUL4* a été réalisée avec le kit « PCR DIG Labeling Mix » (Roche). La préparation et l'hybridation de la sonde ont été effectuées dans le tampon « DIG Easy Hyb » de la même manière que pour le « Southern blot » décrit précédemment. La détection des marquages s'est faite avec le kit « DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter II » selon les indications du fabricant.

### 2.1.3.2 RT-PCR

#### 2.1.3.2.1 La RT-PCR allèle-spécifique

Les ARN totaux sont extraits de siliques de 3 jours après pollinisation (DAP) à l'aide du kit « TRIzol® Reagent » (Invitrogen) en suivant les indications du fabricant. Les extraits sont traités avec 5 unités de DNase I RNase-free (kit Fermentas) pendant 30 min. La réaction est bloquée par ajout d'EDTA à une concentration finale de 5 mM avant incubation à 75°C

pendant 10 min. 0,5 µg d'ARN ainsi obtenus sont directement utilisés pour la rétrotranscription (RT). Cette réaction s'effectue en présence d'un mélange d'hexamères et d'oligo-dT 3:1 (v/v) (10 µg/ml) (Invitrogen) dans un volume réactionnel final de 20µl contenant 4 µl de tampon de réaction, 0,25 mM de dNTP, 5 mM de DTT (« dithiothreitol »), 40 unités de RNaseOUT et 200 unités de rétrotranscriptase SuperscriptIII (Invitrogen). Les tubes sont alors placés à 50°C pendant 1h. La réaction est inactivée en 15 min par chauffage à 70°C. Des quantités équivalentes de la réaction RT sont utilisées pour détecter par PCR l'expression spécifique des allèles mâles ou femelles des gènes *PHERES1* et *MEDEA*. Les méthodes de détection de ces deux gènes sont respectivement décrites dans *Köhler et al. 2005* et *Kinoshita et al. 1999*.

#### 2.1.3.2.2 La qRT-PCR

L'extraction des ARN totaux d'inflorescences et de siliques à différents jours après pollinisation est réalisée avec le kit RNeasy MINI PLUS (Quiagen). 2 µg d'ARN totaux sont rétrotranscrits en utilisant le kit SuperscriptIII (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. La réaction de PCR qui suit utilise des amorces de gènes spécifiques dans un volume réactionnel total de 10 µl de « SYBR Green Master mix » (Roche). La réaction s'effectue dans l'appareil « Lightcycler LC480 » (Roche) toujours selon les instructions du fabricant. La valeur moyenne de trois répliquas est normalisée par rapport aux gènes ACTIN2 (AT3G18780) et GAPDH (AT3G26650) servant de contrôles internes.

Gène détecté	Couple d'amorces
<i>MEDEA</i>	5'-GCAGGACTATGGTTTGGATG-3'
	5'-CACCTTGAGGTAACAATGCTC-3'
<i>YFP</i>	5'- ATATCATGGCCGACAAGCA-3'
	5'- GAACTCCAGCAGGACCATGT-3'
<i>ACTIN2</i>	5'- CTTGCACCAAGCAGCATGAA-3'
	5'- CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT-3'
<i>GAPDH</i>	5'- TTGGTGACAACAGGTCAAGCA-3'
	5'- AAACCTTGTCGCTCAATGCAATC-3'

## 2.1.4 Analyse des extraits protéiques d'*Arabidopsis thaliana*

### 2.1.4.1 « Western Blot »

#### 2.1.4.1.1 Extraction des protéines totales végétales

La poudre des échantillons est préparée à l'aide du broyeur Silamat® S5 comme décrit précédemment. Les protéines totales sont extraites en présence d'un tampon dénaturant. Après une étape de dénaturation de 5 min à 95°C suivie d'une centrifugation de 15 min à 16000 x g permettant la sédimentation des débris cellulaires, une fraction aliquote du surnageant, constituant l'extrait protéique, est utilisée pour déterminer la concentration de l'extrait par dosage à l'amidoblack. Cette méthode de dosage est basée sur la précipitation des protéines dans le méthanol en milieu acide et leur coloration à l'amidoblack. 10 µl de solution protéique sont donc ajoutés à 200 µl d'eau et 1ml de solution d'amidoblack. Après agitation, le tout est centrifugé 10 min à 16000 x g. Le culot de protéines précipitées est lavé avec une solution de lavage puis dissout dans une solution de NaOH 0,2 M. L'absorbance est déterminée à 595nm. La concentration est calculée à partir d'une gamme étalon établie avec de la BSA (« Albumine de Sérum Bovin »).

Tampon d'extraction dénaturant (pH 6.8)	Tris-base	62,5 mM
	SDS	3% (p/v)
	β-mercaptoéthanol	3% (v/v)
	Glycérol	10 % (v/v)
	Bleu de bromophénol	0,05% (p/v)
Solution d'Amidoblack	Acide acétique	10% (v/v)
	Méthanol	90% (v/v)
	Amidoblack	0,05% (p/v)
Solution de lavage	Acide acétique	10% (v/v)
	Ethanol	90% (v/v)

#### 2.1.4.1.2 Séparation et détection des protéines en SDS-PAGE

Les gels sont préparés selon *Sambrook et al. 1989* avec le système Mini-Protean III (BioRad). Le gel de résolution est préparé avec une concentration d'acrylamide permettant une séparation optimale des protéines d'intérêt. Le gel de concentration est coulé au-dessus. Après dépôt des échantillons, l'électrophorèse se fait à 140V dans un tampon Tris-Glycine jusqu'à obtenir la séparation désirée. Après la migration, le gel est lavé 3 min dans le tampon de transfert puis placé en contact d'une membrane en PVDF (« PolyFluorure De Vinylidène ») Immobilon-P (Millipore) dans un système d'électrotransfert (« Mini Trans - Blot Cell » de BioRad). Un courant de 270mA est appliqué durant 2h afin de transférer les

protéines du gel sur la membrane. La membrane est rincée 5 min dans du T-TBS 1x puis mise à saturer dans le tampon lait 1h à température ambiante. Elle est ensuite transférée dans du tampon lait contenant les anticorps primaires et mise à incuber 2h toujours à température ambiante (ou 16h à 4°C). La membrane est lavée 3 fois 10 min dans du tampon lait puis mise en présence des anticorps secondaires pour un temps d'incubation de 45 min. Suivent un lavage de 10 min dans du tampon lait et deux lavages dans le T-TBS 1x. La révélation est effectuée par chémiluminescence, avec le kit « ECL Western Blotting Detection Reagents » (GE Healthcare).

Tampon de migration Tris-Glycine	Tris-base	25 mM
	Glycine	250 mM
	SDS	0,1%
Tampon de transfert	Tris-base	25 mM
	Glycine	192 mM
	Ethanol technique	15% (v/v)
T-TBS 1x	Tris-HCl pH 7.4	20 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	0,1% (v/v)
Tampon lait	Tris-HCl pH 7.4	20 mM
	NaCl	150 mM
	Triton X-100	0,1% (v/v)
	Lait en poudre écrémé	5% (p/v)

#### 2.1.4.2 Co-Immunoprécipitation

Les plantules exprimant pMSI1::MSI1-RFP sont collectées et congelées dans de l'azote liquide. Elles sont broyées puis transférées dans un mortier, préalablement refroidi dans la glace, contenant du tampon d'extraction (p/v) froid. L'échantillon est broyé à nouveau jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Celle-ci est ensuite centrifugée (25min, 13000 x g, 4°C) et le surnageant est récupéré dans un nouveau tube après filtration à travers du Miracloth (Calbiochem). 100 µl de cet extrait protéique sont prélevés pour servir de témoin d'extraction. Le reste de l'extrait est incubé à 4°C avec l'anticorps anti-CUL4 (dilution 1/1000) pendant une nuit.

Les billes de Proteine A Sepharose (GE Healthcare) sont lavées trois fois dans du tampon d'extraction refroidi et sont ajoutées à l'extrait de protéines totales de plantes à raison de 100 µl de billes par ml d'extrait, pour une incubation de 3h à 4°C sous légère agitation. Les billes couplées aux protéines immunocapturées sont lavées trois fois dans le tampon d'extraction

froid et resuspendues dans du tampon de charge SDS. Les échantillons sont alors chargés sur gel de polyacrylamide 10% et séparés par électrophorèse avant leur transfert sur la membrane Immobilon-P. L'anticorps anti-DsRed (Clontech) est utilisé à une dilution de 1:1000 (v/v) pour la détection de la protéine MSI-RFP.

Tampon d'extraction	NaHPO <sub>4</sub> pH 8.0	100 mM
	Triton X-100	1% (v/v)
	Inhibiteur de Protéase (mix « Complete » de Roche)	1 pastille
Tampon de charge SDS	Tris-HCl pH 6.8	125 mM
	SDS	5%
	β-mercaptoethanol	10%
	Glycérol	20%
	Bleu de bromophénol	0,1%

## 2.1.5 Techniques d'analyses microscopiques

### 2.1.5.1 Analyse des embryons des mutants alléliques *cul4* par Nomarsky

Les hampes florales et les siliques sont préalablement fixées dans un mélange éthanol/acide acétique (9:1 v/v) pendant 2h à -20°C. Les tissus sont ensuite éclaircis avec la solution de Hoyer (hydrate de chloral, glycérol, eau 8:1:2 (p/p)) 15 à 60 min avant d'être disséqués en vu de leur observation. Les images sont obtenues grâce au microscope photonique Zeiss Axiophot en utilisant des objectifs 20x ou 40xOil DIC.

### 2.1.5.2 Analyse des croisements par microscopie confocale

Pour l'analyse des lignées portant l'épitope YFP, les siliques obtenues par croisement sont disséquées à différents jours après pollinisation. Les graines libérées sont prélevées et placées directement entre lame et lamelle dans une solution aqueuse contenant 10% de glycérol afin d'éviter une déshydratation trop rapide des tissus. Les échantillons sont observés avec un microscope confocal Zeiss LSM510, en utilisant un laser argon excitant à 488nm. La lumière est récupérée à travers un objectif « Plan apochromat 20x » et filtrée avec un « Band Pass » 505-550nm.

### 2.1.5.3 Coloration GUS (β-glucuronidase)

Les siliques issues des différents croisements entre les mutants et les lignées pPHE::GUS et pMEA::GUS sont coupées de part et d'autre à l'aide d'une lame de rasoir puis transférées dans une solution d'acétone 80% pour la fixation des tissus. Après 2h d'incubation à -20°C, les siliques sont lavées 3 fois avec le tampon phosphate 50 mM pH 7.0. Au dernier lavage, le

tampon phosphate est remplacé par la solution de coloration et les échantillons sont infiltrés 5 min sous vide. La coloration se déroule à l'obscurité, à 37°C pendant 16h. Elle est arrêtée par deux rinçages dans du tampon phosphate 50 mM puis les tissus sont décolorés dans des bains successifs d'éthanol 50, 70 et 96% (v/v) de 10 min chacun. L'éthanol est ensuite remplacé par la solution de Hoyer dans le but d'éclaircir d'avantage les tissus sans perdre la coloration GUS, en vue de leur observation au microscope optique Zeiss E800.

Tampon phosphate pH 7.0 (50mM)	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> stock 1M	28,8 ml
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> stock 1M	21,1 ml
	Eau bidistillée stérile	q.s.p. 1l
Tampon de coloration	Tampon phosphate pH 7.0	50 mM
	EDTA	5mM
	Triton X-100	0,05%
	K <sub>4</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,5 mM
	K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub>	0,5 mM
	X-Gluc	0,5 mg/ml

#### 2.1.5.4 BiFC (« Bimolecular Fluorescence Complementation »)

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

## 2.2 Techniques relatives aux bactéries

### 2.2.1 Préparation de bactéries compétentes

Tout d'abord, la souche bactérienne est inoculée dans 5 ml de milieu LB et cultivée 16h à 37°C. Cette pré-culture est transférée dans 250 ml de milieu LB contenu dans un erlenmeyer de 1l. La croissance des cellules se déroule à 37°C sous forte agitation, jusqu'à une  $DO_{600nm}$  de 0,7 qui correspond à des cellules en fin de phase exponentielle de croissance. Les étapes qui suivent sont effectuées au froid avec du matériel stérile.

La culture obtenue est centrifugée pendant 15 min à 5000 x g, lavée une fois avec une solution de  $CaCl_2$  0,1 M, reprise ensuite dans 50 ml de cette même solution et incubée toute une nuit à 4°C. Puis, la culture est centrifugée et resuspendue dans 3 ml de tampon  $CaCl_2$  50 mM contenant 15% de glycérol. Cette solution bactérienne est aliquotée dans des tubes individuels, congelée dans de l'azote liquide et stockée à -80°C. Chaque aliquote de 50  $\mu$ l est utilisée pour une transformation. Les bactéries *E. coli* de souche TOP10 ainsi préparées peuvent être transformées par choc thermique.

### 2.2.2 Transformation des bactéries par choc thermique

Cette technique a été utilisée pour toutes les transformations bactériennes réalisées au cours de cette étude. Le vecteur d'intérêt purifié (100 ng) est ajouté au 50  $\mu$ l de bactéries compétentes. Le mélange est incubé 30 min dans la glace puis placé dans un bain-marie à 42°C pendant 45 s avant d'être ré-incubé 2 min dans la glace. Après transformation, les bactéries sont placées une heure à 37°C dans 300  $\mu$ l de milieu LB. Au final, elles sont étalées sur un milieu contenant l'antibiotique qui permet la sélection des bactéries renfermant le plasmide d'intérêt.

### 2.2.3 Analyse des clones bactériens

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

But	Séquence des amorces	
Séquencage des plasmides gateway	MD30	5'- GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT -3'
	MD31	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT -3'



## 2.2.4 Mise en évidence d'interactions protéiques par « GST-Pull down »

### 2.2.4.1 Extraction des protéines de fusion GST exprimées dans *E. coli*

Les gènes correspondants aux protéines que l'on souhaite exprimer dans *E. coli* sont clonés dans le vecteur pDEST15. Les bactéries BL21AI transformées avec ces constructions sont étalées sur 3 boîtes contenant un milieu additionné d'ampicilline. Après leur culture à 37°C, les colonies sont directement remises en suspension sur la boîte, avec du milieu LB contenant l'antibiotique. La solution bactérienne est versée dans un erlenmeyer de 1l. Cette opération est répétée trois fois afin de récolter un maximum de colonies. La solution bactérienne est finalement diluée jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600nm}$  de 0,4 et placée sous forte agitation dans un incubateur à 37°C. Lorsque la DO atteint 0,5, la culture est induite avec de l'arabinose 0,2%. L'induction dure 3-4h, toujours sous agitation, à une température de 16°C afin de limiter l'agrégation des protéines exprimées et l'apparition de corps d'inclusion. Les étapes suivantes sont effectuées sur la glace, avec des tampons à 4°C et des rotors refroidis.

En fin d'induction, les bactéries sont centrifugées (15 min, 7000 x g, 4°C), le culot est repris dans 10 ml de tampon d'extraction *E. coli* et transféré dans des tubes Falcon de 15ml. Une paillette de lysosyme est ajoutée. Le mélange est laissé au repos 10 min dans la glace avant sonication 6 fois 15 s (puissance 6 à 40%, modèle VIA de Sonics & Materials équipé d'une micro-sonde). Du Triton X-100 est additionné au mélange, à une concentration finale de 0,5% (v/v). Après 10 min de repos dans la glace, les tubes sont centrifugés 25 min à 20000 x g. Le surnageant constitue l'extrait protéique *E. coli*.

La même expérience a été réalisée avec le plasmide pGEX-4T-1 qui permet d'isoler la protéine GST seule. Dans ce cas, les bactéries utilisées sont des BL21(DE3)pLysS et l'inducteur correspondant est l'IPTG (1mM).

Tampon Tris/NaCl (0,1 M pH 7.5)	NaCl	500 mM
	Tris-HCl pH 7.5	100 mM
Tampon d'Extraction <i>E. coli</i>	Tampon Tris/NaCl pH 7.5	0,1 M
	NP40	0,5%
	$\beta$ -glycérolphosphate	10 mM
	NaF	1mM
	DTT	5 mM
	Inhibiteur de Protéase (mix « Complete » de Roche)	1 pastille

#### 2.2.4.2 Purification des protéine de fusion GST

Les billes de Gluthation Sepharose (GE Healthcare) (1 ml) sont lavées 3 fois dans un excès (13 ml) de tampon Tris/NaCl pH 7.5 froid. Après le dernier lavage, les billes sont resuspendues volume à volume dans le tampon d'extraction *E. coli* et gardées à 4°C. 100 µl de billes sont ajoutées à 1 ml d'extrait protéique d' *E. coli* et placées sous faible agitation pendant 16h à 4°C. Après l'incubation, les billes sont lavées 3 fois avec du tampon d'extraction *E. coli* et reprises volume à volume dans ce même tampon. La solution finale, pouvant être gardée au maximum 5 jours à 4°C, contient la protéine de fusion GST fixée sur les billes de Gluthation Sepharose. L'efficacité de la purification est testée sur gel SDS-PAGE. A cet effet, 20 µl de billes sont prélevés, centrifugés (1 min, 100 x g, 4°C), débarrassés du surnageant et resuspendus dans du tampon de charge SDS. Le mélange est dénaturé 10 min à 95°C avant d'être chargé sur le gel. Après la migration, le gel est lavé une fois dans l'eau stérile et coloré au bleu de Coomassie. La révélation des protéines se fait par des lavages successifs du gel avec une solution de décoloration.

Solution de coloration	Coomassie Brillant Blue R250	2,5 g/l
	Méthanol	45% (v/v)
	Acide acétique	10% (v/v)
	H <sub>2</sub> O	45% (v/v)
Solution de décoloration	Acide acétique	7% (v/v)
	Ethanol	20% (v/v)

#### 2.2.4.3 Transcription-Traduction *in vitro*

Les cDNA des gènes d'intérêt sont clonés dans le vecteur pGADT7. Ces plasmides sont directement utilisés en tant que matrice pour la transcription-traduction dans des extraits de germes de blé. Les deux réactions couplées sont réalisées à l'aide du kit « TNT7 Coupled Wheat Germ Extract Systems » (Promega) selon les indications du fabricant. Ce kit permet de produire des protéines radioactives, marquées à la methionine-[35S]. L'efficacité de la production protéique *in vitro* est vérifiée sur gel SDS-PAGE. Après migration d'un échantillon réactionnel, le gel est séché et placé à -80°C au contact d'un film sensible aux rayons X.

#### 2.2.4.4 L'expérience de « Pull down »

Les protéines produites *in vitro* sont divisées en deux lots. L'un est incubé avec les protéines de fusion GST fixées sur les billes et l'autre avec une quantité équivalente de protéine GST seule, également fixée sur les billes, servant de contrôle d'interaction

aspécifique. La quantité de billes ajoutée est estimée à partir du gel coloré au bleu de Coomassie décrit précédemment. Le mélange est incubé sous une agitation douce à 4°C pendant 16h. A la fin de la réaction d'interaction, les billes sont lavées 3 fois avec du tampon d'extraction *E. coli* froid. Au dernier lavage, elles sont centrifugées (5 min, 100 x g, 4°C), le surnageant est éliminé et les billes sont resuspendues dans un volume équivalent de tampon de charge SDS. S'en suit une étape de dénaturation de 10 min à 95°C. Après une légère centrifugation, la totalité du surnageant est directement déposé sur gel. Après migration, le gel est séché et mis au contact d'un film sensible au rayon X.

## 2.3 Techniques relatives aux levures

### 2.3.1 Transformation des levures par l'acétate de lithium

Une pré-culture de levures est réalisée à 30°C en inoculant la veille 5 ml de milieu YPD. Cette pré-culture sert à inoculer 50 ml de milieu YPD pour la culture finale. Lorsque la DO<sub>600nm</sub> atteint 0,6, les levures sont centrifugées (5 min, 5000 x g) et le culot est lavé 2 fois avec de l'eau bidistillée stérile et 2 fois avec la solution LiAc/TE 1x. Les cellules sont finalement reprises dans maximum 1,5 ml (dépend du nombre de transformations) de tampon LiAc/TE 1x.

Pour la réaction de transformation, 5 µl d'ADN de sperme de saumon préalablement bouilli et refroidi dans la glace sont mélangés à 200 ng de chaque plasmide d'intérêt et 350 µl de solution LiAc/TE/PEG4000. Ce mélange est ajouté à 50 µl de la suspension de levure préparée précédemment et le tout est homogénéisé au Vortex. Celui-ci est incubé 30 min à 30°C puis placé dans une étuve à 42°C pendant 10 min. Après centrifugation, les culots de levure transformées sont repris dans 100 µl d'eau stérile et étalés sur milieu sélectif - L(Leucine)/W(Tryptophane).

Tampon LiAc/TE (10x)	LiOAc	1 M
	Tris-HCl pH 8.0	100 mM
	EDTA pH 7.5	10 mM
Tampon LiAc/TE/PEG	Tampon LiAc/TE	1x
	PEG4000	40% (p/v)

### 2.3.2 Test d'interaction en « double hybride »

Les levures sont transformées par les plasmides contenant les gènes codant pour les protéines dont on veut tester l'interaction. Le système utilisé est de type GAL4. Un plasmide porte la séquence de la protéine « appât » en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN de la protéine GAL4. Le second plasmide porte la séquence codante de la protéine « proie » en

fusion avec le domaine d'activation de GAL4. Si les deux protéines interagissent, elle vont reformer un facteur de transcription GAL4 fonctionnel et ainsi activer une série de gènes rapporteurs portés par la levure. Pour la souche AH 109, ces gènes sont *HIS3*, *ADE2*, *lacZ* et *MEL1*.

Après la double transformation, les levures sont incubées 3 jours à 28°C sur milieu sélectif permettant la sélection des plasmides. Le milieu est également dépourvu des nutriments qui permettent la mise en évidence d'une interaction. Ici, les gènes rapporteurs sont *ADE2* qui rétablit l'autotrophie de la souche vis-à-vis de l'adénine et *HIS3*, qui fait de même pour l'histidine. Le milieu -L/W est donc utilisé pour identifier les doubles transformants tandis que les milieux -L/W/H et -L/W/A permettent de tester les interactions. La différence entre les milieux -L/W/H et -L/W/A porte sur la stringence du test où la sélection sur -L/W/A requiert une interaction plus forte entre les protéines. Ce test est principalement qualitatif et son succès dépend de la croissance de la souche sur le milieu.

Ce test peut se présenter sous forme de clones striés sur une boîte ou de test en goutte. Dans ce cas, une dilution en cascade du clone dans de l'eau stérile est réalisée en microplaque ELISA, puis une goutte de chaque dilution est déposée sur boîte de milieu sélectif à l'aide d'un répliqueur de plaque.



# Bibliographie

- Abriel H.** and Staub O. (2005) "Ubiquitylation of ion channels." *Physiology (Bethesda)* 20: 398-407.
- Achard P.**, Gusti A., Cheminant S., Alioua M., Dhondt S., Coppens F., Beemster G.T. and Genschik P. (2009) "Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in Arabidopsis." *Curr Biol* 19(14): 1188-93.
- Amerik A.Y.** and Hochstrasser M. (2004) "Mechanism and function of deubiquitinating enzymes." *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 189-207.
- Andrade, M. A.,** Gonzalez-Guzman, M., Serrano, R., and Rodriguez, P. L. (2001). "A combination of the F-box motif and kelch repeats defines a large Arabidopsis family of F-box proteins." *Plant Mol Biol*, 46(5), 603-14.
- Angers S.,** Li T., Yi X., MacCoss M.J., Moon R.T. and Zheng N. (2006) "Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery." *Nature* 443: 590-593.
- Arias E.E.** and Walter J.C. (2005) "Replication-dependent destruction of Cdt1 limits DNA replication to a single round per cell cycle in Xenopus egg extracts." *Genes Dev* 19: 114-126.
- Arias E.E.** and Walter J.C. (2006) "PCNA functions as a molecular platform to trigger Cdt1 destruction and prevent re-replication." *Nat Cell Biol* 8: 84-90.
- Bachmair, A.,** Novatchkova, M., Potuschak, T., and Eisenhaber, F. (2001) "Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification." *Trends Plant Sci* 6(10): 463-70.
- Bai C.,** Sen P, Hofmann K, Ma L, Goebel M, Harper JW, Elledge SJ. 1996 SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86(2): 263-74.
- Bantignies F.** and Cavalli G. (2006) "Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins." *Curr Opin Cell Biol* 18: 275-83.
- Baroux C.,** Gagliardini V., Page D.R. and Grossniklaus U. (2006) "Dynamic regulatory interactions of Polycomb group genes: MEDEA autoregulation is required for imprinted gene expression in Arabidopsis." *Genes Dev* 20: 1081-1086.
- Berger F.** (2003) "Endosperm: the crossroad of seed development." *Curr Opin Plant Biol* 6(1): 42-50.
- Berger, F.,** Grini, P. E., and Schnittger, A. (2006). "Endosperm: an integrator of seed growth and development." *Curr Opin Plant Biol* 9(6): 664-70.
- Bernhardt A.,** Lechner E., Hano P., Schade V., Dieterle M., Anders M., Dubin M.J., Benvenuto G., Bowler C., Genschik P. and Hellmann H. (2006) "CUL4 associates with DDB1 and DET1 and its downregulation affects diverse aspects of development in Arabidopsis thaliana." *Plant J* 47; 591-603.
- Biedermann S.** and Hellmann H. (2010) "The DDB1a interacting proteins ATCSA-1 and DDB2 are critical factors for UV-B tolerance and genomic integrity in Arabidopsis thaliana." *Plant J*
- Birchler J.A.** (1993) "Dosage analysis of maize endosperm development." *Annu Rev Genet* 27: 181-204.
- Boavida, L. C.,** Becker, J. D., and Feijo, J. A. (2005). "The making of gametes in higher plants." *Int J Dev Biol* 49(5-6): 595-614.
- Bootsma, D.,** Weeda, G., Vermeulen, W., van Vuuren, H., Troelstra, C., van der Spek, P.J., and Hoeijmakers, J.H. (1995). Nucleotide excision repair syndromes: molecular basis and clinical symptoms. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 347, 75-81.
- Borden K. L.** (2000) "RING domains: master builders of molecular scaffolds?" *J Mol Biol* 295(5): 1103-12.
- Bowman J.L.,** Smyth D.R. and Meyerowitz E.M. (1989) "Genes directing flower development in Arabidopsis." *Plant Cell* 1: 37-52.
- Bowman J.L.** and Floyd S.K. (2008) "Patterning and polarity in seed plant shoots." *Annu Rev Plant Biol* 59: 67-88.
- Braun BC,** Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M. (1999) The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol* 1(4): 221-6.
- Brooks C.L.** and Gu W. (2006) "p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond." *Mol. Cell* 21: 307-315.
- Callis J,** Carpenter T, Sun CW, Vierstra RD. Structure and evolution of genes encoding polyubiquitin and ubiquitin-like proteins in Arabidopsis thaliana ecotype Columbia. *Genetics*. 1995 Feb;139(2):921-39.

- Capron A.**, Okrész L. and Genschik P. (2003) "First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase." *Trends Plant Sci* 8(2): 83-9.
- Capron A.**, Serralbo O, Fülöp K, Frugier F, Parmentier Y, Dong A, Lecureuil A, Guerche P, Kondorosi E, Scheres B, Genschik P. 2003 The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *Plant Cell* 15(10): 2370-82.
- Cardozo T.** and Pagano M. (2004) "The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine." *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(9): 739-51.
- Castellano Mdel M.**, Boniotti MB, Caro E, Schnittger A, Gutierrez C. DNA replication licensing affects cell proliferation or endoreplication in a cell type-specific manner. *Plant Cell*. 2004 16(9); 2380-93.
- Cebolla, A.**, Vinardell, J. M., Kiss, E., Olah, B., Roudier, F., Kondorosi, A. and Kondorosi, E. (1999). The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J*. 18: 4476-4484.
- Cenciarelli, C.**, Chiaur, D. S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M., and Pagano, M. (1999). "Identification of a family of human F-box proteins." *Curr Biol*, 9(20), 1177-9.
- Chae H.S.** and Kieber J.J. (2005) "Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis." *Trends Plant Sci* 10: 291-296.
- Chan H.W.**, Miller J.S., Moore M.B. and Lutz C.T. (2005) "Epigenetic control of highly homologous killer Ig-like receptor gene alleles." *J Immunol* 175(9): 5966-74.
- Chanvivattana Y.**, Bishopp A, Schubert D, Stock C, Moon YH, Sung ZR, Goodrich J. (2004) "Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis." *Development* 131(21): 5263-76.
- Chaudhury AM,** Ming L, Miller C, Craig S, Dennis ES, Peacock WJ (1997) Fertilization-independent seed development in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 4223-4228
- Chaudhury, A.M.,** Craig, S., Dennis, E. and Peacock, W.J. (1998) Ovule and embryo development, apomixis and fertilization. *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 26-31.
- Chaudhury A.M.,** Koltunow A., Payne T., Luo M., Tucker M.R., Dennis, E.S. and Peacock W.J. (2001) "Control of early seed development." *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 677-699.
- Chen J,** Wu X, Lin J, Levine AJ. 1996 mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol Cell Biol* 16(5):2445-52.
- Chen H.,** Shen Y., Tang X., Yu L., Wang J., Guo L., Zhang Y., Zhang H., Feng S., Strickland E., Zheng N. and Deng X.W. (2006) "Arabidopsis CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development." *Plant Cell* 18; 1991-2004.
- Chen Z.,** Tan J.L., Ingouff M., Sundaresan V. and Berger, F. (2008) "Chromatin assembly factor 1 regulates the cell cycle but not cell fate during male gametogenesis in Arabidopsis thaliana." *Development* 135(1): 65-73.
- Chen H.,** Huang X., Gusmaroli G., Terzaghi W., Lau O.S., Yanagawa Y., Zhang Y., Li J., Lee J.H., Zhu D., Deng X.W. (2010) "Arabidopsis CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time." *Plant Cell* 22(1): 108-23.
- Chiba T.** and Tanaka K. (2004) "Cullin-based ubiquitin ligase and its control by NEDD8-conjugating system." *Curr Protein Pept Sci* 5(3): 177-84.
- Choi Y.,** Gehring M., Johnson L., Hannon M., Harada J.J., Goldberg R.B., Jacobsen S.E. and Fischer R.L. (2002) "DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in Arabidopsis." *Cell* 110: 33-42.
- Choi, Y.,** Harada, J. J., Goldberg, R. B., and Fischer, R. L. (2004). "An invariant aspartic acid in the DNA glycosylase domain of DEMETER is necessary for transcriptional activation of the imprinted MEDEA gene." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19), 7481-6.
- Christians MJ,** Gingerich DJ, Hansen M, Binder BM, Kieber JJ, et al. (2009) The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in Arabidopsis by controlling type-2 ACC synthase levels. *Plant J* 57(2): 332-45.

- Cleaver** JE, Lam ET and Revet I. 2009 Disorders of nucleotide excision repair: the genetic and molecular basis of heterogeneity. *Nat Rev Genet* 10(11); 756-68.
- Criqui**, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A., Shen, W. H., Dong, A., and Genschik, P. (2000) "Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells." *Plant J*, 24(6), 763-73.
- De Lucia**, F. et al. (2008) A PHD-Polycomb Repressive Complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 16831–16836
- Denuc** A. and Marfany G. (2010) "SUMO and ubiquitin paths converge." *Biochem Soc Trans* 38(Pt 1): 34-9.
- Deshaies** R.J. and Joazeiro C.A. (2009) "RING domain E3 ubiquitin ligases." *Annu Rev Biochem* 78: 399-434.
- Dharmasiri** N., Dharmasiri S. and Estelle M. (2005) "The F-box protein TIR1 is an auxin receptor." *Nature* 435(7041):441-5.
- Dharmasiri** N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jürgens G, Estelle M. (2005) "Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins." *Dev Cell* 9(1):109-19.
- Dias** D.C., Dolios G., Wang R. and Z.Q. Pan, (2002) CUL7: a DOC domain-containing cullin selectively binds Skp1<sup>Fbx29</sup> to form an SCF-like complex, *Proc Natl Acad Sci USA*. 99: 16601–16606.
- Dieterle** M., Thomann A., Renou J.P., Parmentier Y., Cognat V., Lemonnier G., Müller R., Shen W.H., Kretsch T. and Genschik P. (2005) "Molecular and functional characterization of Arabidopsis Cullin 3A." *Plant J* 41: 386–399.
- Di Fiore** B. and Pines J. (2007) "Emi1 is needed to couple DNA replication with mitosis but does not regulate activation of the mitotic APC/C." *J Cell Biol* 177(3): 425-37.
- Di Fiore** B. and Pines J. (2008) "Defining the role of Emi1 in the DNA replication-segregation cycle." *Chromosoma* 117(4): 333-8.
- Doelling** JH, Phillips AR, Soyler-Ogretim G, Wise J, Chandler J, Callis J, Otegui MS, Vierstra RD. (2007) The ubiquitin-specific protease subfamily UBP3/UBP4 is essential for pollen development and transmission in Arabidopsis. *Plant Physiol* 145(3): 801-13.
- Dover**, J., Schneider, J., Tawiah-Boateng, M. A., Wood, A., Dean, K., Johnston, M., and Shilatifard, A. (2002). "Methylation of histone H3 by COMPASS requires ubiquitination of histone H2B by Rad6." *J Biol Chem*, 277(32), 28368-71.
- Downes** B.P., Stupar R.M., Gingerich D.J. and Vierstra R.D. (2003) "The HECT ubiquitin-protein ligase (UPL) family in Arabidopsis: UPL3 has a specific role in trichome development." *Plant J* 35:729-742.
- Downes**, B., and Vierstra, R. D. (2005). "Post-translational regulation in plants employing a diverse set of polypeptide tags." *Biochem Soc Trans*, 33(Pt 2), 393-9.
- El-Mahdy** MA, Zhu Q, Wang Q, Wani G, Prætorius-Ibba M, Wani AA (2006) "Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC." *J Biol Chem* 281; 13404–13411
- Eloy**, N. B., Coppens, F., Beemster, G. T., Hemerly, A. S. and Ferreira, P. C. (2006). The Arabidopsis anaphase promoting complex (APC): regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* 5, 1957-1965.
- El Refy** A., Perazza D., Zekraoui L., Valay J. G., Bechtold N., Brown S., Hulskamp M., Herzog M. and Bonneville J. M. (2003) "The Arabidopsis KAKTUS gene encodes a HECT protein and controls the number of endoreduplication cycles." *Mol Genet Genomics* 270(5); 403-14.
- Elsasser** S, Gali RR, Schwickart M, Larsen CN, Leggett DS, Müller B, Feng MT, Tübing F, Dittmar GA, Finley D. (2002) Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol* 4(9): 725-30.
- Elsasser** S, Chandler-Militello D, Müller B, Hanna J, Finley D. (2004) Rad23 and Rpn10 serve as alternative ubiquitin receptors for the proteasome. *J Biol Chem* 279(26):26817-22.
- Fang** G., Yu H. and Kirschner M.W. (1998) "Direct binding of CDC20 protein family members activates the anaphase-promoting complex in mitosis and G1." *Mol Cell* 2: 163–171.



- Fang SY, Jensen JP, Ludwig RL, Vousden KH, Weissman AM (2000)** Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53. *J Biol Chem* 275:8945–8951
- Feil R. and Berger F. (2007)** “Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals.” *Trends Genet* 23: 192-9.
- Figueroa P, Gusmaroli G, Serino G, Habashi J, Ma L, et al. (2005)** Arabidopsis Has Two Redundant Cullin3 Proteins That Are Essential for Embryo Development and That Interact with RBX1 and BTB Proteins to Form Multisubunit E3 Ubiquitin Ligase Complexes in Vivo. *Plant Cell* 17: 1180–1195.
- Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES. (1996)** Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 8449-54.
- Finnegan E.J., Peacock W.J. and Dennis E.S. (2000)** “DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes.” *Curr Opin Genet Dev* 10(2): 217-23.
- Finnegan, E.J. and Dennis, E.S. (2007)** Vernalization-induced trimethylation of histone H3 Lysine 27 at FLC is not maintained in mitotically quiescent cells. *Curr. Biol.* 17, 1978–1983
- Fousteri M, Vermeulen W, van Zeeland AA, Mullenders LH 2006** “Cockayne syndrome A and B proteins differentially regulate recruitment of chromatin remodeling and repair factors to stalled RNA polymerase II in vivo.” *Mol Cell* 23; 471-482.
- Fülöp K, Tarayre S, Kelemen Z, Horváth G, Kevei Z, Nikovics K, Bakó L, Brown S, Kondorosi A, Kondorosi E. 2005** Arabidopsis anaphase-promoting complexes: multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle* 4(8):1084-92.
- Gagne J.M., Downes B.P., Shiu S.H., Durski A.M. and Vierstra R.D. (2002)** The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(17):11519-24.
- Gagne J.M., Smalle J., Gingerich D.J., Walker J.M., Yoo S.D., Yanagisawa S. and Vierstra R.D. (2004)** “Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation.” *Proc Natl Acad Sci USA* 101(17); 6803-8.
- Garcia D., Fitz Gerald J.N. and Berger F. (2005)** “Maternal control of integument cell elongation and zygotic control of endosperm growth are coordinated to determine seed size in Arabidopsis.” *Plant Cell* 17(1): 52-60.
- Gehring M., Choi Y. and Fischer R.L. (2004)** “Imprinting and seed development.” *Plant Cell* 16 (suppl): S203-13.
- Gehring M, Huh JH, Hsieh TF, Penterman J, Choi Y, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL. 2006** DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA Polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. *Cell* 124: 495-506.
- Gendall A.R., Levy Y.Y., Wilson A., Dean C. (2001)** “The VERNALIZATION 2 gene mediates the epigenetic regulation of vernalization in Arabidopsis.” *Cell* 107 : 525-535.
- Genschik, P., Criqui, M. C., Parmentier, Y., Derevier, A. and Fleck, J. (1998)** Cell cycle-dependent proteolysis in plants. Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* 10: 2063-2076.
- Gill G. (2003).** “Post-translational modification by the small ubiquitin-related modifier SUMO has big effects on transcription factor activity.” *Curr Opin Genet Dev* 13(2), 108-13.
- Gingerich DJ, Gagne JM, Salter DW, Hellmann H, Estelle M, et al. (2005)** Cullin 3A and B assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-A-brac (BTB). *J Biol Chem* 280: 18810–18821.
- Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A., and Finley, D. (1998).** “A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3.” *Cell*, 94(5), 615-23.
- Glickman M.H. and Ciechanover A. (2002)** The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev.* Apr;82(2):373-428.
- Glotzer M., Murray A.W. and Kirschner M.W. (1991)** “Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway.” *Nature* 349: 132-138.

- Golan A.**, Yudkovsky Y. and Hershko A. (2002) “The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk.” *J Biol Chem* 277(18): 15552-7.
- Goldstein G.**, Scheid M., Hammerling U., Schlesinger D.H., Niall H.D. and Byers B. (1975) “Isolation of a polypeptide that has lymphocyte-differentiation properties and is probably represented universally in living cells.” *Proc Natl Acad Sci USA* 72: 11-15.
- J. Goodrich**, P. Puangsomlee, M. Martin, D. Long, E.M. Meyerowitz, G. Coupland, (1997) “A Polycomb-group gene regulates homeotic gene expression in Arabidopsis.” *Nature* 386: 44–51.
- Goodrich J.** and Tweedie S. (2002) “Remembrance of things past: chromatin remodeling in plant development.” *Annu Rev Cell Dev Biol* 18; 707-746.
- Gray W. M.**, Hellmann H., Dharmasiri S. and Estelle M. (2002) “Role of the Arabidopsis RING-H2 protein RBX1 in RUB modification and SCF function.” *Plant Cell* 14(9): 137-44.
- Groisman R.**, Polanowska J., Kuraoka I., Sawada J., Saijo M., Drapkin R., Kisselev A.F., Tanaka K. and Nakatani Y. (2003) “The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage.” *Cell* 113; 357–367.
- Greb, T.** et al. (2007) The PHD finger protein VRN5 functions in the epigenetic silencing of Arabidopsis FLC. *Curr. Biol.* 17, 73–78
- Groisman R.**, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, Kisselev AF, Tanaka K, Nakatani Y: The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 2003, 113:357-367.
- Groll M.**, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R. (1997) Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature* 386(6624): 463-71.
- Grossniklaus U.**, Vielle-Calzada JP, Hoepfner MA, Gagliano WB. Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in Arabidopsis. *Science* 1998 ; 280 : 446-50.
- U. Grossniklaus**, C. Spillane, D.R. Page, C. Kohler, (2001) Genomic imprinting and seed development: endosperm formation with and without sex. *Curr Opin Plant Biol* 4: 21–27.
- Grossniklaus U.** and Paro R. (2007) “Transcriptional silencing by Polycomb group proteins, in: C.D. Allis, T. Jenuwein, D. Reinberg, M. Caparros” (Eds.), *Epigenetics*, Cold Spring Harbor pp. 211–230
- Guittou AE**, Page DR, Chambrier P, Lionnet C, Faure JE, et al. (2004) Identification of new members of Fertilisation Independent Seed Polycomb Group pathway involved in the control of seed development in Arabidopsis thaliana. *Development* 131: 2971–2981.
- Guittou A.E.** and Berger F. (2005) “Control of reproduction by Polycomb group complexes in animals and plants.” *Int J Dev Biol* 49: 707-16.
- Guittou A.E.** and Berger F. (2005) “Loss of function of MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA 1 produces nonviable parthenogenetic embryos in Arabidopsis.” *Curr Biol* 15; 750–754.
- Gusti A.**, Baumberger N., Nowack M., Pusch S., Eisler H., Potuschak T., De Veylder L., Schnittger A. and Genschik P. (2009) “The Arabidopsis thaliana F-box protein FBL17 is essential for progression through the second mitosis during pollen development.” *PLoS One* 4(3): e4780.
- Hay R.T.** (2005) “SUMO: a history of modification.” *Mol Cell* 18: 1–12.
- Haupt Y.**, Barak Y, Oren M. (1996) Cell type-specific inhibition of p53-mediated apoptosis by mdm2. *EMBO J* 15(7):1596-606.
- Haupt Y.**, Maya R, Kazaz A, Oren M (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* 387:296–299
- He Y.J.**, McCall C.M., Hu J., Zeng Y. and Xiong Y. (2006) “DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases.” *Genes Dev* 20; 2949-2954.
- Hennig L.**, Taranto P, Walser M, Schönrock N, Gruissem W (2003) Arabidopsis MSI1 is required for epigenetic maintenance of reproductive development. *Development* 130, 2555–2565.
- Hennig L.**, Bouveret R. and Gruissem W. (2005) MSI1-like proteins: an escort service for chromatin assembly and remodeling complexes. *Trends Cell Biol* 15:295-302

- Hennig L.** and Derkacheva M. (2009) “Diversity of Polycomb group complexes in plants: same rules, different players?” *Trends Genet* 25(9): 414-23.
- Hershko A.**, Ciechanover A., Heller H., Haas A. L. and Rose I.A. (1980) “Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis.” *Proc Natl Acad Sci U S A* 77(4): 1783-6.
- Hershko A.**, Ciechanover A. and Rose I.A. (1981) “Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown.” *J Biol Chem* 256(4): 1525-8.
- Hershko A.** and Ciechanover A. (1992) “The ubiquitin system for protein degradation.” *Annu Rev Biochem* 61: 761-807.
- Hershko A.** and Ciechanover A. (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 67:425-79.
- Higa LA,** Mihaylov IS, Banks DP, Zheng J, Zhang H: Radiation mediated proteolysis of CDT1 by CUL4-ROC1 and CSN complexes constitutes a new checkpoint. *Nat Cell Biol* 2003, 5:1008-1015.
- Higa L.A.,** Wu M., Ye T., Kobayashi R., Sun H. and Zhang H. (2006) “CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation.” *Nat Cell Biol* 8:1277-1283.
- Higa LA,** Banks D, Wu M, Kobayashi R, Sun H, Zhang H: L2DTL/ CDT2 interacts with the CUL4/DDB1 complex and PCNA and regulates CDT1 proteolysis response to DNA damage. *Cell Cycle* 2006, 5:1675-1680
- Higashiyama, T.,** Kuroiwa, H., and Kuroiwa, T. (2003). “Pollen-tube guidance: beacons from the female gametophyte.” *Curr Opin Plant Biol*, 6(1), 36-41.
- Hoecker U** (2005) Regulated proteolysis in light signaling. *Curr Opin Plant Biol* 8:469–476
- Holm, M.,** Ma, L.G., Qu, L.J., and Deng, X.W. (2002). Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of lightdependent gene expression in Arabidopsis. *Genes Dev.* 16; 1247–1259.
- Holweg C.,** Süßlin C. and Nick P. (2004) “Capturing in vivo dynamics of the actin cytoskeleton stimulated by auxin or light.” *Plant Cell Physiol* 45(7): 855-63.
- Honda R,** Tanaka H and Yasuda H (1997) Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420:25–27
- Honda R.** and Yasuda H (2000) Activity of MDM2, a ubiquitin Ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase. *Oncogene* 19:1473–1476
- Hu J,** McCall CM, Ohta T, Xiong Y: Targeted ubiquitination of CDT1 by the DDB1–CUL4A–ROC1 ligase in response to DNA damage. *Nat Cell Biol* 2004, 6:1003-1009.
- Huang T.T.** and D’Andrea A.D. (2006) Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 323–334.
- Hunter T.** and Sun H. (2008) “Crosstalk between the SUMO and ubiquitin pathways.” *Ernst Schering Found Symp Proc* 1: 1–16.
- Ingouff M,** Haseloff J, Berger F (2005) Polycomb group genes control developmental timing of endosperm. *Plant J* 42: 663–674
- Ingouff M.,** Hamamura Y., Gourgues M., Higashiyama T. and Berger F. (2007) Distinct dynamics of HISTONE3 variants between the two fertilization products in plants. *Curr Biol* 17: 1032–1037.
- Ingouff M.,** Sakata T., Li J., Sprunck S., Dresselhaus T. and Berger F. (2009) “The two male gametes share equal ability to fertilize the egg cell in Arabidopsis thaliana.” *Current Biology* 19(1): R19-20.
- Irniger S.** (2002) “Cyclin destruction in mitosis: a crucial task of Cdc20.” *FEBS Lett* 532(1-2): 7-11.
- Itoh H.,** Matsuoka M. and Steber C.M. (2003) “A role for the ubiquitin–26S-proteasome pathway in gibberellin signalling.” *Trends Plant Sci* 8; 492–497.
- Jackson PK,** Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD. (2000) The lore of the RINGS: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 10(10): 429-39.
- Jang, I.C.,** Yang, J.Y., Seo, H.S., and Chua, N.H. (2005). HFR1 is targeted by COP1 E3 ligase for post-translational proteolysis during phytochrome A signaling. *Genes Dev.* 19: 593–602.

- Jiang** C.Z., Yee J., Mitchell D.L. and Britt A.B. (1997) "Photorepair mutants of Arabidopsis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94; 7441–7445.
- Jin** J., Arias E.E., Chen J., Harper J.W. and Walter J.C. (2006) "A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1." *Mol Cell* 23; 709–721.
- Jin** JB and Hasegawa PM. 2008 Flowering time regulation by the SUMO E3 ligase SIZ1. *Plant Signal Behav.* Oct;3(10):891-2.
- Jullien** PE, Katz A, Oliva M, Ohad N, Berger F: Polycomb group complexes self-regulate imprinting of the polycomb group gene MEDEA in Arabidopsis. *Curr Biol* 2006, 16:486-492.
- Jullien** PE, Kinoshita T, Ohad N, Berger F: (2006) Maintenance of DNA methylation during the Arabidopsis life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell* 18: 1360-1372.
- Jullien** PE, Mosquna A, Ingouff M, Sakata T, Ohad N, Berger F: Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in Arabidopsis. *PLoS Biol* 2008, 6:e194.
- Jullien** P.E. and Berger F. (2008) "Parental genomic imprinting in plants: significance for reproduction." *Med Sci (Paris)* 24(8-9):753-7.
- Jullien** P.E. and Berger F. (2009) "Gamete-specific epigenetic mechanisms shape genomic imprinting." *Curr Opin Plant Biol* 12(5): 637-42.
- Kamura** T., Conrad M. N., Yan Q., Conaway R. C. and Conaway J. W. (1999) "The Rbx1 subunit of SCF and VHL E3 ubiquitin ligase activates Rub1 modification of cullins Cdc53 and Cul2." *Genes Dev* 13(22): 2928-33.
- Kamura**, T., Koepp, D. M., Conrad, M. N., Skowyra, D., Moreland, R. J., Iliopoulos, O., Lane, W. S., Kaelin, W. G., Elledge, S. J., Conaway, R. C., Harper, J. W., and Conaway, J. W. (1999). "Rbx1, a component of the VHL tumor suppressor complex and SCF ubiquitin ligase." *Science* 284(5414), 657-61.
- Katz**, M. Oliva, A. Mosquna, O. Hakim, N. Ohad, FIE and CURLY LEAF Polycomb proteins interact in the regulation of homeobox gene expression during sporophyte development, *Plant J.* 37 (2004) 707–719.
- Kapetanaki** M.G., Guerrero-Santoro J., Bisi D.C., Hsieh C.L., Ropic-Otrin V. and Levine AS. (2006) "The DDB1-CUL4A<sup>DDB2</sup> ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103; 2588-2593.
- Kaufman** PD, Kobayashi R, Stillman B. (1997) Ultraviolet radiation sensitivity and reduction of telomeric silencing in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking chromatin assembly factor-I. *Genes Dev.* 11, 345–357.
- Kim** W. and Kaelin W.G. Jr. (2003) "The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein: new insights into oxygen sensing and cancer." *Curr Opin Genet Dev* 13(1): 55-60.
- Kim**, H. J., Oh, S. A., Brownfield, L., Hong, S. H., Ryu, H., Hwang, I., Twell, D., and Nam, H. G. (2008) "Control of plant germline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors." *Nature*, 455(7216), 1134-7.
- Kinoshita** T, Yadegari R, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL. (1999) Imprinting of the MEDEA Polycomb gene in the Arabidopsis endosperm. *Plant Cell* 11:1945-1952.
- Kinoshita** T, Miura A, Choi Y, Kinoshita Y, Cao X, Jacobsen SE, Fischer RL, Kakutani T. (2004) One-way control of FWA imprinting in Arabidopsis endosperm by DNA methylation. *Science* 303: 521-3.
- Kisselev** AF, Akopian TN, Goldberg AL. 1998 Range of sizes of peptide products generated during degradation of different proteins by archaeal proteasomes. *J Biol Chem* 273(4): 1982-9.
- Kisselev** AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL. 1999 The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem* 274(6): 3363-71.
- Kiyosue** T., Ohad N., Yadegari R., Hannon M., Dinneny J., Wells D., Katz A., Margossian L., Harada J.J., Goldberg R.B. and Fischer R.L. (1999) "Control of fertilization-independent endosperm development by the MEDEA polycomb gene in Arabidopsis." *Proc Natl Acad Sci USA* 96(7): 4186-91.

- C. **Köhler**, L. Hennig, R. Bouveret, J. Gheyselinck, U. Grossniklaus, W. Gruissem, Arabidopsis MSI1 is a component of the MEA/FIE Polycomb group complex and required for seed development, *EMBO J.* 22 (2003) 4804–4814.
- Köhler** C, Hennig L, Spillane C, Pien S, Gruissem W, Grossniklaus U (2003) The Polycomb-group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the MADS-box gene *PHERES1*. *Genes Dev* 17: 1540–1553
- Köhler** C. and Grossniklaus U. (2005) “Seed development and genomic imprinting in plants.” *Prog Mol Subcell Biol* 38: 237-62.
- Köhler** C., Page D.R., Gagliardini V. and Grossniklaus U. (2005) “The Arabidopsis thaliana MEDEA Polycomb group protein controls expression of *PHERES1* by parental imprinting.” *Nat Genet* 37: 28-30.
- Köhler** C. and Makarevich G. (2006) “Epigenetic mechanisms governing seed development in plants.” *EMBO Rep* 7(12): 1223-7.
- Kornitzer** D. and Ciechanover A. (2000). “Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation.” *J Cell Physiol*, 182(1), 1-11.
- Krogan**, N. J., Dover, J., Khorrami, S., Greenblatt, J. F., Schneider, J., Johnston, M., and Shilatifard, A. (2002). “COMPASS, a histone H3 (Lysine 4) methyltransferase required for telomeric silencing of gene expression.” *J Biol Chem*, 277(13), 10753-5.
- Kubbutat** M.H., Jones S.N. and Vousden K.H. (1997) “Regulation of p53 stability by Mdm2.” *Nature* 15;387(6630): 299-303.
- Kurepa** J., Walker J.M., Smalle J., Gosink M.M., Davis S.J., Durham T.L., Sung D.Y. and Vierstra, R.D. (2003) The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress. *J Biol Chem* 278, 6862–6872
- Kuroda** H., Takahashi N., Shimada H., Seki M., Shinozaki K. and Matsui M. (2002) “Classification and expression analysis of Arabidopsis F-box-containing protein genes.” *Plant Cell Physiol* 43(10): 1073-85.
- Kwee**, H. S. and Sundaresan, V. (2003). The NOMEA gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the Anaphase Promoting Complex in Arabidopsis. *Plant J.* 36, 853-866.
- Lau** OS, Deng XW. Effect of Arabidopsis COP10 ubiquitin E2 enhancement activity across E2 families and functional conservation among its canonical homologues. *Biochem J.* 2009 Mar 15;418(3):683-90.
- LeBron** C., Chen, L., Gilkes, D. M., and Chen, J. (2006). “Regulation of MDMX nuclear import and degradation by Chk2 and 14-3-3.” *Embo J*, 25(6), 1196-206.
- Lechner** E., Xie D., Grava S., Pigaglio E., Planchais S., Murray J.A., Parmentier Y., Mutterer J., Dubreucq B., Shen W.H. and Genschik P. (2002) “The AtRbx1 protein is part of plant SCF complexes, and its down-regulation causes severe growth and developmental defects.” *J Biol Chem* 277(51):50069-80.
- Lechner** E., Achard P., Vansiri A., Potuschak T. and Genschik P. (2006) “F-box proteins everywhere.” *Curr Opin Plant Biol* 9(6): 631-8.
- Lee** J. and Zhou P. (2007) “DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase.” *Mol Cell* 26(6); 775-80.
- Lee**, J.H., Terzaghi, W., Gusmaroli, G., Charron, J.B., Yoon, H.J., Chen, H., He, Y.J., Xiong, Y., and Deng, X.W. (2008) Characterization of Arabidopsis and rice DWD proteins and their roles as substrate receptors for CUL4-RING E3 ubiquitin ligases. *Plant Cell* 20 152–167.
- Leismann**, O., and Lehner, C. F. (2003). “Drosophila securin destruction involves a D-box and a KEN-box and promotes anaphase in parallel with Cyclin A degradation.” *J Cell Sci* 116(Pt 12): 2453-60.
- Y.Y. **Levy**, S. Mesnage, J.S. Mylne, A.R. Gendall, C. Dean, Multiple roles of Arabidopsis VRN1 in vernalization and flowering time control, *Science* 297 (2002) 243–246.
- Li** B., Ruiz J.C. and Chun K.T. (2002) CUL-4A is critical for early embryonic development. *Mol Cell Biol* 22, 4997–5005.
- Li** X, Zhao Q, Liao R, Sun P, Wu X. (2003) “The SCF(Skp2) ubiquitin ligase complex interacts with the human replication licensing factor Cdt1 and regulates Cdt1 degradation.” *J Biol Chem* 278: 30854-30858.

- Liu, F., Ni, W., Griffith, M. E., Huang, Z., Chang, C., Peng, W., Ma, H., and Xie, D.** (2004) “The ASK1 and ASK2 genes are essential for Arabidopsis early development.” *Plant Cell* 16(1), 5-20.
- Liu J., Zhang Y., Qin G., Tsuge T., Sakaguchi N., Luo G., Sun K., Shi D., Aki S., Zheng N., Aoyama T., Oka A., Yang W., Umeda M., Xie Q., Gu H. and Qu L.J.** (2008) “Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis gametogenesis.” *Plant Cell* 20(6): 1538-54.
- Lou X., Zhu J., Zhang Q., Zang R., Chen Y., Yu Z. and Zhao Y.** (2005) “Genetic control of the opaque-2 gene and background polygenes over some kernel traits in maize (*Zea mays* L.)” *Genetica* 124(2-3): 291-300.
- Lyapina, S., Cope, G., Shevchenko, A., Serino, G., Tsuge, T., Zhou, C., Wolf, D.A., Wei, N., and Deshaies, R.J.** (2001). Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* 292, 1382–1385.
- J.A. Long, E.I. Moan, J.I. Medford, M.K. Barton,** A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis, *Nature* 379 (1996) 66–69.
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM.** 1999 RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(20):11364-9.
- Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS.** 1993 Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(6): 2112-6.
- Luo, M., Bilodeau, P., Dennis, E.S., Peacock, W.J., and Chaudhury, A.** (2000). Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing Arabidopsis seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 10637–10642
- Machida YJ, Hamlin JL, Dutta A:** Right place, right time, and only once: replication initiation in metazoans. *Cell* 2005, 123:13-24
- Makarevich G., Leroy O., Akinci U., Schubert D., Clarenz O., Goodrich J., Grossniklaus U. and Kohler C.** (2006) “Different Polycomb group complexes regulate common target genes in Arabidopsis.” *EMBO Rep* 7: 947-952.
- Makarevich G, Villar CB, Erilova A, Kohler C** (2008) Mechanism of PHERES1 imprinting in Arabidopsis. *J Cell Sci* 121: 906–912.
- Marrocco K, Thomann A, Parmentier Y, Genschik P, Criqui MC.** The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic Arabidopsis cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development*. 2009 May;136(9):1475-85.
- Memelink J.** (2009) “Regulation of gene expression by jasmonate hormones.” *Phytochemistry* 70(13-14):1560-70.
- Michael D. and Oren M.** (2003). The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* 13, 49–58.
- Miller, J. J., Summers, M. K., Hansen, D. V., Nachury, M. V., Lehman, N. L., Loktev, A., and Jackson, P. K.** (2006). “Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor.” *Genes & Development*, 20(17): 2410-20.
- Mistry, H., Wilson, B. A., Roberts, I. J., O’Kane, C. J., and Skeath, J. B.** (2004). “Cullin-3 regulates pattern formation, external sensory organ development and cell survival during *Drosophila* development.” *Mech Dev* 121(12): 1495-507.
- Miura K, Hasegawa PM.** Regulation of cold signaling by sumoylation of ICE1. *Plant Signal Behav.* 2008 Jan;3(1):52-3.
- Miura K, Hasegawa PM.** Sumoylation and abscisic acid signaling. *Plant Signal Behav.* 2009 Dec 10;4(12).
- Molinier J, Lechner E, Dumbliuskas E, Genschik P.** (2008) Regulation and role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *PLoS Genet.* 4:e1000093.
- Morison I.M., Ramsay J.P. and Spencer H.G.** (2005) “A census of mammalian imprinting.” *Trends Genet* 21(8): 457-65.

- Nakajima S**, Sugiyama M, Iwai S, Hitomi K, Otsu E, et al. (1998) Cloning and characterization of a gene (UVR3) required for photorepair of 6-4 photoproducts in *Arabidopsis thaliana*. *Nucl Acids Res* 26: 638–644.
- Nasmyth K**, Peters JM, Uhlmann F. 2000 Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science* 288(5470):1379-85.
- Nishitani H**, Sugimoto N, Roukos V, Nakanishi Y, Saijo M, Obuse C, Tsurimoto T, Nakayama KI, Nakayama K, Fujita M et al.: Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *Embo J* 2006, 25:1126-1136.
- Nixdorf M** and Hoecker U. 2010 SPA1 and DET1 act together to control photomorphogenesis throughout plant development. *Planta* 231(4):825-33.
- Nowack M.K.**, Grini P.E., Jakoby M.J., Lafos M., Koncz C. and Schnittger A. (2006) “A positive signal from the fertilization of the egg cell sets off endosperm proliferation in angiosperm embryogenesis.” *Nat Genet* 38(1): 63-7.
- Ohad,N.**, Yadegari,R., Margossian,L., Hannon,M., Michaeli,D., Harada,J.J., Goldberg,R.B. and Fischer,R.L. (1999) Mutations in FIE, a WD Polycomb group gene, allow endosperm development without fertilization. *Plant Cell*, 11, 407-416.
- Ohta, T.**, Michel, J. J., Schottelius, A. J., and Xiong, Y. (1999). “ROC1, a homolog of APC11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity.” *Mol Cell*, 3(4), 535-41.
- Ohta, T.**, Michel, J. J., and Xiong, Y. (1999). “Association with cullin partners protects ROC proteins from proteasome-dependent degradation.” *Oncogene*, 18(48), 6758-66.
- Osterlund, M.T.**, Hardtke, C.S., Wei, N., and Deng, X.W. (2000). Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* 405: 462–466.
- Pagano, M.**, and Benmaamar, R. (2003). “When protein destruction runs amok, malignancy is on the loose.” *Cancer Cell*, 4(4), 251-6.
- Page A. M.** and Hieter P. (1999) “The anaphase-promoting complex: new subunits and regulators.” *Annual Review of Biochemistry* 68: 583-609.
- Park S.** and Harada J.J. (2008) “*Arabidopsis* embryogenesis.” *Methods Mol Biol* 427: 3-16.
- Peng J.**, Schwartz D., Elias J. E., Thoreen C. C., Cheng D., Marsischky G., Roelofs J., Finley D. and Gygi, S. P. (2003) “A proteomics approach to understanding protein ubiquitination.” *Nat Biotechnol* 21(8): 921-6.
- Pepper, A.**, Delaney, T., Washburn, T., Poole, D., and Chory, J. (1994). DET1, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in *Arabidopsis*, encodes a novel nuclear-localized protein. *Cell* 78: 109–116.
- Perez-Perez J. M.**, Serralbo O., Vanstraelen M., Gonzalez C., Criqui M. C., Genschik P., Kondorosi E. and Scheres B. (2008) “Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C).” *Plant J* 53(1): 78-89.
- Peters J.M.** (2006) “The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy.” *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 644–656.
- Petroski M.D.** and Deshaies R.J. 2005 Mechanism of lysine 48-linked ubiquitin-chain synthesis by the cullin-RING ubiquitin-ligase complex SCF-Cdc34. *Cell* 123(6):1107-20.
- Petroski M.D.** and Deshaies R.J. 2005 In vitro reconstitution of SCF substrate ubiquitination with purified proteins. *Methods Enzymol* 398:143-58.
- Pfleger, C.M.** and Kirschner, M.W. (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* 14, 655–665
- Pien, S.** and Grossniklaus, U. (2007) Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochim. Biophys. Acta* 1769, 375–382.
- Pintard L**, Willis JH, Willems A, Johnson JL, Srayko M, et al. (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* 425: 311–316.

- Pintard L, Willems A, Peter M.** 2004 Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* 23(8):1681-7.
- Potuschak T., Lechner E., Parmentier Y., Yanagisawa S., Grava S., Koncz C. and Genschik P.** (2003) "EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2." *Cell* 115: 679–689.
- Prouteau M. and Colot V.** (2005) "Contrôles épigénétiques, développement et variation génétique naturelle chez les plantes." *Med Sci* 21: 422-7.
- Prudden J., Pebernard S., Raffa G., Slavin D.A., Perry J.J., Tainer J.A., McGowan C.H. and Boddy M.N.** (2007) "SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability." *EMBO J* 26: 4089–4101.
- Pugh C.W. and Ratcliffe P.J.** (2003) "The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis." *Semin Cancer Biol* 13(1): 83-9.
- Rapic-Otrin V., Navazza V., Nardo T., Botta E., McLenigan M., Bisi D.C., Levine A.S. and Stefanini, M.** (2003) "True XP group E patients have a defective UV-damaged DNA binding protein complex and mutations in DDB2 which reveal the functional domains of its p48 product." *Hum Mol Genet* 12; 507–1522.
- Ray S., Golden T. and Ray A.** (1996) "Maternal effects of the short integument mutation on embryo development in Arabidopsis." *Dev Biol* 180(1): 365-9.
- Raymond J. Deshaies, Claudio A.P. Joazeiro** (2009) RING Domain E3 Ubiquitin Ligases Annual Review of Biochemistry, Vol. 78: 399-434
- Reimann, J. D., Freed, E., Hsu, J. Y., Kramer, E. R., Peters, J. M., and Jackson, P. K.** (2001). "Emi1 is a mitotic regulator that interacts with Cdc20 and inhibits the anaphase promoting complex." *Cell*, 105(5), 645-55.
- Reimann, J. D., Gardner, B. E., Margottin-Goguet, F., and Jackson, P. K.** (2001). "Emi1 regulates the anaphase-promoting complex by a different mechanism than Mad2 proteins." *Genes Dev* 15(24), 3278-85.
- Ríos G, Lossow A, Hertel B, Breuer F, Schaefer S, Broich M, Kleinow T, Jásik J, Winter J, Ferrando A, Farrás R, Panicot M, Henriques R, Mariaux JB, Oberschall A, Molnár G, Berendzen K, Shukla V, Lafos M, Koncz Z, Rédei GP, Schell J, Koncz C.** (2002) Rapid identification of Arabidopsis insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *Plant J.* 32:243-253.
- Rivett A.J.** (1989) "The multicatalytic proteinase complex." *Revis Biol Celular* 20: 113-23.
- Rogers SO, Bendich** (1985). Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbariurp and mummified plant tissues. *Plant Mol Biol*5:69-76.
- Rudner AD, Murray AW.** 2000 Phosphorylation by Cdc28 activates the Cdc20-dependent activity of the anaphase-promoting complex. *J Cell Biol* 149(7): 1377-90.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T.** (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual." (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Saijo, Y., Sullivan, J.A., Wang, H., Yang, J., Shen, Y., Rubio, V., Ma, L., Hoecker, U., and Deng, X.W.** (2003). The COP1-SPA1 interaction CUL4 Represses Photomorphogenesis 2003 defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity. *Genes Dev.* 17, 2642–2647.
- Saracco S.A., Miller M.J., Kurepa J. and Vierstra R.D.** (2007) "Genetic analysis of SUMOylation in Arabidopsis: conjugation of SUMO1 and SUMO2 to nuclear proteins is essential." *Plant Physiol* 145(1):119-34.
- Scheffner, M., Huibregtse, J. M., Vierstra, R. D., and Howley, P. M.** (1993). "The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53." *Cell*, 75(3), 495-505.
- Schroeder D.F., Gahrtz M., Maxwell B.B., Cook R.K., Kan J.M., Alonso J.M., Ecker J.R. and Chory J.** (2002) "De-etiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate Arabidopsis photomorphogenesis." *Curr Biol* 12; 1462–1472.
- Schruff M.C., Spielman M., Tiwari S., Adams S., Fenby N. and Scott R.J.** (2006) "The AUXIN RESPONSE FACTOR 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs." *Development* 133(2): 251-61.



- D. **Schubert**, L. Primavesi, A. Bishopp, G. Roberts, J. Doonan, T. Jenuwein, J. Goodrich, Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27, *EMBO J.* 25 (2006) 4638-4649.
- Schubert** D. and Goodrich J. (2003) "Plant epigenetics: MEDEA's children take centre stage." *Curr Biol* 13(16): R638-40.
- Schwechheimer**, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W.L., Lyapina, S., Deshaies, R.J., Gray, W.M., Estelle, M., and Deng, X.W. (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* 292, 1379–1382.
- Schwechheimer** C. (2004) The COP9 signalosome (CSN): an evolutionary conserved proteolysis regulator in eukaryotic development. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3):45-54.
- Scott**, R.J., M. Spielman, J. Bailey and H.G. Dickinson (1998) Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125, 3329–3341
- Scott** R.J. and Spielman M. (2006) "Genomic imprinting in plants and mammals: how life history constrains convergence." *Cytogenet Genome Res* 113(1-4): 53-67.
- Scrima** A., Konícková R., Czyzewski B.K., Kawasaki Y., Jeffrey P.D., Groisman R., Nakatani Y., Iwai S., Pavletich N.P. and Thomä N.H. (2008) "Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex." *Cell* 135(7); 1213-23.
- Sedgwick** C, Rawluk M, Decesare J, Raithatha S, Wohlschlegel J, Semchuk P, Ellison M, Yates J 3rd and Stuart D. (2006) "Saccharomyces cerevisiae Ime2 phosphorylates Sic1 at multiple PXS/T sites but is insufficient to trigger Sic1 degradation." *Biochem J* 399(1): 151-60.
- Senga** T, Sivaprasad U, Zhu W, Park JH, Arias EE, Walter JC, Dutta A: PCNA is a co-factor for Cdt1 degradation by CUL4/DDB1 mediated N-terminal ubiquitination. *J Biol Chem* 2006.
- Seo**, H.S., Yang, J.Y., Ishikawa, M., Bolle, C., Ballesteros, M.L., and Chua, N.H. (2003). LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* 423, 995–999.
- Seol**, J. H., Feldman, R. M., Zachariae, W., Shevchenko, A., Correll, C. C., Lyapina, S., Chi, Y., Galova, M., Claypool, J., Sandmeyer, S., Nasmyth, K., Deshaies, R. J., Shevchenko, A., and Deshaies, R. J. (1999). "Cdc53/cullin and the essential Hrt1 RING-H2 subunit of SCF define a ubiquitin ligase module that activates the E2 enzyme Cdc34." *Genes Dev*, 13(12), 1614-26.
- Serino**, G., and Deng, X.W. (2003). The COP9 signalosome: Regulating plant development through the control of proteolysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 165–182.
- Serralbo**, O., Pérez-Pérez, J. M., Heidstra, R. and Scheres, B. (2006). Non-cell autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of HOBBIT, an *Arabidopsis* CDC27 homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 13250-13255.
- Sheldon** CC, Burn JE, Perez PP, Metzger J, Edwards JA, Peacock WJ, Dennis ES. 1999 The FLF MADS box gene: a repressor of flowering in *Arabidopsis* regulated by vernalization and methylation. *Plant Cell*, 11:445-458.
- Shuck** S.C., Short E.A. and Turchi J.J. (2008) "Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology." *Cell Res* 18; 64–72.
- Singer**, J. D., Gurian-West, M., Clurman, B., and Roberts, J. M. (1999). "Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells." *Genes Dev* 13(18): 2375-87.
- Skowyra** D, Craig KL, Tyers M, Elledge SJ, Harper JW. (1997) F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91(2):209-19.
- Skowyra**, D., Koepp, D. M., Kamura, T., Conrad, M. N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1999). "Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCFGrr1 and Rbx1." *Science*, 284(5414), 662-5.
- Smalle**, J., and Vierstra, R. D. (2004). "The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway." *Annu Rev Plant Biol*, 55, 555-90.
- Stewart-Cox** J.A., Britton N.F. and Mogie M. (2004) "Endosperm triploidy has a selective advantage during ongoing parental conflict by imprinting." *Proc Biol Sci* 271(1549): 1737-43.

- Stolpe T**, Süßlin C, Marrocco K, Nick P, Kretsch T, Kircher S. 2005 In planta analysis of protein-protein interactions related to light signaling by bimolecular fluorescence complementation. *Protoplasma* 226(3-4): 137-46.
- Strickland E**, Rubio V. and Deng X.W. (2006) “The function of the COP/DET/FUS proteins in controlling photomorphogenesis: a role for regulated proteolysis.” In: Schäfer E, Nagy F (eds) *Photomorphogenesis in plants and bacteria*, 3rd edn. Springer, New York.
- Sugasawa K.**, Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., Tanaka K., and Hanaoka F. (2005) “UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex.” *Cell* 121; 387-400.
- Sun H.**, Levenson J.D. and Hunter T. (2007) “Conserved function of RNF4 family proteins in eukaryotes: targeting a ubiquitin ligase to SUMOylated proteins.” *EMBO J* 26: 4102–4112.
- Sung, S.** et al. (2006) A PHD finger protein involved in both the vernalization and photoperiod pathways in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 20, 3244–3248
- Suzuki, G.**, Yanagawa, Y., Kwok, S.F., Matsui, M., and Deng, X.W. (2002). *Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev.* 16: 554–559.
- Takahashi N.**, Kuroda H., Kuromori T., Hirayama T., Seki M., Shinozaki K., Shimada H., and Matsui M. (2004) “Expression and interaction analysis of *Arabidopsis* Skp1-related genes.” *Plant Cell Physiol* 45(1): 83-91.
- Takeda DY**, Parvin JD, Dutta A: Degradation of Cdt1 during S phase is Skp2-independent and is required for efficient progression of mammalian cells through S phase. *J Biol Chem* 2005, 280:23416-23423.
- Tan X**, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, et al. (2007) “Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase.” *Nature* 446:640–45.
- Tan X.** and Zheng N. (2009) “Hormone signaling through protein destruction: a lesson from plants.” *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296(2): E223-7.
- Tarayre S**, Vinardell JM, Cebolla A, Kondorosi A, Kondorosi E. 2004 Two classes of the CDH1-type activators of the anaphase-promoting complex in plants: novel functional domains and distinct regulation. *Plant Cell* 16(2): 422-34.
- Tarpey P.S.**, Raymond F.L., O'Meara S., Edkins S., Teague J., Butler A., Dicks E. et al. (2007) “Mutations in CUL4B, which encodes a ubiquitin E3 ligase subunit, cause an X-linked mental retardation syndrome associated with aggressive outbursts, seizures, relative macrocephaly, central obesity, hypogonadism, pes cavus, and tremor.” *Am J Hum Genet* 80; 345–352.
- Tarpey P.S.**, Smith R., Pleasance E., Whibley A., Edkins S., Hardy C., O'Meara S., Latimer C. et al. (2009) “A systematic, large-scale resequencing screen of X-chromosome coding exons in mental retardation.” *Nat Genet* 41; 535–543.
- Thomann A**, Brukhin V, Dieterle M, Gheyeselink J, Vantard M, et al. (2005) *Arabidopsis* CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *Plant J* 43: 437–448.
- Thomann, A.**, Dieterle, M., and Genschik, P. (2005). “Plant CULLIN-based E3s: phytohormones come first.” *FEBS Lett*, 579(15), 3239-45.
- Thomann A**, Lechner E, Hansen M, Dumbliuskas E, Parmentier Y, Kieber J, Scheres B, Genschik P. (2009) “*Arabidopsis* CULLIN3 genes regulate primary root growth and patterning by ethylene-dependent and -independent mechanisms.” *PLoS Genet* 5(1):e1000328.
- Uzunova K.**, Gottsche K., Miteva M., Weisshaar S.R., Glanemann C., Schnellhardt M., Niessen M., Scheel H., Hofmann K., Johnson E.S. et al. (2007) “Ubiquitin-dependent proteolytic control of SUMO conjugates.” *J Biol Chem* 282: 34167–34175.
- Van Nocker S.** 2003 CAF-1 and MSI1-related proteins: linking nucleosome assembly with epigenetics. *Trends Plant Sci.* 8(10):471-3.
- Varshavsky A.** 1997 The N-end rule pathway of protein degradation. *Genes Cells* 2(1):13-28.

- Verma R.**, Annan R.S., Huddleston M.J., Carr S.A., Reynard G. and Deshaies R.J. (1997) "Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase." *Science* 278(5337): 455-60.
- Verma R**, Aravind L, Oania R, McDonald WH, Yates JR 3rd, Koonin EV, Deshaies RJ. (2002) Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* 298(5593): 611-5.
- Vielle-Calzada J.P.**, Thomas J., Spillane C., Coluccio A., Hoepfner M.A. and Grossniklaus U. (1999) "Maintenance of genomic imprinting at the Arabidopsis medea locus requires zygotic DDM1 activity." *Genes Dev* 13:2971–2982
- Vielle-Calzada JP**, Baskar R, Grossniklaus U. (2000) "Delayed activation of the paternal genome during seed development." *Nature* 404: 91-4.
- von Wangenheim K.H.** and Peterson H.P. (2004) "Aberrant endosperm development in interploidy crosses reveals a timer of differentiation." *Dev Biol* 270(2): 277-89.
- Wang J.**, Mager J., Chen Y., Schneider E., Cross J.C., Nagy A. and Magnuson T. (2001) "Imprinted X inactivation maintained by a mouse Polycomb group gene." *Nat Genet* 28(4): 371-5.
- Wang KL**, Yoshida H, Lurin C, Ecker JR (2004) "Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein." *Nature* 428: 945–950.
- Wang QE**, Zhu Q, Wani G, Chen J, Wani AA. (2004) UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2. *Carcinogenesis* 25:1033-1043.
- Wang D**, Tyson MD, Jackson SS, Yadegari R. (2006) Partially redundant functions of two SET-domain polycomb-group proteins in controlling initiation of seed development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(35): 13244-9.
- Wang H.**, Zhai L., Xu J., Joo H.Y., Jackson S., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Xiong Y., Zhang Y. (2006) "Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4–DDB–ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage." *Mol Cell* 22; 383-394.
- Wang S.**, Liu J., Feng Y., Niu X., Giovannoni J. and Liu Y. (2008) "Altered plastid levels and potential for improved fruit nutrient content by downregulation of the tomato DDB1-interacting protein CUL4." *Plant J* 55; 89-103.
- Wang L**, He G, Zhang P, Wang X, Jiang M, Yu L. (2010) Interplay between MDM2, MDMX, Pirh2 and COP1: the negative regulators of p53. *Mol Biol Rep*
- Waning DL**, Li B, Jia N, Naaldijk Y, Goebel WS, HogenEsch H, Chun KT. (2008) Cul4A is required for hematopoietic cell viability and its deficiency leads to apoptosis. *Blood* 15;112(2):320-9
- Weber, J.D.**, Taylor, L.J., Roussel, M.F., Sherr, C.J., and Bar-Sagi, D. (1999). Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.* 1, 20–26
- Weber H.**, Bernhardt A., Dieterle M., Hano P., Mutlu A., Estelle M., Genschik P. and Hellmann H. (2005) "Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ/MATH protein family." *Plant Physiol* 137: 83–93.
- Wei, N.**, Kwok, S.F., von Arnim, A.G., Lee, A., McNellis, T.W., Piekos, B., and Deng, X.W. (1994). Arabidopsis COP8, COP10, and COP11 genes are involved in repression of photomorphogenic development in darkness. *Plant Cell* 6: 629–643.
- Weissman A. M.** (2001) "Themes and variations on ubiquitylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3); 169-78.
- Wenzel T.** and Baumeister W. (1995) "Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome." *Nat Struct Biol* 2(3): 199-204.
- Wertz IE**, O'Rourke KM, Zhang Z, Dornan D, Arnott D, Deshaies RJ, Dixit VM (2004) Human De-etiolated-1 regulates c-Jun by assembling a CUL4A ubiquitin ligase. *Science* 303:1371–1374
- Wilkinson K.D.**, Urban M.K. and Haas A.L. (1980) "Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes." *J Biol Chem* 255: 7529-7532.
- Willems AR**, Schwab M, Tyers M. 2004 A hitchhiker's guide to the cullin ubiquitin ligases: SCF and its kin. *Biochim Biophys Acta* 1695(1-3): 133-70.

- Wilson** Z. A. and Yang C. (2004) “Plant gametogenesis: conservation and contrasts in development.” *Reproduction* 128(5): 483-92.
- Winston**, J. T., Koepp, D. M., Zhu, C., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1999). “A family of mammalian F-box proteins.” *Curr Biol*, 9(20), 1180-2.
- Wood**, C.C. et al. (2006) The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a Polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14631–14636.
- Xiao** W, Gehring M, Choi Y, Margossian L, Pu H, Harada JJ, Goldberg RB, Pennell RI, Fischer RL (2003) Imprinting of the MEA Polycomb gene is controlled by antagonism between MET1 methyltransferase and DME glycosylase. *Dev Cell*, 5:891-901.
- Xu**, G., Ma, H., Nei, M., and Kong, H. (2009). “Evolution of F-box genes in plants: different modes of sequence divergence and their relationships with functional diversification.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(3), 835-40.
- Yanagawa** Y, Sullivan J, Komatsu S, Gusmaroli G, Suzuki G, Yin J, Ishibashi T, Saijo Y, Rubio V, Kimura S, Wang J, Deng XW (2004) *Arabidopsis* COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes Dev* 18:2172–2181
- Yanagida** M. (2000) “Cell cycle mechanisms of sister chromatid separation; roles of Cut1/separin and Cut2/securin.” *Genes Cells* 5(1): 1-8.
- Yang**, X., Lee, S., So, J. H., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L., and Estelle, M. (2004). “The IAA1 protein is encoded by AXR5 and is a substrate of SCF(TIR1).” *Plant J*, 40(5), 772-82.
- Yang**, J., Lin, R., Sullivan, J., Hoecker, U., Liu, B., Xu, L., Deng, X.W. and Wang, H. (2005). Light regulates COP1-mediated degradation of HFR1, a transcription factor essential for light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17: 804–821.
- Yao** T and Cohen RE. (2002) A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* 419(6905):403-7.
- Yi** C. and Deng X.W. (2005) “COP1: From plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis.” *Trends Cell Biol* 15: 618–625.
- Yoshida** D., Kim K., Noha M. and Teramoto A. (2006) “Hypoxia inducible factor 1-alpha regulates of platelet derived growth factor-B in human glioblastoma cells.” *J Neurooncol* 76(1):13-21.
- Yoshida** H., Nagata M., Saito K., Wang K.L. and Ecker J.R. (2005) “*Arabidopsis* ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases.” *BMC Plant Biol* 5: 14.
- Zachariae** W., Shevchenko, A., Andrews, P. D., Ciosk, R., Galova, M., Stark, M. J., Mann, M., and Nasmyth, K. (1998). “Mass spectrometric analysis of the anaphase-promoting complex from yeast: identification of a subunit related to cullins.” *Science* 279(5354): 1216-9.
- Zachariae**, W., Schwab, M., Nasmyth, K., and Seufert, W. (1998). “Control of cyclin ubiquitination by CDK-regulated binding of Hct1 to the anaphase promoting complex.” *Science*, 282(5394), 1721-4.
- Zhang** Y, Feng S, Chen F, Chen H, Wang J, McCall C, Xiong Y, Deng XW. (2008) “*Arabidopsis* DDB1-CUL4 ASSOCIATED FACTOR1 forms a nuclear E3 ubiquitin ligase with DDB1 and CUL4 that is involved in multiple plant developmental processes.” *Plant Cell* 20(6):1437-55.
- Zhao**, D., Han, T., Risseeuw, E., Crosby, W. L., and Ma, H. (2003). “Conservation and divergence of ASK1 and ASK2 gene functions during male meiosis in *Arabidopsis thaliana*.” *Plant Mol Biol*, 53(1-2), 163-73.
- Zheng** N., Schulman B.A., Song L., Miller J.J., Jeffrey P.D., Wang P., Chu C., Koepp D.M., Elledge S.J., Pagano M. et al. (2002) “Structure of the Cul1-Rbx1-Skp1-F box Skp2 SCF ubiquitin ligase complex.” *Nature* 416: 703-709.
- Zhong** W., Feng H., Santiago F.E. and Kipreos E.T. (2003) “CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA replication licensing.” *Nature* 423; 885–889.

**Zou Y., Liu Q., Chen B., Zhang X., Guo C., Zhou H., Li J., Gao G., Guo Y., Yan C., Wei J., Shao C. and Gong Y. (2007) “Mutation in CUL4B, which encodes a member of cullin–RING ubiquitin ligase complex, causes X-linked mental retardation.” Am J Hum Genet 80; 561–566.**

# Annexes



# Arabidopsis *CULLIN3* Genes Regulate Primary Root Growth and Patterning by Ethylene-Dependent and -Independent Mechanisms

Alexis Thomann<sup>1</sup>\*, Esther Lechner<sup>2,3</sup>, Maureen Hansen<sup>3</sup>, Eva Dumbliauskas<sup>2</sup>, Yves Parmentier<sup>2</sup>, Joe Kieber<sup>3</sup>, Ben Scheres<sup>4</sup>, Pascal Genschik<sup>2\*</sup>

**1** ZMBP–Developmental Genetics, Universität Tübingen, Tübingen, Germany, **2** Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Propre de Recherche 2357, Conventienné avec l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, France, **3** Department of Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, United States of America, **4** Molecular Genetics, Department of Biology, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands

## Abstract

CULLIN3 (CUL3) together with BTB-domain proteins form a class of Cullin-RING ubiquitin ligases (called CRL3s) that control the rapid and selective degradation of important regulatory proteins in all eukaryotes. Here, we report that in the model plant *Arabidopsis thaliana*, *CUL3* regulates plant growth and development, not only during embryogenesis but also at post-embryonic stages. First, we show that *CUL3* modulates the emission of ethylene, a gaseous plant hormone that is an important growth regulator. A *CUL3* hypomorphic mutant accumulates ACS5, the rate-limiting enzyme in ethylene biosynthesis and as a consequence exhibits a constitutive ethylene response. Second, we provide evidence that *CUL3* regulates primary root growth by a novel ethylene-dependant pathway. In particular, we show that *CUL3* knockdown inhibits primary root growth by reducing root meristem size and cell number. This phenotype is suppressed by ethylene-insensitive or resistant mutations. Finally, we identify a function of *CUL3* in distal root patterning, by a mechanism that is independent of ethylene. Thus, our work highlights that *CUL3* is essential for the normal division and organisation of the root stem cell niche and columella root cap cells.

**Citation:** Thomann A, Lechner E, Hansen M, Dumbliauskas E, Parmentier Y, et al. (2009) Arabidopsis *CULLIN3* Genes Regulate Primary Root Growth and Patterning by Ethylene-Dependent and -Independent Mechanisms. *PLoS Genet* 5(1): e1000328. doi:10.1371/journal.pgen.1000328

**Editor:** Patrick S. Schnable, Iowa State University, United States of America

**Received:** October 6, 2008; **Accepted:** December 3, 2008; **Published:** January 9, 2009

**Copyright:** © 2009 Thomann et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** AT was supported by PhD fellowship of the French Government and subsequently by a SPINOZA award to BS. MH was supported by a grant from the National Science Foundation.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: pascal.genschik@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

† These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Regulation of protein stability through the ubiquitin proteasome system (UPS) is now considered as a major mechanism underlying many cellular and organismal processes, such as cell division, DNA repair, quality control of newly produced proteins, developmental and immune defense pathways, and in plants, light and phytohormone signal transduction [1–3]. Degradation via the UPS is a two-step process: the protein is first tagged by covalent attachment of ubiquitin and subsequently degraded by a multicatalytic protease complex called the 26S proteasome. The transfer of ubiquitin to a target protein substrate requires an ubiquitin protein-ligase (E3).

E3 enzymes act to specify the substrates and thus they play a key role in the ubiquitylation reaction. Several hundred different E3s have been identified in metazoan and plant genomes, based on specific, commonly shared structural motifs. However, the most intensively studied subclasses of E3s are those of the cullin-RING ligase (CRL) superfamily, which form multi-protein complexes [4]. CRL E3s can be viewed as two functional modules brought together by the CULLIN proteins, acting as molecular scaffolds. The first module forms the catalytic centre and is composed of a RING finger domain protein and an ubiquitin conjugating

enzyme (E2). The second module can be considered as the substrate recognition module, in which a specific protein physically interacts with the target substrate.

A series of recent reports has shed light on the molecular composition and function of the CUL3-based CRL E3s (reviewed in [5]). Certain 'Bric a brac, Tramtrack and Broad Complex/Pox virus and Zinc finger' (BTB/POZ) domain proteins function as substrate specific receptors in *Schizosaccharomyces pombe* and *Caenorhabditis elegans* [6–9]. These BTB domain proteins bind CUL3, via the BTB domain and direct substrate specificity through an independent protein-protein interaction domain. The best-documented substrate for the CUL3-BTB ligases thus far, is the nematode MEI-1 protein, which regulates the meiosis-to-mitosis transition of fertilized embryos [6,8–9]. In mammals, *CUL3* function is essential and its loss-of-function in mouse produces an arrest during early embryogenesis [10]. Recent data have also implicated vertebrate CUL3 in cell cycle regulation [11] and signal transduction pathways, such as the Wnt-beta-catenin pathway [12]. In contrast to metazoans, the function of the *CUL3* orthologs is not essential in budding and fission yeasts [7,13].

The Arabidopsis genome encodes two CUL3-related proteins, called CUL3A and CUL3B [14]. Disruption of both genes causes embryo lethality [15–17], indicating that CRL3s play important



## Author Summary

Ubiquitin-mediated proteolysis plays a central role in controlling intracellular levels of essential regulatory molecules in all eukaryotic organisms. This protein degradation pathway has a large number of components, including hundreds of ubiquitin protein ligases (E3s) that are predicted to have regulatory roles in cell homeostasis, cell cycle control, and development. Recent research revealed the molecular composition of CULLIN3 (CUL3)-based E3 ligases, which are essential enzymes in both metazoans and plants. Here, we report that in the model plant *A. thaliana*, *CUL3* modulates the emission of ethylene, a gaseous plant hormone that controls a variety of processes such as fruit ripening and stress response. In particular, we provide evidence that *CUL3* regulates root growth by a novel ethylene-dependant pathway. Thus, we showed that *CUL3* knockdown inhibits primary root growth by reducing the root meristem size. Finally, we also identified a function of *CUL3* in distal root patterning. Indeed, *CUL3* function is required for normal division and organisation of the root stem cell niche and columella root cap cells. Overall, our results show that Arabidopsis *CUL3* is essential for plant growth and development, not only during embryogenesis but also at post-embryonic stages.

functions during early steps of plant development. Moreover a genomic search revealed the existence of about 80 BTB-domain proteins in *Arabidopsis* belonging to different families depending on additional protein domains, either upstream or downstream of the BTB-domain, such as the meprin and TRAF homology (MATH) domain, the Armadillo repeats (ARM) and the tetratricopeptide repeats (TPR) [15–16,18–19]. Protein interaction studies in yeast suggested that CUL3A and CUL3B may form many different CRL3 complexes, but their nature and substrates are still poorly documented in plants.

ETO1, an *Arabidopsis* BTB-domain protein, controls the stability of ACS5, a member of the 1-aminocyclo-propane-1-carboxylic acid synthases (ACS) that catalyse a rate-limiting step in ethylene biosynthesis [20]. Moreover, ETO1 was found to directly interact with CUL3A, which prompted the authors to propose ACS5 as the first reported substrate for a plant CUL3-based E3. However ETO1 is also able to inhibit ACS5 activity without CUL3, indicating a higher complexity in this regulation [20]. Supporting a function of CRL3 in ethylene biosynthesis is the fact that cycles of (de)neddylation seem to play an important role in this process, because *Arabidopsis* RNAi lines in which the expression of two NEDD8-related proteins, RUB1 and RUB2, are reduced exhibit a triple response and overproduce ethylene [21].

To better characterize the function of CRL3 E3s in *Arabidopsis*, we identified a hypomorphic mutation in *CUL3A*, which, when combined with the *cul3b* null mutation strongly impairs overall CRL3 functions. Here we report a molecular and genetic characterization of this line, with a focus on ethylene biosynthesis and primary root growth.

## Results

### Generation of a Hypomorphic Mutant Reveals Different *CUL3* Functions during *Arabidopsis* Development

Previously it was shown that the combined disruption of both *Arabidopsis* *CUL3A* and *CUL3B* genes causes embryo lethality [15–17]. To further investigate the function of *CUL3* in plants, we searched for additional *Arabidopsis* T-DNA insertion lines. One

line was of particular interest as the T-DNA was inserted at the very end of the *CUL3A* coding sequence. This mutant allele, called *cul3a-3* was further characterised. The T-DNA insertion creates a mutation, in which the last two amino acids of the protein are replaced by an eight-residue peptide (Figure 1A). The *cul3a-3* mutant line produces a lower abundant truncated transcript (Figure 1B). Interestingly, the CUL3A protein detected by a specific anti-peptide antibody [18] was not only less abundant, but was also hyper-rubylated (Figure 1C), suggesting that the truncated CUL3A protein is less prone to de-rubylation. It is noteworthy that cycles of rubylation/de-rubylation are important for CRL3 activity (reviewed in [22]).

Homozygous *cul3a-3* mutant plants are fertile and do not show morphological defects under normal growth conditions. As *CUL3A* and *CUL3B* genes are functionally redundant, we generated a double mutant using the previously characterized *cul3b-1* knockout line [17]. The double homozygous *cul3a-3 cul3b-1* mutant, hereafter called *cul3* hypomorph (*cul3<sup>hyp</sup>*), was viable, but exhibited several developmental defects. Approximately 10% of homozygous *cul3<sup>hyp</sup>* seedlings displayed altered cotyledon phenotypes (Table 1). Some seedlings exhibited a single cotyledon while others, at a lower frequency, had three cotyledons (Figure 1D); seedlings with partially or totally fused cotyledons were also observed (not shown). In addition, the vascular patterning of cotyledons was often abnormal (Figure 1E). In particular, we observed interrupted and freely ending veins. In less than 1% of these seedlings we observed other abnormalities, such as root-less seedlings (not shown). The absence of root meristem was previously revealed in some of the *Arabidopsis* *cul3a-1 cul3b-1* double null mutants that could complete their embryonic development [17].

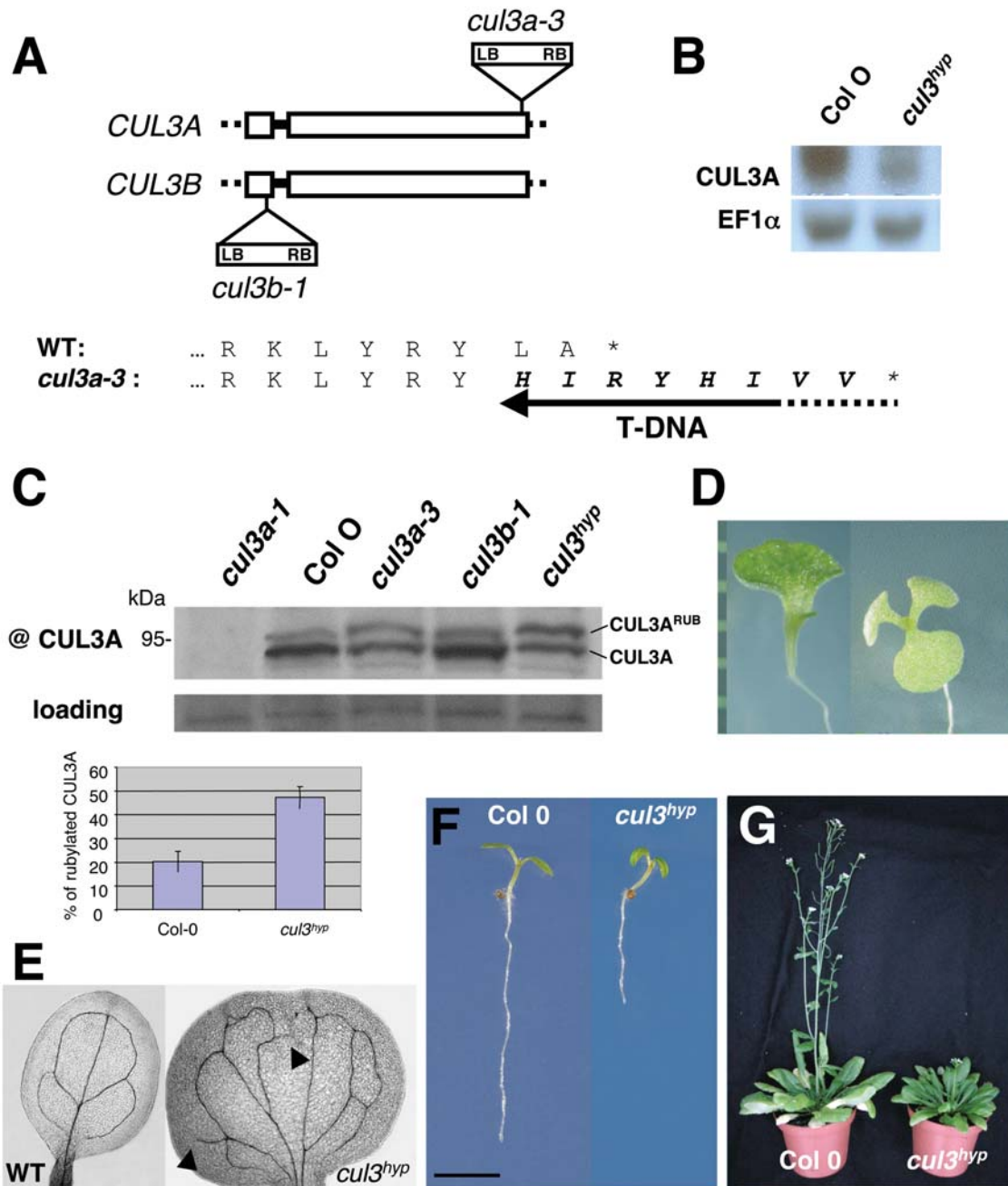
The subset of *cul3<sup>hyp</sup>* seedlings that had normal organ patterning displayed epinastically curled cotyledons and shorter roots when grown in the light (Figure 1F). At a latter stage of development, the most striking phenotype was a reduced rosette size and a delay in flowering (Figure 1G). Consistently, a slight delay in flowering was observed in single *cul3a-1* loss-of-function mutant [18].

Overall, our data indicate that *Arabidopsis* *CUL3A* and *CUL3B* are important for plant growth and development, both during embryogenesis and at post-embryonic stages.

### The *cul3<sup>hyp</sup>* Double Mutant Displays a Triple Response in the Absence of Ethylene

Because ETO1 is involved in the ethylene biosynthetic pathway and physically interacts with *Arabidopsis* CUL3A [20], most likely through its BTB domain, we investigated whether the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant is affected in ethylene-mediated processes. In accordance with this speculation, etiolated *cul3<sup>hyp</sup>* mutants displayed a typical triple response in the absence of ethylene, which is characterized by short hypocotyls, short roots, and exaggerated apical hooks (Figure 2). The phenotype was similar to that of *eto1-1*, though less severe than the *constitutive triple response1 (ctr1-1)* mutant. It is noteworthy that the single *cul3a-3* mutant displayed a weak triple response. Moreover, when germinated in the presence 5  $\mu$ M ACC, the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant was still responsive to ethylene in a root elongation assay (Figure S1).

To better characterize whether the *CUL3A* and *CUL3B* genes are involved in the control of ethylene biosynthesis or might also play functions further downstream in the signalling cascade, we first used a pharmacological approach. We found that treatment with 2  $\mu$ M aminoethoxyvinyl glycine (AVG), which inhibits ACC synthase and hence ethylene biosynthesis [23], significantly reversed the *cul3<sup>hyp</sup>* triple response (Figure S1). However, AVG has toxic effects and it inhibited root elongation of wild-type plants even at low concentrations (not shown).



**Figure 1. The *cul3<sup>hyp</sup>* displays multiple developmental abnormalities.** A. Schematic representation of T-DNA insertions in both *CUL3A* and *CUL3B* genes. LB and RB indicate the orientation of the left and right T-DNA borders, respectively. Exons (open boxes), introns (single lines) and 5' and 3' UTRs (dots) are indicated. Below, C-terminal protein sequence of *CUL3A* aligned with the *cul3a-3* mutant protein. The extra eight-residue peptide is indicated in bold. B. *CUL3A* transcript level in wild type and mutant plant. RNA was extracted from 3-week-old plants. C. *CUL3A* protein detected by a *CUL3A*-specific anti-peptide antibody. Proteins were extracted from 3-week-old wild-type and mutant plants as indicated. Rubylated and unrubylated *CUL3A* proteins are indicated. The panel below shows the percentage of rubylated *CUL3A* protein in wild type and *cul3<sup>hyp</sup>*. Data are means of 3 different western blots  $\pm$ SE. D. 10-day old *cul3<sup>hyp</sup>* mutant seedlings showing cotyledon phenotype. E. Venation defects of *cul3<sup>hyp</sup>* cotyledon. F. 4-day-old light grown wild type and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant seedlings. G. 58-day-old wild type and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant plants under short days conditions. doi:10.1371/journal.pgen.1000328.g001

Thus, we undertook a genetic approach and generated triple mutant combinations with ethylene-insensitive or resistant mutants in the ethylene-signalling cascade. In all triple mutants, *etr1-1 cul3<sup>hyp</sup>*, *ein2-1 cul3<sup>hyp</sup>* and *ein3-1 cul3<sup>hyp</sup>*, the triple response observed in the *cul3<sup>hyp</sup>* hypomorph was significantly, but not entirely suppressed (Figure 2). We conclude that the triple response phenotype of *cul3<sup>hyp</sup>*

can be mostly explained by a function of *CUL3A* and *CUL3B* upstream of ethylene perception. However, the fact that both hypocotyl and root length were slightly reduced in all three triple mutants compared to their corresponding single ethylene insensitive or resistant mutants indicates that Arabidopsis *CUL3* genes act also at other levels, which are ethylene independent.

**Table 1.** Scoring of the cotyledon phenotype observed with *cul3<sup>hyp</sup>* seedlings.

Alles	Dicotyledons	Monocotyledon	Tricotyledons	Fused cotyledons	Seedlings scored
Wild type	1010	0	0	0	1010
<i>cul3<sup>hyp</sup></i>	2637 (89.25%)	225 (7.61%)	64 (2.16%)	29 (0.98%)	2955

doi:10.1371/journal.pgen.1000328.t001

### Ethylene Production of *cul3<sup>hyp</sup>* Is Significantly Enhanced by the *eto1-1* and *etr1-1* Mutations

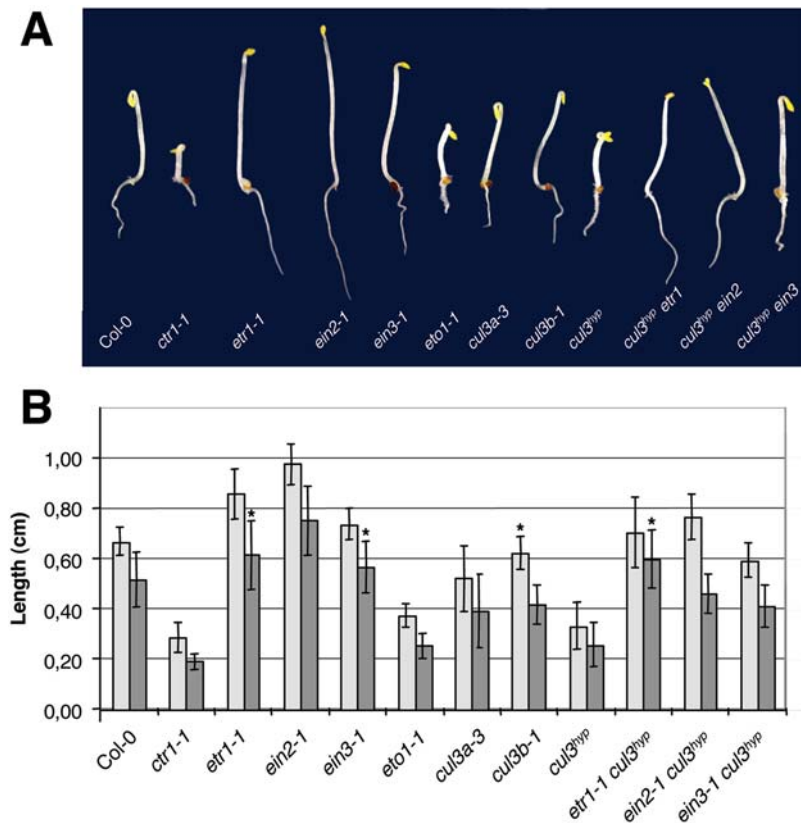
We generated an *eto1-1 cul3<sup>hyp</sup>* triple mutant and found only a slight additive effect on the triple response regarding root growth (Figure S1). These data indicate that the triple response observed in *cul3<sup>hyp</sup>* is mainly attributed to a defect in the CUL3<sup>ETO1</sup> E3 ligase, but does not exclude the possibility that the two ETO1-related proteins, EOL1 and/or EOL2 [20] may also play some minor roles in this process.

As a next step, we measured ethylene emission between day 3 and day 4 in the etiolated mutant seedlings. Consistently, the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant accumulated two to three-fold more ethylene gas than did the wild type control (Figure 3A), but significantly less than *eto1* seedlings. To further confirm that the triple response observed in the etiolated seedlings is the consequence of CUL3A/B knockdown, we transformed the *cul3<sup>hyp</sup>* double mutant with a binary vector spanning a CUL3A genomic fragment [18]. Several

transformants were recovered, which suppressed the triple response (not shown) as well as ethylene overproduction (Figure 3A).

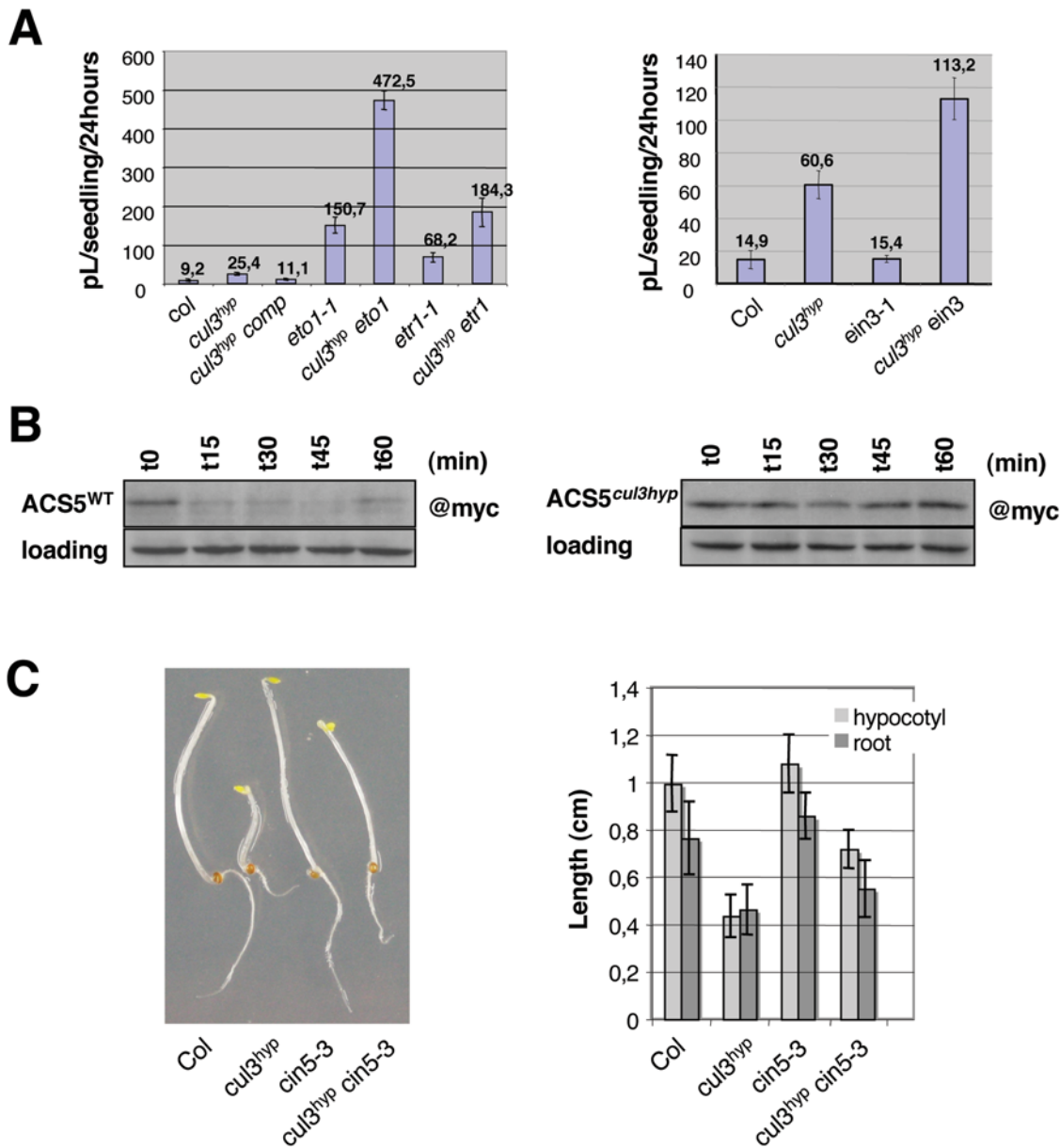
Because the triple response of the *eto1-1 cul3<sup>hyp</sup>* triple mutant was slightly more severe than in the *eto1-1* single mutant (Figure S1), we measured ethylene production in the triple *eto1-1 cul3<sup>hyp</sup>* mutant (Figure 3A). There was an increase of about 3-fold in ethylene production as compared to the *eto1-1* parent, suggesting that CUL3A/B controls ethylene production by both ETO1-dependent and independent mechanisms.

There was also an increase of about 3-fold in ethylene production in the *etr1-1 cul3<sup>hyp</sup>* mutant compared to *etr1-1* (Figure 3A). Likewise, ethylene production was increased in the *ein3-1 cul3<sup>hyp</sup>* triple mutant compared to the *cul3<sup>hyp</sup>* parent, despite the fact that *ein3-1* does not overproduce ethylene. This data indicates that CUL3A/B acts additively with the autoinhibition control of ethylene biosynthesis.



**Figure 2. The *cul3<sup>hyp</sup>* mutant exhibits the triple response in the dark.** A. Phenotypes of 3-day-old etiolated seedlings of the indicated genotypes grown without ACC. B. Hypocotyl (light grey) and root (dark grey) length measurements of 3-day-old etiolated seedlings of the indicated genotypes grown without ACC. Values are average lengths (means  $\pm$  SD) of >30 hypocotyls or roots. T-tests were performed for each value compared to WT (the triple mutants were compared to their corresponding ethylene-insensitive mutants) indicating significant differences ( $p < 0.05$ ). The (\*) symbol highlights values for which  $p > 0.05$ .

doi:10.1371/journal.pgen.1000328.g002



**Figure 3. Ethylene production and ACS5 turnover in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant.** A. Ethylene emission from combinatorial mutants of the indicated genotypes. Etiolated seedlings were grown in sealed vials and the amount of ethylene released was quantified by gas chromatography (pL, pico Liter). Each bar represents the average ( $\pm$ SE) of three separate vials with each vial measured in triplicate. B. The half-life of myc-ACS5 is increased in *cul3<sup>hyp</sup>* mutant seedlings. Wild type (left panel) or *cul3<sup>hyp</sup>* mutant (right panel) seedlings harbouring the myc-ACS5 transgene were grown for 4 days on MS medium containing either 1 nM DEX (wild type) or 10 nM DEX (*cul3<sup>hyp</sup>*) in the dark. The seedlings were washed in liquid MS medium lacking DEX and then suspended in liquid MS medium lacking DEX but containing the protein synthesis inhibitor cycloheximide at time 0. At various times (indicated in minutes above each lane), the seedlings were harvested, and protein extracts were analyzed by immunoblotting using an anti-myc monoclonal antibody. C. Phenotypes of 3-day-old etiolated seedlings of the indicated genotypes grown without ACC (left panel). Hypocotyl (light gray) and root (dark gray) length measurements of 3-day-old etiolated seedlings of the indicated genotypes grown without ACC (right panel). Values are average lengths (means $\pm$ SD) of >30 hypocotyls or roots. For all mutants (except *cin5-3*)  $p < 0.05$  compared to wild type plants. doi:10.1371/journal.pgen.1000328.g003

### ACS5 Is a Target of CUL3 in Arabidopsis

ETO1 directly interacts with ACS5 to inhibit its activity, but also mediates ACS5 26S proteasome-dependent degradation, most likely via CUL3A/B [20]. Moreover, the *cin5-3* mutation, which disrupts the *ACS5* gene [24], significantly reduces ethylene production in *eto1-1* and partially suppresses its constitutive triple response [25]. Thus, we speculated that the constitutive triple response observed in *CUL3A/B* knockdown was mainly the consequence of ACS5 protein stabilisation. To address this issue,

we first introgressed a transgenic line expressing a Dex-inducible myc-tagged ACS5 [25] into the *cul3<sup>hyp</sup>* double mutant background. Due to partial silencing of the *ACS5* reporter construct in the *cul3<sup>hyp</sup>* hypomorph, we could not compare directly the myc-ACS5 protein accumulation in *cul3<sup>hyp</sup>* and wild-type backgrounds at identical concentrations of dexamethasone (Dex). However, by increasing Dex levels, we could normalize the expression of myc-ACS5 in *cul3<sup>hyp</sup>* and compare myc-tagged ACS5 protein half-lives in both genetic backgrounds (Figure 3B). After Dex-induction and

subsequent removal, seedlings were incubated in presence of cycloheximide, which blocks *de novo* protein synthesis, and the myc-tagged ACS5 protein levels were then determined by immunoblot analysis. Whereas ACS5 protein in the wild type background had a very short half-life of  $\pm 15$  min as previously reported [25], there was no decrease in the level of ACS5 protein after 1 hour. Thus, Arabidopsis CUL3A and CUL3B are involved in the turnover of the ACS5 isoform. Furthermore, we produced the *cin5-3 cul3<sup>hyp</sup>* triple mutant and found that *cin5-3* suppresses partially the triple response of *cul3<sup>hyp</sup>* (Figure 3C). Overall, we conclude that ACS5 is a primary target of CUL3A/B and ETO1 in seedlings, but other ACSs, in particular of the type-2 class, are most likely also degraded by this E3 ligase.

### CUL3A and CUL3B Regulate Primary Root Growth by a Mechanism Different from ETO1

The *cul3<sup>hyp</sup>* mutant exhibits a shorter root (Figure 1F) and *CUL3A/B* genes are essential during embryogenesis for proper patterning of the hypophyseal lineage, important founders of the future root meristem [17]. Furthermore, the role of ethylene on primary root growth was recently emphasized by several reports [26–29]. To characterize the function of CUL3A/B during root development, the work focused on primary root growth.

At 11 days post-germination, the elongation of *cul3<sup>hyp</sup>* primary root showed a reduction of about 80% as compared to wild type (Figure 4A and Figure S2). The root growth defect was similar to *ctr1*, *ein2-1* and *ein3-1* (not shown) significantly suppressed this phenotype, but these mutations were unable to restore wild type root growth. Thus, *CUL3A* and *CUL3B* regulate primary root growth via both ethylene-dependent and independent mechanisms.

To better characterise this phenotype, we measured the length of cells in the cortex in the differentiation zone, because it was found that ethylene stimulates auxin biosynthesis and its basipetal transport to the root elongation zone, where auxin inhibits cell elongation [27,29]. Consistent with such a scenario, we observed a 50% reduction in length of these cells in *eto1-1* (Figure 4B). However to our surprise, cortical cell length in the differentiation zone was only marginally affected in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant. This suggests that the mechanism by which ethylene inhibits root growth in a *CUL3*-deficient mutant background is different from that reported for *eto1* mutants and ACC-treated wild-type plants [27,29].

Root growth depends on cell elongation and on cell production rates in the root apical meristem. Therefore we investigated whether *CUL3A/B* knockdown affects the meristem size and/or activity. Strikingly, we observed that in *cul3<sup>hyp</sup>* the meristem size and cell number was reduced compared to wild-type plants (Figure 4C–D). Interestingly, in the *ctr1-1* mutant, there was also a significant reduction in both meristem size and cell number. Conversely, in *eto1-1*, the root meristem size and cell number were even slightly increased in comparison to wild-type plants, suggesting that ethylene overproduction in this mutant can have opposite effects in the root, negatively affecting cell expansion in the elongation zone but positively affecting root meristem size.

Importantly, the meristem phenotype of *cul3<sup>hyp</sup>* was suppressed by the *ein2-1* and *ein3-1* mutations and therefore is dependent on ethylene signalling. We investigated whether this phenotype in *cul3<sup>hyp</sup>* was the consequence of reduced cell cycle activity. To this end we introduced the p<sub>CYC<sub>B1</sub>1</sub>::GUS reporter construct [30] into *cul3<sup>hyp</sup>* mutant background. The Destruction box of plant B-type mitotic cyclins targets proteins for degradation after mitosis [31] and thus the p<sub>CYC<sub>B1</sub>1</sub>::GUS reporter is a suitable marker to identify cells in G2-to-early M phase. The number of CycB;1:GUS expressing cells was not significantly reduced in the root apical meristem of *cul3<sup>hyp</sup>* compared to wild-type plants (Figure 4E). Thus, the most likely

explanation of the ethylene-dependent inhibition of root growth is that cells in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant prematurely exit the meristem and make the transition to cell expansion.

### The *cul3<sup>hyp</sup>* Mutation Affects Distal Root Patterning in an Ethylene-Independent Manner

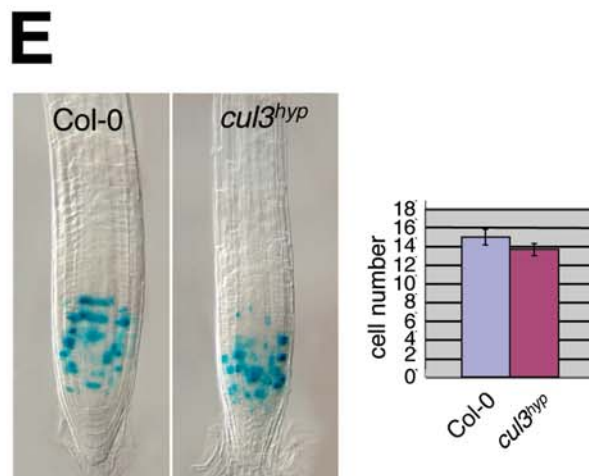
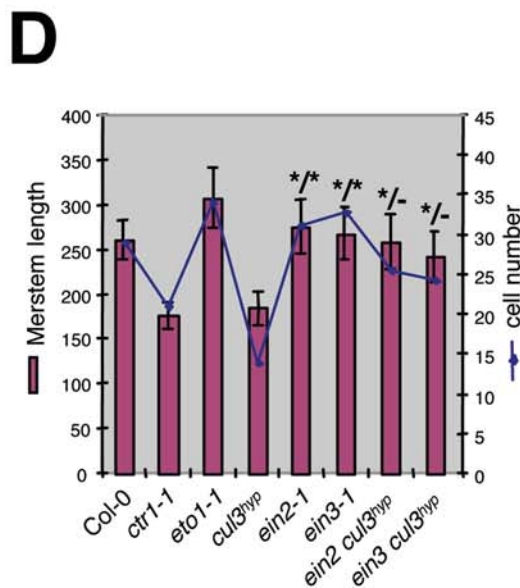
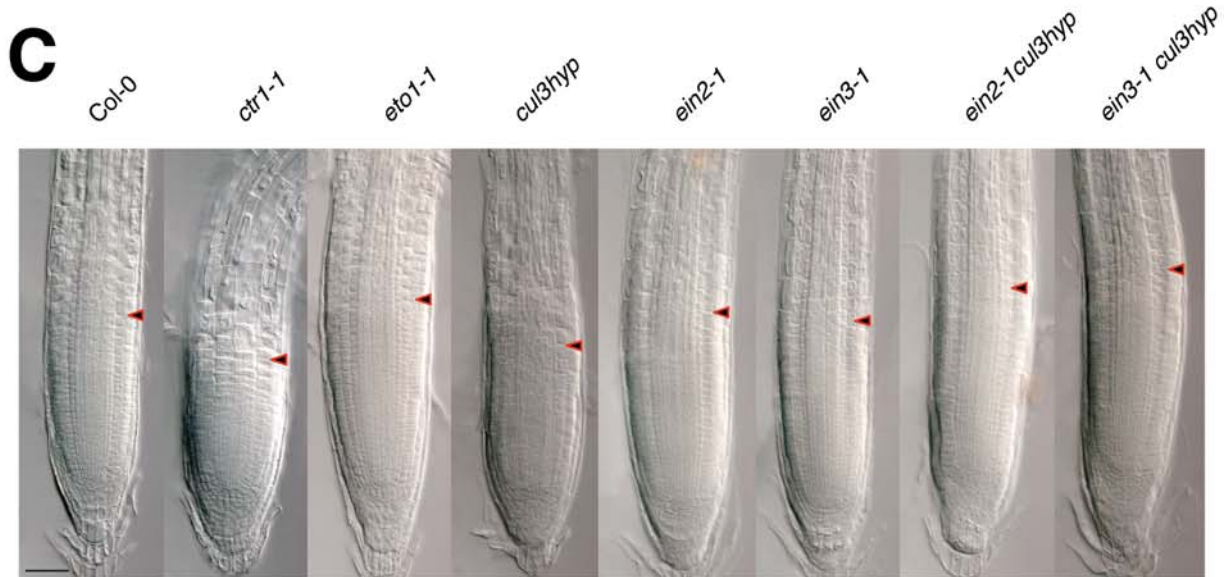
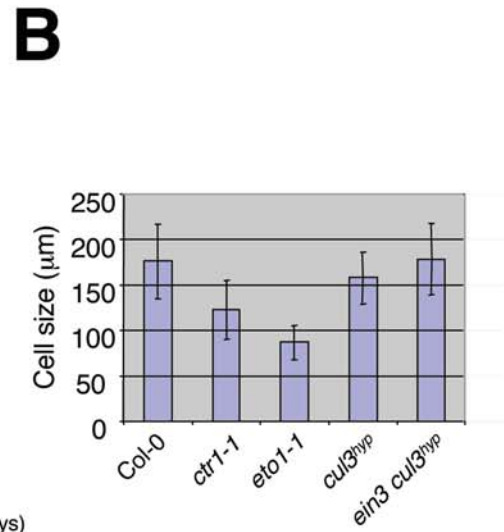
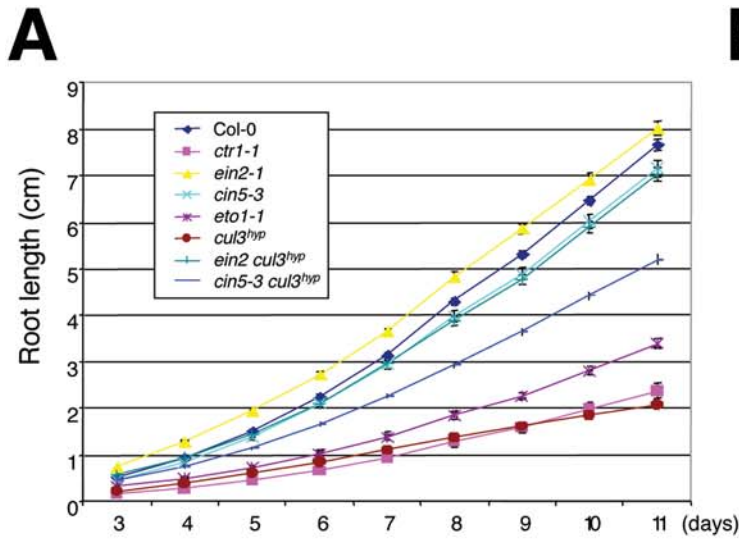
To get more insights into the mechanism(s) by which *CUL3A/B* regulate root growth, we determined the expression pattern of both genes in Arabidopsis roots by using promoter-GUS fusions. After short GUS staining, we observed the strongest histochemical p<sub>CUL3A</sub>::GUS localization in the stele, but also in the distal part of the root (Figure 5A). A similar expression pattern was also observed for the p<sub>CUL3B</sub>::GUS reporter, although the signal was weaker in the stele. In the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant, this region revealed clear defects of cell division patterns in the quiescent center (QC), other cells of the root stem cell niche and the columella root cap (Figure 5B–E). Starch granule staining, which marks only differentiated columella cells, showed premature differentiation of the columella root cap initials (Figure 5B). To investigate whether this defect in root meristem patterning is associated with mis-specification of the QC or columella cells, we examined the expression of different markers in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant background. In *cul3<sup>hyp</sup>* plants expressing QC-specific marker QC46 (Figure 5B) or endodermis and QC marker p<sub>SCR</sub>::H2BYFP (Figure 5C), we could identify signal in cells of the QC region, even when their morphology or cell number was altered. However, when we used columella-specific markers (Figure 5D–E) and in particular Q1630, which is only expressed in layers C1 and C2 in wild type (n = 21), we observed a different pattern in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant plants. The marker was in general expressed in additional columella cell layers (50%, n = 32) or showed a patchy distribution (22%, n = 32).

It was recently reported that ethylene modulates cell division in the QC, which can eventually lead to additional columella cell layers [26]. Therefore we investigated whether the phenotype observed in *cul3<sup>hyp</sup>* is dependent on ethylene signalling. However, this was not the case as defects of cell division in the QC and columella remained in the *ein3-1 cul3<sup>hyp</sup>* triple mutant (Figure 5B). Moreover, contrarily to the report of Ortega-Martinez et al. [26], we did not observe deregulated QC cell divisions in the *eto1-1* mutant. Thus, we conclude that the knockdown of *CUL3A/B* function in Arabidopsis disturbs distal root patterning by a mechanism that is ethylene independent.

### PIN7 Protein Accumulates in *cul3<sup>hyp</sup>* Columella Cells by a Post-Transcriptional Mechanism

Auxin is involved in distal pattern formation of Arabidopsis roots [32]. To investigate whether auxin signalling is affected in *cul3<sup>hyp</sup>*, we introduced the DR5rev-GFP reporter construct into the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant and monitored GFP expression in the root tip (Figure 6A). The spatial distribution of DR5 expression in the mutant was more narrow and also reduced in intensity in comparison to wild type roots (Figure 6A), indicating that auxin signalling is reduced in the distal part of *cul3<sup>hyp</sup>* roots.

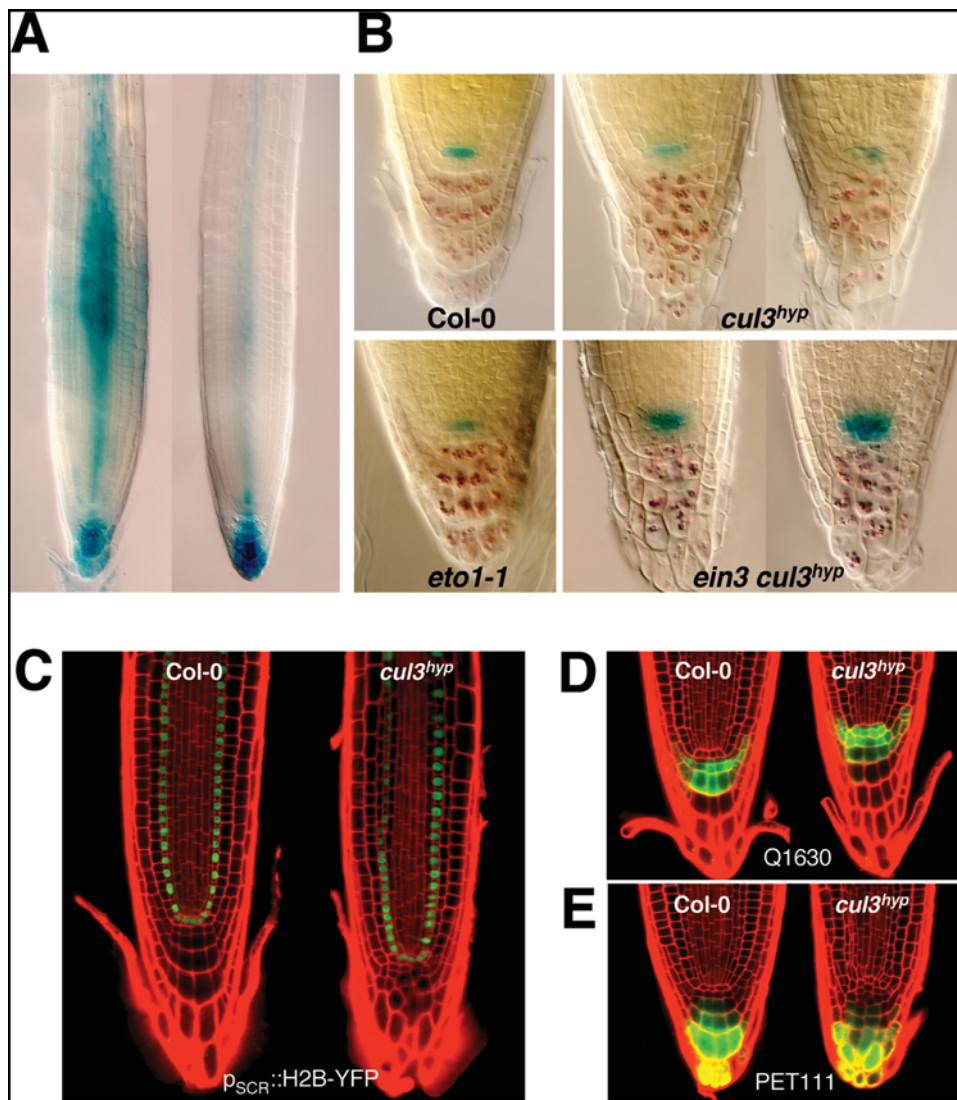
PIN-FORMED (PIN) proteins are rate-limiting factors catalysing polar auxin transport [33–34]. These proteins are crucial for auxin distribution and as such provide positional information to coordinate plant development. Because auxin signalling was reduced in the *cul3<sup>hyp</sup>* distal part of the root, one possibility is that the auxin gradient is disturbed in this mutant. Thus, we introduced into the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant background different *PIN::PIN-GFP* reporters, consisting of their endogenous promoters and translational fusions between PIN1, PIN2 and PIN7 proteins and



**Figure 4. The *cul3<sup>hyp</sup>* mutant affects primary root meristem size and cell number.** A. Kinetic analysis of primary root elongation of wild type compared to the indicated genotypes. Values are average lengths of >16 roots. B. Cortical cell lengths in the differentiation zone of 7-day-old wild type and mutant roots. Values are average lengths (means±SD) of more than 60 cells measured in 5 different roots. C. Representative wild type and mutant root tips. Arrows indicate the transition zone where cells leave the meristem and enter the differentiation zone. D. Root-meristem size indicated in  $\mu\text{m}$  and cell number of wild-type plants compare to the indicated genotypes. Cortex meristematic cells showing no sign of differentiation were counted. Values are average lengths or numbers (means±SD) of >12 roots at 7 dpv. T-tests were performed for each value compared to WT (the triple mutants were compared to their corresponding ethylene-insensitive mutants) indicating significant differences ( $p < 0.05$ ). The (\*) symbol highlights values (meristem size/cell number) for which  $p > 0.05$ . E. Mitotic activity in wild type and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant root meristems, which is monitored by the proCYCB1;1-GUS reporter. Values in the right panel are average numbers of stained cells (means±SE) of more than 18 roots. doi:10.1371/journal.pgen.1000328.g004

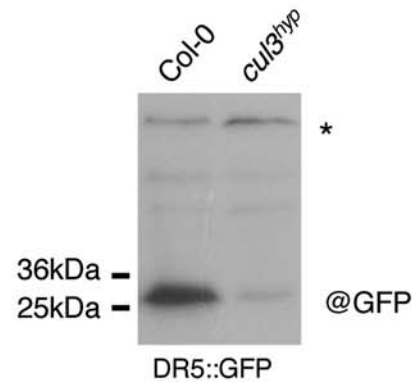
GFP. Whereas PIN1 and PIN2 expression patterns and levels were similar to wild type in *cul3<sup>hyp</sup>* (Figure 6B–C), we observed a higher expression level of PIN7 in columella cells (Figure 6D). The ratio of the GFP signal between the stele and the columella tissues was four-to-five times higher in *cul3<sup>hyp</sup>* roots in comparison to wild type (Figure 6E). *PLN* gene expression is regulated at the transcriptional, but also post-transcriptional levels [35]. Thus we performed

quantitative RT-PCR assays on *PLN7* gene expression on isolated wild type and *cul3<sup>hyp</sup>* root tips. In contrast to the PIN7 protein accumulation in columella cells, the PIN7 transcript level in *cul3<sup>hyp</sup>* was slightly reduced in comparison to wild type (Figure 7F). Our data indicate that *CUL3A/B* knockdown induces in the highest CUL3 expression domain PIN7 accumulation, most likely by a post-transcriptional mechanism.

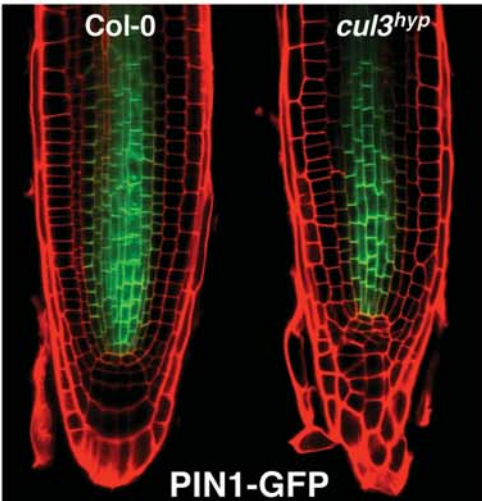


**Figure 5. The *cul3<sup>hyp</sup>* mutant shows defects in QC and columella cells organisation.** A. Expression patterns of  $p_{\text{CUL3A}}::\text{GUS}$  and  $p_{\text{CUL3B}}::\text{GUS}$  in primary roots. B. Double labelling of QC and columella cells in wild type and different mutants. The QC46 marker was used to visualize GUS staining (in blue) in the functional QC. Lugol staining was used to visualize the differentiated columella cells. C. Expression of the endodermis and QC marker  $p_{\text{SCR}}::\text{H2B-YFP}$  in wild type (left) and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant (right) roots. D. and E. Columella-specific enhancer trap Q1630 and PET111 in wild type (left) and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant (right) roots. Q1630 is only expressed in columella layers C1 and C2. doi:10.1371/journal.pgen.1000328.g005

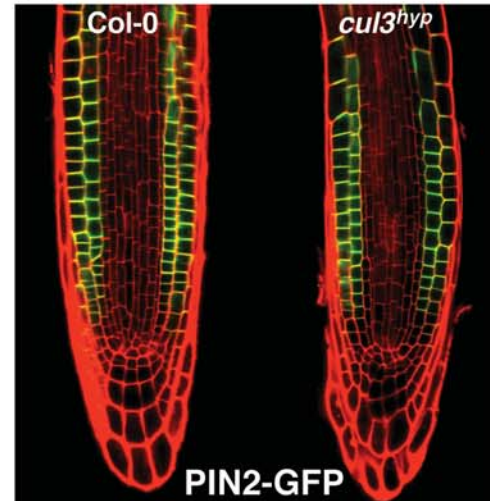
**A**



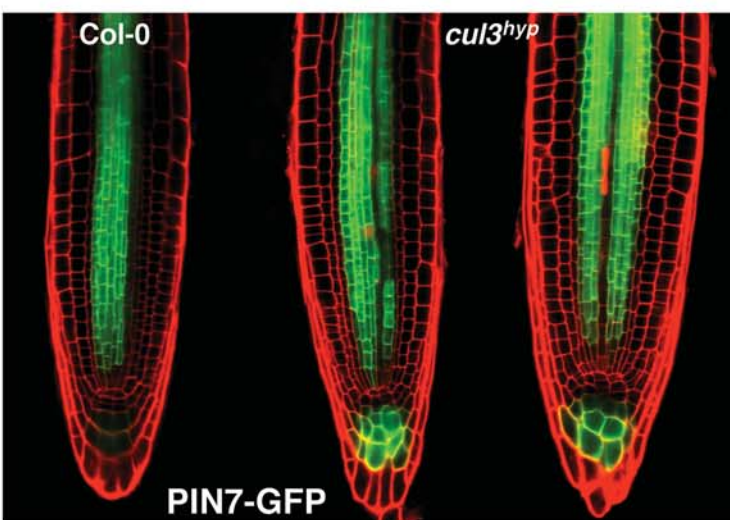
**B**



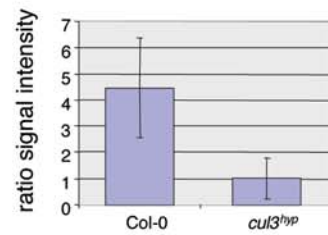
**C**



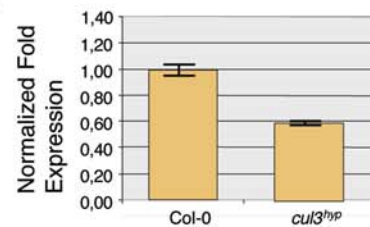
**D**



**E**



**F**





**Figure 6. The *cul3<sup>hyp</sup>* mutant accumulates PIN7 in the root cap.** A. On the left panel, expression of the auxin-sensitive reporter DR5rev-GFP in wild type (left) and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant (middle and right) roots. On the right panel, immuno-detection of GFP protein from wild-type and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant root tips expressing the auxin-sensitive reporter DR5rev-GFP. The asterisk indicates an aspecific protein band used as loading control. B. PIN1 expression and polarity monitored by the *p<sub>PIN1</sub>::PIN1*-GFP reporter in wild type (left) and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant (right) roots. C. PIN2 expression and polarity monitored by the *p<sub>PIN2</sub>::PIN2*-GFP reporter in wild type (left) and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant (right) roots. D. PIN7 expression and polarity monitored by the *p<sub>PIN7</sub>::PIN7*-GFP reporter in wild type (left) and *cul3<sup>hyp</sup>* mutant (middle and right) roots. E. Ratio of the GFP signal between the stele and the columella tissues. F. Relative levels of *PIN7* transcripts (determined by real-time RT-PCR) in 10 day-old root tips (1 cm of the root starting from the root tip) in *cul3<sup>hyp</sup>* and Col control plants. Data are means ± SE. doi:10.1371/journal.pgen.1000328.g006

**Discussion**

**The *cul3<sup>hyp</sup>* Mutant Controls Ethylene Production**

ACSs are rate-limiting enzymes in ethylene biosynthesis (reviewed in [36]). Arabidopsis has nine ACSs, which are subdivided into three different types [37]. ETO1, a BTB domain-containing protein interacts with type-2 ACS proteins and mediates the degradation of at least one of them, ACS5 [20]. Because ETO1 also interacts in a yeast two-hybrid assay with Arabidopsis CUL3A, it was concluded that ACS5 becomes

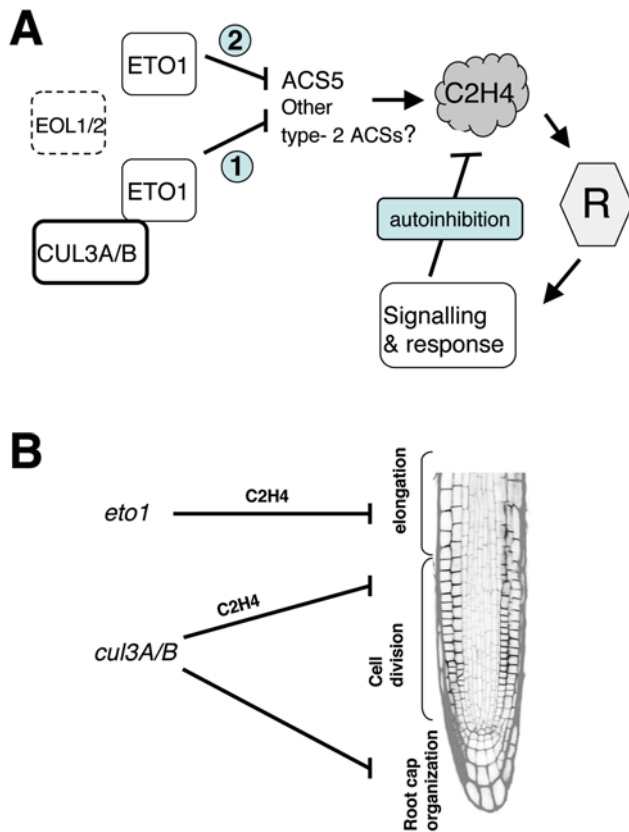
ubiquitulated by a CUL3<sup>ETO1</sup> E3 ligase and subsequently degraded by the 26S proteasome [20,37].

Our data indicate that ethylene production is induced in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant, which is consistent with such a scenario. In addition, we found that the half-life of ACS5 is prolonged in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant providing a molecular evidence for the involvement of CUL3A/B in the turnover of ACS5. However it is noteworthy that *cul3<sup>hyp</sup>* is a weak ethylene overproducer in comparison to *eto1-1*, *cul3<sup>hyp</sup>* produces about six-fold less ethylene than does *eto1-1*. Thus, it is possible that this difference in ethylene production is the consequence of a longer ACS5 half-life in *eto1-1* in comparison to *cul3<sup>hyp</sup>* mutant. This is also consistent with the fact that *cul3<sup>hyp</sup>* still keeps some CRL3 activity, whereas *eto1-1* is a null allele. However, we also cannot rule out that ETO1, which is still present in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant background, inhibits ACS5 protein activity by a process independent of protein degradation. Moreover, BTB-containing proteins themselves are also substrates for these CUL3 complexes [8,38], which may even lead to a higher ETO1 protein accumulation in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant. This data would be consistent with the finding that ETO1 overexpression in Arabidopsis reduces kinetin-induced ethylene production and most importantly that ETO1 inhibits ACS5 activity via a direct interaction [20].

Arabidopsis ETO1 is part of a small gene subfamily containing two other closely related BTB-domain proteins, called EOL1 and EOL2 [20]. Genetic interactions showed only minor additive effects on the triple response morphology in *eto1-1 cul3<sup>hyp</sup>* triple mutant compared to *eto1-1*, but a strong increase in ethylene production was observed. This suggests that EOL1 and EOL2 are also involved in ethylene biosynthesis, though ETO1 is the main CUL3 receptor in this process. Although it was previously shown that the single *eol1* and *eol2* mutants grow like wild type in the dark [16], recent data demonstrated that both EOL1 and EOL2 negatively regulate ethylene biosynthesis by directing type-2 ACS proteins for degradation [39].

Is ACS5 the only ACS target of CUL3A/B in Arabidopsis? Based on our data we can say that ACS5 is a primary target, because ACS5 loss-of-function in *cin5-3* significantly suppressed the triple response during early seedling development (Figure 3C) and the root growth inhibition (Figure 4A) of *cul3<sup>hyp</sup>*. Nevertheless, *cin5-3* does not entirely revert the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant; thus, it is likely that other ACSs are also targeted by CUL3A/B<sup>ETO1</sup> (Figure 7A). As for ETO1, EOL1 and EOL2 only interact with type-2 ACSs [37,39], whereas type-1 and type-3 ACSs, which are also degraded by the 26S proteasome [40–41], are most likely recognized by another Arabidopsis E3 ligase.

It was previously found that ethylene-insensitive or resistant mutants, such as *etr1-1*, *ein2-1* and *ein4-1* produce increased amounts of ethylene [42–44], whereas *ctr1-1* does not [45]. This suggested a negative feedback mechanism from ethylene perception and signal transduction to ethylene biosynthesis [43]. The finding that the *cul3<sup>hyp</sup>* mutation synergistically enhances ethylene production in *etr1-1* indicates that CUL3A/B and ETR1 act in parallel and most likely independently in the regulation of ethylene biosynthesis (Figure 7A). This is consistent with previous studies showing that ETO1 also acts synergistically with *etr1* to enhance ethylene production [46].



**Figure 7. Models for CUL3A/B action in ethylene biosynthesis and root growth.** A. Proposed model based on our genetic interactions to explain the role of CUL3A and CUL3B in ethylene biosynthesis. ETO1-dependent and independent effects on ethylene emission have been observed. (1) CUL3A/B<sup>ETO1</sup> controls ACS5 and most likely other type-2 ACSs protein stability. (2) ETO1 inhibits ACSs also independently of CUL3A/B [20]. The negative feedback mechanism from ethylene perception and signal transduction to ethylene biosynthesis is also shown. B. We propose a model in which the ethylene pathway acts at two different levels to inhibit primary root growth. The first mode of action triggered by ethylene is an inhibition of cell elongation as earlier reported [27,29]. This mechanism most likely involves ETO1 and can be mimicked by exogenous application of ethylene. The second mechanism affects cell differentiation at the exit of the meristem and involves CUL3A/B. doi:10.1371/journal.pgen.1000328.g007

## Ethylene Inhibits Primary Root Growth by Two Different Mechanisms

Arabidopsis primary root growth is reduced in a concentration-dependent manner when plants are exposed to ACC or to exogenously applied ethylene and this process is the consequence of down regulation of cell elongation ([47] and references therein). Recent results demonstrated that ACC treatment of wild-type plants positively regulates auxin biosynthesis and distribution in Arabidopsis roots [27–29]. Based on different approaches, a model was proposed in which ethylene-stimulated auxin is subsequently basipetally transported to the elongation zone where it inhibits cell elongation [27,29].

In the present report we provide evidence that the ethylene pathway also acts on root development at a different level (Figure 7B). We show that the inhibition of *CUL3A/B* activity impairs primary root growth in an ethylene-dependent manner by reduction of root meristem size and cell number. In contrast to *eto1-1* or ACC-treated plants [27,29,47], no significant effect was observed on cell elongation in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant. However, we found a similar root phenotype in *ctr1-1* and the double *ebf1-1 ebf2-1* [48] mutant backgrounds (this work and data not shown), both accumulating the transcription factor EIN3 leading to a constitutive ethylene response. It is noteworthy that the *ctr1-1* mutation affects both cell elongation and root meristem size, indicating that ethylene signalling is involved in both mechanisms. Because the number of mitotic cells in the *cul3<sup>hyp</sup>* root meristem was not significantly different from wild type, we conclude that the reduced meristem size is the consequence of the premature transition of cells from the meristem to the cell elongation zone, rather than caused by differences in cell division activity.

An intriguing observation is that in *eto1-1*, which overproduces ethylene, or in ACC-treated roots ([27] and our data), no decrease on the root meristem size was observed. This suggests that despite the fact that ethylene is a volatile gas, depending on its sites of production and/or perception, ethylene can induce different local responses. Hence, this fits with the evidence that ACS genes in Arabidopsis display distinct expression patterns during plant development [49].

## *CUL3A/B* Activity Is Necessary for Normal Root Cap Organisation

The strong *CUL3A* and *CUL3B* expression in the distal part of the root and their involvement in distal root patterning suggest that *CUL3A/B* proteins control the division and organisation of the stem cell niche and columella root cap cells. By which mechanism(s) do *CUL3A/B* genes maintain QC and root cap organisation? It was recently reported that ethylene modulates cell division in the stem cell niche [26]. Such an effect of ethylene would be consistent with the role of *CUL3A/B* in ethylene biosynthesis (see above). However, several lines of evidence argue against this possibility. First, 1  $\mu$ M ACC treatment of wild type roots revealed no abnormalities in columella cell differentiation and/or tissue organisation [27]. Second, such a phenotype was not observed in the *eto1-1* null mutant. Third and most importantly, the ethylene insensitive mutation *ein3-1* did not suppress cell division defects in the QC and in columella cells. A possible explanation for the discrepancies between our data and [26] is that the two *eto1-11* and *eto1-12* alleles used in their studies, which are point mutations, are acting in a dominant negative way to inhibit *CUL3A/B* activity. Overall, even if a subtle effect of ethylene on stem cell division is not excluded, our data point to an ethylene-independent role of *CUL3A/B* in organizing stem cell niche and columella (Figure 7B).

Interestingly, we noticed that the DR5::GFP signal in the *cul3<sup>hyp</sup>* root tip was weaker and more restricted than in wild type roots, suggesting altered auxin signalling. In addition, we also observed a higher PIN7 protein accumulation in *cul3<sup>hyp</sup>* columella cells. One way to connect these observations is a scenario in which PIN7 misexpression leads to the depletion of intracellular auxin from the root tip, resulting in reduced auxin signalling and as a consequence patterning defects. Further experiments need to confirm such a model. Moreover, because PIN7 accumulation in columella cells is under post-transcriptional control and because *CUL3A/B* genes are strongly expressed in these cells, it will be interesting to address whether the PIN7 protein is a direct target of a still unknown CRL3 complex. Finally, a broader connection between *CUL3A/B* and auxin may exist, since several developmental abnormalities in the *cul3<sup>hyp</sup>* mutant, such as altered number of cotyledons, or defects in root and venation patterning and embryogenesis (this work and [17]) are reminiscent of auxin transport or signalling defects.

## Materials and Methods

### Plant Material, Growth Conditions, and Treatment

The Arabidopsis *cul3a-3* (SALK 012973) mutant line has been identified using the web assisted program: <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>. The insertion site was confirmed by sequencing the T-DNA flanking sequences. The precise location of the T-DNA in the *cul3a-3* mutant has been determined by sequencing, showing an insertion after nucleotide 2191 in the last exon of *CUL3A*. The last 8 nucleotides (TAGCCTAA) of *CUL3A* are replaced by 26 nucleotides from the left border of the T-DNA (ACATACGGTAT-CATATTGTGGTGTA) leading to the addition of 8 amino acids (HIRYHIVV) to *CUL3A* protein sequence.

All *Arabidopsis thaliana* lines used are in the Columbia background except for the Q1630 reporter line, which is in the C24 background. The transgenic and mutant lines have been described elsewhere: *ein3-1* [50], *etr1-1* [51], *eto1-1* [43], *ctr1-1* [45], *ein2-1* [43], *cin5-3* [24], proPIN1-PIN1-GFP and proPIN2-PIN2-GFP [52], proPIN7-PIN7-GFP [53], CYCB1-GUSDB [54], Q1630 [55] and PET111 [56]. The *CUL3A*- and *CUL3B*-promoter GUS transgenic lines are described respectively in [18,19].

*Arabidopsis thaliana* seeds were sterilized with chloral gas or with ethanol method, plated on 1/2 MS medium (1/2 MS salts [Gibco-BRL, Cleveland, OH], pH 5.8, 1% sucrose, and 0.8% agar), stored 2 to 3 days at 4°C in the dark, and then transferred to a plant growth room (21/25°C, 16-h photoperiod). For the triple response assay, surface-sterilized seeds were germinated in the dark on 1/2 MS medium. Plates with seeds were cold-treated at 4°C for 2 to 3 days, exposed to light at room temperature for 2 to 4 h to improve germination, then wrapped with aluminum foil and incubated at 22°C for 3 days in the dark. A minimum of 15 seedlings were scored per mutant by pulling them out of the growth medium, stretching them flat on the surface of another agar plate, taking in pictures, and then quantifying root and hypocotyl lengths using ImageJ (National Institutes of Health; <http://rsb.info.nih.gov/ij>). For seeds propagation, plants were grown to maturity at 22°C under 16-h photoperiod.

### Transcript Level Analyses

For Northern-blot analysis RNA was extracted from plant material using the Trizol reagent (Invitrogen, Paisley, UK). RNA gel blot analysis was performed with 20  $\mu$ g of total RNA per lane. Northern blot procedure is described in [31]. <sup>32</sup>P-labelled probes were synthesized with the Prime-a-Gene random prime labelling kit (Promega Corporation, Madison, WI, 8USA) using a 900-bp

CUL3A cDNA fragment amplified with two gene-specific primers (c3as4 5'-ATGGATTTGGGTGAATCTGT-3' and c3a5 5'-CTCGGGGTGACTGCCATA-3').

For qRT-PCR assays, RNA was extracted from 10 days old root tips (1 cm of the root starting from the root tip) using the kit NucleoSpin RNA XS (Macherey Nagel). 1 µg of total RNA were reverse transcribed with High Capacity cDNA Reverse Transcription kit TM (Applied Biosystems). PCR was performed using gene-specific primers in a total volume of 15 µL SYBR Green Master mix (Roche) on a Lightcycler LC480 apparatus (Roche) according to the manufacturer's instructions. The TIP4I and At4g26410 genes were used as internal controls. The relative expression level of *PLN7* gene in *cul3<sup>hyp</sup>* plants was compared with Col-0 control plants using GenEx Pro 4.3.5. software (MultiD Analyses) after normalization using the At4G26410 cDNA level and averaging over three replicates.

Primer list.

PIN7: TGGGCTCTTGTGCTTTCA and TCACCCAACTGAACATTGC

TIP4I: GTGAAAACCTGTTGGAGAGAAGCAA and CAAC-TGGATACCCCTTCGCA

AT4G26410: GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC and GGTCCGACATACCCATGATCC

### myc-ACS5 Protein Stability

Transgenic lines used were dex-inducible myc-tagged ACS5 [25]. The coding region of ACS5 was amplified from cDNA of wild type and fused to a 6× myc cassette, and cloned into the binary GVG vector pTA7002 [57]. Plants were transformed with the plasmids by the floral dip method [58], and transformants were selected on MS medium containing hygromycin. T2 seedlings were grown on MS medium containing 10 nM dex and screened for lines that expressed the myc-tagged proteins at low levels in an inducible manner.

Tissues for protein analyses were ground in a denaturing buffer [59] followed by boiling for 5 min. After centrifugation, 20 µg of total protein extracts were fractionated on a 10% SDS-PAGE gel and blotted onto Immobilon-P membrane (Millipore, Bedford, MA, USA). The immunoreactive proteins were detected using peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibodies (Dianova, Chalfont St Giles, Bucks, UK) and ECL Western blot analysis system from Amersham.

Immunoblots were performed using a 5000-fold dilution of anti-Myc monoclonal antibodies from mouse (clone MYC-1A1 Euromedex) and a 5000-fold dilution of peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Molecular Probes). Signals were detected by film (within the linear range of detection) using the enhanced chemiluminescence protein gel blot analysis system (Amersham Biosciences). The blot was stained subsequently with Coomassie blue to control the loading.

For ACS5 turnover assays, wild type and *cul3<sup>hyp</sup>* transgenic seedlings harbouring DEX-inducible myc-ACS5 were grown on MS medium for 8 days at 22°C. Twenty ml of liquid MS medium containing different DEX concentrations (see Figure 3) were poured onto the plates where seedlings were growing and incubated for 4 hours. Seedlings were incubated for different times in 1M cycloheximide after three washes of liquid MS medium. Total proteins were extracted and used for immunoblot analysis.

### Ethylene GC Measurements

Seeds were sterilized using chlorine gas sterilization (100 mL bleach +3 mL HCl for ~4 hours), and seeds were aliquoted in

0.4% top agar to 3 mL MS 1% sucrose media in 22-mL gas chromatography vials. Vials were maintained sterile using autoclaved aluminum foil, for 5 days in 4°C. Vials were incubated in the light for 4–6 hours, then capped and incubated at 22°C dark for 4 days. The vials were capped in the dark at day 3 and incubated to day 4. The accumulated ethylene was measured by gas chromatography as described in [24]. All genotypes are represented by 3 repetitions of 2–3 vials each. Ethylene measured in each vial was then divided by number of seedlings in the vial.

### Phenotypical Analysis and Microscopy

Root seedlings were photographed and their lengths were measured with ImageJ. At least 15 seedlings were processed, and at least three independent experiments were performed, giving the same statistically significant results. Root meristem lengths and epidermal cell lengths were measured on root mounted in chloral hydrate. Images were captured with a Zeiss Axioskop microscope (Carl Zeiss, New York, NY) equipped with a Nikon DXM1200 digital camera (Nikon Instruments Europe, Badhoevedorp, The Netherlands). The number of root meristematic cells was obtained by counting cortical cells showing no sign of vacuolisation. Root meristem length was assessed as the distance between the quiescent center and the first cell with a vacuole. ImageJ was used also for measurements of the length of root cortical cells. At least 10 seedlings were processed in at least three independent experiments giving similar results.

Histochemical GUS staining analyses of the *CUL3A/B* promoter, the *CYCB-GUS* and *QC* reporter lines were done as described in [60]. For the confocal microscopy, roots were visualized using a Leica (Wetzlar, Germany) MZ FLIII fluorescence stereomicroscope equipped with GFP and YFP filters. Propidium iodide (10 µg/mL in distilled water) was used to stain the cell walls of living root cells (red signal). For quantification of PIN7:GFP signal fluorescence ImageJ program was used. The ratio of GFP signal intensity between the stele and the columella was calculated for the wild type and *cul3<sup>hyp</sup>* roots. Approximately 15 seedlings/images were examined, in three independent experiments giving similar results.

### Supporting Information

**Figure S1** Response of *cul3<sup>hyp</sup>* to AVG and ACC. A. Hypocotyl length measurements of 3-day-old etiolated seedlings of the indicated genotypes grown without (light grey) or with (dark grey) 2 µM AVG. Values are average lengths (means±SD) of >30 hypocotyls. B. Hypocotyl length measurements of 3-day-old etiolated seedlings of the indicated genotypes grown without (light grey) or with (dark grey) 5 µM ACC. Values are average lengths (means±SD) of >30 hypocotyls. C. Root length measurements of 3-day-old etiolated seedlings of the indicated genotypes grown without (light grey) or with (dark grey) 5 µM ACC. Values are average lengths (means±SD) of >30 roots.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000328.s001 (1.5 MB TIF)

**Figure S2** Representative 11-day-old seedlings of the indicated genotypes.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000328.s002 (2.8 MB TIF)

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PG. Performed the experiments: AT EL MH ED. Analyzed the data: AT JK BS PG. Contributed reagents/materials/analysis tools: AT EL ED YP. Wrote the paper: PG.

## References

- Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 22: 442–451.
- Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503–533.
- Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 55: 555–590.
- Petroski MD, Deshaies RJ (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 9–20.
- Pintard L, Willems A, Peter M (2004) Cullin-based ubiquitin ligases: Cul3-BTB complexes join the family. *EMBO J* 23: 1681–1687.
- Furukawa M, He YJ, Borchers C, Xiong Y (2003) Targeting of protein ubiquitination by BTB-Cullin 3-Roc1 ubiquitin ligases. *Nat Cell Biol* 5: 1001–1007.
- Geyer R, Wee S, Anderson S, Yates J, Wolf DA (2003) BTB/POZ domain proteins are putative substrate adaptors for cullin 3 ubiquitin ligases. *Mol Cell* 12: 783–790.
- Pintard L, Willis JH, Willems A, Johnson JL, Srayko M, et al. (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature* 425: 311–316.
- Xu L, Wei Y, Reboul J, Vaglio P, Shin TH, et al. (2003) BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature* 425: 316–321.
- Singer JD, Gurian-West M, Clurman B, Roberts JM (1999) Cullin-3 targets cyclin E for ubiquitination and controls S phase in mammalian cells. *Genes Dev* 13: 2375–2387.
- Sumara I, Quadroni M, Frei C, Olma MH, Sumara G, et al. (2007) A Cul3-based E3 ligase removes Aurora B from mitotic chromosomes, regulating mitotic progression and completion of cytokinesis in human cells. *Dev Cell* 12: 887–900.
- Angers S, Thorpe CJ, Biechele TL, Goldenberg SJ, Zheng N, et al. (2006) The KLHL12-Cullin-3 ubiquitin ligase negatively regulates the Wnt-beta-catenin pathway by targeting Dishevelled for degradation. *Nat Cell Biol* 8: 348–357.
- Michel JJ, McCarville JF, Xiong Y (2003) A role for Saccharomyces cerevisiae Cul8 ubiquitin ligase in proper anaphase progression. *J Biol Chem* 278: 22828–22837.
- Thomann A, Dieterle M, Genschik P (2005) Plant CULLIN-based E3s: phytohormones come first. *FEBS Lett* 579: 3239–3245.
- Figuerola P, Gusmaroli G, Serino G, Habashi J, Ma L, et al. (2005) Arabidopsis Has Two Redundant Cullin3 Proteins That Are Essential for Embryo Development and That Interact with RBX1 and BTB Proteins to Form Multisubunit E3 Ubiquitin Ligase Complexes in Vivo. *Plant Cell* 17: 1180–1195.
- Gingerich DJ, Gagne JM, Salter DW, Hellmann H, Estelle M, et al. (2005) Cullin 3A and B assemble with members of the broad complex/tramtrack/bric-A-brac (BTB). *J Biol Chem* 280: 18810–18821.
- Thomann A, Brukhin V, Dieterle M, Gheysels J, Vantard M, et al. (2005) Arabidopsis CUL3A and CUL3B genes are essential for normal embryogenesis. *Plant J* 43: 437–448.
- Dieterle M, Thomann A, Renou JP, Parmentier Y, Cognat V, et al. (2005) Molecular and functional characterization of Arabidopsis Cullin 3A. *Plant J* 41: 386–399.
- Weber H, Bernhardt A, Dieterle M, Hano P, Mutlu A, et al. (2005) Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiol* 137: 83–93.
- Wang KL, Yoshida H, Lurin C, Ecker JR (2004) Regulation of ethylene gas biosynthesis by the Arabidopsis ETO1 protein. *Nature* 428: 945–950.
- Bostick M, Lochhead SR, Honda A, Palmer S, Callis J (2004) Related to ubiquitin 1 and 2 are redundant and essential and regulate vegetative growth, auxin signaling, and ethylene production in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2418–2432.
- Bosu DR, Kipreos ET (2008) Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div* 18: 3–7.
- Capitani G, McCarthy DL, Gut H, Grütter MG, Kirsch JF (2002) Apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in complex with the inhibitor L-aminooxyvinylglycine. Evidence for a ketimine intermediate. *J Biol Chem* 277: 49735–49742.
- Vogel JP, Woeste KE, Theologis A, Kieber JJ (1998) Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of Arabidopsis confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction, respectively. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4766–4771.
- Chae HS, Faure F, Kieber JJ (2003) The eto1, eto2, and eto3 mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in Arabidopsis by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell* 15: 545–559.
- Ortega-Martínez O, Pernas M, Carol RJ, Dolan L (2007) Ethylene modulates stem cell division in the Arabidopsis thaliana root. *Science* 317: 507–510.
- Ruzicka K, Ljung K, Vanneste S, Podhorská R, Beeckman T, et al. (2007) Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* 19: 2197–2212.
- Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 19: 2169–2185.
- Swarup R, Perry P, Hagenbeck D, Van Der Straeten D, Beemster GT, et al. (2007) Ethylene upregulates auxin biosynthesis in Arabidopsis seedlings to enhance inhibition of root cell elongation. *Plant Cell* 19: 2186–2196.
- Doerner P, Jørgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C (1996) Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* 380: 520–523.
- Genschik P, Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Fleck J (1998) Cell cycle-dependent proteolysis in plants. Identification of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor MG132. *Plant Cell* 10: 2063–2076.
- Sabatini S, Beis D, Wolkenfelt H, Murfett J, Guilfoyle T, et al. (1999) An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* 99: 463–472.
- Vieten A, Sauer M, Brewer PB, Friml J (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci* 12: 160–168.
- Benjamins R, Scheres B (2008) Auxin: the looping star in plant development. *Annu Rev Plant Biol* 59: 443–465.
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benková E, Benjamins R, et al. (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* 132: 4521–4531.
- Chae HS, Kieber JJ (2005) Eto Brute? Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci* 10: 291–296.
- Yoshida H, Nagata M, Saito K, Wang KL, Ecker JR (2005) Arabidopsis ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biol* 5: 14.
- Luke-Glaser S, Roy M, Larsen B, Le Bihan T, Metalnikov P, et al. (2007) CIF-1, a shared subunit of the COP9/signalosome and eukaryotic initiation factor 3 complexes, regulates MEL-26 levels in the Caenorhabditis elegans embryo. *Mol Cell Biol* 27: 4526–4540.
- Christians MJ, Gingerich DJ, Hansen M, Binder BM, Kieber JJ, et al. (2008) The BTB ubiquitin ligases ETO1, EOL1 and EOL2 act collectively to regulate ethylene biosynthesis in Arabidopsis by controlling type-2 ACC synthase levels. *Plant J* (in press).
- Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 3386–3399.
- Joo S, Liu Y, Lueth A, Zhang S (2008) MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant J* 54: 129–140.
- Bleecker AB, Estelle MA, Somerville C, Kende H (1988) Insensitivity to Ethylene Conferred by a Dominant Mutation in Arabidopsis thaliana. *Science* 241: 1086–1089.
- Guzmán P, Ecker JR (1990) Exploiting the triple response of Arabidopsis to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell* 2: 513–523.
- Thain SC, Vandenbussche F, Laarhoven IJ, Dowson-Day MJ, Wang ZY, et al. (2004) Circadian rhythms of ethylene emission in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136: 3751–3761.
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72: 427–441.
- Woeste KE, Ye C, Kieber JJ (1999) Two Arabidopsis mutants that overproduce ethylene are affected in the posttranscriptional regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Plant Physiol* 119: 521–530.
- Le J, Vandenbussche F, Van Der Straeten D, Verbeelen JP (2001) In the early response of Arabidopsis roots to ethylene, cell elongation is up- and down-regulated and uncoupled from differentiation. *Plant Physiol* 125: 519–522.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, et al. (2003) EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two Arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell* 115: 679–689.
- Tsuchisaka A, Theologis A (2004) Unique and overlapping expression patterns among the Arabidopsis 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase gene family members. *Plant Physiol* 136: 2982–3000.
- Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, et al. (1997) Activation of the ethylene gas response pathway in Arabidopsis by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell* 89: 1133–1144.
- Chang C, Kwok SF, Bleecker AB, Meyerowitz EM (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science* 262: 539–544.
- Xu J, Hoffhuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J, et al. (2006) A molecular framework for plant regeneration. *Science* 311: 385–388.
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemsen V, Paponov I, et al. (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots. *Nature* 433: 39–44.
- Ferreira PCG, Hemeryk AS, Engler JDA, Montagu MV, Engler G, et al. (1994) Developmental expression of the Arabidopsis cyclin gene. *Cyc1at Plant Cell* 6: 1763–1774.
- Sabatini S, Heidstra R, Wildwater M, Scheres B (2003) SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev* 17: 354–358.

56. Nawy T, Lee JY, Colinas J, Wang JY, Thongrod SC, et al. (2005) Transcriptional profile of the Arabidopsis root quiescent center. *Plant Cell* 17: 1908–1925.
57. Aoyama T, Chua NH (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* 11: 605–612.
58. Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735–743.
59. Büche C, Poppe C, Schäfer E, Kretsch T (2000) *eid1*: a new Arabidopsis mutant hypersensitive in phytochrome A-dependent high-irradiance responses. *Plant Cell* 12: 547–558.
60. Willemsen V, Wolkenfelt H, de Vrieze G, Weisbeck P, Scheres B (1998) The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the Arabidopsis embryo. *Development* 125: 521–531.

# Regulation and Role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in Maintaining Genome Integrity upon UV Stress

Jean Molinier, Esther Lechner, Eva Dumbliauskas, Pascal Genschik\*

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS (UPR2357), conventionné avec l'Université Louis Pasteur, Strasbourg, France

## Abstract

Plants use the energy in sunlight for photosynthesis, but as a consequence are exposed to the toxic effect of UV radiation especially on DNA. The UV-induced lesions on DNA affect both transcription and replication and can also have mutagenic consequences. Here we investigated the regulation and the function of the recently described CUL4-DDB1-DDB2 E3 ligase in the maintenance of genome integrity upon UV-stress using the model plant Arabidopsis. Physiological, biochemical, and genetic evidences indicate that this protein complex is involved in global genome repair (GGR) of UV-induced DNA lesions. Moreover, we provide evidences for crosstalks between GGR, the plant-specific photo reactivation pathway and the RAD1-RAD10 endonucleases upon UV exposure. Finally, we report that DDB2 degradation upon UV stress depends not only on CUL4, but also on the checkpoint protein kinase Ataxia telangiectasia and Rad3-related (ATR). Interestingly, we found that DDB1A shuttles from the cytoplasm to the nucleus in an ATR-dependent manner, highlighting an upstream level of control and a novel mechanism of regulation of this E3 ligase.

**Citation:** Molinier J, Lechner E, Dumbliauskas E, Genschik P (2008) Regulation and Role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in Maintaining Genome Integrity upon UV Stress. *PLoS Genet* 4(6): e1000093. doi:10.1371/journal.pgen.1000093

**Editor:** Gregory P. Copenhaver, The University of North Carolina at Chapel Hill, United States of America

**Received:** March 13, 2008; **Accepted:** May 12, 2008; **Published:** June 13, 2008

**Copyright:** © 2008 Molinier et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Funding was provided by the CNRS, the French National Research Agency (ANR-07-BLAN-0216-02) and the EU NoE (Rubicon LSHG-CT-2005-018683). All these agencies funded the salaries and provided the research environment.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: Pascal.Genschik@ibmp-ulp.u-strasbg.fr

## Introduction

Plants are subjected to many different environmental stresses due to their sessile life styles. As obligate prototroph they need to take benefit of the sunlight containing ultra-violets (UV) for photosynthesis but concomitantly, have to prevent UV irradiation from inducing irreversible damage especially on DNA. Genetic changes that occur in somatic plant cells can potentially be passed to the progeny through meiosis since plants lack a permanent germ line and produce gametes from somatic lineages [1]. In order to avoid dramatic genetic alterations efficient DNA repair pathways must be activated in addition to physiological adaptation like biosynthesis of UV absorbing compounds. UVs predominantly induce photochemical lesions such as cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) and (6-4)-photoproducts [2]. These bulky DNA lesions are repaired by a simple and error free mechanism: photo reactivation, which is present in prokaryotes and most eukaryotes, with the exception of mammals [3]. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, the *UVR2* gene encodes a photolyase (PHR1) that acts only on CPDs [4,5], whereas the *UVR3* gene encodes a photolyase specific for 6-4 photoproducts [6].

In addition to this direct repair process, most organisms also have a sophisticated general repair mechanism, such as the Nucleotide Excision Repair (NER) [7]. The NER process contributes to global genome repair and consists of 5 steps: recognition of the DNA damage, opening of the pre-incision complex, dual incision of the lesion, DNA synthesis followed by the ligation of the newly synthesised DNA strand. Two proteins, DDB1 and DDB2 (DNA Damage Binding protein 1 and 2), were initially isolated as part of a heterodimeric protein complex that

recognises UV-induced DNA lesions [8]. Although still under debate, these proteins seem to play an early function during NER. Recent findings have shown that DDB1 and DDB2, at least in mammals, form an E3 ubiquitin ligase together with Cullin 4 (CUL4) and RBX1 [9]. Thus, CUL4 binds RBX1 to recruit a specific E2 ubiquitin conjugating enzyme and also binds DDB1, an adaptor protein, which itself associates with the predicted substrate receptor DDB2. However, the ubiquitylation events triggered by this E3 ligase during NER seem complex and are not yet fully understood. Thus in mammals, both the *Xeroderma pigmentosum* complementation group C (XPC) and the receptor protein itself, DDB2, are ubiquitylated after UV irradiation [10,11–12,13–14]. However the fate of these proteins are different; whereas polyubiquitylated XPC is not degraded and exhibits enhanced binding activity to damaged DNA, polyubiquitylated DDB2 is destroyed by the proteasome. Thus it is believed that DDB2 facilitates and/or stabilizes the binding of XPC to UV-induced photoproducts [15], but its turnover is crucial to allow the NER process to occur efficiently. Therefore recognition of UV lesions at the initial step of NER is critical and should be tightly controlled to allow efficient and rapid DNA repair. Hence mutations in human *DDB2* gene cause genetic complementation group XPE phenotype characterized by hypersensitivity to sunlight and a predisposition to skin cancer [16]. Interestingly, recent data also indicate a role of CUL4-DDB1-DDB2 E3 ligase in histone H3 and H4 ubiquitylation during UV stress [17]. This work points to an interesting model in which histone ubiquitylation around the lesions may cause the eviction of nucleosomes and thus expose the damaged DNA to the repair machinery. A function of CUL4A-DDB1<sup>DDB2</sup> was also proposed for histone

## Author Summary

Recent research revealed strong links between Cullin4 (CUL4)-based cullin-RING ubiquitin ligases (CRLs) and chromatin biology, including DNA replication and DNA repair. During Nucleotide Excision Repair (NER), CUL4 together with DDB1 (DNA Damage Binding protein 1) ubiquitylate an increasingly large number of substrates, including components of the NER machinery as well as various histone proteins. In contrast to mammals, plants have an efficient DNA repair pathway, mediated by photolyases that reverse UV lesions in presence of visible light, without DNA excision. Thus, it is believed that in aerial plant tissues this DNA repair pathway is predominant. In the present work we used the model plant Arabidopsis to investigate the role of CUL4-DDB1A<sup>DDB2</sup> in global genome repair at the level of a whole organism. Using a genetic approach, we highlighted the existence of cooperative roles of different DNA repair processes that all together contribute to maintain genome integrity upon exposure to UV. Moreover, we report that DDB2 turnover not only depends on CUL4-DDB1A, but also on the ATR checkpoint protein kinase. Strikingly, we demonstrated that Arabidopsis DDB1A shuttles from the cytoplasm to the nucleus after UV stress in an ATR-dependent manner, illustrating a novel level of regulation of this class of CRL.

H2A monoubiquitylation during UV irradiation [18]. Finally, DDB2 may also act in NER in a chromatin-independent and less direct manner, by controlling the stability of P53 [19].

In spite of these advances, the control and the dynamics of the CUL4-DDB1-DDB2 complex during the recognition step of photoproducts is still not well understood. Moreover, the cooperation between the different DNA repair pathways in the repair of highly mutagenic UV-induced DNA lesions remains poorly characterized and much of our current knowledge comes from data obtained with different cell types and not at the level of a complex organism. In the present work we used the model plant *Arabidopsis thaliana*, which has to deal with the benefit of UV light and the harmful effects of photoproducts on DNA during development. Here we provide evidences for a CUL4-DDB1A<sup>DDB2</sup> protein complex *in planta* and for its function in the global genome repair pathway (GGR). Using a genetic approach, we demonstrate a synergism between GGR, the plant specific photo reactivation pathway and the RAD1-RAD10 endonucleases upon UV exposure. These results support the existence of different interconnections between DNA repair processes that all together contribute to maintain genome integrity. Moreover, we report that DDB2's turnover depends on the CUL4-DDB1A E3 ligase and the ATR kinase. Strikingly, we demonstrated that Arabidopsis DDB1A shuttles from the cytoplasm to the nucleus in an ATR-dependent manner, highlighting an upstream control and a novel level of regulation for this CUL4-based E3 ligase.

## Results

### Molecular Characterisation of Arabidopsis DDB1A and DDB2 Insertion Lines

In order to define the role of Arabidopsis CUL4, DDB1A and DDB2 in DNA repair, a genetic approach was conducted. Two Arabidopsis *DDB1A* (*ddb1a-1* and *ddb1a-2*) and one *DDB2* (*ddb2-2*) insertion lines were identified using the web-assisted program: <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>. The Arabidopsis *CUL4* insertion line used in this study (*cul4-1*) is described in [20]. We used

this hypomorphic mutant, which exhibits a strong reduction of *CUL4* expression, instead of a null mutant that is lethal in Arabidopsis (unpublished). In lines *ddb1a-1* and *ddb1a-2* the T-DNAs are integrated in the 10<sup>th</sup> exon and in the 5<sup>th</sup> intron, respectively (Figure 1A). For both tagged lines, Arabidopsis plants homozygous for the T-DNA insertions did not exhibit significant phenotypical differences compared to wild-type (WT) plants under standard growth conditions. Using RT-PCR *DDB1A* transcripts remain undetectable in *ddb1a-1* and *ddb1a-2* mutant plants (Figure 1B) indicating that both mutant lines are defective for *DDB1A* expression. For DDB2, which is encoded by a single gene in Arabidopsis, we raised antibodies against the protein for its immunodetection in different mutant lines (see experimental procedures for details). One T-DNA insertion mutant for *AtUV-DDB2* (here referred as *ddb2-1*) was recently reported [21], but this mutant still expresses low amount of DDB2 protein (not shown). For this reason, we chose another mutant line, *ddb2-2* (Nossen ecotype), in which a transposon is integrated in the 10<sup>th</sup> exon (Figure 1A). No signal on western blot is detectable in *ddb2-2* (Figure 1B), suggesting a loss-of-function mutation. Similarly to *ddb1a* mutants, plants homozygous for this insertion did not exhibit significant phenotypic differences compared to the wild type Arabidopsis plants grown under standard conditions. It is noteworthy that *DDB2* expression level in both Col0 and Nossen WT Arabidopsis ecotypes is low (Figure 1B), which is in agreement with the signal intensity of several different microarray experiments reflecting the transcript level [22].

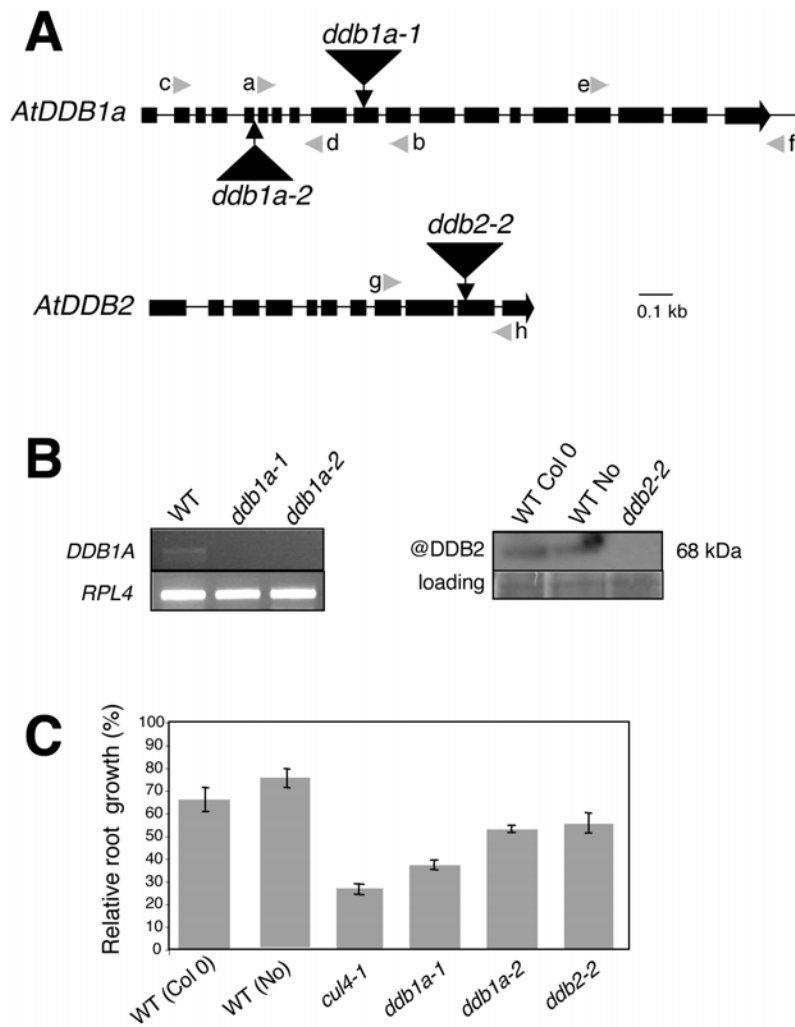
### CUL4, DDB1A, and DDB2 Defective Plants Are UV-C Hypersensitive

To test whether Arabidopsis *CUL4*, *DDB1A* and *DDB2* are involved in the repair of UV-induced DNA lesions, root growth inhibition experiments were performed. In plants, roots are the material of choice to measure the defect in UV tolerance, because they lack UV-screen compounds, which protect cells from UV light. *cul4*, *ddb1a* and *ddb2* defective mutant plants were grown vertically on the agar surface and roots were irradiated with 600 J/m<sup>2</sup> of UV-C. Relative root growth (root length treated/root length untreated) in % was determined 24h following the UV-C treatment. Root growth was reduced to 28, 37, 50 and 53% for *cul4-1*, *ddb1a-1*, *ddb1a-2* and *ddb2-2*, respectively, relative to that of WT control plants (Figure 1C). Therefore all insertion lines exhibit a significant root growth inhibition upon exposure to UV-C compared to WT Arabidopsis plants. Interestingly, both Arabidopsis DDB1A and DDB2 over expressing plants exhibit an enhanced UV-C tolerance compared to WT plants (Figure S1A) suggesting that both proteins, as effectors of the excision repair pathway, are limiting factors in this process.

Cisplatin is another DNA damaging agent that induces bulky DNA lesions. Similarly to UV-C stress, *cul4-1*, *ddb1a-2* and *ddb2-2* exhibit a significant growth reduction compared to WT control plants, as measured by their relative weight (Figure S1B). However, we did not observe such a difference in sensitivity upon exposure of the mutant lines to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; Figure S1C). This lack of sensitivity is in agreement with the fact that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA lesions are not predominantly repaired by the NER pathway. Taken together these data suggest that *CUL4*, *DDB1A*- and *DDB2*-deficient plants are affected in the tolerance to induced bulky DNA damage and this may reflect a defect in DNA repair.

### CUL4 and DDB2 Defective Plants Are Impaired in Synthesis-Dependent Repair of UV-Induced DNA Lesions

Plants compensate the deleterious effects of UV radiation by various mechanisms including the accumulation of secondary



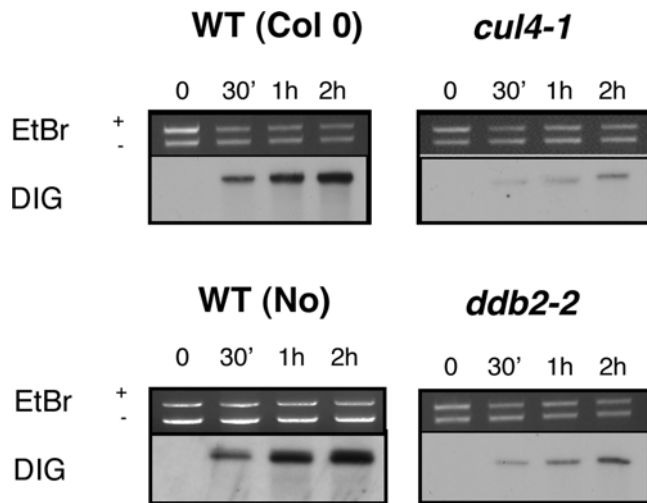
**Figure 1. *cul4*, *ddb1a* and *ddb2* insertion mutant lines exhibit hypersensitivity to UV-C.** (A) Genomic organization of the *DDB1A* and *DDB2* loci. T-DNAs are inserted in the 10<sup>th</sup> exon (black boxes) in the *ddb1a-1* and in the 5<sup>th</sup> intron (black line) in *ddb1a-2* mutant plants. Primers a–b, c–d and Lb1 were used for genotyping *ddb1a-1* and *ddb1a-2*, respectively. In the *ddb2-2*, the transposon is inserted in the 10<sup>th</sup> exon (black boxes). Primers h–g and Ds5-2a were used for genotyping (see supplemental material for details). (B) Molecular characterisation of *DDB1A*- and *DDB2*-mutant plants. RT-PCR analyses were performed for *DDB1A* expression in WT and the insertional mutants *ddb1a-1* and *ddb1a-2* using the specific e–f primers. *RPL4* primers were used as a control (See supplemental material for details). Immuno-detection of *DDB2* protein in two different WT *Arabidopsis thaliana* ecotypes (Columbia: Col0 and Nossen: No) and in the *ddb2-2* insertional mutant. Coomassie blue staining was used as loading control. (C) Root-growth assay. One-week-old mutant (*cul4-1*, *ddb1a-1*, *ddb1a-2*, *ddb2-2*), and WT control plants were exposed to 600 J/m<sup>2</sup> of UV-C. Root growth was measured 24h following irradiation. Root growth was calculated relative to the corresponding untreated plants ( $\pm$ SEM). Eight plants per replicate were used and experiments were performed in triplicates. For all mutants  $p < 0.05$ , compared to WT plants (both ecotypes). doi:10.1371/journal.pgen.1000093.g001

metabolites [23]. To check whether the UV-C hypersensitive phenotype of *cul4*, *ddb1a* and *ddb2* mutant lines is the consequence of a defect in a DNA repair mechanism, cell extracts of WT, *cul4-1* and *ddb2-2* plants were used in an *in vitro* DNA repair assay as described in [24]. This assay measures the efficiency of DIG dUTP incorporation in a UV-C damaged plasmid in the presence of plant cell extracts. Thereby the efficiency of dark repair of UV-induced DNA damage can be evaluated. Strikingly, cell extracts derived from the mutant plants were less efficient in DIG dUTP incorporation after 1 and 2 h of incubation (Figure 2). Taken together these results show that the UV hypersensitivity of *cul4* and *ddb2* (and most likely *ddb1a*) mutant plants is due to a defect in synthesis-dependent repair of UV-induced DNA lesions, indicating an important role for these factors in the excision repair process.

#### Genetic Interactions between Arabidopsis *CEN2*, *RAD1*, *RAD10*, *CUL4*, *DDB1A*, and *DDB2*

CENTRIN2 (*CEN2*) and the heterodimer RAD1-RAD10 (XPF-ERCC1) act in the GGR-NER repair pathway [7]. *CEN2* is part of the XPC-RAD23 recognition complex, whereas, RAD1-RAD10 in cooperation with RAD2 are the endonucleases excising the bulky DNA lesions. In Arabidopsis *CEN2*, RAD1-RAD10 are also part of the GGR-NER repair process [25]. In order to define whether *CUL4*, *DDB1A* and *DDB2* act in the same repair pathway as *CEN2* and RAD1-RAD10 different double mutants were produced and characterised for their UV-C sensitivity by using the root growth assay. Double *ddb1a-2 ddb2-2*, *cul4-1 cen2-2*, *ddb1a-2 cen2-2* and *ddb2-2 cen2-2* mutant plants did not exhibit significant additive effects on root growth inhibition compared to the respective single mutants (Figure 3A). These results are consistent





**Figure 2. *In vitro* synthesis DNA repair assays of UV-C damaged plasmid.** Cell extracts (20  $\mu$ g) from WT (Col/Nossen), *cul4-1* and *ddb2-2* plants were incubated with UV-C damaged (UV-C treated pGEX: +UV-C) and control (untreated pBKS: -UV-C) plasmids in the presence of DIG-dUTP. Incorporation was evaluated during a time course. These pictures are representative of 2 independent experiments.  
doi:10.1371/journal.pgen.1000093.g002

with epistatic interactions between *CUL4*, *DDB1A*, *DDB2* and *CEN2* indicating that they act in the same pathway.

The same approach was used using Arabidopsis *RAD1* or *RAD10* defective plants. Contrary to the results observed with *cen2-2*, all double mutant plants (*cul4-1 rad10*, *ddb1a-2 rad10*, *ddb2-2 rad10* and *cen2-2 rad1*) exhibit an enhanced UV-C sensitivity compared to the respective single mutants (Figure 3B). These synergistic genetic interactions suggest that UV induced DNA lesions are processed by at least two different repair pathways in which *RAD1* and *RAD10* seem to play a role. Although it is assumed that *RAD1* and *RAD10* are mainly involved in NER, a role in homologous recombination (HR) has also been reported [26,27]. In addition, UV was already shown to stimulate somatic homologous recombination [28]. Thus our genetic approach suggests that not only NER, but also HR, contributes to maintain genome integrity upon UV irradiation.

### Defect in Photolyase Expression (*PHR1*) Enhances UV-C Sensitivity of *CUL4*, *DDB1A*, and *DDB2*

In contrast to mammals, plants and other organisms have a direct DNA repair mechanism, which involves photolyases [3]. It has previously been shown that the Arabidopsis *UVR2* gene encodes a photolyase (PHR1) specific for CPDs [4,5], which are the main UV-induced DNA lesions. Because *CUL4*, *DDB1A* and *DDB2* act in the GGR-NER pathway (see above), we checked how a combined defect in both DNA repair pathways affects UV-C tolerance in plants. For this, double *cul4-1 phr1*, *ddb1a-2 phr1* and *ddb2-2 phr1* mutant plants were produced and exposed to chronic UV-C doses. Hence, all double mutants exhibited a significant higher UV sensitivity compared to the corresponding single mutant plants reflected by a reduction in the number of newly formed leaves and a higher number of bleached plants (Figure 4A–C). This synergistic genetic interaction between both pathways indicates that NER and not only photolyase plays a major role to maintain genome integrity in green tissues, which are constantly exposed to sunlight.

### *In vivo* Characterisation of the CUL4-DDB1A-DDB2 Complex

Next, we investigated whether Arabidopsis *CUL4*, *DDB1A* and *DDB2* proteins form a complex *in planta*. As no antibody against *DDB1A* was available and because we further aimed to determine the subcellular localisation of *DDB1A* and *DDB2*, we first produced Arabidopsis transgenic plants expressing GFP-tagged versions of both proteins (Figure 5A). To test whether the *DDB1A*-GFP fusion protein was functional, complementation of the UV-C sensitivity of *ddb1a-2* plants was analysed using the root growth assay. Expression of both untagged *DDB1A* and *DDB1A*-GFP fusion protein complement the *ddb1a-2* UV-C sensitivity compared to the control plants to the same extent (Figure 5B). Therefore *DDB1A*-GFP expressing plants are suitable for further analyses. Pair-wise immunoprecipitation experiments were conducted using either anti-*CUL4* or anti-GFP antibodies. Indeed we found that both *DDB1A* and *DDB2* co-immunoprecipitate with *CUL4* (Figure 5C). In addition, we showed an enrichment of *DDB2* when co-immunoprecipitated with *CUL4* upon UV-C exposure compared to untreated plants (Figure 5D).

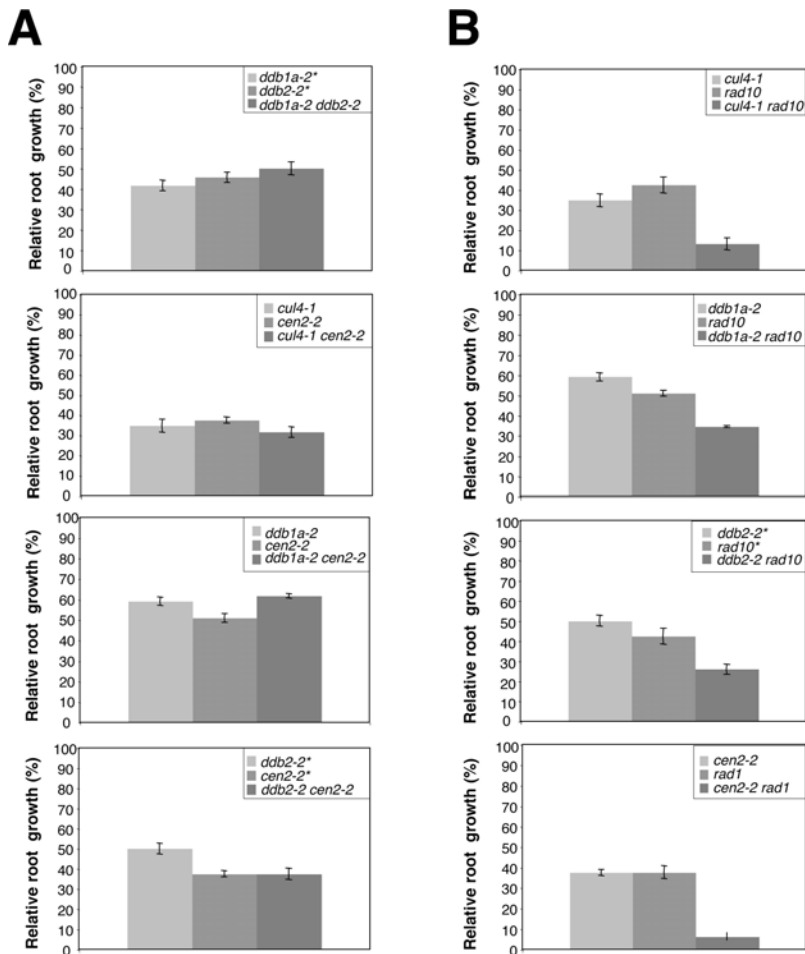
In XP group E patients, a point mutation in the DxR motif (R273H) of the WD40 domain in *DDB2* abolishes its interaction with *DDB1* leading to the human genetic disorder XPE [16]. This motif is also conserved in Arabidopsis. Therefore, we investigated the interaction between the mutated Arabidopsis *DDB2* protein *DDB2* (R343H) and *DDB1A* using the yeast two-hybrid assay. In contrast to human, interaction between *DDB1A* and *DDB2* was not abolished by the DxR mutation (Figure S2). This shows that some features of the Arabidopsis *DDB1A*-*DDB2* interaction may differ from those of human. Overall, our immunoprecipitation and previously published yeast two-hybrid assays [20] suggest that *CUL4*, *DDB1A* and *DDB2* are part of a same protein complex *in vivo*.

### *In vivo* Localisation of *DDB1A* and *DDB2*

To better understand the regulation of the *CUL4*-*DDB1A*-*DDB2* complex in the context of DNA repair, the subcellular localisation of *DDB1A* and *DDB2* was investigated. Arabidopsis plants expressing GFP-tagged versions of *DDB1A* and *DDB2* were analysed using confocal microscopy. We observed that GFP-*DDB2* is localized exclusively in the nucleus (Figure 5E). This result is consistent with the published work in metazoans, including human [15]. To investigate into more details the localisation of *DDB2*, we performed immunolocalisation experiments using the anti-GFP antibody. We found *DDB2* broadly distributed on chromatin with a lower intensity at the chromocenters and nucleoli (Figure 5E). This result is also in agreement with the recent work of [15] showing a homogenous distribution of human *DDB2* on chromatin in absence of genotoxic stress. On the other hand, the subcellular localisation of *DDB1* in mammalian cells is less well understood and seems more complex [19,29,30]. Here we show that Arabidopsis *DDB1A*-GFP is mainly located in the cytosol and is enriched in speckles of unknown origin (Figure 5F). This subcellular localisation contrasts with the situation in mammals, where both nuclear and cytoplasmic localisations have been reported. The strict cytosolic localisation of plant *DDB1A* raises the question whether this protein relocates to the nucleus under genotoxic stress conditions in order to contribute to the DNA repair process.

### *DDB1A* Spatio-Temporal Dynamics upon UV Exposure

To investigate whether *DDB1A* protein accumulates in the nucleus, at least transiently upon DNA stress, we performed a time course experiment following UV-C exposure. Strikingly, as soon as



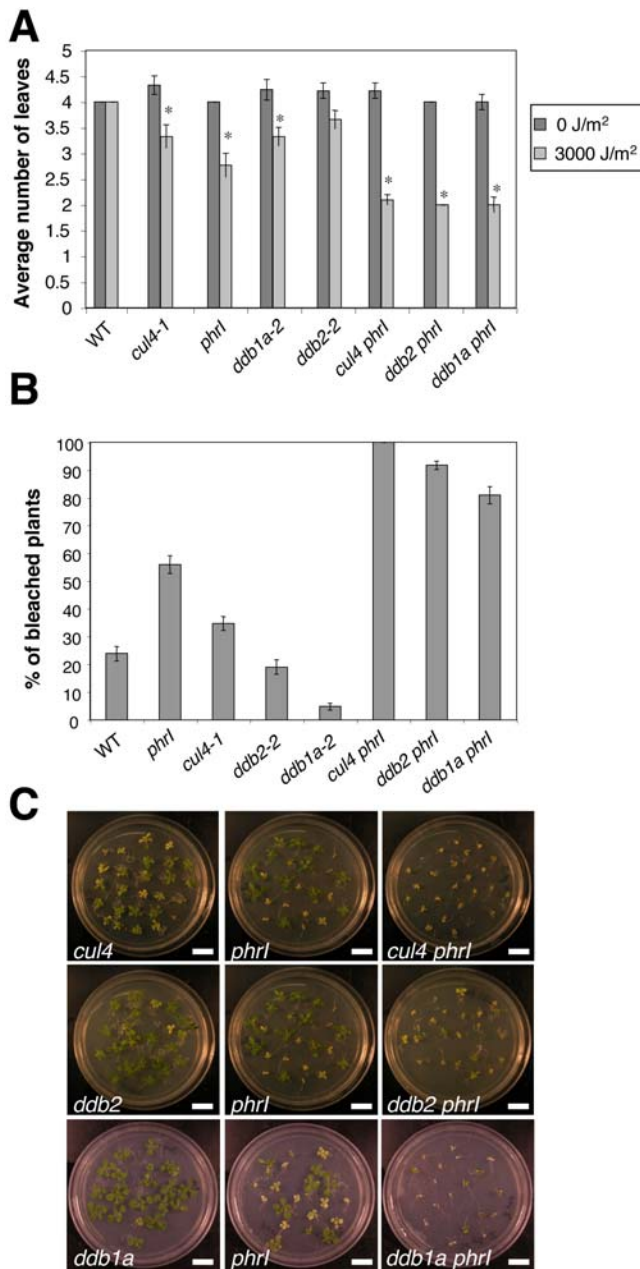
**Figure 3. Genetic interactions in NER and HR.** One-week-old single and double mutant plants (A) *ddb1a-2-ddb2-2*; *cul4-1-cen2-2*; *ddb1a-2-cen2-2*; *ddb2-2-cen2-2* (B) *cul4-1-rad10*; *ddb1a-2-rad10*; *ddb2-2-rad10*; *cen2-2-rad1* were exposed to 600 J/m<sup>2</sup> of UV-C. Root growth was measured 24h following irradiation. Root growth was calculated relative to the corresponding untreated plants ( $\pm$ SEM). Eight plants per replicate were used and experiments were triplicated. For all the single and double mutants  $p < 0.05$ , compared to WT plants. Because *ddb2-2* is in a different Arabidopsis ecotype, the single control mutants were selected as segregants from each double mutant involving *ddb2-2* and are indicated by \*. doi:10.1371/journal.pgen.1000093.g003

five minutes upon exposure to UV-C, we observed a clear enrichment of the DDB1A-GFP signal in nuclei of UV-C treated roots and this signal even increased up to 30 min (Figures 6A and 6B). The UV-C dependent nuclear shuttling of DDB1A suggests an upstream level of control of the CUL4-DDB1A-DDB2 complex.

Ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATM, ATR) kinases play a crucial role in sensing and transmitting DNA damage signals to downstream effectors of cell-cycle progression or DNA repair components. The response of ATR to UV lesions and stalled replication forks occurs independently of ATM, although both ATM and ATR have also cooperative roles [31]. Thus we investigated whether DDB1A nuclear shuttling depends on ATR. To do so, we engineered *ATR*-deficient plants (*atr-2*) expressing the DDB1A-GFP construct and monitored the DDB1A dynamics upon UV-C exposure. In contrast to the rapid DDB1A shuttling from the cytoplasm to the nucleus in WT plants, DDB1A-GFP remained excluded from the nucleus in UV-exposed *atr* deficient plants (Figures 6A and 6B). Thus we conclude that both DDB1A and DDB2 accumulate in the nuclei of cells upon UV-stress, most likely to promote excision repair and that this mechanism is dependent on ATR.

### DDB2 Protein Stability Is CUL4- DDB1A- and ATR-Dependent

In order to study the regulation of DDB2 stability in the context of DNA repair, the DDB2 protein content was determined upon exposure of WT, *CUL4*-, *DDB1A*- and *ATR*-deficient plants to UV-C. Both the endogenous DDB2 and the GFP-DDB2-tagged protein steady state levels in WT plants start to decrease between 30 min to 1 hour after UV-C treatment (Figure 6C and Figure S3). Two hours after UV-C treatment neither the DDB2 protein content (Figure S3B) nor the DDB1A subcellular localisation (data not shown) was re-established. As similar decrease in DDB2 protein content was observed when plants were treated with cisplatin (Figure S3A), which also induces bulky DNA lesions that are processed by the excision repair pathway. However, it is noteworthy that the decrease in the steady state level of DDB2 was only evident after 6 hours, most likely because the drug uptake by the plant and its genotoxic effects need more time, compared to UV-treatment. In contrast to UV and cisplatin treatments, no DDB2 decay was observed upon exposure of WT plants to hydrogen peroxide, that induces DNA lesions which are not predominantly repaired by the GGR-NER pathway (Figure S3A).



**Figure 4. Genetic interactions between CUL4, DDB1A, DDB2 and UVR2.** Ten-day-old single (*cul4-1*, *ddb1a-2*, *ddb2-2*, *phr1*) and double mutant plants (*cul4-1 phr1*, *ddb1a-2 phr1*, *ddb2-2 phr1*) were irradiated with UV-C (3000 J/m<sup>2</sup>) 3 times in row every 2 days. (A) Graph representing the average number of leaves. Counting was one week after the last UV-C exposure. At least 20 plants were used per replicate and this experiment was duplicated. T-test \* $p < 0.05$ , compared to WT plants. (B) Graph representing the percentage of bleached plants. Counting was 2 weeks after the last UV-C exposure. At least 20 plants were used per replicate and this experiment was duplicated. (C) Pictures showing the phenotype of plants 14 days after the last UV-C exposure (Bar = 1 cm). doi:10.1371/journal.pgen.1000093.g004

In human, DDB2 stability is controlled by the CUL4-based E3 ligase [32]. Therefore we tested whether CUL4 and DDB1A are essential components for UV-induced degradation of DDB2 *in vivo* by exposing Arabidopsis *CUL4*- and *DDB1A*-deficient plants to UV-C. Interestingly, DDB2 protein level remained stable and even slightly increased upon UV-C exposure in *cul4-1* and *ddb1a-2* mutant plants, suggesting that DDB2 is a target of the CUL4-DDB1A E3

ligase complex (Figure 6C and Figure S3C). Moreover, all our attempts to express GFP-DDB2 in either *cul4-1* or *ddb1a-2* mutant backgrounds failed leading to plant death, suggesting that DDB2's turnover is crucial for plant survival (data not shown).

As we showed that DDB1A shuttles from the cytoplasm to the nucleus upon UV-C exposure in an ATR-dependent manner (Figures 6A and 6B), we investigated whether a defect in this mechanism abolishes also DDB2 decay. Thus, *atr-2* mutant plants were irradiated with UV-C and DDB2 protein content was determined during a time course. Interestingly, no decay of DDB2 protein was observed (Figure 6C and Figure S3C), indicating a role for ATR in the regulation of DDB2 stability, most likely via the direct or indirect control of DDB1A shuttling to the nucleus.

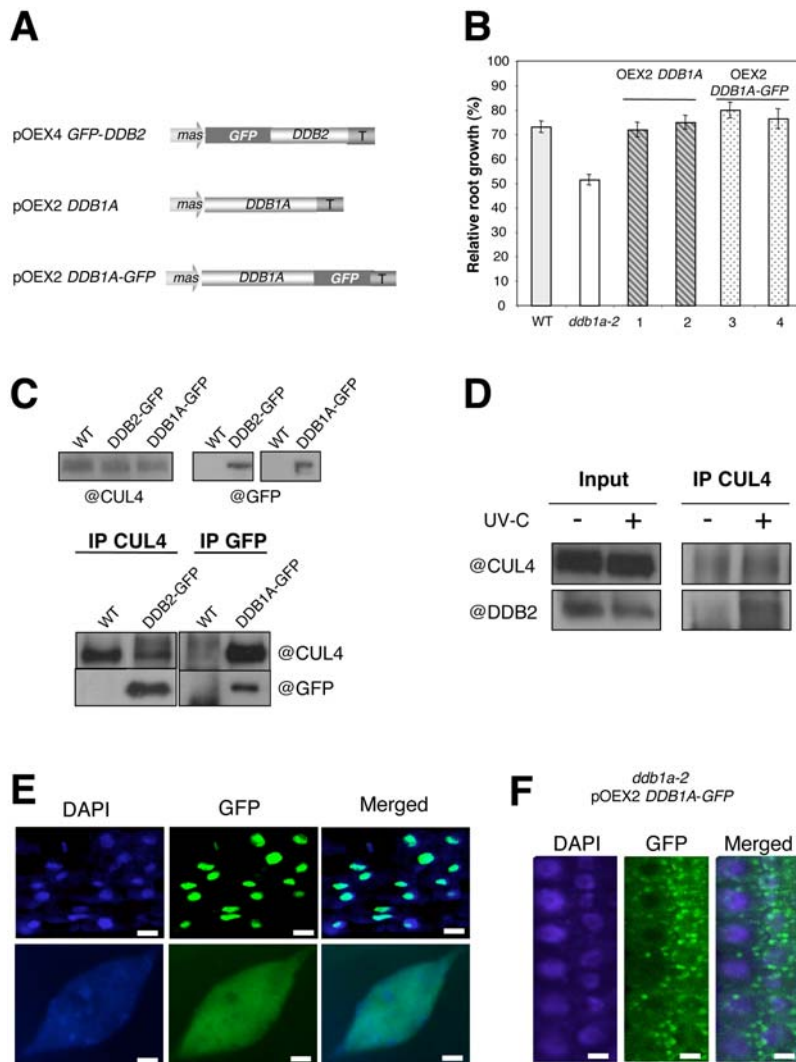
## Discussion

### A Role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in NER

Regulation of protein stability through the ubiquitin proteasome system (UPS) is a major mechanism underlying many cellular and organismal processes, such as cell division, signal transduction in hormonal and developmental pathways, immune defence and DNA repair, among others [33,34,35]. Ubiquitylation requires ubiquitin protein-ligases (E3s) that transfer ubiquitin to an internal lysine residue of the target protein. Among the different E3 enzymes, the composition of CUL4-based E3 ligases was only recently identified [36]. CUL4 binds RBX1 to recruit a specific E2 ubiquitin conjugating enzyme and also binds DDB1, an adaptor protein, which itself associates with substrate receptors. Affinity purification of CUL4 E3s from mammalian cells identified various WD40 proteins as possible substrate receptors [37,38–39,40]. These WD40 proteins interact with DDB1 through a DxR motif, but for most of them, their roles and substrates remain unknown.

Plant genomes contain also numerous WD40 proteins carrying the DxR motif [41], one of them is Arabidopsis DDB2. In human, a point mutation in the DxR motif (R273H) of DDB2 leads to the XPE genetic disorder by abolishing its interaction with DDB1 [8]. Although DDB1 is well conserved in plants and the fact that the DxR motif is present in the Arabidopsis DDB2 homolog, a similar point mutation did not abolish DDB1A-DDB2 interaction, at least in yeast. Therefore, it is possible that some characteristics of DDB1-DDB2 interaction differ in plant. However recombinant and purified human DDB2 (R273H) variant is also able to form a complex with DDB1 *in vitro* [42]. It will now be interesting to check the *in vivo* effects of the plant DDB2 (R273H) mutant. Arabidopsis DDB1A is also part of other protein complexes, which most likely do not contain DDB2. It was reported that DDB1A forms a complex with the ubiquitin-conjugating enzyme variant COP10 and the de-etiolated 1 (DET1) protein to regulate photomorphogenesis [43], possibly via a CUL4-dependent E3 ligase activity [44]. Thus it is likely that the dynamics of the different protein complexes involving CUL4 and DDB1A must be tightly controlled and that DDB1A is more abundant than its various substrate receptors, such as DDB2. It is noteworthy that the Arabidopsis genome encodes also a second DDB1-related protein, called DDB1B sharing 93% protein sequence similarity with DDB1A. However, it is still unknown whether DDB1B plays similar or distinct roles than DDB1A.

Overall, our data point to an involvement of CUL4, DDB1A and DDB2 as effectors of synthesis dependent repair of UV-C induced DNA damage as described in human cells. First, we showed that both Arabidopsis DDB1A and DDB2 co-immunoprecipitate with CUL4 from plant extracts, supporting the existence of a CUL4-DDB1A<sup>DDB2</sup> complex *in planta*. Second, mutations of *CUL4*, *DDB1A* and *DDB2* lead to plant hypersen-



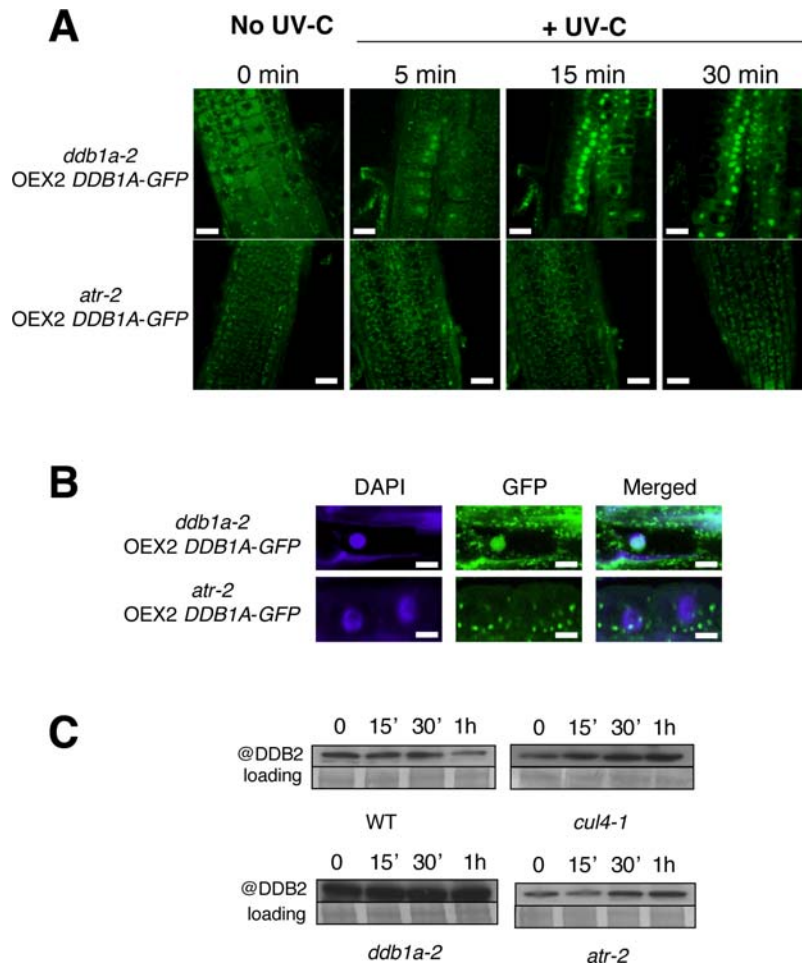
**Figure 5. DDB1A and DDB2 interaction with CUL4 and their subcellular localisation.** (A) Schematic representation of the constructs (mas: mannopine synthase; GFP: Green Fluorescent Protein; T: nos terminator). (B) Root growth assays showing complementation of *ddb1a-2* with either DDB1A or DDB1A-GFP ectopically expressed proteins. (C) *In vivo* pull down of CUL4 with DDB1A and DDB2 proteins. WT, pOEX4GFP-DDB2 and *ddb1a-2* pOEX2DDB1A-GFP plants were used for immunoprecipitation assays using either anti-CUL4 (Bernhardt et al., 2006) or anti-GFP antibodies. WT plants were used as controls. (D) *In vivo* pull down of CUL4 complex upon UV-C exposure. WT plants were used for immunoprecipitation assays using anti-CUL4 antibody. CUL4 and DDB2 were detected before (–) and 15 min upon UV-C exposure (+). (E) Localisation of GFP-DDB2 fusion protein in root cells using confocal microscopy (Bar = 50  $\mu$ m) and immunolocalisation in root cells (Bar = 5  $\mu$ m). (F) Localisation of DDB1A-GFP fusion protein in root cells using confocal microscopy (Bar = 25  $\mu$ m). All pictures are representative of 3 different experiments using independent transgenic lines. doi:10.1371/journal.pgen.1000093.g005

sitivity to bulky DNA lesions induced by UV-C or cisplatin. This is in agreement with the recently reported UV hypersensitive phenotype of DDB2-deficient plants [21]. Most importantly, we showed that cell extracts prepared from CUL4 and DDB2 deficient plants are less efficient in dark repair of UV-induced DNA damage. Third, the *cul4-1 cen2-2*, *ddb1a-2 cen2-2* and *ddb2-2 cen2-2* double mutant genetic analysis strongly suggests that CUL4, DDB1A and DDB2 act in the same pathway than CEN2, which was previously shown to be involved in the NER pathway and to interact with the Arabidopsis XPC homolog, AtRAD4 [22,45].

#### DDB1A Nuclear Shuttling and DDB2 Stability Regulated by the Protein Kinase ATR

In mammals, the recognition step of the NER pathway involves both the CUL4-DDB1-DDB2 and XPC-RAD23-CEN2 complex-

es [13]. Although DDB1-DDB2 binds DNA helix distortions with the highest affinity, its exact mode of action is still controversial. However, whether DDB2 directly recruits XPC to DNA lesions [13] or only creates a chromatin environment facilitating the assembly of NER components [15], it is believed that DDB2 needs to be degraded in order to allow efficient processing and repair of DNA lesions. In mammals, proteolysis of DDB2 is performed by the 26S proteasome and specifically depends on the CUL4-DDB1 E3 ubiquitin ligase [10,11–12,13–15]. Similarly to mammalian DDB2, the Arabidopsis homolog is also degraded after UV-stress by a mechanism that is CUL4-dependent. It is noteworthy that the plant DDB2 protein decay is only partial and starts as soon as 1 hour or even less after UV stress, which contrasts with the situation reported in some animal cells where DDB2 decay was only detected 2 to 4 hours upon UV exposure [15]. The rapid DDB2



**Figure 6. ATR-dependent DDB1A-GFP nuclear shuttling and DDB2 stability.** (A) DDB1A-GFP dynamics upon UV-C exposure ( $600 \text{ J/m}^2$ ) in WT (upper panel) and in *atr-2* mutant plant (lower panel). Bar =  $75 \mu\text{m}$ . Pictures are representative of 3 different experiments using 2 independent transgenic lines. (B) Higher magnification of DDB1A-GFP localisation 15 min upon UV-C exposure in either *ddb1a-2* or *atr-2* mutant backgrounds. Chromatin is stained by DAPI (blue). (C) Immunoblot revealing DDB2 content upon UV-C exposure ( $900 \text{ J/m}^2$ ) in WT, *cul4-1*, *ddb1a-2* and *atr-2* Arabidopsis plants. Coomassie blue staining was used as loading control.  
doi:10.1371/journal.pgen.1000093.g006

decay in plants compared to animals could be explained by the predominant role of the GGR repair process in cooperation with either direct repair or homologous recombination to maintain efficiently genome stability upon UV irradiation.

At present, little is known about the upstream signals leading to this degradation process and/or the factors controlling specifically the CUL4 E3 ligase activity. It is well described that neddylation/deneylation is a general and important process to regulate E3 ligases functions [46]. Indeed it was shown that COP9/signalosome regulate CUL4 activity [9]. However more specific mechanisms may also contribute to the control of the E3 ligase complexes. We showed in this study that a functional Arabidopsis DDB1A fluorescent protein localises predominantly in the cytoplasm in the absence of UV irradiation, which was puzzling for a protein supposed to act at the chromatin level. However, upon UV exposure DDB1A relocates rapidly into the nucleus. This observation raised the question of how DDB1A shuttling to the nucleus is controlled in order to contribute to an efficient DNA repair process. Experiments on transfected cells indicate that human DDB1 is also primarily located in the cytoplasm, but shows a dynamic nuclear accumulation induced by UV light [29,30]. Moreover, when DDB2 was co-expressed together with DDB1, the later protein showed increased accumulation in the

nucleus suggesting that DDB2 plays an active role in this translocation process. Interestingly, a recent study showed that the replication checkpoint protein Claspin is required for the turnover of DDB2 [47]. SiRNA-mediated knockdown of Claspin abolishes the degradation of DDB2 upon UV exposure and impairs its colocalization at damaged DNA sites. Claspin is required for activation of the ATR-mediated DNA damage checkpoint response, leading to arrest of DNA replication and inhibition of cell cycle progression [48]. This would suggest that crosstalk exists between cell cycle checkpoint and NER.

ATR plays a central role in cell-cycle regulation, transmitting DNA damage signals to downstream effectors [31]. Therefore the link between ATR signalling and DDB2 stability was investigated. Arabidopsis is a material of choice to study the role of ATR in DNA damage signalling because ATR deficient plants are viable [49] whereas lack of ATR expression is lethal in mammals [50]. Using an Arabidopsis *atr* mutant plant, we showed that in such a genetic background DDB2 was stabilised upon UV exposure, indicating a direct or indirect role for this signalling pathway in the control of the first step of the NER process. In addition, DDB1A shuttling from the cytoplasm to the nucleus upon UV exposure is also ATR-dependent, suggesting that this mechanism might control DDB2 turnover via the

assembly of the CUL4-DDB1A E3 ligase in the nucleus. Our results highlight the fact that ATR signalling controls another effector of the excision repair machinery in addition to XPA [51], a protein that is not conserved in plants. A similar shuttling upon UV exposure was already described for the Arabidopsis CEN2, another component of the GGR pathway and for the large subunit of the tobacco ribonucleotide reductase [45,52]. The control of DDB1A nuclear translocation by the ATR kinase and subsequently DDB2 turnover illustrates a novel and specific level of regulation of Cullin-based E3 ligase complex activity.

### Crosstalk of Different DNA Repair Pathways to Maintain Genome Integrity upon UV Stress

Plants have to take benefit of sunlight for photosynthesis, but at the same time, have also to face UV damages on DNA. Thus to maintain genome integrity, efficient DNA repair processes are needed. In contrast to mammals, plants have a specific DNA repair pathway, the direct DNA repair that is mediated by photolyases. In this pathway, UV-induced pyrimidine dimers are reversed without DNA excision in the presence of visible light [3]. In Arabidopsis two photolyases, PHR1 [4,5] and UVR3 [6] are specific for each type of UV induced DNA lesions, the CPDs and 6-4 photoproducts, respectively. It is believed that in green tissues and in presence of light the direct repair is the predominant pathway, whereas in absence of light the NER also called dark repair, is preferentially used. Using a genetic approach we found a synergistic genetic interaction between *CUL4*, *DDB1A*, *DDB2* and the photolyase *PHR1* regarding UV sensitivity. This strongly suggests that both pathways contribute together to efficiently repair UV lesions in green tissues and does not restrict the CUL4-DDB1A-DDB2 pathway to DNA repair in non-light exposed tissues (e.g., in roots). Moreover, based on our results (Figure 4), the restriction of the NER pathway to proliferating cells as previously suggested [53] also seems unlikely. In addition *CUL4*, *DDB1A* and *DDB2* are expressed in various Arabidopsis cell types including post-mitotic cells of mature leaves (unpublished data).

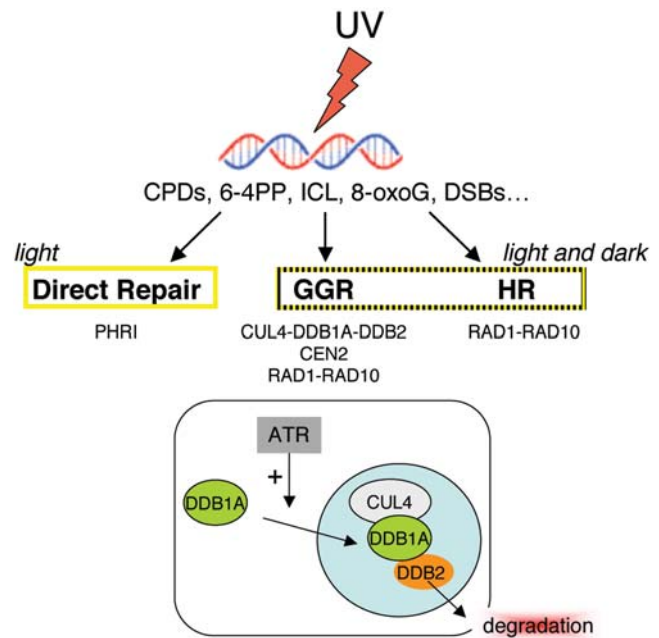
Interestingly, we also identified a synergistic genetic interaction between the components of the NER and RAD1-RAD10. Although the RAD1-RAD10 heterodimer is mainly known to be involved in the removal of bulky DNA lesions during the NER process, it was shown that these enzymes also contribute to the removal of non-homologous overhangs during HR in plants [26,27]. Moreover in *Saccharomyces cerevisiae*, mutations in RAD1 and in RAD10 reduce intra-chromosomal recombination [54,55]. The synergistic genetic interactions observed with the Arabidopsis *rad1* and *rad10* mutations stress the point that HR, in addition to NER, is activated to maintain genome integrity upon UV exposure.

It is noteworthy that UV radiations induce primarily CPDs and 6-4 photoproducts but also DSBs that need to be efficiently repaired. Moreover, Arabidopsis *PHR1* mutants or plants defective in NER, such as the *Atcen2* mutant [22] exhibit not only hypersensitivity to UV but also enhanced somatic homologous recombination frequency [56]. Taken together our data indicate that at least three different repair pathways (Figure 7), direct repair, NER and HR, cooperatively contribute to maintain genome integrity in different tissues upon exposure to UV. Hence, combined disruption of these pathways becomes dramatic for plant development and survival under UV stress conditions.

## Materials and Methods

### Plant Material and Growth Conditions

Arabidopsis mutant plants have been identified using the web assisted program: <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>.



**Figure 7. Schematic representation of DNA repair pathways in plant cells and control of DDB2 stability upon UV exposure.** As a consequence of UV irradiation, different types of DNA damage are produced such as cyclobutyl pyrimidine dimers (CPDs), (6-4) photoproducts (6-4 Pps, Inter/Intra Cross Link (ICL), 8-oxoG or even DNA double-strand breaks (DSBs). In order to repair these lesions different repair processes including Direct Repair, Homologous Recombination (HR) and Global Genome Repair (GGR) are activated. The GGR pathway involves the CUL4-DDB1A ubiquitin E3 ligase complex. Based on our data, we propose the following model: Under normal growth conditions DDB1A localises predominantly to the cytoplasm, whereas CUL4 and DDB2 are both located into the nucleus. Upon UV irradiation, DDB2 recognises bulky DNA lesions and DDB1A shuttles from the cytoplasm to the nucleus in an ATR-dependent manner (direct or indirect). This allows DDB2 degradation by the 26S proteasome and most likely permits subsequent steps of the excision repair process to occur efficiently.

doi:10.1371/journal.pgen.1000093.g007

*ddb1a-1* (SALK 055584), *ddb1a-2* (SALK 038757), *cen2-2* (SM-3-20758), *atr-2* (SALK 032841), *rad10* (SALK 077000), *rad1* [57], *phr1* (WiscDsLox 466C12) are in Columbia ecotype whereas *ddb2-2* (RATM53-3351-1) is in Nossen ecotype. The *cul4-1* mutant is described in [20]. For *in vitro* culture plants were germinated on GM medium (MS salts (Duchefa, The Netherlands), 1% sucrose, 0.8% agar, pH 5.8) in the presence or absence of a selectable agent. Plants were grown in a culture chamber under a 16h/8h photoperiod (22°C/20°C). For soil cultured plants, seeds were sown (20/pot) and put at 4°C in the dark during 3 days. The pots were transferred in greenhouse and kept under a regime of 16h/8h photoperiod (20°C/16°C; 70% humidity). At the 4 leaf developmental stage, plants were individualized and grown for further experiments.

### Molecular Characterisation of Insertion Lines and Production of Transgenic Plants

Single and double homozygous mutant plants were characterised by PCR (see supplemental material for details). The effect of the T-DNA or transposon on gene expression was determined by RT-PCR for *DDB1A* and western blotting for DDB2, respectively. Total RNA from WT plants or insertion lines was prepared using Trizol (GibcoBRL). The reverse transcription was

performed using 4.5 µg of total RNAs, hexamers and the Reverse Transcription kit (Applied Biosystems). The PCR reaction was performed in 50 µl reaction mixture containing 1 µl of the RT reaction mixture, 1.25U of ExTaq (Takara), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM of each dNTP and 2 µM of gene specific primers. The genes specific primers and PCR conditions are in supplemental material. For all genes different dilutions of the RT reaction mixture and number of PCR cycles were used to confirm that the PCR amplifications were within the linear range.

The pOEX2 and pOEX4 vectors [22] driving expression of DDB1A or DDB2, respectively, under the control of the mannopine synthase constitutive promoter were constructed. The cDNAs of Arabidopsis *DDB1A* and *DDB2* were amplified by PCR from the stock center clones (C104978 and U61992), sequenced and cloned into the pOEX2 and pOEX4 vectors, respectively between the *NcoI*-*AvrII* sites for DDB2 and *PmeI*-*AvrII* sites for DDB1A. For GFP fusion, the GFP coding sequence was inserted into the *NcoI* sites for pOEX4GFP-DDB2 fusion and *AvrII* site for pOEX2DDB1A-GFP fusion. The resulting plasmids pOEX2DDB1A, pOEX2DDB1A-GFP and pOEX4GFP-DDB2 were mobilized into *Agrobacterium tumefaciens* and used to transform Arabidopsis WT and *ddb1a-2* plants. *DDB1A* expression was verified by RT-PCR and *DDB1A-GFP* using primers combination e and f (see supplemental material).

### Treatment of Plants with DNA Damaging Agents

To evaluate the UV-C (254 nm) sensitivity, we used a root-growth assay. Three-day-old *in vitro* germinated WT and homozygous mutant plants were transferred to square plates containing GM medium and grown vertically for an additional day. Root length was measured 24h upon UV-C exposure (600 J/m<sup>2</sup>) using a Stratalinker (Stratagene). The relative root growth was calculated: (root length treated/ root length untreated)×100 (±SEM). Eight plants per replicate were used. Experiments were performed in triplicates. No significant differences in root growth were observed between all untreated mutants and WT plants under our growth conditions and at the time the plant material was analysed.

To evaluate the UV-C (254 nm) sensitivity on whole plants 1-week-old *in vitro* germinated WT and homozygous mutant plants were irradiated with UV-C (3000 J/m<sup>2</sup>) 3 times in row every 2 days using a Stratalinker (Stratagene). Plants were immediately returned to the growth chamber. The bleached phenotype was observed one week later. At least 20 plants per replicate were used and the experiment was duplicated.

For treatment with Cisplatin (Cis) and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 10 day-old Arabidopsis seedlings were transferred from solid GM plates into 24-well culture plates placed in sterile liquid GM medium containing 0; 0.1; 0.5; 1; 5 and 10 µM of Cisplatin (Sigma) or 0; 1.25; 2.5; 3.75 and 5 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma). The use of different concentrations allowed us to check the linear range of the treatment. The relative weight was calculated: (weight treated/ weight untreated)×100 (±SEM) for the most representative concentration (5 µM Cisplatin and 2.5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Eight plants per concentration were used. Experiments were performed in triplicates.

### In vitro Repair Assay

The *in vitro* repair assay according to [24] was performed on cell extracts prepared from *cul4-1*, *ddb2-2* Arabidopsis mutant plants and from WT as control. The pGEX and pBSK plasmids were linearised using the *SmaI* restriction enzyme and purified using the Gel extraction kit (Qiagen). The pGEX-linearised plasmid was either UV-C damaged (450 J/m<sup>2</sup>) using the Stratalinker (Stratagene) and used as repair substrate. The non-damaged pBSK-linearised plasmid was used as internal control. Fifteen µg of protein extracts were used per time point and mixed with 200 ng

of damaged plasmid (pGEX) and 300 ng of non-damaged plasmid (pBSK). The reaction was stopped 30 min, 1 h or 2 h after incubation by rapid frozen into liquid nitrogen. Plasmids were purified using the Gel extraction kit (Qiagen) and separate by electrophoresis on a 0.8% agarose gel. DNA was transferred to a nylon membrane (Roche) by capillary transfer and DIG detection procedures were performed using the DIG Nucleic Acid Detection kit (Roche) according the manufacturer's instruction.

### Microscopy Analysis and Immunolocalisation

Roots of vertically grown one week-old *in vitro* germinated WT and pOEX4 GFP-DDB2 plants were excised and images were captured as a stacked series using the Axiovert 100M confocal microscope (Zeiss). For immunolocalisation roots were excised, fixed and immunostained using the anti-GFP antibody (Clontech) as described in [58]. Roots of DDB2-GFP plants were fixed during 45 min in 4% formaldehyde prepared in 1×PME (50 mM Pipes, 5 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 mM EGTA, pH 6.9) and washed 5 times 5 min in 1×PME. Roots were digested for 45 min in a 0.3% (w/v) cellulase, 0.3% (w/v) pectolyase solution (Onuzuka RS cellulase) prepared in 1×PME and washed 5 times for 5 min with 1×PME. Root tips were squashed onto poly-lysine-coated slides and allowed to air dry. Slides were rehydrated in 1×PME and incubated for 15 min with 0.5% Triton X-100 (Sigma) in 1×PME and rinsed with 1×PME. Slides were incubated 3 times 5 min in 1×PME and immersed in -20°C methanol for 10 min. Slides were rinsed in 1×PBS for 10 min and washed 3 times 5 min in 1×PBS at room temperature, then incubated with the monoclonal anti-GFP antibody (Clontech). Antibody was diluted 1:750 in 3% BSA, 0.05% Tween-20, 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in 1×PBS. Hundred µl of diluted primary antibody were applied to each slide for 3 h at room temperature. Slides were washed 3 times 5 min in 1×PBS and incubated for 3 h at room temperature in presence of 100 µl of FITC-conjugated goat anti-mouse secondary antibody diluted in (1:1000) in 3% BSA, 0.05% Tween-20, 0.02% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> in 1×PBS dilution solution. Slides were washed as before and mounted in DAPI-containing mounting medium (Vectashield, Vector). Nuclei were visualized using a Nikon E800 fluorescence microscope.

For monitoring DDB1A dynamics, roots of vertically grown one week-old *in vitro* germinated *ddb1a-2* pOEX2DDB1A-GFP plants were irradiated with UV-C at 600 J/m<sup>2</sup> using a the Stratalinker (Stratagene) and images were captured every 5 min during the first hour following UV-C exposure.

### Antibodies and Immunoblotting

A peptide of 16 amino acids (DLPSREIVHSNDFNRH) was synthesised and used to immunise rabbit. The antiserum was immunopurified against the peptide according the protocol of BIOMOL.

For determining DDB2 content, 2-week-old germinated WT, *cul4-1* and *atr-2* plants were grown *in vitro* on GM medium. Plants were UV-C irradiated (900 J/m<sup>2</sup>) using the Stratalinker (Stratagene). Eight plants per time point (before irradiation, 15 min, 30 min, 1 h and 2 h after irradiation) were harvested. Total protein was prepared using a denaturing buffer. Twenty µg of total protein were separated by SDS gel and blotted onto Immobilon-P membrane (Millipore). The anti-peptidic anti-AtDDB2 antibody was used to 1/1000 dilution. Quantification of protein content was performed using the Image J software relative to the loading controls.

### List of Primers Used in This Study

- a: TTTGGTATGGCTTTTACTTCCTG
- b: TGGTCATCTGATATATTGCTTCC

c: TGAGAGACCATAACCATCTTCTAGC  
 d: GATGTGCAAAGCCCCTATTG  
 e: GGAAAATGAACCAACTAAGGAAGG  
 f: TTGATTGATGATTGATTTGACTC  
 g: GATTCAAGATTGATGATCCATTCCAC  
 h: AAAATCCTCACGACGTGTCAG  
 LBa1: TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG  
 LBB1: GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT  
 Ds5: TCCGTTCCGTTTTTCGTTTTTTAC  
 Ds3: CCGGATCGTATCGGTTTTTCG

## Supporting Information

**Figure S1** UV-C sensitivity of DDB1A and DDB2 overexpressing plants and mutants sensitivities to Cisplatin and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (A) Root-growth assay. One-week-old *DDB1A* and *DDB2* independent overexpressor lines and WT control plants were exposed to 900 J/m<sup>2</sup> of UV-C. Root growth was measured 24h following irradiation. Eight independent plants were analysed per lines and the experiment was performed in triplicates. (B) One-week-old mutant (*cul4-1*, *ddb1a-2*, *ddb2-2*), and WT control plants were cultured in presence of 5 μM of Cisplatin. Weight was measured one week after. Relative weight was calculated relative to the corresponding untreated plants (±SEM). Eight plants per replicate were used and experiments were triplicated. For all mutants  $p < 0.05$ , compared to WT plants. (C) One-week-old mutant (*cul4-1*, *ddb1a-2*, *ddb2-2*), and WT control plants were cultured in presence of 2.5 mM of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Weight was measured one week after. Relative weight was calculated relative to the corresponding untreated plants (±SEM). Eight plants per replicate were used and experiments were triplicated. For all mutants no significant difference was found compared to WT plants.

## References

- Puchta H, Hohn B (1996) From centiMorgans to base pairs: homologous recombination in plants. *Trends Plant Sci* 1: 340–348.
- Sancar A (1996) DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* 65: 43–81.
- Britt AB (1999) Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci* 4: 20–25.
- Ahmad M, Jarillo JA, Klimczak LJ, Landry LG, Peng T, et al. (1997) An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photo reactivation in Arabidopsis. *Plant Cell* 9: 199–207.
- Jiang CZ, Yee J, Mitchell DL, Britt AB (1997) Photorepair mutants of Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 7441–7445.
- Nakajima S, Sugiyama M, Iwai S, Hitomi K, Otoshi E, et al. (1998) Cloning and characterization of a gene (*UVR3*) required for photorepair of 6-4 photoproducts in Arabidopsis thaliana. *Nucl Acids Res* 26: 638–644.
- Shuck SC, Short EA, Turchi JJ (2008) Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res* 18: 64–72.
- Chu G, Chang E (1988) Xeroderma pigmentosum group E cells lack a nuclear factor that binds to damaged DNA. *Science* 242: 564–567.
- Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, et al. (2003) The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* 113: 357–367.
- Chen X, Zhang Y, Douglas L, Zhou P (2001) UV-damaged DNA-binding proteins are targets of CUL4A-mediated ubiquitination and degradation. *J Biol Chem* 276: 48175–48182.
- Nag A, Bondar T, Shiv S, Raychaudhuri P (2001) The xeroderma pigmentosum group E gene product DDB2 is a specific target of cullin 4A in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21: 6738–6747.
- Rapic-Otrin V, McLenigan MP, Bisi DC, Gonzalez M, Levine AS (2002) Sequential binding of UV DNA damage binding factor and degradation of the p48 subunit as early events after UV irradiation. *Nucl Acids Res* 30: 2588–2598.
- Sugasawa K, Okuda Y, Saijo M, Nishi, et al. (2005) UV-induced ubiquitylation of XPC protein mediated by UV-DDB-ubiquitin ligase complex. *Cell* 121: 387–400.
- El-Mahdy MA, Zhu Q, Wang QE, Wani G, Praetorius-Ibba M, et al. (2006) Cullin 4A-mediated proteolysis of DDB2 protein at DNA damage sites regulates in vivo lesion recognition by XPC. *J Biol Chem* 281: 13404–13411.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000093.s001 (0.63 MB TIF)

**Figure S2** DxR-mutated DDB2 binds DDB1A in yeast. (A) Schematic representation of DDB2 carrying four WD40 domains. The DxR motif at the end of the third WD40 domain is indicated as well as the point mutation R343H used for the yeast two-hybrid assay. (B) Yeast two-hybrid interaction between DDB1A and DDB2 and its mutated version (R343H). No auto-activation by the single plasmids was observed when the yeast strains were grown on LTA medium.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000093.s002 (0.78 MB TIF)

**Figure S3** Steady state of GFP-DDB2 protein levels and quantification of DDB2 protein levels upon various genotoxic stresses. (A) Immunoblot revealing GFP-DDB2 content of pOEX4GFP-DDB2 Arabidopsis transgenic plants upon exposure to UV-C (900 J/m<sup>2</sup>), Cisplatin (10 μM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM). Coomassie blue staining was used as loading control. (B) Immunoblot revealing DDB2 content in WT plant up to 2 h following UV-C exposure and the quantification of DDB2 protein levels normalised to the loading controls. (C) Graphs representing the quantification of DDB2 protein levels normalised to the loading controls upon exposure to UV-C in WT plants and in the different mutant backgrounds used. Quantifications are representative of 2 independent experiments, one of them is presented in Figure 6C.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000093.s003 (0.82 MB TIF)

## Acknowledgments

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: JM PG. Performed the experiments: JM EL ED. Analyzed the data: JM PG. Contributed reagents/materials/analysis tools: EL. Wrote the paper: PG.



27. Dubest S, Gallego ME, White CI (2004) Roles of the AtErcc1 protein in recombination. *Plant J* 39: 334–342.
28. Puchta H, Swoboda P, Gal S, Blot M, Hohn B (1995) Somatic intrachromosomal homologous recombination events in populations of plant siblings. *Plant Mol Biol* 28: 281–292.
29. Shiyonov P, Hayes SA, Donepudi M, Nichols AF, Linn S, et al. (1999) The naturally occurring mutants of DDB are impaired in stimulating nuclear import of the p125 subunit and E2F1-activated transcription. *Mol. Cell Biol* 19: 4935–4943.
30. Liu W, Nichols AF, Graham JA, Dualan R, Abbas A, et al. (2000) Nuclear transport of human DDB protein induced by ultraviolet light. *J Biol Chem* 275: 21429–21434.
31. Shiloh Y (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* 31: 402–410.
32. Huang TT, D'Andrea AD (2006) Regulation of DNA repair by ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 323–334.
33. Ciechanover A, Orian A, Schwartz AL (2000) Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 22: 442–451.
34. Pickart CM (2001) Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70: 503–533.
35. Smalle J, Vierstra RD (2004) The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. *Annu Rev Plant Biol* 55: 555–590.
36. Higa LA, Zhang H (2007) Stealing the spotlight: CUL4-DDB1 ubiquitin ligase docks WD40-repeat proteins to destroy. *Cell Div* 2: 5.
37. Jin J, Arias EE, Chen J, Harper JW, Walter JC (2006) A family of diverse Cul4-Ddb1-interacting proteins includes Cdt2, which is required for S phase destruction of the replication factor Cdt1. *Mol Cell* 23: 709–721.
38. Angers S, Li T, Yi X, MacCoss MJ, Moon RT, et al. (2006) Molecular architecture and assembly of the DDB1-CUL4A ubiquitin ligase machinery. *Nature* 443: 590–593.
39. Higa LA, Wu M, Ye T, Kobayashi R, Sun H, et al. (2006) CUL4-DDB1 ubiquitin ligase interacts with multiple WD40-repeat proteins and regulates histone methylation. *Nat Cell Biol* 8: 1277–1283.
40. He YJ, McCall CM, Hu J, Zeng Y, Xiong Y (2006) DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev* 20: 2949–2954.
41. Lee JH, Terzaghi W, Gusmaroli G, Charron JB, Yoon HJ, et al. (2008) Characterization of Arabidopsis and Rice DWD Proteins and Their Roles as Substrate Receptors for CUL4-RING E3 Ubiquitin Ligases. *Plant Cell* 1: 152–67.
42. Wittschieben BØ, Iwai S, Wood RD (2005) DDB1-DDB2 (xeroderma pigmentosum group E) protein complex recognizes a cyclobutane pyrimidine dimer, mismatches, apurinic/apyrimidinic sites, and compound lesions in DNA. *J Biol Chem* 280: 39982–39989.
43. Yanagawa Y, Sullivan JA, Komatsu S, Gusmaroli G, Suzuki G, et al. (2004) Arabidopsis COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes Dev* 18: 2172–2181.
44. Chen H, Shen Y, Tang X, Yu L, Wang J, et al. (2006) Arabidopsis CULLIN4 Forms an E3 Ubiquitin Ligase with RBX1 and the CDD Complex in Mediating Light Control of Development. *Plant Cell* 18: 1991–2004.
45. Liang L, Flury S, Kalck V, Hohn B, Molinier J (2006) CENTRIN2 interacts with the Arabidopsis homolog of the human XPC protein (AtRAD4) and contributes to efficient synthesis-dependent repair of bulky DNA lesions. *Plant Mol Biol* 61: 345–356.
46. Parry G, Estelle M (2004) Regulation of cullin-based ubiquitin ligases by the Nedd8/RUB ubiquitin-like proteins. *Semin Cell Dev Biol* 15: 221–229.
47. Praetorius-Ibba M, Wang QE, Wani G, El-Mahdy MA, Zhu Q, et al. (2007) Role of Claspin in regulation of nucleotide excision repair factor DDB2. *DNA Repair* 6: 578–587.
48. Freire R, van Vugt MA, Mamely I, Medema RH (2006) Claspin: timing the cell cycle arrest when the genome is damaged. *Cell Cycle* 5: 2831–2834.
49. Culligan K, Tissier A, Britt A (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* 16: 1091–1104.
50. Brown EJ, Baltimore D (2000) ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev* 14: 397–402.
51. Wu X, Shell SM, Liu Y, Zou Y (2007) ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene* 26: 757–764.
52. Lincker F, Philipps G, Chabouté ME (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.
53. Kimura S, Tahira Y, Ishibashi T, Mori Y, Mori T, et al. (2004) DNA repair in higher plants; photo reactivation is the major DNA repair pathway in non-proliferating cells while excision repair (nucleotide excision repair and base excision repair) is active in proliferating cells. *Nucl Acids Res* 32: 2760–2767.
54. Prado F, Aguilera A (1995) Role of reciprocal exchange, oncended invasion crossover and single-strand annealing on inverted and direct repeat recombination in yeast: different requirements for the RAD1, RAD10, and RAD52 genes. *Genetics* 139: 109–123.
55. Fidantsef AL, Mitchell DL, Britt AB (2000) The Arabidopsis UVH1 gene is a homolog of the yeast repair endonuclease RAD1. *Plant Physiol* 124: 579–586.
56. Ries G, Heller W, Puchta H, Sandermann H, Seidlitz HK, et al. (2000) Elevated UV-B radiation reduces genome stability in plants. *Nature* 406: 98–101.
57. Liu Z, Hossain GS, Islas-Osuna MA, Mitchell DL, Mount DW (2000) Repair of UV damage in plants by nucleotide excision repair: Arabidopsis UVH1 DNA repair gene is a homolog of Saccharomyces cerevisiae Rad1. *Plant J* 21: 519–528.
58. Friesner JD, Liu B, Culligan K, Britt AB (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.

## **Rôle du complexe CUL4-DDB1 dans le contrôle du développement embryonnaire chez *Arabidopsis thaliana***

La stabilité de nombreuses protéines est régulée par la protéolyse ubiquitine-dépendante, qui participe ainsi au contrôle d'un large éventail de processus physiologiques chez tous les eucaryotes. La spécificité de ce mécanisme repose sur l'action des ubiquitine-E3 ligases, qui permettent la reconnaissance et l'ubiquitination des protéines cibles afin de les conduire au protéasome 26S, lieu de leur dégradation. Parmi ces différentes enzymes E3, une nouvelle classe d'ubiquitine ligases, renfermant la CUL4, a été récemment identifiée. Elles se présentent sous forme de complexes composés des sous-unités CUL4, DDB1 et d'une protéine à domaine WD40, nommée DCAF, qui agirait en tant que récepteur des protéines cibles. Ces CUL4 jouent des rôles importants au niveau chromatinien qui incluent la réparation de l'ADN chez les métazoaires et les plantes, ainsi que le maintien de l'état silencieux de l'hétérochromatine chez la levure. Parmi les récepteurs éventuels des substrats des CUL4, nous avons identifié MSI1, un membre d'une famille de protéines conservée au cours de l'évolution. Ces protéines MSI-like appartiennent à différents complexes multiprotéiques, incluant le complexe PRC2, un régulateur négatif de l'expression de plusieurs gènes.

Les résultats obtenus et décrits dans ce mémoire mettent en évidence une interaction physique entre les protéines MSI1 et DDB1A d'*Arabidopsis* suggérant l'existence d'un complexe multimérique incluant la CUL4. De plus, les mutants perte de fonction *cul4* et *ddb1* présentent un phénotype d'embryon létalité mais contrairement au mutant *msi1*, sont incapables de développer un albumen en absence de pollinisation. Néanmoins, l'empreinte parentale du gène *MEDEA*, une cible directe du complexe PRC2 d'*Arabidopsis*, est dérégulée dans les mutants *cul4*. Au sein de ces mutants, une accumulation des transcrits du gène ainsi que de la protéine *MEDEA* a également été relevée suggérant l'implication du complexe CUL4 dans le contrôle de la répression de *MEDEA*. Dans l'ensemble, cette étude fournit pour la première fois une preuve de l'existence d'un lien fonctionnel entre une E3 ligase et le complexe PRC2 conduisant à l'implication de l'ubiquitination dans la répression de certains gènes.

## **The CUL4-based E3 ligase is involved in the regulation of embryo development in *Arabidopsis thaliana***

Regulation of protein stability by the ubiquitin proteasome system participates in a broad variety of physiologically and developmentally controlled processes in all eukaryotes. In this pathway, a critical step involves ubiquitin ligases (E3s), which facilitate the transfer of ubiquitin moieties to a substrate protein which is then targeted for degradation by the 26S proteasome. Among the different E3 enzymes, a novel class of cullin-containing ubiquitin ligases composed of CUL4, DDB1, and one WD40 protein, believed to act as a substrate receptor and named DCAF, was recently identified. CUL4-Ring E3 ligases (CRL4) play important functions at the chromatin level, including responses to DNA damage in metazoans and plants and, in fission yeast, in heterochromatin silencing. Among putative CRL4 receptors we identified MSI1, which belongs to an evolutionary conserved protein family. MSI1-like proteins contribute to different protein complexes, including the epigenetic regulatory Polycomb Repressive Complex2 (PRC2). Here we provide evidence that *Arabidopsis* MSI1 physically interacts with DDB1A and is part of a multimeric protein complex including CUL4. *CUL4* and *DDB1* loss-of-function mutants are embryo lethal, but in contrast to the *msi1* mutant do not show autonomous endosperm development in the absence of fertilization. Nevertheless, parental imprinting of *MEA*, a target gene of the *Arabidopsis* PRC2 complex, is lost in *CUL4*-deficient plants. In addition, after pollination both *MEA* transcript and protein accumulate in a *cul4* mutant background. Overall, our work provides the first evidence of a physical and functional link between an E3 ligase and a PRC2 complex thus indicating a role of ubiquitination in the repression of gene expression.