



HAL
open science

Caractérisation fonctionnelle de TCTP et CSN4 dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et de la croissance mitotique chez *Arabidopsis thaliana*

Garance Pontier

► To cite this version:

Garance Pontier. Caractérisation fonctionnelle de TCTP et CSN4 dans la régulation de la progression du cycle cellulaire et de la croissance mitotique chez *Arabidopsis thaliana*. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSEN065 . tel-03115367

HAL Id: tel-03115367

<https://theses.hal.science/tel-03115367>

Submitted on 19 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Numéro National de Thèse : **2020LYSEN065**

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée par
l'Ecole Normale Supérieure de Lyon

Ecole Doctorale N° 340
Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire (BMIC)

Spécialité de doctorat : Biologie végétale
Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Soutenue publiquement le 13/11/2020, par :
Garance PONTIER

Caractérisation fonctionnelle de TCTP et CSN4
dans la régulation de la progression du cycle
cellulaire et de la croissance mitotique chez
Arabidopsis thaliana

Devant le jury composé de :

Chabouté, Marie-Edith
Gallois, Jean-Luc
Zubieta, Chloé
Roudier, François
Bendahmane, Mohammed
Szécsi, Judit

DR, IBMP Strasbourg
DR, INRAE Avignon
DR, LPCV Grenoble
PU, ENS Lyon
DR, ENS Lyon
IR, ENS Lyon

Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse
Co-encadrante de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement tous les membres du jury qui ont pris de leur temps pour lire, évaluer et discuter de mon travail.

À Mohammed et Judit pour avoir encadré cette thèse et aussi plus largement pour m'avoir soutenue et formée; pour avoir aidé la petite L3 qui était arrivée dans l'équipe Morphoflo il y a si longtemps et l'avoir fait grandir jusqu'à la soutenance de cette thèse. Pour votre attention et votre compréhension dans les moments où tout va bien et surtout dans les autres... Notamment, un grand merci pour votre soutien lorsque j'ai passé l'agrégation pendant mon stage de M2. En quelques mots : merci de m'avoir fait confiance au long de ces années.

À Léo qui a su me transmettre son travail pour que je puisse progressivement en faire le mien.

À Véro, sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est actuellement. Pour ton aide précieuse, que ce soit pour les qPCR, clonages, génotypages et autres, aide qui a grandement augmenté mes capacités d'organisation... Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi !

À tous les membres de l'équipe Morphogenèse Florale passés et actuels que j'ai eu la chance de côtoyer plus ou moins longtemps. Merci pour votre accueil, votre gentillesse et votre soutien scientifique (et bon pour les petits déjeuners d'équipe aussi quand même).

Aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, Thomas, Sarah et Catherine. Cette thèse a pu s'appuyer sur votre aide et votre enthousiasme, que ce soit pendant une semaine ou plusieurs mois.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse : Cécile Raynaud, Bertrand Mollereau et Fabrice Besnard pour le suivi pendant ces trois ans. Ma thèse doit beaucoup à vos conseils et vos encouragements. Une mention particulière à Cécile pour la collaboration sur les tests d'activité kinase des complexes CDK/CYC et les premiers résultats très prometteurs.

Enfin, je ne peux pas citer tous ceux qui m'ont aidé scientifiquement et humainement au détour d'un couloir, d'un café ou de longues heures en salle de crible et de récolte des graines. Alors je remercie de tout cœur l'ensemble du labo pour l'ambiance de travail chaleureuse et pour la facilité à trouver quelqu'un prêt à donner un coup de main à toute heure de la journée. Je citerai quand même l'équipe culture : Alexis Lacroix, Justin Berger et Patrice Bolland que mes revendications anti-puceron n'ont pas trop embêté j'espère et l'équipe logistique : Hervé Leyral et Isabelle Desbouchages pour les milieux autoclavés au petit matin quand je dormais tranquillement...

Je remercie aussi le département de biologie de l'ENS, qui après m'avoir accueillie comme élève a su me faire une place comme enseignante. À tous ceux qui m'ont fait confiance pour enseigner leurs UE, notamment Déborah Prévot, Aurélie Vialette, Cendrine Moskalenko, Marie Sémon, Fabien Mongelard, Jean-Nicolas Volff et François Roudier. À tous ceux avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et avec qui j'ai pris un réel plaisir à collaborer.

À tous ceux qui ont été mes co-bureaux au cours de ces années et qui ont sûrement réalisé que j'ai tendance à parler à voix haute en travaillant... Pour toutes les discussions scientifiques ou pas qui nous ont enrichies mutuellement. Et mention spéciale au poulailler et assimilés, sachez que, malgré toutes les fois où je vous ai snobé pour cause d'aqualicorne, vous avez été et restez des amis formidables.

Aux co-bureaux officieux, ceux du confinement et de la rédaction de thèse, parce que ça n'a pas dû être toujours être facile d'entendre des "Non je travaille" à longueur de journée et de repousser les repas. Merci pour les thés, les pauses goûters, les soirs et les week-ends. Vous avez tous été un soutien incroyable par votre présence, par la fonction grammaire intégrée pour certains et liste des abréviations pour d'autres et j'en passe.

À ma famille, et avant tout à mes parents, qui ont dû supporter cet exil lyonnais. Soyez sûrs que, même si les visites dans le Sud et nouvelles ont pu se faire rares, vous étiez présents dans mon cœur.

À tous mes amis de Lyon et d'ailleurs, parce que je n'aurai pas pu rêver meilleur soutien. Je ne peux bien entendu pas tous vous citer, mais sentez-vous tous visés par ces remerciements. Que vous apparteniez ou pas à une de si nombreuses générations d'aumônerie que j'ai eu le privilège de fréquenter, que je vous connaisse ou pas depuis des années et des années ou que j'ai eu l'occasion ou pas de vous battre à la bâtarde ou à tout autre jeu de société, merci du fond du cœur.

J'espère que toutes les personnes avec qui j'ai eu la chance de passer du temps de travail ou autre durant ces trois années y auront pris le même plaisir que moi et à tous ceux que j'ai pu blesser de quelque manière que ce soit, j'en demande pardon.

À tous ceux qui liront ces pages, merci d'avoir prêté attention à mon travail.

Ma dernière phrase sera pour dédier cette thèse à mon papa.

Quod scripsi, scripsi.

Résumé

Chez les plantes comme chez les animaux, la taille des organes est une caractéristique cruciale dépendant de différents processus que sont la prolifération, la croissance, la différenciation et la mort cellulaires. Ces processus sont très précisément contrôlés et beaucoup de leurs régulateurs clefs sont fortement conservés chez les eucaryotes. Parmi eux, TRANSLATIONNALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP), une protéine régulée lors de sa traduction, est connue pour jouer un rôle essentiel dans le développement des organes. En effet, la perte de fonction de *TCTP* entraîne une létalité embryonnaire à la fois chez la souris, la drosophile et *Arabidopsis thaliana*. Il a été montré que TCTP contrôle la progression du cycle cellulaire notamment au niveau de la transition G1/S. Chez les animaux, les voies d'action de TCTP sont bien décrites et notamment son inhibition du répresseur de tumeur p53. Au contraire, chez les plantes, les voies d'action de TCTP restent moins bien décrites.

Afin de comprendre plus précisément les mécanismes par lesquels TCTP contrôle la progression du cycle cellulaire chez *Arabidopsis thaliana*, une étude à laquelle j'ai participé a permis d'identifier CSN4, une sous-unité du complexe CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME (CSN), comme interacteur de TCTP. Le complexe CSN régule l'activité, l'assemblage et la stabilité des complexes CULLIN-RING UBIQUITIN LIGASES (CRL), une classe majeure d'E3-ubiquitine ligases. Les CRL sont donc impliqués dans la dégradation par la voie Ubiquitine/protéasome de nombreux substrats dont des régulateurs clefs du cycle cellulaire. CSN régule les CRL grâce à son activité enzymatique de déneddylation : il enlève le peptide NEDD8 (une modification post-traductionnelle) de la sous-unité CULLINE (CUL) des CRL.

De plus, l'étude à laquelle j'ai participé a montré que TCTP et CSN4 interagissent physiquement et génétiquement pour contrôler le développement des organes. En outre, le niveau de *TCTP* influe sur le niveau de neddylation de CUL1 chez *A. thaliana* mais également chez *Drosophila melanogaster*. Ainsi, un modèle a été établi, proposant que TCTP régule la progression du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S en inhibant l'activité de déneddylation de CSN de par son interaction avec CSN4. Ma thèse vise donc à préciser ce modèle pour clarifier la voie d'action de TCTP sur la progression du cycle cellulaire.

Dans une première partie, j'ai caractérisé l'interaction physique entre AtTCTP et AtCSN4 notamment par des approches de co-immunoprécipitation chez *A. thaliana* et de BiFC dans des feuilles de tabac. J'ai montré que celle-ci n'implique pas le domaine PCI de AtCSN4, domaine permettant son interaction avec les autres sous-unités de CSN. De plus, l'interaction AtTCTP/AtCSN4 est relativement spécifique et n'est pas étendue à tous les CSN. Chez *A. thaliana*, elle se fait en dehors du complexe CSN puisque qu'elle ne concerne pas AtCSN5, la sous-unité catalytique. Au contraire, dTCTP (séquence de *TCTP* venant de *D. melanogaster*) interagit avec AtCSN5, laissant paraître une potentielle différence entre les voies de régulation végétales et animales.

Dans une deuxième partie, j'ai précisé l'impact de AtTCTP et AtCSN4 sur le développement chez *A. thaliana*, notamment sur le développement embryonnaire. Comme chez les mutants *tctp*, j'ai ainsi mis en évidence l'existence d'un délai embryonnaire non accompagné de défaut morphologique majeur chez les mutants *csn4*. Ce délai est moins important que celui des mutants *tctp* puisque les mutants *csn4* parviennent à se développer et à atteindre la maturité. Les plantules *csn4* présentent ensuite un phénotype pléiotrope et meurent une dizaine de jours après germination. Parmi les déficiences observées, se retrouvent des défauts de réponse à l'auxine qui ne sont pas présents chez les mutants *tctp*. Cela confirme que les effets de la perte

de fonction de *AtCSN4* sont plus divers que ceux de la perte de fonction de *AtTCTP* et qu'ainsi la protéine AtTCTP ne régulerait qu'une sous-partie des fonctions de CSN.

Enfin, dans une troisième partie, j'ai cherché à préciser le rôle de l'interaction AtTCTP/AtCSN4 pendant la progression du cycle cellulaire. En étudiant le niveau d'expression de certains régulateurs clefs du cycle cellulaire, j'ai mis en évidence que les défauts associés à la dérégulation d'*AtCSN4* sont variés et non limités à la transition G1/S contrairement à ceux liés à la perte de fonction d'*AtTCTP* qui touchent uniquement certains régulateurs de la transition G1/S comme *CYCD7;1* et *KRP6*. De plus, l'activité kinase des CDK/CYC semble diminuée chez *csn4* et *tctp*. Pour mieux comprendre le lien entre AtTCTP/AtCSN4, la neddylation et le cycle cellulaire, j'ai également étudié le niveau d'ubiquitination global des différentes lignées. Celui-ci est augmenté chez *csn4-2035*, en cohérence avec le rôle de CSN dans la déneddylation, et paraît constant chez *tctp*. J'ai également mené une étude protéomique globale pour identifier les protéines dérégulées chez les mutants *tctp* et *csn4-2035*. Il est intéressant de noter un effet contraire, similaire à ce qui est observé au niveau de la neddylation de CUL1, avec un enrichissement de protéines impliquées notamment dans la traduction à la fois parmi celles surexprimées chez *tctp-2* et celles sous-exprimées chez *csn4-2035*.

Les travaux durant ma thèse apportent de nouvelles connaissances sur les mécanismes par lesquels TCTP régule la transition G1/S du cycle cellulaire en association avec CSN4 et ouvrent sur de nouvelles questions et perspectives notamment sur l'implication de régulateurs clefs du cycle comme *CYCD7;1* et *KRP6* ou le lien avec la régulation de la traduction des protéines.

Table des matières

I- Introduction	11
1- Croissance et développement chez les plantes	11
A- L'embryogenèse chez les plantes.....	11
B- Organogenèse à l'âge adulte	13
2- Le contrôle du cycle cellulaire	19
A- La progression du cycle cellulaire permet aux cellules de se diviser.....	19
B- La progression du cycle cellulaire est contrôlée par des complexes CDK/CYC	21
C- L'activité des complexes CDK/CYC est finement régulée.....	22
D- Les cibles des complexes CDK/CYC permettent la progression du cycle cellulaire.....	25
E- Les points de contrôle du cycle cellulaire	29
F- Intégration du contrôle du cycle cellulaire lors du développement.....	31
3- Dégradation des protéines par la voie Ubiquitine protéasome.....	35
A- Présentation générale du système Ub/Pr.....	35
B- Le rôle crucial des E3 Ub-ligases pour la spécificité des dégradations.....	37
C- La régulation de l'activité CRL.....	39
4- Focus sur CSN, un régulateur clef du cycle cellulaire	43
A- Présentation du complexe CSN.....	43
B- Rôle de l'activité enzymatique dans la fonction de CSN.....	45
C- Des rôles fonctionnels extrêmement divers pour CSN.....	47
D- Des fonctions non-enzymatiques pour CSN	49
E- Rôle de CSN dans le contrôle du cycle cellulaire.....	51
5- Rôle de TCTP, un régulateur majeur du développement et de la croissance mitotique conservé chez les eucaryotes	57
A- Caractéristiques de la protéine TCTP	57
B- Fonctions de TCTP dans le développement.....	61
C- Rôles de TCTP dans la signalisation chez les plantes.....	66
6- Objectifs de thèse	69
II- Résultats	71
1- TCTP et CSN4 interagissent physiquement en dehors du complexe CSN.....	71
A- TCTP et CSN4 interagissent physiquement <i>in planta</i>	71
B- Précisions sur le domaine d'interaction de AtTCTP.....	75
C- Précisions sur le domaine d'interaction de AtCSN4.....	75
D- Lien de l'interaction AtTCTP/AtCSN4 avec le complexe CSN	81
E- Discussion et perspectives.....	87
2- Impact de AtTCTP et AtCSN4 sur le développement des plantes.....	92
A- Impact sur le développement embryonnaire	92
B- Étude de l'interaction génétique entre AtTCTP et AtCSN4.....	96
C- Les niveaux d'expression de <i>TCTP</i> et <i>CSN4</i> sont indépendants.....	100
D- Lien avec la réponse hormonale.....	102
E- Discussion et perspectives.....	104
3- Contrôle de la progression du cycle cellulaire par AtTCTP et AtCSN4.....	109
A- Suivi de la progression du cycle cellulaire <i>in planta</i>	109
B- Régulation de AtTCTP et AtCSN4 au cours du cycle cellulaire	113
C- Étude du niveau d'expression des cyclines.....	113
D- Étude de l'activité des complexes CDK/CYC	117
E- Régulation des niveaux protéiques	125
F- Lien de la voie AtTCTP/AtCSN4 avec la voie de dommage à l'ADN	129
G- Discussion et perspectives	131

III-	Discussion générale.....	138
1-	Les diverses fonctions de AtTCTP et AtCSN4 et de leur interaction.....	138
A-	Effets spécifiques à AtCSN4.....	138
B-	Effets spécifiques à AtTCTP.....	139
C-	Effets communs à AtCSN4 et AtTCTP.....	140
2-	Les mutants <i>tctp</i> et <i>csn4</i> possèdent des phénotypes macroscopiques semblables mais des phénotypes moléculaires opposés.....	143
A-	Les mutants <i>tctp</i> et <i>csn4</i> possèdent des phénotypes moléculaires opposés quant à la neddylation de CUL1.....	143
B-	Le phénotype macroscopique des mutants est lié à une perturbation de la balance de neddylation des CUL.....	145
C-	Établissement d'un modèle d'action de la voie TCTP/CSN4.....	148
D-	Conservation de la voie AtTCTP/AtCSN4.....	152
IV-	Matériels et méthodes.....	154
1-	Matériel biologique et conditions de culture.....	154
A-	<i>Arabidopsis thaliana</i>	154
B-	<i>Nicotiana</i>	155
2-	Études au niveau protéique.....	156
A-	Extraction des protéines.....	156
B-	Révélation des protéines.....	156
C-	Co-immunoprécipitation.....	156
D-	Test d'activité kinase.....	157
E-	Étude des protéines dérégulées entre plusieurs génotypes.....	157
3-	Études par microscopie.....	157
A-	Observation des embryons d' <i>A. thaliana</i>	157
B-	Observation de marqueurs fluorescents.....	157
C-	Complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC).....	158
D-	Root tracking.....	158
4-	Études bioinformatiques.....	159
A-	Alignement des séquences protéiques.....	159
B-	Modélisation des protéines.....	159
5-	Étude transcriptomique.....	159
V-	Références.....	161
VI-	Annexes.....	188
1-	Liste des abréviations.....	188
A-	Gènes et Protéines.....	188
B-	Notation des mutants.....	190
C-	Méthodes.....	190
D-	Autres.....	190
2-	Liste des lignées d' <i>A. thaliana</i> utilisés dans ma thèse.....	192
3-	Liste des lignées d' <i>A. thaliana</i> simplement cités dans ma thèse.....	194
4-	Étude protéomique : listes des protéines dérégulées chez les mutants <i>tctp</i> , <i>35S::AtTCTP</i> et <i>csn4-2035</i>	197
A-	Protéines sous-représentées chez <i>tctp-2</i>	197
B-	Protéines surreprésentées chez <i>tctp-2</i>	197
C-	Protéines surreprésentées chez <i>35S::AtTCTP</i>	198
D-	Protéines sous-représentées chez <i>csn4-2035</i>	199
E-	Protéines surreprésentées chez <i>csn4-2035</i>	201

F- Protéines surreprésentées chez <i>tctp-2</i> et sous-représentées chez <i>csn4-2035</i>	201
5- Listes des amorces utilisées durant ma thèse	202
6- Liste des publications	205
7- Revue en préparation : <i>Involvement of COP9 SIGNALOSOME (CSN) in cell cycle regulation.</i> ..	206
8- Article : Betsch et al., 2019	217

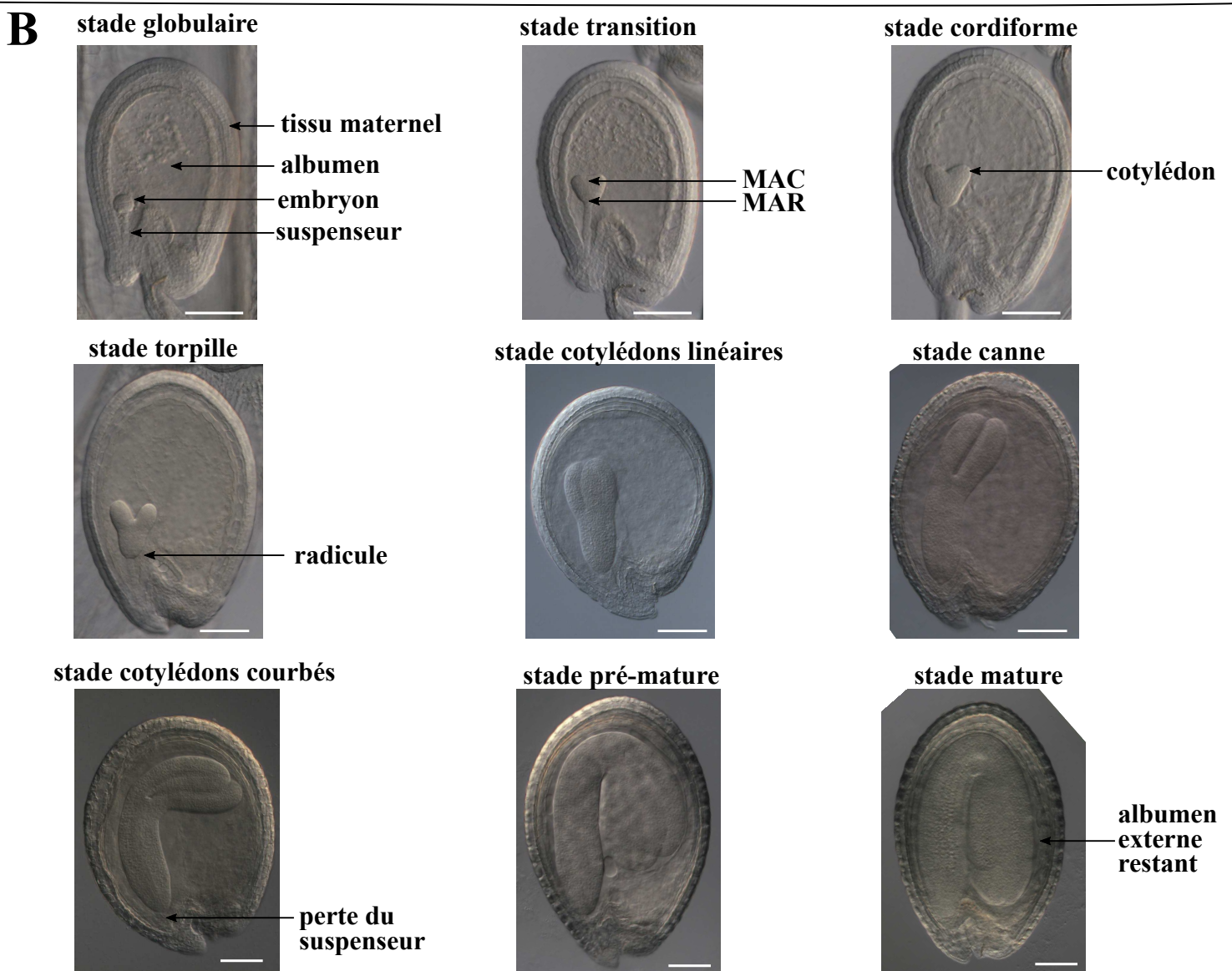
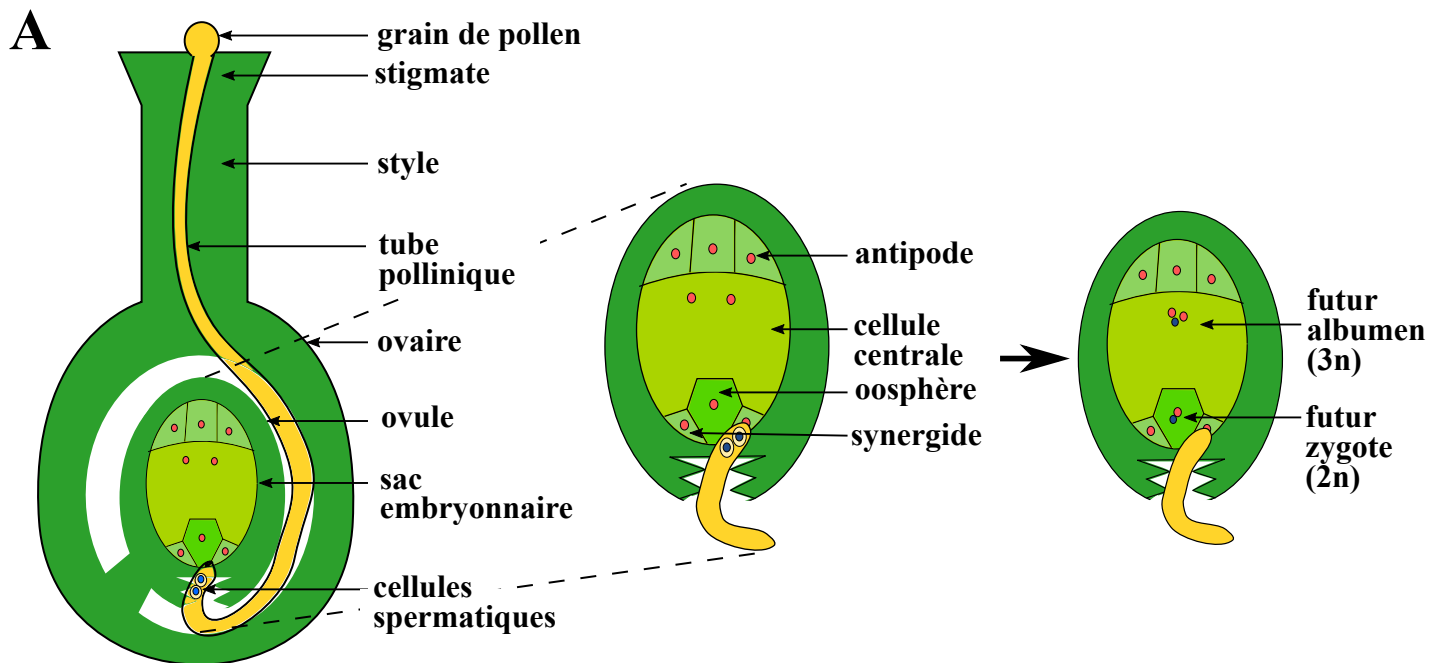


Figure I.1. Fécondation et développement embryonnaire chez *Arabidopsis thaliana*.

A. Les cellules spermatiques sont amenées jusqu'au sac embryonnaire grâce à la croissance du tube pollinique. S'ensuit une double fécondation : celle de l'oosphère (haploïde) donne le futur embryon et celle de la cellule centrale (diploïde) donne le futur albumen.

B. La croissance de l'embryon est stéréotypée et passe par 9 stades bien caractérisés où se mettent en place progressivement les différentes structures embryonnaires : méristème apical caulinaire (MAC), méristème apical racinaire (MAR) puis cotylédons et radicule. L'albumen se développe puis est progressivement dégradé et réduit à sa couche la plus externe. Barre d'échelle : 75 μm .

I- Introduction

1- Croissance et développement chez les plantes

Chez tous les organismes multicellulaires, le développement de chaque cellule appartenant à un certain tissu doit être précisément régulé et coordonné pour aboutir au développement dudit tissu, de l'organe auquel il appartient et *in fine* de l'organisme entier. Cette régulation spatio-temporelle met en jeu différents mécanismes : division, croissance, différenciation, mort et migration cellulaire. En fonction des organismes, ces processus prennent une importance différente : par exemple, aucune migration cellulaire n'est observée chez les végétaux car leurs cellules possèdent une paroi rigide empêchant tout déplacement. Une autre différence majeure entre animaux et végétaux est la part de l'embryogenèse dans l'établissement des différents organes. En effet, tous les organes des animaux sont mis en place dès l'embryogenèse. Au contraire, les végétaux possèdent des structures appelées méristèmes constitués de cellules indifférenciées et totipotentes permettant la formation continue d'organes pendant toute leur vie. La croissance des nouveaux organes se fait dans un premier temps par la croissance mitotique, c'est-à-dire par une augmentation massive du nombre de cellules due à la prolifération cellulaire, puis par élongation de ces cellules. Les plantes en général, et plus particulièrement la plante modèle *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) ou arabette des dames, sont donc un modèle intéressant pour étudier le développement et la morphogenèse des organes en général et la croissance mitotique en particulier : elles permettent de travailler à la fois au niveau de l'embryon et au niveau des différents méristèmes apicaux et racinaires chez la plante adulte.

A- L'embryogenèse chez les plantes

L'embryogenèse, chez les végétaux et les animaux est une étape clef du développement. L'embryon se forme par reproduction sexuée suite à la fusion d'un gamète mâle et d'un gamète femelle et se développe en un nouvel individu unique. Chez les Angiospermes spécifiquement, une double fécondation est nécessaire au développement du futur embryon (Dumas and Rogowsky, 2008). L'oosphère, gamète femelle, est contenue au sein de l'ovule dans le sac embryonnaire qu'elle forme avec sept autres cellules dont la cellule centrale possédant deux noyaux haploïdes (Figure I.1.A). Suite à sa germination sur le stigmate et à la croissance d'un tube pollinique, le grain de pollen achemine deux gamètes mâles au niveau du sac embryonnaire : un premier va fusionner avec l'oosphère donnant naissance au zygote principal, futur embryon et le deuxième fusionne avec la cellule centrale pour former un zygote accessoire triploïde, futur albumen (Figure I.1.A).

La formation de l'embryon se fait principalement par mitoses successives de l'oosphère fécondé et peut être divisée en trois phases principales : une phase de genèse et de spécification des tissus, une phase de croissance des organes et de stockage et finalement une phase de déshydratation préparant la dormance. Ces différentes étapes ont été précisément caractérisées et classifiées chez la plante modèle *A. thaliana* ((Bowman, 1994), Figure I.1.B). La première division du zygote principal est asymétrique et établit une polarité : la petite cellule apicale devient l'embryon tandis que la grande cellule basale produit le suspenseur qui relie physiquement l'embryon au tissu maternel et permet sa nutrition (Jeong et al., 2016). L'embryon

atteint tout d'abord le stade globulaire vers 3-4 jours après fécondation (JAF) par différentes divisions se succédant dans l'ensemble des cellules embryonnaires (Figure I.1.B). Les cellules en contact avec la surface de l'embryon, appelées protoderme, formeront l'épiderme, tandis que les cellules intérieures donnent les précurseurs du système vasculaire et du tissu fondamental ((Hove et al., 2015), Figure I.2.A). En outre, suite à la division asymétrique d'une cellule à la base de l'embryon appelée hypophyse, la cellule fille apicale en forme de lentille forme le centre quiescent, centre organisateur du méristème apical racinaire (MAR) (Figure I.2.A). Le méristème apical caulinaire (MAC) est spécifié à partir des cellules les plus apicales du tissu fondamental. L'embryon passe ensuite de la symétrie radiale qui était la sienne à une symétrie bilatérale au cours du stade transition vers 5 JAF ((Jürgens, 1992), Figure I.1.B). Ensuite, pendant le stade cordiforme vers 6 JAF, les ébauches des deux premières feuilles appelées cotylédons émergent des deux côtés du MAC (Figure I.1.B). Vers 7 JAF, au stade suivant, nommé torpille, émerge une racine portant le MAR (Figure I.1.B). Les structures ainsi formées continuent à se développer et la croissance progressive des cotylédons permet de différencier encore cinq stades : le stade cotylédons linéaires vers 8 JAF, le stade canne vers 9 JAF où les cotylédons arrivent au niveau du haut de la graine, le stade cotylédons courbés vers 10 JAF, le stade pré-mature vers 11 JAF où les cotylédons courbés arrivent au moins jusqu'au milieu de la graine et le stade mature vers 12 JAF où l'embryon occupe tout l'espace de la graine (Figure I.1.B).

L'albumen, provenant de la fécondation de la cellule centrale, grandit premièrement grâce à un très grand nombre de divisions cellulaires incomplètes : les noyaux se divisent sans cytotérièse formant ainsi un cœnocyte (Berger, 2003). Il s'agit d'un tissu de réserve, indispensable à la nutrition de l'embryon lors de l'embryogenèse. Le devenir de ce tissu diffère en fonction des Angiospermes considérées. Chez *A. thaliana*, il se cellularise progressivement entre la fin du stade globulaire et le stade torpille (Berger, 2003). Les cellules centrales sont ensuite rapidement dégradées suite à une mort cellulaire programmée. Les réserves sont majoritairement stockées dans les cotylédons qui s'étendent de façon considérable. Au stade mature, l'albumen est restreint à sa couche la plus externe qui joue un rôle dans la régulation de la dormance et de la germination de la graine et stocke quelques réserves sous forme de lipides, nécessaires pendant la germination (Figure I.1.B). Ce type de graine est qualifié d'exalbuminé. Au contraire, les graines dites albuminées, celles de céréales par exemple, conservent leur albumen même à l'état mature et celui-ci aura un rôle majeur de tissu de réserve lors de la germination (Jean, 2014). Enfin, il existe également des graines à périsperme, par exemple comme les graines de quinoa, dont les réserves sont stockées dans un tissu de réserve d'origine maternelle : le périsperme, et parfois également dans l'albumen (Jean, 2014).

Le développement de l'embryon et de l'albumen sont fortement interdépendants, comme observable chez *A. thaliana*. Ainsi, les mutants pour *zhoupi* (*zou*), un facteur de transcription exprimé uniquement dans l'albumen, présentent des embryons petits et retardés morphologiquement bien que viables à la germination (Yang et al., 2008). Réciproquement, une mort précoce de l'embryon conduit à une absence de dégradation de l'albumen (Fourquin et al., 2016). La coordination du développement de ces deux compartiments implique la mise en place d'un dialogue. Cette communication peut se faire sous forme de signaux mécaniques comme la pression exercée par l'embryon qui semble être cruciale pour l'induction de la mort cellulaire dans l'albumen (Fourquin et al., 2016). Elle peut également passer par voie chimique

grâce à des hormones ou des peptides. Par exemple, l'auxine, hormone clef régulant la grande majorité des processus développementaux des plantes, est requise à la fois pour l'établissement de l'axe embryonnaire apico/basal (Friml et al., 2003), pour le développement du suspenseur (Robert et al., 2013) et pour la prolifération et la différenciation de l'albumen (Figueiredo et al., 2015). Produite massivement dans l'albumen, elle semble également être transportée vers l'enveloppe de la graine, participant aussi à la coordination de la croissance des tissus fécondés et des tissus maternels (Figueiredo et al., 2016).

Ces différentes coordinations sont cruciales notamment pour permettre le flux de nutriments en provenance des tissus sources : tissu maternel et albumen vers l'embryon. En effet, de façon à stocker une quantité d'énergie conséquente sous forme de glucides, de lipides et protéines, l'embryon doit être approvisionné en divers nutriments organiques et inorganiques par les tissus alentours. Ce transport passe par deux voies : par le suspenseur ou par l'épiderme. Le suspenseur est attaché à sa base au tissu maternel (Bowman, 1994) d'où pourrait provenir directement une partie des nutriments. En outre, comme il est majoritairement entouré par l'albumen qui exprime un grand nombre de transporteurs de nutriments, il est probable qu'une majorité des nutriments proviennent de l'albumen pour ensuite être transportés à l'embryon *via* le suspenseur (Kawashima and Goldberg, 2010). Le suspenseur dégénère chez *A. thaliana* autour du stade cotylédons courbés ((Blanvillain et al., 2011), Figure I.1.B). Cela souligne la nécessité d'une autre voie, moins bien décrite, par laquelle l'embryon peut prendre des nutriments directement de l'albumen à travers son épiderme (Lafon-Placette and Köhler, 2014). Ces différents transports sont facilités par la présence de transporteurs transmembranaires d'export ou d'import sur les différentes interfaces concernées. Par exemple, les transporteurs de sucres bidirectionnels *SWEET 11*, *12* et *15* sont exprimés spécifiquement au niveau des cellules de l'albumen entourant l'embryon et sont impliqués dans la nutrition embryonnaire (Chen et al., 2015).

B- Organogenèse à l'âge adulte

Une fois l'embryogenèse complétée, la graine est prête à germer pour donner un individu adulte. Cet individu est capable de mettre en place de nouveaux organes tout au long de sa vie grâce aux méristèmes dont le fonctionnement est abordé ici à partir de l'exemple du MAR d'*A. thaliana*, source de tous les tissus souterrains. La racine se compose de plusieurs zones, listées dans l'ordre apico-basal : la coiffe qui protège extérieurement l'apex racinaire, une zone méristématique (le MAR) où se fait la croissance mitotique, une zone d'élongation cellulaire puis une zone de différenciation cellulaire (Figure I.2.B). Plus précisément, le MAR est organisé de façon stéréotypée : les cellules souches appelées cellules initiales, entourent le centre quiescent composé de deux à quatre cellules se divisant très peu ((Gaillochet and Lohmann, 2015), Figure I.2.B). Les cellules initiales établissent, suite à des divisions asymétriques, des lignages cellulaires sous forme de files. Chaque file correspond à un futur devenir cellulaire : de l'extérieur vers l'intérieur de la racine, se trouvent les files de la coiffe latérale, de l'épiderme, du cortex, de l'endoderme, du péricycle et des tissus vasculaires (xylème et phloème) (Figure I.2.B).

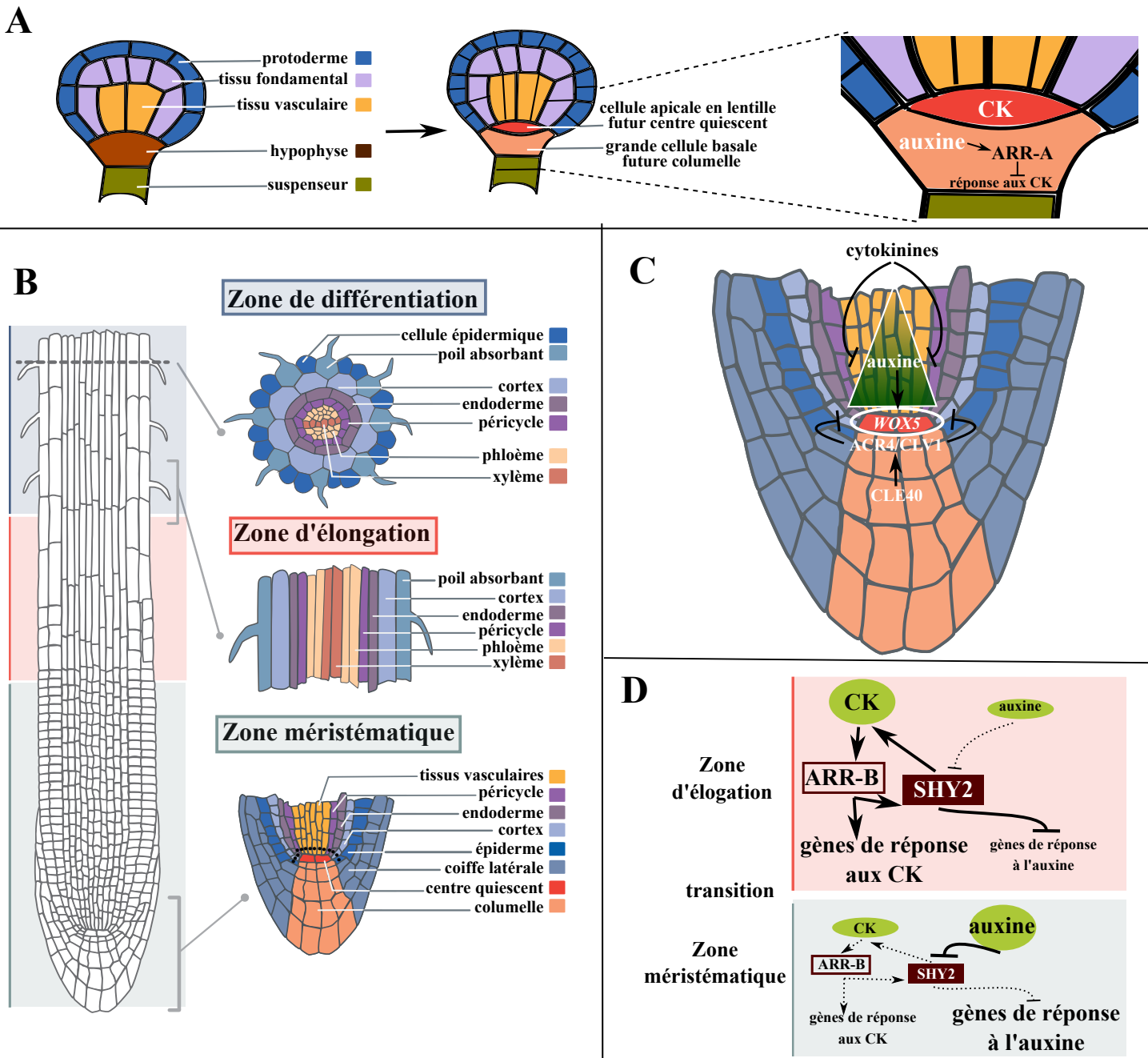


Figure I.2. Développement racinaire chez *Arabidopsis thaliana*.
Adapté de Bouché, 2017.

A. Le méristème apical racinaire (MAR) est spécifié lors de l'embryogenèse suite à la division assymétrique de l'hypophyse. Le centre quiescent est mis en place dans la cellule fille apicale où la signalisation des cytokinines (CK est forte). La voie des CK est inhibée dans la cellule fille basale par une importante signalisation auxinique.

ARR-A : ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR de type A

B. La racine est composée de trois zones : une de division cellulaire appelée zone méristématique où se situe le MAR, une d'élongation et une de différenciation. Les zooms sur chaque zones permettent de mettre en évidence l'organisation en files cellulaires due à l'orientation des mitoses. Les cellules avec des points noirs sont les cellules initiales à l'origine des files cellulaires.

C. L'expression de *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5* (*WOX5*) au niveau du centre quiescent permet le maintien de l'état de cellule souche et donc celui du méristème. Elle est finement régulée par différentes voies au niveau local dont celle de *CLE40*. Elle est également intégrée au niveau plus global notamment par régulation hormonale via l'auxine et les CK.

CLE40 : CLAVATA 3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED 40, *ACR4* : CRINKLY 4, *CLV1* : CLAVATA 1

D. La balance auxine/CK contrôle le passage de la zone méristématique à la zone d'élongation. Le dialogue hormonal est intégré en partie par *SHORT HYPOCOTYL 2* (*SHY2*).

ARR-B : ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR de type B

Côté apical au centre de la racine, une initiale donne naissance à la columelle, tissu de la coiffe responsable du gravitropisme. Au fur et à mesure de l'éloignement du centre quiescent, se retrouvent des cellules qui, dans un premier temps, continuent à se diviser et gardent des caractéristiques méristématiques, puis commencent progressivement à s'allonger et à acquérir des particularités structurales et fonctionnelles et enfin ne se divisent plus et s'allongent rapidement quand elles atteignent la zone d'élongation (Figure I.2.B).

Cette organisation précise du MAR est mise en place par une voie moléculaire basée notamment sur la communication intercellulaire. Le centre quiescent se caractérise par l'expression de *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5 (WOX5)*, un gène codant pour l'expression d'un facteur de transcription à homéodomaine (Figure I.2.C). *WOX5* est essentiel pour limiter les divisions cellulaires dans le centre quiescent (Forzani et al., 2014). Il participe également, de façon non cellulièrement autonome, au maintien de l'état de cellule souche des cellules initiales voisines (Sarkar et al., 2007). L'expression de *WOX5* est restreinte par la production dans les cellules de la columelle en différenciation du peptide *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED 40 (CLE40)* (Stahl et al., 2009). Ce peptide régule positivement l'abondance du complexe *CRINKLY 4 (ACR4)/CLAVATA 1 (CLV1)* au niveau des membranes des initiales de la columelle qui, elle, régule négativement *WOX5* ((Stahl et al., 2013), Figure I.2.C). Ce réseau est crucial pour permettre la maintenance du MAR. Il agit de concert avec de nombreux autres réseaux génétiques, non détaillés ici, pour arriver à une homéostasie tissulaire dans laquelle maintenance des cellules souches, prolifération et différenciation sont finement coordonnées (Drisch and Stahl, 2015).

Par ailleurs, la régulation de *WOX5* peut intégrer de nombreux signaux externes ou internes *via* différentes phytohormones comme l'auxine et les cytokinines (Figure I.2.C). Un maximum d'auxine est créé par biosynthèse locale et transport polarisé dans le centre quiescent. Il induit l'expression de *WOX5* qui participe au maintien de ce maximum sur une zone restreinte ((Gonzali et al., 2005), Figure I.2.C). Au contraire, les cytokinines, hormones dérivées d'adénine, régulent négativement *WOX5* ((Zhang et al., 2013b), Figure I.2.B). Les facteurs de transcription *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) de type B (ARR-B)*, activés par phosphorylation suite à la perception de cytokinines, régulent un transporteur d'auxine, *AUXIN TRANSPORTER-LIKE PROTEIN 2 (LAX2)*. Les cytokinines régulent donc l'activité mitotique du centre quiescent au moins en partie par régulation de la distribution de l'auxine. Ce mécanisme met en lumière un des nombreux dialogues entre auxine et cytokinines qui permettent de réguler finement le développement du MAR en particulier et des plantes en général. Par ailleurs, le rôle du dialogue auxine/cytokinines est clef pour contrôler le passage des cellules de l'état méristématique à l'état différencié et par là, la taille du méristème. Ce contrôle est intégré au niveau de la protéine *SHORT HYPOCOTYL 2 (SHY2)* (Figure I.2.D). Cette protéine fait partie de la famille des *AUX/IAA*, des protéines dégradées en présence d'auxine et qui régulent négativement la signalisation auxinique (Tian et al., 2003). De plus, *SHY2* est induit par des *ARR-B* et stimule la biosynthèse des cytokinines (Dello Ioio et al., 2008). Ainsi, dans la zone de transition quand les cellules quittent le méristème, la présence de cytokinines active *SHY2*, ce qui renforce la voie des cytokinines tout en inhibant celle de l'auxine (Figure I.2.D).

Au contraire, dans le méristème, en présence d'un niveau élevé d'auxine, SHY2 est dégradée ce qui renforce la voie auxinique et inhibe celle des cytokinines (Figure I.2.D).

Un tel dialogue auxine/cytokinines est aussi particulièrement intéressant lors de l'embryogenèse pour la détermination et la mise en place du MAR (Müller and Sheen, 2008). Suite à la division asymétrique de l'hypophyse (partie I-1-A, Figure I.2.A), une réponse forte aux cytokinines est observée uniquement dans la cellule fille apicale qui détermine le futur centre quiescent du MAR. Malgré cette forte réponse aux cytokinines, cette cellule apicale n'exprime pas *ARR7* et *ARR15*, deux *ARR de type A (ARR-A)*, au contraire de sa cellule sœur basale. Cela est surprenant car les *ARR-A* sont des cibles transcriptionnelles directes des *ARR-B*. Ils sont également activés post-transcriptionnellement par phosphorylation en présence de cytokinines et mettent en place une boucle de rétrocontrôle négatif en inhibant les gènes de réponse aux cytokinines. Ce résultat a mis en évidence l'existence d'une autre régulation des *ARR-A*. En effet, un niveau élevé d'auxine dans la cellule basale active la transcription des *ARR-A*, inhibant ainsi la réponse aux cytokinines (Figure I.2.A).

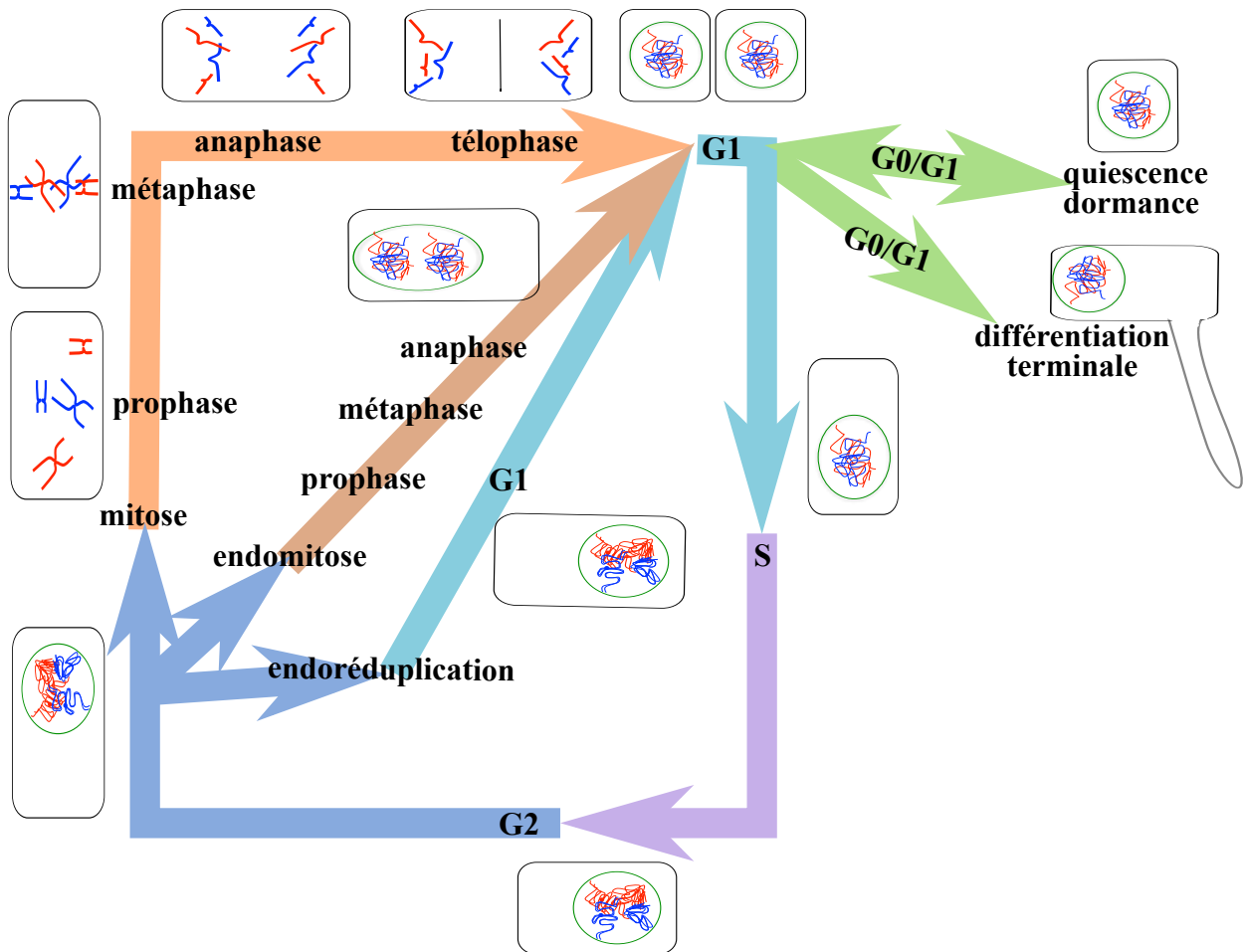


Figure I.3. Le cycle cellulaire permet la multiplication des cellules.

Adapté de Berger, 2017

Les cellules en division passent par l'interphase composée d'une phase G1 de croissance, S de duplication de l'ADN et G2 de croissance et de préparation de mitose. Elles entrent ensuite généralement en mitose qui est subdivisée en prophase, métaphase, anaphase et télophase. L'enchaînement de l'interphase et de la mitose constitue un cycle cellulaire et conduit à l'obtention de deux cellules filles génétiquement identiques. Dans certains cas, les cellules ne se divisent pas et entrent en endocycle par l'absence de mitose (endoréduplication) ou de télophase de mitose (endomitose). Elles peuvent également être en attente d'entrer dans le cycle en état de quiescence ou de dormance ou en être sorties en état de différenciation terminale. Les schémas représentent les cellules et leur contenu génétique dans les différentes phases.

2- Le contrôle du cycle cellulaire

Comme évoqué précédemment, notamment à partir de l'exemple du MAR, la formation d'un nouvel organe implique la coordination de différents processus : croissance mitotique, élongation, différenciation et mort cellulaire. Le paragraphe suivant détaille les mécanismes impliqués dans le contrôle d'un de ces processus : la croissance mitotique.

A- La progression du cycle cellulaire permet aux cellules de se diviser

Dans un organisme multicellulaire, chaque cellule peut se retrouver dans différents états : en division active ou en quiescence, elle-même sous-divisée en quiescence méristématique, dormance et différenciation terminale qui peut dans certains cas aboutir à la mort programmée ((Velappan et al., 2017), Figure I.3). Pour reprendre l'exemple précédent, les cellules du centre quiescent du MAR sont en quiescence méristématique, tandis que les cellules de la zone méristématique du MAR sont en division active et les cellules de la zone d'élongation entrent en différenciation terminale. Les cellules de la coiffe se desquament suite à une mort cellulaire programmée. Enfin, toutes ces cellules entrent en dormance à la fin de l'embryogenèse dans la graine déshydratée, en attente de la germination. Il serait possible de décrire également d'autres états comme la sénescence ou la quiescence induite par un stress comme l'hypoxie mais dont le rôle n'est pas inscrit dans un contexte développemental. Chaque cellule doit donc pouvoir être orientée vers différents destins et notamment vers le fait de se diviser ou pas.

La division cellulaire peut se faire suivant deux modalités: la mitose, force majeure de formation et de croissance des organes, qui d'une cellule mère donne deux cellules filles identiques, et la méiose, permettant la reproduction sexuée, qui à partir d'une cellule mère donne quatre cellules filles de contenu chromosomique réduit de moitié. Les processus mis en jeu sont majoritairement conservés dans les deux types de division et chez tous les eucaryotes. Par la suite, ils seront décrits, sauf indications contraires, dans les mitoses de cellules végétales dans le cas de la plante modèle *A. thaliana*.

Avant de se diviser, une cellule passe par un certain nombre d'étapes, rassemblées sous le terme d'interphase, nécessaires pour la préparation de la dernière étape: la division *stricto sensu*. L'ensemble de ces étapes, appelé cycle cellulaire, est constitué pour l'interphase d'une phase G1 (pour Gap-1) de croissance, d'une phase S de réplication de l'ADN (passage d'une copie = 2n à deux copies = 4n) et d'une phase G2 (Gap-2) de croissance et de préparation de la mitose (Figure I.3). La mitose (M) se divise elle-même en différentes phases : la prophase pendant laquelle les chromosomes à deux chromatides identiques se condensent, la métaphase pendant laquelle ils s'alignent à l'équateur de la cellule, l'anaphase pendant laquelle les chromatides sœurs se séparent et commencent à migrer à un pôle opposé de la cellule et la télophase, phase de séparation des deux cellules filles (Figure I.3). La séparation des deux cellules filles, nommée cytotélerèse, se fait par la mise en place d'une nouvelle paroi, appelée phragmoplaste. Un grand nombre de vésicules golgiennes, riches notamment en pectines, s'accumulent au centre de la cellule, fusionnent, rejoignent les deux extrémités de la cellule et s'y raccordent à la paroi, séparant ainsi les deux cellules filles. Il est notable que ce processus est totalement différent dans les cellules animales où un sillon de division, formé par la contraction d'un anneau d'actine, permet la séparation des deux cellules filles.

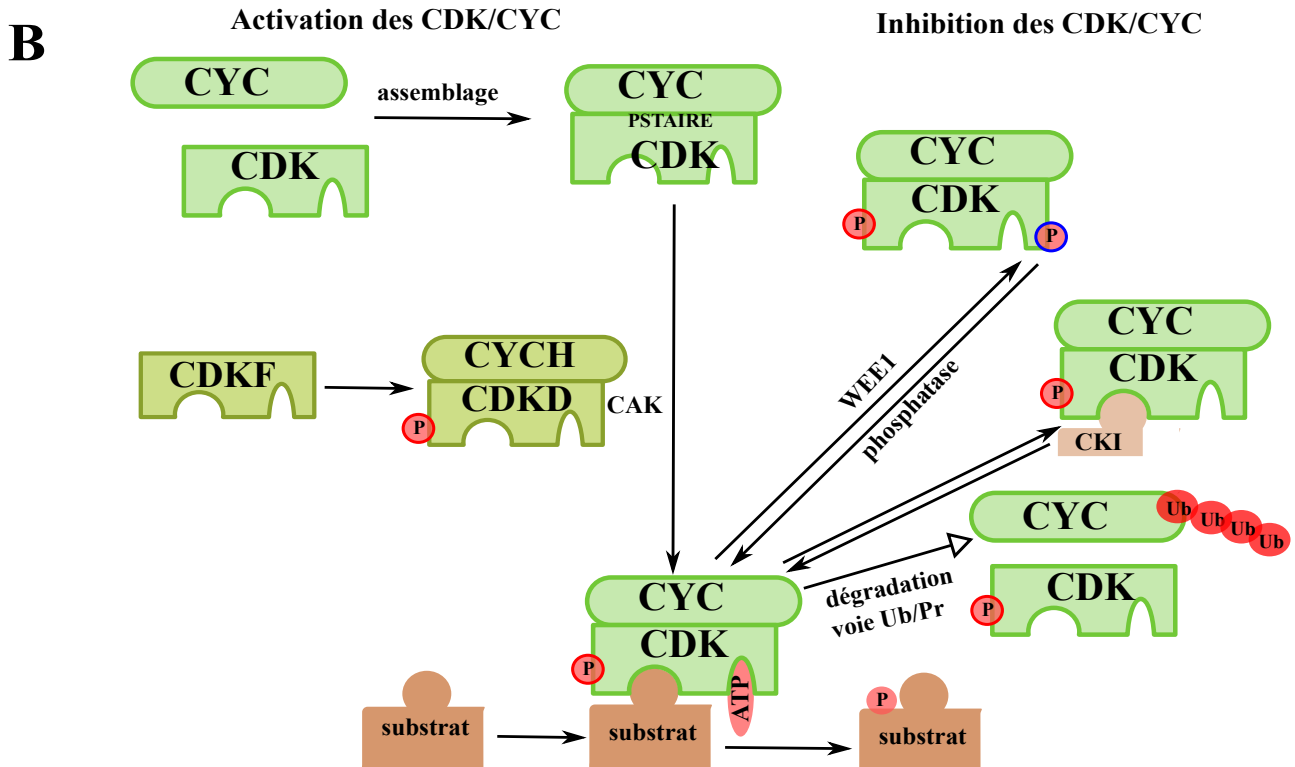
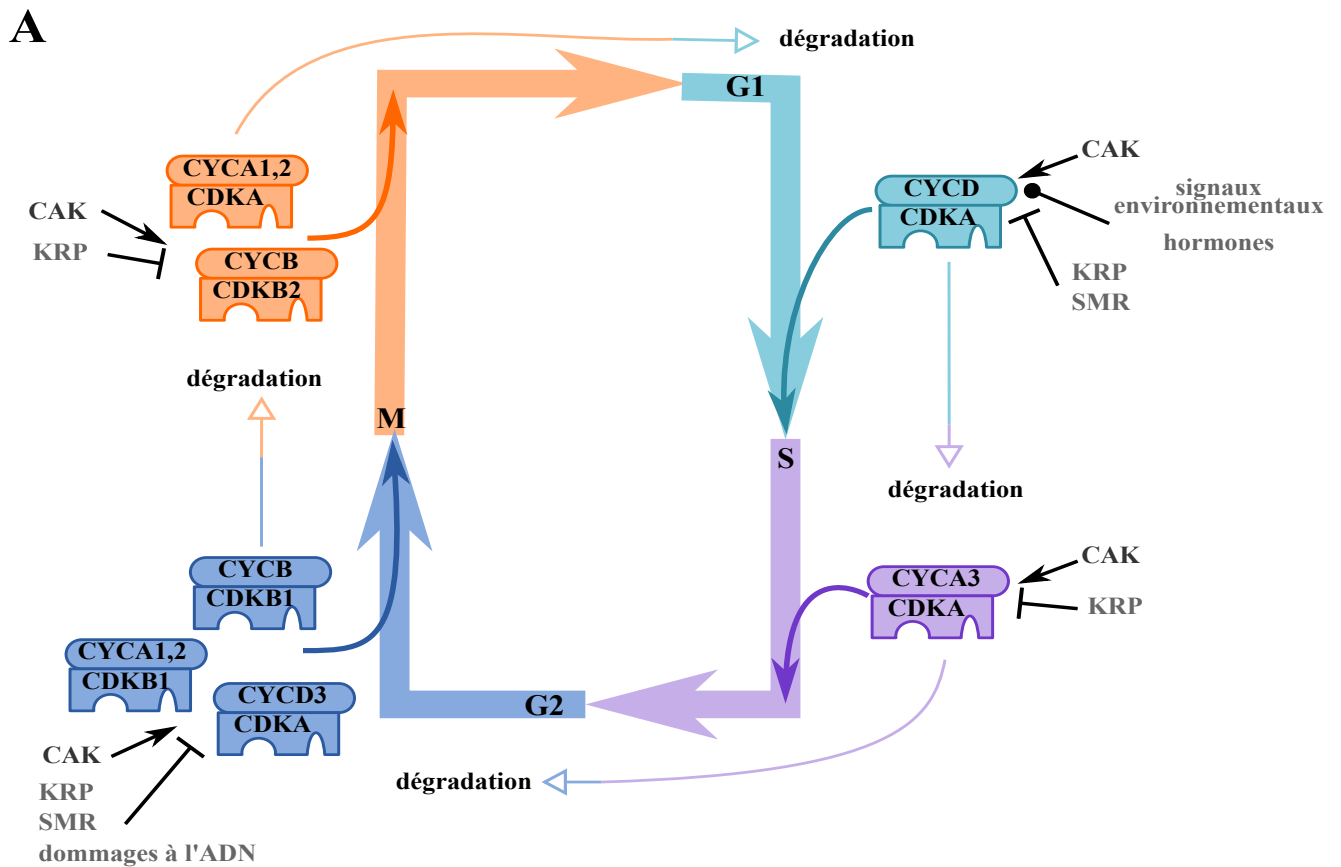


Figure I.4. L'activation des différents complexes CDK/CYC permet la progression du cycle cellulaire.

A. Durant chaque phase du cycle cellulaire, des complexes CDK/CYC spécifiques sont activés et permettent sa progression. Ils sont désactivés lors du passage à la phase suivante par la dégradation des CYC.

CAK : CDK ACTIVATING KINASE, CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE, CYC : CYCLINE, KRP : KIP RELATED PROTEIN, SMR : SIM RELATED PROTEIN.

B. Les complexes CDK/CYC sont régulés de manière précise par des modifications post-traductionnelles et par interaction avec d'autres protéines. Les phosphates (P) activateurs sont entourés en rouge, ceux inhibiteurs en bleu.

CKI : CYCLIN KINASE INHIBITOR, Pr : protéasome, Ub : UBIQUITINE.

Dans la pointe racinaire d'*A. thaliana*, un cycle complet dure environ 15h pour une phase S autour de 3h (Betsch et al., 2019). Il est important de noter qu'il existe également d'autres types de cycles, appelés endocycles (Matsunaga et al., 2013). Certains, appelés endoreduplications, sont caractérisés par l'absence de phase M et conduisent ainsi à un doublement de l'information génétique de la cellule (Figure I.3). Ce processus est assez répandu chez les plantes notamment au niveau de l'albumen, des trichomes et des cellules épidermiques foliaires (Matsunaga et al., 2013). D'autres types d'endocycles, appelés endomitoses, consistent en la séparation des chromatides sœurs sans division nucléaire ni cytotélière, donnant ainsi naissance à une cellule au contenu génétique et au nombre de chromosomes doublés (Figure I.3). Les endomitoses peuvent également donner naissance à des cellules multinucléées lorsque la division nucléaire s'accomplit mais pas la cytotélière. Le processus d'endomitose a notamment été reporté dans l'albumen (Matsunaga et al., 2013).

B- La progression du cycle cellulaire est contrôlée par des complexes CDK/CYC

L'enchaînement précis des différentes phases du cycle cellulaire requiert un contrôle moléculaire strict de sa progression, notamment au niveau des deux transitions clefs : G1/S et G2/M. Ce contrôle est dépendant de l'activité de protéines kinases appelées CYCLIN DEPENDENT KINASES (CDK) qui forment des complexes avec les CYCLINES (CYC). La succession de différents complexes CDK/CYC, qui phosphorylent un grand nombre de substrats au long des différentes phases, est indispensable à la progression du cycle cellulaire (Figure I.4.A). Historiquement, les complexes CDK/CYC ont été mis en évidence dans les années 1960 à partir d'ovocyte de Xénope (Maller et al., 1989). L'injection du cytoplasme d'un ovocyte II (en métaphase de 2^e division de méiose) chez un ovocyte I (bloqué en prophase de 1^e division de méiose) provoque la maturation de ce dernier qui poursuit et finit sa première méiose et avance jusqu'à la métaphase de la 2^e. Il y a donc une substance dans le cytoplasme de l'ovocyte II activatrice de la méiose. Cette substance, appelée MPF (pour *Maturation Promoting Factor*), a été caractérisée plus précisément par des expériences de fusions cellulaires qui ont montré qu'elle stimulait aussi l'entrée en mitose (Maller et al., 1989). Elle a été identifiée plus tardivement, en 1988, comme étant composée de deux protéines: une sous-unité CDK catalytique et une sous-unité CYC régulatrice (Maller et al., 1989).

Chez *A. thaliana*, 12 gènes codent pour des CDK, divisées en sept classes: CDKA à G (Menges et al., 2005). Seules les CDKA et B sont les régulateurs les plus directs du cycle cellulaire. Les CDKA, possédant un motif PSTAIRE typique et homologues des CDK1 animales, sont nécessaires tout au long du cycle, notamment pour les transitions tant G1/S que G2/M (Figure I.4.A). Les CDKB sont spécifiques aux plantes et ne sont présentes qu'en G2 et en M où leur activité est maximale ((Porceddu et al., 2001), Figure I.4.A). Les CDKD (conservées entre plantes et animaux) et CDKF (spécifiques aux plantes), appelées CDK-ACTIVATING KINASES (CAK), agissent en activant leurs substrats, dont font partie d'autres CDK, par phosphorylation ((Inzé and De Veylder, 2006), Figure I.4.B). Les CDKC, E et G ne semblent pas avoir de rôle direct dans le contrôle du cycle cellulaire.

Ces CDK s'associent avec différentes CYC en fonction des phases du cycle cellulaire. Les CYC d'*A. thaliana* sont nombreuses (une cinquantaine) et très diverses. Par analogies avec les CYC animales, ont été distinguées différentes classes: 10 CYCA, 11 CYCB, 10 CYCD et une CYCH. Au moins 17 autres gènes ont été trouvés et classifiés en types C, P, L et T (Inzé

and De Veylder, 2006). De façon générale, les CYCD participent à la régulation de la transition G1/S, les CYCA à celle des contrôles des phases S et G2 et les CYCB à celles de la transition G2/M et des contrôles intra-M (Figure I.4.B). Cependant, les faits précis sont bien plus complexes.

Les CYCD, régulatrices de la transition G1/S, semblent être assez redondantes entre elles, comme les mutants perte de fonction d'une CYCD spécifique ne semble présenter que des phénotypes mutants faibles. Par exemple, les mutants *cycd6;1* ne présentent des défauts que sur un nombre très restreint de divisions cellulaires périclinales uniquement aux stades cordiforme et torpille des embryons (Sozzani et al., 2010). De plus, l'expression de certaines CYCD est influencée par des signaux environnementaux tels la disponibilité en saccharose pour CYCD2, CYCD3 et CYCD4;1 ((Nieuwland et al., 2009; Riou-Khamlichi et al., 2000), Figure I.4.A). Elles peuvent également être cruciales pour certaines réponses hormonales comme celles aux cytokinines pour laquelle la présence de la fonction CYCD3 semble requise dans le MAC et les feuilles en développement (Dewitte et al., 2007). Enfin, au moins une partie des CYCD ont probablement un rôle étendu à d'autres phases (Figure I.4.A). En effet, par exemple, CYCD3;1 présente un pic transcriptionnel en G2/M (Menges et al., 2005). Des kinases, comme celles associées aux CYCD3;3, sont également actives en G2/M (Nakagami et al., 2002). De plus, l'expression ectopique de CYD3;1 dans des trichomes stimule l'entrée non seulement en phase S mais également en phase M (Schnittger et al., 2002).

Les CYCA peuvent être sous-classifiées en deux sous-types: les CYCA3 dont le pic de transcription est en phase S et les CYCA 1 et 2 dont le pic d'expression est plus tardif en phase G2/M ((Menges et al., 2005), Figure I.4.A). Ces dernières pourraient donc plutôt participer au contrôle de l'entrée en mitose, alors que le rôle canonique de contrôle de la phase S serait plus spécifiquement attribué aux CYCA3. Les CYCB possèdent toutes un profil transcriptionnel très proche présentant un pic d'expression en phases G2 et M ((Menges et al., 2005), Figure I.4.A).

Le niveau protéique des CYC est aussi extrêmement finement régulé notamment par des mécanismes de dégradation (Figure I.4). Les CYCA et B contiennent une "boîte de destruction", *D-Box*, conduisant à leur dégradation par le protéasome (Genschik et al., 1998). Les CYCB sont dégradées pendant la phase M par une E3-Ubiquitine-ligase ANAPHASE PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME (APC/C) (Weingartner et al., 2003). Cette dégradation est cruciale pour la bonne progression du cycle cellulaire étant donné que l'expression d'une CYCB1 non dégradable perturbe la cytotérière (Criqui and Genschik, 2002). Par ailleurs, les CYCD possèdent un motif PEST qui conduit également à une dégradation par le protéasome (Planchais et al., 2004). Le mécanisme général de dégradation par le protéasome et son rôle particulier dans la progression du cycle cellulaire sera détaillé dans la partie I.3.

C- L'activité des complexes CDK/CYC est finement régulée

L'activité des complexes CDK/CYC dépend, bien évidemment, dans un premier temps de la présence de la CDK : les CDKA sont présentes tout au long du cycle alors que les CDKB1 sont restreintes aux phases G2 et début de M et les CDKB2 à la phase M (Menges et al., 2005). En outre, les CDK ne sont enzymatiquement actives que lorsqu'elles sont associées aux CYC ((Morgan, 2006), Figure I.4.B). Ainsi, un autre niveau de régulation de l'activité kinase est défini par la présence du partenaire CYC. Comme décrit précédemment (partie I.2.B), le niveau

des CYC est régulé à la fois transcriptionnellement et post-transcriptionnellement en fonction des différentes classes de CYC et des différentes phases du cycle. En outre, le choix du partenaire CYC joue également un rôle dans le contrôle de l'activité CDK. Les CYC s'associent aux CDK *via* le motif PSTAIRE de ces dernières (Figure I.4.B). De nombreux complexes peuvent ainsi se former, d'autant plus que différentes CYC peuvent interagir avec la même CDK. Des interactions préférentielles s'établissent entre les différentes protéines : les CYCB et les CYCA2 avec les CDKB, alors que les CYCD et les CYCA3 de phase S s'associent exclusivement avec CDKA ((Van Leene et al., 2011), Figure I.4.A). Cette étude recense au moins 92 complexes CDK/CYC différents. Cette grande complexité pourrait refléter le besoin de plasticité développementale des plantes qui doivent constamment s'adapter à leur environnement (Inzé and De Veylder, 2006).

En plus de ce premier niveau de complexité du contrôle du cycle cellulaire dû à une grande diversité des complexes CDK/CYC, il est important de souligner qu'un autre niveau de complexité est ajouté par la régulation fine de l'activité kinase des CDK. Une fois les complexes CDK/CYC formés, ils sont régulés par différentes phosphorylations qui peuvent être activatrices ou inhibitrices en fonction des sites (Figure I.4.B). Les CDK possèdent une Tyrosine dans leur partie N-terminale qui peut être phosphorylée. Pour les CDKA, il a été démontré que, en présence de cette phosphorylation, l'activité de CDKA est diminuée car la phosphorylation inhibe la liaison de l'ATP et la reconnaissance du substrat. C'est le cas notamment en cas de stress ou de dommage à l'ADN où la phosphorylation de cette tyrosine est catalysée par WEE1 ((De Schutter et al., 2007), Figure I.4.B). Les sites de phosphorylation inhibitrice sont conservés chez les CDKB mais aucune preuve biochimique de leur fonctionnalité n'a été réalisée (Inzé and De Veylder, 2006). Ces phosphorylations inhibitrices doivent être levées pour autoriser la poursuite du cycle cellulaire. C'est le rôle chez les animaux et levures de la phosphatase CDC25 (Morgan, 2006). Chez *A. thaliana*, il ne semble pas y avoir d'homologue de CDC25 (Vandepoele et al., 2002) même si cette fonction phosphatase doit être conservée ((Inzé and De Veylder, 2006), Figure I.4.B). Par ailleurs, il existe également des phosphorylations activatrices des CDK sur une thréonine de la partie C-terminale (Figure I.4.B). Ces phosphorylations sont catalysées par des CAK: 3 CDKD et 1 CDKF. De façon générale, les CAK participent à l'activation de la très grande majorité des CDK (Umeda et al., 2005). Les CDKD doivent s'associer à CYCH pour être actifs tandis que CDKF peut phosphoryler ses substrats sous forme monomérique (Figure I.4.B). En outre, CDKF est capable de phosphoryler les CDKD pour les activer (Shimotohno et al., 2004) mettant en place une cascade de phosphorylation qui pourrait être particulièrement importante pour le déroulement précis du cycle cellulaire en intégrant des signaux environnementaux et hormonaux.

Enfin, les complexes CDK/CYC sont également régulés par des familles de protéines inhibitrices, appelés CKI pour *CYCLIN KINASE INHIBITORS*, dont celle des sept KIP RELATED PROTEINES (KRP) (ou ICK pour Interactors of Cdc2 Kinase) qui se lie *via* leur domaine C-terminal aux CDKA et CYCD inhibant ainsi leur fonction ((Van Leene et al., 2011), Figure I.4). L'interaction entre KRP et CYCD est importante pour leur fonction comme le phénotype causé par une surexpression de KRP peut être complété par une surexpression de CYCD (Zhou et al., 2003a).

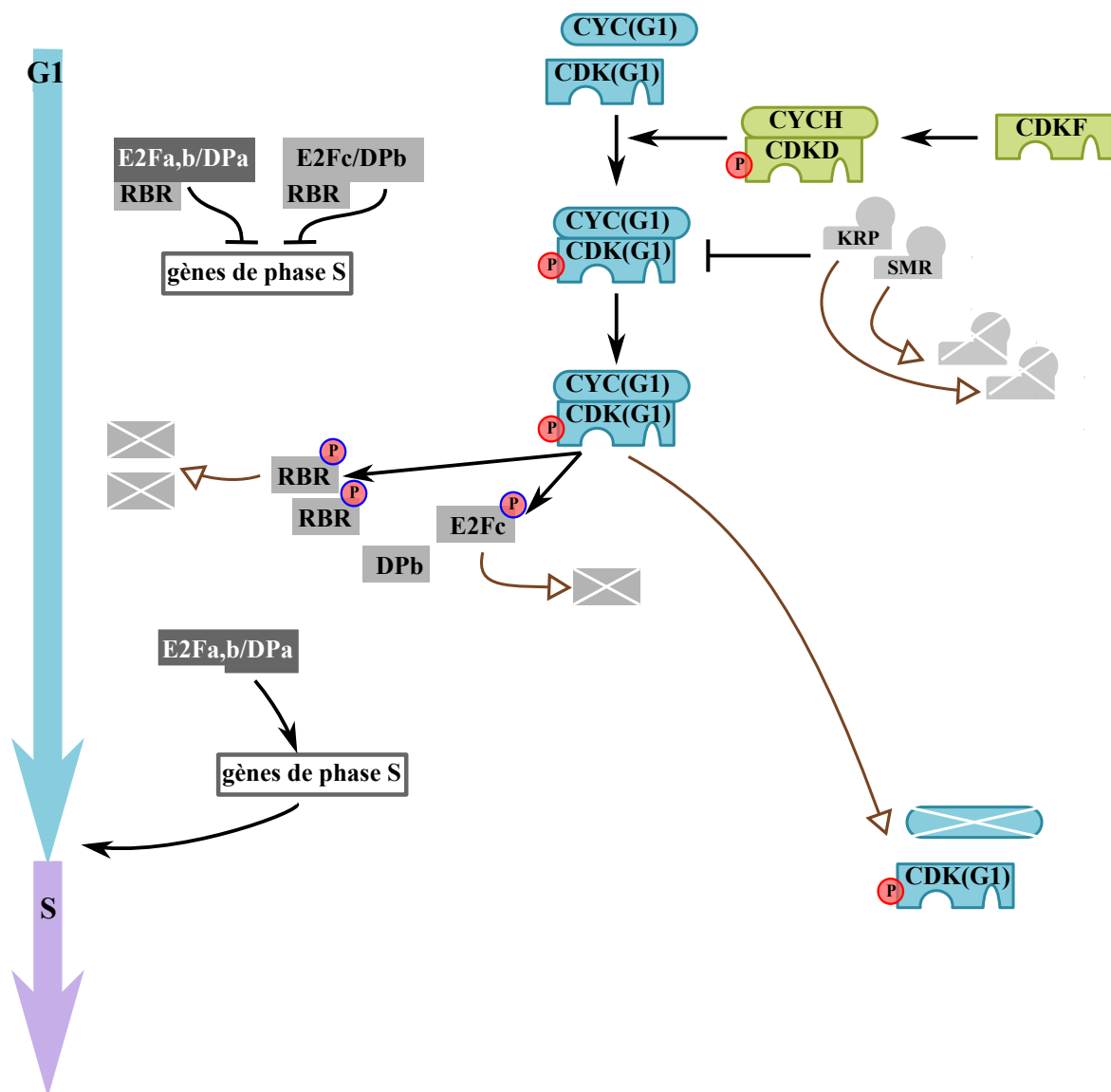


Figure I.5. Passage de la transition G1/S.

Les complexes CKD/CYC de phase G1 sont activés suite à leur phosphorylation par les CDK ACTIVATING KINASE et à la levée de l'inhibition par la dégradation des KIP RELATED PROTEIN (KRP) et les SIM RELATED PROTEIN (SMR). Ils phosphorylent leurs cibles dont E2Fc et RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR), ce qui conduit à leur dégradation et à l'activation de la transcription des gènes de phase S.

Gris foncé : régulateurs positifs de la progression, Gris clair : régulateurs négatifs, Flèches vides marron : dégradation par la voie Ubiquitine/Protéasome.

CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE, CYC : CYCLINE, E2F : E2 PROMOTOR-BINDING FACTOR, DP : DIMERIZATION PARTNER, P : phosphate (entouré de rouge quand activateur, de bleu quand inhibiteur)

La surexpression de différents KRP a également permis de confirmer leur action inhibitrice *in planta*: les surexpressions de *KRP 1, 2* ou *3* entraînent des phénotypes similaires caractérisés notamment par une inhibition de la croissance au niveau de la plante en général, des cellules moins nombreuses mais plus grandes et une baisse de l'activité des complexes CDK (De Veylder et al., 2001; Wang et al., 2000). En outre, la perte de fonction d'un seul ou de moins de quatre KRP n'entraîne pas de phénotype majeur, suggérant une redondance au moins partielle de leurs fonctions (Cheng et al., 2013). Néanmoins, la redondance est forcément limitée comme les *KRP* possèdent des profils d'expression différents que ce soit au niveau des spécificité spatiales ou temporelles. Mis à part *KRP1* et *6* qui semblent être exprimés dans toute la plante, les autres *KRP* montrent une expression tissu-spécifique avec, par exemple, une forte expression de *KRP4* dans les feuilles et *KRP2* dans les fleurs, alors que *KRP3* est très peu exprimé *in planta* mais très fortement dans des cellules en culture (De Veylder et al., 2001). Une expression différentielle a également été observée dans le MAC (Ormenese et al., 2004). Ils sont également exprimés de façon différentielle au cours du cycle cellulaire, avec notamment *KRP6* exprimé lors de la transition G1/S, *KRP3* et *5* pendant la phase S, *KRP1* à la transition G2/M et *KRP4* en début de phase M (Menges et al., 2005), suggérant des rôles spécifiques dans chacune des phases du cycle cellulaire. De plus, il est intéressant de noter que les KRP sont eux-mêmes régulés notamment en fonction de conditions environnementales ou en réponse à des phytohormones (Wang et al., 2008a).

Les plantes possèdent également une autre famille d'inhibiteurs de l'activité CDK/CYC : les SIAMESE (SIM)/SIM RELATED PROTEINS (SMR) composée de SIM et SMR 1 à 13 chez *A.thaliana* (Van Leene et al., 2011). Ces protéines possèdent des motifs de fixation aux CDK et CYC permettant leur interaction avec différents complexes CDK/CYC: CDKA/CYCD pour SMR 3-6 et 8 et CDKB1/CYCB pour SIM, SMR 1, 2 et 11 ((Van Leene et al., 2011), Figure I.4). De façon similaire aux KRP, la surexpression de SIM conduit à un ralentissement du cycle cellulaire (Churchman et al., 2006). D'autre part, un rôle spécifique aux SIM/SMR par rapport aux KRP semble être l'inhibition des complexes formés par CDKB, en lien avec le contrôle de la phase M et de l'endoréduplication. Cela a été confirmé par l'étude de certains mutants qui présentent un phénotype de perte d'endoréduplication au niveau des trichomes pour *sim* (Walker et al., 2000) ou au niveau des cellules épidermiques géantes des sépales pour *Igo-1* et *-2*, deux mutants de *SMR1* (Roeder et al., 2010).

Ainsi, la présence de différents CKI, KRP et SIM/SMR inhibe l'activité des complexes CDK/CYC par compétition avec leurs substrats. L'activation de ces complexes passe donc par la dégradation des CKI.

D- Les cibles des complexes CDK/CYC permettent la progression du cycle cellulaire

Se basant sur ce qui précède, il est possible de préciser comment se déroule la progression entre les différentes phases du cycle cellulaire. La transition G1/S est stimulée par la formation des complexes CDKA/CYCD puis son activation suite à sa phosphorylation par le complexe CDKD/CYCH, lui-même activé par CDKF (partie I.2.C, Figure I.5). Il faut également que les inhibitions par liaison aux KRP et SIM/SMR soient levées (partie I.2.C, Figure I.5). Une fois actif, CDKA/CYCD peut à son tour phosphoryler ses substrats dont RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR) ((Inzé and De Veylder, 2006), Figure I.5).

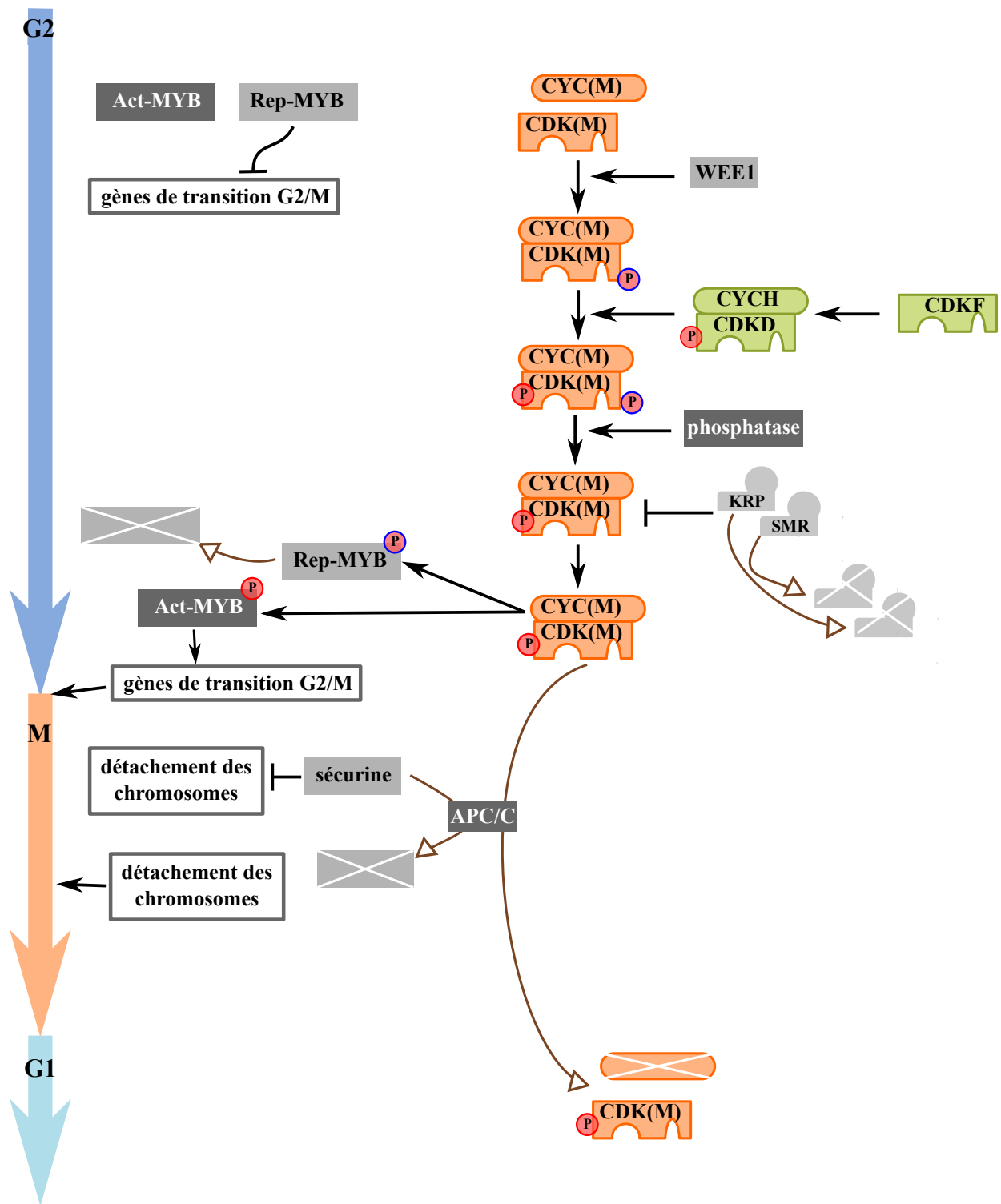


Figure I.6. Passage de la transition G2/M et progression en phase M.

Les complexes CDK/CYC sont activés par phosphorylation et levée des inhibitions (interaction avec les KIP RELATED PROTEIN (KRP) et les SIM RELATED PROTEIN (SMR), phosphorylation par WEE1). Par phosphorylation, ils activent les Act-MYB et répriment les Rep-MYB permettant ainsi l'expression des gènes de transition G2/M. Le complexe ANAPHASE PROMOTING COMPLEX/ CYCLOSOME (APC/C) est crucial pour la progression dans la phase M puis sa sortie respectivement grâce à la dégradation de la sécurine et des CYCLINES (CYC).

Gris foncé : régulateurs positifs de la progression, Gris clair : régulateurs négatifs, Flèches vides marron : dégradation par la voie Ubiquitine/Protéasome.

Act-MYB et Rep-MYB : Facteurs de transcription MYB respectivement activateurs et répresseurs, CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE, P : phosphate (entouré de rouge quand activateur, de bleu quand inhibiteur)

À l'état non phosphorylé, RBR interagit avec le facteur de transcription E2 PROMOTOR-BINDING FACTOR (E2F)/DIMERIZATION PARTNER (/DP) et bloque son activité, ce qui conduit à la répression des gènes régulés par E2F. Une fois phosphorylé, RBR est dissocié de E2F/DP menant à une activation des gènes E2F-dépendants. Chez *A. thaliana*, il existe 2 E2F activateurs : E2Fa et E2Fb qui et s'associent à DPa et fonctionnent comme activateurs transcriptionnels en absence de RBR (Figure I.5). Les gènes dont ils stimulent l'expression sont des gènes d'entrée en phase S comme les gènes *ORIGIN REPLICATION COMPLEX (ORC)*, *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGENE (PCNA)* ou *RBR*. 181 cibles putatives de E2Fa et E2Fb ont été identifiés parmi lesquelles une majorité de gènes codant pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, la réplication de l'ADN et la dynamique de la chromatine (Vandepoele et al., 2005). Il existe également une forme tronquée de E2F, E2Fc, qui n'a pas de fort domaine activateur transcriptionnel. E2Fc interagit avec DPb et réprime les gènes d'entrée en phase S, régulant ainsi négativement la transition G1/S (Inzé and De Veylder, 2006), Figure I.5). Cette inhibition est levée pour passer à la phase S par la dégradation sélective de E2fc, suite à sa phosphorylation par CDKA/CYCD, par la E3-ubiquitine-ligase SCF^{SKP2A} ((del Pozo et al., 2002b), Figure I.5). Un processus semblable est en jeu pour les régulateurs négatifs DP-E2F-LIKE 1 (DEL1, = E2Fe), DEL2 (= E2Fd) et DEL3 (= E2Ff) qui ne possèdent pas non plus de domaine activateur de transcription mais deux domaines de liaison à l'ADN: ils peuvent donc réprimer les gènes cibles en indépendamment de DP et pourrait jouer un rôle pour réguler finement un sous-ensemble des gènes E2F-dépendants (Inzé and De Veylder, 2006).

La transition G2/M met en jeu des mécanismes similaires. Les facteurs de transcription R1R2R3-MYB-LIKE (MYB3R) sont considérés comme les acteurs majoritaires du déclenchement de cette transition ((Magyar et al., 2016). Ils sont cruciaux pour réguler positivement (Act-MYB) ou négativement (Rep-MYB) l'expression d'un grand nombre de gènes spécifiques aux phases G2 et M (Figure I.6). Il a été démontré chez le tabac que des Act-MYB sont activés suite à leur phosphorylation par un complexe CDK/CYC de phase M ((Araki et al., 2004), Figure I.6). Au contraire, les Rep-MYB sont cruciaux pour la répression des gènes spécifiques à la transition G2/M en dehors de celle-ci et sont dégradés en fin de phase G2 par la voie du protéasome suite à leur phosphorylation par des CDK/CYC ((Chen et al., 2017), Figure I.6). Les complexes CDK/CYC de la transition G2/M peuvent être composés à la fois des CDKA ou B et des CYC A, B voire probablement D (partie I.2.C, Figure I.4.A). Comme détaillé précédemment, pour être actifs, ces complexes CDK/CYC doivent être phosphorylés par les CAK et perdre à la fois l'inhibition par phosphorylation par WEE1 grâce à l'action d'une phosphatase encore inconnue et celles dues à une potentielle interaction avec des KRP ou SIM/SMR (Figure I.6). L'activité des complexes CDK/CYC de phase M permet l'entrée de la cellule en phase M. Le déroulement de la phase M est ensuite dépendant de l'E3-Ubiquitine ligase APC/C qui initie la séparation des chromosomes. APC/C cible la SECURINE, une protéine qui interagit avec la SEPARASE, inhibant son activité protéase. Suite à la dégradation *via* APC/C de la SECURINE, la SEPARASE est enzymatiquement active et capable de dégrader la COHESINE qui maintient les chromatides attachées. L'anaphase est ainsi initiée ((Morgan, 2006), Figure I.6). La sortie de mitose est permise par un autre rôle crucial d'APC/C qui cible les CYC mitotiques pour dégradation, désactivant ainsi les complexes CDK/CYC de phase M (partie I.2.B, Figure I.6).

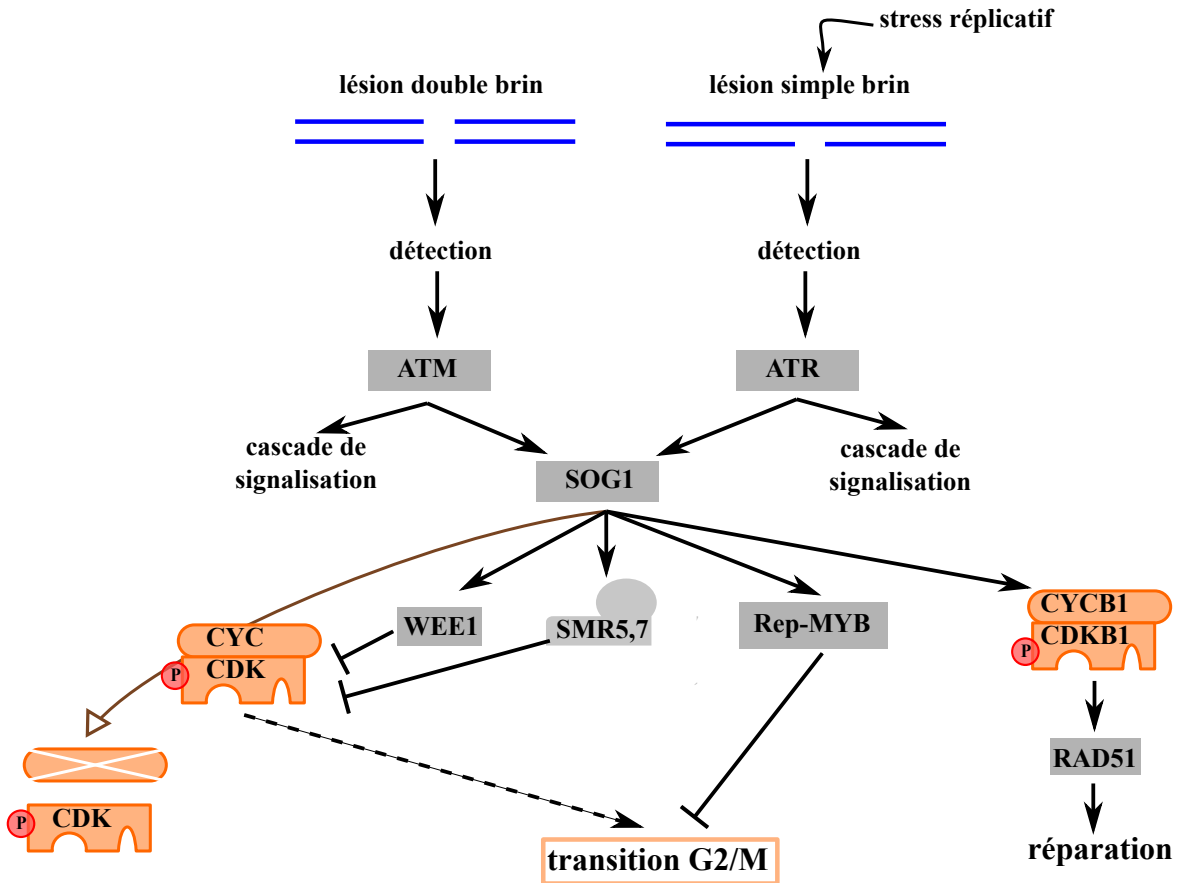


Figure I.7. Réponse des cellules face aux dommages à l'ADN.

La détection de lésions simple ou double brin de l'ADN conduit à l'activation du facteur de transcription SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 (SOG1). Par différentes voies, SOG1 inhibe la progression du cycle cellulaire notamment au niveau de la transition G2/M et promeut les mécanismes de réparation de l'ADN.

ATM : ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED, ATR : ATM-AND-RAD3-RELATED, CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE, CYC : CYCLINE, RAD51 : RADIATION SENSITIVE 51, Rep-MYB : facteur de transcription MYB represser, SMR : SIM RELATED PROTEIN

E- Les points de contrôle du cycle cellulaire

La progression phase par phase du cycle cellulaire n'est pas automatique et dépend notamment de l'intégrité de l'ADN cellulaire, contrôlée tout au long du cycle. Suite à un dommage à l'ADN, la cellule peut alternativement, en fonction de la gravité, activer des mécanismes, *via* des points de contrôle du cycle cellulaire, provoquant le délai ou l'arrêt du cycle cellulaire de façon à réparer l'ADN voire induire la mort cellulaire si les dégâts sont trop importants (Kaufmann and Paules, 1996). Ces mécanismes ont été regroupés sous le terme *DNA damage response (DDR)*. Les points de contrôle concernent à la fois l'intégrité globale de l'ADN (*DNA Damage Checkpoint*) qui peut être vérifiée tout au long du cycle et provoquer des arrêts en G1, S ou G2 et les erreurs de réplication de l'ADN (*Replication Checkpoint*) conduisant à un arrêt en phase S ou G2. De façon schématique, la kinase ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED (ATM) répond aux lésions double brin de l'ADN tandis que ATM-AND-RAD3-RELATED (ATR) répond aux lésions simple brin notamment dans le cas de stress de réplication ((Culligan et al., 2004; Culligan et al., 2006), Figure I.7). Suite à leur activation, elles mettent en place une cascade de signalisation pour répondre à ces dommages, initier leur réparation ou la mort de la cellule.

Il est important de souligner que même si les mécanismes sont semblables chez les animaux, ceux-ci possèdent un intégrateur clef, souvent appelé "gardien du génome" : p53 qui n'a pas d'homologue chez les plantes. p53 est l'intégrateur majeur de la DDR chez les animaux qui est activé différenciellement en fonction du niveau de dommage perçu notamment par ATM et ATR (Levine, 1997). En fonction de son niveau d'activation, p53 peut orienter la cellule soit vers un arrêt en G1/S en stimulant l'expression de p21, un inhibiteur des CDK/CYC, et la voie de réparation de l'ADN, soit vers la mort cellulaire par apoptose (Levine, 1997). Un homologue fonctionnel de p53 chez *A. thaliana* pourrait être SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1 (SOG1), un facteur de transcription dont l'activation, possible à la fois par ATM et ATR, est requise pour la plupart des réponses aux dommages à l'ADN comme l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la mort cellulaire programmée et l'endoréduplication ((Mahapatra and Roy, 2020), Figure I.7). Concernant l'arrêt du cycle cellulaire, SOG1 a des effets multiples : activation de la transcription de la kinase WEE1 suite à un stress réplcatif conduisant à l'inhibition des CDK/CYC (De Schutter et al., 2007), activation de la transcription des inhibiteurs du cycle *SMR 5* et *7* (Yi et al., 2014), dégradation de *CDKB2;1* (Adachi et al., 2011) et accumulation des Rep-MYB (Takahashi et al., 2019), menant à un arrêt des cellules en phase G2 (Figure I.7). Il est possible d'ajouter à ces effets l'induction de la cycline *CYCB1;1* (Weimer et al., 2016). Cette cycline, surexprimée de façon majeure en présence de dommages à l'ADN, participe à la réponse au dommage de l'ADN en association avec *CDKB1*. En effet, parmi les cibles de *CDKB1/CYCB1*, se trouve *RADIATION SENSITIVE 51 (RAD51)*, un des acteurs principaux de la réparation par recombinaison homologue suite à des lésions double brin de l'ADN (Figure I.7).

Par ailleurs, il existe un autre point de contrôle, plus localisé au niveau de la métaphase (*Spindle Assembly Checkpoint, SAC*) qui vise à vérifier le bon alignement des chromosomes sur la plaque équatoriale de la cellule. Chez les animaux, ce point de contrôle a été décrit avec précision.

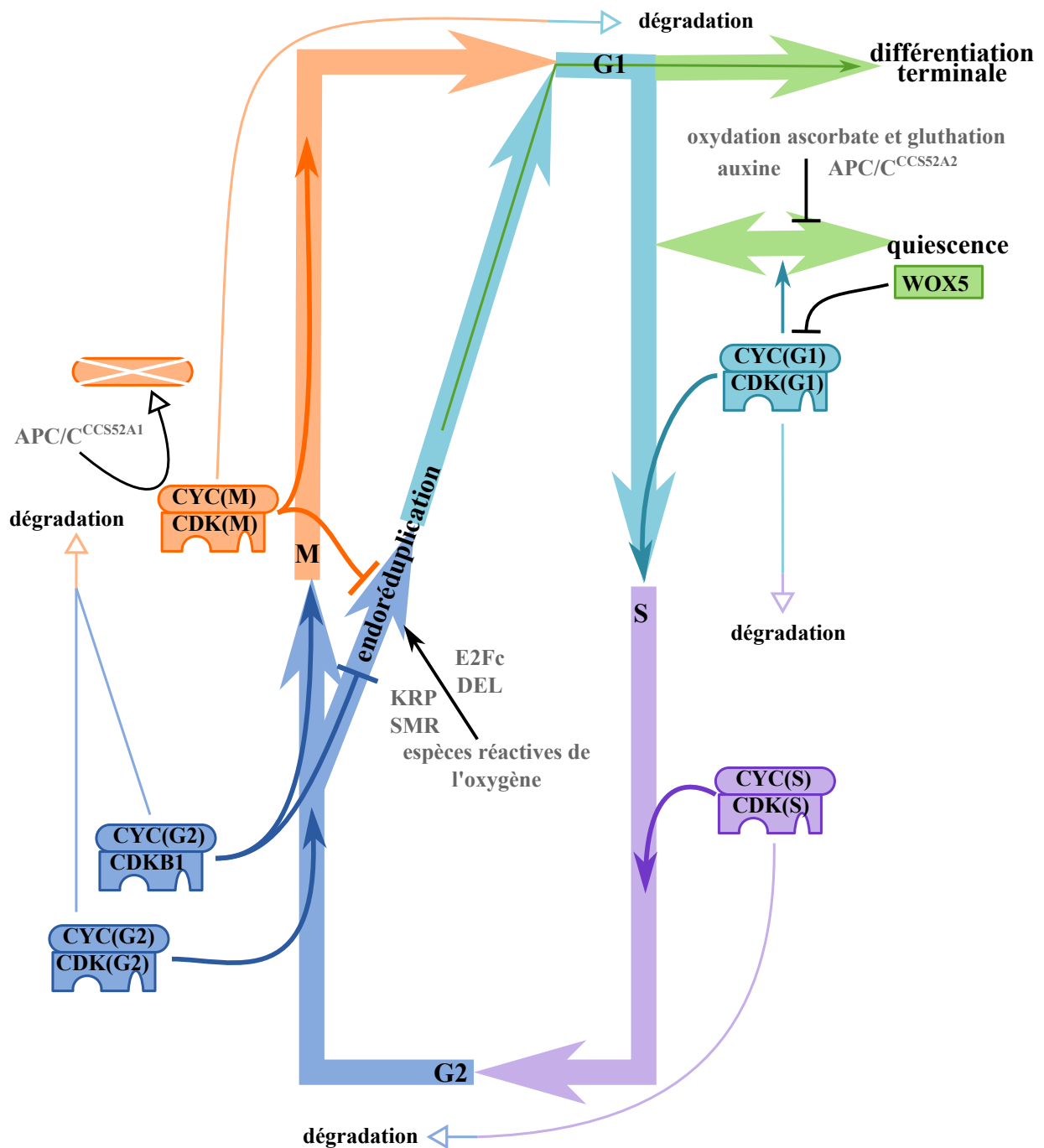


Figure I.8. Régulation de l'entrée et de la sortie du cycle cellulaire.

Le maintien de l'état de quiescence dépend de plusieurs facteurs dont l'inhibition des CYCLIN DEPENDENT KINASE (CDK)/CYCLINE (CYC) de phase G1 par WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 5 (WOX5). La sortie du cycle pour entrer en différenciation terminale est fortement favorisée par l'endoréduplication. Celle-ci est sous le contrôle de nombreux facteurs dont les complexes CDK/CYC des phases G2 et M qui l'inhibent fortement.

Les flèches vides indiquent la dégradation par la voie Ubiquitine/Protéasome. La phase dans laquelle chaque complexe CDK/CYC est actif est indiquée entre parenthèse.

APC/C : ANAPHASE PROMOTING COMPLEX, CCS52A : CELL CYCLE SWITCH 52A, DEL : DP-E2F-LIKE, E2Fc : E2 PROMOTOR-BINDING FACTOR c, KRP : KIP RELATED PROTEIN, SMR : SIM RELATED PROTEIN

Il met notamment en jeu la protéine MAD2 qui, en présence de kinétochore(s) mal attaché(s) peut lier le complexe APC/C inhibant son activité et ainsi la dégradation de ses substrats dont la SECURINE qui empêche la dissociation des chromatides sœurs (Morgan, 2006). Chez *A. thaliana*, même si l'architecture moléculaire est légèrement différente, un tel point de contrôle existe et permet le délai du cycle cellulaire si le fuseau mitotique est perturbé (Komaki and Schnittger, 2017). De façon spécifique aux plantes, la réponse SAC est limitée dans le temps et ne reste pas active plus de 2h, conduisant à une remise à zéro du cycle cellulaire et donc à un passage directement en G1 sans division (Komaki and Schnittger, 2017). Cette spécificité végétale permet probablement des duplications de génome de façon plus aisée que chez les animaux.

F- Intégration du contrôle du cycle cellulaire lors du développement

Au-delà du fonctionnement classique du cycle cellulaire (Partie I-2-B,C et D), la plante doit pouvoir s'adapter et adapter la progression de son cycle cellulaire à différentes conditions environnementales ou internes. Il a déjà été souligné à plusieurs reprises que certains régulateurs, comme les CYCD et les KRP, pouvaient être sensibles aux variations environnementales ou phytohormonales permettant ainsi un ajustement du cycle cellulaire. Un autre exemple déjà abordé est l'adaptation aux dommages à l'ADN (Partie I-2-E) qui peut entraîner un arrêt du cycle cellulaire voire le passage vers la différenciation par stimulation de l'endoréduplication ou enfin la mort cellulaire programmée. Ces exemples soulignent l'importance pour la plante de pouvoir passer d'un état de division à un autre et donc de pouvoir entrer et sortir du cycle cellulaire. Les cellules en dehors du cycle cellulaire peuvent être dans différents états de quiescence ou en dormance (Partie I-2-A, Figure I.3). La phase de quiescence est souvent notée G0 mais il est encore mal défini si elle correspond à un état distinct ou s'il s'agit d'un prolongement de la phase G1 (Velappan et al., 2017). L'existence d'une phase G0 distincte est plus communément admise chez les animaux où la présence d'un point de restriction précoce en phase G1 orienterait les cellules soit vers le stade de quiescence G0 soit vers la poursuite du cycle (Pardee, 1974). La présence d'un tel point de restriction n'est pas encore démontrée chez les plantes.

L'état de quiescence méristématique, retrouvé par exemple dans le centre quiescent du MAR et dans le centre organisateur du MAC, est atteint grâce à un certain nombre de régulateurs décrits en partie précédemment pour le MAR (partie I-1-B). Il est intéressant de souligner ici que WOX5 maintient l'état de quiescence en réprimant transcriptionnellement les CYCD ((Forzani et al., 2014), Figure I.8). Un niveau faible de *RBR* est requis pour préserver l'état des cellules souches et inhiber leur différenciation (Wildwater et al., 2005). Un autre acteur majeur serait le complexe APC/C : son association avec CELL CYCLE SWITCH 52A 2 (CCS52A2) au niveau des cellules quiescentes est indispensable au maintien de l'état de quiescence ((Vanstraelen et al., 2009), Figure I.8) même si les cibles dégradées ne sont pas encore totalement élucidées. De plus, le couplage entre oxydation des antioxydants ascorbate et glutathion et maximum d'auxine dans le centre quiescent est également important pour l'arrêt de ces cellules en G1/G0 ((Velappan et al., 2017), Figure I.8).

Les régulateurs de l'état de quiescence suite à la différenciation terminale sont différents. La différenciation est souvent liée au passage à l'endoréduplication où la cellule continue à doubler son contenu chromosomique sans se diviser ((De Veylder et al., 2011), Figure I.8).

Une baisse de l'activité CDK mitotique semble nécessaire ((De Veylder et al., 2007), Figure I.8). En effet, augmenter expérimentalement le niveau d'activité de CDK par la surexpression de *CYCA* ou *CYCD* conduit à une inhibition de la différenciation des cellules foliaires (Dewitte et al., 2003; Imai et al., 2006), tandis que sa diminution par l'expression de mutants *CDK* dominant-négatifs ou de *KRP* provoque une sortie précoce du cycle cellulaire (Boudolf et al., 2004; Verkest et al., 2005). Un régulateur clef pourrait ainsi être CDKB1 qui est G2/M spécifique : sa perte totale ou partielle entraîne un passage précoce vers des endocycles ((Boudolf et al., 2004), Figure I.8). Certains KRP et SIM/SMR ont également été directement reliés à l'endoréduplication ((De Veylder et al., 2011), Figure I.8), ainsi que E2Fc ((Pozo et al., 2006), Figure I.8) et les DEL ((De Veylder et al., 2007), Figure I.8). D'autres modulations sont en jeu comme celles par les espèces réactives de l'oxygène ((Considine et al., 2017), Figure I.8) et par le complexe APC/C associé à CCS52A1, lui-même régulé par les cytokinines. APC/C^{CCS52A1} cible notamment les *CYCA* mitotiques, conduisant à leur dégradation par le protéasome ((Boudolf et al., 2009), Figure I.8). Ces deux exemples de quiescence montrent comment la machinerie du cycle cellulaire peut être modulée lors du développement de la plante pour permettre la croissance des organes et leur coordination.

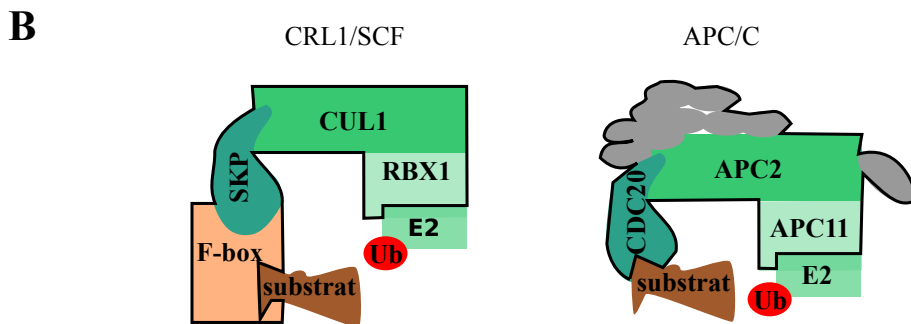
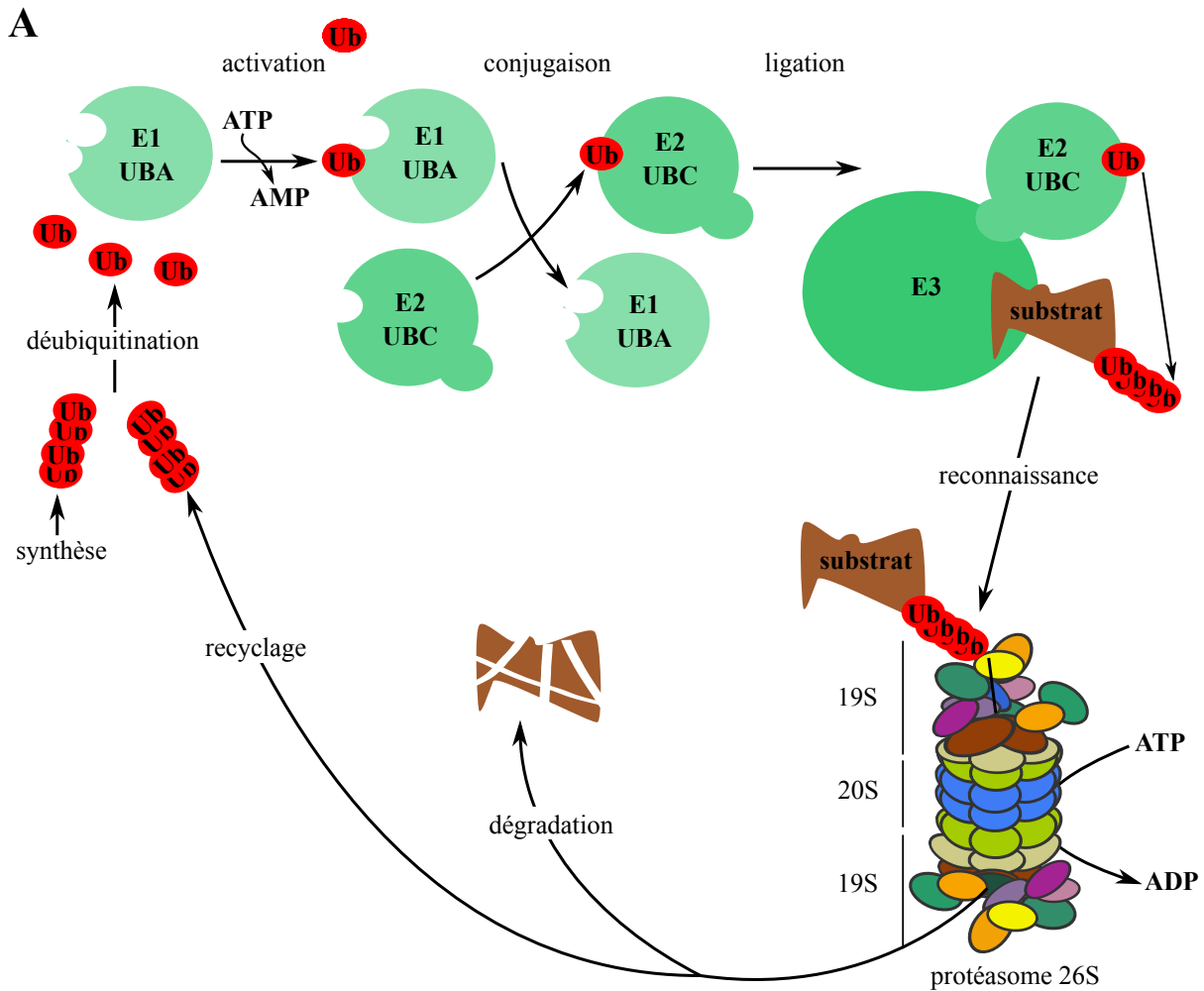


Figure I.9. La voie Ubiquitine/Protéasome conduit à la dégradation de ses substrats

A. Représentation schématique des différentes étapes de la voie Ubiquitine/Protéasome. L'ubiquitine (Ub) est d'abord activée par l'enzyme E1 (Ub-ACTIVATING ENZYME, UBA) puis conjuguée à l'enzyme E2 (Ub-CONJUGATING ENZYME, UBC) avant d'être transférée au substrat grâce à l'enzyme E3 Ub-ligase. Le substrat polyubiquitiné est reconnu par le protéasome, ce qui conduit à sa dégradation et au recyclage de l'Ub.

B. Exemple de deux types d'E3-Ubiquitine ligase appartenant à la classe des ligases CULLIN-RING (CRL). L'E3 ligase (entourée en noir) est composée de plusieurs sous-unités permettant son interaction avec le substrat et l'enzyme E2 de conjugaison de l'ubiquitine. Les complexes CRL1 aussi appelés SCF (S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN (SKP)/CULLIN (CUL)/F-BOX CONTAINING) sont composés de CUL1, d'une protéine de liaison SKP, d'une protéine RING-BOX1 (RBX1) interagissant avec E2 et d'une protéine F-box qui est l'adaptateur spécifique du substrat. Les complexes ANAPHASE PROMOTING COMPLEXE/CYCLOSOME (APC/C) sont composés de APC2 (de la famille des CUL), APC 11 (une protéine RING), de la sous-unité adaptatrice CELL DIVISION CYCLE 20 (CDC20), et de 7 à 10 autres sous-unités (en gris).

3- Dégradation des protéines par la voie Ubiquitine protéasome

Comme évoqué plus haut (partie I-2), la régulation de la progression du cycle cellulaire passe par des mécanismes très divers. Il est cependant important de noter la place cruciale qu'occupe la régulation post-traductionnelle en général et la dégradation des protéines en particulier de ces processus. Parmi les différents mécanismes, le système Ubiquitine/Protéasome (Ub/Pr), très bien conservé chez les eucaryotes, est mis en jeu pour dégrader non seulement des protéines anormales ou endommagées mais également des protéines clefs du développement dont le taux est finement contrôlé.

A- Présentation générale du système Ub/Pr

De façon globale, le système implique deux étapes : le marquage de la protéine cible par une ou plusieurs molécules d'Ub puis son adressage et sa dégradation par le protéasome. L'Ub est un petit peptide (8,5 kDa) qui peut se lier de façon covalente sur un ou plusieurs résidus de lysine des protéines ciblées. La manière dont l'Ub est attachée sur son substrat conditionne le devenir dudit substrat. De façon générale, l'Ub peut être attachée sous forme monomérique conduisant à des protéines monoubiquitinées ou multi-monoubiquitinées si elles possèdent plusieurs sites modifiables. Ces marques ont majoritairement été associées à l'activation des gènes d'immunité et au renouvellement des protéines transmembranaires (Miricescu et al., 2018). Cependant, certains cas de multi-monoubiquitination, notamment de protéines petites et désordonnées, amènent aussi à leur dégradation (Dimova et al., 2012; Saeki, 2017). L'Ub peut aussi former de longues chaînes conduisant à différentes formes de polyubiquitination des substrats. Le cas le plus classique est la formation de longues chaînes par ubiquitination de la lysine 48 (K 48) de Ub qui est reconnue par le protéasome et mène à la dégradation des cibles (Saeki, 2017). Ce signal est le plus canonique concernant la dégradation *via* le système Ub/Pr, mais d'autres types de chaînes comme les longues chaînes en K29, les chaînes courtes multiples (K11, K48 et K63) ou les chaînes branchées (K11/K48, K48/K63) catalysées par APC/C mènent également à la dégradation protéosomale (Saeki, 2017). Enfin, les longues chaînes de polyubiquitine en K63, en plus de participer au système Ub/Pr, ont été plus particulièrement associées à des signaux de dégradation dépendants des lysosomes et des vacuoles (Miricescu et al., 2018).

L'Ub est exprimée comme une répétition d'unités d'Ub ou en fusion N-terminale avec d'autres protéines : classiquement avec des protéines ribosomales ou, spécifiquement chez les plantes, avec le petit peptide RELATED TO UBIQUITIN (RUB)/NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8 (NEDD8) (Miricescu et al., 2018). S'ensuit le clivage de ces précurseurs par des enzymes de débiquitination (DUB) (Figure I.9.A). Ces étapes pourraient être un moyen d'établir un "contrôle qualité" sur les monomères d'Ub (Amerik and Hochstrasser, 2004). La conjugaison de l'Ub sur les protéines cibles est réalisée par trois enzymes consécutives : l'enzyme d'activation de l'Ub E1 (ou *Ub-Activating enzyme*, UBA), l'enzyme de conjugaison de l'Ub E2 (ou *Ub- conjugating enzyme*, UBC) et l'Ub-ligase E3 (Figure I.9.A). E1 active un peptide Ub en ajoutant un groupement adényle à sa partie C-terminale grâce à son activité ATP-hydrolase. Le peptide Ub se lie ensuite de façon covalente par son groupe carboxylate C-terminal à la cystéine du site actif de E1 ((Haas et al., 1982), Figure I.9.A).

Il est ensuite transféré sur la cystéine du site actif de l'enzyme E2 (Figure I.9.A). Après cela, il est directement attaché à la lysine de la protéine cible *via* l'activité catalytique de E3 qui assure la spécificité de la réaction ((Hershko et al., 1983), Figure I.9.A).

Une fois la protéine ubiquitinée, elle peut être reconnue par différents types de protéines possédant un domaine de liaison à l'Ub (*Ub Binding Domain*, UBM). Cette reconnaissance permet la discrimination entre les différents types d'ubiquitination et ainsi l'orientation des protéines ubiquitinées dans les différentes voies cellulaires. Pour le cas de la voie Ub/Pr, la reconnaissance se fait par le protéasome 26S (Figure I.9.A). Celui-ci est composé de nombreuses protéines (au moins 66) (Bedford et al., 2010). Ces protéines forment un cœur catalytique 20S et un ou deux complexes régulateurs 19S dont les rôles sont les suivants : la liaison de protéines ubiquitinées, leur dé-ubiquitination menant au recyclage de l'Ub, leur dénaturation et l'ouverture du canal du protéasome pour permettre leur translocation dans le cœur 20S où se fait ensuite la dégradation (Figure I.9.A). L'assemblage du protéasome est un processus nécessitant un enchaînement précis de diverses étapes notamment pour permettre la maturation du site actif protéolytique (Bedford et al., 2010). Son fonctionnement est complexe et utilise de l'énergie sous forme d'ATP.

B- Le rôle crucial des E3 Ub-ligases pour la spécificité des dégradations

Les E3 Ub-ligases contrôlent la spécificité de la réaction d'ubiquitination en assurant la reconnaissance des protéines cibles. Il existe ainsi une grande diversité d'enzymes E3 : chez *A. thaliana*, plus de 1400 gènes ont été identifiés comme codant des composants de ligases E3 (Lee and Kim, 2011). Ces E3 peuvent être divisées en trois familles par rapport au domaine permettant leur interaction avec les enzymes E2 : les ligases E3 à domaine HECT (Homology to E6-AP C-Terminus), à domaine RING (Really Interesting New Gene) et à domaine RING finger-like U-box (Chen and Hellmann, 2013). Les E3 plus particulièrement impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire appartiennent à une sous-famille de ligases à domaine RING : les ligases CULLIN-RING (CRL) dont font partie les ligases CRL1 (aussi appelées SCF pour S-PHASE KISASE ASSOCIATED PROTEIN (SKP)/CULLIN (CUL)/F-BOX CONTAINING) et les APC/C (Teixeira and Reed, 2013). Les complexes SCF sont composés d'une protéine RING nommée RING-BOX1 (RBX1) qui peut interagir avec E2, d'un adaptateur spécifique du substrat appelé F-box et de protéines de formation du complexe : CUL1 et une protéine de liaison SKP (Figure I.9.B). Malgré l'absence de preuve concrète de l'incorporation d'une majorité d'entre elles dans des complexes CRL, la présence de plus de 700 F-box différentes doit permettre aux CRL de se lier à une grande diversité de substrats (Gagne et al., 2002). Cela est cohérent avec le nombre important de fonctions associées aux SCF en plus du contrôle de la progression du cycle cellulaire et de leur rôle central dans la transduction des signaux phytohormonaux parmi lesquelles il est possible de citer le contrôle du rythme circadien, de certains systèmes d'auto-incompatibilité, de la senescence et du temps de floraison (Chen and Hellmann, 2013).

Concernant le cycle cellulaire, le rôle des SCF semble crucial avant tout au niveau de la transition G1/S. Chez les animaux, ce rôle est bien caractérisé notamment concernant la dégradation, par exemple, des CKI, de E2F, des CYCA, D et E par SCF^{SKP2} (Frescas and Pagano, 2008), permettant ainsi l'entrée de la cellule en phase S.

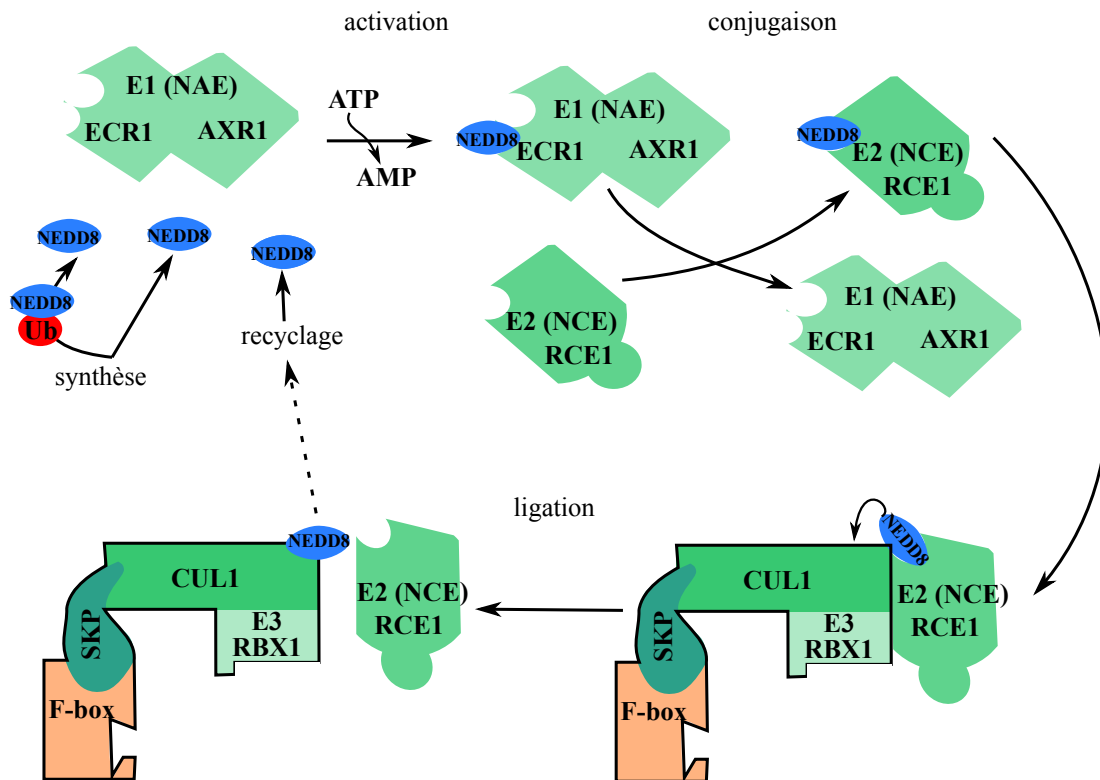


Figure I.10. La voie de neddylation.

La voie de neddylation ressemble à celle d'ubiquitinylation (Fig I.9.A). NEDD8 est exprimée seule ou en fusion avec l'Ub. Le peptide NEDD8 est activé par l'enzyme E1, appelée NEDD8 ACTIVATING ENZYME (NAE) et constituée chez les plantes d'un hétérodimère entre AUXIN RESISTANT 1 (AXR1) et E1-C-TERMINAL RELATED (ECR1). Il est ensuite conjugué sur l'enzyme E2 ou NEDD8 CONJUGATING ENZYME (NCE), fonction réalisée par RUB CONJUGATING ENZYME 1 (RCE1) chez les plantes. La fonction E3-ligase est assurée par RING-BOX1 (RBX1), une sous-unité du complexe E3-Ubiquitine ligase. Les CUL sont les substrats spécifiques de la neddylation.

NEDD8 : NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8

Si la fonction paraît conservée chez les plantes, les SCF précis impliqués dans la dégradation des CYC spécifique de G1 ne sont pas encore identifiées. Les complexes SCF^{SKP2B} et SCF^{FBL17} semblent cibler pour dégradation les inhibiteurs de cycle KRP (Kim et al., 2008a; Ren et al., 2008; Zhao et al., 2012). SCF^{SKP2} permet la dégradation du régulateur négatif E2Fc (del Pozo et al., 2002b).

Les complexes APC/C régulent eux spécifiquement la transition G2/M du cycle cellulaire. Ils sont composés de 11 à 13 sous-unités dont : APC2, un membre éloigné de la famille des CUL, APC11, une protéine RING, ainsi que des sous-unités adaptatrices CELL DIVISION CYCLE 20 (CDC20) et CELL CYCLE SWITCH 52 (CCS52) ((Chen and Hellmann, 2013), Figure I.9.B). Le rôle des autres sous-unités n'est pas encore complètement élucidé. Contrairement aux CRL1, les fonctions d'APC/C sont quasiment exclusivement centrées autour de la régulation du cycle cellulaire. Ces rôles ont été en partie détaillés précédemment, notamment quant à la dégradation des CYC mitotiques, au SAC et à la régulation de l'endoréplication (partie I.2). Un seul rôle plus éloigné de la régulation du cycle cellulaire, faisant intervenir la sous-unité APC10, a été mis en évidence dans la régulation de la machinerie d'interférence à ARN (Marrocco et al., 2012).

Enfin, il existe également d'autres complexes CRL incorporant d'autres CUL : CUL3A et CUL3B pour les CRL3 et CUL4 pour les CRL4. Leurs rôles sont moins directement liés à la régulation du cycle cellulaire et certains d'entre eux seront abordés par la suite (partie I.4.C).

C- La régulation de l'activité CRL

Précédemment a été souligné le rôle de la dégradation des protéines en général et de certaines E3 ligases comme les CRL en particulier dans la régulation de la progression du cycle cellulaire. Étant donné la grande diversité de certaines sous-unités comme les F-box qui orientent le choix entre les différents substrats, il est crucial que l'assemblage et l'activité des CRL soient finement régulés pour permettre une protéolyse ajustée aux différentes situations. Au niveau des CUL, cette régulation passe notamment par l'ajout covalent d'un peptide RUB/NEDD8 qui conditionne leur capacité d'interaction, le complexe CRL étant stabilisé en présence de CUL neddylées (CUL^{NEDD8}) (Schwechheimer, 2018).

NEDD8 présente 60% d'homologie au niveau de sa séquence d'acide aminés avec l'Ub et une structure quasi identique (Kamitani et al., 1997). Trois gènes encodent NEDD8 chez *A. thaliana* : *RUB1* et *2* sont exprimés en fusion avec l'Ub et *RUB3* est exprimé seul ((Rao-Naik et al., 1998), Figure I.10). La voie de neddylation est très semblable à la voie d'Ub, impliquant une cascade de trois enzymes : une enzyme E1 pour l'activation appelée NEDD8 ACTIVATING ENZYME (NAE), une enzyme E2 pour la conjugaison appelée NEDD8 CONJUGATING ENZYME (NCE) et une enzyme E3 pour la ligation spécifique du substrat ((Parry and Estelle, 2004), Figure I.10). La fonction E1 NAE est réalisée par l'hétérodimérisation entre AUXIN RESISTANT 1 (AXR1) ou AXR1-LIKE (AXL) et E1 C-TERMINAL RELATED 1 (ECR1) ((del Pozo et al., 2002a; Dharmasiri et al., 2007), Figure I.10) et la fonction E2 NCE est assurée par RUB CONJUGATING ENZYME 1 (RCE1) ((del Pozo and Estelle, 1999), Figure I.10). La fonction E3 est assurée par RBX1, la protéine à domaine RING du complexe CRL ((Gray et al., 2002; Morimoto et al., 2003), Figure I.10).

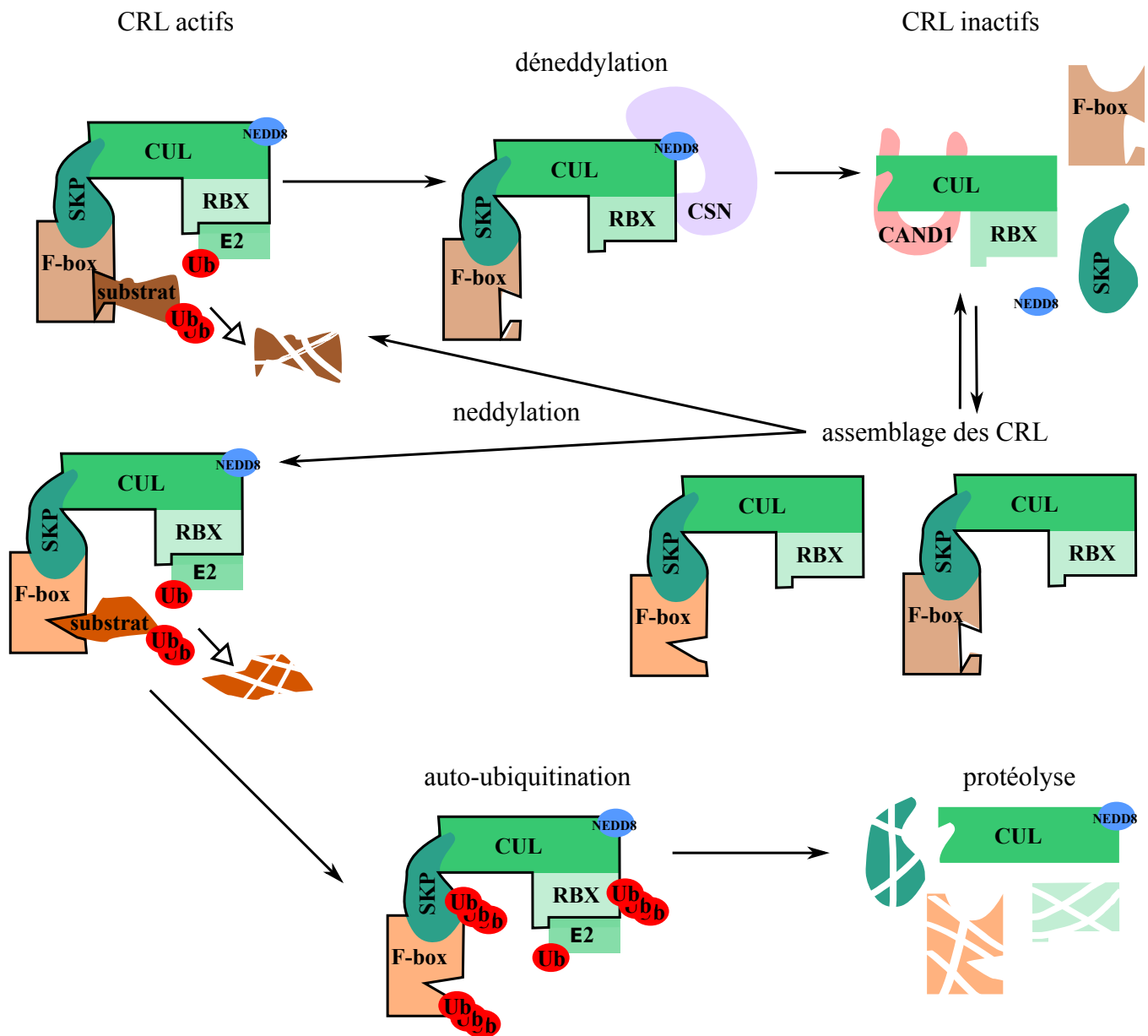


Figure I.11. Régulation de l'activité des ligases CULLIN-RING (CRL).

Les complexes CRL (encadrés en noir) qui sont des E3-ubiquitine ligases actives lorsque neddyllées conduisent à la dégradation de leur substrat par protéolyse. Une activation prolongée peut conduire à leur auto-ubiquitination et dégradation. CSN est l'enzyme permettant la déneddylation des CRL, menant à leur inactivation par désassemblage et association avec CAND1. Les complexes peuvent ensuite être ré-assemblés puis neddyllés pour devenir actifs. Ces cycles de neddylation/dénéddylation et association à CAND1 permettent notamment le changement de sous-unité F-box et ainsi de spécificité de substrat.

CAND1 : CULLIN-ASSOCIATED NEDD8-DISSOCIATED 1, CSN : CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME, CUL : CULLIN, E2 : enzyme de conjugaison de l'ubiquitine, NEDD8 : NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8, RBX : RING-BOX , Ub : UBIQUITINE, SKP : S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN

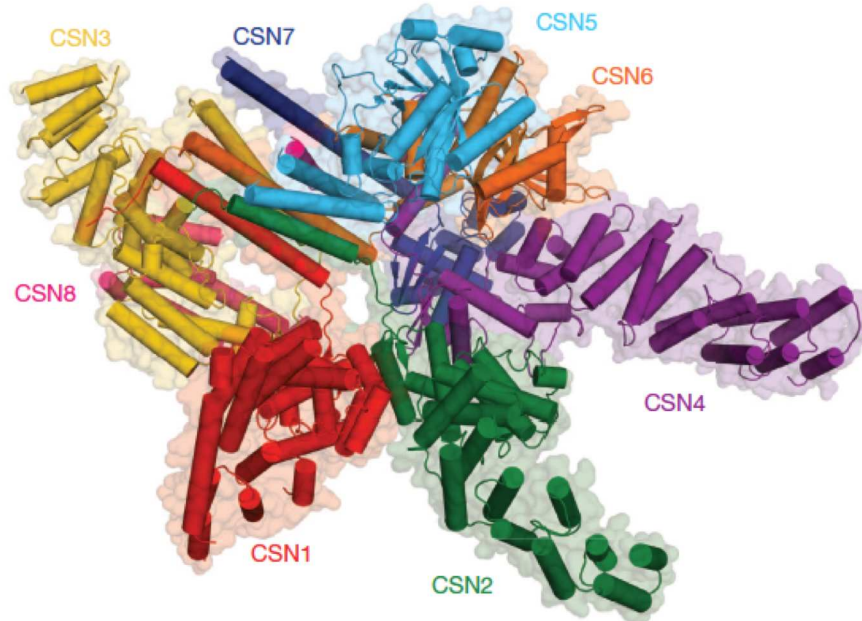
Les substrats bien définis de RBX1 sont les CUL au niveau de la lysine du motif conservé VRIMK dans le domaine *winged-helix B* (WHB), et plus spécifiquement CUL1, 3A, 3B et 4 qui peuvent participer à la formation de complexes CRL ((Schwechheimer, 2018), Figure I.10).

L'état de neddylation des CUL influe fortement sur l'activité des complexes CRL (Figure I.11). La neddylation de CUL1 peut stabiliser le CRL et augmenter son activité en favorisant sa dimérisation (Bosu and Kipreos, 2008). Elle conduit également à relâcher l'interaction entre RBX1 et le domaine WHB de CUL1 ce qui facilite l'interaction avec l'E2 impliquée dans l'ubiquitination (Duda et al., 2008). En outre, elle inhibe l'interaction avec CULLIN-ASSOCIATED NEDD8-DISSOCIATED 1 (CAND1), un inhibiteur de l'assemblage des CRL (Liu et al., 2002). Néanmoins, une hyper-neddylation des CUL peut avoir un effet inverse sur l'activité des CRL, promouvant l'auto-ubiquitination et la dégradation de certaines sous-unités comme RBX1 ((Cope and Deshaies, 2006; Peth et al., 2007), Figure I.11).

NEDD8 reste associée aux CUL tant que le complexe entier reste formé et interagit avec son substrat. Uniquement une fois le substrat dégradé, un complexe protéique appelé CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 (COP9) SIGNALOSOME (CSN) peut accéder à la CUL et la déneddylater ((Cavadini et al., 2016), Figure I.11). L'identification et le rôle précis de CSN seront détaillées dans la partie suivante (partie I-4). Une fois la CUL déneddylée, le dimère CUL-RBX1 se dissocie des autres sous-unités et lie la protéine inhibitrice CAND1 ((Liu et al., 2002; Zheng et al., 2002), Figure I.11). Cette interaction bloque le réassemblage des CRL et la neddylation de CUL. Cependant le rôle de CAND1 n'est pas uniquement inhibiteur puisque son absence *in vivo* conduit à l'inactivation des complexes SCF chez *A. thaliana* (Chuang et al., 2004). CAND1 peut agir en favorisant l'échange entre les différentes protéines F-Box possibles pour un complexe CRL, régulant ainsi la spécificité de son substrat ((Liu et al., 2018; Zemla et al., 2013), Figure I.11).

Toutes ces études permettent d'aboutir à un modèle de régulation des CRL à plusieurs niveaux (Figure I.11). De façon simplifiée, les complexes CRL sont actifs lorsque la CUL qui les compose est neddylée, ce qui conduit à la dégradation des substrats. Ils sont inactivés suite à leur déneddylation par CSN, leur désassemblage et l'association de certaines sous-unités avec CAND1. De façon plus précise, CSN et CAND1 ne sont pas uniquement des inhibiteurs de l'activité de CRL. En effet, CSN est nécessaire pour assurer des cycles de neddylation/dénéddylation qui conduisent, *via* CAND1, à un échange de F-box et donc de spécificité de substrat des CRL. Ces cycles permettent aussi de limiter l'auto-ubiquitination de certaines sous-unités des CRL conduisant à leur dégradation. Ils sont donc strictement nécessaires au bon fonctionnement des CRL et donc au développement des organismes. Ainsi, par exemple, les mutants *csn*, chez qui la fonction déneddylase est perdue, meurent quelques jours après germination (Wei and Deng, 2003). Plus précisément, même si une surabondance de CUL^{NEDD8} est bien observée, les substrats des CRL s'accumulent dans ces plantes (Hotton and Callis, 2008). Ces résultats sont contraires aux données *in vitro* où l'ajout de CSN inhibe l'ubiquitination des substrats (Hotton and Callis, 2008). Ils soulignent que l'activité de déneddylation de CSN est requise *in vivo* pour permettre le bon fonctionnement des CRL. Enfin, les cycles d'assemblage/désassemblage sont tout particulièrement cruciaux pour l'adaptation à différents contextes développementaux ou environnementaux (Lydeard et al., 2013). Il est ainsi important de souligner que la régulation des CRL est un processus particulièrement dynamique (Mosadeghi et al., 2016).

A



B

Sous-unité	Motif	Autres noms	Autre noms (H. sapiens)	Identité avec l'homologue humain
CSN1	PCI	COP11/FUS6	GPS1	44,7%
CSN2	PCI	COP 12/FUS12	TRIP15 ALIEN	61,1%
CSN3	PCI	COP13/FUS11		42%
CSN4	PCI	COP8/FUS4		49,5%
CSN5A CSN5B	MPN (JAMM+) MNP (JAMM+)	AJH1 AJH2	JAB1	62%
CSN6A CSN6B	MPN MPN		HVIP	39,8%
CSN7	PCI	COP15/FUS5		34,4%
CSN8	PCI	COP9/FUS7 /FUS8		32,3%

Figure I.12. Formation et composition du complexe CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME (CSN).

A. Adapté de Lingaraju et al., 2014. Structure cristalline du CSN humain

B. Adapté de Serino et Deng, 2003. Comparaison des différentes sous-unités de CSN chez *Arabidopsis thaliana* et *Homo sapiens*. Le domaine PCI (pour Proteasome, COP9, Initiation factor 3) permet l'interaction entre les sous-unités. Le domaine MPN (MPR1/PAD1/N-terminal domain) porte l'activité catalytique, mais n'est actif qu'en présence d'un motif JAMM+ (JAB1/MPN domain metalloenzyme).

4- Focus sur CSN, un régulateur clef du cycle cellulaire

Comme décrit juste avant, CSN est un régulateur clef des complexes CRL car il possède une activité enzymatique de déneddylation. Il possède un rôle purement inhibiteur sur les CRL *in vitro*, mais la situation *in vivo* est beaucoup plus complexe car les cycles de neddylation/dénéddylation des CUL sont nécessaires au bon fonctionnement des CRL. CSN est ainsi un régulateur clef des CRL qui eux-mêmes contrôlent la progression du cycle cellulaire. Il est donc important de détailler le fonctionnement de CSN pour pouvoir en comprendre le lien étroit avec la progression du cycle cellulaire.

A- Présentation du complexe CSN

Le complexe CSN a premièrement été identifié chez *A. thaliana* dans un groupe de mutants présentant un phénotype caractéristique de photomorphogenèse constitutive dans le noir associé à une mort prématurée une dizaine de jours après germination ((Wei and Deng, 1992), Figure I.13.D). D'après le phénotype, ces mutants ont premièrement été appelés *constitutive photomorphogenesis/de-etiolated/fusca (cop/det/fus)*. Plus tard, des protéines homologues ont été retrouvées chez les mammifères et les invertébrés, soulignant la conservation du complexe chez les eucaryotes (Wei and Deng, 1999). Le complexe est composé de huit sous-unités qui sont de manière générale très conservées. Par exemple, le niveau d'homologie de séquence entre *A. thaliana* et l'homme est compris entre 32,3% (pour CSN8) et 62% (pour CSN5) ((Serino and Deng, 2003), Figure I.12.B). Chez *A. thaliana*, les sous-unités CSN 1-4, 7 et 8 sont codées chacune par un seul gène, tandis que CSN5 et 6 sont codées par deux gènes ((Gusmaroli et al., 2007), Figure I.12.B). CSN5A et B jouent des rôles inégaux durant le développement, avec CSN5A comme sous-unité fonctionnelle prédominante. Au contraire, CSN6A et B sont majoritairement redondantes.

La structure de CSN est bien caractérisée et a été cristallisée pour le complexe humain ((Lingaraju et al., 2014), Figure I.12.A). Les sous-unités 1-4 et 7-8 possèdent toutes un domaine PCI (pour Proteasome, COP9, Initiation factor 3) défini par homologie entre les sous-unités de ces différents complexes ((Wei et al., 2008), Figure I.12.B). Ce domaine est important pour les interactions protéine/protéine et permet la mise en place du squelette du complexe. Au centre du complexe se trouvent une sous-unité CSN5 et une CSN6. Les deux se caractérisent par un domaine appelé MPN (MPR1/PAD1/N-terminal domain) qui est le domaine catalytique du complexe ((Wei et al., 2008), Figure I.12.B). Cependant ce domaine ne semble pleinement fonctionnel que chez CSN5 et pas chez CSN6. En effet, uniquement chez CSN5, le domaine MPN possède un motif JAMM (JAB1/MPN domain metalloenzyme) qui agit comme centre catalytique de l'activité isopeptidase ((Cope et al., 2002), Figure I.13.B). De part cette activité enzymatique, CSN est capable de déneddyliser les CUL des complexes CRL (partie I.3.C, Figure I.11).

La structure du complexe CSN ressemble fortement à celle de deux autres complexes conservés chez les eucaryotes : le couvercle du protéasome 26S et le facteur d'initiation 3 de la traduction chez les eucaryotes (eIF3) (Wei et al., 2008). Le couvercle du protéasome et CSN possèdent la même stœchiométrie avec 6 sous-unités à domaine PCI et 2 à domaine MPN. Néanmoins, le couvercle du protéasome possède une neuvième sous-unité nommée DSS1. Cette neuvième sous-unité semble exister aussi chez CSN dans de nombreux organismes.

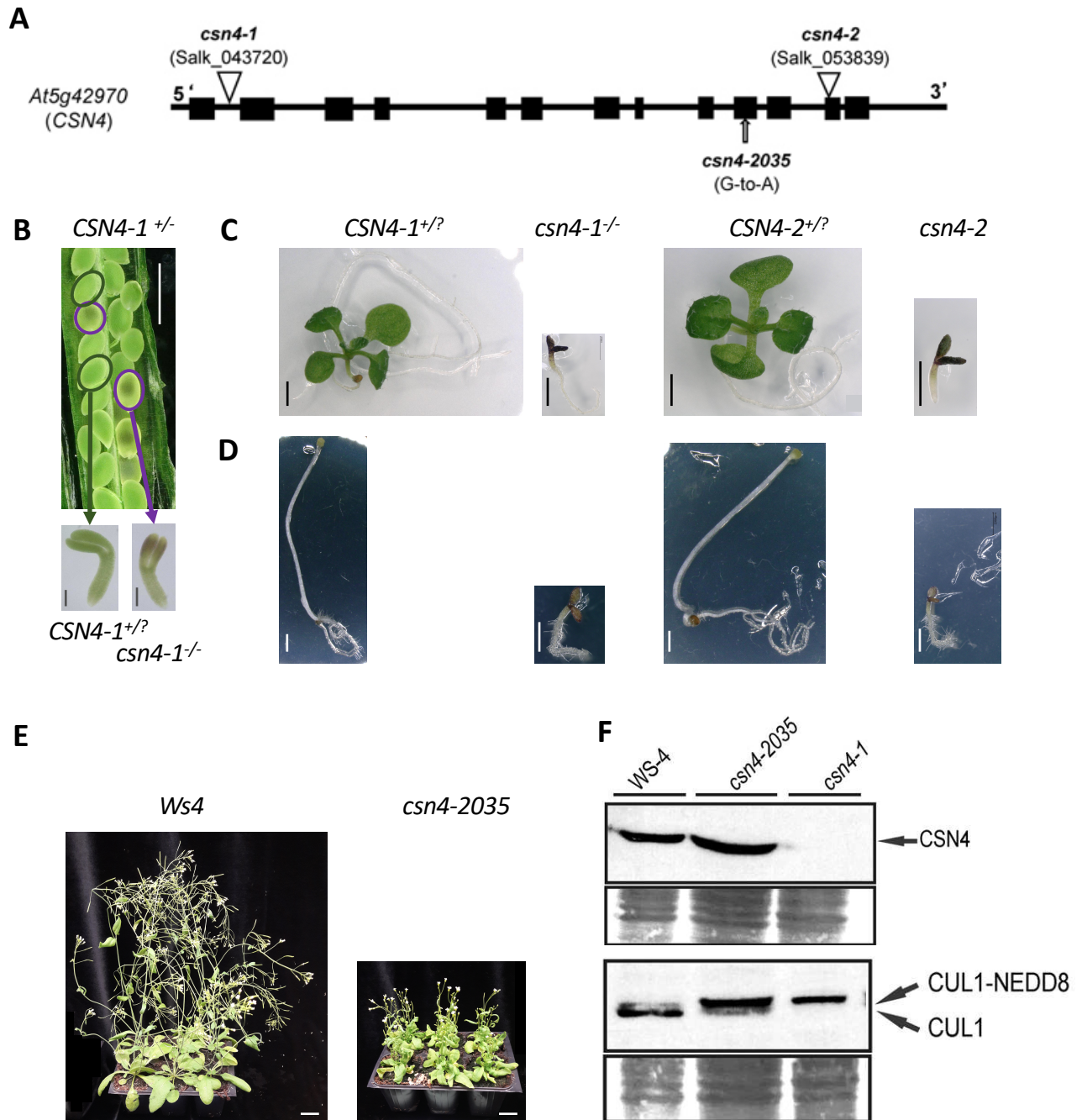


Figure I.13. Les mutants perte de fonction *csn4-1* et *csn4-2* ainsi que le mutant allélique *csn4-2035* présentent des défauts de développement et de neddylation de la culline 1 (CUL1).

A. Adapté de Pacurar et al., 2017. Représentation des différents mutants de CSN4 utilisés. *csn4-1* et *csn4-2* sont des mutants d'insertion et *csn4-2035* un mutant allélique.

B, C et D. Phénotype des mutants perte de fonction pour CSN4. Au sein d'une silique hétérozygote *CSN4*^{+/-} (B), se trouvent environ 75% de graines au phénotype sauvage (cercle vert foncé, *CSN4*^{+/?}) et 25% de graines dont les embryons ont les cotylédons anthocyanés (cercle violet, *csn4*^{-/-}). Phénotype de plantules de 10 jours ayant germé à la lumière (C) ou au noir (D). Les mutants *csn4*^{-/-} ne se développent pas plus et meurent. Ils présentent un phénotype de photomorphogénèse constitutive. Barres d'échelle blanches (D) et noires (C) : 1mm, grises (B) : 100 µm.

E. Phénotype des mutants alléliques viables *csn4-2035*. Barre d'échelle : 2cm.

F. Adapté de Pacurar et al. 2017. *Western blot* réalisés à partir des protéines totales de plantules des génotypes indiqués et révélés avec des anticorps anti -CSN4 et -CUL1. Le mutant *csn4-1* contrairement au mutant *csn4-2035* ne produit pas de protéine CSN4. CUL1 est uniquement (pour *csn4-1*) ou très majoritairement (pour *csn4-2035*) sous forme neddyllée contrairement au sauvage *Ws4* où la forme déneddyllée est majoritaire.

Il s'agit d'un peptide nommé CSN Acidic Protein (CSNAP) qui s'incorpore au complexe CSN dans des cellules humaines et est homologue à DDS1 (Rozen et al., 2015). Chez *A. thaliana*, mais pas chez la totalité des plantes, un homologue de CSNAP existe (Barth et al., 2016). Sa fonctionnalité *in planta* n'a toutefois pas encore été démontrée.

B- Rôle de l'activité enzymatique dans la fonction de CSN

L'activité enzymatique de CSN est portée par le motif JAMM de la sous-unité CSN5 (partie I.4.A). Cependant l'ensemble des sous-unités semblent nécessaires à l'activité de déneddylation des CUL. Cela est notamment suggéré par le fait que l'ensemble des mutants perte de fonction *csn* de différentes sous-unités présentent souvent des phénotypes similaires que ce soit chez *Neurospora crassa* (Wang et al., 2010), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) (Oron et al., 2007), *Mus musculus* (Wei et al., 2008) ou *A. thaliana* (Gusmaroli et al., 2007).

Comme les mutants perte de fonction *csn* (soit les simples mutants *csn 1-4*, 7 et 8 et les doubles mutants *csn5a*csn5b* et *csn6a*csn6b*) présentent des phénotypes identiques chez *A. thaliana*, seules les deux lignées perte de fonction indépendantes *csn4-1* et *csn4-2* seront présentées en illustration dans ce qui suit (Figure I.13). Les mutants perte de fonction *csn* se caractérisent chez *A. thaliana* par une photomorphogénèse constitutive : même suite une germination dans le noir, les plantules ne s'étiolent pas et les cotylédons s'ouvrent (partie I.4.A, Figure I.13.D). Elles présentent également une forte anthocyanisation des cotylédons visible post-germination mais également dès le stade torpille du développement embryonnaire (Figure I.13.B, C). Enfin, elles ont des défauts morphologiques importants au niveau de l'architecture racinaire notamment et sont très peu sensibles à l'auxine ((Dohmann et al., 2008b), Figure I.13.C). Tout cela conduit à leur mort prématurée une dizaine de jours post-germination (Figure I.13.C). De façon intéressante, une mutation dans le motif JAMM de CSN5A bloquant l'activité enzymatique sans perturber l'assemblage du complexe conduit à un phénotype dominant négatif pléiotrope (Gusmaroli et al., 2004). La gravité de ce phénotype est positivement corrélée avec l'ampleur de l'effet sur le neddylation des CUL et reproduit en partie le phénotype *csn*. Ainsi, le phénotype perte de fonction semble bien majoritairement dû à un effet de la perte de l'activité deneddylase de CSN.

En outre, il est important de noter que l'activité déneddylase n'est possible qu'en présence du complexe entier, qui forme une poche permettant la liaison à NEDD8, et pas si CSN5 est isolé (Cope et al., 2002). De façon générale, la perte d'une sous-unité déstabilise le complexe et conduit le plus souvent à une dégradation d'autres sous-unités, inhibant ainsi l'activité deneddylase (Gusmaroli et al., 2007). Cela se vérifie notamment par l'hyperneddylation des CUL dans les mutants *csn4* (Figure I.13.F). La déneddylation des CUL peut être également bloquée par des anticorps anti-CSN2 neutralisant le complexe (Yang et al., 2002). Il est également intéressant de souligner que la forme la plus stable est le complexe entier. Seul CSN5 semble être retrouvée sous forme libre *in vivo* indépendamment des autres sous-unités (Dubiel et al., 2015). De plus, différents sous-complexes de poids moléculaires inférieurs ont pu être identifiés (CSN1-3,8 ; CSN4-7 et CSN4-8) même si leur existence et leur fonction reste encore débattue.

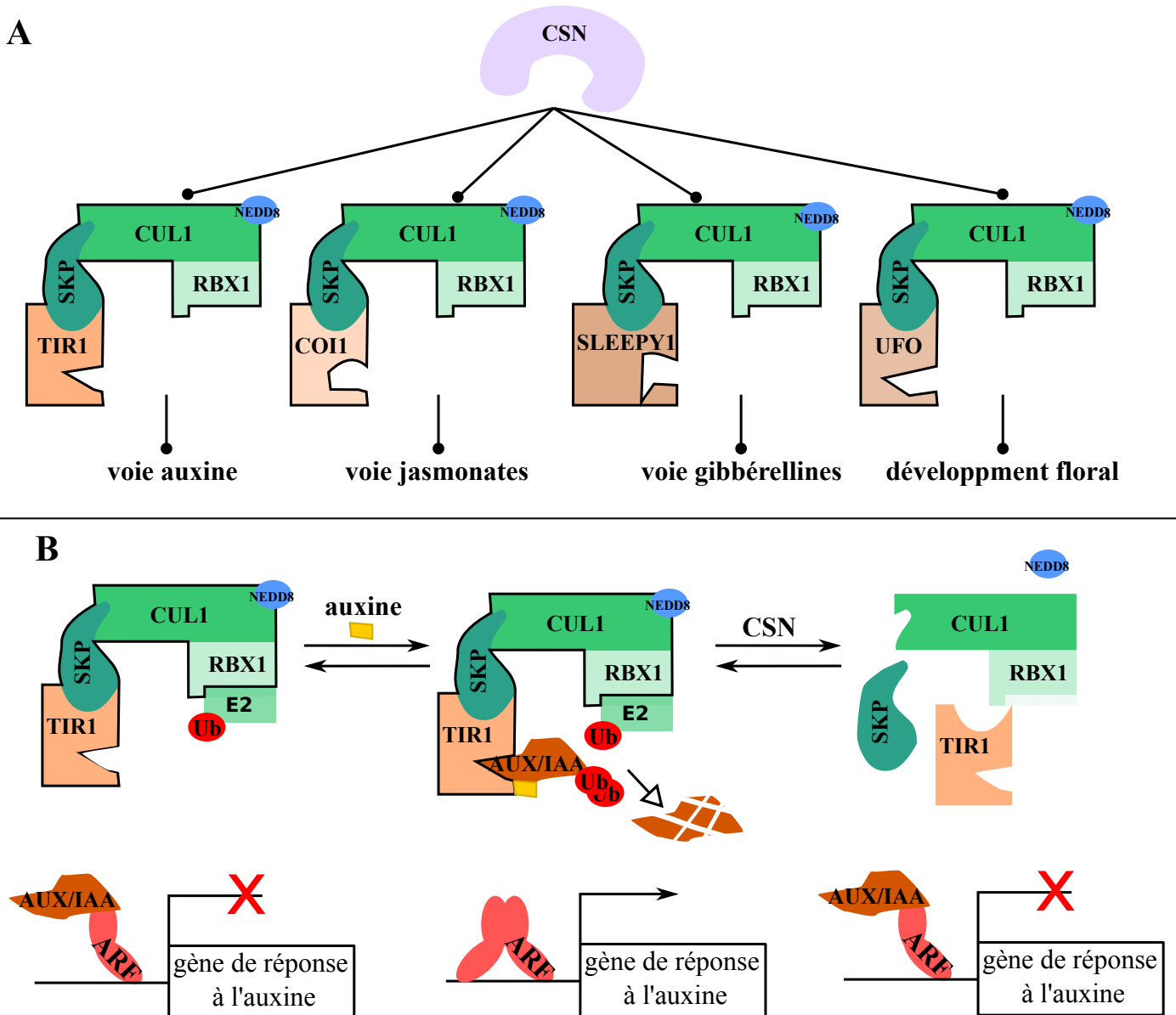


Figure I.14. CSN régule de nombreux aspects du développement végétal par le contrôle de l'activité des complexes CULLIN-RING ligases 1 (CRL1).

A. CSN régule la neddylation et donc l'activité des complexes CRL1 (entourés en noir) formés avec différentes F-box dont TIR1 (TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1), COI1 (CORONATINE-INSENSITIVE 1), SLEEPY1 et UFO (UNUSUAL FLORAL ORGANS). Ces complexes régulent eux-mêmes la dégradation spécifique de certaines protéines impliquées respectivement dans les voies de signalisation de l'auxine, des jasmonates, des gibbérellines et du développement floral.

B. Exemple de la voie de l'auxine. Les AUX-IAA régulent négativement la transcription des gènes de réponse à l'auxine en inhibant les AUXIN RESPONSE FACTOR (ARF). En présence de l'hormone, ils sont dégradés par le complexe CRL1 formé avec TIR1. L'activité de ce complexe est contrôlée notamment par CSN qui, en déneddylant CULLIN 1 (CUL1), conduit à son désassemblage.

CSN : CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME, E2 : enzyme de conjugaison de l'UBIQUITINE (Ub), NEDD8 : NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8, RBX1 : RING-BOX 1, SKP : S-PHASE KISASE ASSOCIATED PROTEIN.

C- Des rôles fonctionnels extrêmement divers pour CSN

De façon générale, le complexe CSN est impliqué, *via* son activité enzymatique, dans toutes les voies régulées par la voie Ub/Pr. Ici seront détaillés de manière non exhaustive certains rôles majeurs de CSN lors du développement des végétaux.

Par son activité de déneddylase des complexes E3 de type SCF, CSN peut réguler de nombreuses voies de signalisations hormonales comme celles de l'auxine, des JA et des gibbérellines. En effet, les premières observations faites sur les mutants *csn* ont mis en évidence leur ressemblance avec des mutants de l'auxine (Stratmann and Gusmaroli, 2012). Du point de vue mécanistique, CSN régule l'activité de l'E3 ligase SCF dont la protéine F-box est TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1 (TIR1), notée SCF^{TIR1} ((Dohmann et al., 2008b; Schwechheimer et al., 2001; Stuttmann et al., 2009a), Figure I.14.A). TIR1 interagit aussi avec l'auxine : la liaison TIR1-auxine conduit à une augmentation de l'affinité de TIR1 pour les AUX/IAA et donc à leur dégradation par la voie Ub/Pr ((Dharmasiri et al., 2005), Figure I.14.B). La répression auparavant exercée par les AUX/IAA sur les gènes de réponse à l'auxine est ainsi levée (Figure I.14.B). L'absence de CSN conduit à une stabilisation des AUX/IAA et donc une baisse de réponse à l'auxine (Figure I.14.B). De manière similaire, CSN régule la réponse aux jasmonates (JA), hormone clef pour la défense et le développement des plantes (Larrieu and Vernoux, 2016). En effet, le récepteur aux JA CORONATINE-INSENSITIVE 1 (COI1) est la F-box du complexe SCF^{COI1} et participe à la dégradation des répresseurs de la réponse aux JA appelés JASMONATE ZIM DOMAIN (JAZ) ((Thines et al., 2007), Figure I.14.A). CSN interagit physiquement avec SCF^{COI1} et les réponses aux JA dépendantes de COI1 le sont aussi de CSN (Feng et al., 2003). Par ailleurs, CSN régule également l'activité de SCF^{SLEEPY1}, une E3 ligase cruciale pour la dégradation des répresseurs DELLA en réponse aux gibbérellines ((Dill et al., 2004; Dohmann et al., 2010), Figure I.14.A).

Des mécanismes semblables impliquent également CSN dans la régulation du développement floral par la régulation de SCF^{UFO} ((Wang et al., 2003), Figure I.14.A). UNUSUAL FLORAL ORGANS (UFO) est une F-box nécessaire à la régulation du gène homéotique floral *APETALA 3* (Zhao et al., 2001).

Sur le même principe, CSN peut influencer sur le développement végétal en régulant des CRL incorporant CUL3A ou B. Ces complexes sont nécessaires au développement embryonnaire, les doubles mutants étant létaux entre les stades globulaire et transition (Figuroa et al., 2005). Des fonctions quant à la signalisation de l'éthylène ont également été démontrés (Chen et al., 2013b; Thomann et al., 2009). Enfin, il a été proposé un rôle dans l'organisation du cytosquelette par comparaison avec les animaux chez qui cela est bien établi (Stratmann and Gusmaroli, 2012). Ce rôle semble être confirmé par l'étude des phénotypes des mutants *csn2-5* et *csn5a-1* qui présentent notamment des défauts d'orientation de croissance racinaire (Stuttmann et al., 2009b).

Enfin, la régulation des complexes CRL contenant CUL4 met en jeu d'autres processus régulés par CSN. Chez les animaux, les complexes CRL CUL4-DNA DAMAGE DAMAGE BINDING PROTEIN 1 (DDB1) sont connus pour le rôle majeur dans le système de réparation des dommages à l'ADN et plus spécifiquement dans la réparation par excision de nucléotides (Chung and Delleire, 2015). Chez *A. thaliana*, ce rôle semble être conservé, notamment en ce qui concerne le maintien de l'intégrité génomique par CUL4-DDB1A-DDB2 suite à un stress induit par des UV (Molinier et al., 2008).

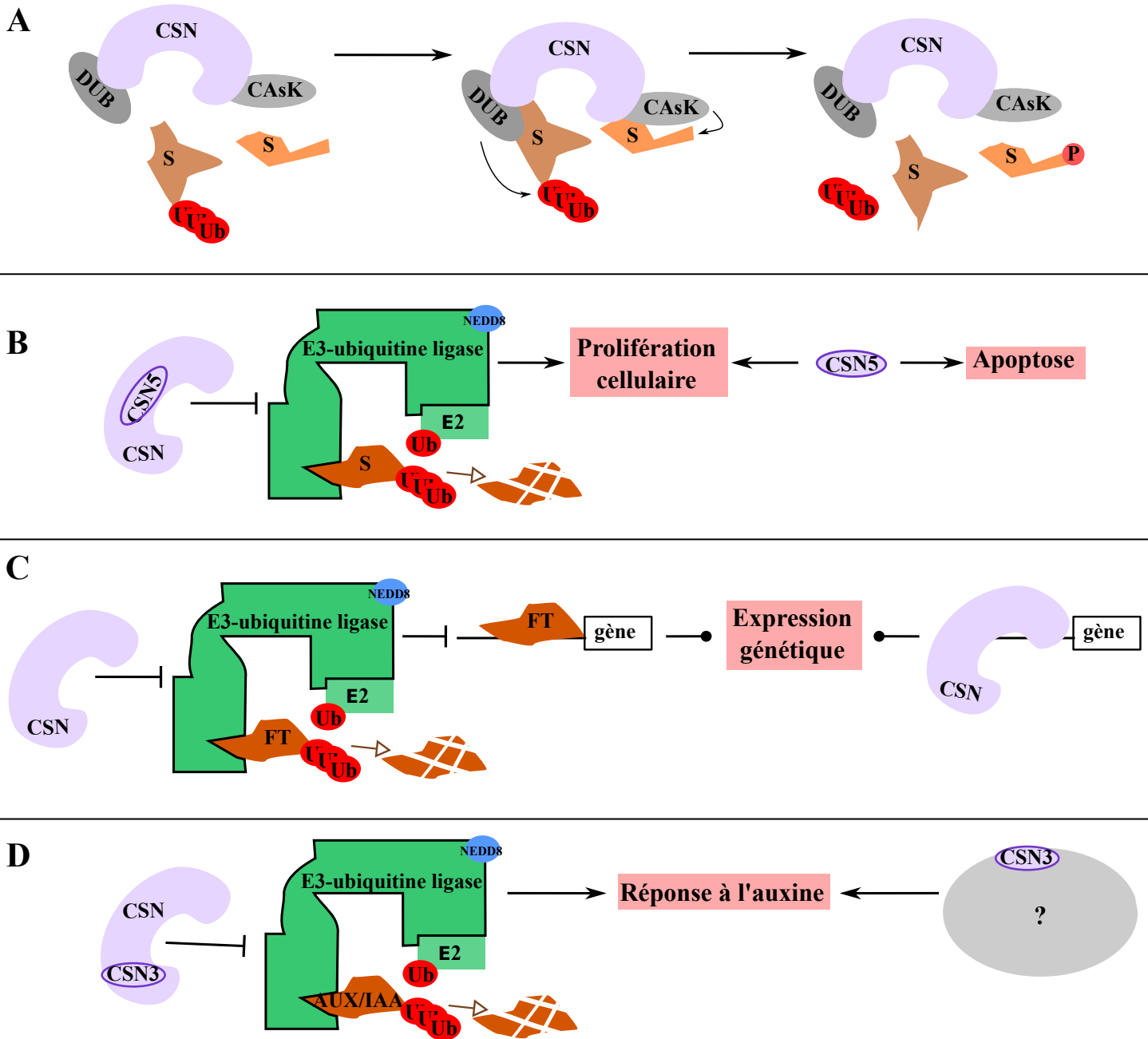


Figure I.15. CSN régule de nombreuses fonctions cellulaires de façon dépendante ou non de son activité enzymatique chez les animaux et les végétaux.

Description de mécanismes semblant spécifiques aux animaux (A, B et C) ou végétaux (D). CSN : CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME, E2 : enzyme de conjugaison de l'Ubiquitine, S : Substrat, Ub : UBIQUITINE

A. CSN s'associe avec des kinases CAsK (CSN-ASSOCIATED KINASES) et des enzymes DUB (Dé-Ubiquitination) et participe ainsi à la régulation de la phosphorylation et de l'ubiquitination de différents substrats de façon indépendante de son activité de déneddylation. P = Phosphate

B. Différentes fonctions ont été établies pour le monomère CSN5 et le complexe CSN. Les deux sont importants pour contrôler la prolifération cellulaire tandis que CSN5, mais pas CSN, semble crucial pour la régulation de l'apoptose.

C. CSN semble pouvoir réguler directement la transcription en se liant à l'ADN en plus de réguler indirectement *via* son activité de déneddylation la dégradation de facteurs de transcription (FT).

D. CSN3 agit sur la voie de l'auxine au sein de CSN par la régulation de la dégradation des AUX/IAA mais également indépendamment de CSN au sein d'un complexe non identifié.

Par ailleurs, les complexes CUL4-DDB1A et B sont nécessaires au développement embryonnaire, à la photomorphogenèse et au contrôle du temps de floraison (Chen et al., 2010; Dumbliauskas et al., 2011). Ils interviennent également dans la régulation de la chromatine notamment en association avec POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2) pour réguler l'empreinte paternelle (Dumbliauskas et al., 2011).

Ces quelques exemples permettent de rappeler les rôles majeurs de CSN lors du développement d'*A. thaliana*. Ils sont loin d'être exhaustifs, d'autant plus qu'ils sont concentrés sur le mécanisme canonique d'action de CSN *via* la régulation des CRL. Le paragraphe suivant met en évidence des rôles de CSN ne dépendant pas de son activité enzymatique.

D- Des fonctions non-enzymatiques pour CSN

L'activité déneddylase de CSN ne suffit pas à expliquer la totalité des fonctions de CSN. En effet, une étude récente a montré que, chez *D. melanogaster*, les mutants perte de fonction pour CSN n'avaient pas le même phénotype que les mutants exprimant une NEDD8 non clivable (Suisse et al., 2018). Ainsi, cela suggère que le rôle de CSN n'est pas uniquement de déneddyliser les CUL.

a- Rôles dépendants du complexe CSN

En plus de l'activité déneddylase de CSN, d'autres rôles importants lui sont attribués. Il peut notamment s'associer avec des kinases appelées CSN-ASSOCIATED KINASES (CA_sK) dont CSN-ASSOCIATED KINASE 2 (CK2) et des enzymes DUB ((Hetfeld et al., 2005; Zhou et al., 2003b), Figure I.15.A). Par exemple, CSN associé à CK2 est indispensable à la phosphorylation de p53 conduisant à sa dégradation dans les cellules animales (Sun et al., 2011). De tels liens entre activité kinase et CSN ne sont pas encore reportés chez les plantes.

Par ailleurs, certains effets ont été reliés spécifiquement à CSN6. Cependant, ces effets ne semblent pas indépendants de CSN et de son activité de déneddylation. En effet, différents exemples de surexpression de CSN6 laissent penser que cette sous-unité peut dans certains cas entrer en compétition avec CSN5 au sein du complexe CSN et ainsi bloquer l'activité de déneddylation. Des tests *in vitro* ont révélé une compétition entre les domaines MLN de CSN5 et CSN6 pour la liaison avec CUL1 (Chen et al., 2014b). Cette étude démontre qu'une plus grande abondance de CSN6 conduit à une absence de déneddylation de CUL1, et de là à une plus grande auto-ubiquitination et dégradation de la protéine F-box Fbw7. Cela limite la dégradation de c-myc induisant ainsi une plus grande prolifération cellulaire. Cependant la forme (holo-/sous-complexes) sous laquelle CSN5 et CSN6 pourraient entrer en compétition n'est pas encore été bien définie. Les fonctions de CSN6 ne mettent donc pas en jeu un nouveau mécanisme d'action mais plutôt une régulation fine de l'activité de déneddylation de CSN par compétition.

b- Rôles spécifiques à des sous-complexes ou des sous-unités

Certaines sous-unités peuvent avoir des rôles indépendamment du complexe CSN. Cela a été mis en valeur par la comparaison précise de mutants spécifiques de chaque sous-unité. Ces mutants ne possèdent pas toujours entre eux un phénotype identique. Par exemple, chez *Neurospora crassa*, l'ensemble des CSN est requis pour maintenir la stabilité des complexes CUL4-DDB1 tandis que tous sauf CSN3 le sont pour maintenir celle des complexes SCF^{SKIP1} et que seul CSN3 est crucial pour maintenir celle de SCF^{FWD-1} (Wang et al., 2010).

L'étude de mutants hypomorphiques viables chez *A. thaliana* a, elle aussi, énormément apporté à l'étude fonctionnelle de chaque sous-unité (Singh and Chamovitz, 2019). Dans la plupart de ces mutants (*csn1-10*, *csn2-5*, *csn4-2035*, *csn5a-1* et *csn5a-2*), l'activité de déneddylation, la dégradation des AUX/IAA et la réponse à l'auxine sont fortement diminuées. Cela suggère fortement que le problème majeur de ces mutants est une perte de l'activité déneddylase de CSN. Cela est confirmé notamment chez *csn4-2035* où la mutation ponctuelle identifiée dans le domaine PCI conduit à une hyper-neddylation de CUL1 témoin de son exclusion du complexe CSN ((Pacurar et al., 2017), Figure I.13.A, F). Ce mutant, bien que viable, présente notamment un phénotype important de nanisme, un amincissement des tiges et une réduction du nombre de fleurs produites par méristèmes (Figure I.13.E). Néanmoins, la comparaison des différents mutants hypomorphiques a également mis en avant des effets plus spécifiques à chacun, par exemple sur la formation des racines (Pacurar et al., 2017). *csn5a-1*, *csn5a-2* ne forment pas de racines adventives tandis que *csn4-2035*, *csn1-10* et *csn3-3* en développement significativement moins que le sauvage. Au contraire, *csn5b* en développe plus que le sauvage et aucune différence significative n'est observable pour *csn2-5*. Ces résultats montrent des premières différences probablement imputables à des rôles assurés par sous-unité.

Un exemple bien démontré d'un tel rôle concerne CSN3 chez *A. thaliana* ((Huang et al., 2013), Figure I.15.D). La mutation *csn3-3* confère des phénotypes liés à une perturbation de la signalisation auxinique mais ne perturbe ni la neddylation de CUL1 ni la dégradation des AUX/IAA. Les auteurs ont également démontré que la mutation n'a aucune conséquence sur l'assemblage du complexe CSN mais altère celle d'un petit complexe contenant CSN3. La présence de CSN3 est donc nécessaire au sein de deux complexes de fonctions différentes : de façon classique dans CSN pour réguler la neddylation des CUL et dans un petit complexe non totalement défini pour permettre une signalisation auxine normale (Figure I.15.D).

Parmi les rôles spécifiques démontrés pour une sous-unité, la majorité des exemples concernent CSN5. CSN5, stable sous forme monomérique ou de sous-complexes, peut lier et modifier la stabilité de différentes protéines de façon neddylation indépendante (Wei et al., 2008). Une illustration de ce fait est que, chez les cellules animales, le domaine N-terminal de CSN5 exprimé seul suffit à réguler l'export nucléaire de p53, alors que le motif JAMM suffit à conduire à sa dégradation, sans incorporation d'aucune de ces deux formes tronquées dans le complexe CSN (Oh et al., 2006). L'effet peut également être inverse : par sa liaison, CSN5 stabilise des protéines comme Transformed Mouse 3T3 Cell Double Minute 2 (Mdm2), une E3 ligase spécifique de p53, en limitant son auto-ubiquitination (Zhang et al., 2008a). De façon générale, il a été remarqué que CSN5 dans le complexe CSN était, avant tout, impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire. CSN5 en sous-complexe est également particulièrement crucial pour la prolifération cellulaire mais aussi pour la régulation de l'apoptose ((Wei et al., 2008), Figure I.15.B).

Initialement, la très forte identité morphologique et transcriptionnelle entre les mutants *csn3* (qui possèdent CSN5 sous forme libre uniquement), *csn5* et *csn3*csn5* plaide clairement en la défaveur de l'existence de fonctions majeurs pour le monomère CSN5 chez *A. thaliana* (Dohmann et al., 2008b). Néanmoins, de tels effets auraient pu être au moins en partie masqués par la létalité des mutants perte de fonction. En effet, l'étude plus approfondie des mutants hypomorphiques a permis de mettre en évidence des différences majeures entre les mutants *csn2-5* et *csn5a-1* (Stuttman et al., 2009b). Seul *csn5a-1*, et pas *csn2-5*, possède des

phénotypes drastiques notamment de photomorphogenèse constitutive et de nanisme. Or, ces deux mutants possèdent des niveaux réduits semblables de complexes CSN et sont affectés similairement au niveau de la neddylation des CUL (Stuttman et al., 2009b). Une différence notoire est que *csn2-5*, mais pas *csn5a-1*, possède un niveau sauvage de monomères CSN5 (Stuttman et al., 2009b). Ces données permettent de supposer que les monomères CSN5 ont des fonctions importantes *in planta* qui expliqueraient notamment les différences phénotypiques des mutants *csn2-5* et *csn5a-1*.

Enfin, des rôles dans la régulation de la transcription ont été plusieurs fois mis en évidence pour différentes sous-unités de CSN. Cela a été assez bien caractérisé pour CSN7 chez *D. melanogaster* (Singer et al., 2014). CSN7 peut interagir directement avec l'ADN, probablement par son domaine PCI qui possède un motif hélice-tour-hélice. De plus, les gènes cibles de CSN7 sont en grande partie les mêmes que ceux dont le niveau d'expression est modifié suite à la dérégulation de différentes sous-unités de CSN. De façon générale, ces gènes sont impliqués dans la transition G1/S du cycle cellulaire et dans le développement du disque imaginal de l'aile. Cela est cohérent avec le phénotype du mutant exprimant un ARNi contre CSN7 dans les disques de l'aile qui présente des défauts de prolifération cellulaire avec une accumulation des cellules en phase G1. Même si les mécanismes précis sont inconnus et qu'aucun motif enrichi sur les sites de l'ADN liant CSN7 n'a pu être identifié, il est clair que CSN7 participe à la régulation de la transcription. De même, CSN1 dans des lymphocytes T de souris (Menon et al., 2007), CSN2 dans des cellules d'ostéocarcinome (Tenbaum et al., 2007) et CSN4 chez *D. melanogaster* (Ullah et al., 2007) ont été retrouvées recrutées sur différents promoteurs suggérant un rôle relativement général des sous-unités de CSN dans la régulation de la transcription. Ainsi, en plus de réguler indirectement la transcription *via* le contrôle de facteurs de transcription par son activité de déneddylation, CSN semble aussi être impliqué directement dans l'activation ou la répression de certains gènes (Figure I.15.C). Cependant, les modalités pratiques de la forme de complexe(s)/sous-complexe(s) impliqué(s) ou de motif(s) permettant la liaison à l'ADN restent encore à élucider. Chez les plantes, aucune activité de régulation de la transcription n'a été démontrée à ce jour.

Les différents exemples traités ont permis de mettre en évidence la grande diversité par laquelle le complexe CSN, *via* son activité déneddylase ou pas, et ses différentes sous-unités peuvent agir sur le développement des organismes. Le paragraphe suivant permettra de détailler comment ces différents mécanismes d'action se complètent en se limitant à un exemple précis : le contrôle du cycle cellulaire

E- Rôle de CSN dans le contrôle du cycle cellulaire

Ce paragraphe est adapté d'une revue en préparation (Annexe 7) présentant les liens entre CSN et régulation du cycle cellulaire tant chez les animaux que chez les végétaux.

a- Phase G1 et transition G1/S

CSN a des rôles complexes et multiples concernant la phase G1 et la transition G1/S. L'effet de CSN sur la phase G1 a été défini par l'étude de mutants sous-expressés des sous-unités CSN chez les animaux. Par exemple, CSN8 est nécessaire pour conserver la bonne durée de la phase G1, probablement en modulant la proportion entre le complexe CSN et des sous-complexes contenant CSN5 (Liu et al., 2013).

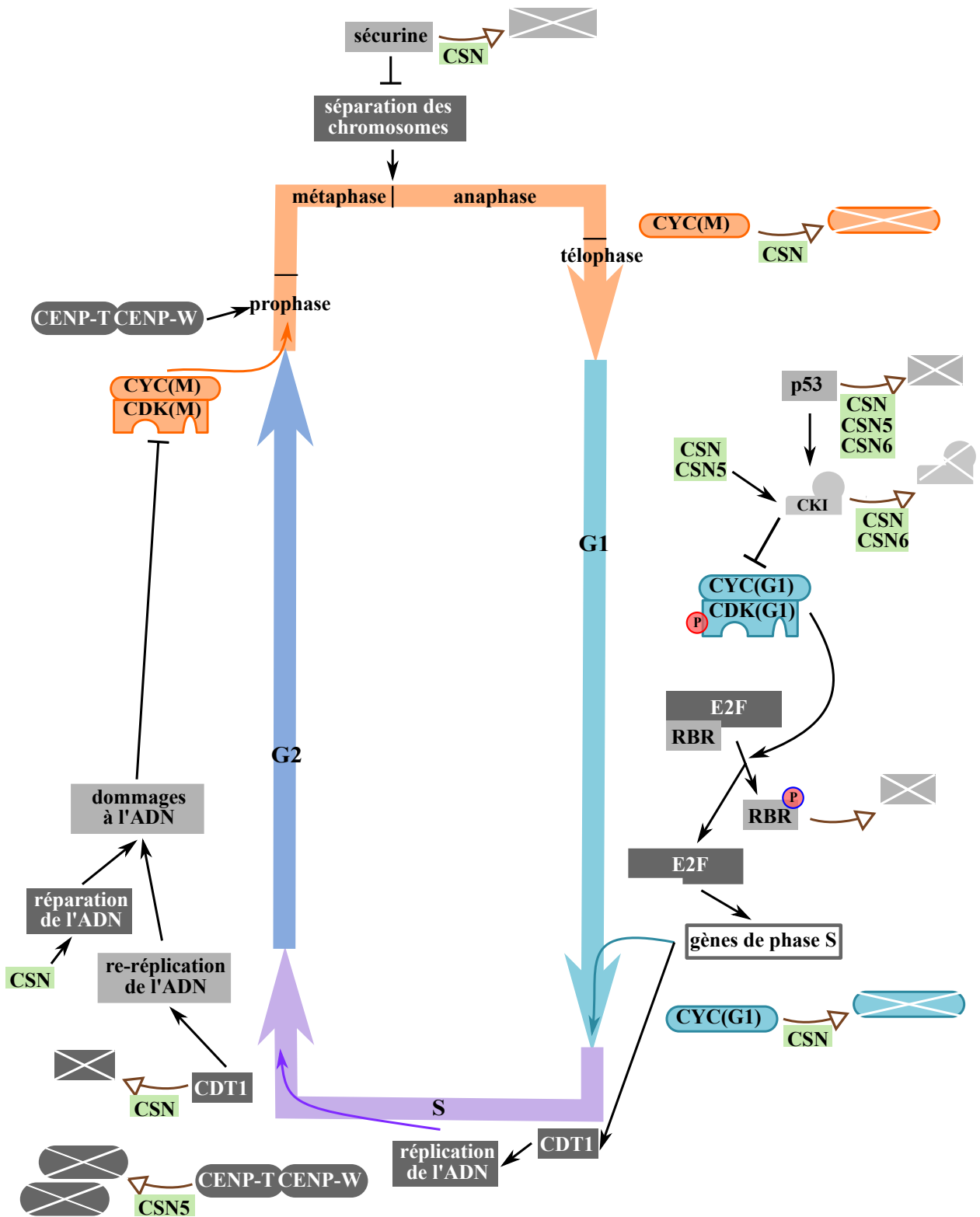


Figure I.16. CSN régule la progression du cycle cellulaire à différents niveaux.

Le complexe CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME (CSN) ou certaines sous-unités spécifiques (vert) contrôlent l'activité de certains régulateurs positifs (gris foncé) ou négatifs (gris clair) du cycle cellulaire majoritairement en modulant leur dégradation par la voie Ubiquitine/Protéasome (flèches marron vides).

CKI : CYCLIN KINASE INHIBITOR, CDT1 : CHROMATIN LICENSING AND DNA REPLICATION FACTOR 1, CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE, CKI : CYCLIN KINASE INHIBITOR, CYC : CYCLINE, E2F : E2 PROMOTOR BINDING FACTOR, RBR : RETINABLASTOMA-RELATED, P : phosphate (entouré de rouge quand activateur, de bleu quand inhibiteur).

Les différents mutants perte de fonction chez les animaux possèdent une suraccumulation de nombreux régulateurs de phase G1 comme p53, p27 (un CKI) et CYCE ((Wei et al., 2008), Figure I.16). CSN contrôle la stabilité d'au moins une partie de ces régulateurs comme CYCE et p27 par la voie classique de contrôle de la neddylation des E3-ligases (Cope and Deshaies, 2003). À cela, s'ajoutent de nombreux mécanismes moins classiques. La translocation de p27 au noyau est dépendante de COP1 qui est elle-même recrutée et stabilisée par CSN ((Choi et al., 2015), Figure I.16). Cette translocation est également sous la dépendance de CSN5 sous forme monomérique (Zhang et al., 2017). En outre, l'interaction spécifique de certaines sous-unités avec des régulateurs semble jouer un rôle clef. C'est le cas de CSN6 qui interagit à la fois avec p57 (un CKI) et son E3-ligase, permettant ainsi le rapprochement physique de ces deux protéines et donc la dégradation de p57 ((Chen et al., 2012), Figure I.16).

Il est également important de souligner que CSN peut apporter de la robustesse au système en participant à la dégradation de mêmes molécules par des mécanismes distincts. L'exemple de la stabilité de p53 est frappant en ce sens. Dans un premier temps, la dégradation de p53 est dépendante de la phosphorylation par des kinases associées à CSN (partie I.4.D.a, (Sun et al., 2011), Figure I.16). CSN6 spécifiquement stabilise MDM2 en limitant son autoubiquitination ((Zhao et al., 2011), Figure I.16). CSN5, possiblement en sous-complexe coopère avec MDM2 pour réguler l'export nucléaire et la dégradation de p53 (partie I.4.D.b, (Oh et al., 2006), Figure I.16). Il est évident ici que la régulation de p53 semble être, chez les animaux, un élément majeur du contrôle de la transition G1/S *via* CSN. Ceci étant dit, il est important de souligner que cela n'explique pas tous les effets de CSN sur la prolifération cellulaire. En effet, les fibroblastes embryonnaires murins *csn5 p53*, tout comme les simples mutants *csn5* dans lesquels p53 s'accumule, ne prolifèrent pas (Yoshida et al., 2010). Cela indique que la perte de p53 ne suffit pas à compenser l'arrêt du cycle cellulaire induit par la perte de CSN5 dans ces cellules.

Même si des mécanismes restent encore à découvrir, il est clair qu'à la fois le complexe CSN et des sous-complexes sont cruciaux pour la progression de la phase G1 et de la transition G1/S chez les animaux. Ces mécanismes concernent majoritairement la régulation de la stabilité protéique. Cependant d'autres mécanismes doivent être envisagés notamment la possibilité pour certains CSN comme CSN7 d'agir en tant que régulateurs transcriptionnels comme décrit précédemment (partie I.4.D.b, (Singer et al., 2014)).

Jusqu'à récemment, aucun mécanisme similaire n'avait été identifié chez les plantes. Cependant, une étude à laquelle j'ai participé montre que CSN4 interagit avec TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP) pour contrôler la transition G1/S (Betsch et al., 2019). Cette étude est particulièrement intéressante car elle est le seul exemple de régulation spécifique de la transition G1/S *via* CSN chez les plantes. Les mécanismes moléculaires expliquant cette régulation, qui n'étaient pas encore élucidés avant ma thèse, constituent l'objet de celle-ci.

b- Phase S et transition G2/M

Chez les plantes, l'effet majeur auparavant décrit est un délai des différents mutants *csn* en phase G2 (Dohmann et al., 2008a). Ce délai s'accompagne de cassures double-brin de l'ADN et d'une activation de la machinerie de réparation de l'ADN liée à l'arrêt à la transition G2/M. Chez les animaux, des phénotypes semblables peuvent être observés notamment des cellules hépatiques *csn5* qui arrêtent de proliférer en phase S ou G2 (Panattoni et al., 2014).

Ces cellules présentent des marqueurs de stress réplcatif et de polyploïdie. Ces effets peuvent s'expliquer en partie par l'importance de CSN dans la limitation de la re-réplication. CSN interagit avec CRL4A/4B^{CDT2}, une E3 ligase cruciale pour la dégradation de CHROMATIN LICENSING AND DNA REPLICATION FACTOR 1 (CDT1) ((Sertic et al., 2013), Figure I.16). CDT1 fait partie du complexe de pré-réplication et sa dégradation en fin de phase S assure l'absence de re-réplication (Figure I.16). Par ailleurs, il est important d'ajouter que CSN ne joue pas uniquement un rôle dans la prévention des dommages à l'ADN mais également dans leur réparation comme évoqué précédemment (partie I.4.C, (Chung and Dellaire, 2015), Figure I.16).

c- Phase M

Un autre phénotype intéressant des mutants sous-exprimant *CSN* dans les cellules HeLa est l'observation de chromosomes mal alignés et de fuseaux multipolaires associé à un allongement de la phase M (Chun et al., 2013). Des sous-complexe CSN5 interagissent avec les protéines centromériques CENP-W et CENP-T durant la phase S conduisant à leur dégradation ((Chun et al., 2013), Figure I.16). Cette dégradation entraîne un renouvellement de CENP-W et CENP-T qui est nécessaire au recrutement postérieur de ces protéines au kinétochore pendant la mitose (Figure I.16). Par ailleurs, CSN, peut se lier à APC/C *via* CSN2 et par là influencer la stabilité de ces cibles (Kob et al., 2009). Deux cibles majeures d'APC/C, CYCB1 et la SECURINE ne sont plus correctement dégradées lors de la méiose I des ovocytes de souris sous-exprimant respectivement *CSN3* et *CSN5* ((Kim et al., 2011), Figure I.16). Cela conduit à une dérégulation des CDK/CYC mitotiques et à l'inhibition de la séparation des chromosomes, bloquant ainsi la sortie de mitose.

Pour résumer, CSN est impliqué dans le contrôle de toutes les étapes de la progression du cycle cellulaire, notamment au niveau des points clefs que sont les transitions G1/S et G2/M. Ce rôle est très conservé chez tous les eucaryotes et fait appel à la fois à des mécanismes classiques basés sur la régulation des E3 Ubiquitine ligases *via* l'activité de déneddylation du complexe CSN mais également à des mécanismes spécifiques à certaines sous-unités et moins bien décrits. À ces rôles, il faudrait ajouter ceux non-décrits ici concernant l'initiation du cycle cellulaire. En effet, CSN contrôle l'entrée du cycle cellulaire en stimulant la transition G0/G1 chez les animaux ((Wei et al., 2008), Annexe 7). Par ailleurs, le complexe CSN et des sous-complexes sont de façon générale nécessaires à l'équilibre entre prolifération, différenciation et mort cellulaire. Enfin, CSN est lié à de multiples voies de proliférations classiques chez les animaux comme celles de la bêta-caténine ((Fang et al., 2015; Jumpertz et al., 2014; Matsuzawa and Reed, 2001; Schütz et al., 2012), Annexe 7) ou de c-Myc ((Chen et al., 2014b), Annexe 7).

Chez les animaux, les différents rôles dans le contrôle du cycle cellulaire, du statut prolifératif, de la réparation de l'ADN et de l'apoptose font que CSN est fortement impliqué dans la tumorigenèse. CSN5 et CSN6 sont surexprimés dans de nombreux types de cancers, participent à la carcinogénèse et sont associés à de mauvais pronostics (Lee et al., 2011; Wang et al., 2016). CSN est donc une cible potentielle pour de nouveaux traitements anti-cancéreux (Schlierf et al., 2016). La multiplicité des moyens d'action de CSN sur la prolifération cellulaire pourrait être un atout en conférant aux inhibiteurs de CSN une grande efficacité d'action. Cependant la pléiotropie de CSN est en prendre en compte pour limiter les effets indésirables.

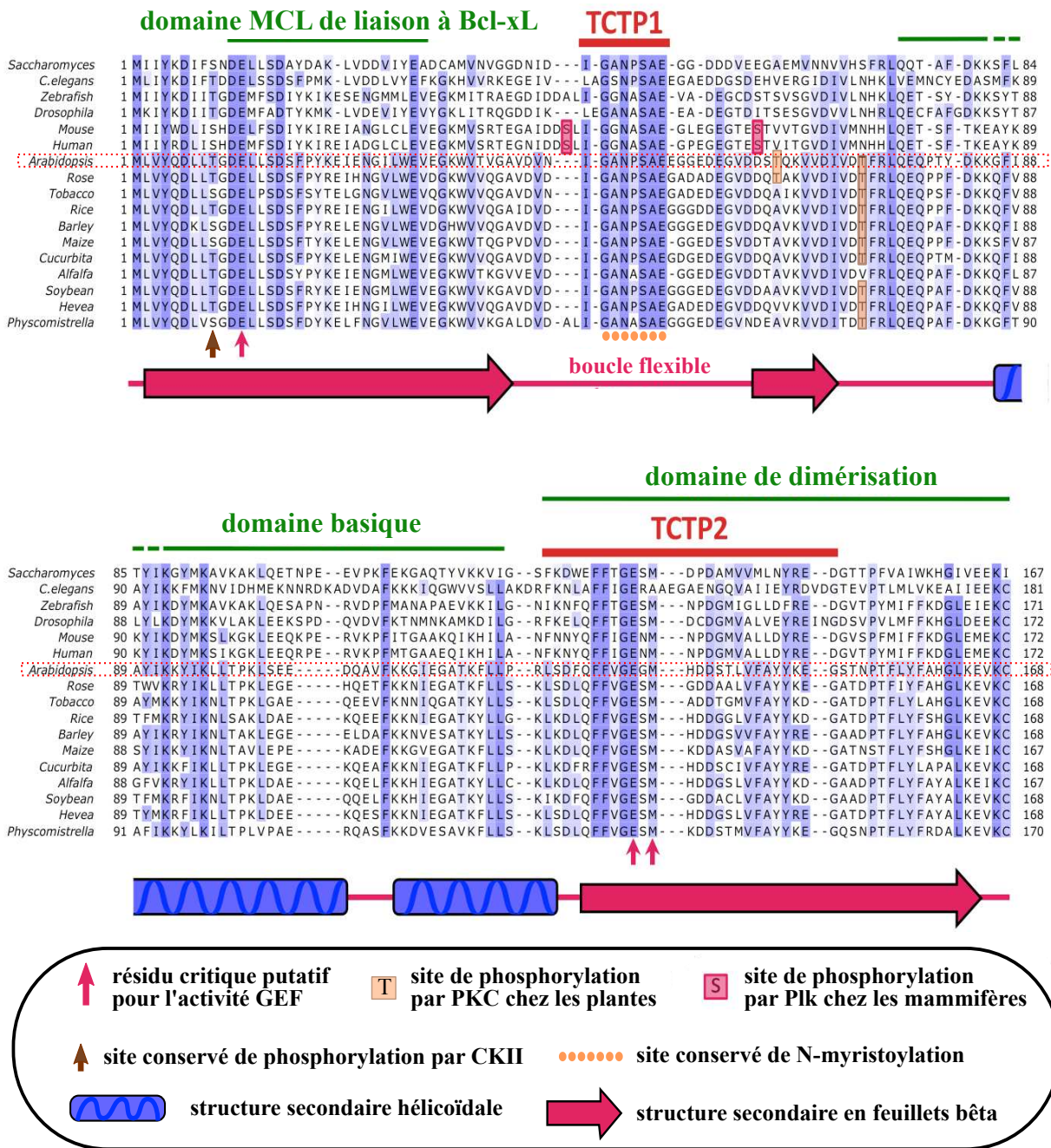


Figure I.17. Conservation de TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP).

Adapté de Betsch et al., In press

La protéine est bien conservée dans les différents règnes. Les domaines signatures TCTP et les domaines spécifiques sont indiqués au dessus des séquences d'acide aminés correspondantes. Les structures secondaires sont indiquées en dessous des séquences correspondantes. Les résidus fortement conservés sont colorés en bleu selon la matrice de score BLOSUM 62. Les différents sites conservés sont indiqués : site de phosphorylation par la kinase caséine II (CKII, flèches marron), site de N-myristoylation (points orange), sites putatifs d'activité GEP (flèches rose). Certains résidus importants dans des règnes spécifiques comme les sites de phosphorylation par Polo like kinase (Plk) chez les mammifères et ceux de phosphorylation par la protéine kinase C (PKC) chez les plantes sont encadrés. La séquence de TCTP chez *Arabidopsis thaliana* est entourée de pointillés rouges.

5- Rôle de TCTP, un régulateur majeur du développement et de la croissance mitotique conservé chez les eucaryotes

Précédemment, j'ai décrit les mécanismes généraux permettant à la plante d'assurer son bon développement notamment grâce au contrôle précis de l'entrée et de la progression du cycle cellulaire. Ces processus sont, de manière générale, très bien conservés entre plantes et animaux. Cette partie va décrire le cas particulier d'un de leurs régulateurs communs : TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP), essentiel pour l'embryogenèse et le développement chez les eucaryotes (Brioudes et al., 2010; Chen et al., 2007; Hsu et al., 2007).

A- Caractéristiques de la protéine TCTP

Généralement, les génomes des champignons, des invertébrés et des protozoaires possèdent une seule copie du gène *TCTP* tandis que les génomes de plantes et de mammifères possèdent plusieurs copies (Betsch et al., In press; Koo et al., 2020). Cependant, dans la majorité des cas, une seule copie semble fonctionnelle. Chez *A. thaliana*, deux copies existent : At3g16640, noté dans la suite *AtTCTP*, et At3g05540. At3g05540 ne semble pas être exprimé et le mutant homozygote avec une insertion en sein de ce gène (SALK_010334) ne présente pas de phénotype flagrant, conduisant à penser qu'il s'agit d'un pseudogène non fonctionnel (Berkowitz et al., 2008). Néanmoins, une étude plus récente indique un rôle pour At3g05540 nommé *AtTCTP2* dans le développement post-embryonnaire et la régénération des plantes *in vitro* (Toscano-Morales et al., 2015).

Le gène *TCTP* est généralement composé de cinq exons de taille conservée et quatre introns de taille variable (Zhang et al., 2013a). Chez *A. thaliana*, l'intron 3 est absent conduisant à la fusion des exons 3 et 4 (Zhang et al., 2013a). L'expression de *AtTCTP* est forte et ubiquitaire (Berkowitz et al., 2008; Brioudes et al., 2010; Szécsi et al., 2006) et son promoteur est situé sur une courte région intergénique de 0,3 kb. Ce promoteur possède des éléments classiques : une TATA Box à -34 paires de base et un patch pyrimidine à -16 paires de base de l'initiation de la transcription et est suffisant pour conduire l'expression forte et constitutive d'un gène rapporteur (Han et al., 2015). Par ailleurs, des régions non-traduites (UTR pour *UnTranslated Regions*) sont présentes aux extrémités 5' et 3' des ARNm de *TCTP* à la fois chez les animaux et les végétaux. Ces UTR ont été reliées à la stabilité de l'ARNm *TCTP* et à la régulation de sa traduction (Bommer and Thiele, 2004). Ainsi, sont présents en 5' un élément 5' Terminal Oligo Pyrimidine (5'-TOP), commun chez les protéines contrôlées traductionnellement (Meyuhas and Kahan, 2015) et en 3' des éléments déstabilisants classiques riches en AU, retrouvés habituellement dans les ARNm à faible durée de vie (Barreau et al., 2005; Ohme-Takagi et al., 1993). Suite à ces régulations post-traductionnelles, la protéine *AtTCTP* n'est pas présente de façon ubiquitaire mais s'accumule dans les zones à forte croissance mitotique comme les méristèmes racinaires (Brioudes et al., 2010).

Au niveau protéique, *AtTCTP* partage respectivement 53,6% et 56% de similarité d'acides aminés avec les protéines humaine (hTCTP) et de *D. melanogaster* (dTCTP) et 30% d'identité d'acides aminés avec hTCTP ((Betsch et al., In press), Figure I.17). Ce grand degré de conservation est cohérent avec le rôle majeur de TCTP dans le développement et la survie des eucaryotes.

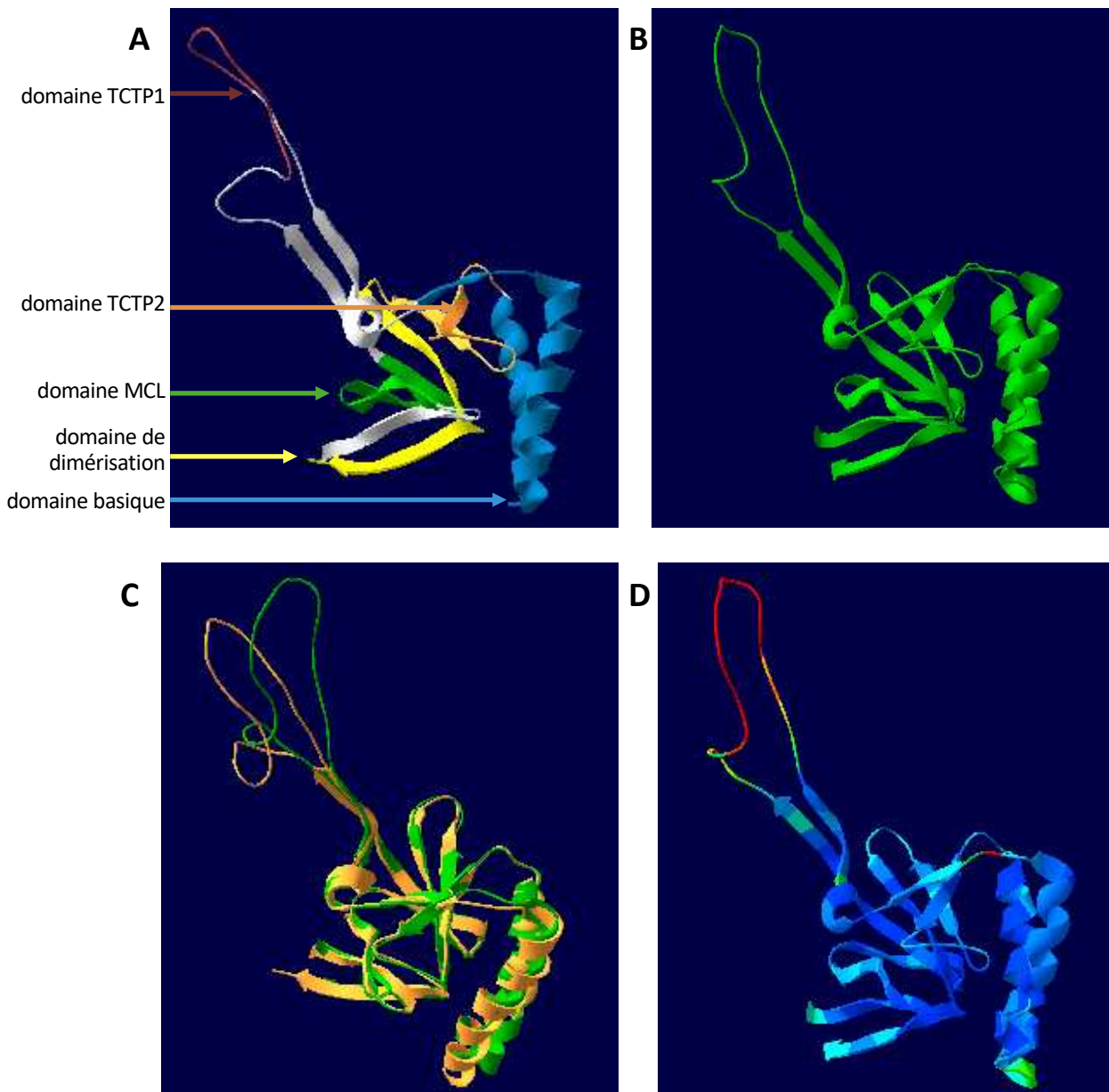


Figure I.18. Structure de TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP).

Les protéines sont visualisées à l'aide du logiciel *Swiss-PdbViewer* (Guex et Peitsch, 1997) et sont représentées par leurs structures secondaires : hélices α (rubans), feuillet β (flèches) et boucles (lignes).

A : Visualisation de la structure de hTCTP (TCTP de *Homo sapiens*) obtenue par RMN (PDB_2HR9). Vert : domaine MCL de liaison à Bcl-xL, marron : domaine TCTP1, bleu : domaine basique, orange : domaine TCTP2, orange et jaune : domaine de dimérisation.

B : Modèle structural de AtTCTP (TCTP de *Arabidopsis thaliana*) obtenu par le logiciel I-TASSER (Zhang 2009, Roy, Yang et Zhang 2012, Yang et Zhang, 2015) par comparaison avec la structure cristallographique de hTCTP (PDB_2HR9).

C : Superposition des structures de hTCTP (A, orange) et AtTCTP (B, vert).

D : Modèle structural de AtTCTP. Chaque acide aminé est coloré selon son RMSD (Déviation de la racine de la moyenne des carrés), *i.e.* selon sa distance à l'acide aminé correspondant de hTCTP. La coloration se fait selon un dégradé avec le bleu foncé représentant une bonne superposition et le rouge une mauvaise.

Sont notamment conservés deux domaines signatures TCTP et un domaine basique permettant la liaison à la tubuline et au calcium ((Hinojosa-Moya et al., 2008), Figure I.17). De plus, les protéines TCTP possèdent dans leur poche centrale une surface d'interaction avec des Guanine Tri Phosphatase (GTPase) qui leur permettrait d'assurer une fonction de facteur d'échange (*Guanine nucleotide exchange factor*, GEF) conduisant les GTPases à relâcher du guanosine diphosphate (GDP) et à se lier au guanosine triphosphate (GTP) ((Santa Brígida et al., 2014; Thaw et al., 2001), Figure I.17). La partie N-terminale de TCTP contient un domaine MCL de liaison à Bcl-xL (Figure I.17) impliqué dans la suppression de l'apoptose chez les mammifères (Yang et al., 2005) et de la mort cellulaire chez le tabac (Gupta et al., 2013).

Par ailleurs, des sites de modifications post-traductionnelles de TCTP sont conservés comme le site de phosphorylation par la kinase caséine II et le site de N-myristoylation ((Betsch et al., In press), Figure I.17). Ce grand niveau de conservation permet de supposer que les protéines TCTP exercent des fonctions similaires dans les différents organismes où elles sont présentes. Cependant quelques légères différences sont remarquables. Ainsi, le site de phosphorylation par Polo like kinase, fonctionnel chez la souris (Yarm, 2002), est présent chez les mammifères et les oiseaux, mais pas chez les autres organismes comme les plantes ((Venugopal, 2005), Figure I.17). Enfin, des thréonines en position 64 et 73, cibles de la protéine kinase C, sont présentes exclusivement chez des TCTP de plantes (Venugopal, 2005). Ces quelques différences suggèrent quant à elles qu'il puisse exister des rôles spécifiques pour TCTP dans les phylla concernés.

À l'image des structures primaires et secondaires, les structures protéiques prédites pour les différentes TCTP sont très semblables ((Hinojosa-Moya et al., 2008), Figure I.18). Des structures expérimentales ont également été obtenues pour différentes espèces par spectroscopie RMN : levure (Thaw et al., 2001), homme ((Feng et al., 2007), Figure I.18.A) et microalgue (Yao et al., 2019) et par cristallographie : parasite de la malaria (Vedadi et al., 2007), homme (Doré et al., 2018; Susini et al., 2008) et souris (Doré et al., 2018). Ces différentes structures s'accordent sur le fait que TCTP est composée de trois domaines structurels majeurs : un domaine cœur en feuilletts β , un domaine en hélice α et une boucle flexible (Figures I.17, I.18). La différence majeure entre les TCTP de plantes et animaux concerne la boucle flexible où se trouve le premier domaine TCTP alors que les autres domaines contenant le deuxième domaine TCTP, le domaine basique et le domaine MCL/Bcl-xL sont très fortement conservés ((Hinojosa-Moya et al., 2008), Figure I.18.C,D).

Plus précisément, les TCTP de plantes peuvent être séparés en deux sous-classes : ceux ressemblant à AtTCTP (Figure I.18.B) et ceux plus proches de CmTCTP (*Cucurbita max.*) qui diffèrent au niveau de la poche centrale (contenant potentiellement le site de liaison aux GTPase) et de la boucle flexible (Gutiérrez-Galeano et al., 2014). Ces subtiles variations de structure pourraient être associées à des divergences de fonction avec les *AtTCTP-like* plus associés à la régulation de la prolifération cellulaire et les *CmTCTP-like* à des rôles dans la reprogrammation du développement, même si cette hypothèse reste à vérifier. De façon plus générale, des données récentes suggèrent que des changements structuraux des protéines TCTP pourraient également être associés à une évolution de leur capacité d'interaction avec différentes protéines (Koo et al., 2020).

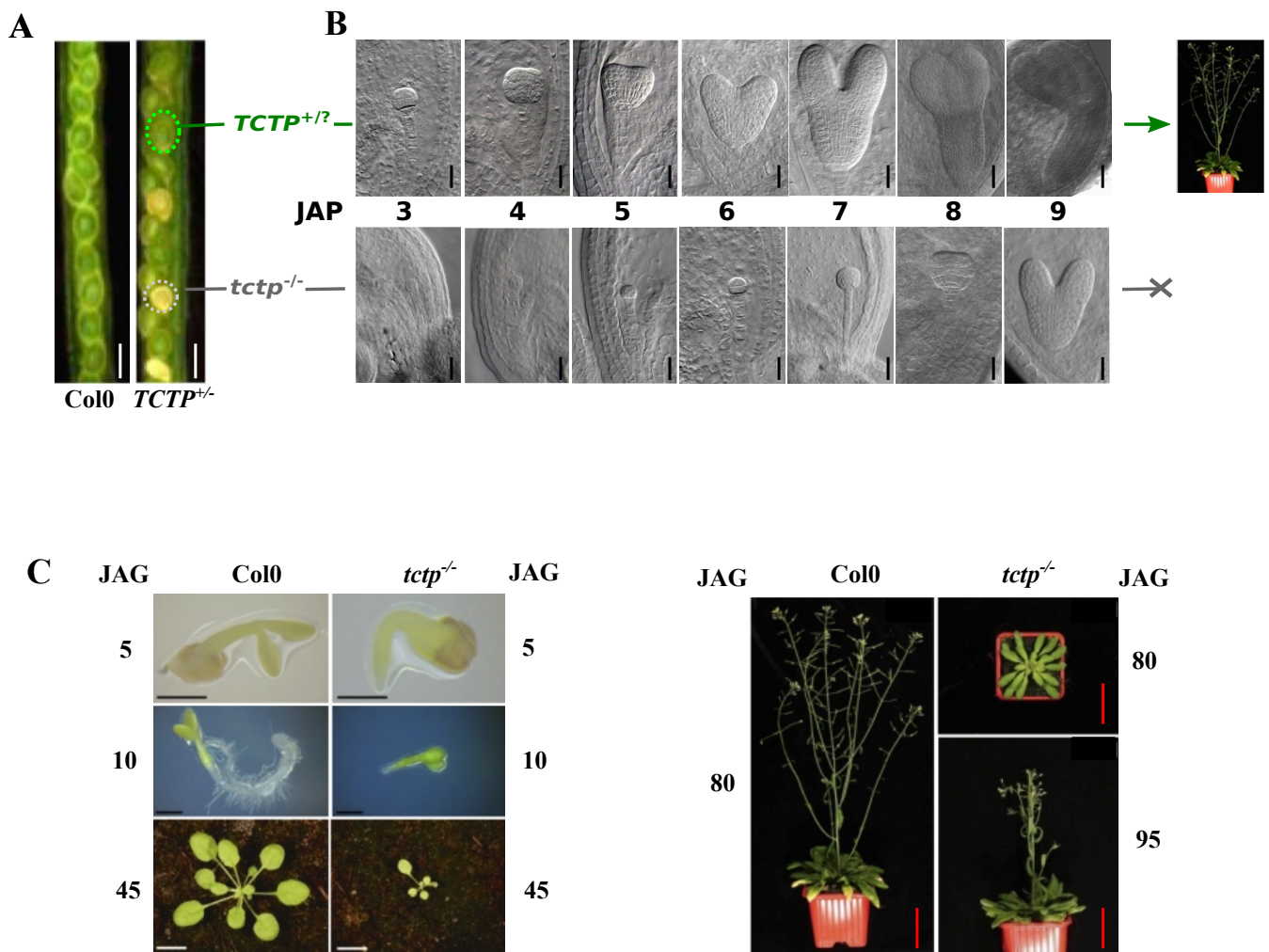


Figure I.19. Phénotype développemental des mutants perte de fonction pour *TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP)* chez *Arabidopsis thaliana*. Adapté de Brioudes et al., 2010

A. Contrairement aux siliques Col0 qui ne présentent que des graines vertes sauvages, les siliques de plantes hétérozygotes *TCTP*^{+/-} possèdent 75% de graines vertes de génotypes *TCTP*^{+/+} et *TCTP*^{+/-} (notées *TCTP*^{+/?}) et 25% de graines blanches *tctp*^{-/-}. Barres d'échelle : 0,5 cm.

B. Images d'embryons *TCTP*^{+/?} et *tctp*^{-/-} à différents temps (jours après pollinisation, JAP). Les embryons *tctp*^{-/-} sont nettement retardés sans présenter de défauts morphologiques et meurent environ 10 JAP. Flèche verte : poursuite du développement, croix grise : létalité. Barres d'échelle : 20 µm.

C. Par sauvetage embryonnaire, des individus adultes *tctp*^{-/-} ont été obtenus et photographiés à différents temps (jours après germination, JAG). Ils présentent des phénotypes de retard développemental, de nanisme et de stérilité. Barres d'échelle noires : 500 µm, blanches : 1 cm, rouges : 5 cm.

Ainsi que ce soit au niveau des structures primaire, secondaire ou tertiaire, les protéines TCTP sont bien conservées dans les différents organismes, suggérant ainsi une conservation d'un bon nombre des fonctions de TCTP. Quelques différences mises en évidence laissent aussi présager que certains TCTP puissent avoir des rôles plus spécifiques selon l'organisme.

B- Fonctions de TCTP dans le développement

TCTP a premièrement été identifié comme étant surexprimé dans les tumeurs de mammifères et régulé post-traductionnellement (Böhm et al., 1989; Chitpatima et al., 1988; Thomas et al., 1981; Yenofsky et al., 1982). TCTP est essentiel au développement des eucaryotes comme les mutants perte de fonction sont létaux au stade embryonnaire chez *Mus musculus* (Chen et al., 2007), *Drosophila melanogaster* (Hsu et al., 2007) et *A. thaliana* ((Brioude et al., 2010), Figure I.19.A,B). Chez *A. thaliana*, la létalité embryonnaire semble uniquement due à un important délai développemental mais les embryons *tctp* ne semblent pas présenter de défauts morphologiques majeurs ((Brioude et al., 2010), Figure I.19.B). Néanmoins, la létalité embryonnaire a fortement limité la détermination des fonctions de TCTP. Les différentes études sont donc basées généralement sur des surexpressions de *TCTP* ou des sous-expressions via des techniques d'ARN interférents. Le premier individu perte de fonction pour *AtTCTP* a pu être obtenu par mon équipe d'accueil par une approche de sauvetage embryonnaire ((Brioude et al., 2010), Figure I.19.C). En apportant une quantité importante de nutriments aux embryons *tctp*, ceux-ci ont pu se développer et embryonnaire ((Brioude et al., 2010), Figure I.19.C). En apportant une quantité importante de nutriments aux embryons *tctp*, ceux-ci ont pu se développer et atteindre l'âge adulte. Les plantes obtenues restent fortement retardées dans leur développement et présentent de sévères défauts de croissance parmi lesquels une taille réduite des organes et des plantes, une floraison retardée et une stérilité, soulignant différents rôles développementaux pour *AtTCTP* notamment dans la croissance mitotique (Figure I.19.C). L'obtention de plantes *tctp* a donc été un outil important pour mieux comprendre les fonctions de *AtTCTP* en particulier et TCTP en général.

a- TCTP et cycle cellulaire

Chez les animaux, dans un premier temps, TCTP a été associé aux cancers. TCTP s'accumule dans les cellules cancéreuses et les tumeurs humaines (Bommer, 2017) et a été proposé comme marqueur des cancers du poumon, du sein et des carcinomes hépatocellulaires (Amson et al., 2012; Chan et al., 2012; Kim et al., 2008b). De plus, une diminution de l'accumulation de TCTP est observée dans de nombreux révertants spontanés (Tuynder et al., 2004) et l'utilisation de siARN visant à diminuer l'expression de *TCTP* permet la suppression des phénotypes malins (Gnanasekar et al., 2009). TCTP a donc été proposé comme cible de traitements anti-cancéreux (Bommer, 2017). Différentes drogues ciblant TCTP ont montré des résultats prometteurs comme preuve de concept pour des traitements anti-cancéreux.

Dû notamment à son implication dans les cancers, le rôle de TCTP au cours du cycle cellulaire a été étudié avec précision. Différentes études ont montré que des dérégulations de *TCTP* étaient à l'origine de perturbations de la progression de cycle cellulaire chez les animaux (Gachet et al., 1999; Johansson et al., 2010) et les végétaux ((Brioude et al., 2010), Figure I.20). Chez les animaux, plusieurs mécanismes peuvent participer à expliquer le rôle de TCTP dans la régulation du cycle cellulaire.

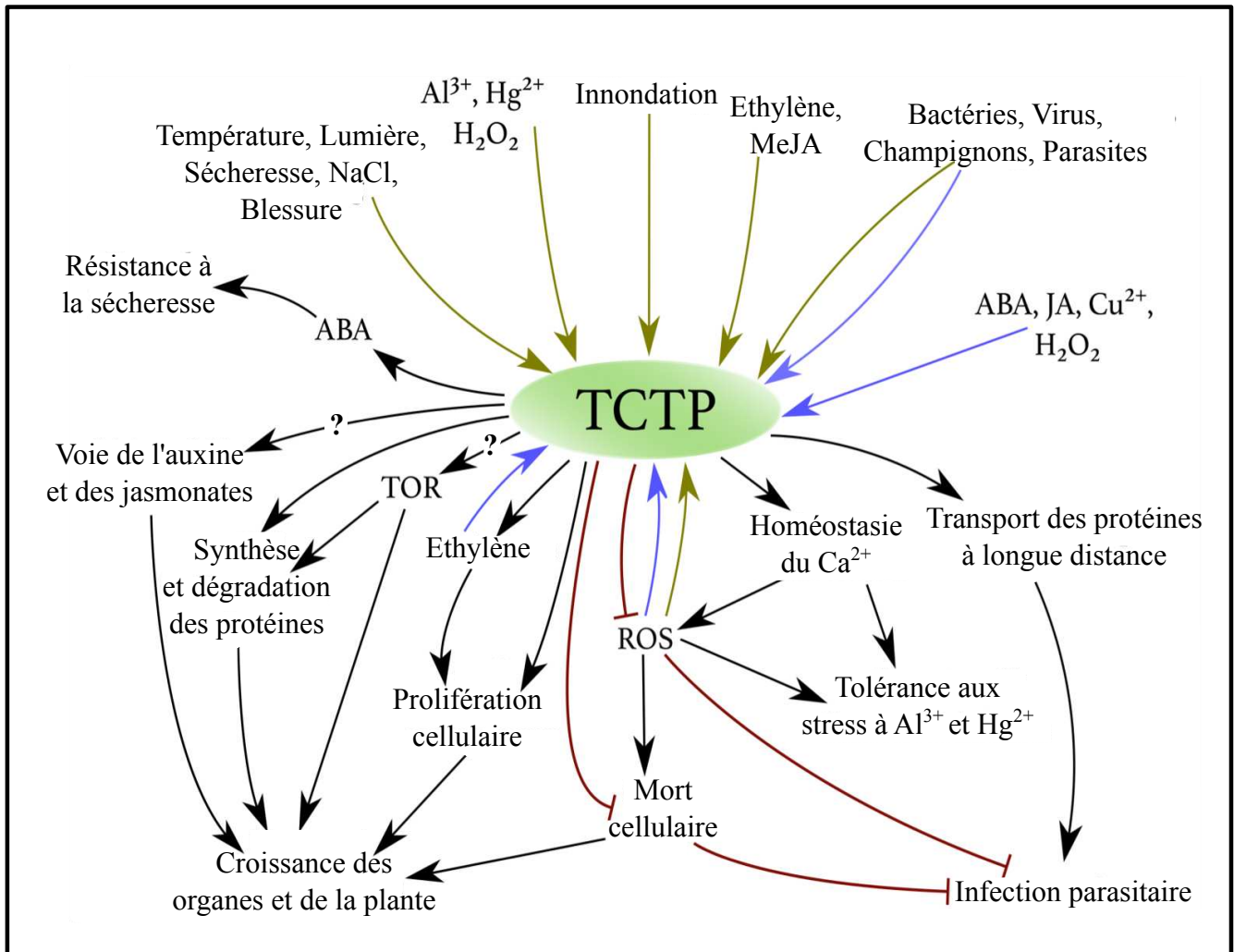


Figure I.20. Les différents rôles de TCTP chez les plantes.

Adapté de Betsch et al., In press

Représentation schématique des multiples stimuli affectant l'expression de *TCTP* (flèches vertes) ou l'accumulation de la protéine TCTP (flèches bleues) et des divers processus biologiques associés à la fonction TCTP (flèches noires et rouges).

ROS = espèces réactives de l'oxygène, ABA = acide abscissique, TOR = TARGET OF RAPAMYCIN, JA = jasmonates, MeJA = méthyl-JA.

Ainsi, TCTP interagit avec les microtubules par son domaine en hélice α de façon transitoire dépendante de la progression du cycle cellulaire (Bazile et al., 2009; Gachet et al., 1999). Elle se lie au pôle du fuseau mitotique au début de la mitose mais en est détachée durant la transition de la métaphase à l'anaphase (Burgess et al., 2008; Yarm, 2002). En outre, chez les cellules humaines, TCTP interagit avec des régulateurs clefs du cycle cellulaire comme la phosphatase Cdc25c, dont elle promeut la dégradation par la voie Ub/Pr, conduisant à une baisse de l'activité CDK en phases G2 et M (Chan et al., 2012). Enfin, la surexpression de CYCE peut compléter la perte de *TCTP* chez *D. melanogaster* (Hsu et al., 2007), mettant en évidence que cette cycline, impliquée plus spécifiquement dans la transition G1/S et spécifique aux animaux, agit en aval de TCTP.

Chez les plantes, l'utilisation de cellules BY2 de *Nicotiana tabacum* exprimant un ARN interférent contre *NtTCTP* a permis de mettre en évidence un délai de 4h dans la progression du cycle cellulaire, plus précisément au niveau de la transition G1/S (Brioude et al., 2010). De plus, le rôle de TCTP dans la régulation du cycle cellulaire a été confirmé par l'étude des cinétiques de croissance de feuilles dérégulées pour TCTP chez *A. thaliana* et *N. tabacum* qui montre des effets réducteurs uniquement sur le nombre de cellule mais pas leur taille (Brioude et al., 2010; Tao et al., 2015). Néanmoins, le mécanisme d'action précis de AtTCTP sur le cycle cellulaire reste inconnu et ma thèse avait pour objectif de le préciser.

b- TCTP, croissance et régulation des niveaux protéiques

TCTP a également été décrit comme un acteur de la voie TARGET OF RAPAMYCIN (TOR). La kinase TOR fait partie d'un complexe qui contrôle la prolifération cellulaire et la croissance en réponse à des signaux environnementaux chez les animaux et les végétaux (Deprost et al., 2007; Wullschleger et al., 2006). Chez les mammifères, la voie TOR croissance en réponse à des signaux environnementaux chez les animaux et les végétaux (Deprost et al., 2007; Wullschleger et al., 2006). Chez les mammifères, la voie TOR contrôle la croissance en intégrant différentes voies de signalisation agissant sur la synthèse des protéines et la biogenèse des ribosomes (Wullschleger et al., 2006). L'activité kinase TOR est stimulée par son association avec la petite Ras GTPase Rheb (Wullschleger et al., 2006). Une étude rapporte que, chez *D. melanogaster*, dTCTP agit comme un régulateur positif direct de la voie TOR, en agissant comme GEF pour Rheb (Hsu et al., 2007). Ces résultats sont soutenus par des études de modélisation moléculaires sur les protéines humaines (Dong et al., 2009) et l'observation de la structure de hTCTP (Thaw et al., 2001). Néanmoins, d'autres études n'ont pas pu confirmer ces résultats chez les mammifères (Rehmann et al., 2008; Wang et al., 2008b) et l'interaction entre TCTP et Rheb reste fortement débattue. Chez les plantes, seules des preuves indirectes comme l'interaction en système hétérologue chez le tabac entre AtTCTP et des homologues de Rheb (Brioude et al., 2010) existent pour proposer une implication de TCTP dans la voie TOR. Ainsi, l'implication de TCTP dans la voie TOR doit encore être explorée (Figure I.20).

La voie TOR régule la synthèse des protéines notamment en augmentant le nombre de ribosomes par la régulation de la synthèse des ARNr et la traduction sélective des ARNm possédant un 5'-TOP dont fait partie TCTP (Deprost et al., 2007; Wullschleger et al., 2006). Il a été confirmé que la traduction de l'ARNm *TCTP*, qui possède un 5'-TOP, est bien stimulée par la voie TOR chez les mammifères (Bommer et al., 2015). TCTP agit sur la voie de synthèse des protéines en interagissant avec le facteur d'élongation de la traduction eEF1A (eucaryotic

Elongation Factor 1A) et son GEF eEF1B β (Cans et al., 2003). TCTP stabilise la forme de eEF1A liée au GDP, inhibant l'activité GEF de eEF1B β . L'interaction de TCTP avec des facteurs d'élongation et leur GEF est très conservé chez l'ensemble des eucaryotes (Koo et al., 2020; Wu et al., 2015), suggérant qu'il s'agit d'une des fonctions clés de TCTP. Chez la levure, TCTP a été identifié comme une protéine associée à la traduction et les mutants perte de fonction présentent un taux de synthèse de protéine réduit et des altérations des profils des polysomes (Fleischer et al., 2006). Ainsi, TCTP pourrait jouer un rôle majeur dans la régulation de la synthèse protéique chez les eucaryotes (Figure I.20).

TCTP a aussi été liée à la dégradation des protéines (Figure I.20). Différentes études ont rapportées un rôle positif ou négatif de TCTP sur l'autophagie chez les mammifères (Bae et al., 2017; Chen et al., 2014a). TCTP a également été impliquée dans la voie Ub/Pr. Par exemple, hTCTP se lie à l'E3-ligase von Hippel-Lindeau, provoque son ubiquitination et sa dégradation conduisant ainsi à la stabilisation de son substrat hypoxia-inducible factor (Chen et al., 2013a). TCTP agit également sur la dégradation d'autres protéines comme le suppresseur de tumeur p53 (Partie I.5.B.c) et la phosphatase Cdc25 (Partie I.5.B.a). Plusieurs études ont également proposé un rôle plus global de TCTP dans la voie Ub/Pr. Chez la levure, l'homologue de TCTP colocalise avec des granules de stress, des composants protéosomiaux impliqués dans la protection de certaines protéines de la dégradation par le protéasome (Rinnerthaler et al., 2013). Diminuer l'expression de *TCTP* dans des cellules de cancer de colon conduit à perturber la quantité de différentes protéines dont des composants de la voie Ub/Pr (Ma et al., 2010). Plus récemment des travaux de mon équipe d'accueil auxquels j'ai participé ont montré que TCTP interagit physiquement et génétiquement avec CSN4, une sous-unité du complexe CSN dont l'activité de déneddylation régule les complexes E3-ligase CRL (Betsch et al., 2019). De plus, chez *A. thaliana* et *D. melanogaster*, la quantité de TCTP influe positivement sur la neddylation de CUL1 (Betsch et al., 2019). Ces données montrent l'existence d'une nouvelle voie par laquelle TCTP, en coopération avec CSN, régule la voie Ub/Pr. Un des objectifs de ma thèse a été de décrire plus précisément cette voie.

c- TCTP et mort cellulaire

En outre, TCTP a été associé au contrôle de l'homéostasie ionique des cellules notamment par liaison au Ca²⁺ (Feng et al., 2007; Graidist et al., 2007; Haghghat and Ruben, 1992), Figure I.20) et à la régulation de l'enzyme Na⁺-K⁺-ATPase (Jung et al., 2004). Cette fonction peut aussi être reliée au rôle de TCTP dans le contrôle de l'apoptose chez les animaux. En effet, la létalité des embryons de souris *tctp* est due à une apoptose excessive, suggérant un rôle majeur de TCTP comme protéine anti-apoptotique (Chen et al., 2007). Cette action peut s'expliquer par différentes voies. D'un côté, TCTP peut interagir avec et moduler positivement l'activité de protéines anti-apoptotique comme Mcl-1 et Bcl-xL, toutes les deux membres de la famille Bcl-2 (Liu et al., 2005; Yang et al., 2005). De plus, TCTP inhibe la dimérisation et donc l'activation de la protéine pro-apoptotique Bax (Susini et al., 2008) et empêche l'accumulation excessive de Ca²⁺ intracellulaire déclenchant l'apoptose suite à des conditions de stress (Graidist et al., 2007). Chez les plantes, ce mécanisme pourrait être conservé comme l'expression constitutive de AtTCTP empêche l'effet apototique de la tunicamycine, un agent inducteur de mort cellulaire programmée, dans les feuilles de tabac (Hoepflinger et al., 2013). Comme

AtTCTP peut se lier au Ca^{2+} , il est probable qu'elle inhibe la mort cellulaire programmée en séquestrant le Ca^{2+} cytosolique (Hoepflinger et al., 2013).

Enfin, chez les animaux, TCTP a été décrit comme antagoniste de p53, aussi connu comme le "gardien du génome" (partie I.2.E). L'interaction entre TCTP, p53 et MDM2 (une E3-ligase spécifique de p53) limite l'auto-ubiquitination de MDM2 et conduit donc à une dégradation accrue de p53 par la voie Ub/Pr (Amson et al., 2012; Funston et al., 2012; Rho et al., 2011). Au contraire, p53 réprime la transcription de *TCTP* (Amson et al., 2012). Ainsi, TCTP joue un rôle clef dans le contrôle de l'arrêt du cycle cellulaire et du choix entre réparation et mort cellulaire suite notamment aux dommages à l'ADN.

Par ailleurs, chez les plantes, TCTP est aussi impliqué dans la régulation d'une autre forme de mort cellulaire appelée réponse hypersensible (*hypersensitive response*, HR) qui intervient suite à l'infection par un pathogène pour limiter sa progression. La sous-expression de *NtTCTP* promeut l'HR tandis que l'expression transitive de *NtTCTP* la décroît (Gupta et al., 2013). Ces données confirment que, chez les plantes comme chez animaux, TCTP joue un rôle majeur dans la mort cellulaire programmée (Figure I.20). Cependant, les mécanismes précis sont moins bien connus chez ces celles-ci, notamment du fait qu'elles ne possèdent pas d'homologues pour les protéines impliquées côté animal.

TCTP est également impliqué dans la détection et la réparation des dommages à l'ADN chez les animaux. Dans les cellules humaines, TCTP est régulée à la hausse après irradiation par des rayons γ et intervient dans la réparation des dommages en association avec ATM (Zhang et al., 2012). L'interaction génétique de TCTP et ATM aboutissant à l'activation de cette dernière a également été confirmée chez *D. melanogaster* (Hong and Choi, 2013). Il est important de rappeler qu'à ces données s'ajoute aussi le rôle de TCTP dans la dégradation de p53 détaillé précédemment. Ces études sont également soutenues par le fait que TCTP participe à protéger les cellules cancéreuses de la cytotoxicité exercée par les agents anti-cancéreux causant des dommages à l'ADN (Bommer et al., 2017; Graidist et al., 2004). Aucune donnée n'est disponible sur un potentiel rôle de TCTP dans la voie des dommages à l'ADN chez les plantes. De façon plus générale, TCTP est impliqué dans la régulation de nombreux stress cellulaires comme le stress oxydatif, le stress ionique, le choc thermique et les stress biotiques (Betsch et al., In press; Bommer, 2017).

TCTP a pu être reliée à de nombreuses fonctions comme la prolifération cellulaire, la croissance, la protection des cellules contre différents stress et la mort cellulaire (Betsch et al., In press). Conformément à ce qui a été observé au niveau de la structure, la fonction de TCTP est bien conservée lors du développement des eucaryotes. En effet, mon équipe d'accueil a montré que compléter un mutant perte de fonction d'*AtTCTP* avec la protéine dTCTP (TCTP de *D. melanogaster*) permet de restaurer le phénotype sauvage (Brioude et al., 2010). Néanmoins, des différences dans la fonction existent comme AtTCTP est impliquée dans la régulation de la prolifération cellulaire et pas l'expansion cellulaire (Brioude et al., 2010) contrairement à dTCTP qui assure les deux fonctions (Hsu et al., 2007). Ainsi, dTCTP complète parfaitement les défauts de prolifération cellulaire des mutants *tctp* d'*A. thaliana* tandis que AtTCTP complète les défauts de prolifération cellulaire mais pas ceux d'expansion cellulaire des mutants *tctp* de *D. melanogaster* (Brioude et al., 2010). Cela

souligne bien qu'en plus d'une grande conservation de fonction, certains rôles de TCTP peuvent être spécifiques à certains organismes ou à certains *phylla*.

C- Rôles de TCTP dans la signalisation chez les plantes

Comme décrit précédemment, TCTP est crucial pour le développement des plantes et la détermination de la taille des organes. Chez *Arabidopsis* et *Nicotiana*, une partie de ces effets des dérégulations de *TCTP* s'expliquent par la perturbation de la prolifération cellulaire. De plus, d'autres fonctions de TCTP ont pu être mises en évidence, notamment concernant son implication dans la signalisation hormonale. Malheureusement, la plupart des travaux proposent seulement des hypothèses basées sur des observations. Les confirmations expérimentales sont relativement rares et souvent contradictoires.

L'auxine est une phytohormone essentielle impliquée dans un grand nombre de processus comme la division cellulaire, l'organogenèse, la senescence, la dominance apicale, le gravitropisme, la croissance racinaire, ... (Vanneste and Friml, 2009). Les plantes exprimant un *ARNi* pour *AtTCTP* sont moins sensibles à des concentrations croissantes d'auxine exogène comparées aux plantes sauvages (Berkowitz et al., 2008). Chez *Brassica oleracea*, les plantes *TCTP-ARNi* poussent plus lentement que les sauvages et accumulent une quantité moindre d'auxine (Cao et al., 2010). Ces données laissent supposer un rôle de TCTP dans la signalisation auxinique. Cependant, chez *A. thaliana*, le phénotype des plantes *TCTP-ARNi* ne ressemble pas à celui des mutants auxiniques qui présentent des défauts plus sévères (Estelle and Somerville, 1987; Křeček et al., 2009). Par exemple, les mutants *TCTP-ARNi* ne présentent pas de perte de dominance apicale (Berkowitz et al., 2008; Brioudes et al., 2010). Par ailleurs, les mutants *tctp* ne présentent de défauts ni dans l'expression du rapporteur de l'homéostasie de l'auxine *DR5rev::GFP* (Friml et al., 2003) ni dans celui de l'efflux d'auxine *PINI::PINI-GFP* (Betsch et al., 2019; Heisler et al., 2005). Ainsi, TCTP ne semble pas jouer un rôle majeur dans la signalisation auxinique (Figure I.20).

D'autres études ont pointé vers un rôle de TCTP dans la voie de l'acide abscissique (*ABscisic Acid*, ABA). L'ABA est une hormone connue pour être impliquée dans la germination des graines et la réponse à la sécheresse (Chen et al., 2020). Chez *A. thaliana*, la surexpression de *AtTCTP* confère une tolérance à la sécheresse en augmentant la fermeture des stomates induite par l'ABA et le calcium (Kim et al., 2012). Comme TCTP interagit avec les microtubules, et ce de façon d'autant plus forte en présence de calcium, les auteurs ont proposé que la fermeture des stomates soit due à l'interaction de TCTP avec les microtubules suite à un stress hydrique conduisant à la dépolymérisation des microtubules (Kim et al., 2012). De plus, le domaine d'expression de *TCTP* augmente après traitement avec de l'ABA et des éléments putatifs de réponse à l'ABA sont présents dans le promoteur de *TCTP*, suggérant la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positif (Kim et al., 2012). De façon similaire, l'expression d'*OsTCTP* (*TCTP* d'*Oriza sativa*) augmente après traitement à l'ABA (Wang et al., 2015). Au contraire, chez *B. oleacea* et *Dactylis glomerata*, l'expression de *TCTP* est stable en réponse à l'ABA (Cao et al., 2010; Huang et al., 2014). De plus, chez *B. oleacea*, la sous-expression de *TCTP* est associée à des niveaux plus importants d'ABA (Cao et al., 2010). Ainsi, ces données révèlent un lien entre TCTP et l'ABA, mais leur incohérence empêche de préciser la nature de ce lien et des études complémentaires seront nécessaires (Figure I.20).

Par ailleurs, la protéine NtTCTP s'accumule en réponse à des traitements à l'éthylène (Tao et al., 2015), une hormone impliquée dans la croissance des plantes, la maturation des fruits et la réponse aux pathogènes ((Dubois et al., 2018), Figure I.20). NtTCTP interagit avec le récepteur à l'éthylène NTHK1 (*N. tabacum* HISTIDINE KINASE1), le protégeant ainsi de la dégradation par la voie Ub/Pr et promouvant la croissance des plantules (Tao et al., 2015).

Enfin, le rôle de TCTP dans la voie hormonale de l'acide jasmonique (JA), une hormone dérivée de lipides jouant un rôle dans les réponses aux stress biotiques et abiotiques et dans les processus développementaux (Wasternack and Hause, 2013), a aussi été discuté (Figure I.20). Chez *A. thaliana*, la surexpression de *GhTCTP* (*TCTP* de *Gossypium hirsutum*) conduit à une diminution drastique des gènes impliqués dans la voie des JA (Zhang et al., 2014). Chez *Hevea brasiliensis*, l'expression de *HbTCTP* est fortement réduite après traitement au méthyl-JA (Li et al., 2013). Au contraire, l'accumulation de OsTCTP n'est pas modifiée après traitement au méthyl-JA chez *Oryza sativa* (Wang et al., 2015). Ces données contradictoires mettent en évidence que plus d'études sont nécessaires pour clarifier un rôle potentiel de TCTP dans la signalisation des JA.

TCTP semble donc lié à de nombreuses voies hormonales sans qu'aucun rôle n'ait pu être défini avec précision.

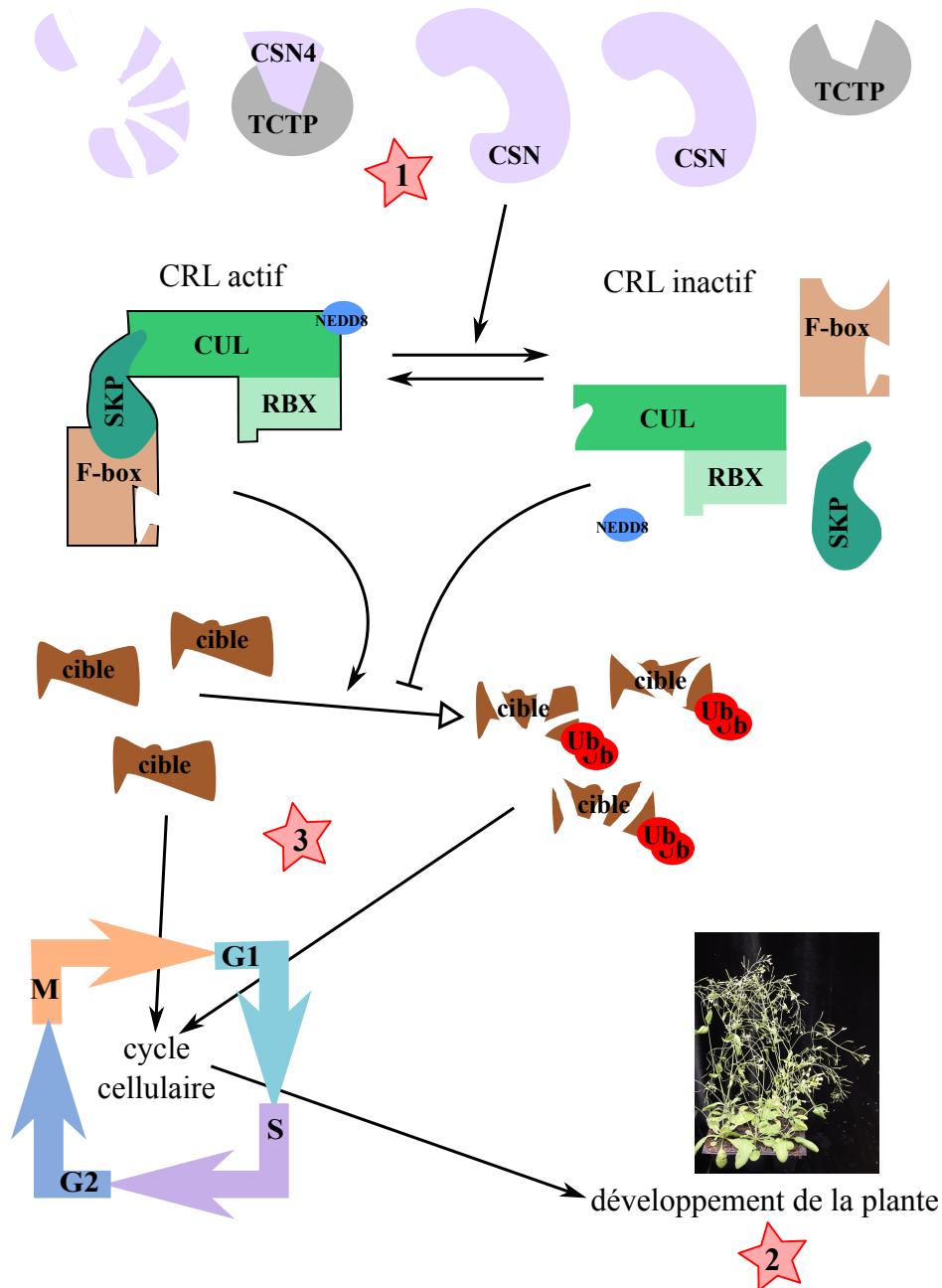


Figure I.21. Présentation des objectifs de la thèse : comment AtTCTP et AtCSN4 coopèrent pour contrôler la progression du cycle cellulaire et le développement chez *Arabidopsis thaliana*.

TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP) interagit physiquement avec CSN4, une sous-unité du complexe CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME (CSN) qui inactive les complexes E3-Ubiquitine ligase CULLIN-RING LIGASE (CRL) en déneddylant leur sous-unité CULLIN (CUL). La balance entre CRL actif et inactif contrôle le niveau d'accumulation des protéines cibles. Ces protéines ont notamment des rôles dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire et par là dans le développement de la plante.

Ma thèse vise à préciser 1) comment AtTCTP et AtCSN4 interagissent, 2) comment elles agissent sur le développement d'*A. thaliana* et 3) par quelle(s) voie(s) moléculaire(s) précise(s) elles contrôlent la progression du cycle cellulaire.

NEDD8 : NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8, RBX : RING-BOX, SKP : S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN, Ub = UBIQUITINE

6- Objectifs de thèse

TCTP est un régulateur essentiel du développement des eucaryotes, particulièrement *via* son rôle dans le contrôle de la progression de la transition G1/S du cycle cellulaire (Brioude et al., 2010). Comme l'a également montré mon équipe d'accueil par des travaux auxquels j'ai participé (Betsch et al., 2019), TCTP interagit physiquement et génétiquement avec CSN4, une sous-unité du complexe CSN, elle aussi impliquée notamment dans le contrôle du cycle cellulaire (Annexe 7).

L'objectif général de ma thèse était de préciser comment AtTCTP et AtCSN4 interagissent et coopèrent pour réguler la progression du cycle cellulaire et quelles en sont les conséquences au niveau du développement des plantes (Figure I.21).

Dans un premier temps, j'ai cherché à caractériser plus finement l'interaction physique entre AtTCTP et AtCSN4 (Figure I.21). Pour cela, j'ai étudié l'interaction entre des formes mutées de AtTCTP et AtCSN4, mais aussi entre AtTCTP et les autres sous-unités de CSN par des approches de co-immunoprécipitation directement chez *A. thaliana* et de complémentation

Ensuite, j'ai évalué l'impact de AtTCTP et AtCSN4 sur le développement des plantes (Figure I.21), notamment au niveau du développement embryonnaire où le rôle des divisions cellulaires est prépondérant. Je me suis intéressée plus précisément au lien avec les réponses hormonales à l'auxine et aux cytokinines par des approches de microscopie. J'ai également préparé des études d'interactions génétiques entre AtTCTP, AtCSN4 et d'autres mutants impliqués dans la régulation de la neddylation des CUL de façon à préciser le lien avec cette dernière.

La partie centrale de ma thèse a consisté à clarifier les voies par lesquelles AtTCTP et AtCSN4 contrôlent la progression du cycle cellulaire (Figure I.21). Dans un premier temps, par microscopie puis par qRT-PCR, j'ai confirmé le rôle des deux protéines dans la transition G1/S. Ces approches m'ont aussi permis d'identifier plus précisément certaines cyclines (CYCD6;1 et CYCD7;1) et certains KRP (KRP5, KRP6) comme candidats intéressants pour lesquels j'ai initié des études complémentaires en générant des lignées rapportrices. Alternativement, par des approches non ciblées, j'ai comparé, dans les différents mutants, les protéines dérégulées par spectrométrie de masse et le niveau d'ubiquitination général par des approches biochimiques et pharmacologiques, de façon à avoir une vision plus globale des processus mis en jeu. Enfin, à la vue son importance pour la transition G1/S et du fait du rôle déjà documenté de CSN, j'ai voulu déterminer si la voie AtTCTP/AtCSN4 était liée étroitement à celle du dommage à l'ADN. Pour cela, j'ai étudié, dans différentes lignées dérégulant AtTCTP ou AtCSN4, l'expression de gènes marqueurs de dommage à l'ADN.

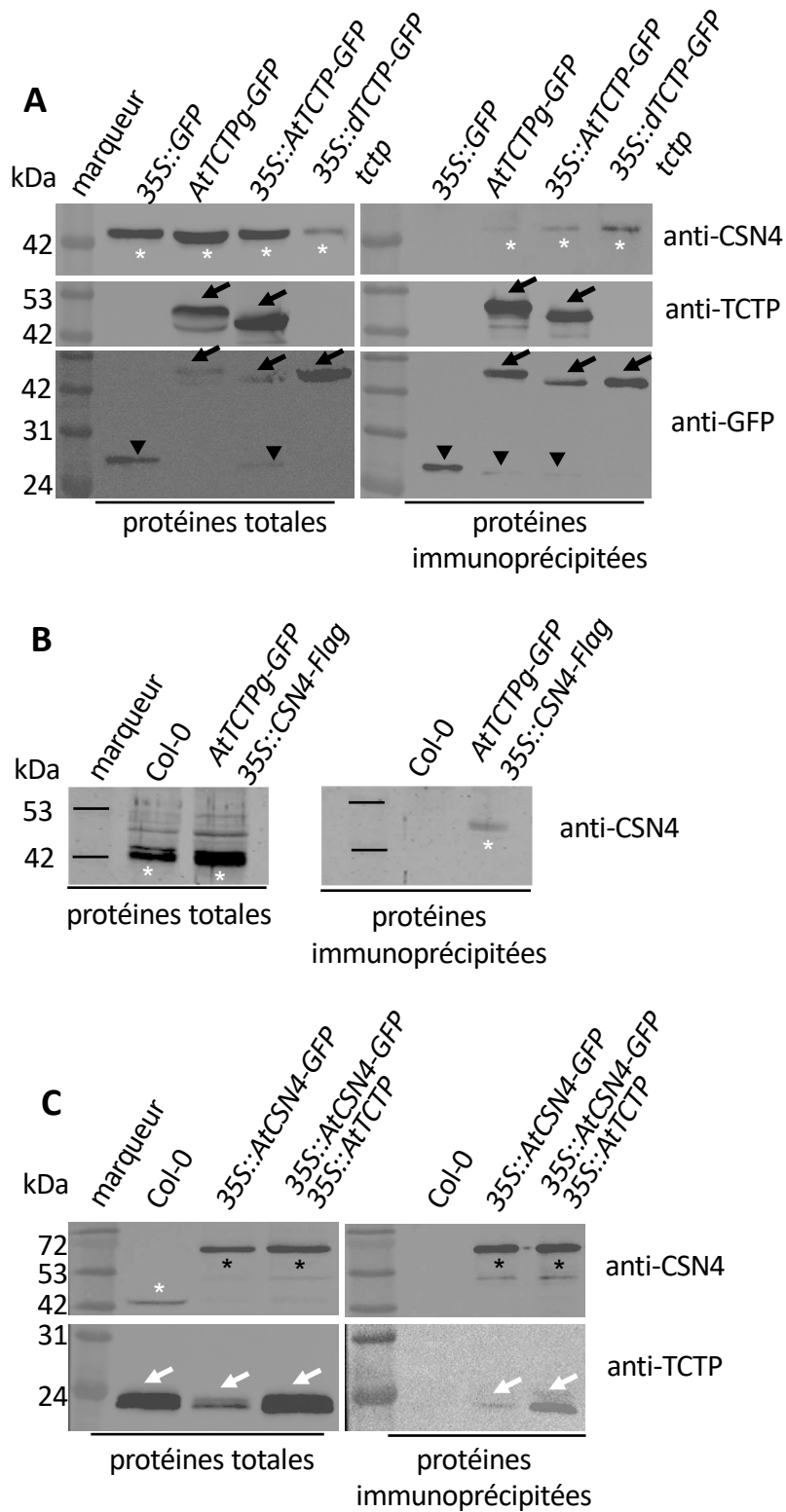


Figure II.1. AtTCTP et ATCSN4 co-immunoprécipitent.

Western blots réalisés à partir de protéines totales ou de protéines immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP (A, B, C) provenant d'inflorescences (A,C) et de graines vertes (B) des différents génotypes indiqués et révélés avec des anticorps anti-CSN4, -TCTP et -GFP. Etoiles blanches : CSN4 endogène (A, C) ou CSN4-Flag (B), étoiles noires : CSN4-GFP (C). Flèches blanches : TCTP endogène (C), flèches noires : TCTP-GFP (A). Triangles : GFP seule (A).

A. AtCSN4 co-immunoprécipite avec AtTCTP et dTCTP dans les inflorescences d'*A. thaliana*.

B. AtCSN4 co-immunoprécipite avec AtTCTP dans les graines d'*A. thaliana*.

C. AtTCTP co-immunoprécipite avec AtCSN4 dans les inflorescences d'*A. thaliana*.

II- Résultats

1- TCTP et CSN4 interagissent physiquement en dehors du complexe CSN

Avant mon arrivée, mon équipe d'accueil a recherché par immunoprécipitation suivie de spectrométrie de masse les interacteurs de TCTP. Parmi les candidats, la protéine CSN4 a semblé prometteuse puisque le complexe CSN auquel elle appartient joue un rôle crucial dans la régulation du cycle cellulaire via la régulation de la neddylation des CUL des complexes CRL (partie I.4.E). Ainsi, des études auxquelles j'ai participé ont visé à confirmer cette interaction dans différents contextes *in planta*. De plus, j'ai également cherché à préciser l'implication des différents domaines de CSN4 ainsi que des autres sous-unités du complexe CSN dans l'interaction TCTP/CSN4 pour mieux déchiffrer le processus fonctionnel mis en jeu.

A- TCTP et CSN4 interagissent physiquement *in planta*

En collaboration avec Léo Betsch, ancien doctorant dans l'équipe, j'ai cherché à confirmer l'interaction physique entre TCTP et CSN4. Dans un premier temps, j'ai utilisé des lignées déjà présentes dans l'équipe exprimant TCTP fusionné à la GFP sous son promoteur endogène (notée *AtTCTPg-GFP*) et sous le contrôle du promoteur constitutif *CaMV 35S* (notée *35S::AtTCTP-GFP*), croisées ou non avec les lignées exprimant CSN4 fusionné avec le peptide Flag sous le contrôle du promoteur constitutif *CaMV 35S* (notée *35S::AtCSN4-Flag*). La construction *AtTCTPg-GFP* reproduit l'expression endogène de *TCTP* alors que la construction *35S::TCTP-GFP* correspond à une expression ubiquiste, du fait que *TCTP* n'y est pas soumis à la régulation post-transcriptionnelle. En utilisant des protéines extraites de différents organes et tissus (*i.e.* graines vertes contenant des embryons au stade pré-mature et inflorescences) provenant de ces lignées, nous avons immunoprécipité AtTCTP-GFP à l'aide d'un anticorps anti-GFP (Figure II.1.A,B). Dans cette fraction, nous avons réussi à détecter la présence de CSN4 ou CSN4-Flag, révélée par des anticorps anti-CSN4 (Figure II.1.A,B). CSN4 est présent dans la fraction immunoprécipitée uniquement quand celle-ci comporte TCTP-GFP et pas dans les contrôles négatifs (plantes sauvages Col0 et plantes exprimant *35S::GFP*) (Figure II.1.A,B). Cela indique que AtTCTP et AtCSN4 co-immunoprécipitent, suggérant une interaction *in vivo*. Pour confirmer nos données, l'immunoprécipitation a aussi été réalisée en sens inverse (Figure II.1.C). Dans les lignées *35S::AtCSN4-GFP*, TCTP est détectée dans la fraction AtCSN4-GFP immunoprécipitée par un anticorps anti-GFP (Figure II.1.C). Ainsi, TCTP et CSN4 co-immunoprécipitent dans différents tissus *in planta*, confirmant une interaction physique directe ou indirecte *in vivo* entre ces deux protéines. Par ailleurs, l'immunoprécipitation a aussi été réalisée dans les lignées *tctp* complémentées avec la protéine TCTP de *D. melanogaster* (dTCTP, lignées *35S::dTCTP-GFP tctp*, (Brioudes et al., 2010)). De façon similaire, AtCSN4 immunoprécipite avec dTCTP (Figure II.1.A). Cela suggère que l'interaction physique entre TCTP et CSN4 est conservée chez les eucaryotes.

En système hétérologue, une approche de complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) dans l'épiderme de feuilles de tabacs a confirmé l'interaction entre AtTCTP et AtCSN4 (Figure II.2,3). Ce système se base sur l'expression d'un fluorochrome, la YELLOW FLUORESCENT PROTEIN (YFP), en deux moitiés distinctes (N-terminal et C-terminal notés respectivement YFP^{Nter} et YFP^{Cter}) ((Hu et al., 2002), Figure II.2).

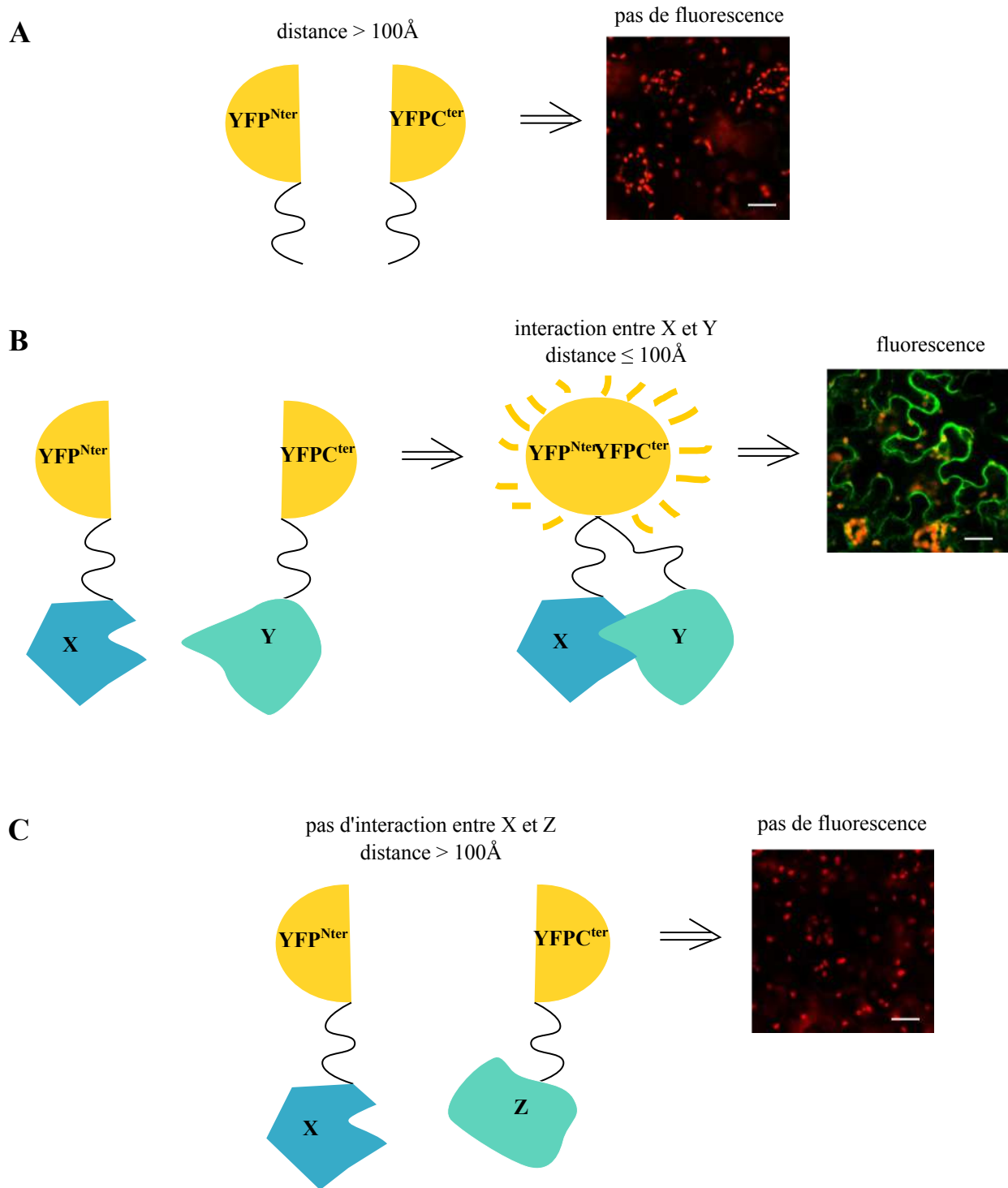


Figure II.2. Présentation du principe de complémentarité bimoléculaire de fluorescence (BiFC).

Représentation schématique des différentes situations envisageable et images du résultat après expression transitoire des constructions dans les feuilles de tabac et visualisation au microscope confocal. Barre d'échelle : 50 μm . Vert : signal YFP, rouge : autofluorescence de la chlorophylle

A. Les deux moitiés de la YELLOW FLUORESCENT PROTEIN (YFP) notées : YFP^{Nter} et YFP^{Cter} sont exprimées séparément. Elles n'ont pas d'affinité particulière l'une pour l'autre et reste éloignées, ce qui conduit à un absence de fluorescence.

B,C. Chaque moitié de YFP est co-exprimée fusionnée *via* un domaine de liaison (trait noir) à une protéine d'intérêt (X, Y ou Z). La fluorescence est établie uniquement si les deux protéines d'intérêt interagissent.

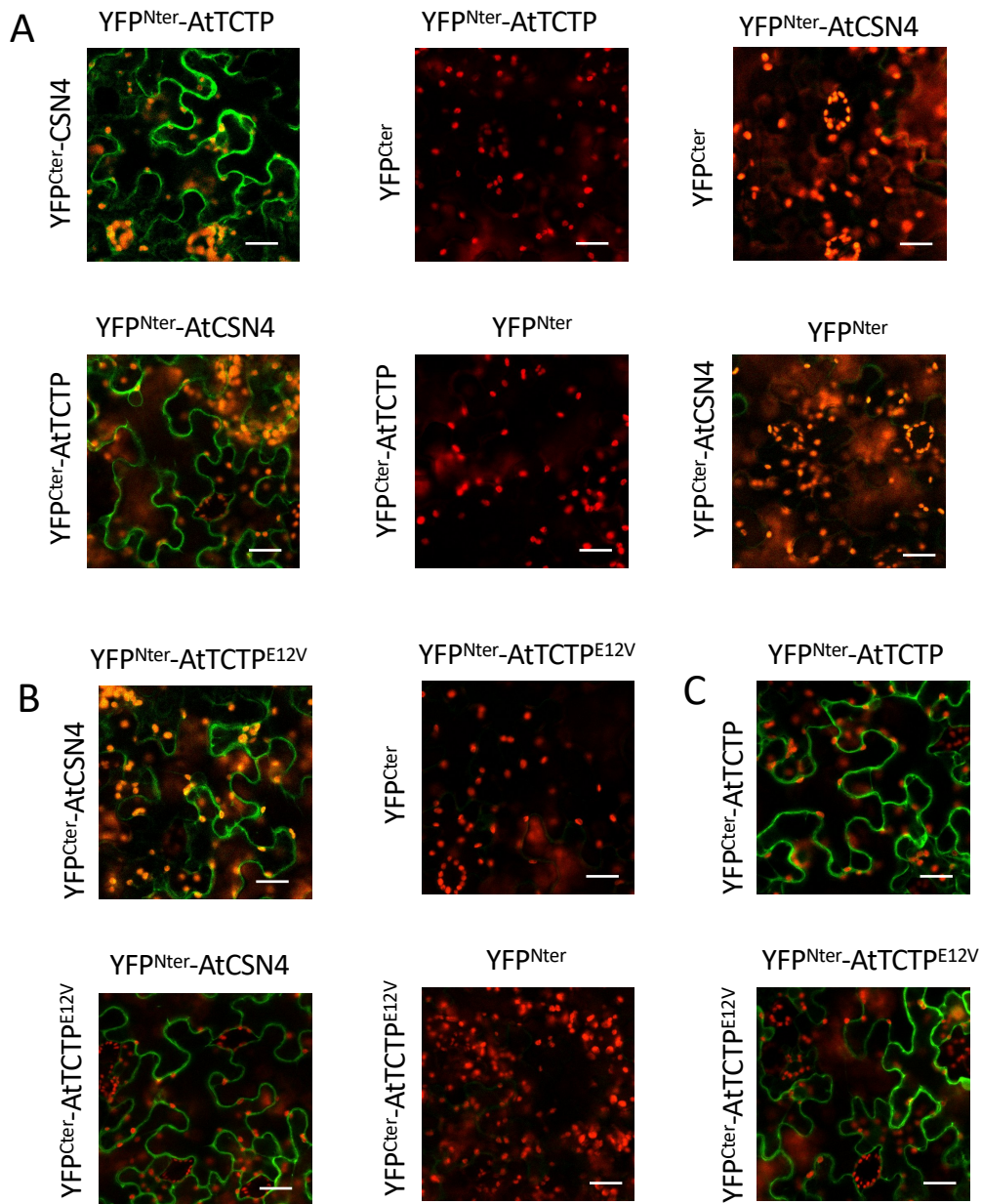


Figure II.3. AtTCTP et AtTCTP^{E12V} interagissent physiquement avec AtCSN4

Test d'interaction par complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC). Les constructions génétiques conduisant à la fusion entre une protéine d'intérêt et le domaine N-terminal ou C-terminal de la YFP (notés YFP^{Nter} et YFP^{Cter}) ont été transformées transitoirement dans des feuilles de tabac. Les feuilles ont été observées au microscope confocal trois jours après transformation. Chaque combinaison a été observée dans 2 feuilles différentes lors de trois répétitions indépendantes. Une image représentative est montrée. Vert : YFP, Rouge : autofluorescence de la chlorophylle. Barre d'échelle : 50 μm

- A.** AtTCTP et AtCSN4 interagissent.
- B.** AtTCTP^{E12V} et AtCSN4 interagissent.
- C.** AtTCTP et AtTCTP^{E12V} sont capables de se dimériser.

<i>Homo-sapiens</i>	1MAAAVRQDLAQLMNSSGSHKDLGKYYRQILEKAIQLSGAEQLEALKAFVEAMVNVSVLVI	80
<i>Mus-musculus</i>	1MAAAVRQDLAQLMNSSGSHKDLGKYYRQILEKAIQLSGTEQLEALKAFVEAMVNVSVLVI	80
<i>Danio-erio</i>	1MASGVRQDLAQLMNSSGSHKDLGKYYRQILEKALQDTEQLEALKAFVEAMVNVSVLVI	80
<i>Drosophila-melanogaster</i>	1	MAAANYGI STAALRSQMLGLINF TGT HKDQADKYRQLLKT VLTNTQELIDGLRLFEVAIVNEHVS	87
<i>Arabidopsis-thaliana</i>	1MDEALTNASAI DGDRQKIEQYKILLSVLSN..DLLQA.QRFIDHILSDVPLVVS	72
<i>Oryza-sativa</i>	1MDNALASAAAIDQRQKIEQYRHLSSVLSFPDIPQA.KRFLDHMVSDVPLVVS	74
<i>Zea-mays</i>	1MDSLSASAAAIDQRQKIEQYRHLASVLSFPDIPQA.KRFLDHMVSDVPLVVS	74
<i>Hordeum-vulgare</i>	1MDSALASAAAIDQRQKIEQYRHLASVLSFPDIPQA.KRFLNHMVSDVPLVVS	74
<i>Nicotiana-tabacum</i>	1MESAFASASAI DQRQKIEQYKHLSTVLASS..DILQA.KOFIDHMLSDVPLVVS	72
<i>Rosa-chinensis</i>	1MEGAFKASAI DQRQKIEQYKHLSTVSSD..DVPVA.KKFIDHMLSDVPLVVS	72
<i>Hevea-brasilienis</i>	1MESAFASASAI DQRQKIEQYKHLASVLSN..DVIQA.KKFIDHMLSDVPLVVS	72
<i>Medicago-tuncatula</i>	1MEGAFASASAI DQRQKIEQYKHLASVLSN..DILHA.RKFIDHMLSDVPLVVS	72
<i>Glycine-max</i>	1MESAFASASAI DQRQKIEQYKHLAAVLSN..DIVQA.RKFIDHMLSDVPLVVS	72
<i>Cucurbita-maxima</i>	1MESAFASASAI DQRQKIEQYKHLNVLSN..DSVQA.KKFIDHTLSDVPLVVS	72
<i>Physcomitrella-patens</i>	1MASD I QGALQNAAGIDHQKIEQYKILLSIMCNI..NVAHA.RAFIDHMTDEVPLVVS	76
<i>Caenorhabditis-elegans</i>	1	MSGEIERSQEVAVIF AQDTHDKQYEAALAKLNKALPQNAMGRVDTAEIKI IKTVDVIALETGSMVSRGF	87
<i>Schizosaccharomyces-pombe</i>	1MEEVVHYFLEGNMVAQFREALALHYHTNEK.ELFEQAKRCLNIGCGSNNAKRNVD	71
<i>Homo-sapiens</i>	81	AKELIYHFTLEKIQPRVIFSEEQVASIRQLHSLIYEKEEDWRNAAQVLVGI PLET.....GQKQYNVDYKLETY	164
<i>Mus-musculus</i>	81	AKEVYHFTLEKIQPRVIFSEEQVASIRQLHSLIYEKEEDWRNAAQVLVGI PLET.....GQKQYNVDYKLETY	164
<i>Danio-erio</i>	81	AKVVCHFLEKIQPRVIFSEEQVASIRQLHSLIYEKEEDWRNAAQVLVGI PLET.....GQKQYNVDYKLETY	164
<i>Drosophila-melanogaster</i>	88	SKMLSHFTLEKVNPRVIFSEEQVAGIRFLANLIERNQQRWDAATVLVGI PLET.....GQKQYSVECKGLTY	171
<i>Arabidopsis-thaliana</i>	73	QKEIAQELTQIQPRVVSFEQALVIREKLAGLYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....GMRAYDDNFKLSKCI	156
<i>Oryza-sativa</i>	75	QKEVAHYALTQIQPRVVSFEQVVVIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....GIRMLDDTNKLSKCVQ	158
<i>Zea-mays</i>	75	QKEVAHYALTQIQPRVVSFEQVVVIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....GIRMLDDTNKLSKCVQ	158
<i>Hordeum-vulgare</i>	75	QKEVAHYALTQIQPRVVSFEQVVVIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....GIRMLDDTNKLSKCVQ	158
<i>Nicotiana-tabacum</i>	73	QKEVAHYLTNQIQPRVVSFEQVLIIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....AMRVVDETFIVSKCVQ	156
<i>Rosa-chinensis</i>	73	QKEIAHYTLAQIQPRVVSFEQVLIIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....SMRVIDDKFKLAKCVQ	156
<i>Hevea-brasilienis</i>	73	QKEIAHYTLAQIQPRVVSFEQVLIIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....GMRVIDDTFIVSKCVQ	156
<i>Medicago-tuncatula</i>	73	QKEIAHYTLAQIQPRVVSFEQVLIIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....GMRVIDDTFIVSKCVQ	156
<i>Glycine-max</i>	73	QKDI AHYTLAQIQPRVVSFEQVLIIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....GMRVIDESYRLSKCVQ	156
<i>Cucurbita-maxima</i>	73	QKDI AHYTLAQIQPRVVSFEQVLIIREKLAELYSEEQWSKAAQMSGIDLDS.....GMRVIDESYRLSKCVQ	156
<i>Physcomitrella-patens</i>	77	HKEIALYALAQIQPRMVVSFEQVSIIRGLAEMYENEEQWSKAAQMSGIDLES.....GQRMDDAYKAKCVQ	160
<i>Caenorhabditis-elegans</i>	88	VKAISEGILAI IKTRTISYEDQVICLRMLASLEYKEGRIKDAAGALIAINSDTSPKFNQPAAKEKQ	176
<i>Schizosaccharomyces-pombe</i>	72	RKELISELYPVQSLLEAPSEYLVSCCLQALTIYEAQNFELLCSLLEAVEKH.....GHFENDLEQLLLR	154
<i>Homo-sapiens</i>	165	EAYINRASLLQNE-STNEQLQIHYKVCYARVLDYRRKPIEAAQRNVELSY.....KTI VHESERLEALK	245
<i>Mus-musculus</i>	165	EAYINRASLLQNE-STNEQLQIHYKVCYARVLDYRRKPIEAAQRNVELSY.....KTI VHESERLEALK	245
<i>Danio-erio</i>	165	EAYINRASLLQNE-STNEQLQIHYKVCYARVLDYRRKPIEAAQRNVELSY.....KSI VHETERLEALK	245
<i>Drosophila-melanogaster</i>	172	ELFINRASLLQAE-TNSEELQVLYKVCYARVLDYRRKPIEAAQRNVELSY.....RKIVDQGERMTALKKAL	252
<i>Arabidopsis-thaliana</i>	157	EAFINKASFLVSN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	244
<i>Oryza-sativa</i>	156	EAFINKASFLVTN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	246
<i>Zea-mays</i>	156	EAFINKASFLVTN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	246
<i>Hordeum-vulgare</i>	156	EAFINKASFLVTN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	246
<i>Nicotiana-tabacum</i>	157	EAFINKASFLVSN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	244
<i>Rosa-chinensis</i>	157	EAFINKASFLVSN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	244
<i>Hevea-brasilienis</i>	157	EAFINKASFLVSN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	244
<i>Medicago-tuncatula</i>	157	EAFINKASFLVSN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	244
<i>Glycine-max</i>	157	EAFINKASFLVSN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	244
<i>Cucurbita-maxima</i>	157	EAFINKASFLVSN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	244
<i>Physcomitrella-patens</i>	161	EIFINKASFLVSN-SQHEVLNLYKVCYARILDLKRRKLEAALRYDDISQIEKRGIDDEEIDENALEQAL	248
<i>Caenorhabditis-elegans</i>	177	EYVNRRTSILMVDLGNPDQIEHKAQARVSDAKRRFEAAQRNVELSY.....TEQLPNSDKLALGKA	258
<i>Schizosaccharomyces-pombe</i>	165	ILTV-RTSIFLAFKVSNDQLMELQLGNARALDEGTGLLEAAKQMYRVLQY.....KVPGNELIYRENLS	236
<i>Homo-sapiens</i>	246	LATLFKDERCQQLAAAYGILEKMYLDRIRGNQLQEF AAMLMPHOKATTADGSSILDRAVIEHNLLS	334
<i>Mus-musculus</i>	246	LATLFKDERCQQLAAAYGILEKMYLDRIRGNQLQEF AAMLMPHOKATTADGSSILDRAVIEHNLLS	334
<i>Danio-erio</i>	246	LATLFKDERCQQLAAAYGILEKMYLDRIRGNQLQEF AAMLMPHOKATTADGSSILDRAVIEHNLLS	334
<i>Drosophila-melanogaster</i>	253	LATLFKDERCQQLPAYGILEKMYLDRIRRSLEQEF AALLODHOKAATSQSSILDRAVIEHNLLS	341
<i>Arabidopsis-thaliana</i>	245	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	333
<i>Oryza-sativa</i>	247	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	335
<i>Zea-mays</i>	247	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	335
<i>Hordeum-vulgare</i>	247	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	335
<i>Nicotiana-tabacum</i>	245	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	333
<i>Rosa-chinensis</i>	245	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	333
<i>Hevea-brasilienis</i>	245	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	333
<i>Medicago-tuncatula</i>	245	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	333
<i>Glycine-max</i>	245	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	333
<i>Cucurbita-maxima</i>	245	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEIDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	333
<i>Physcomitrella-patens</i>	249	LATLYKDERCSKLIYPILOKQVYLERILRKPEVDAF AEELKPHQKALLPDKSTVLDRA	337
<i>Caenorhabditis-elegans</i>	259	LTILFKDERAPKASPEL IAKMYLTKV I HKDELEEELHQLDQKQAD-EGESILKGIQEHNI	346
<i>Schizosaccharomyces-pombe</i>	237	QELSLQPSVREIPFMSLVGKYLKRRKFKGEGDGLFPFLPHQ-VHIMNRLIEDGRFLETN	324
<i>Homo-sapiens</i>	335	AEKIASQMIT EGRMNGFIDGIDGIVHFET-REALPTWDKQIQSLCFQVNNLLEKISQTAPEWTAQ	406
<i>Mus-musculus</i>	335	AEKIASQMIT EGRMNGFIDGIDGIVHFET-REALPTWDKQIQSLCFQVNNLLEKISQTAPEWTAQ	406
<i>Danio-erio</i>	335	AEKIASQMIT EGRMNGFIDGIDGIVHFET-REALPTWDKQIQSLCFQVNNLLEKISQTAPEWTAQ	406
<i>Drosophila-melanogaster</i>	342	AEKIASQMIT EGRMNGHIDGISAIVHFEN-RELLPQWRQIQSLCYQVNSIIIEKISVAEPD	407
<i>Arabidopsis-thaliana</i>	334	AEKIAANMIGDDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIAGLCOALNDILDSMSSKGI	397
<i>Oryza-sativa</i>	336	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIAGLCOALNDILDSMSSKGI	399
<i>Zea-mays</i>	336	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIAGLCOALNDILDSMSSKGI	399
<i>Hordeum-vulgare</i>	336	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIAGLCOALNDILDSMSSKGI	399
<i>Nicotiana-tabacum</i>	334	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIMGLCOALNDVLDMAKKG	397
<i>Rosa-chinensis</i>	334	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIVGLCOALNDVLDMAKKG	397
<i>Hevea-brasilienis</i>	334	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIVGLCOALNDVLDMAKKG	397
<i>Medicago-tuncatula</i>	334	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIVGLCOALNDVLDMAKKG	397
<i>Glycine-max</i>	334	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIVGLCOALNDVLDMAKKG	397
<i>Cucurbita-maxima</i>	334	AEKIASRM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIVGLCOALNDVLDMAKKG	397
<i>Physcomitrella-patens</i>	338	AEKIAARM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIVGLCOALNDVLDMAKKG	401
<i>Caenorhabditis-elegans</i>	347	AESMAAGM IYEDRMGSDIQVEAVIFHEDDTEELQWDDQIVGLCOALNDVLDMAKKG	412
<i>Schizosaccharomyces-pombe</i>	325	VDTVAVDMVIERLNASIDGCEGYITLPEYGNKANNLPYVNIKTAVLQHYGS	377

Figure II.4. CSN4 est conservé chez les eucaryotes.

Alignement des séquences de CSN4 provenant de différents organismes dont *A. thaliana* (tirets rouges) réalisé avec MultAlin (Corpet, 1988) et visualisé avec Jalview (Waterhouse et al., 2009). Les résidus conservés sont colorés en bleu suivant la matrice de score BLOSUM 62. Les domaines PCI sont colorés en vert clair. La position correspondant à l'alanine 302 d'*A. thaliana*, mutée chez *csn4-2035*, est colorée en rouge.

La fluorescence ne peut se faire que si les deux parties sont suffisamment proches pour reformer la structure tridimensionnelle du fluorochrome entier. Les deux moitiés de YFP formées n'ont pas une grande affinité l'une pour l'autre et donc aucune fluorescence n'est observable lorsqu'elles sont co-exprimées seules (Figure II.2.A). Pour tester l'interaction entre deux protéines d'intérêt, il faut donc les fusionner chacune à une moitié de fluorochrome YFP, co-exprimer les deux constructions obtenues dans les cellules et suivre l'intensité de la fluorescence. En effet, si et seulement si les deux protéines d'intérêt ont une affinité l'une pour l'autre, leur interaction va suffisamment rapprocher les deux moitiés de fluorochrome et ainsi permettre le phénomène de fluorescence (Figure II.2.B,C).

J'ai donc fusionné AtTCTP et AtCSN4 avec chacune une moitié de YFP. Les deux constructions ont été co-exprimées de manière transitoire dans des feuilles de tabac. Quel que soit le sens utilisé, on observe une reconstitution de la fluorescence au niveau de la membrane et du cytosol de l'épiderme des feuilles de tabacs des cellules où AtTCTP et AtCSN4 sont co-exprimées, mais pas quand elles sont seules (contrôles négatifs avec moitié de YFP seule) (Figure II.3.A).

Ainsi, ces différentes approches indiquent que AtTCTP et AtCSN4 interagissent physiquement *in planta*. De plus cette interaction est probablement localisée dans le cytosol des cellules, comme suggéré par les études de co-localisation réalisées avant mon arrivée dans l'équipe (Betsch et al., 2019).

B- Précisions sur le domaine d'interaction de AtTCTP

Un mutant de TCTP non fonctionnel : TCTP^{E12V}, a précédemment été décrit comme interférant avec la fonction de TCTP et notamment son effet sur la prolifération cellulaire (Brioude et al., 2010; Dong et al., 2009; Hsu et al., 2007). De ce fait, AtTCTP^{E12V} n'est pas fonctionnelle et ne complète pas le mutant *tctp* (Brioude, 2010). Mécaniquement, il a été proposé que la mutation E12V abolisse la fonction GEF de TCTP (Dong et al., 2009; Hsu et al., 2007), mais cela reste incertain comme d'autres études ont contredit ces résultats (Rehmann et al., 2008; Wang et al., 2008b).

J'ai vérifié si la mutation E12V dans TCTP interfère avec l'interaction, entre TCTP et CSN4, ce qui pourrait expliquer la non-fonctionnalité de AtTCTP^{E12V}. J'ai donc testé son interaction avec AtCSN4 par BiFC (Figure II.2.B). La présence d'un signal fluorescent quand AtTCTP^{E12V} et AtCSN4 sont co-exprimées, combinée à son absence dans chaque contrôle négatif (avec moitié de YFP seule), indique que AtCSN4 interagit avec cette forme mutée de AtTCTP. Ainsi, la mutation E12V dans AtTCTP n'empêche pas son interaction physique avec AtCSN4. L'interaction AtTCTP/AtCSN4 est conservée même dans ce contexte particulier où AtTCTP n'est pas fonctionnel. J'ai pu remarquer que AtTCTP^{E12V} est capable de se dimériser de la même façon que AtTCTP (Figure II.3.C), ce qui est cohérent avec le fait que la mutation ne touche pas le domaine de dimérisation (acides aminés 125 à 167, (Betsch et al., In press)).

C- Précisions sur le domaine d'interaction de AtCSN4

CSN4 est une protéine très conservée chez les eucaryotes (partie I.4.A, Figure II.4). Elle comporte notamment un domaine PCI qui permet son interaction avec les autres sous-unités du complexe CSN et qui est particulièrement bien conservé ((Dessau et al., 2008), Figure II.4).

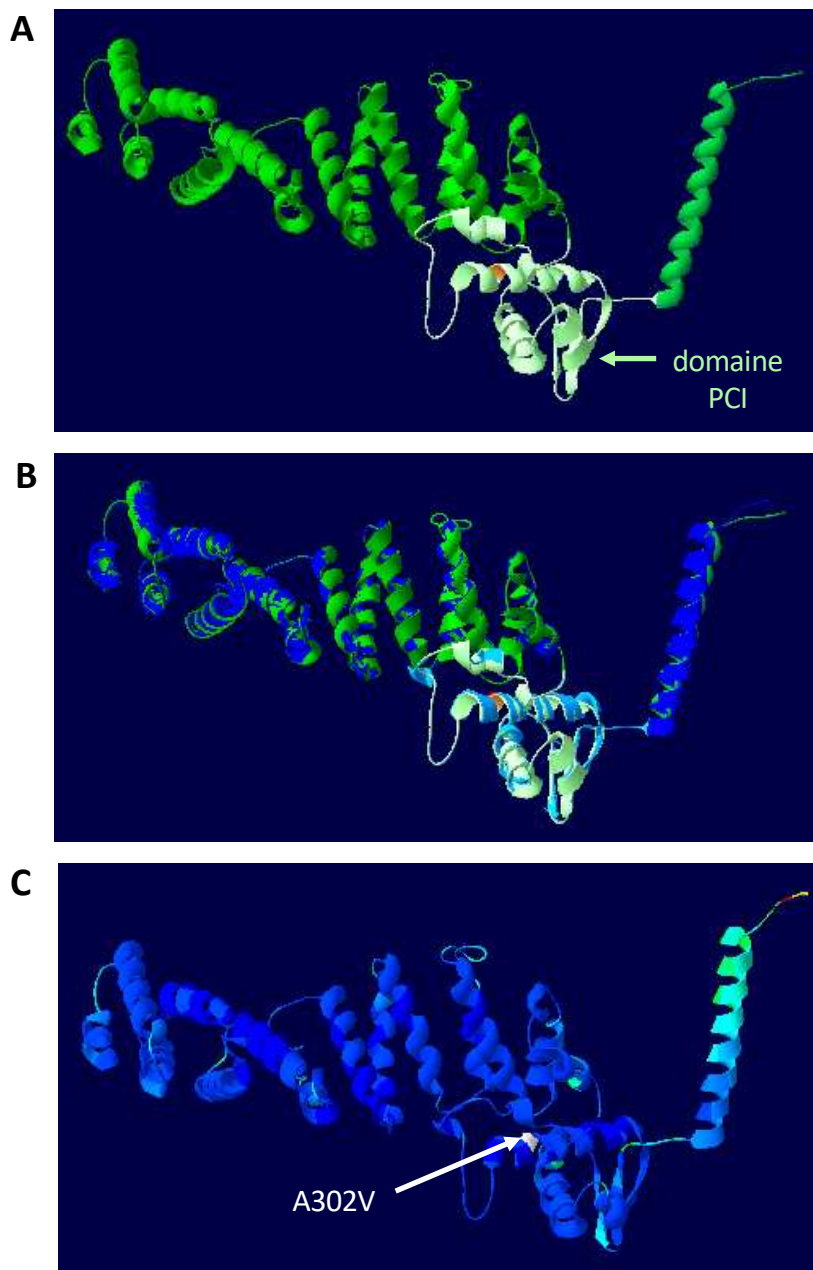


Figure II.5. La mutation *csn4-2035* n'entraîne pas de changement global majeur dans la conformation de la protéine.

Modèles structuraux des protéines AtCSN4 (vert) et Atcsn4-2035 (bleu) obtenus par le logiciel *I-TASSER* (Zhang 2009, Roy, Yang et Zhang 2012, Yang et Zhang, 2015) par comparaison avec la structure cristallographique de CSN4 humain (PDB_ 4D0P) et visualisés par le logiciel *Swiss-PdbViewer* (Guex et Peitsch, 1997). Les protéines sont représentées par leurs structures secondaires : hélices α (rubans), feuillet β (flèches) et boucles (lignes).

A. Modèle de AtCSN4 avec le domaine PCI en vert clair, l'alanine 302 en orange et le reste de la protéine en vert.

B. Superposition des modèles structuraux des protéines AtCSN4 (vert, voir A) et Atcsn4-2035 (bleu). Atcsn4-2035 est représentée avec le domaine PCI en bleu clair, la valine 302 en rouge et le reste de la protéine en bleu.

C. Modèle structural de Atcsn4-2035. Chaque acide aminé est coloré selon son RMSD (Déviation de la racine de la moyenne des carrées), *i.e.* selon sa distance à l'acide aminé correspondant de AtCSN4. La coloration se fait selon un dégradé avec le bleu foncé représentant une superposition parfaite et le rouge un éloignement important de la structure originale. La valine 302 est colorée arbitrairement en blanc pour être localisée mais sa valeur de RMSD correspond à du bleu foncé.

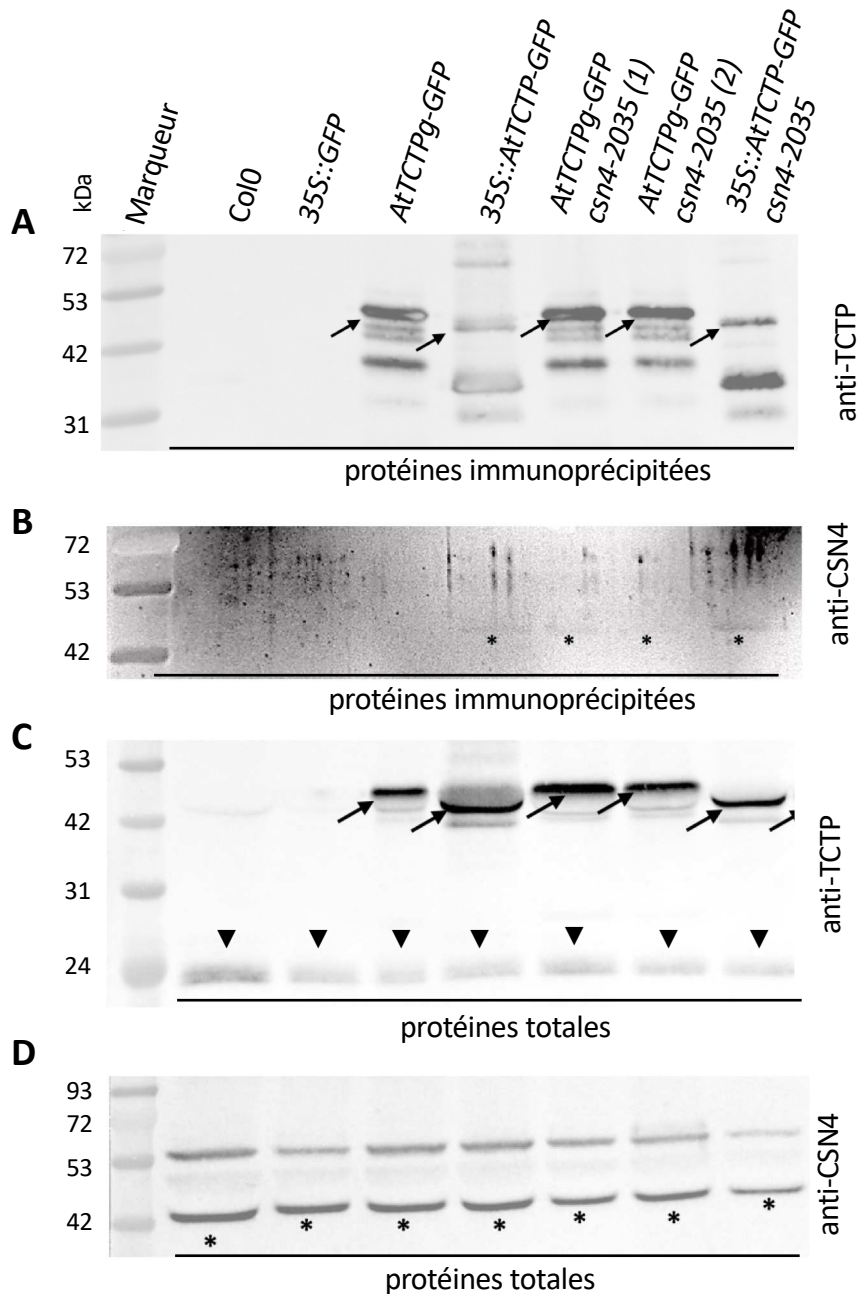


Figure II.6. AtTCTP et Atcsn4-2035 co-immunoprécipitent

Western blots réalisés sur les protéines immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP (A, B) ou sur les protéines totales (C, D) provenant de plantules des génotypes indiqués et révélés par un anticorps anti-TCTP (A, C) ou anti-CSN4 (B, D). Flèches : TCTP-GFP, triangles : TCTP, étoiles : CSN4

A. La présence d'une bande correspondant à TCTP-GFP (flèche) dans toutes les lignées où la construction est présente montre la réussite du protocole d'immunoprécipitation. Des bandes correspondant probablement à des formes tronquées sont également visibles.

B. La présence de bandes CSN4 (étoiles) dans tous les génotypes d'intérêt (à part *TCTPg-GFP*) montre que TCTP et *csn4-2035*, tout comme TCTP et CSN4, co-immunoprécipitent. L'absence de bande dans *TCTPg-GFP* peut probablement s'expliquer par une quantité moindre de matériel de départ.

C, D. TCTP endogène (C, triangles) et CSN4 (D, étoiles) sont bien présents dans toutes les lignées avant immunoprécipitation, de même que TCTP-GFP (C, flèches) dans les lignées où la construction est exprimée.

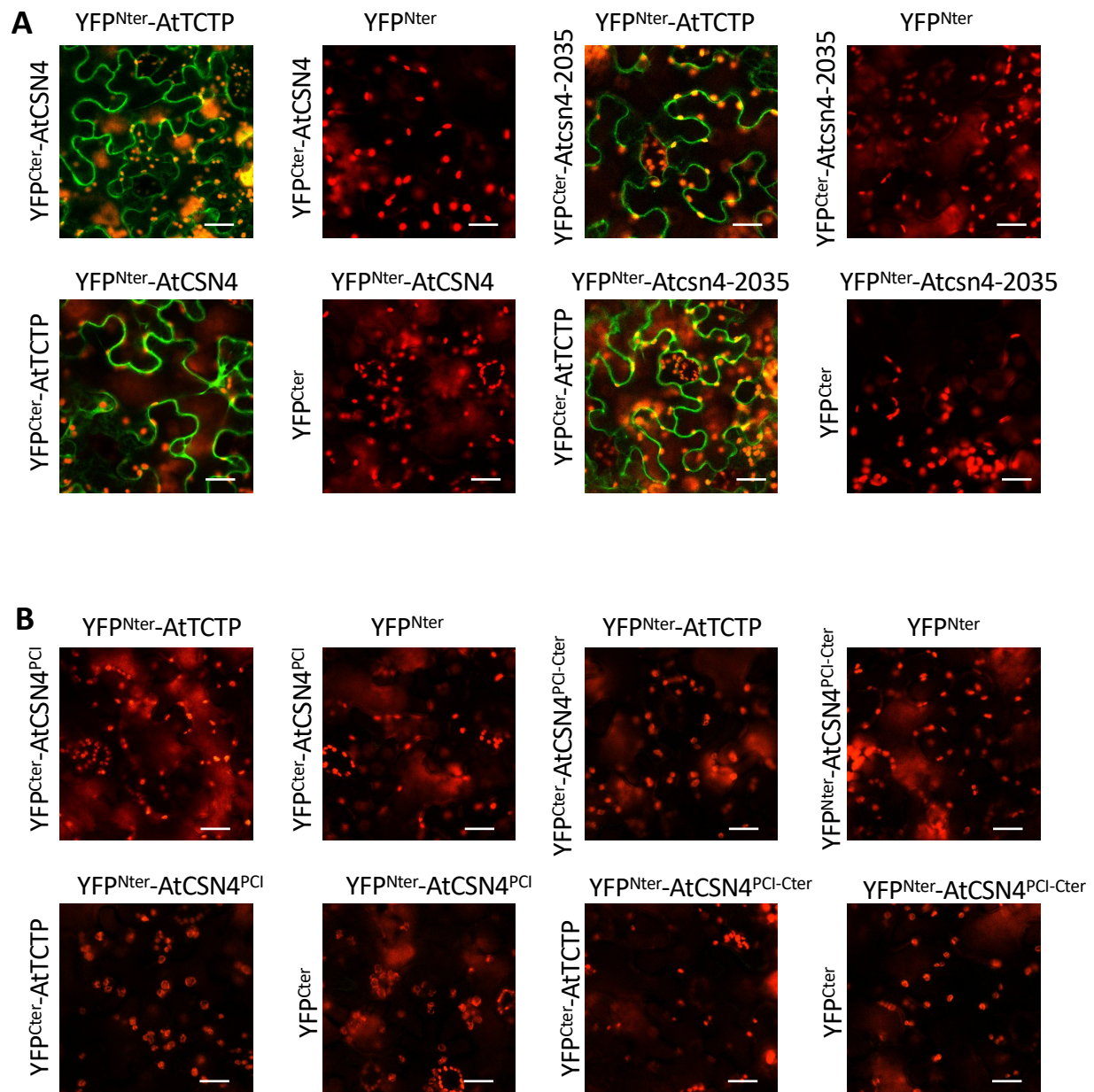


Figure II.7. AtCSN4 n'interagit pas avec AtTCTP par son domaine PCI

Test d'interaction par complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC). Les constructions génétiques conduisant à la fusion entre une protéine d'intérêt et le domaine N-terminal ou C-terminal de la YFP (notés YFP^{Nter} et YFP^{Cter}) ont été transformées transitoirement dans des feuilles de tabac. Les feuilles ont été observées au microscope confocal trois jours après transformation. Chaque combinaison a été observée dans 2 feuilles différentes lors de trois répétitions indépendantes. Une image représentative est montrée. Vert : YFP, Rouge : autofluorescence de la chlorophylle. Les contrôles négatifs pour AtTCTP co-transformé avec des moitiés de YFP seules est montré figure II.3. Barre d'échelle : 50 μ m

A. AtTCTP et Atcsn4-2025 interagissent.

B. AtTCTP n'interagit pas avec le domaine PCI et la partie C-terminale de AtCSN4.

Savoir si AtCSN4 interagit avec AtTCTP *via* son domaine PCI est crucial pour mieux caractériser le rôle et la spécificité de l'interaction AtTCTP/AtCSN4. J'ai pu m'appuyer sur un mutant allélique faible de *AtCSN4* : *Atcsn4-2035* ayant une mutation ponctuelle dans le domaine PCI en position 302 de la protéine, conduisant à l'échange d'une alanine très conservée chez les eucaryotes en valine ((Pacurar et al., 2017), Figure II.4). Plus précisément, une étude de conservation spécifique de la position lors de l'évolution (*position-specific evolutionary preservation*, (Tang and Thomas, 2016)) retraçant la présence de cette alanine dans les reconstructions des ancêtres directs de CSN4 montre qu'elle a été conservée sur 1629 millions d'années. Cependant, cette mutation met en jeu deux acides aminés proches (changement A->V) et ne semble pas avoir un effet majeur sur la structure de la protéine en général et du domaine PCI en particulier (Figure II.5). En effet, la prédiction des structures de deux protéines par le logiciel I-Tasser (Roy et al., 2012; Yang and Zhang, 2015; Zhang, 2009) et leur superposition grâce au logiciel Swiss-PdbViewer (Guex and Peitsch, 1997) ne montrent aucun changement majeur de structure (Figure II.5.B). Les hélices de domaine PCI sont entièrement superposables dans les deux modèles, seule l'hélice C-terminale pourrait présenter un léger changement comme le montre également le calcul pour chaque acide aminé de *csn4-2035* de sa distance à l'acide aminé correspondant de CSN4 par le RMSD (déviation de la racine de la moyenne des carrés) (Figure II.5.C). De plus, l'alignement global des deux structures peut être comparé de façon quantitative par le Tm-score, une métrique évaluant la similarité globale du repliement de deux protéines (Xu and Zhang, 2010; Zhang and Skolnick, 2004). Pour AtCSN4 et *Atcsn4-2035*, le Tm-score est de 0,9933 sachant qu'une valeur de 1 indique une identité parfaite. Les modélisations des deux structures sont donc presque identiques. Néanmoins, la mutation perturbe l'interaction de *Atcsn4-2035* avec le complexe CSN (Pacurar et al., 2017). Ainsi, la protéine *csn4-2035* possède une mutation qui, sans sembler changer de façon majeure la structure protéique, touche un acide aminé très conservé et impliqué dans l'interaction avec les autres sous-unités de CSN. *Atcsn4-2035* est donc un bon modèle pour étudier le rôle du domaine PCI dans l'interaction TCTP/CSN4.

Pour tester l'interaction entre AtTCTP et *Atcsn4-2035*, j'ai tout d'abord introgressé par croisement les constructions *AtTCTPg-GFP* et *35S::TCTP-GFP* dans les lignées *Atcsn4-2035* pour pouvoir mettre en place une approche de co-immunoprécipitation semblable à celle décrite précédemment (partie II.1.A). Ces co-immunoprécipitations ont été effectuées avec un stagiaire de L3 que j'encadrais (Thomas Duchateau, ENS de Lyon) sur des protéines provenant de plantules (Figure II.6). En immunoprécipitant TCTP-GFP, on peut révéler la présence de CSN4 par un anticorps spécifique anti-CSN4 dans toutes les lignées testées à l'exception des contrôles négatifs ne présentant pas TCTP-GFP (*Col0* et *35S::GFP*) et de la lignée *AtTCTPg-GFP* (Figure II.6.B). L'absence de bande dans cette condition peut probablement s'expliquer par une quantité moindre de protéines de départ, les plantules de cette lignée ayant mal germés. Ainsi, AtTCTP semble interagir avec *Atcsn4-2035*.

J'ai confirmé ce résultat de manière indépendante par BiFC (Figure II.7). En effet, on observe un signal fluorescent quand AtTCTP et *Atcsn4-2035* sont co-exprimées dans les cellules d'épiderme de tabac, mais dans aucun contrôle négatif (Figure II.7.A). Ces résultats montrent que AtTCTP est capable d'interagir avec *Atcsn4-2035* de manière similaire qu'avec CSN4. L'échange d'un acide aminé conservé dans le domaine PCI de CSN4 ne perturbe donc pas son interaction avec TCTP.

A

AtCSN8	
AtCSN7	
AtCSN1	1.....MERDEEASGPMMEMCTNGGEETSNNRRP I I SGEPLD I EAYAALYKGRTKIMRLLF I ANHCGG	61
AtCSN2	1 M ASDADMEDYGF EYSD EEEQEEQD VDI ENQYYNSKGMVETEPEEALSGFAEVVQMEPEKADWGF KAL KQTVKIYYRLG	77
AtCSN4	1 <u>L</u> <u>MDEALTNASAIGDQRQKI</u> <u>EQYKLILSSVLSNDLQAQRFIDHILSDDVPLVVSRLQSFQAEQLGR</u>	67
AtCSN3	1.....MIGAVNSVEAVITSIQGLSGSPEDLSALHDLLRGAQDSLRAEPGVNFSTLDQLD-ASKHSLGYYLFLVLT	70
AtCSN8	
AtCSN7	1.....MDIEQKQAEIIDQLVKKRAST	20
AtCSN1	62 NHALQFDALRMAYDEIKKGENTQLFREVVNKIGNRLGEKYGMDLAWCEAVDRRAEQKKVLENELSSYRTNLIKESI	138
AtCSN2	78 KYKEMMEAYTEMLTYIKSAVTRNYSEKINNIMDFVSGSASQNTGLLQEFYQTTLKALEEAKNERLWFKTNLKLGNL	154
AtCSN4	68 LEPETQKEIAQFTLTQIQPRVVSFEELQALVIREKLAGLYESEQEWSKA-AQ-MLSGJD-LDSQMRVDDNFKLSKC	140
AtCSN3	71 CGP-VSKEKAAYEIP I IARFINSCDAGQIRLASYKFVSLCKILKDHVIALGD-PLRGVPLLNAVQKLQVSSKRLTA	145
AtCSN8	1.....MDLSPVKEALAAKSFDKIA	19
AtCSN7	21 CKSEALGPLIEATSHPSLFAFSEILALPNVAQ....LEGTTDSVYLDLLRLFAHGTWGDYKCNATRLPHLSPDQIL	93
AtCSN1	139 RMGYNDFGDFYACGMLGDAFKNYIRTRDYCTTTKHIHMCNAILVSIEMGQFTHVTSYVNKAEQNPETL-EPMVN	214
AtCSN2	155 WFDIGEYRRMTKILKELHKSCQKEDGTDQKKGSGQLLEVYAJEIQIYETKDNKKLKQLYHKALAIKSAIPHRIM	230
AtCSN4	141 <u>QIARLYLED</u> DDAVNAEAFIN <u>KASFLVNSQNEVLNQYKVCYARILDMKRKFL</u> EAALRYG I <u>SDI</u> EQRQIGDEFID	217
AtCSN3	146 LHPDVLQLCLQAKSYKSGF S ILSDDIVEIDQPRDFFL-YSYGGMICIGLKRKQKALELLYNVVTAPMHQVNAIALE	221
AtCSN8	20 DICDTLMLQVASEGIEYHDDWPYAIHLLGYFYV...DDCDSARFLWKRIPTAIKERKPEVVAAWGIGQKLWTHDYAGV	94
AtCSN7	94 KLKQLTVLTLAASNKVLPHYDTLMVELDVSNVRELEDFLINECMYAGIVRGKLDQLKRCFVFPFAAGRDLRPGQLGNM	170
AtCSN1	215 AKLRCAAGLAHLELKKYKLAARKFLDVNPELGNVSYNEV IAPQDIATYGGLCALASFDRESELKQKVIDNINFRNLFEL	291
AtCSN2	231 <u>GJIRECGGKMMAERQWEEAATDFE</u> <u>EAFKNYDEAGNQRRLQQLKYLVL</u> ANMLMESEVNPFDGQEAAPYKNDPE	303
AtCSN4	218 <u>ENALEQALSAAVTCTLAGAGPQRSRLATLYK</u> ... <u>DERCSKLKLYPILOKVYLERILRRPEIDAFSEELRPHOKASL</u>	292
AtCSN3	222 <u>AYKKYILVSLIHNGQFTNTLPKCASTAAGRSEK</u> ... <u>NYTGPIELGNCYNDGKIGEL</u> ...EALVVARNAEFEEEDKNLGL	294
AtCSN8	95 YEAIRGYDWSQEAQDMVAAFSDLYTKRMFQLLLSAYSTITIHDLALFLGMTEDDATTYVENGWTVDAASQMASVKK	171
AtCSN7	171 LHTLSNWLNTSENLLISIQDKIKWADNMSEMDKKHRKEAEEGVEEVKKSLSMKGDVDIRGNKEMFGEPSGVMDYEEED	247
AtCSN1	292 VPDVRELINDFYSSRYASCLEYLASLKSLLLDIHLHDHVDTLVDQIRKKALIQYTLPFMSVDLSRMADAEKTSVSG	368
AtCSN2	304 <u>ILAMTNLAAAYQRNEIEFERILKSNRRTIMDDPFI</u> RNYMEDLLKKVTRQVLLKLIKPYTKIGIPFISKELNVPETD	380
AtCSN4	293 <u>PDKSTVLDRA</u> MI <u>IEHNLLSASKLYTNIRFDELGT</u> ... <u>LALDPPKAEKIAANMLGQDRMRGSDI</u> QFEFAV I <u>HFEDDVEE</u>	366
AtCSN3	295 <u>VKQAV</u> ... <u>SSLYKRNILRLTQKYLTL</u> SLQDIAN... <u>MVQLGNAKEAEMHVLQMIQDGGIHALINQKQGMVRFLEDPEQ</u>	366
AtCSN8	172 QAVKREQKVDSSKLQRLTEYVFHLEH.....	197
AtCSN7	248 GIRPKRRRHPVTR.....	260
AtCSN1	389 LEKELEALITDNOIQARIDSHNKILYARHADQRNATFQKVLQMGNEFDRDVRAMLLRANLLKHEYHARSARKL	441
AtCSN2	381 VTLLVSLILDSRIDGHIDEMNRYLRLGDSGNGRKLHKAVDKWNSQLKSLSSNITSRV.....	438
AtCSN4	367 <u>LQQWD</u> ... <u>QQJSGLQALNDILDQMAKKGMSPV</u>	397
AtCSN3	367 YKSSSEIEIMDSVIQRTIGLSKNLLAMDESLSCDPLY...LGKVGRRERQRYDFGDDFDTPVQKFSM.....	429

B

AtCSN5B	1 MEGSSSTIARKTWELENSILTVDSPDSTSDNIFYYDDTSQTRFQQEKPWENDPHYFKRVKISALALLKMVVH	72
AtCSN5A	1 MEGSSSAIARKTWELENNILPVEPTDSASDSIFHYDDASQAKIQQEKPWASDPNYFKRVHISALALLKMVVH	72
AtCSN6A	1.....MAPSSSSGLTFKLHPLVIVNISDHYTRVKT-QLNPPASICASGHGSSNGE	49
AtCSN6B	1.....MAPSSSSGLTFKLHPLVMLNISDHFTRVKT-QLNPPAASCATGNGSSNAD	49
AtCSN5B	73 ARSGGTIEIMGLMQGKTDGDTIIVMDAFALPVEGTETRVNAQDDAYEYMVVEYSQTNKLAGRLENVVGYWYSH	144
AtCSN5A	73 ARSGGTIEIMGLMQGKTEGDTIIVMDAFALPVEGTETRVNAQSDAYEYMVVEYSQTSKLAGRLENVVGYWYSH	144
AtCSN6A	50 AMFQQNPRVYGCIVIGVQRGRTVEIFNSFELLYDPSTQTLDRS.....FLEKKQELYKKVFPDFYILGWYST	115
AtCSN6B	50 AMLLQNPRVYGCIVIGLQRGRTVEIFNSFELIFDPALDTLDRS.....FLEKKQELYKKVFPDFYVVLGWYST	115
AtCSN5B	145 PGYGCWLSGIVSTQRLNQQHQEPFLAVVIDPRTVTSAGKVEIGAFRTYSKGYKPPDEPVSEYQTIPLNKIE	216
AtCSN5A	145 PGYGCWLSGIVSTQMLNQQYQEPFLAVVIDPRTVTSAGKVEIGAFRTYPEGHKISDDHVSEYQTIPLNKIE	216
AtCSN6A	116...GSDAEESDMHIHKALMDINESPVYVLLNPAINHATQKDLPVTIYESELHVIDGIPQLIFAHTSYTIEVTE	184
AtCSN6B	116...GSDATESDMHIHKALMDINESPVYVLLNPAINHAQKDLPVTIYESEFHVIDGIPQSIFVHTSYTIEVTE	184
AtCSN5B	217 DFGVHCKQYYSLDVITYFKSSLDSHLLDLLWNKYVWNTLSSPPLGNGDYVAGQISDLAEKLEQAESHVQSR	288
AtCSN5A	217 DFGVHCKQYYSLDITYFKSSLDSHLLDLLWNKYVWNTLSSPPLGNGDYVAGQISDLAEKLEQAESQLANSR	288
AtCSN6A	185 AERISVDHVAHLKPSDGGSAATQLAAHLTG I HSAIKMLNSRIRVLYQNLAAAMQKGD...KSCDNSVLRQVSSL	254
AtCSN6B	185 AERISVDHVAHLKPSDGGSAATQLAAHLTG I HSAIKMLNSRIRVLYQHIVAMQKGD...KPCENSVLRQVSSL	254
AtCSN5B	289 FGGVVPSSLHKKKKEDESQLTKITRDSAKITVEQVHGLMSQVIKDELFSMRQSNKSPSTDSSDPDPIMITY	358
AtCSN5A	289 YGGIAPAGHQRRKEDEPQLAKITRDSAKITVEQVHGLMSQVIKDLFNSARQSK-KSADSSDPPEMITY	357
AtCSN6A	255 LRRLL-PAMESERFQDNFLMEYNDKLLITYLAMITNCTSSNMNEMVDKFNATYDRNTRRGRTAFM.....	317
AtCSN6B	255 LRSLL-PAAESEKFNENFLMEYNDKLLMSYLAMITNCTSSNMNEVVDKFNATYDKHSRRRGRTAFM.....	317

Figure II.8. Etude de la conservation des différents CSN chez *A. thaliana*.

Alignements réalisés avec MultAlin (Corpet, 1988) et visualisés avec Jalview (Waterhouse et al., 2009).

A. Alignement des séquences des CSN possédant un domaine PCI qui est coloré en vert clair. CSN4 est encadrée de pointillés rouges. L'alanine mutée dans *csn4-2035* est colorée en rouge.

B. Alignement des séquences des CSN possédant un domaine MPN qui est coloré en vert. Les nucléotides pouvant lier des ions, présents uniquement chez CSN5, sont colorés en violet.

Cela suggère que le domaine PCI pourrait ne pas être indispensable à l'interaction TCTP/CSN4. Il est également possible que la mutation A302V soit trop minime pour perturber l'interaction TCTP/CSN4 de façon visible. Pour mieux comprendre par quel domaine AtCSN4 interagit avec AtTCTP, j'ai introduit des changements plus importants dans CSN4. Différentes parties de la protéine ont été délétées afin d'obtenir les formes tronquées suivantes : N-terminal (acides aminés 1 à 197, AtCSN4^{N-ter}), PCI (acides aminés 198 à 365, AtCSN4^{PCI}), PCI et C-terminal (198 à 397, AtCSN4^{PCI-Cter}) (Figure II.7.B). Ces protéines tronquées ont été exprimées dans le système de BiFC pour tester leur interaction avec TCTP. Je n'ai pas observé de signal fluorescent quand AtTCTP et AtCSN4^{PCI} ou AtCSN4^{PCI-Cter} sont exprimées conjointement, indiquant que ni le domaine PCI ni la fin C-terminale de AtCSN4 ne sont suffisantes pour permettre l'interaction avec AtTCTP (Figure II.7.B). Malheureusement, suite à des problèmes de clonage, je n'ai pas pu vérifier l'interaction entre AtTCTP et AtCSN4^{N-ter}, mais à la vue des résultats précédents, deux possibilités sont envisageables. Premièrement, si AtTCTP interagirait avec AtCSN4^{N-ter} alors l'interaction TCTP/CSN4 implique la partie N-ter de CSN4. Deuxièmement, si AtTCTP n'interagit pas avec AtCSN4^{N-ter}, alors probablement la conformation globale de AtCSN4 est nécessaire à son interaction avec AtTCTP.

Ainsi, deux approches différentes : co-immunoprécipitation et BiFC, montrent que AtTCTP n'interagit pas avec AtCSN4 par le domaine PCI de cette dernière. Ces résultats laissent envisager plusieurs hypothèses : AtTCTP pourrait séquestrer AtCSN4 en dehors du complexe CSN par un autre domaine que le domaine PCI ou l'interaction AtTCTP/AtCSN4 pourrait se faire au sein de tout ou partie du complexe CSN. Ces données ne permettent donc pas de progresser quant à l'implication du complexe CSN dans l'interaction AtTCTP/AtCSN4. Pour pouvoir avancer sur cette question, j'ai ensuite testé l'interaction des autres sous-unités de CSN avec AtTCTP.

D- Lien de l'interaction AtTCTP/ATCSN4 avec le complexe CSN

Comme détaillé dans l'introduction (partie I.4.A), CSN4 fait partie de complexe CSN composé de 8 sous-unités. Pour étudier la spécificité de l'interaction AtTCTP/AtCSN4, j'ai cherché à évaluer l'interaction entre AtTCTP et les autres sous-unités de CSN chez *A. thaliana*. Les protéines AtCSN 1, 2, 3, 4, 7 et 8 possèdent toutes un domaine PCI. Ces différentes sous-unités ont considérablement divergé entre elles (Figure II.8.A). Le domaine PCI reste la partie la plus conservée de ces protéines. Au contraire, les protéines AtCSN 5A, 5B, 6A et 6B possédant en commun un domaine MPN ont moins divergé (Figure II.8.B). Une différence notoire est la présence de nucléotides pouvant lier des ions uniquement dans les domaines MPN des protéines CSN5 et pas CSN6. Cela explique que seuls les domaines MPN des AtCSN5 soient catalytiquement fonctionnels (partie I.4.A, (Cope et al., 2002)). J'ai pu cloner dans les vecteurs de BiFC les sous-unités 1, 2, 3, 5A, 6A, 6B et 7. Après co-expression avec AtTCTP dans l'épiderme des feuilles de tabacs, j'ai observé la présence ou non de fluorescence indiquant une interaction (Figure II.9). De façon claire, AtTCTP n'interagit pas avec AtCSN2, AtCSN3, AtCSN6B et AtCSN7 (Figure II.9.B,C,G,H). Pour AtCSN7, j'ai pu remarquer un signal constitutif au sein des noyaux quand AtCSN7 est fusionné avec une moitié de YFP (Figure II.9.H). Comme ce signal est présent en intensité similaire dans les contrôles où aucune fluorescence n'est attendue (moitié de YFP seule), AtTCTP et ATCSN7 ne doivent pas interagir.

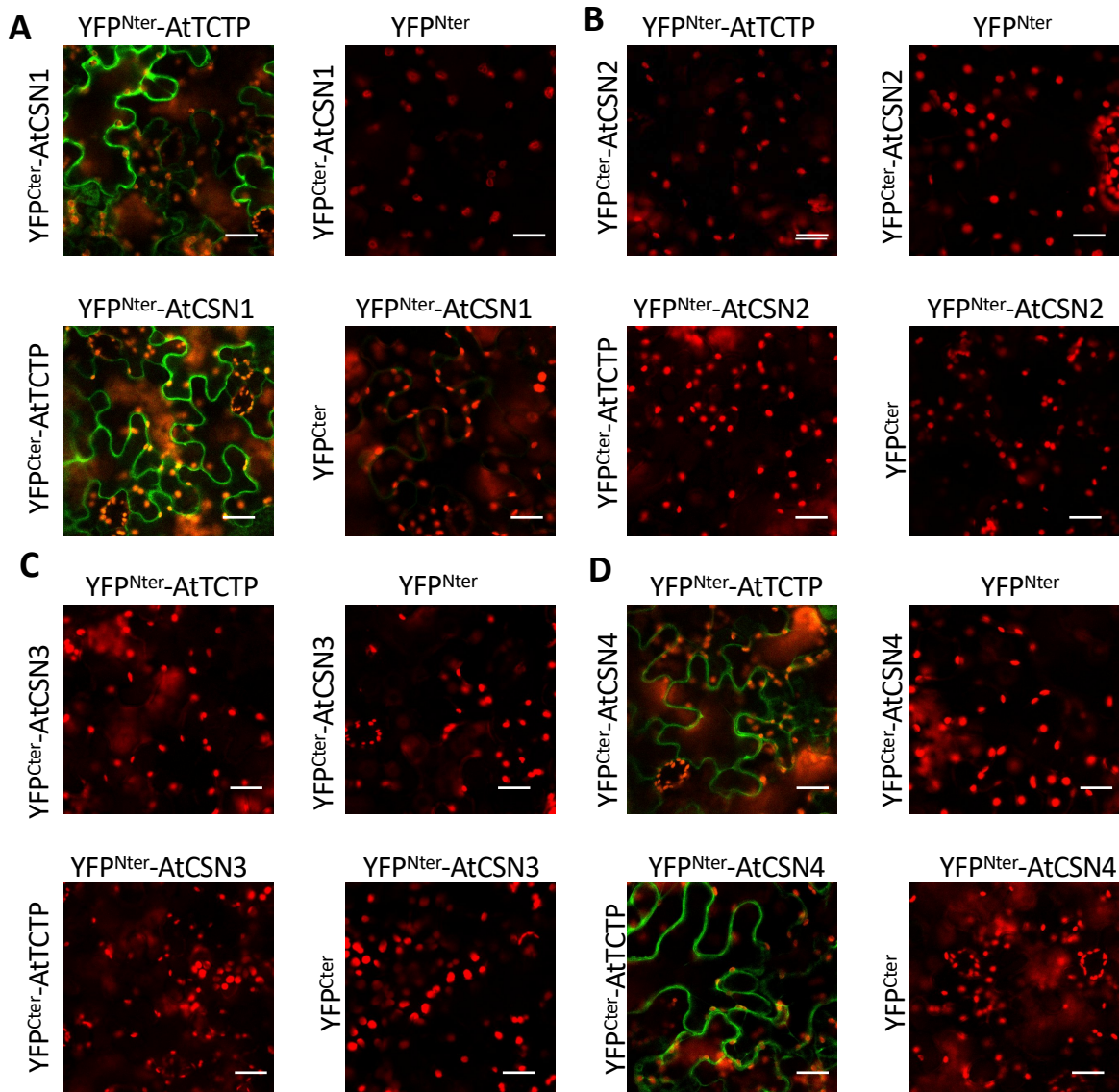


Figure II.9.(A-D). AtTCTP interagit avec AtCSN 1 et 4 mais pas avec AtCSN 2 et 3.

Test d'interaction par complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC). Les constructions génétiques conduisant à la fusion entre une protéine d'intérêt et le domaine N-terminal ou C-terminal de la YFP (notés YFP^{Nter} et YFP^{Cter}) ont été transformées transitoirement dans des feuilles de tabac. Les feuilles ont été observées au microscope confocal trois jours après transformation. Chaque combinaison a été observée *a minima* dans 2 feuilles différentes lors de trois répétitions indépendantes. Une image représentative est montrée. Vert : YFP, Rouge : autofluorescence de la chlorophylle. Barre d'échelle : 50 μ m

- A. AtTCTP et AtCSN1 interagissent.
- B. AtTCTP et AtCSN2 n'interagissent pas
- C. AtTCTP et AtCSN3 n'interagissent pas
- D. AtTCTP et AtCSN4 interagissent

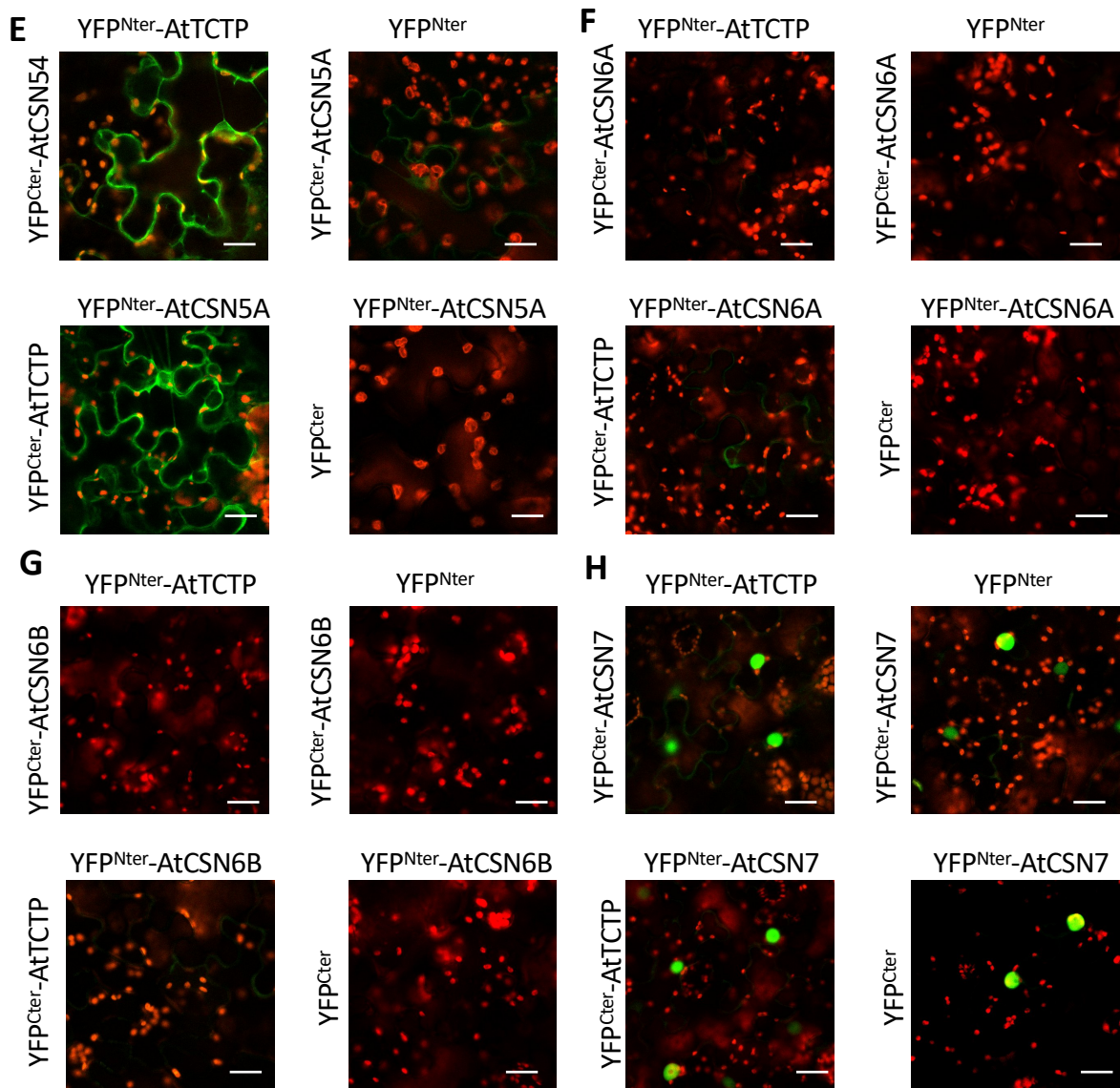


Figure II.9.(E-H). AtTCTP interagit avec AtCSN 5A mais pas avec AtCSN 6A, 6B et 7.

Test d'interaction par complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC). Les constructions génétiques conduisant à la fusion entre une protéine d'intérêt et le domaine N-terminal ou C-terminal de la YFP (notés YFP^{Nter} et YFP^{Cter}) ont été transformées transitoirement dans des feuilles de tabac. Les feuilles ont été observées au microscope confocal trois jours après transformation. Chaque combinaison a été observée *a minima* dans 2 feuilles différentes lors de trois répétitions indépendantes. Une image représentative est montrée. Vert : YFP, Rouge : autofluorescence de la chlorophylle. Barre d'échelle : 50 μm

E. AtTCTP et AtCSN5A interagissent.

F. AtTCTP et AtCSN6A n'interagissent pas

G. AtTCTP et AtCSN6B n'interagissent pas

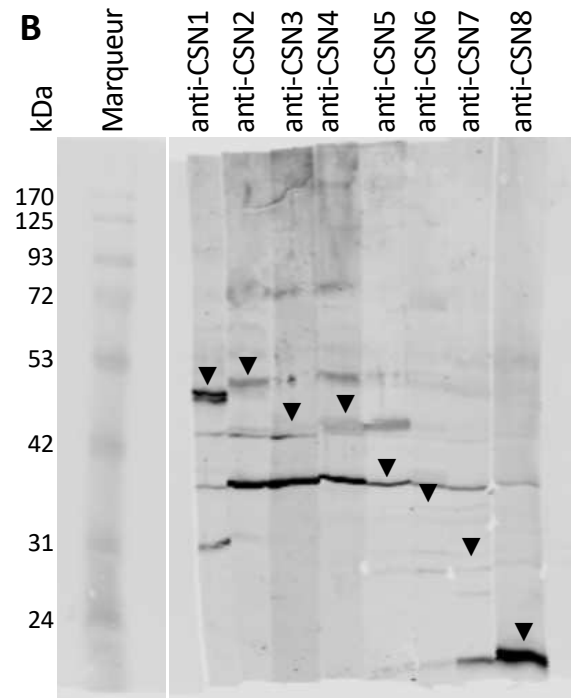
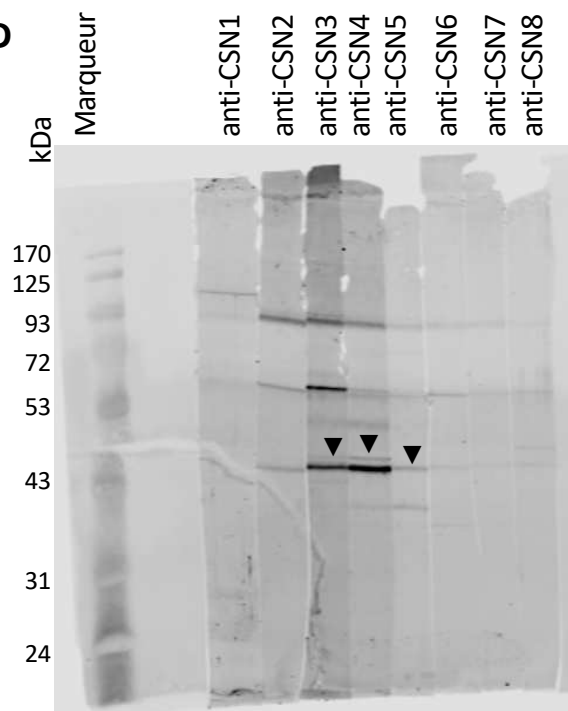
H. AtTCTP et AtCSN7 n'interagissent pas

A

Sous-unité	Taille attendue (kDa)
CSN1	55,5
CSN2	51,6
CSN3	47,9
CSN4	46,3
CSN5	37,6
CSN6	36,2
CSN7	30,3/29,6
CSN8	23,2

C

Sous-unité	Taille attendue (kDa)
CSN1	50,6
CSN2	51,2
CSN3	47,7
CSN4	44,5
CSN5	39,7/40,3
CSN6	35,7/35,4
CSN7	29,5
CSN8	22,5

B**D****Figure II.10. Spécificité des anticorps anti-CSN.**

A, C. tailles attendues pour chaque sous-unité de CSN chez l'homme (A) et chez *A. thaliana* (C). La présence de deux valeurs correspond à l'existence de deux isoformes.

B, D. *Western blots* réalisées à partir de protéines totales extraites de cellules humaines (B) ou d'*A. thaliana* (D). La membrane a été coupée en 8 bandelettes révélées chacune avec un anticorps spécifique d'une sous-unité de CSN. Les triangles indiquent la présence d'une bande autour de la taille attendue.

Malgré son caractère non spécifique, ce signal nucléaire est quand même intéressant car il a été démontré que dCSN7 peut lier l'ADN et peut probablement agir comme facteur de transcription (Singer et al., 2014). On peut ainsi supposer que AtCSN7 a lui aussi un rôle fonctionnel au sein du noyau. Par ailleurs, AtTCTP ne semble pas non plus interagir avec AtCSN6A même si un signal très faible et épars a pu être parfois observé (Figure II.9.F). Enfin, AtTCTP interagit non seulement avec AtCSN4 mais aussi avec AtCSN5A et de façon moins forte avec AtCSN1 (Figure II.9.A,D,E). Donc AtTCTP n'interagit pas avec l'ensemble des CSN mais spécifiquement avec certaines sous-unités. Cela est cohérent avec la diversité de séquence entre les différents CSN d'*A. thaliana* (Figure II.8). En effet, la partie la plus conservée correspond au domaine PCI qui ne semble pas être impliqué, au moins dans le cas de CSN4, dans l'interaction avec TCTP. Cependant, la capacité d'interagir avec TCTP ne semble pas être restreinte à AtCSN4, mais étendue aussi *a minima* à AtCSN1 et AtCSN5A, ce qui laisse supposer que l'interaction pourrait se faire au sein d'un sous-complexe CSN.

Pour confirmer ces données, j'ai voulu évaluer l'interaction *in planta* de AtTCTP et des AtCSN. Des anticorps spécifiques commerciaux disponibles pour les sous-unités CSN, ont été décrits comme reconnaissant les protéines humaines, excepté CSN1 et CSN8 qui reconnaissent en plus les protéines de porc, de souris et de grenouille, CSN4 qui reconnaît en plus les protéines d'*A. thaliana* et de chou-fleur et CSN5 reconnaît les protéines d'*A. thaliana* et de chou-fleur uniquement. J'ai tout d'abord testé ces différents anticorps sur des protéines extraites de cellules humaines. Pour chaque anticorps, j'ai pu observer des bandes correspondant à la taille attendue (Figure II.10.A,B). Cependant, dans de nombreux cas, ces bandes sont peu spécifiques. Ainsi, par exemple, la bande sortant à la taille attendue pour CSN5 semble être présente quel que soit l'anticorps utilisé. Il est donc difficile de pouvoir assigner une bande à un CSN spécifique, d'autant plus dans le cas de CSN3 et CSN4 par exemple dont les tailles attendues, respectivement 47,9 et 46,3 kDa, sont très proches.

Du fait de l'important niveau de conservation des CSN chez les eucaryotes, j'ai également testé ces anticorps chez *A. thaliana* (Figure II.10.D). Seuls les anticorps anti-CSN4 et -CSN5 présentent une bande correspondant à la taille attendue. Avec l'anticorps anti-CSN3, plusieurs bandes de forte intensité sont observables. Une de ces bandes correspond à la taille attendue de 47,7 kDa, mais sa spécificité n'a pas été vérifiée plus précisément. J'en ai conclu que seuls les anticorps dirigés contre AtCSN4 et AtCSN5 sont spécifiques, et ai seulement utilisé ces anticorps dans les études qui suivent.

Par co-immunoprécipitation, la présence de AtCSN4 mais pas de AtCSN5 peut être révélée par l'anticorps spécifique dans les protéines immunoprécipitées avec AtTCTP-GFP (Figure II.11.A). Ce résultat paraît contradictoire avec le fait que AtTCTP puisse interagir avec AtCSN5A par BiFC. En outre, en utilisant des lignées d'*A. thaliana* perte de fonction (ko) pour *tctp* complétées par *35S::dTCTP-GFP* (Brioudes et al., 2010), j'ai démontré que AtCSN5 est co-immunoprécipité avec dTCTP-GFP (Figure II.11.B). Cette différence n'est pas évidente à comprendre mais on peut supposer qu'elle révèle, tout comme l'approche de BiFC, une affinité entre TCTP et CSN5. Cependant, cette affinité ne conduit pas toujours à une interaction, notamment dans le cas physiologique des plantules d'*A. thaliana*. Des études complémentaires seraient nécessaires pour comprendre si dTCTP et dCSN5 interagissent en conditions physiologiques chez *D. melanogaster*.

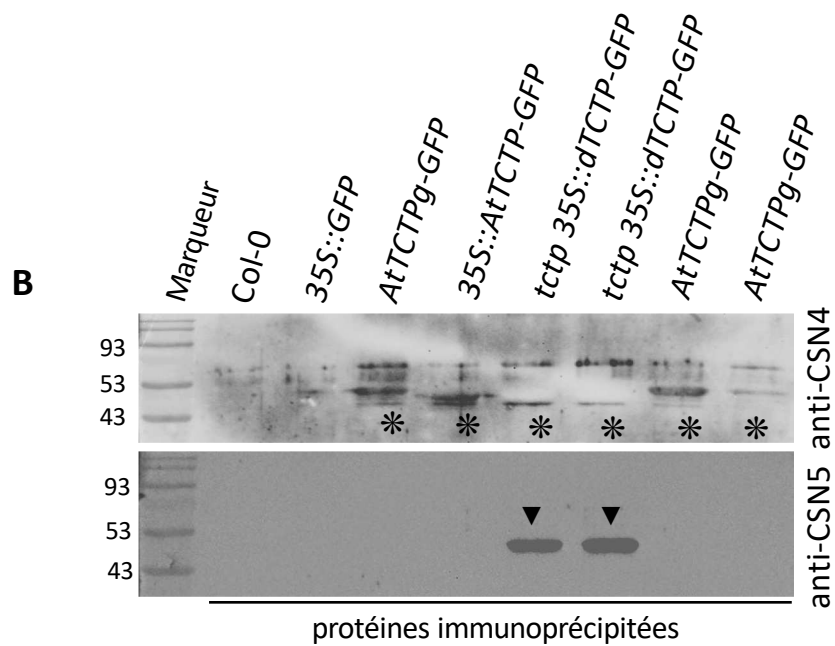
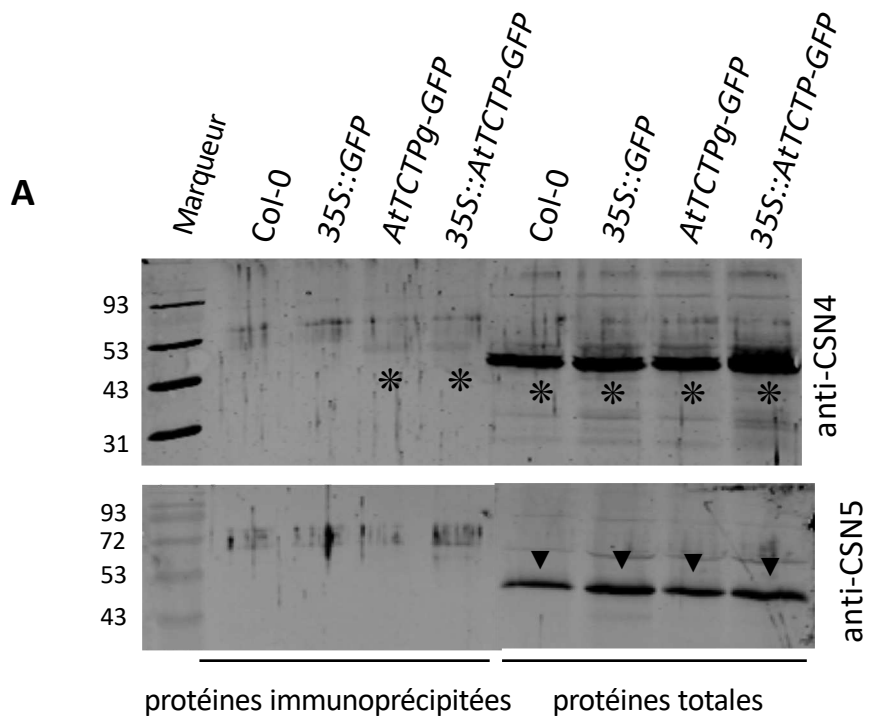


Figure II.11. AtCSN5 co-immunoprécipite avec dTCTP mais pas AtTCTP
 Western blots réalisés à partir de protéines totales (A) ou de protéines immunoprécipitées avec un anticorps anti-GFP (A, B) provenant de graines vertes (A) et de plantules (B) des différents génotypes indiqués et révélés avec des anticorps anti-CSN4 et -CSN5 (A,B). Etoiles : CSN4, triangles : CSN5.

- A.** AtCSN5 ne co-immunoprécipite pas avec AtTCTP contrairement à AtCSN4.
B. AtCSN5 co-immunoprécipite avec dTCTP.

Ainsi, l'absence d'interaction *in planta* entre AtTCTP et AtCSN5, sous-unité catalytique du complexe CSN, montre que AtTCTP et AtCSN4 n'interagissent pas au sein du complexe CSN entier et fonctionnel enzymatiquement. Elle n'exclue pas que l'interaction physiologique concerne d'autres sous-unités comme AtCSN1.

E- Discussion et perspectives

J'ai dans un premier temps montré que AtTCTP interagit physiquement avec AtCSN4 (Figure II.11.A). Or CSN4 fait partie d'un complexe de 8 sous-unités : le complexe CSN, connu notamment pour déneddyliser les CUL (partie I.3.C). Immédiatement se pose donc la question de savoir si l'interaction entre AtTCTP et AtCSN4 fait intervenir tout le complexe CSN ou au contraire si cette interaction est exclusive. Pour répondre à cette question, ma première démarche a été d'étudier l'implication du domaine PCI de AtCSN4 dans son interaction avec AtTCTP. Comme le domaine PCI permet l'interaction de CSN4 avec les autres CSN, une interaction avec AtTCTP *via* le domaine de PCI de AtCSN4 favoriserait l'hypothèse selon laquelle AtTCTP empêche CSN4 de se lier aux autres CSN. L'interaction AtTCTP/AtCSN4 conduirait ainsi à une perturbation de l'activité CSN et du patron de neddylation des CUL *via* séquestration de CSN4 hors du complexe CSN.

Pour tester cette hypothèse, deux approches différentes ont été utilisées : étude de l'interaction de AtTCTP avec la forme mutée *Atcsn4-2035* (Pacurar et al., 2017) par co-immunoprécipitation (Figure II.6) et BiFC (Figure II.7.A) et avec des formes tronquées de AtCSN4 par BiFC (Figure II.7.B). Tous les résultats concordent pour indiquer que AtTCTP et AtCSN4 n'interagissent pas par le domaine PCI de cette dernière. Ces résultats ne sont donc en aucun cas conclusifs sur l'implication du complexe CSN dans l'interaction AtTCTP/AtCSN4. De plus, ils fournissent un nouveau modèle d'étude intéressant avec le mutant *csn4-3035*. En effet la comparaison de ce mutant, où la formation du complexe CSN est perturbée et l'interaction AtTCTP/AtCSN4 est conservée, avec un mutant perte de fonction classique pourra aider à différencier les rôles de AtCSN4 en association avec le complexe CSN ou avec AtTCTP.

Ma deuxième démarche pour étudier si l'interaction AtTCTP/AtCSN4 se fait ou non au sein du complexe CSN a été d'étudier l'interaction entre AtTCTP et les différentes sous-unités CSN. J'ai démontré par BiFC que AtTCTP interagit avec AtCSN 1, 4 et 5A mais pas avec AtCSN 2, 3, 6A, 6B et 7 (Figure II.8). Dû à des difficultés de clonage, je n'ai pas pu tester l'interaction avec CSN 5B et 8. Ces résultats montrent qu'il semble y avoir une spécificité d'interaction entre AtTCTP et uniquement certains CSN dont CSN4. Ainsi, AtTCTP n'a pas d'affinité pour tous les CSN. Néanmoins, ces données ne suffisent pas pour conclure sur l'implication d'autres sous-unités CSN dans l'interaction AtTCTP/AtCSN4.

J'ai ensuite voulu étudier ces interactions *in planta*. Malheureusement, je n'ai pas pu me procurer des anticorps spécifiques de chaque sous-unité CSN. Des anticorps ont été créés contre les protéines CSN humaines mais, malgré le fort taux de conservation des CSN (voir Figure II.4 pour CSN4), je n'ai pu détecter les CSN d'*A. thaliana* que dans les cas de AtCSN4 et AtCSN5 et pas pour les autres sous-unités (Figure II.10.B). Je n'ai donc pu mettre en place une approche de co-immunoprécipitation *in planta* que pour AtCSN5 en plus de AtCSN4. L'anticorps utilisé est un anticorps qui reconnaît les deux formes AtCSN5A et 5B. Que ce soit dans les plantules ou les graines, AtCSN5 ne co-immunoprécipite pas avec AtTCTP contrairement à AtCSN4 (Figure II.11). Ce résultat indique qu'*in planta* AtCSN5 n'appartient

pas au complexe contenant AtTCTP et AtCSN4 et est en claire contradiction avec le résultat de BiFC présentant une interaction entre AtTCTP et AtCSN5A. Cependant ces différences ne sont pas totalement incompatibles.

En effet, dans la situation de BiFC, les deux protéines sont exprimées en grande quantité dans un contexte non physiologique. Il est donc possible que des affinités entre deux protéines soient révélées comme interaction même si ces protéines n'interagissent pas en situation physiologique. Ici notre situation de co-immunoprécipitation est beaucoup plus proche de la situation physiologique : seul *TCTP* est légèrement (lorsque sous son propre promoteur) ou fortement (lorsque sous *35S*) surexprimé, alors que *CSN5* est uniquement endogène. Comme dans les mêmes conditions de co-immunoprécipitation, AtCSN4, mais pas AtCSN5, co-immunoprécipite avec AtTCTP, il est certain que AtCSN5 n'appartient pas au complexe AtTCTP/AtCSN4. Comme CSN5 est la sous-unité catalytique de CSN, l'interaction AtTCTP/AtCSN4 ne peut pas se faire au sein d'un complexe CSN fonctionnel. Cependant, il est possible qu'il existe des complexes AtTCTP/AtCSN5 en très faible quantité ou très dynamiques et dont l'existence ne peut donc pas être mise en évidence par co-immunoprécipitation. Cela est d'autant plus possible que AtTCTP et AtCSN5A ont une affinité l'une envers l'autre, comme le montre leur interaction en BiFC. Ainsi, ces expériences ne permettent pas de trancher définitivement sur une potentielle interaction entre AtTCTP et AtCSN5 : celle-ci pourrait exister mais de façon transitoire et/ou en faible quantité.

Par ailleurs, je n'ai pu mettre en place la même approche de co-immunoprécipitation pour les autres sous-unités à cause de l'absence d'anticorps spécifiques. L'interaction AtTCTP/AtCSN4 pourrait donc se faire au sein d'un sous-complexe CSN ne contenant pas AtCSN5 et donc enzymatiquement inactif. L'existence de tels sous-complexes a longtemps été débattue dans la communauté comme l'expression de sous-unités de CSN, coordonnée par des miARN de la famille *let-7*, conduit à l'assemblage du complexe CSN (Leppert et al., 2011). Ainsi l'existence de sous-complexes n'est possible que si ce système de régulation est compromis ou si des complexes sont détruits. Des sous-complexes CSN1/2/3/8 et CSN4/5/6/7 ont été obtenus *in vitro* par spectrométrie de masse à partir de CSN recombinant humain (Sharon et al., 2009) mais n'ont jamais été observés *in vivo*.

Chez les plantes, l'étude d'un mutant faible de CSN3 a montré l'existence de sous-complexes contenant CSN3 et ayant une fonction différente du complexe CSN dans la signalisation auxinique indépendante de la neddylation des CUL ((Huang et al., 2013), Figure I.15.D). Ces sous-complexes ne contiennent pas CSN 1, 4, 5 et 8. À cause d'une absence d'anticorps, les auteurs n'ont pas pu étudier la présence de CSN 2, 6 et 7 dans ces sous-complexes mais elle semble relativement improbable à la vue de la topologie du complexe CSN. Il existerait donc des complexes contenant uniquement CSN3 et d'autres protéines n'appartenant à CSN. Par ailleurs, l'interprétation de gradients glycérol, de *pull-down* et de surexpression de sous-unités ont mené à postuler l'existence de sous-complexes CSN4-8 (Dubiel et al., 2015). L'existence de ce sous-complexe a été retrouvé dans le cytoplasme de fibroblastes de souris et joue un rôle dans la régulation du CKI p27 (Tomoda et al., 2002). Ainsi, CSN4 semble pouvoir prendre part à des sous-complexes chez les animaux. Cela pourrait être le cas dans le cas de l'interaction TCTP/CSN4 chez *A. thaliana* même si un complexe différent serait mis en jeu comme CSN5 n'y participe *a priori* pas.

Ainsi plusieurs questions se posent face aux interactants de TCTP/CSN4. La première est l'implication des autres CSN que je n'ai pas pu définitivement trancher lors de ma thèse. Grâce à un anticorps spécifique, j'ai pu établir que CSN5 ne participe probablement pas à l'interaction TCTP/CSN4. L'absence d'anticorps spécifique pour les autres sous-unités pourra dans la suite être dépassée en exprimant chaque sous-unité fusionnée à un tag sous le contrôle de son propre promoteur. Il sera donc possible de réaliser des immunoprécipitations avec des anticorps anti-tag dans des conditions proches des conditions physiologiques. Cette approche demande un important effort de clonage et de transformation. Elle pourra être mise en place, dans un premier temps, pour AtCSN1 qui possède une affinité en BiFC avec AtTCTP (Figure II.9.A).

Alternativement, il est possible de tirer profit de l'existence de mutants faibles de différentes sous-unités de CSN ayant des phénotypes de gravité différente et un effet plus ou moins drastique sur l'activité enzymatique de CSN. Il existe chez *A. thaliana* : *csn1-10*, *csn2-5*, *csn3-3*, *csn5a-1*, *csn5a-2*, *csn5b-1*, *csn6a-1* et *csn6b-1* ((Singh and Chamovitz, 2019), Annexe 3). Ces mutants représentent autant de contextes différents permettant d'étudier l'influence de telle ou telle sous-unité sur l'interaction AtTCTP/AtCSN4. En effet, en introgressant *TCTPg-GFP* et *35S::TCTP-GFP* dans ces lignées, il sera possible de vérifier par co-immunoprécipitation si l'interaction entre AtTCTP et AtCSN4 reste intacte lorsqu'une sous-unité précise de CSN est modifiée. Cela permettra d'identifier des sous-unités de CSN indispensables à la formation du complexe AtTCTP/AtCSN4. Ces lignées sont en cours d'établissement.

Enfin, il est important de souligner qu'il est possible, que similairement aux sous-complexes CSN3 (Huang et al., 2013), le complexe TCTP/CSN4 ne contienne aucun autre CSN. Il est toutefois probable qu'il contienne *a minima* quelques autres protéines comme, mis à part CSN5, les CSN isolés ne sont pas stables (Dubiel et al., 2015).

Un autre élément important concerne l'étude du mutant de AtTCTP, AtTCTP^{E12V}. En effet, AtTCTP^{E12V} n'est pas fonctionnelle comme elle ne complémente pas les mutants *tctp* (Brioude et al., 2010) mais elle interagit toujours avec AtCSN4 (Figure II.3.B). Or, une des hypothèses d'action du complexe AtTCTP/AtCSN4 serait que AtTCTP séquestre AtCSN4 en dehors du complexe CSN, perturbant ainsi l'activité de celui-ci. Cette hypothèse a notamment été formulée car les mutants *tctp* possèdent des CUL1 hyperneddylées (Betsch et al., 2019). Cependant, si la fonction principale de AtTCTP était de séquestrer AtCSN4, alors la capacité d'interagir avec AtCSN4 serait suffisante pour que AtTCTP soit fonctionnelle. Comme AtTCTP^{E12V} est à la fois non-fonctionnelle et capable d'interagir avec AtCSN4, cette hypothèse est invalidée. Mon étude suggère fortement que la fonction principale de AtTCTP n'est pas de séquestrer physiquement AtCSN4 pour bloquer l'activité de déneddylation des CUL. Cela ne veut pas dire que AtTCTP ne séquestre pas AtCSN4 mais seulement que cette potentielle séquestration n'est pas suffisante pour expliquer toutes les fonctions d'AtTCTP *in planta*. Il existerait donc des événements post-interaction TCTP/CSN4 cruciaux pour la fonction de AtTCTP et auxquels la non-fonctionnalité de AtTCTP^{E12V} serait liée.

Pour valider totalement ce modèle, il faudrait quantifier les interactions AtTCTP/AtCSN4 et AtTCTP^{E12V}/AtCSN4 qui semblent comparables en BiFC, bien qu'aucune quantification précise ne soit possible dans ce système. En effet, si l'interaction AtTCTP^{E12V}/AtCSN4 est nettement moins forte que celle AtTCTP/AtCSN4, il serait possible

que suffisamment de protéines CSN4 soient en dehors de l'interaction et donc libres d'intégrer le complexe CSN, revalidant le modèle de séquestration. Une telle quantification serait possible en mettant en place un système de transfert d'énergie entre molécules fluorescentes (FRET). De plus, il serait intéressant de confirmer ces résultats *in vivo* en testant l'interaction entre AtTCTP^{E12V}-GFP et AtCSN4 par co-immunoprécipitation. Un autre élément pourrait être apporté en étudiant le niveau de neddylation de CUL1 de plantes *tctp pTCTP::TCTP^{E12V}* obtenues par sauvetage embryonnaire. Ces données permettraient de localiser l'étape pour laquelle AtTCTP^{E12V} n'est pas fonctionnelle en amont ou aval de la régulation de la neddylation de CUL1 sur la voie reliant TCTP à ces effets sur la progression du cycle cellulaire.

En outre, il serait intéressant d'étudier également le domaine d'interaction de AtTCTP avec AtCSN4 en tronquant les différents domaines de AtTCTP (Betsch et al., In press) et testant leur interaction avec AtCSN4 par BiFC. Il serait particulièrement instructif d'étudier les capacités d'interaction du domaine basique de AtTCTP qui est connu chez les animaux comme interface de nombreuses interactions (Betsch et al., In press). Cependant, une étude de modélisation de l'interaction AtTCTP/AtCSN4 prédit que celle-ci se ferait plutôt par la boucle flexible contenant le domaine *TCTP1* ou les feuillettes β situés vers l'extrémité C-terminale (Léo Betsch 2017), ce qui laisse la question encore très ouverte.

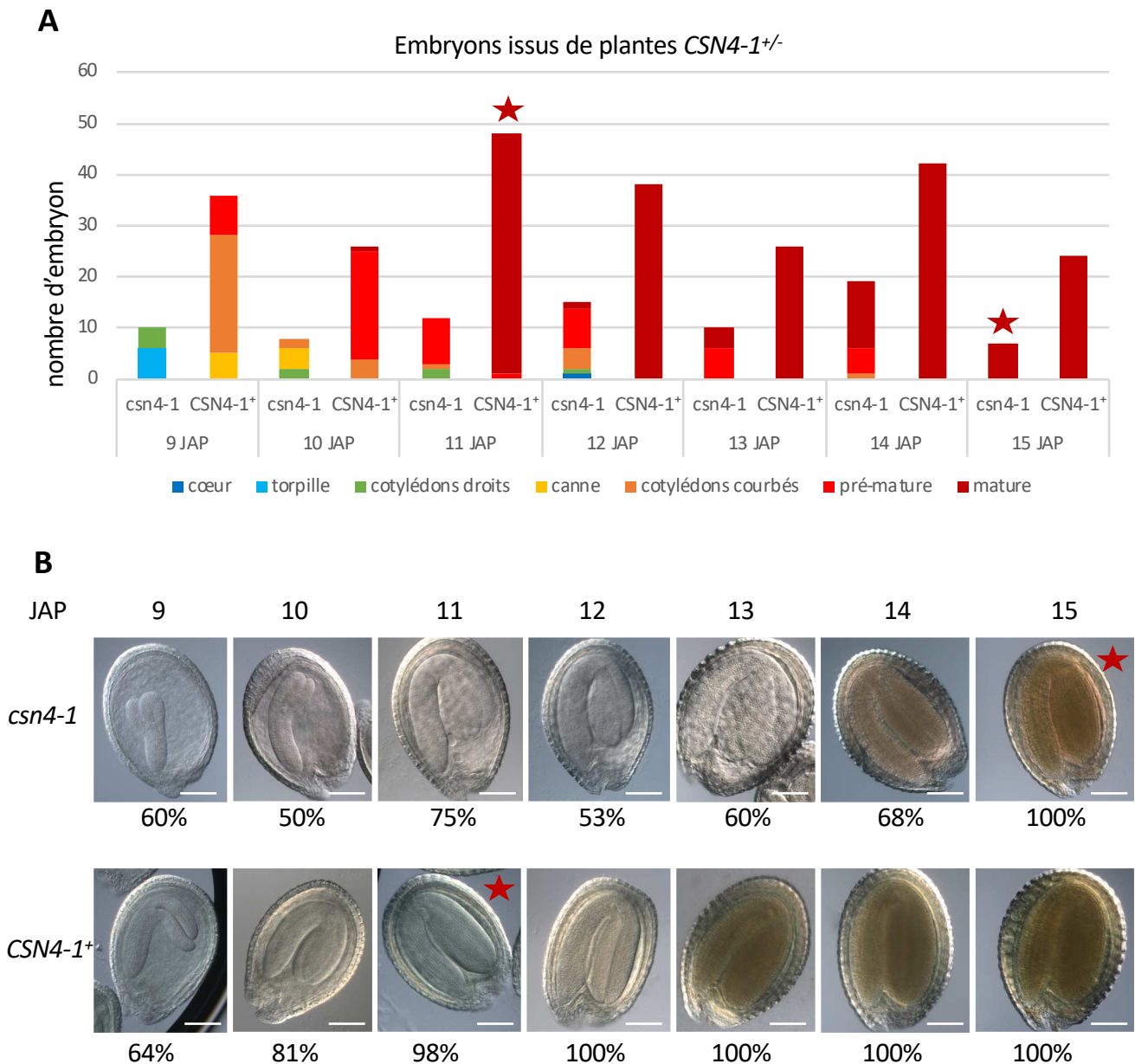


Figure II.12 A, B. Les embryons *csn4* sont retardés dans leur développement mais arrivent à maturité.

A, B. Pour chaque temps post-pollinisation étudié (9 à 15 jours post-pollinisation, JAP), une silique de la même plante a été étudiée. Les graines ont été séparées entre les graines vertes (correspondant aux embryons *CSN4-1^{+/+}* et *CSN4-1^{+/-}*, notées *CSN4-1⁺*) et les graines aux embryons anthocyanés (correspondant aux embryons *csn4-1*) et le stade de développement de chaque embryon a été analysé (voir Figure I.1.B). Les étoiles rouge foncé montrent le premier temps pour lequel les embryons ont atteint au minimum à 90% l'état de maturité.

A. Histogramme présentant les stades de développement des différents embryons. Les embryons *csn4-1* présentent un délai développemental important par rapport aux embryons *CSN4-1⁺*. Ils arrivent à maturité 4 jours plus tard que les embryons *CSN4-1⁺*.

B. Pour chaque temps, une image représentative du stade développemental le plus représenté parmi les embryons étudiés est montrée. Le pourcentage d'embryon à ce stade est également précisé. Les embryons *csn4-1* ne présentent pas de défauts morphologiques majeurs. Barre d'échelle : 100 μ m.

2- Impact de AtTCTP et AtCSN4 sur le développement des plantes

Après avoir mis en évidence une interaction physique entre AtTCTP et AtCSN4, j'ai cherché à préciser leur relation génétique au cours du développement de la plante pour mieux comprendre les fonctions de cette interaction.

A- Impact sur le développement embryonnaire

Les mutants perte de fonction pour *tctp* (*tctp-1* et *tctp-2*) présentent un délai important lors de l'embryogenèse conduisant à leur mort prématurée neuf jours après pollinisation sans que ces embryons présentent de défaut morphologique majeur (Partie I.5.B, Figure I.19). Comme AtTCTP et AtCSN4 interagissent physiquement et possiblement de manière fonctionnelle pour réguler la progression du cycle cellulaire, j'ai regardé si un délai de développement embryonnaire était également visible chez les mutants *csn4*.

Dans les plantes hétérozygotes *CSN4-1^{+/-}* et *CSN4-2^{+/-}*, les graines dont l'embryon est homozygote *csn4* sont facilement reconnaissables car elles présentent des points violets dus à l'accumulation d'anthocyanes dans les cotylédons embryonnaires (Figure I.13). Dans une même silique, j'ai donc pu comparer, après traitement à l'hydrate de chloral, le stade développemental des embryons *csn4-1* ou *CSN4-1⁺* (*CSN4-1^{+/+}* et *CSN4-1^{+/-}*) (Figure II.12.A,B). De plus, j'ai également suivi l'âge post-pollinisation de chaque silique entre 9 jours après pollinisation (JAP; âge pour lesquels l'accumulation des anthocyanes commence à être visibles) et 15 JAP (dernier jour avant dessiccation des graines). Les embryons *csn4-1* sont nettement retardés par rapport à ceux *CSN4-1⁺* : par exemple, à 9 JAP, 60% des embryons *csn4-1* sont au stade torpille tandis que 64% des embryons *CSN4-1⁺* sont au stade cotylédons courbés (Figure II.12.A). Ce délai est conservé au long du développement jusqu'à 14 JAP. Néanmoins, contrairement aux embryons *tctp*, les embryons *csn4-1* parviennent à maturité bien qu'environ 4 jours plus tardivement que les embryons *CSN4-1⁺* (Figure II.12A). De plus, il est crucial de noter que ce délai de développement ne s'accompagne pas de défaut morphologique majeur lors de l'embryogenèse (Figure II.12.B).

Comme ces données ne concernent qu'un nombre limité d'embryons, chaque silique comportant une dizaine d'embryons *csn4-1*, j'ai voulu étudier le développement embryonnaire de façon plus systématique en comparant entre eux des embryons provenant de siliques différentes de même âge post-pollinisation (Figure II.12.C,D). J'ai pu ainsi confirmer que les embryons *csn4-1* sont nettement retardés dans leur développement par rapport aux embryons *CSN4-1⁺*. Par exemple, à 12 JAP, 55% des embryons *csn4* sont au stade pré-mature tandis que 97% des embryons *CSN4-1⁺* sont au stade mature (Figure II.12.C). Ce retard est présent tout au long du développement et ainsi le stade développement des embryons *csn4-1* à 13 JAP (43 % d'embryons pré-matures et 55 % d'embryons matures) est comparable à celui des embryons *CSN4-1⁺* à 11 JAP (35% d'embryons pré-matures et 61% d'embryons matures). Le délai entre les conditions semble donc être d'entre deux et trois jours. Cependant, les embryons *csn4-1* rattrapent leur retard avant le dessèchement des graines de la silique et atteignent en grande majorité le stade mature à 15 JAP contre 12 JAP pour les embryons sauvages, soit avec un délai de 3 jours (Figure II.12.C). Enfin, j'ai réalisé la même expérience dans la lignée indépendante *CSN4-2^{+/-}* pour 10 et 11 JAP (Figure II.12.D). Le développement des embryons *csn4-2* est très semblable au développement de ceux *csn4-1*.

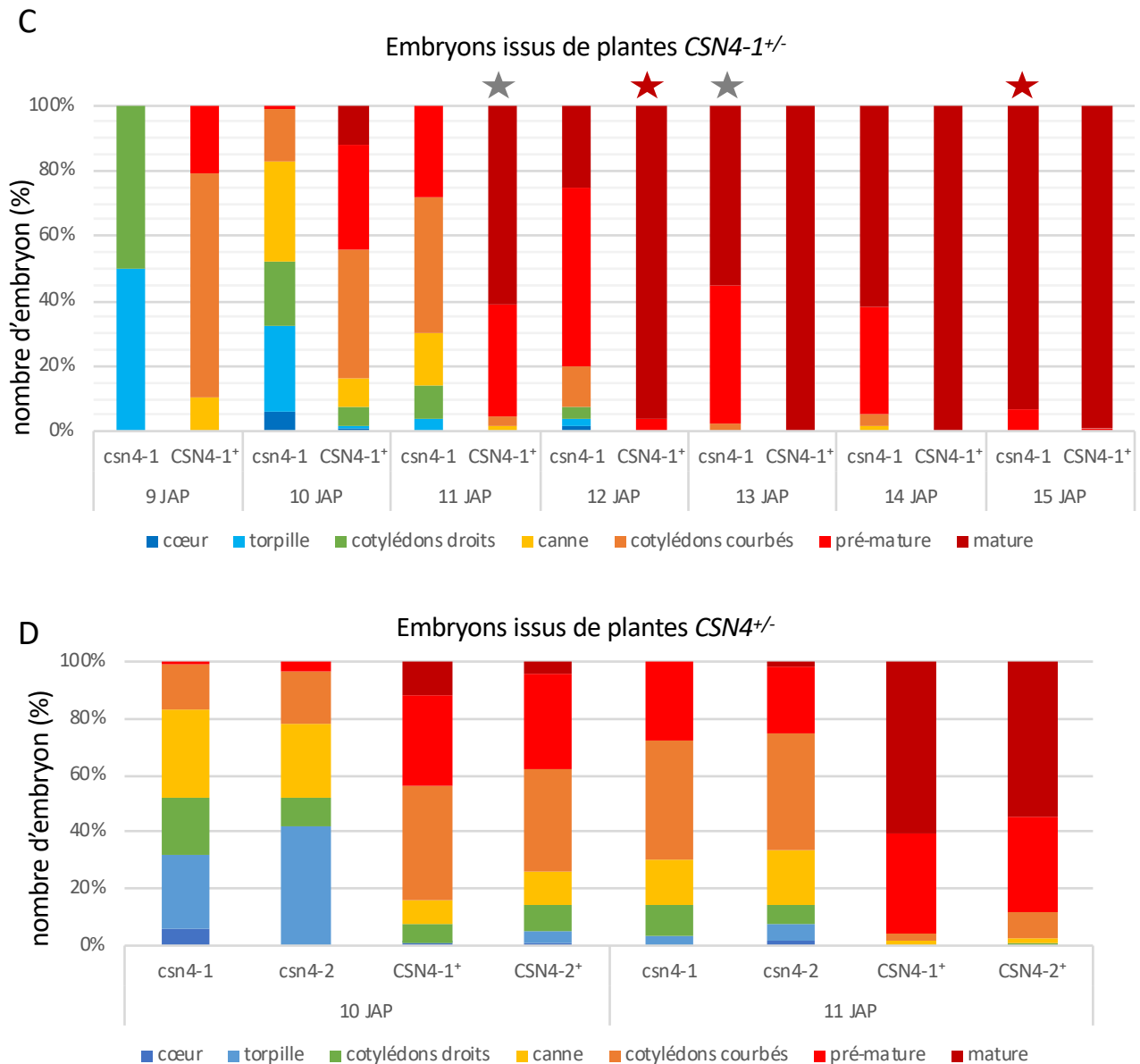


Figure 12 C, D. Les embryons *csn4* sont retardés dans leur développement mais arrivent à maturité.

C, D. Pour chaque temps post-pollinisation étudié (9 à 15 jours post-pollinisation, JAP), des siliques provenant de plantes différentes *CSN4-1^{+/-}* (C,D) ou *CSN4-2^{+/-}* (D) ont été étudiées. Les graines ont été séparées entre les graines vertes (correspondant aux embryons *CSN4^{+/+}* et *CSN4^{+/-}*, notées *CSN4⁺*) et les graines aux embryons anthocyanés (correspondant aux embryons *csn4^{-/-}*). Le stade de développement de chaque embryon a été analysé et l'ensemble des données est représentée sous forme d'un histogramme.

C. Pour chaque temps, ont été analysées entre 6 et 8 siliques provenant de 3 plantes différentes (excepté pour 9 JAP, uniquement 2 siliques) soit entre 49 et 81 embryons *csn4-1* et entre 170 et 247 embryons *CSN4-1⁺* (sauf pour 9 JAP, respectivement 18 et 68 embryons). Les étoiles de même couleur montrent des états développementaux similaires, le rouge foncé indiquant le premier temps pour lequel les embryons ont atteint au minimum à 95% l'état de maturité. Les embryons *csn4-1* présentent un délai développemental important par rapport aux sauvages.

B. Pour la lignée *CSN4-2^{+/-}*, 5 siliques provenant de 3 plantes différentes ont été analysées soit, pour respectivement 10 et 11 JAP, 60 et 68 embryons *csn4-2* et 168 et 175 embryons *CSN4-2⁺*. Les données pour la lignée *CSN4-1^{+/-}* sont les mêmes que pour le C. Les embryons *csn4-2* présentent un phénotype similaire aux embryons *csn4-1*.

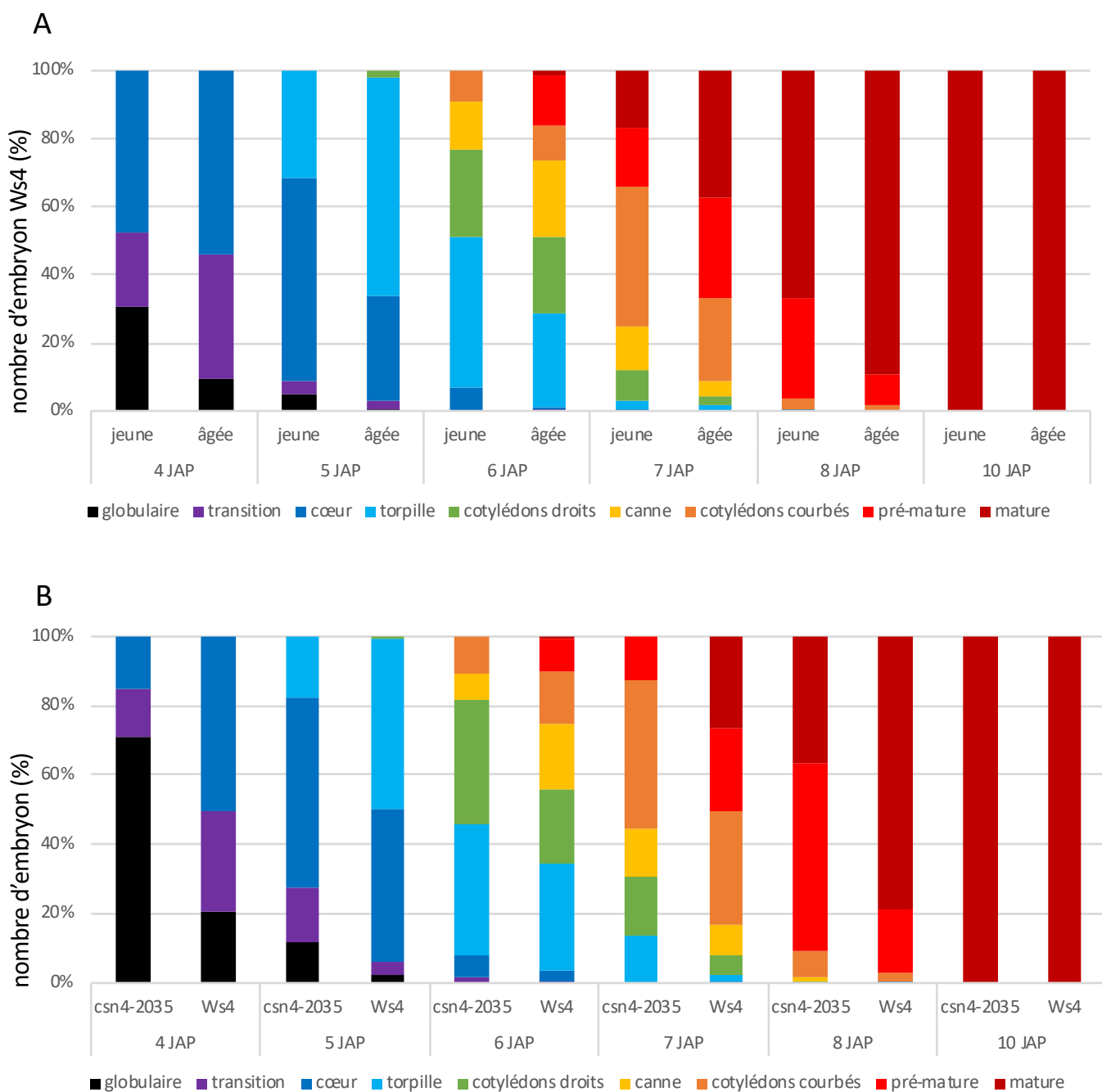


Figure II.13. Les embryons *csn4-2035* présentent un léger retard de développement.

Résultat du comptage des stades de développement des embryons (voir Figure I.1.B) de génotypes Ws4 et *csn4-2035* observés à différent temps post-pollinisation (4 à 10 jours après pollinisation, JAP).

A. Pour chaque inflorescence Ws4, la plus jeune et la plus âgée des siliques pollinisées le même jour ont été étudiées. Pour chaque condition, entre 149 et 255 embryons ont été observés, sauf pour 10 JAP (respectivement 105 et 89 embryons pour les siliques jeunes et âgées), venant de 4 à 6 plantes différentes.

B. Les valeurs indiquées correspondent pour *csn4-2035* à la seule silique pollinisée chaque jour et pour Ws4 à la moyenne entre la silique la plus jeune et la plus âgée pollinisées le même jour. Pour *csn4-2035*, entre 93 et 254 embryons provenant de 4 à 6 plantes différentes ont été comptabilisés sauf pour 10 JAP (27 embryons venant de 3 plantes).

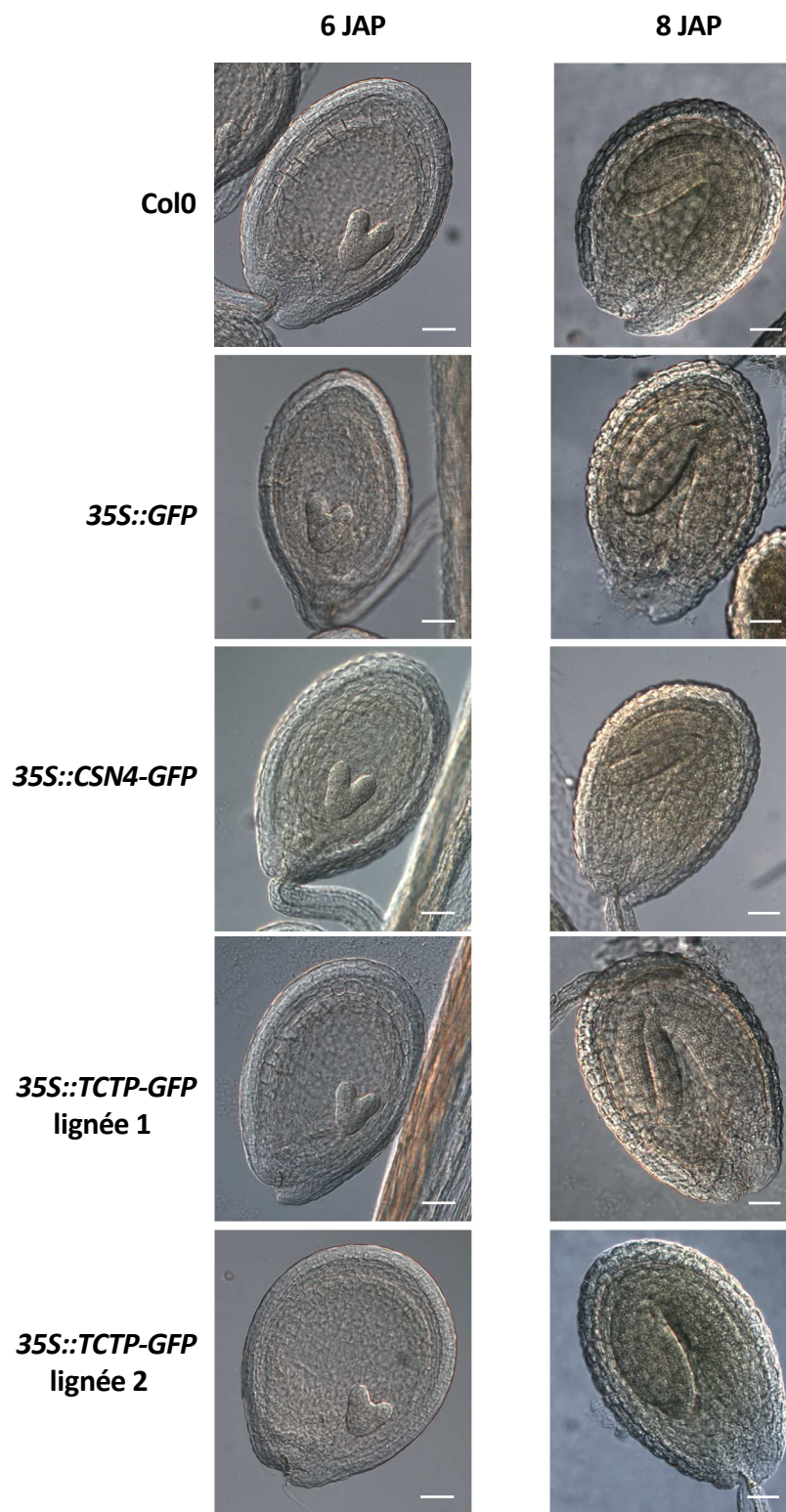


Figure II.14. Les plantes surexprimant AtTCTP ou AtCSN4 ne présentent pas de phénotype embryonnaire majeur.

Images représentatives de graines des génotypes Col0, 35S::GFP, 35S::CSN4-GFP, 35S::TCTP-GFP (2 lignées différentes) à différent temps post-pollinisation (6 et 8 jours après pollinisation, JAP). Pour chaque génotype, 250 graines venant de 5 plantes différentes ont été observées à 8 JAP et 150 graines venant de 3 plantes différentes à 6 JAP.

Barre d'échelle : 50 μ m

Par exemple, à 11 JAP, les embryons *csn4-1* sont à 42% au stade cotylédons courbés et 28% au stade pré-mature et ceux *csn4-2* sont à 41% au stade cotylédons courbés et 27% au stade pré-mature (Figure II.12.D). Les embryons *CSN4-1⁺* et *CSN4-2⁺* sont à des stades plus avancés, comprenant respectivement 61% et 54% d'embryons au stade mature (Figure II.12.D). Cela confirme que les embryons *csn4* sont retardés dans leur embryogenèse de façon significative.

Pour déterminer si la mutation dans le domaine PCI de CSN4 est suffisante pour générer un retard dans le développement des embryons, j'ai réalisé une étude similaire chez les mutants homozygotes *csn4-2035* comparés aux sauvages Ws4. Les plantes *csn4-2035* produisent moins de fleurs que les Ws4 : en moyenne une fleur s'ouvre chaque jour chez le mutant contre quatre chez le sauvage (Figure I.13.E). Pour chaque plante chaque jour, j'ai donc prélevé l'unique silique développée sur les plantes *csn4-2035* et à la fois la silique la plus âgée et la plus jeune de celles développées sur les plantes Ws4 pour y comparer le développement embryonnaire (Figure II.13). Concernant les embryons Ws4, j'ai observé une petite différence entre les embryons des siliques jeunes et ceux des siliques âgées pour les temps allant de 4 à 8 JAP, tous les embryons étant matures à 10 JAP (Figure II.13.A). Ce délai est quantifiable, par exemple à 5 JAP, les embryons de siliques jeunes sont 59% au stade cordiforme et 32% au stade torpille contre respectivement 31% et 65% pour ceux de siliques âgées. Pour pouvoir comparer avec *csn4-2035*, j'ai choisi de faire la moyenne entre tous les embryons observés chez Ws4 qu'ils viennent de siliques jeunes ou âgées pollinisées le même jour (Figure II.13.B). Cela me semble être la meilleure approche pour avoir un état représentatif du développement embryonnaire moyen des embryons sauvages pour un temps post-pollinisation donnée. J'ai ainsi comparé le développement embryonnaire observé dans l'unique silique pollinisée par jour chez *csn4-2035* au développement embryonnaire moyen de Ws4 (Figure II.13.B). J'ai remarqué que les embryons *csn4-2035* présentent un léger délai de développement de 4 à 8 JAP mais ont également atteint leur maturité à 10 JAP. Ce délai, inférieur à un jour, est facilement quantifiable : par exemple, à 8 JAP, pour *csn4-2035*, environ 54% des embryons sont au stade pré-mature et 36% au stade mature alors que pour Ws4, environ 18% sont au stade pré-mature et 79% au stade mature (Figure II.13.B). De plus, à 5 et 6 JAP, l'état de développement des embryons *csn4-2035* est similaire à celui des embryons des siliques jeunes Ws4 (Figure II.13.B). Il est important de se rappeler que les embryons venant de siliques jeunes ne représentent que le quart le plus jeune des embryons Ws4 et que donc cette similarité est compatible avec un léger délai de développement des embryons *csn4-2035* par rapport à la totalité des embryons Ws4. Néanmoins, cela met en lumière que ce délai reste minime.

De la même façon, j'ai suivi le développement embryonnaire de plantes surexprimant *AtTCTP* ou *AtCSN4* (Figure II.14). Dans les deux cas, je n'ai remarqué aucune différence dans leur développement embryonnaire comparé à celui des lignées contrôle Col0 et *35S::GFP* (Figure II.14). Les surexpressions de *AtTCTP* et de *AtCSN4* n'ont pas d'effet visible à cette échelle-là au niveau de l'embryogenèse sur la progression du cycle cellulaire.

B- Étude de l'interaction génétique entre AtTCTP et AtCSN4

Pour mieux comprendre le lien entre *AtTCTP* et *AtCSN4*, des études génétiques impliquant des lignées sous-exprimant ou sur-exprimant ces protéines avaient été menées avant mon arrivée dans l'équipe (Betsch et al., 2019).

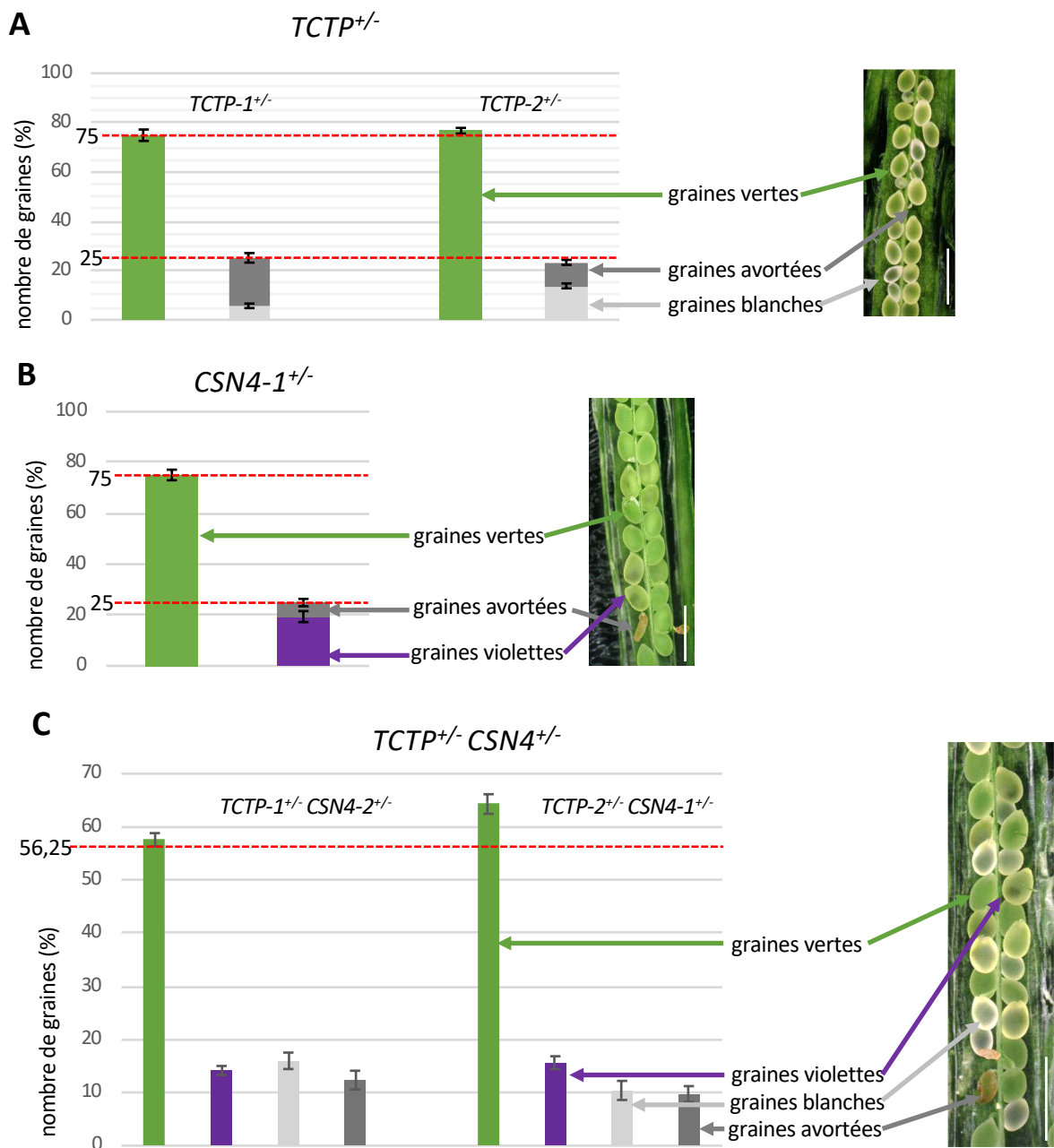


Figure II.15. Étude de la ségrégation des graines dans les doubles hétérozygotes *TCTP*^{+/-} *CSN4*^{+/-}.

Comptage des graines de différents phénotypes : graines sauvages vertes (vert), graines retardées dans leur développement blanches (gris clair), graines avortées (gris foncé), graines “violettées” dont les embryons sont anthocyanés (violet). Les lignes en pointillés rouges montrent les moyennes théoriques. Pour chaque panel, une image de silique représentative est montrée. Barre d'échelle : 1mm.

A, B. Étude des plantes hétérozygotes pour *AtTCTP* (A) ou *AtCSN4* (B). La moyenne résulte du comptage de 18 siliques venant de 6 plantes différentes pour *TCTP-1*^{+/-} (soit 1202 graines totales), de 13 siliques venant de 4 plantes différentes pour *TCTP-2*^{+/-} (soit 718 graines totales) et de 10 siliques venant de 4 plantes différentes pour *CSN4-1*^{+/-} (soit 576 graines totales). Les moyennes obtenues ne sont pas différentes des moyennes attendues théoriquement de 75% de graines vertes (A et B, homozygotes sauvages et hétérozygotes) et de 25% de graines blanches et avortées (A, *tctp*^{-/-}) ou de 25% de graines violettes et avortées (B, *csn4*^{-/-}).

C. Étude des plantes hétérozygotes pour *AtTCTP* et *AtCSN4*. La moyenne résulte du comptage de 15 siliques venant de 6 plantes différentes pour *TCTP-1*^{+/-} *CSN4-2*^{+/-} (soit 897 graines totales) et de 11 siliques venant de 3 plantes différentes pour *TCTP-2*^{+/-} *CSN4-1*^{+/-} (soit 557 graines totales). La moyenne observée pour les graines vertes est égale dans le cas de *TCTP-1*^{+/-} *CSN4-2*^{+/-} et supérieure dans le cas de *TCTP-2*^{+/-} *CSN4-1*^{+/-} à celle attendue de 56,25%.

Elles ont amené à conclure que la surexpression de *AtTCTP* dans les plantes *ARNi-AtCSN4* n'entraîne pas une accélération de la croissance par rapport aux plantes simples *ARNi-AtCSN4*. Cela suggère que *AtTCTP* requiert un niveau normal de *AtCSN4* pour stimuler la croissance mitotique. Par ailleurs, comme aucune lignée exprimant à la fois *ARNi-AtTCTP* et *ARNi-AtCSN4* n'avait pu être obtenue, de telles lignées doivent être létales. Néanmoins, ces études n'ont pas cherché à caractériser l'effet de la perte de fonction simultanée de ces deux gènes sur le développement embryonnaire. Pour remédier à cela, j'ai croisé les lignées hétérozygotes *TCTP^{+/-}* et *CSN4^{+/-}* pour tenter de trouver dans la descendance des doubles homozygotes *tctp csn4*.

Concernant les simples hétérozygotes, j'ai observé la ségrégation dans la descendance de deux lignées indépendantes *TCTP^{+/-}* 1 et 2. Comme attendu et déjà décrit (Brioude et al., 2010), j'ai observé respectivement 74,9% et 76,7% de graines vertes dans la descendance de *TCTP-1^{+/-}* et *TCTP-2^{+/-}* (Figure II.15.A). Ces graines correspondent aux génotypes *TCTP^{+/-}* et *TCTP^{+/+}* qui ne peuvent pas être différenciés au niveau de leur phénotype macroscopique. Conformément aux lois mendéliennes de la génétique, j'ai bien retrouvé environ 25% de mutants homozygotes *tctp*. Parmi ces 25%, se retrouvent des graines blanches et des graines avortées (Figure II.15.A). La proportion entre ces deux dernières est extrêmement différente, notamment en fonction des siliques et des stades de développement considérés. Par exemple, les siliques les plus âgées contiennent plus de graines avortées. De même, dans la lignée *CSN4-1^{+/-}*, j'ai observé 75,1% de graines vertes correspondant aux embryons *CSN4-1^{+/+}* et *CSN4-1^{+/-}* (Figure II.15.B). Les 25% de graines *csn4-1* sont répartis entre une majorité de graines dont les embryons sont anthocyanés (notées graines violettes) et des graines avortées (Figure II.15.B). De même, la proportion de graines avortées varie en fonction des siliques considérées.

Après croisement des lignées *TCTP^{+/-}* et *CSN4^{+/-}*, j'ai étudié des graines de différents phénotypes et génotypes dans les siliques de la descendance des doubles hétérozygotes (Figure II.15.C). Ainsi, dans une même silique, j'ai observé des graines vertes qui ressemblent aux sauvages Col0, des graines violettes dont les embryons sont anthocyanés qui ressemblent aux simples mutants *csn4*, des graines blanches dont le développement de l'embryon est très retardé qui ressemblent aux simples mutants *tctp* et des graines avortées. J'ai étudié plus précisément la ségrégation dans deux de ces croisements : *TCTP-1^{+/-} CSN4-2^{+/-}* et *TCTP-2^{+/-} CSN4-1^{+/-}* (Figure II.15.C). Les pourcentages observés sont semblables à ceux attendus pour *TCTP-1^{+/-} CSN4-2^{+/-}* où j'ai compté 57,6 % de graines vertes pour 56,25% attendus de graines au phénotype sauvage (*TCTP-1^{+/+} CSN4-2^{+/+}*, *TCTP-1^{+/-} CSN4-2^{+/+}*, *TCTP-1^{+/+} CSN4-2^{+/-}* et *TCTP-1^{+/-} CSN4-2^{+/-}*) (Figure II.15.C). Ils diffèrent légèrement pour *TCTP-2^{+/-} CSN4-1^{+/-}* avec 64% de graines vertes (Figure II.15.C). Ce résultat est légèrement supérieur à l'attendu.

Identifier les simples homozygotes *tctp CSN4* ou *TCTP csn4* est plus complexe. Dans un premier temps, il est facile de déduire que les graines violettes correspondent à des mutants *csn4* et les graines blanches à des mutants *tctp*. Les pourcentages respectifs dans les génotypes *TCTP-1^{+/-} CSN4-2^{+/-}* et *TCTP-2^{+/-} CSN4-1^{+/-}* de graines violettes : 14,1% et 15,6% et de graines blanches : 16 et 10,4% sont tous bien inférieurs aux 18,75% attendus pour chaque mutant simple homozygote (Figure II.15.C). Ceci étant dit, il est plus difficile d'assigner les graines avortées à un génotype car elles peuvent correspondre aux deux simples homozygotes voire au double homozygote.

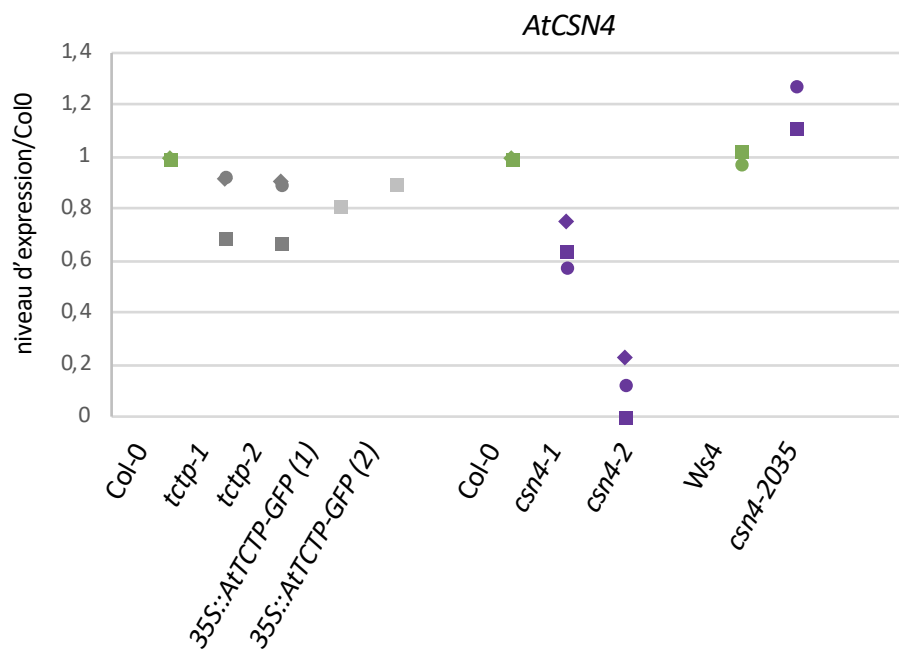
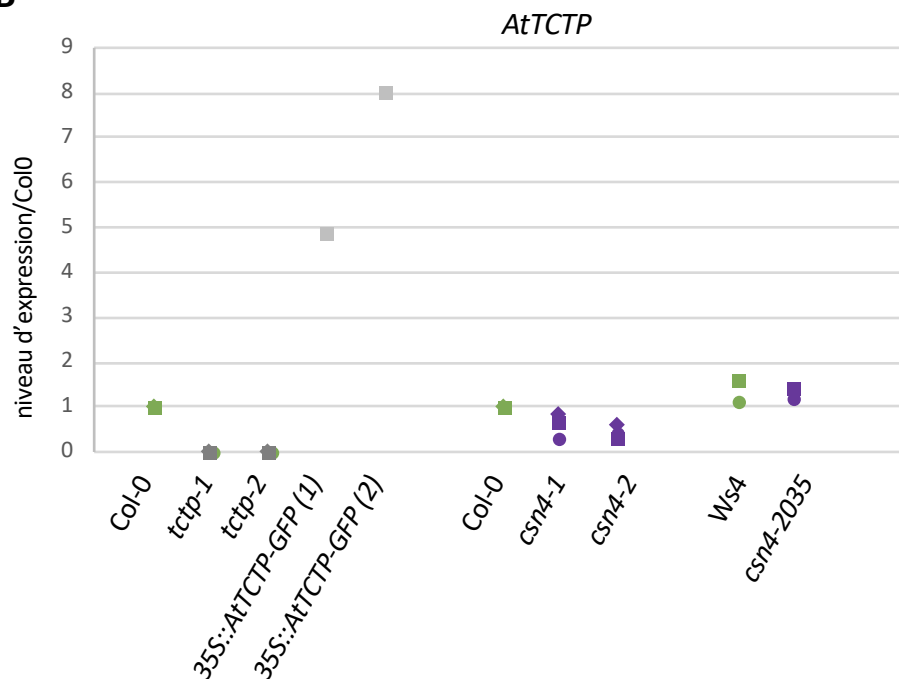
A**B**

Figure II.16. Les niveaux d'expression d'*AtTCTP* et d'*AtCSN4* sont indépendants l'un de l'autre.

RT-qPCR réalisées à partir de plantules des différents génotypes indiqués. Trois réplicas biologiques indépendants réalisés (losanges, ronds, carrés) pour tous les génotypes sauf pour les deux lignées *35S::AtTCTP-GFP* (un seul réplica, carrés).

Les niveaux d'expression de *AtTCTP* (A) et *AtCSN4* (B) ont été normalisés à partir des niveaux des gènes de ménage *TUB4*, *PDF2* et *GAPDH* et ramenés arbitrairement à 1 pour Col0.

Vert : plantules sauvages, gris foncé : perte de fonction pour *AtTCTP*, gris clair : surexpression de *AtTCTP*, violet : mutant pour *AtCSN4*.

Par exemple, pour le génotype *TCTP-1^{+/-} CSN4-2^{+/-}*, il est probable que les 12,3 % de graines avortées soient un mélange de : 4,65% de graines *TCTP csn4* (18,75% de *TCTP csn4* attendu – 14,1% de graines violettes observées), 2,75% de graines *tctp CSN4* (18,75% *tctp CSN4* attendu - 16% de graines blanches observé) et 4,9% de graines restantes (12,3 - 4,65 - 2,75) qui correspondraient aux mutants *tctp csn4*. Ce pourcentage est cohérent avec les 6,25% attendu bien que légèrement plus bas.

Pour confirmer que les graines *tctp csn* avortent, j'ai regardé par génotypage s'il était possible de retrouver des graines de tel génotype dans d'autres conditions. J'ai premièrement vérifié qu'aucune plante provenant de graines vertes n'était de génotype *tctp csn4*. Cela m'a semblé particulièrement important étant donné que le pourcentage de graines vertes est supérieur à l'attendu dans le génotype *TCTP-2^{+/-} CSN4-1^{+/-}*. Toutes les plantules testées provenant de graines vertes étaient bien de génotype *TCTP-2 CSN4*. J'ai également vérifié qu'on ne retrouve pas de plantes *tctp csn* dans les graines anthocyanées qui germent. Ainsi, les doubles mutants *tctp csn* semblent se trouver parmi les graines avortées. Je n'ai pas pu préciser leur phénotype plus précisément car il s'agit d'environ trois graines par siliques (6,25% attendu dans des siliques d'environ 50 graines), rendant les études de ségrégation par siliques difficiles. Ces études ne m'ont donc permis ni de mettre en évidence l'existence ni de caractériser le développement des doubles mutants *tctp csn*. Néanmoins, ces résultats, avec ceux obtenus en étudiant des lignées ARNi (Betsch et al., 2019), suggèrent fortement que les doubles mutants *tctp csn4* meurent précocement à l'état embryonnaire.

C- Les niveaux d'expression de *TCTP* et *CSN4* sont indépendants

Pour préciser le lien génétique entre *TCTP* et *CSN4*, j'ai vérifié le niveau d'expression de *AtCSN4* dans les différents contextes dérégulés pour *AtTCTP* par RT-qPCR et réciproquement (Figure II.16). Pour pouvoir comparer les différents génotypes, tous les échantillons ont été obtenus par un processus de sauvetage embryonnaire car celui-ci est indispensable à l'obtention de plantules *tctp*. De plus, les plantules ont été récoltées assez jeunes, autours de cinq jours après germination, pour que les mutants *csn4* soient encore vivants et pas trop impactés par la mort cellulaire. Il est premièrement important de noter qu'avec les amorces utilisées pour *CSN4* un transcrite est observable dans les échantillons *csn4-1* (Figure II.16). Malgré cela, des *Western blots* révélés avec un anticorps spécifique Anti-*CSN4* ont confirmé une absence de la protéine *CSN4* dans les mutants *csn4-1* (Figure I.13.F). Les mutants *csn4-1* sont donc bien des mutants perte de fonction même si un transcrite est observable.

En comparant sauvages, mutants *tctp* et *35S::AtTCTP*, j'ai démontré que, quel soit le niveau de *AtTCTP*, le niveau d'expression de *AtCSN4* reste constant (Figure II.16.A). Cela indique que *AtTCTP* ne régule pas *AtCSN4* au niveau transcriptionnel. Inversement, le niveau d'expression de *AtTCTP* est semblable chez le sauvage *Ws4* et le mutant faible *csn4-2035* (Figure II.16.B). Chez les mutants *csn4*, le niveau de *AtTCTP* est globalement semblable au niveau sauvage voire parfois diminué (Figure II.16.B). Cette légère diminution, visible uniquement sur certains échantillons, est probablement une conséquence de la mort cellulaire en cours chez *csn* vu qu'elle n'est pas du tout retrouvée chez *csn4-2035*. Ainsi, *AtCSN4* ne semble pas non plus réguler l'expression de *AtTCTP*. Cela n'exclue pas que des régulations protéiques entre *AtTCTP* et *AtCSN4* puissent exister.

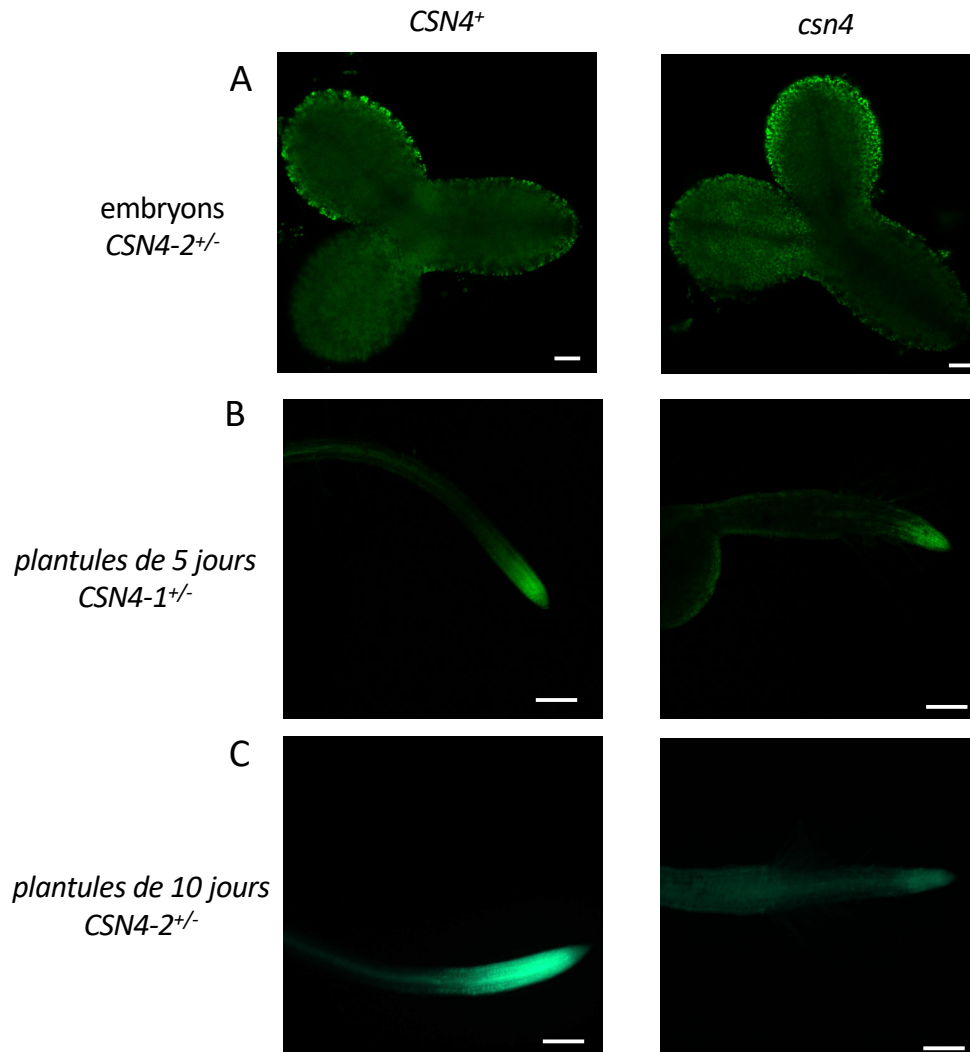


Figure II.17. Le niveau de AtTCTP ne dépend pas de AtCSN4.

Observation au microscope confocal (A, B) et à épifluorescence (C) des lignées *TCTPg-GFP CSN4^{+/-}*. Le signal vert correspond à la GFP.

A. Observation d'embryons issus de plantes *CSN4-2^{+/-}*. Aucune différence majeure de fluorescence n'est visible entre les embryons homozygotes mutants *csn4* provenant de graines violettes et ceux *CSN4⁺* provenant de graines vertes. Barre d'échelle : 15 μ m.

B, C. Observation de racines de plantules *csn4* et *CSN4⁺* de 5 (B) et 10 jours (C). Les racines de plantules *csn4*, reconnaissables à leur phénotype, fluorescent au niveau de leur méristème de façon similaire à celles *CSN4⁺* à 5 jours mais nettement moins à 10 jours. Barre d'échelle : 200 μ m.

Pour étudier plus en détail les régulations au niveau protéique, j'ai introgressé le marqueur *TCTPg-GFP* dans les lignées *CSN4^{+/-}*. Ces lignées permettent d'étudier l'influence de l'absence de AtCSN4 sur AtTCTP. Dans les embryons et dans les méristèmes racinaires de jeunes plantules *csn4*, le signal fluorescent marquant AtTCTP est autant présent que dans les plantules *CSN4⁺* (Figure II.17.A,B). Ce signal s'atténue dans les méristèmes racinaires des plantules *csn* plus âgées, ce qui est probablement une conséquence du fait qu'elles sont en train de mourir et donc que les divisions cellulaires sont en train de cesser (Figure II.17.C). Ainsi, AtCSN4 ne semble pas influencer directement le niveau protéique de AtTCTP dans les embryons et les jeunes plantules d'*A. thaliana*. Je n'ai pas pu faire l'étude inverse du niveau protéique de AtCSN4 dans les mutants *tctp* car je n'ai pas jugé prioritaire de générer des lignées exprimant *AtCSN4-GFP* sous le contrôle de son propre promoteur. En effet, vu que AtTCTP et AtCSN4 interagissent physiquement, il est plus probable que leur mécanisme d'action principal implique une coopération pour réguler ensemble leurs cibles, plutôt que l'une soit la cible de l'autre. Cela n'exclue pas que AtTCTP puisse réguler AtCSN4 au niveau protéique. Cependant, cela reste peu probable comme le niveau protéique de CSN4 semble relativement stable dans les lignées sous-exprimant ou surexprimant *TCTP* (Betsch et al., 2019).

D- Lien avec la réponse hormonale

Les complexes CRL auxquels participent AtCUL1 sont en partie impliqués dans la régulation de la signalisation hormonale, la mieux caractérisée étant la voie de l'auxine (Partie I.4.C, Figure I.14.B). Ainsi, la réponse à l'auxine est diminuée chez les mutants *csn4* et *csn4-2035* (Dohmann et al., 2008b; Pacurar et al., 2017). Étonnement, les mutants *tctp* ne présentent aucune perturbation ni du transport ni la réponse à l'auxine (Betsch et al., 2019).

Les cytokinines sont aussi des candidats évidents pour étudier une médiation hormonale du contrôle du cycle cellulaire puisqu'elles ont premièrement été identifiées par leur capacité à stimuler la division cellulaire *in vitro* (Miller et al., 1956). Pour caractériser la réponse aux cytokinines dans différents contextes de dérégulation de TCTP ou CSN4, diverses lignées rapportrices sont disponibles. Une lignée exprimant un promoteur synthétique, nommé *TWO-COMPONENT-OUTPUT-SENSOR NEW (TCSn)*, qui contrôle l'expression de la GFP a été établie (Zürcher et al., 2013). Ce promoteur consiste en vingt-quatre répétitions du motif de liaison de facteurs de transcription activés en présence de cytokinines, les ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) de type B (ARR-B), devant un promoteur minimal *35S*. Il s'agit donc un senseur de la réponse globale aux cytokinines. D'autres lignées existent comme l'expression de la GFP sous le contrôle de promoteurs endogènes dont l'expression est stimulée par les ARR-B comme ceux des *ARR de type A (ARR-A) ARR5* et *ARR7* (Müller and Sheen, 2008; Zürcher et al., 2013). Les ARR-A sont des facteurs de transcription dont l'activation dépend de leur phosphorylation en présence de cytokinines et qui régulent négativement les gènes de réponse aux cytokinines, mettant en place une boucle de rétrocontrôle négatif (Partie I.1.B, (Müller and Sheen, 2007)).

Lors de l'embryogenèse, la réponse aux cytokinines est observable par la construction *TCSn::GFP* dès le stade cœur précoce dans les vaisseaux de la partie plus apicale de l'embryon puis la fluorescence s'étend plus verticalement au stade cœur tardif avant d'être restreinte côté basal aux vaisseaux de la future racine au stade torpille comme décrit dans la littérature ((Zürcher et al., 2013), Figure II.18.A).

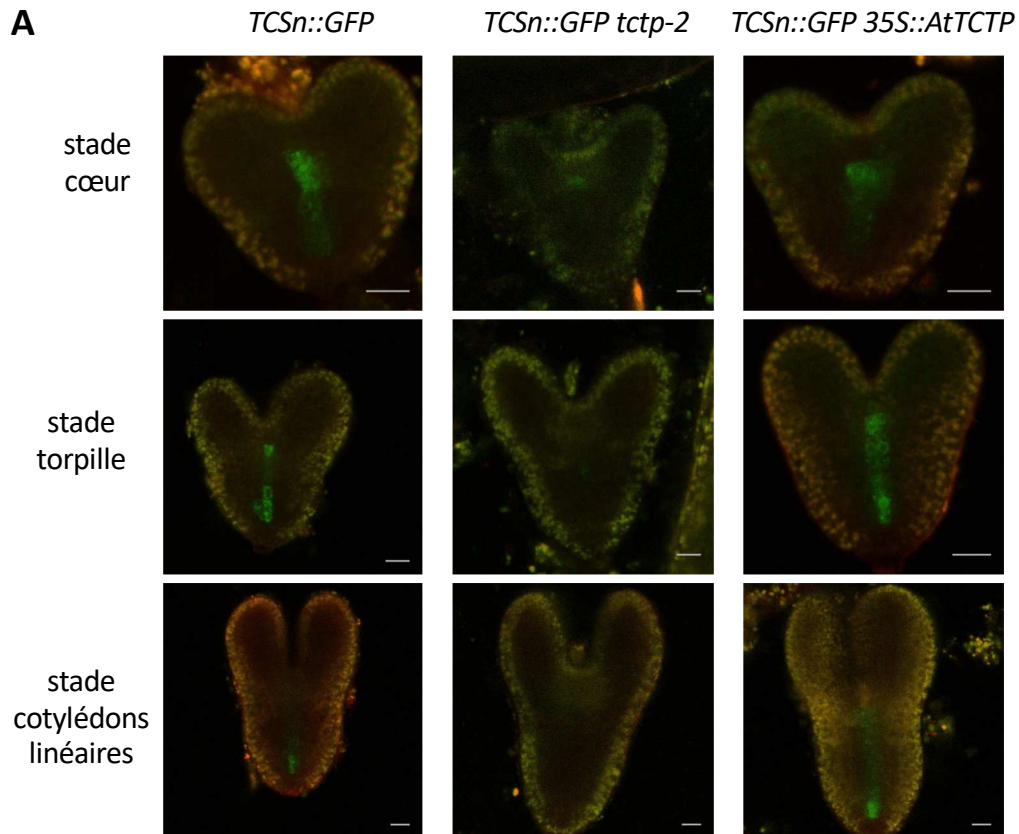


Figure II.18.A. La signalisation globale des cytokinines, mais pas l'expression des ARR-A, est perturbée en absence de TCTP.

A. La fluorescence de *TCSn::GFP* a été évaluée dans des embryons sauvages, *tctp-2* et *35S::AtTCTP* à différents stades (cœur, torpille, cotylédons linéaires, voir Figure I.1). Le signal GFP est présent au niveau du tissu vasculaire des embryons sauvages et *35S::AtTCTP* mais pas *tctp-2*.

Barre d'échelle = 15µm.

Ce profil est conservé chez les plantes surexprimant *AtTCTP* mais pas chez les mutants *tctp* qui présentent une diminution drastique de la fluorescence *TCSn::GFP* à tous les stades de l'embryogenèse (Figure II.18.A). J'ai donc mis en évidence que la réponse aux cytokinines semble fortement altérée en absence *AtTCTP*. D'une manière intéressante, les signaux *ARR5::GFP* et *ARR7::GFP*, présents au niveau du suspenseur aux stades globulaire, cœur et torpille, sont semblables chez le sauvage, *35S::AtTCTP* et *tctp* ((Müller and Sheen, 2008; Zürcher et al., 2013), Figure II.18.B,C). Ainsi, l'expression d'*ARR5* et celle d'*ARR7* semblent indépendantes de *AtTCTP*. Cela suggère un processus complexe de régulation de la voie des cytokinines par *AtTCTP* qui stimulerait la voie de façon globale mais indépendante des ARR-A. Ces données seront à comparer avec la réponse aux cytokinines en cas de perturbation de l'expression de *AtCSN4*, les lignées étant en cours d'établissement.

E- Discussion et perspectives

a- Développement embryonnaire des mutants *tctp* et *csn4*

Les embryons *tctp* meurent précocement à l'état embryonnaire sans posséder de défauts morphologiques majeurs à cause d'un délai développemental important dû à un ralentissement de la croissance mitotique (Brioudes et al., 2010). Une approche de sauvetage embryonnaire permet aux embryons *tctp* de poursuivre leur développement jusqu'à l'âge adulte s'ils sont placés sur des milieux appropriés : milieu riche en sucre jusqu'au début de la germination, milieu classique jusqu'à la formation des premières feuilles puis terre ((Brioudes et al., 2010), Figure 1.19). La létalité pourrait donc être majoritairement due à un manque de ressources nutritives pour l'embryon qui a besoin d'un temps plus long de développement à cause du ralentissement de la progression du cycle cellulaire. Cette hypothèse est confortée par l'absence de défaut morphologique majeur des embryons *tctp* (Brioudes et al., 2010). J'ai voulu la tester autrement en essayant de compléter les mutants *tctp* en exprimant *AtTCTP* uniquement dans l'embryon sous le contrôle du promoteur spécifique *pTWISTEDSEED* (*pTWS*) (Doll et al., 2020) ou uniquement dans l'albumen sous le contrôle du promoteur spécifique *pZHOUP1* (*pZOU*) (Yang et al., 2008). Ces complémentations partielles permettront de clarifier le rôle de *AtTCTP* respectivement dans la croissance mitotique embryonnaire et dans le transport de nutriment de l'albumen vers l'embryon. L'analyse des premiers transformants est actuellement en cours. En complément de ces études, il serait également d'étudier si les mutants *tctp* et *csn4-2035* présentent ou non un délai dans le développement de l'albumen comparable à celui observé au niveau embryonnaire. Cela aiderait à comprendre le mécanisme mis en jeu et la part de coordination dans le développement de ces deux tissus. Des données obtenues chez le mutant *csn2* montrent que le développement de l'albumen y est ralenti, suggérant un lien étroit avec le développement embryonnaire également ralenti (Franciosini et al., 2015).

Comme *TCTP* interagit physiquement et génétiquement avec *CSN4* (Betsch et al., 2019), j'ai caractérisé précisément le développement embryonnaire des mutants *csn4*. Ainsi, les embryons *csn4* présentent un délai d'entre 2 et 3 jours par rapport aux embryons *CSN4⁺* de la même silique (Figure II.12). Ce phénotype est en cohérence avec celui des *csn2* pour lesquels un délai dans le développement embryonnaire avait auparavant été observé sans être quantifié de manière précise (Franciosini et al., 2015).

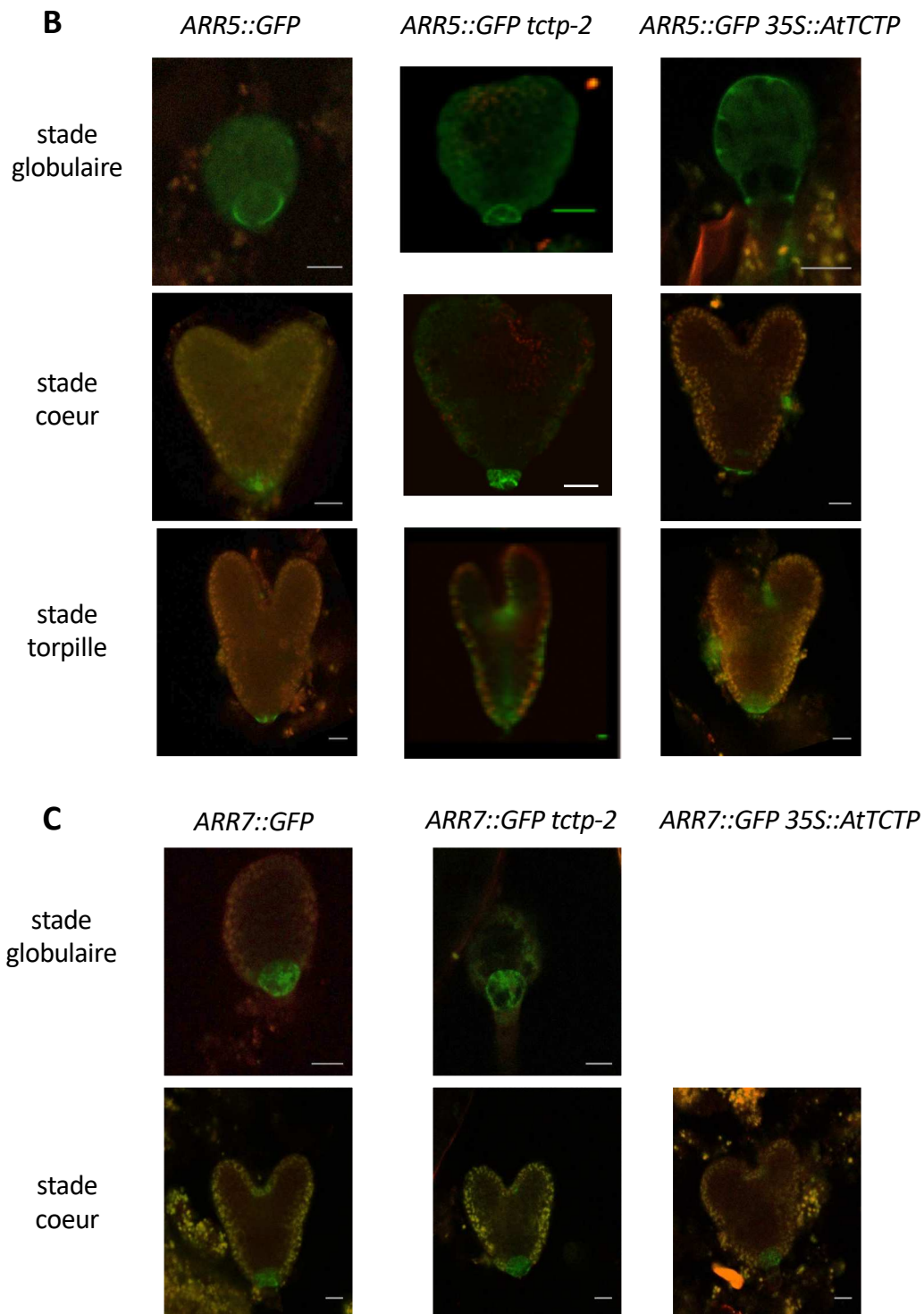


Figure II.18.B,C. La signalisation globale des cytokinines, mais pas l'expression des ARR-A, est perturbée en absence de TCTP.

B,C. La fluorescence des marqueurs *ARR5::GFP* (B) et *AAR7::GFP* (C) a été évaluée dans des embryons sauvages, *tctp-2* et *35S::AtTCTP* à différents stades (globulaire, coeur, torpille, voir Figure I.1.B).

Le signal GFP est semblable dans tous les embryons observés.

Barre d'échelle : 15µm.

De plus, même si les embryons *csn2* présentent quelques défauts mineurs lors de l'embryogenèse notamment au niveau des divisions de l'hypophyse et du centre quiescent liés à une signalisation auxiniques réduite, ils restent majoritairement semblables aux embryons sauvages, avec des méristèmes apicaux bien établis (Franciosini et al., 2015). De même, les embryons *csn4* ne présentent pas de défauts morphologiques majeurs, suggérant que leur défaut principal à ce stade est un retard dans la croissance mitotique, semblable à celui observé chez les mutants *tctp*. Cela est cohérent avec le fait que les cellules BY2 exprimant un ARNi contre *CSN4* et les cellules racinaires d'*A. thaliana* présentent toutes deux un délai d'environ 4h du cycle cellulaire (Betsch et al., 2019).

Néanmoins, le délai observé chez les embryons *csn4* est plus modéré que celui des embryons *tctp* et les embryons *csn4* parviennent à maturité avant la phase de déshydratation de la silique. Ils ne présentent donc pas de létalité embryonnaire et les graines peuvent germer. Cette observation apporte plus de précision sur le processus mis en jeu au niveau embryonnaire. En effet, en culture cellulaire de BY2 et dans les racines d'*A. thaliana*, l'expression d'un ARNi contre *CSN4* ou *TCTP* induit un délai du cycle cellulaire semblable par rapport au sauvage (environ 4h, (Betsch et al., 2019)). Le délai embryonnaire n'est donc pas purement un reflet du délai dans la progression du cycle cellulaire observé auparavant dans d'autres situations qui conduirait à un délai semblable chez les mutants *csn4* et *tctp*. Il est donc possible de déduire que, au contraire des situations précédentes, le cycle cellulaire semble ralenti de façon moins importante chez *csn4* que *tctp* ou alors qu'un processus non identifié permet de limiter l'impact du ralentissement du cycle cellulaire sur le développement embryonnaire chez *csn4* mais pas chez *tctp*.

Par ailleurs, les plantules *csn4* meurent environ 10 jours après germination (Figure I.13). Contrairement aux embryons *csn4*, les plantules *csn4* possèdent un phénotype nettement plus pléiotropique, caractérisé notamment par de forts défauts du développement racinaire et de la signalisation auxinique s'ajoutant à ceux dans la progression du cycle cellulaire qui étaient déjà visibles au stade embryonnaire (Gusmaroli et al., 2007). Par ailleurs, contrairement aux graines *tctp*, les plantules *csn4* ne peuvent pas être sauvées par un ajout de nutriments. Les défauts majeurs causant la létalité chez *csn4* semblent être différents de ceux chez *tctp*, où le ralentissement du cycle cellulaire conduisant à un manque de ressources est crucial. Ainsi, le ralentissement du cycle cellulaire conduisant à un manque de nutriment ne semble pas être le facteur prédominant de la mort des plantules *csn4*, ce qui est cohérent avec la grande pléiotropie de leur phénotype. La raison majeure de cet arrêt semble être l'arrêt des méristèmes apicaux caulinaires et racinaires dont l'activité n'est maintenue post-embryonnairement (Franciosini et al., 2015).

Concernant les mutants faibles *csn4-2035*, le développement embryonnaire est très légèrement impacté, comme en témoigne le délai inférieur à un jour que j'ai pu mettre en évidence (Figure II.13). Leur phénotype embryonnaire, tout comme le phénotype global, est donc nettement moins important que celui des mutants perte de fonction *csn4*. Comme *csn4-2035* est en grande partie affecté dans l'activité de déneddylation, plusieurs hypothèses peuvent se dégager : soit l'activité déneddylase persistante peut suffire à assurer le déroulement presque normal du développement embryonnaire, soit *CSN4* agit sur le développement embryonnaire par un mécanisme indépendant de *CSN*. Cette dernière hypothèse est confortée par le fait que *TCTP* et *csn4-2035* interagissent (Figures II.6 et II.7). Ainsi, si l'action de *CSN4* sur le

développement embryonnaire passe majoritairement par son interaction avec TCTP (non perturbée chez le mutant *csn4-2035*), mais par celle avec le complexe CSN (perturbée chez le mutant *csn4-2025*), il paraît logique que le développement des embryons *csn4-2035* ne soit que peu perturbé.

b- Interaction génétique entre TCTP et CSN4

Pour préciser le lien génétique lors du développement entre *AtTCTP* et *AtCSN4*, j'ai cherché à obtenir les doubles homozygotes mutants *tctp csn4*. Ces mutants semblent létaux en début de développement embryonnaire (Figure II.15). Cela est cohérent avec l'impossibilité d'obtenir des plantes exprimant à la fois *ARNi-AtTCTP* et *ARNi-AtCSN4* auparavant remarquée dans l'équipe (Betsch et al., 2019). Cependant, il n'est pas possible d'obtenir plus de précision et de savoir si les mutants *tctp csn4* ressemblent aux mutants *tctp* ou sont encore plus retardés dans leur développement. Ces études sont rendues difficiles par le fait que les deux mutants étudiés sont létaux et qu'il faut donc travailler avec des plantes double hétérozygotes conduisant à un nombre limité de doubles homozygotes par silique dans la descendance. Ces limites pourront être dépassées en croisant le mutant faible viable *csn4-2035* (Col0) avec les lignées *TCTP^{+/+}*. Dans ces lignées il sera possible de fixer la mutation *csn4-2035* à l'état homozygote pour identifier plus facilement les doubles mutants *tctp csn4-2035*. Ces croisements sont en cours d'obtention.

De plus, il est important de noter que l'absence de CSN4 n'améliore pas le phénotype des mutants *tctp csn4* par rapport à celui des mutants *tctp* (Figure II.15). En effet, si l'hypothèse de séquestration de CSN4 en dehors de CSN par TCTP expliquait la grande majorité du phénotype des mutants *tctp*, ce dernier serait en grande partie dû à un fonctionnement accru de CSN entraînant une hypo-neddylation des CUL (hypo-neddylation bien visible pour CUL1 chez les mutants *tctp*, (Betsch et al., 2019). Or, chez les double mutants *tctp csn4*, en absence de CSN4, cette hypo-neddylation n'est pas possible comme CSN n'y est pas actif et les CUL sont au contraire hyper-neddylés. On s'attendrait donc à observer un phénotype moins important chez les mutants *tctp csn4* par rapport aux mutants *tctp*, un phénotype s'approchant de celui des mutants *csn4*. Cela n'est pas en accord avec mes résultats expérimentaux qui indiqueraient donc que le rôle de TCTP ne serait pas uniquement de séquestrer CSN4 en dehors du complexe CSN.

Pour avancer quant à la séquestration de CSN4 par TCTP, il est également possible de s'appuyer sur les études d'interaction génétiques déjà publiées (Betsch et al., 2019). En effet, les doubles mutants *35S::AtTCTP 35S::AtCSN4-GFP* ont le même phénotype que les mutants *35S::AtTCTP*, à savoir une croissance plus rapide au début de leur développement (Betsch et al., 2019). Si le rôle de *AtTCTP* était majoritairement de séquestrer *AtCSN4* en dehors du complexe CSN, alors le phénotype du double mutant sur-exprimant *AtTCTP* et *AtCSN4* devrait être nettement moins fort que celui du simple mutant sur-exprimant uniquement *AtTCTP*, ce qui n'est manifestement pas le cas. De plus, le double mutant *ARNi-TCTP 35S::CSN4-GFP* présente certes un phénotype de retard de croissance mais de façon moins prononcé que le simple mutant *ARNi-TCTP* (Betsch et al., 2019). Ce résultat est également en incohérence avec un rôle de TCTP uniquement dans la séquestration de CSN4. Ainsi, les différentes conclusions de ces études génétiques, en cohérence avec l'étude que j'ai menée précédemment sur le mutant

TCTP^{E12V} (Partie II.1.B), semblent indiquer que le rôle de TCTP est complexe et ne peut pas s'expliquer uniquement par la séquestration de CSN4 en dehors de CSN.

c- Lien avec les voies hormonales

Pour mieux comprendre les défauts développementaux, il est intéressant d'étudier le lien de la voie TCTP/CSN4 avec différentes signalisations hormonales. Un premier candidat évident est la voie de signalisation de l'auxine, liée à la régulation du cycle cellulaire et qui fait intervenir une ligase E3 contenant CUL1: SCF^{TIR1} (Partie I.4.C, Figure I.14.B). De façon étonnante, alors que la mutation *tctp* perturbe la neddylation de CUL1 (Betsch et al., 2019), elle ne semble affecter ni le transport ni la réponse à l'auxine (Betsch et al., 2019). Ainsi, les complexes SCF^{TIR1} contenant AtCUL1 et impliqués dans la voie de dégradation des AUX/IAA par l'auxine ne semblent pas être régulés par AtTCTP. La régulation des CRL via AtCUL1 par AtTCTP serait donc plus limitée que celle par CSN en général et ne toucherait que certains complexes contenant CUL1 et non pas leur totalité. Ainsi, TCTP n'agirait que sur une sous-population des CRL1, sans modifier le niveau de neddylation et l'activité de l'ensemble des CRL1. Pour confirmer ces données, j'ai utilisé la construction *HS::AXR3NT-GUS* qui permet d'évaluer la dégradation des AUX/IAA, dont ARX3 est un représentant, dans différentes conditions (Gray et al., 2001). Cette dégradation, stimulée par un traitement à l'auxine, est moindre dans un contexte où l'activité CSN de déneddylation de AtCUL1 est perturbée comme dans le cas des mutants *csn1-10* (Huang et al., 2013) et *csn2-5* (Stuttman et al., 2009a). Les lignées sont actuellement en cours d'analyse.

J'ai choisi d'étudier également la signalisation des cytokinines car celle-ci est également liée étroitement à la régulation du cycle cellulaire, de façon globalement antagoniste à la voie de l'auxine. De façon surprenante, la signalisation globale aux cytokinines (rapportée par le promoteur synthétique *TCSn*) est grandement diminuée dans les embryons *tctp* sans que les niveaux d'expression des *ARR-A*, *ARR5* et *ARR7* soient modifiée (Figure II.18). Ces données peuvent paraître à première vue en totale contradictoires. Néanmoins, *ARR7* peut également être régulé par la voie de l'auxine via les AUXINE RESPONSE FACTORS (ARF) ((Müller and Sheen, 2008), Figure I.2). Il est donc possible qu'en absence de *AtTCTP* la transcription d'*ARR7* soit stimulée non pas par les ARR-B, moins actifs comme le montre la réduction du signal *TCSn::GFP* (Figure II.18), mais par les ARF qui restent actifs comme le montre le signal *DR5::Venus* inchangé (Betsch et al., 2019). Ainsi, la signalisation auxinique qui reste inchangée pourrait contribuer à la diminution de celle des cytokinines dans les embryons *tctp*. Pour mieux comprendre les processus mis en jeu, il sera crucial d'étudier la réponse aux cytokinines dans les embryons *csn4* chez qui la signalisation auxinique est fortement diminuée.

3- Contrôle de la progression du cycle cellulaire par AtTCTP et AtCSN4

Après avoir étudié la fonction globale de AtTCTP et AtCSN4 sur le développement des plantes, j'ai choisi de me focaliser sur l'étude de la voie moléculaire expliquant au moins en partie ces défauts développementaux globaux. Ainsi, j'ai cherché à identifier le mécanisme précis d'action de AtTCTP/AtCSN4 sur la progression du cycle cellulaire.

A- Suivi de la progression du cycle cellulaire *in planta*

Les données de mon équipe d'accueil indiquent que, chez les cellules synchronisées de tabac, la sous-expression aussi bien de *NtTCTP* que de *NtCSN4* conduit à un ralentissement de la progression du cycle cellulaire (Betsch et al., 2019; Brioude et al., 2010). Plus précisément, ils ont démontré que ces sous-expressions conduisent à un délai de 4h de la transition G1/S (Betsch et al., 2019; Brioude et al., 2010). Au contraire, ils ont observé une accélération de la phase G1 chez les cellules surexprimant *NtTCTP*, mais la longueur du cycle reste inchangée (Betsch et al., 2019). De plus, dans les pointes racinaires d'*A. thaliana*, des essais d'incorporation d'EdU ont montré un délai similaire dans les lignées *ARNi-AtTCTP* et *ARNi-AtCSN4*. En effet, le cycle entier est retardé d'environ 4h tandis que la durée de la phase S reste inchangée par rapport aux plantes sauvages et aux plantes surexprimant *AtTCTP* ou *AtCSN4* (Betsch et al., 2019). Pour mieux caractériser le délai dans le cycle chez les arabettes ARNi pour *AtTCTP* ou *AtCSN4*, j'ai mis en place une approche de suivi *in vivo* par des marqueurs fluorescents spécifiques des différentes phases du cycle cellulaire.

J'ai commencé cette étude par la mise en place d'un suivi *in vivo* automatisé de la racine en croissance (appelé *root tracking*) en microscopie confocale. Cette méthode permet de suivre un signal fluorescent pendant une durée pouvant aller jusqu'à quinze heures en prenant un cliché toutes les cinq minutes (Doumane et al., 2017). Pour cela j'ai suivi le marqueur *pCYCB1::CYCB1-GFP* qui est présent dans les cellules uniquement de la fin de la phase G2 jusqu'à la fin de la phase M ((Aki and Umeda, 2016), Figure II.19.B,C). Pour chaque racine étudiée (10 dans le cas des plantules sauvages Col0), j'ai pu repérer différentes cellules (entre 3 et 20 par racine) pour lesquelles il est possible de suivre et quantifier un cycle entier de fluorescence pendant la période d'observation : apparition progressive de CYCB1-GFP dans les noyaux en G2, concentration sur le plan équatorial en métaphase et disparition brutale en anaphase, conformément aux données déjà publiées (Figure II.19.C,D, (Aki and Umeda, 2016). La durée moyenne de fluorescence de *pCYCB1::CYCB1-GFP* calculée sur 85 cellules sauvages est de 1h44 (Figure II.19.E). Cela signifie que la cellule met environ 1h45 pour passer de la fin de la phase G2 à l'anaphase de la mitose. Cette durée est inférieure à celle de 3h publiée précédemment (Aki and Umeda, 2016). Cette différence peut très probablement s'expliquer par les variations dans les conditions de culture (Aki and Umeda, 2016).

Par la suite, j'ai conduit des études similaires sur des mutant *tctp-2*. Je n'ai malheureusement pas pu mesurer la durée de la fluorescence pour un grand nombre de cellules car les racines croissantes des plantules *tctp* survivent très difficilement dans la petite chambre de culture d'imagerie par *root tracking*. Néanmoins, j'ai pu démontrer que la durée de la fluorescence de *pCYCB1::CYCB1-GFP* n'est pas significativement modifiée (T-test, p-value: 0,21) dans la lignée mutante *tctp-2* où la durée moyenne, calculée sur 10 cellules venant de deux racines, est de 1h56 (Figure II.19.E).

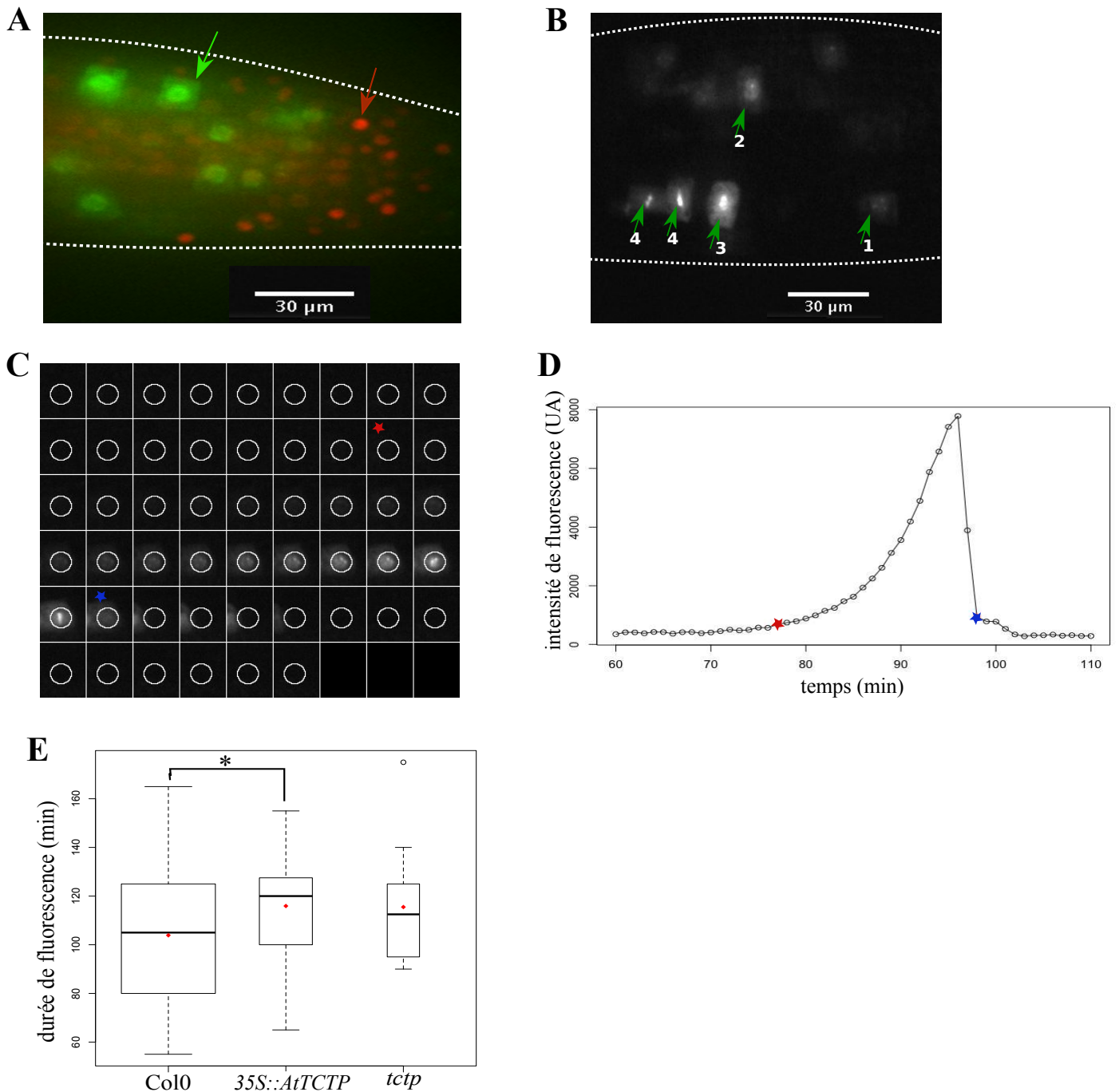


Figure II.19. Suivi du cycle cellulaire par *root tracking* dans des racines dérégulées pour *TCTP*.

A. Image du méristème d'une racine Col0 (délimitée par les pointillés) exprimant les constructions *pHTR2::CDT1a-RFP* (rouge) et *pCYCB1::CYCB1-GFP* (vert).

B. Image du méristème d'une racine Col0 (délimitée par les pointillés) exprimant la construction *pCYCB1::CYCB1-GFP*. La fluorescence est bien observable dans le noyaux de certaines cellules. La progression dans les phases G2 et M est numérotée de 1 (G2, apparition de la fluorescence) à 4 (métaphase, juste avant la disparition de la fluorescence).

C,D. Un noyau (délimité par un cercle blanc) d'une racine Col0 exprimant *pCYCB1::CYCB1-GFP* a été suivi pendant la progression des phases G2 et M. Une image a été prise toutes les 5 minutes (B) et la fluorescence y a été quantifiée (C). Les étoiles rouges et bleues marquent respectivement le moment où la fluorescence apparaît et disparaît.

E. Comparaison de la durée de fluorescence de la construction *pCYCB1::CYCB1-GFP* dans les noyaux de racines Col0 (85 noyaux étudiés), *35S::AtTCTP* (27 noyaux) et *tctp* (10 noyaux). La largeur des boîtes est proportionnelle à la taille des échantillons considérés. Le losange rouge représente la moyenne calculée pour chaque génotype. L'étoile indique que les moyennes pour Col0 et *35S::AtTCTP* sont significativement différentes (T-test, p-value < 0,05).

Mes résultats suggèrent donc que les phases G2/M ne sont pas impactées en absence de *AtTCTP*, en accord avec les données déjà publiées par mon équipe (Betsch et al., 2019; Brioudes et al., 2010).

Par ailleurs, la durée de fluorescence de *pCYCB1::CYCB1-GFP* est légèrement mais significativement (T-test, p-value de 0,003) augmentée pour la lignée *35S::AtTCTP* avec une moyenne de 1h56 pour 27 noyaux étudiés (Figure II.19.E). Ces données peuvent paraître surprenantes mais s'accordent avec celles obtenues dans les cellules synchronisées de tabac où la surexpression de *35S::NtTCTP-GFP* provoque une accélération de la phase G1/S d'environ 2h mais pour une durée totale de cycle semblable aux cellules sauvages (Betsch et al., 2019). Comme la longueur de la phase S est similaire dans les racines d'*A. thaliana* sauvage et *35S::AtTCTP* (Betsch et al., 2019), cela laisse supposer une compensation en G2 ou M et est donc cohérent avec l'observation de phases G2/M légèrement plus longues dans les racines d'*A. thaliana*.

Du fait de la mortalité précoce des plantules *csn4*, je n'ai pas pu utiliser la même approche sur ces mutants. La durée aurait sans doute été affectée comme il est publié que *AtCSN4* est essentiel pour la progression de la phase G2 et que la construction *CYCB1;1::GUS* est exprimée dans un nombre de cellules plus élevées chez *csn4* par rapport au sauvage (Dohmann et al., 2008a).

J'ai ensuite voulu suivre des marqueurs d'autres phases du cycle cellulaire pour compléter ces résultats. *pHTR2::CDT1a-RFP* est un marqueur exprimé dans les phases S-G2 pendant une durée de huit heures environ (Aki and Umeda, 2016), Figure II.19.A). Cependant, pendant les 15h d'observation, je n'ai vu aucune cellule où le signal fluorescent apparaît puis disparaît. Je n'ai donc pas pu quantifier la durée de fluorescence et par là la durée des phases S/G2. Cela indique soit que la durée des phases S/G2 est nettement allongée dans nos conditions jusqu'à dépasser 12-14h, soit que le marqueur est plus stable et pas strictement restreint aux phases S/G2.

La transition G1/S étant particulièrement intéressante pour mes études, j'ai essayé de développer un marqueur fluorescent adapté pour la suivre. Des candidats évidents sont les cyclines de type D qui sont des cyclines de type G1, impliquées dans le passage à la phase S (Partie I.2.B, (Menges et al., 2006)). *CYCD3;1* a été choisie car, même si son expression n'est pas spécifique à la phase G1 avec également un pic en phases G2 et M après une chute drastique de l'expression en phase S (Menges et al., 2005), elle a été décrite comme limitante pour la transition G1/S (Menges et al., 2006). Différents clonages ont été initiés pour cloner *CYCD3;1* fusionné en N- ou C-terminal avec différents fluorochromes (GFP ou m-cherry) sous le contrôle de son promoteur endogène. Malgré une bonne efficacité de transformation, je n'ai pu observer aucune fluorescence dans les racines des diverses lignées d'insertions obtenues. Étant donné que son niveau d'expression dans les racines est relativement faible (Collins et al., 2012) et sa dégradation rapide (Planchais et al., 2004), il est probable que la fusion *CYCD3;1*-fluorochrome ne soit pas présente en assez grande quantité, ou de façon trop transitoire, pour être suivie par microscopie fluorescent même en phase G1. Par *root tracking*, j'ai donc pu confirmer que la durée des phases G2 et M n'est pas affectée chez les mutants *tctp* mais pas que la transition G1/S est retardée.

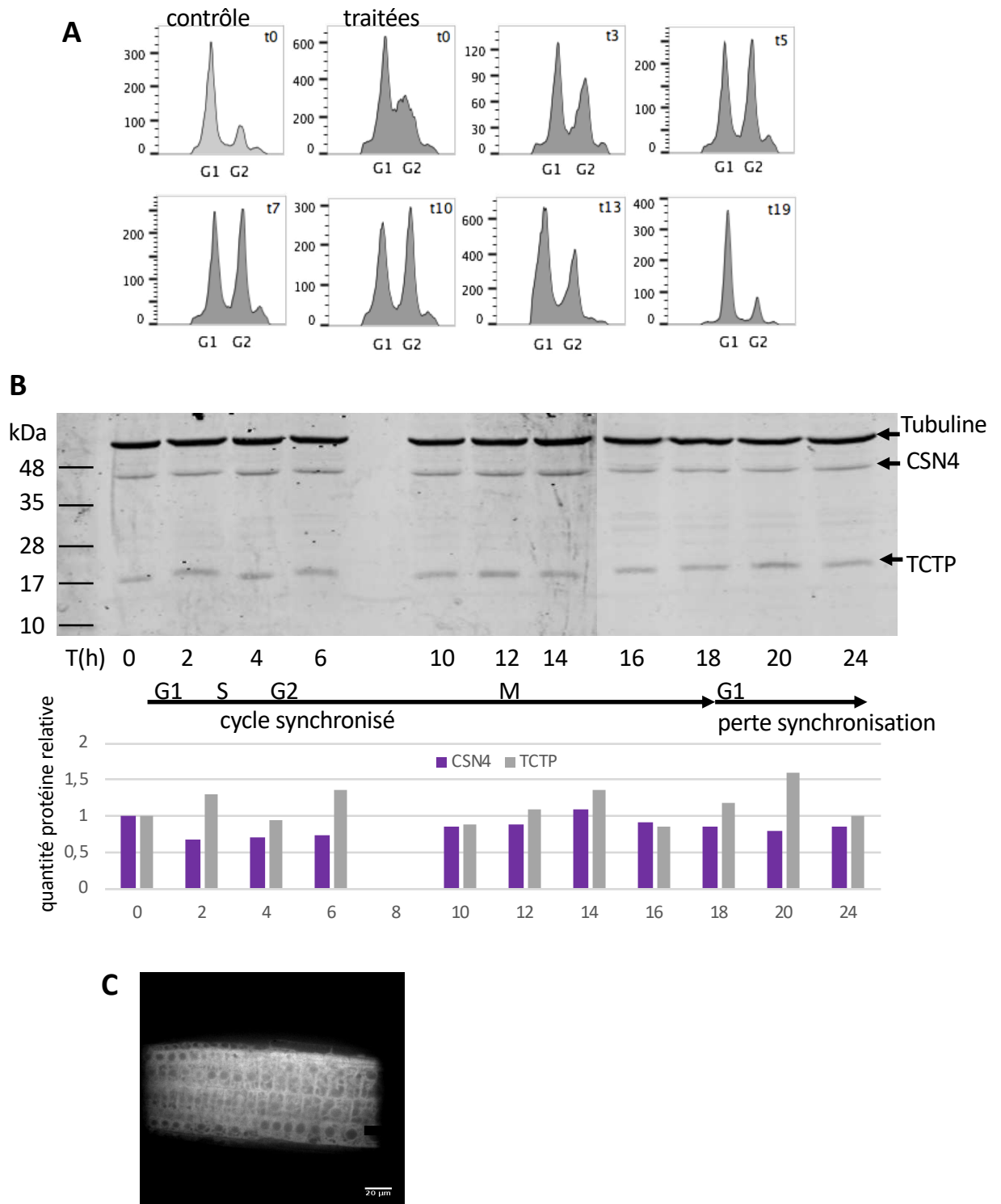


Figure II.20. Etude des niveaux protéiques de TCTP et CSN4 au cours du cycle cellulaire.

A,B. Des cellules de BY2 en culture liquide ont été synchronisées par de l'aphidicoline (traitées, gris foncé). Après retrait de la drogue (t0), des échantillons ont été prélevés à différents temps (indiqués en heures) pour permettre l'extraction des noyaux (A) ou des protéines totales (B).

A. Analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux après coloration de l'ADN au DAPI. Des cellules non traitées (contrôle, gris clair) sont montrées pour le temps t0, représentatif de tous les temps observés.

B. *Western Blot* révélé avec des anticorps anti -TCTP, -CSN4 et -TUBULIN et quantification associée. Les quantités de CSN4 (violet) et TCTP (gris) ont été normalisées par celle de TUBULIN.

C. Image représentative d'apex de racines exprimant *TCTPg-GFP* suivies par *root tracking* pendant 15h. Aucune modification du signal fluorescent n'est visible au cours du temps. Echelle : 20 µm.

B- Régulation de AtTCTP et AtCSN4 au cours du cycle cellulaire

Une autre question est comment la voie AtTCTP/AtCSN4 pourrait réguler la progression du cycle cellulaire uniquement à certains points clefs comme la transition G1/S, alors que CSN est impliqué plus globalement. Ainsi, j'ai étudié si AtTCTP voire AtCSN4 étaient régulées spécifiquement lors des différentes phases du cycle cellulaire. Pour cela, j'ai quantifié la quantité de AtTCTP et AtCSN4 par *Western blot* dans des échantillons prélevés toutes les deux heures sur des cellules de tabacs synchronisées (Figure II.20.A,B). J'ai également évalué la quantité d'ADN de ces cellules par cytométrie de flux pour y suivre la progression du cycle cellulaire (Figure II.20.A). Les niveaux de AtTCTP et AtCSN4 restent constants au cours du cycle cellulaire montrant qu'il n'y a pas de variation du niveau de ces protéines au cours des différentes phases du cycle cellulaire (Figure II.20.B).

De plus, j'ai suivi la fluorescence de la construction *AtTCTPg-GFP* par *root tracking* (Partie II.3.A) pendant 15h dans l'apex de la racine (Figure II.20.C). Je n'ai observé aucune différence flagrante ni de niveau (confirmant les résultats précédents), ni de localisation de AtTCTP-GFP. Conformément à ce qui avait été observé auparavant notamment dans le système hétérologue des feuilles de tabac (Betsch et al., 2019), AtTCTP semble cytosolique et parfois nucléaire. Ces données mettent donc en évidence une absence de régulation du niveau d'accumulation protéique de AtTCTP au cours du cycle cellulaire et ne permettent donc pas de conclure quant aux mécanismes conduisant à une spécificité d'action du complexe TCTP/CSN4 lors de la transition G1/S.

C- Étude du niveau d'expression des cyclines

Pour évaluer plus précisément le rôle de *AtTCTP* et *AtCSN4* dans la progression du cycle cellulaire, j'ai étudié l'effet de la dérégulation d'*AtTCTP* et *AtCSN4* sur le niveau d'expression de plusieurs cyclines, régulateurs clefs du cycle cellulaire, par RT-qPCR. Cette approche transcriptomique est loin d'être idéale car les régulateurs du cycle cellulaire sont connus pour être majoritairement régulés post-transcriptionnellement. Néanmoins, les outils protéomiques pour étudier le cycle cellulaire manquent cruellement chez les plantes par rapport aux animaux. Une approche transcriptomique reste donc intéressante puisqu'elle peut donner des indications sur la variation d'expression d'un grand nombre de gènes sur différentes lignées d'intérêt. Ainsi, j'ai mesuré l'expression de différentes cyclines chez les deux lignées perte de fonction indépendantes de *tctp* et *csn4* et chez le mutant ponctuel *csn4-2035* (Figure II.21). À cause de la létalité des mutants *tctp* et *csn*, j'ai dû travailler sur des plantules assez jeunes étant subi le protocole de sauvetage embryonnaire; ces conditions ont été appliquées à tous les échantillons. Les cyclines ont été choisies sur plusieurs critères : celles déjà connues pour être dérégulés chez *csn4* (Dohmann et al., 2008a) et celles connues pour être exprimés de manière spécifique en G1/S (Menges et al., 2005).

Certaines cyclines de classe D ont été étudiées car elles sont connues pour réguler la transition G1/S (Figure II.21.A). Parmi elles, *CYCD4;2*, *6;1* et *7;1* sont spécifiquement exprimées à la fin de la phase G1 alors que l'expression de *CYCD3;1* s'étend aux phases G2, M et G1 (Menges et al., 2005). Aucune dérégulation au niveau transcriptionnel n'est visible dans *csn4* pour *CYCD3;1* (Figure II.21.A).

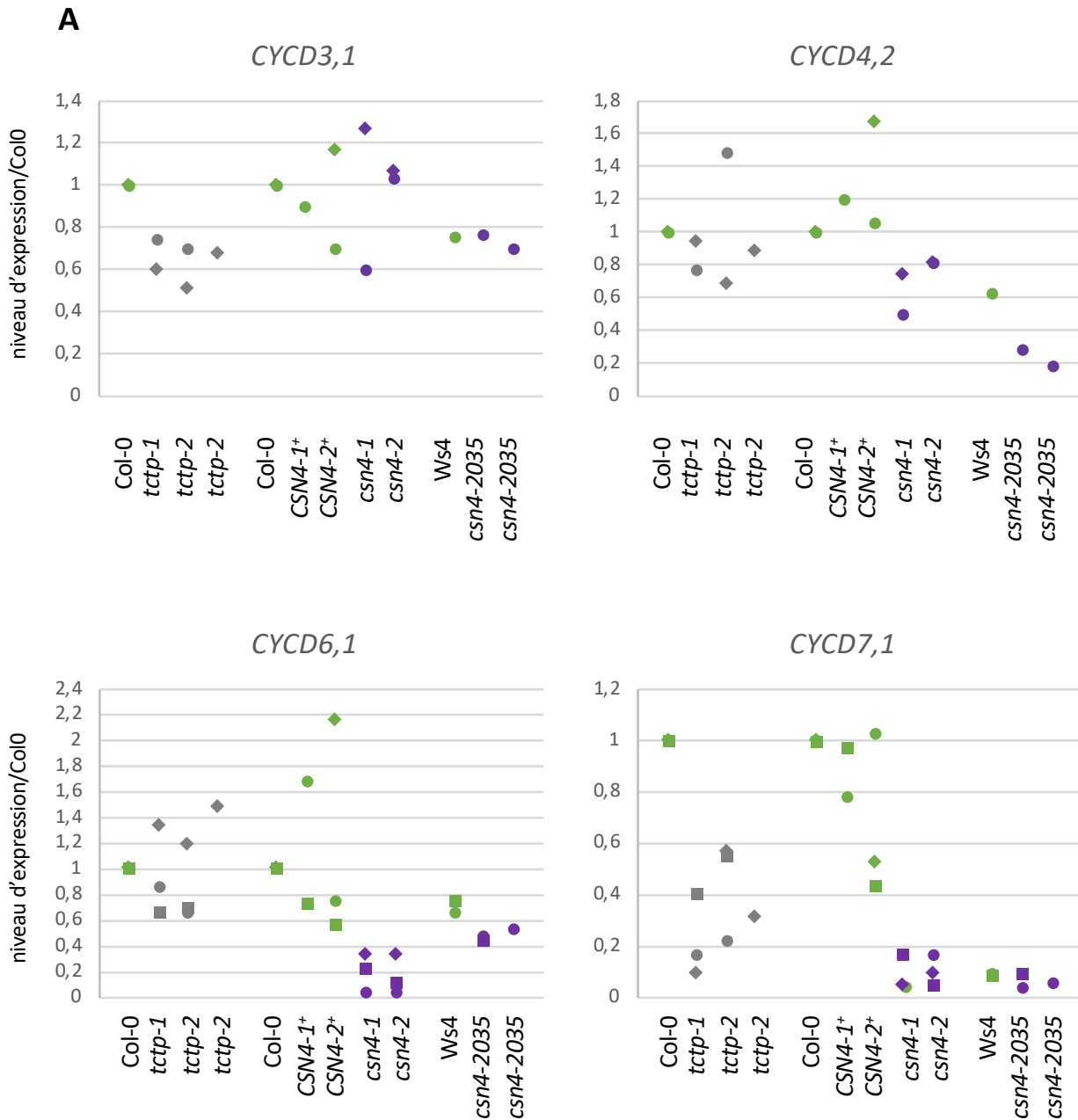


Figure II.21 A. Expression des cyclines (CYC) dans des plantules dérégulées pour *TCTP* ou *CSN4*.

Résultats de RT-qPCR réalisées sur des plantules des différents génotypes indiqués : sauvages (vert, Col0, Ws4, *CSN4-1+*, et *CSN4-2+*), perte de fonction pour *AtTCTP* (gris, *tctp-1*, *tctp-2*), perte de fonction et sous-exprimant *AtCSN4* (violet, *csn4-1*, *csn4-2* et *csn4-2035*). Trois répliques biologiques ont été réalisées (losanges, ronds, carrés).

A. Expression des cyclines de classe D

Il est dur de conclure quant à l'expression de cette cycline dans *tctp* car, même s'il est possible d'observer une légère diminution (valeur autour de 0,7 contre 1 pour Col0), celle-ci se fait pour des valeurs absolues d'expression extrêmement faibles et n'est pas donc probablement pas significative. Par contre, une claire diminution de l'expression de *CYCD4;2* est visible dans *csn4-2035* avec une tendance similaire pour les plantes *csn4* (Figure II.21.A). J'ai également observé une diminution de *CYCD6;1* et *CYCD7;1* dans les deux lignées indépendantes *csn4* (Figure II.21.A). Il est compliqué de conclure sur le niveau d'expression de ces deux dernières cyclines dans *csn4-2035* car elles semblent très peu exprimées dans le fond Ws4 (expression environ 40% plus faible pour *CYCD6;1* et 90% plus faible pour *CYCD7;1* que chez Col0) (Figure II.21.A). Cela peut s'expliquer soit par une inéquation des amorces de qPCR utilisées due à des SNP entre Col0 et Ws4, soit par une expression différentielle entre ces deux fonds génétiques. Concernant le génotype *tctp*, seule *CYCD7;1* semble légèrement sous-exprimée alors que les autres cyclines sont exprimées au niveau sauvage (Figure II.21.A). Ainsi, mes données démontrent que les cyclines D exprimées spécifiquement en G1 semblent être majoritairement sous-exprimées en absence de AtCSN4, alors que le rôle de AtTCTP paraît être plus limité et concerner spécifiquement *CYCD7;1*.

Parmi les cyclines de classe A, *CYCA3;1* et *CYCA3;2* sont exprimées uniquement pendant la phase S et *CYCA1;1* et *CYCA2;2* sont exprimées pendant les phases G2 et M. En cohérence avec des données déjà publiées pour *CYCA2;2* et *CYCA3;2* (Dohmann et al., 2008a), ces cyclines sont, à part *CYCA1;1*, nettement surexprimées dans les mutants *csn* (Figure II.21.B). Cependant, elles ne le sont pas ou peu dans *csn4-2035*, ce qui laisse supposer un effet majeur de la mort cellulaire dans le processus d'activation transcriptionnelle des cyclines A en absence de AtCSN4. En outre, la dérégulation de *AtTCTP* n'a aucun effet sur la transcription des cyclines A (Figure II.21.B).

Enfin, d'autres cyclines régulent les phases G2 et M : *CYCB1;1* qui est en plus liée à la voie de réponse aux dommages à l'ADN (Culligan et al., 2006) et *CYCB1;2*. La perte de fonction de *AtTCTP* n'a pas d'effet sur le niveau d'expression d'aucune de ces deux CYC (Figure II.21.C). En revanche, *CYCB1;1* est massivement surexprimée dans les mutants perte de fonction et allélique pour *AtCSN4*, conformément aux données déjà publiées pour *csn4* ((Dohmann et al., 2008a), Figure II.21.C). Au contraire, l'expression de *CYCB1;2* semble diminuée pour *csn4* et constante pour *csn4-2035* alors qu'elle avait été publiée comme augmentée dans *csn4* ((Dohmann et al., 2008a), Figure II.21.C).

Ces données de RT-qPCR permettent d'avoir une idée du fonctionnement global du cycle cellulaire dans les différents génotypes étudiés. En accord avec nos résultats précédents, elles confirment que AtTCTP et AtCSN4 joueraient toutes deux un rôle lors de la transition G1/S et que seule AtCSN4 aurait un impact sur les autres phases du cycle cellulaire. Ainsi, mes résultats suggèrent qu'il n'y a pas d'effet global de AtTCTP sur la régulation de l'expression des cyclines en général mais spécifiquement sur l'expression d'une cycline de la phase G1 : *CYCD7;1*. Au contraire, suite à la perte de fonction de *AtCSN4*, de nombreux effets sont visibles : sous-expression de certaines cyclines de phase G1 et surexpression de certaines cyclines des phases S, G2 et M. Cependant, une bonne partie de ces effets pourraient être des conséquences secondaires de la mort cellulaire plutôt que des conséquences primaires de l'absence de AtCSN4 car ils ne se retrouvent pas dans le mutant faible et viable *csn4-2035*.

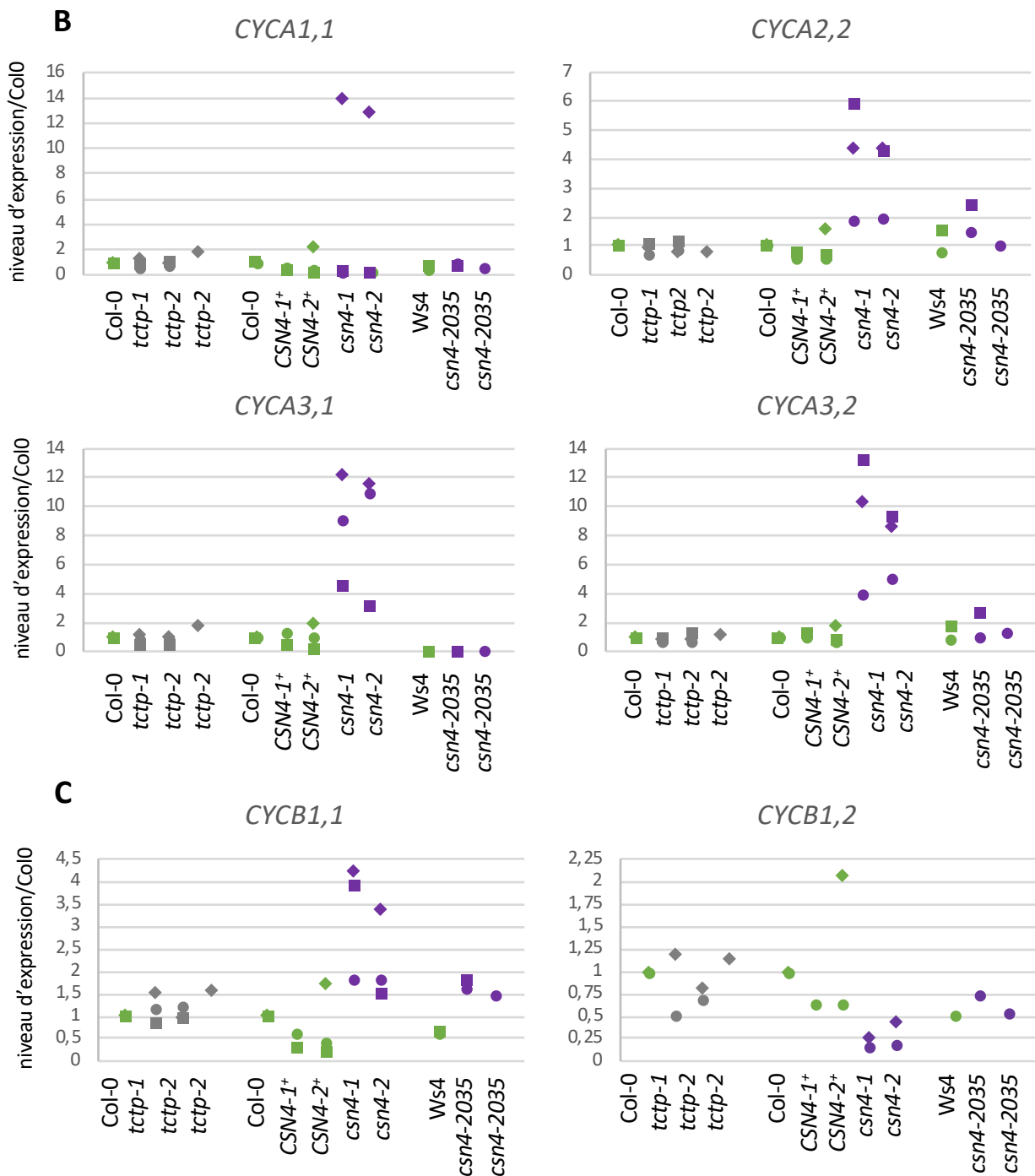


Figure II.21.B,C. Expression des cyclines (CYC) dans des plantules dérégulées pour *TCTP* ou *CSN4*.

Résultats de RT-qPCR réalisées sur des plantules des différents génotypes indiqués : sauvages (vert, Col0, Ws4, *CSN4-1+*, et *CSN4-2+*), perte de fonction pour *AtTCTP* (gris, *tctp-1*, *tctp-2*), perte de fonction et sous-exprimant *AtCSN4* (violet, *csn4-1*, *csn4-2* et *csn4-2035*). Trois réplicas biologiques ont été réalisés (losanges, ronds, carrés).

B. Expression des cyclines de classe A.

C. Expression des cyclines de classe B.

Ainsi les tendances retrouvées à la fois chez *csn4-1*, *csn4-2* et *csn4-2035*, comme la surexpression de *CYCB1;1* et la sous-expression de cyclines de phase G1, sont particulièrement intéressantes pour comprendre le rôle de AtCSN4.

J'ai voulu confirmer ces résultats de RT-qPCR par une autre méthode pour *CYCD6;1*, cycline exprimée lors de la transition G1/S. Pour cela, j'ai croisé les différentes lignées d'intérêt avec les lignées déjà décrites qui permettront de suivre *in vivo* l'expression de *CYCD6;1* : *pCYCD6;1::GUS-GFP* (Sozzani et al., 2010). Ces croisements sont en cours d'études et des résultats préliminaires ont été obtenus. Comme attendu, une fluorescence relativement faible est retrouvée chez certains embryons sauvages, au niveau de certaines cellules de la pointe racinaire au niveau de l'endoderme et/ou du péri-cycle (Figure II.22). Cette expression est cohérente avec celle déjà observée dans les cellules initiales du cortex et de l'endoderme et leurs descendantes (Sozzani et al., 2010). Aucune différence n'a été observée à première vue chez les mutants *csn4-2* (Figure II.22). Vu le faible niveau de fluorescence observée, une étude plus poussée est nécessaire pour déterminer si une baisse de l'expression de *CYCD6;1* est observable chez ces mutants, conformément aux données de RT-qPCR (Figure II.21). De façon surprenante, la zone d'expression de *CYCD6;1* semble grandement élargie chez le mutant *tctp-2* (Figure II.22). *CYCD6;1* y est exprimée plus apicalement, toujours au niveau de la même file cellulaire correspondant probablement à l'endoderme ou au péri-cycle. Des études plus poussées sont requises pour déterminer l'identité précise de cette file cellulaire. L'augmentation de l'expression de *CYCD6;1* chez le mutant *tctp* paraît assez surprenante notamment du fait des résultats de RT-qPCR qui indique une stabilité de son expression et une diminution d'une autre cycline de phase G1, *CYCD7;1* (Figure II.21). Néanmoins, les RT-qPCR ont été réalisées chez des plantules et non des embryons, il est donc totalement possible que la dynamique de l'expression de *CYCD6;1* soit différente dans ces deux tissus. Elle devra donc être confirmée par des études futures, notamment dans la lignée indépendante *tctp-1*. De plus, une lignée reportrice avec une fusion traductionnelle de *CYCD6;1* pourra également préciser ces résultats, notamment pour éclaircir si cette accumulation se retrouve au niveau protéique. Si ces résultats sont confirmés, il sera possible de supposer que l'accumulation de *CYCD6;1* dans les mutants *tctp* est une conséquence d'un blocage dans la transition G1/S conduisant à une accumulation des cyclines de phase G ne pouvant plus être dégradées en phase S.

D- Étude de l'activité des complexes CDK/CYC

Les résultats précédents laissent envisager que AtTCTP et AtCSN4 peuvent réguler une partie des complexes CDK/CYC en influant sur le niveau d'expression des cyclines. De tels résultats restent très lacunaires car, en plus de l'importance du contrôle de l'expression des cyclines, ils existent d'autres moyens majeurs de contrôle de l'activité de ces complexes comme la dégradation par la voie UB/protéasome des cyclines et la régulation de l'activité kinase des CDK par phosphorylation/déphosphorylation (Partie I.2.C). Pour avoir une vision plus globale, en collaboration avec Cécile Raynaud (*Institute of Plant Sciences Paris Saclay*, Équipe : *Chromosome Dynamics*), nous nous sommes intéressés au niveau d'activité des complexes CDK/CYC par test d'activité kinase ((Schönthal, 2004), Figure II.23). Ce test consiste à isoler les complexes CKC/CYC d'extraits protéiques, provenant ici de plantules des différents géotypes d'intérêt, puis à tester leur capacité à phosphoryler l'histone H1 *in vitro*.

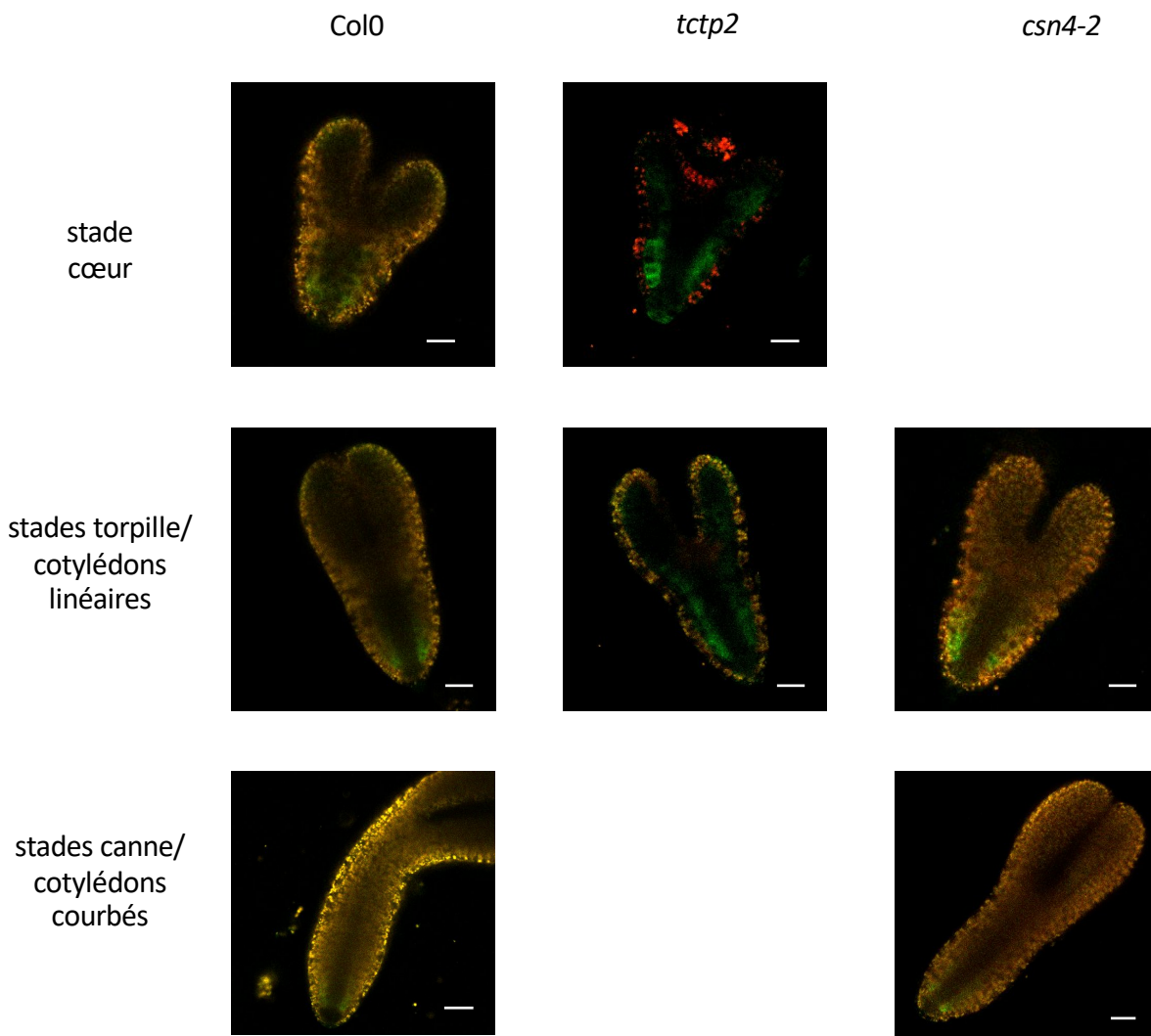


Figure II.22. Expression de *CYCD6;1* dans les embryons.

Images représentatives d'embryons de différents génotypes (*Col0*, *tctp2*, *csn4-2*) exprimant la construction *pCYCD6;1::GFP* à différents stades. La construction semble davantage exprimée chez les embryons *tctp2* par rapport aux embryons *Col0* et *csn4-2* aux différents stades considérés.

Vert : fluorescence de la GFP, rouge : autofluorescence de la chlorophylle.

Barre d'échelle : 15µm

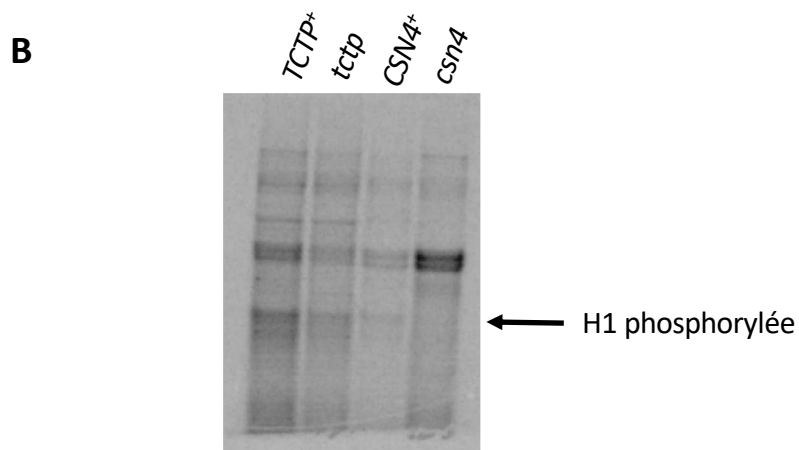
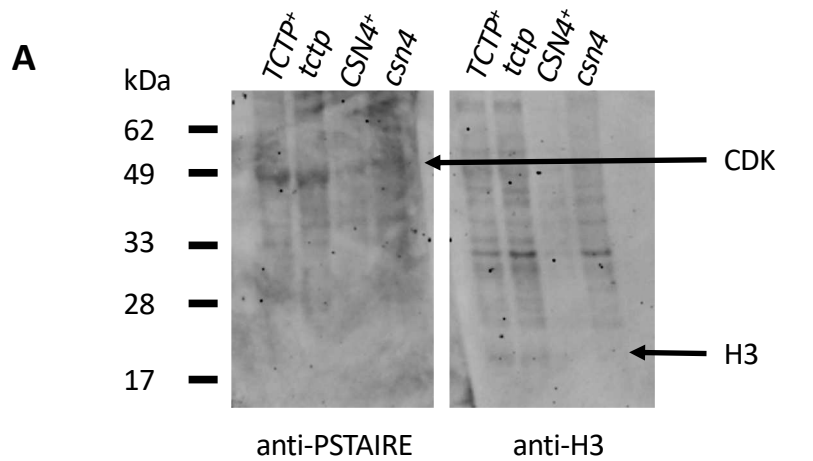


Figure II.23. L'activité des complexes CDK/CYC semble diminuer en absence de *TCTP* et *CSN4*.

A. *Western blots* réalisés après isolation, par des billes de sépharose couplées à la protéine CKS, des complexes CDK/CYC à partir de plantules des différents génotypes indiqués et révélés avec les anticorps anti-peptide(PSTAIRE) et anti-H3.

B. Après isolation des complexes CDK/CYC par des billes de sépharose couplées à la protéine CKS, ceux-ci sont mis en présence de leur substrat H1 et d'ATP marquée radioactivement. Des *western blots* sont ensuite réalisés et révélés par autoradiographie pour observer le niveau d'H1 phosphorylée.

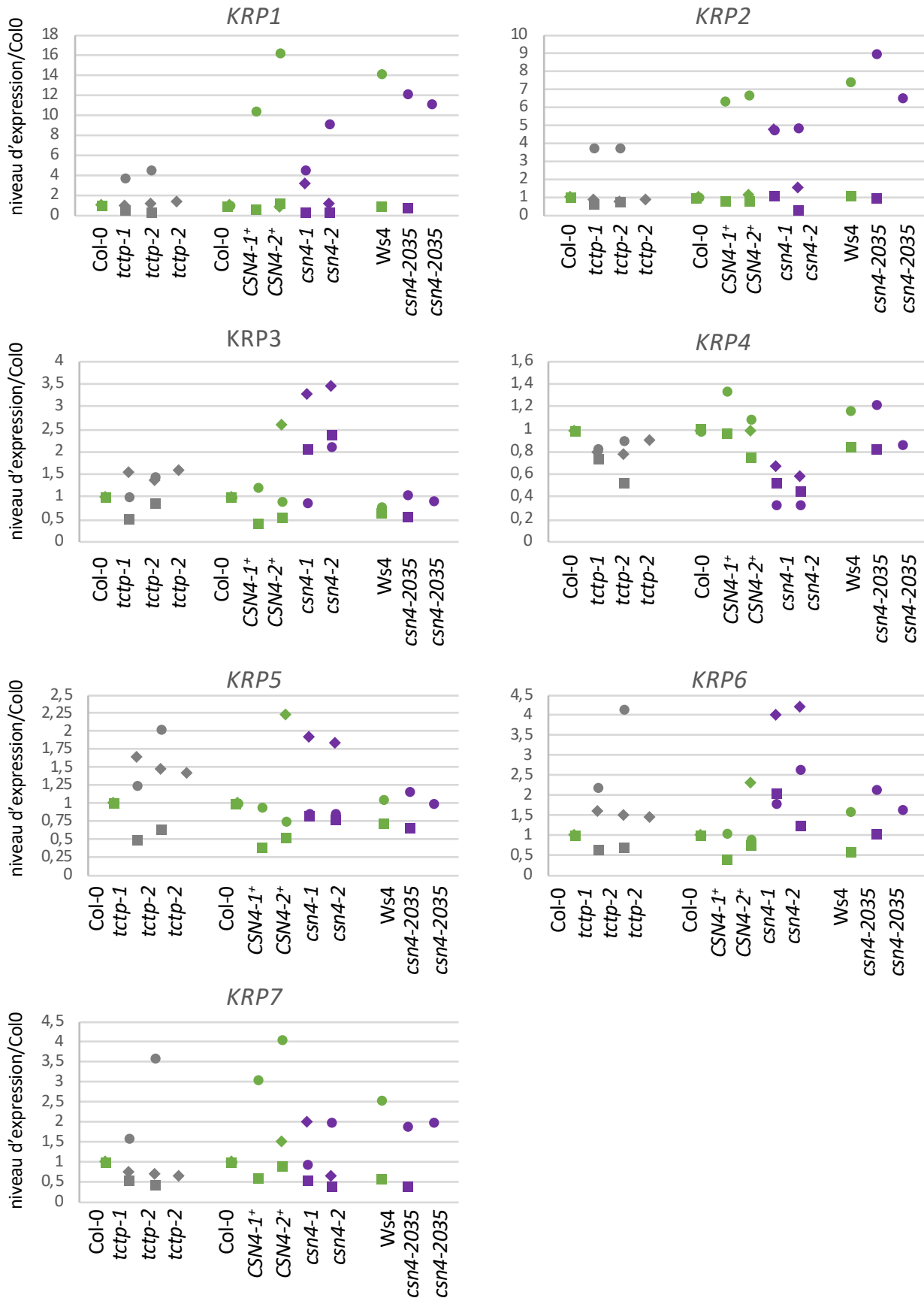


Figure II.24. Expression des KRP dans des plantules dérégulées pour *TCTP* ou *CSN4*.

Résultats de RT-qPCR réalisées sur des plantules des différents génotypes indiqués : sauvages (vert, Col0, Ws4, *CSN4-1+*, et *CSN4-2+*), perte de fonction pour *AtTCTP* (gris, *tctp1*, *tctp2*), perte de fonction et sous-exprimant *AtCSN4* (violet, *csn4-1*, *csn4-2* et *csn4-2035*). Trois répliques biologiques ont été réalisées (losanges, ronds, carrés).

Le niveau de phosphorylation de H1 est ensuite détecté par autoradiographie et permet d'estimer l'activité des complexes CDK/CYC. Des premiers essais ont permis d'obtenir des résultats préliminaires (Figure II.23). Pour les échantillons obtenus à partir de plantules *TCTP*⁺ et *tctp*, le niveau de charge et par conséquent la quantité de CDK/CYC isolés semblent être similaire (Figure II.23.A). Par contre, il semblerait que le niveau d'H1 phosphorylée soit légèrement inférieur dans les plantules *tctp* par rapport aux plantules *TCTP*⁺ (Figure II.23.B), laissant supposer que les complexes CDK/CYC y seraient moins actifs. L'échantillon issu des plantules *csn4* a clairement une quantité protéique de CDK/CYC isolés plus grande que celui issu des plantules *CSN4*⁺ (Figure II.23.A). Pourtant, le niveau de phosphorylation de H1 est supérieur chez *CSN4*⁺ par rapport à *csn4* (Figure II.23.B). Cela tend à indiquer que l'activité kinase des CDK/CYC est largement inférieure dans les plantules *csn4* par rapport aux plantules *CSN4*⁺. Ces résultats ne sont que préliminaires et d'autres répétitions sont nécessaires afin de pouvoir confirmer et quantifier la baisse d'activité des CDK/CYC en absence de *TCTP* et *CSN4*. Cette expérience est particulièrement intéressante car elle permet d'avoir accès à l'étape finale du processus : l'activité des complexes, et pas seulement à une étape plus intermédiaire comme l'expression ou la présence de tel ou tel élément du complexe. Cependant, elle ne permet pas de distinguer les différents complexes CYC/CDK entre eux.

Pour comprendre les mécanismes de régulation des complexes CDK/CYC, je me suis intéressée à une famille de régulateurs appelés KRP (Partie I.2.C). Ces protéines, par leur domaine C-terminal, peuvent se lier et ainsi inhiber l'activité de complexes CDKA/CYCD, régulant ainsi la transition G1/S. Elles semblent avoir également un rôle dans la transition G2/M. Leurs patrons d'expression sont relativement divers (Menges et al., 2005) : *KRP6* présente un pic à la transition G1/S, tandis que *KRP3* et *KRP5* sont majoritairement exprimés en phase S, *KRP4* en début de phase G2, *KRP1* en fin de phase G2 et en mitose. *KRP7* est exprimé de façon plus constitutive au cours du cycle. *KRP2* mais aussi *KRP1* sont exprimés de façon massive lors de l'entrée dans un nouveau cycle cellulaire après une phase de quiescence. Il est donc intéressant de voir comment leur expression pouvait évoluer dans les cas de dérégulations de *AtTCTP* et *AtCSN4*. La même approche par RT-qPCR que pour l'expression des cyclines (Figure II.21) a été réalisée (Figure II.24). Mes résultats montrent que *KRP1*, *KRP2* et *KRP7* ne présentent pas de changement d'expression dans les différents génotypes testés (Figure II.24). *KRP3* et *KRP4* présentent des effets spécifiques aux deux lignées *csn4*, donc probablement liés à la mort cellulaire : surexpression pour *KRP3* et sous-expression pour *KRP4* (Figure II.24). De façon surprenante, *KRP5* semble montrer une surexpression spécifiquement en absence de *AtTCTP* (Figure II.24). Enfin, il est particulièrement intéressant de remarquer que *KRP6*, dont l'expression est habituellement très forte lors de la transition G1/S, est surexprimé dans tous les mutants : *tctp*, *csn4* et *csn4-2035* (Figure II.24). Cette surexpression d'un inhibiteur des CDK/CYC peut expliquer au moins en partie le délai précédemment observé lors de la transition G1/S (Betsch et al., 2019; Brioudes et al., 2010). Pour confirmer l'influence de *TCTP* et *CSN4* sur l'expression de *KRP6* et étudier celle sur la stabilité de *KRP6*, j'ai suivi *in planta* différents marqueurs : *pKRP6::GFP* et *pKRP6::KRP6-GFP* dans mes lignées mutantes d'intérêt. J'ai voulu évaluer le niveau protéique de *KRP6* dans les embryons des lignées d'intérêt. Malheureusement, aucune fluorescence n'était visible pour la construction *pKRP6::KRP6-GFP* dans les embryons des génotypes Col0, *tctp* et *csn4* (données non montrées).

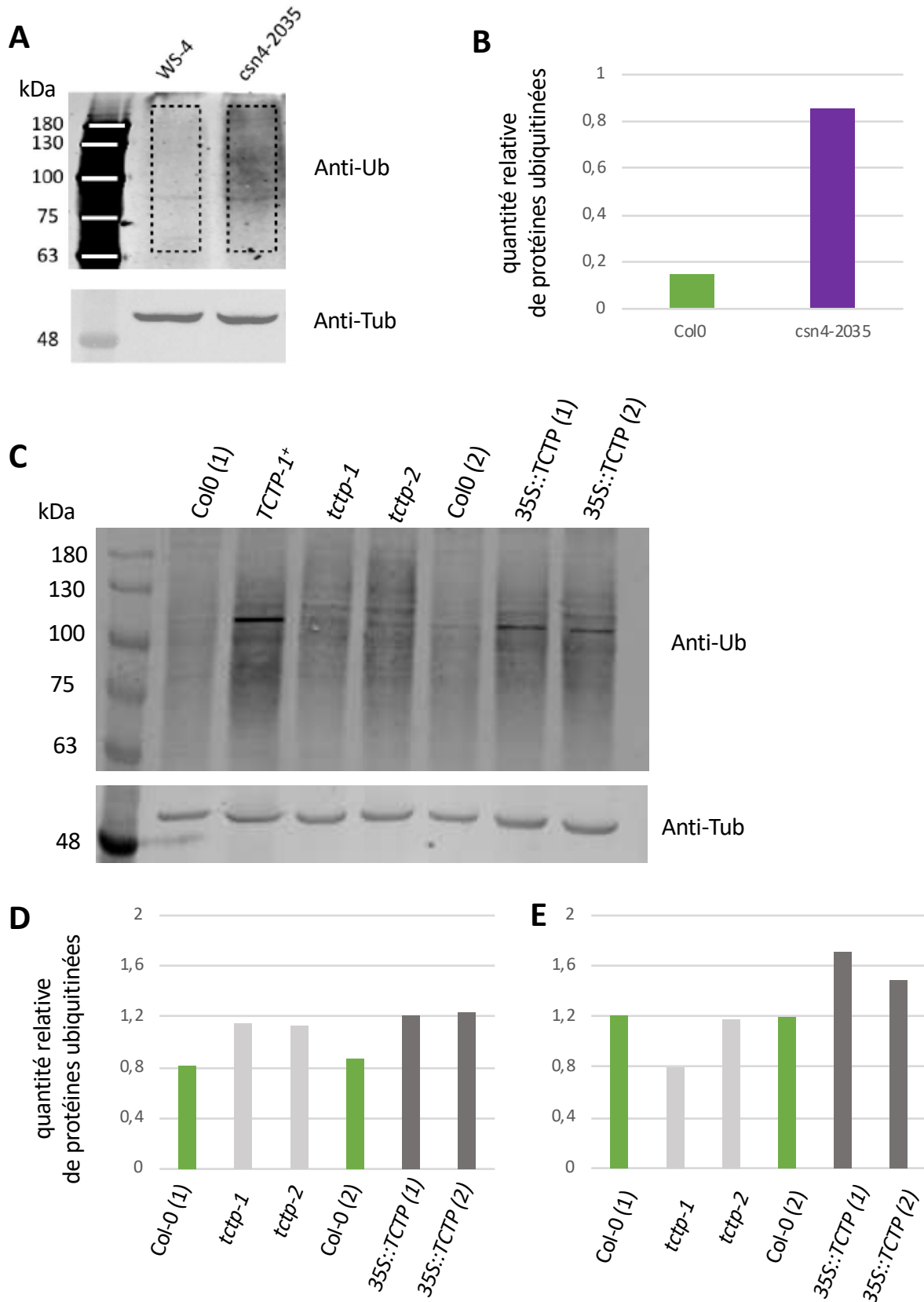


Figure II.25. Niveau d'ubiquitination général des protéines.

A,C. *Western blot* réalisés à partir d'extraits de protéines totales d'inflorescences des différents génotypes indiqués et révélés avec des anticorps anti-UBIQUITINE (Ub) et anti-TUBULINE (Tub).

B. Quantification de la quantité de protéines ubiquitinées relative à la quantité de Tub pour le *Western blot* présenté en A.

D,E. Quantification de la quantité de protéines ubiquitinées relative à la quantité de Tub. Les valeurs indiquées sont les moyennes obtenues par la quantification de deux gels réalisés à partir d'inflorescences (D) et de feuilles (E). Le gel présenté en C est un des deux gels quantifié en D.

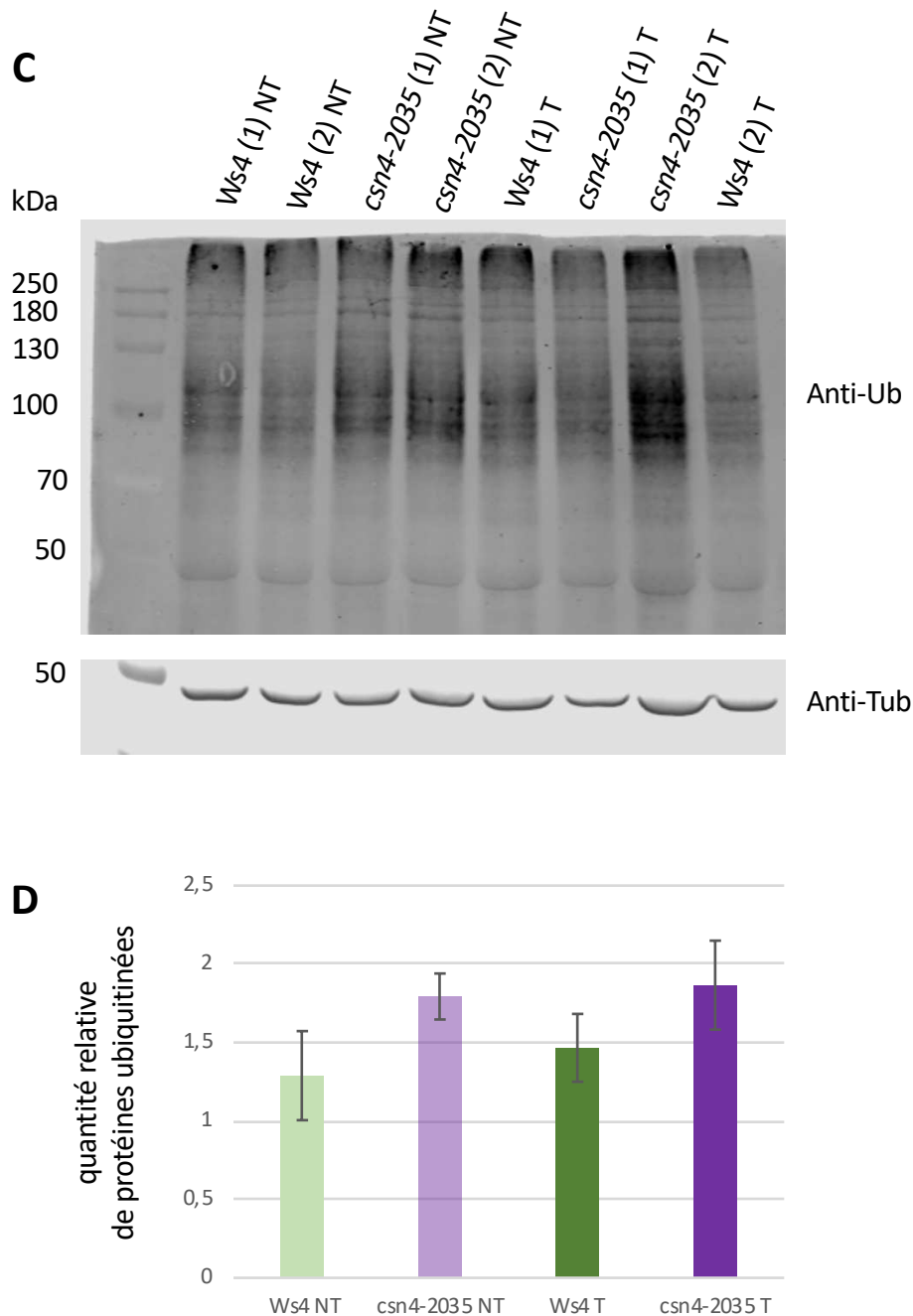


Figure II.26.C,D. Effet du traitement au MG132 sur le niveau d'ubiquitination général des protéines.

C. *Western blot* réalisés à partir d'extraits de protéines totales de plantules des génotypes indiqués traités (T) ou non (NT) avec 10 μ M de MG132 et révélés avec des anticorps anti-UBIQUITINE (Ub) et anti-TUBULINE (Tub).

D. Quantification de la quantité de protéines ubiquitinées relative à la quantité de Tub dans les conditions indiquées. Les valeurs moyennes indiquées pour chaque condition ont été calculées à partir de deux répliques biologiques, chacun déposé sur deux gels indépendants. Les barres d'erreur indiquent l'écart type.

Le niveau de KRP6 doit être trop faible pour pouvoir être visualisé par fluorescence. Néanmoins, ces expériences doivent être répétées, et l'analyse des autres lignées avec marqueurs et dans d'autres organes (racine) complétées pour pouvoir tirer une conclusion.

E- Régulation des niveaux protéiques

Il est probable que le contrôle de la progression du cycle cellulaire *via* AtTCTP/AtCSN4 passe par la régulation de la dégradation d'un certain nombre de protéines, étant donné le lien déjà observé entre cette voie et la neddylation des CUL et donc la voie Ub/protéasome (Betsch et al., 2019). J'ai, dans un premier temps, évalué si cette voie dérégule un grand nombre de protéines ou si elle semble plus spécifique. Pour ces études, j'ai travaillé avec un étudiant en L3, qui j'ai encadré pendant son stage. Sur des extraits de protéines totales venant de plantules de différents génotypes, nous avons utilisé un anticorps anti-Ub, reconnaissant toutes les formes de protéines ubiquitinées, pour révéler le niveau global d'ubiquitination (Figure II.25). En accord avec les données déjà publiées pour *csn1* et *csn3* (Peng et al., 2001), le niveau global d'ubiquitination est environ 5,7 fois plus élevé dans le mutant *csn4-2035* que dans le sauvage (Figure II.25.A,B). Des gels postérieurs ont également mis en évidence un niveau plus élevé d'ubiquitination chez le mutant *csn4-2035* par rapport au sauvage, bien que la différence soit moindre, avec une augmentation uniquement de 1,4 fois (Figure II.26.C,D). Ces résultats sont cohérents puisque AtCSN4 appartient au complexe CSN qui déneddyle les CUL et conduit ainsi à l'inactivation des complexes CRL (Partie I.3.C). La perte de AtCSN4 peut donc conduire à une hyper activité des complexes CRL et donc à une augmentation globale du niveau d'ubiquitination. Les différences entre les différents niveaux d'ubiquitination peuvent possiblement s'expliquer par la différence du matériel utilisé : inflorescences pour la figure II.25 et plantules pour la figure II.26.

Concernant les mutants *tctp*, le niveau d'ubiquitination semble stable par rapport aux plantes sauvages au niveau des feuilles (Figure II.25.E) et stable voire augmenté au niveau des inflorescences (Figure II.25.C,D). Cela semble à première vue contre-intuitif : le niveau de neddylation étant plus faible dans ces mutants, on s'attendrait à une baisse globale du niveau d'ubiquitination. Cependant, la régulation entre neddylation et ubiquitination est beaucoup plus complexe qu'une simple relation de cause à effet, notamment vu que la déneddylation, en plus d'inactiver les complexes CRL, peut leur permettre de changer d'adaptateur et ainsi de substrat et peut augmenter la stabilité des différentes sous-unités (Partie I.3.C, (Hotton and Callis, 2008)). Les mutants *35S::TCTP* présentent également un niveau d'ubiquitination stable voire légèrement augmenté par rapport au sauvage que ce soit dans les feuilles ou les inflorescences (Figure II.25.C,D,E). Ce résultat semble cohérent avec un effet limité de la surexpression de *TCTP* sur le phénotype des plantes et une augmentation de la neddylation des CUL (Betsch et al., 2019).

L'observation du niveau global d'ubiquitination est instructive mais comprend une limite importante : il est impossible de différencier l'effet d'une modification de l'activité enzymatique d'ubiquitination des protéines de celui d'un changement dans l'efficacité de dégradation par le protéasome des protéines ubiquitinées. Pour avoir une vision plus claire du niveau d'ubiquitination sans prendre en compte une potentielle activité différentielle du protéasome, j'ai aussi quantifié le niveau d'ubiquitination après traitement au MG132, un inhibiteur du protéasome ((Hakenjos et al., 2011), Figure II.26).

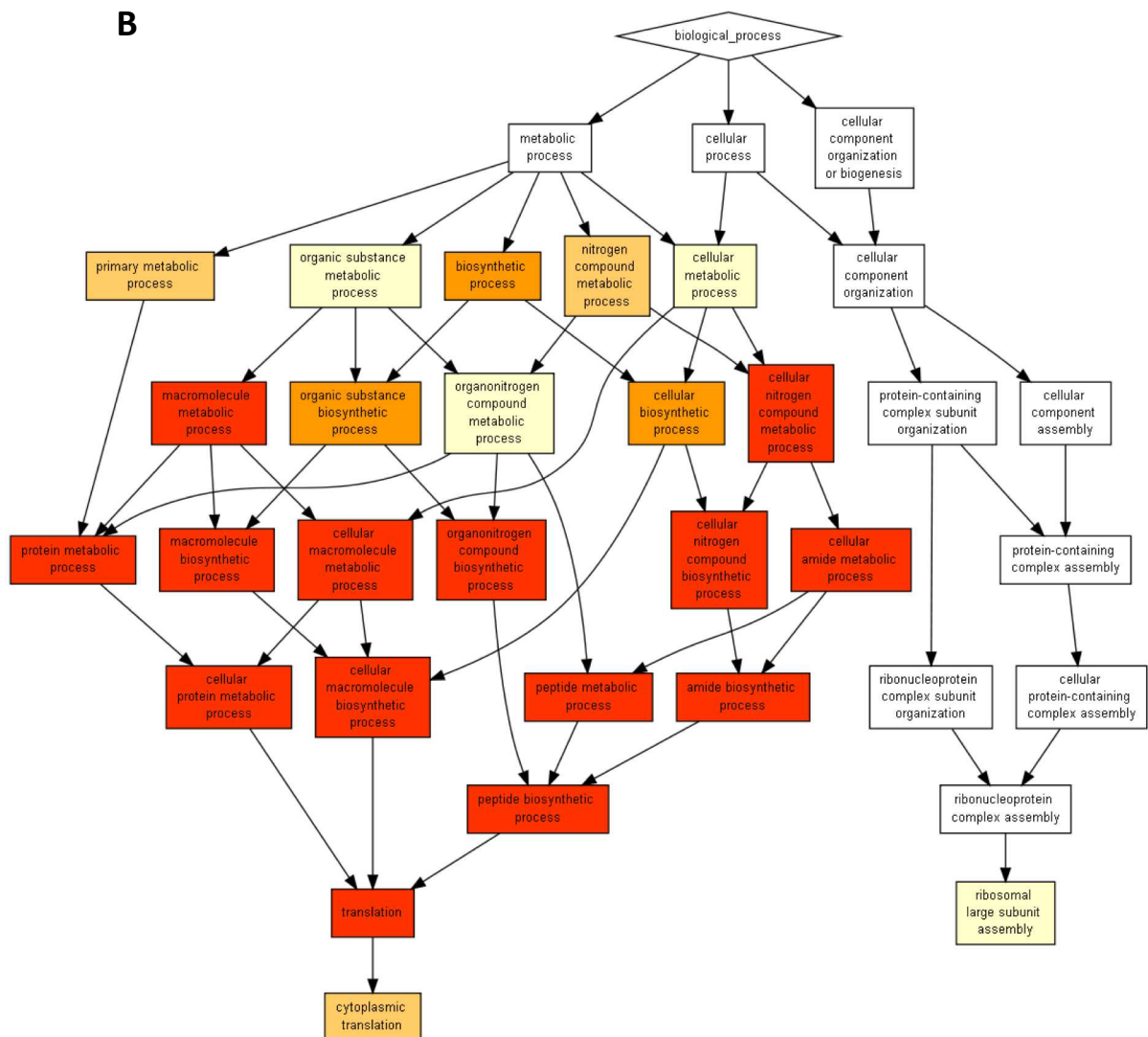
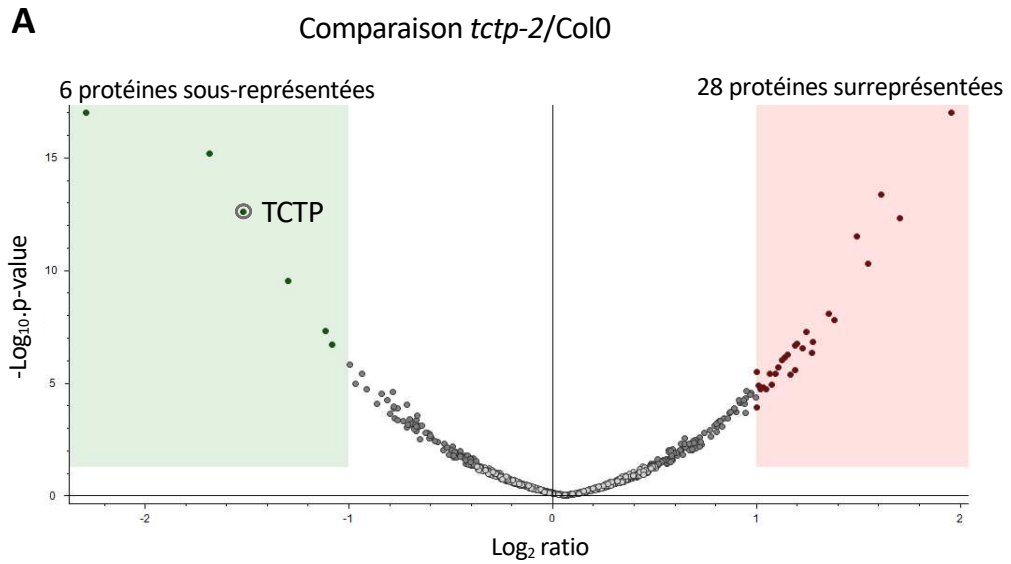


Figure II.27.A, B. Etude protéomique des mutants *tctp-2*, *35S::TCTP* et *csn4-2035*

A. Suite à une analyse par spectrométrie de masse, les protéines différentiellement présentes entre les génotypes *tctp-2* et Col0 sont représentées. Les zones verte et rouge correspondent respectivement aux protéines sous-représentées (dont TCTP) et surreprésentées chez *tctp-2* par rapport à Col0. La liste complète est disponible en annexe (VI.4.A,B).

B. Analyse de *Gene Ontology* sur les protéines surreprésentées chez *tctp-2*.

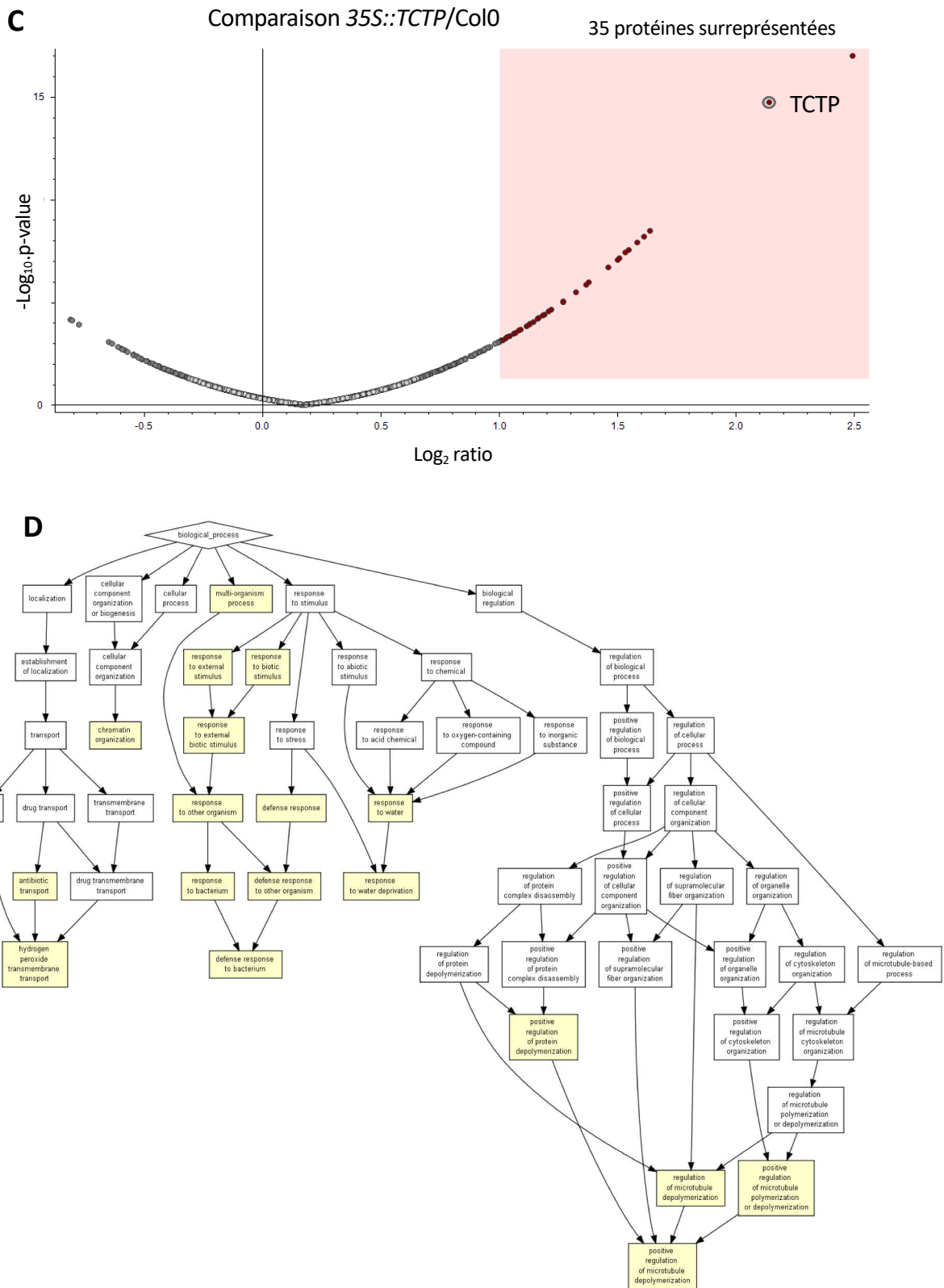
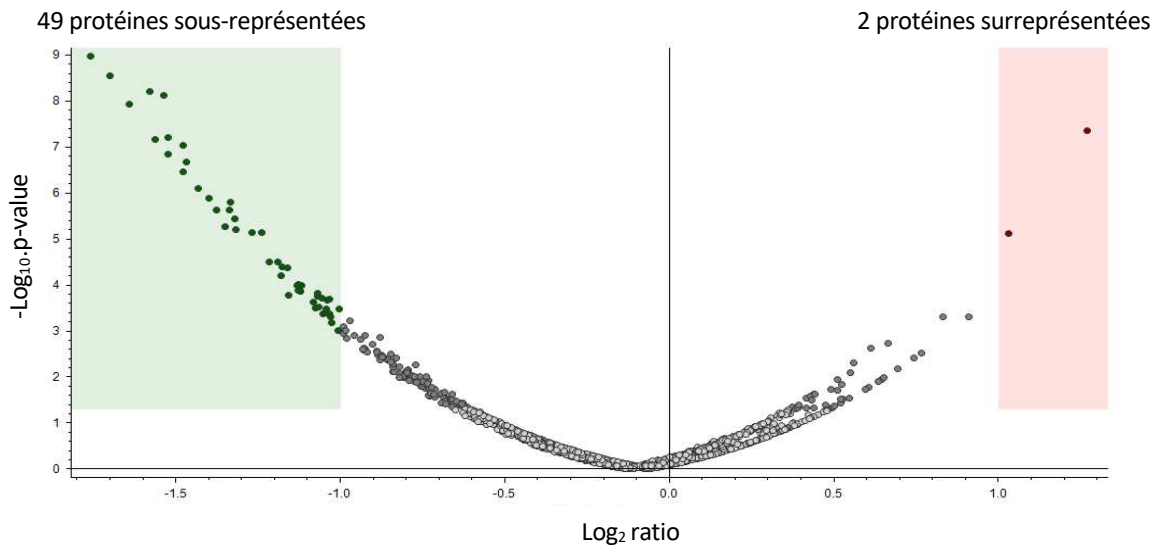
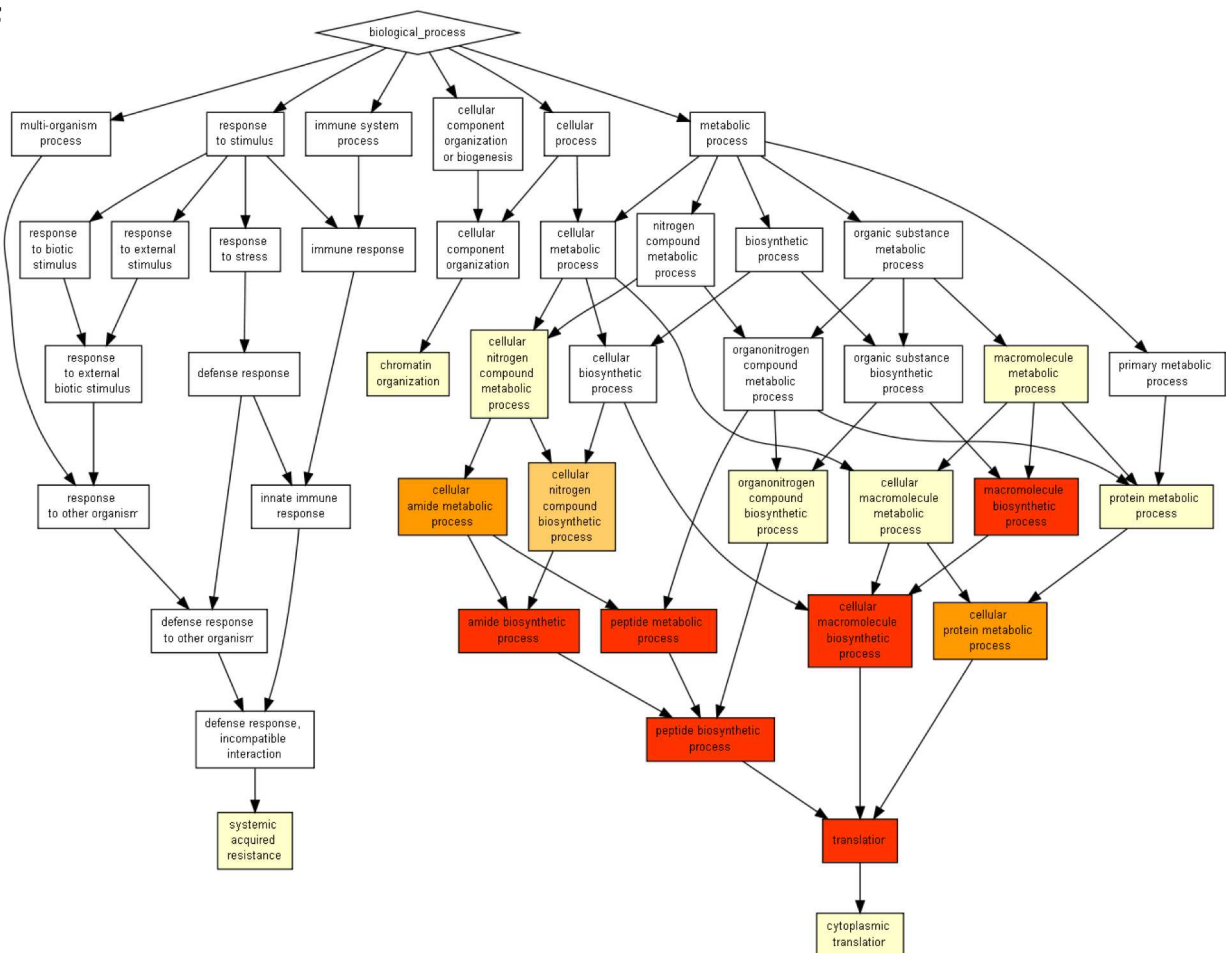


Figure II.27.C,D. Etude protéomique des mutants *tctp2*, *35S::TCTP* et *csn4-2035*

C. Suite à une analyse par spectrométrie de masse, les protéines différentiellement présentes entre les génotypes *35S::TCTP* et Col0 sont représentées. La zone rouge correspond aux protéines surreprésentées chez *35S::TCTP* par rapport à Col0 (dont TCTP). La liste complète est disponible en annexe (VI.4.C).

D. Analyse de *Gene Ontology* sur les protéines surreprésentées chez *35S::TCTP*.

EComparaison *csn4-2035*/Col0**F****Figure II.27.E,F. Etude protéomique des mutants *tctp2*, *35S::TCTP* et *csn4-2035***

E. Suite à une analyse par spectrométrie de masse, les protéines différentiellement présentes entre les génotypes *csn4-2035* et Col0 sont représentées. Les zones verte et rouge correspondent respectivement aux protéines sous-représentées et surreprésentées chez *csn4-2035* par rapport à Col0. La liste complète est disponible en annexe (VI.4.D,E).

F. Analyse de *Gene Ontology* sur les protéines sous-représentées chez *csn4-2035*.

En présence de MG132, les protéines ubiquitinées ciblées au protéasome ne sont donc plus dégradées et peuvent donc être révélées par l'anticorps anti-Ub. J'ai premièrement traité de jeunes plantules sauvages de 5 jours en les déplaçant sur des milieux contenant différentes concentrations de MLN132 de 0 à 50 μ M. Les premières données obtenues montrent une augmentation d'environ 40% du niveau d'ubiquitination dès un traitement à 20 μ M de MG132 (Figure II.26.A,B). Une augmentation du niveau d'ubiquitine a pu être retrouvée à la fois sur des plantules sauvages et *csn4-2035* traitées avec 42 μ M de MG132. Cependant cette augmentation était moins importante et donc difficile à quantifier (Figure II.26.C,D). Il pourrait être judicieux de tester d'autres manières d'administrer la drogue comme des infiltrations de feuilles pour atteindre une efficacité de traitement plus grande.

Ces approches permettent d'avoir une idée de l'ampleur des modifications du système Ub/protéasome suite aux dérégulations de *AtTCTP* et *AtCSN4*, mais ne permettent en aucun cas d'identifier des protéines spécifiques qui seraient régulées. Pour pallier ce manque, j'ai commencé, en collaboration avec A. Page de la *Protein Science Facility* de la SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL), deux expériences de spectrométrie de masse permettant d'identifier les protéines différentiellement présentes dans des extraits de protéines totales d'un côté de Col0, *tctp-2* et *35S::TCTP* et d'un autre Col0 et *csn4-2035* (Figure II.27). Pour chacun des trois réplicas biologiques de chaque génotype, j'ai récolté des jeunes feuilles caulinaires de 3 plantes issues de sauvetage embryonnaire. La comparaison des mutants *tctp-2* et *35S::TCTP* au sauvage Col0 montrent la présence de respectivement 28 et 35 (dont AtTCTP) protéines surexprimées; 6 (dont AtTCTP) et 0 protéines sous-exprimées (Figure II.27.A,C, Annexe 4). On ne retrouve pas ici, comme on pourrait s'y attendre, des protéines sous-exprimées dans *tctp-2* qui seraient surexprimées dans *35S::TCTP* ou l'inverse. Dans les protéines surexprimées chez *tctp-2*, une analyse de *Gene Ontology* indique une surreprésentation de protéines impliquées dans la traduction, le métabolisme et la biosynthèse des peptides avec par exemple de nombreuses protéines ribosomales (Figure II.27.B). Les protéines surexprimées chez *35S::TCTP* sont différentes et interviennent dans des processus variés; aucune fonction cellulaire ne semble particulièrement enrichie (Figure II.27.D). Chez les mutants *csn4-2035*, ont été identifiées 2 protéines surexprimées et 49 sous-exprimées (Figure II.27.E). Parmi ces protéines sous-exprimées, celles impliquées dans la traduction, le métabolisme et la biosynthèse des protéines sont surreprésentées (Figure II.27.F). Ainsi, des protéines fonctionnellement proches sont à la fois surexprimées chez *tctp-2* et sous-exprimées chez *csn4-2035*; 7 protéines sont même en commun entre ces deux conditions : les protéines ribosomales 60S L17-2, L13a-2, L7a-1, L36a, L37-2 et L19-1 et la protéine ribosomale 40S S26-3 (Annexe 4).

F- Lien de la voie AtTCTP/AtCSN4 avec la voie de dommage à l'ADN

Individuellement CSN4 et TCTP ont déjà été décrits comme impliqués dans la voie de réponse aux dommages à l'ADN dans différents organismes (Parties I.4.C et 1.5.B). Chez *A. thaliana*, les mutants *csn4* sont caractérisés par un niveau élevé de dommages à l'ADN, notamment de cassures double brin (Dohmann et al., 2008a). Néanmoins, chez les plantes, aucun lien n'a jamais été fait entre TCTP et les dommages à l'ADN au contraire des modèles cellulaires humaines et drosophiles où TCTP est impliqué dans la réponse aux dommages à l'ADN, plus spécifiquement aux cassures double brin (Hong and Choi, 2013; Zhang et al., 2012).

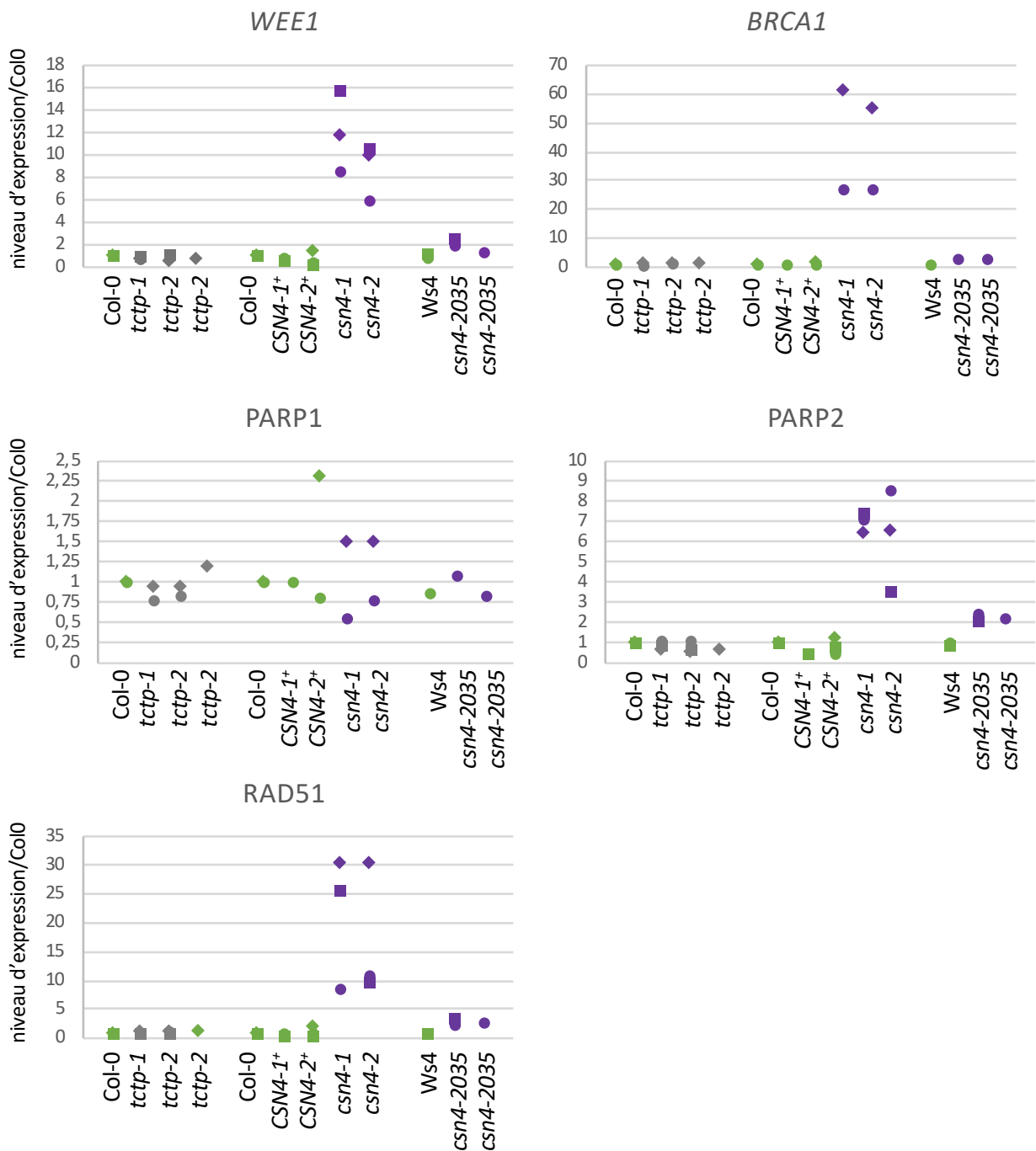


Figure II.28. Expression de gènes liés au dommage à l'ADN dans des plantules dérégulées pour *TCTP* ou *CSN4*.

Résultats de RT-qPCR réalisées sur des plantules des différents génotypes indiqués : sauvages (vert, Col0, Ws4, *CSN4-1+*, et *CSN4-2+*), perte de fonction pour *AtTCTP* (gris, *tctp-1*, *tctp-2*), perte de fonction et sous-exprimant *AtCSN4* (violet, *csn4-1*, *csn4-2* et *csn4-2035*). Trois réplicas biologiques ont été réalisés (losanges, ronds, carrés).

Pour avoir une idée du lien entre ces différentes voies, j'ai commencé par étudier le niveau d'expression de certains gènes impliqués dans la réponse aux dommages à l'ADN et connus pour être massivement surexprimés chez *csn4* ((Dohmann et al., 2008a), Figure II.28). AtWEE1 est une kinase importante dans les points de contrôle au stress répliatif et aux dommages à l'ADN ((De Schutter et al., 2007), Partie I.2.E). AtRAD51 est une protéine clef nécessaire à la méiose mais aussi surexprimée et impliquée dans la réparation de l'ADN suite à des cassures double et simple brins (Li et al., 2004). AtBRCA1 est induit fortement suite à des cassures double brins et nécessaire à leur réparation (Reidt et al., 2006). Enfin, AtPARP1 et AtPARP2 sont deux poly(ADP-ribose) polymérase qui régulent la réparation des dommages à l'ADN et la réponse au stress (Gu et al., 2019). Par une approche de RT-qPCR similaire à celle décrite précédemment (Figure II.21), j'ai confirmé que tous ces gènes, à l'exception de *AtPARP1*, sont très fortement surexprimés (jusqu'à 30 fois pour *AtRAD51* et même plus pour *AtBRCA1* par exemple) dans les mutants *csn4* et également surexprimés, bien que de façon moins forte (environ 3 fois pour *AtRAD51*), dans les mutants *csn4-2035* (Figure II.28). Ainsi, même si la mort cellulaire contribue pour une grande partie à l'augmentation du nombre de dommages à l'ADN, AtCSN4 doit être requis pour la prévention et/ou la réparation des dommages à l'ADN. Au contraire, chez les mutants *tctp*, aucune différence dans l'expression de ces gènes n'a été observée par rapport au sauvage (Figure II.28). Cela indique que, contrairement à chez les animaux, AtTCTP ne semble pas jouer un rôle majeur dans la régulation de la voie de réponse aux dommages de l'ADN, ou du moins pas dans une proportion semblable à celle assurée par AtCSN4.

G- Discussion et perspectives

a- Progression du cycle cellulaire

Les travaux auxquels j'ai participé (Betsch et al., 2019) avaient déjà permis de mettre en évidence que les cellules de tabacs sous-exprimant *NtTCTP* ou *NtCSN4* présentent un délai de 4h au niveau de la transition G1/S. De plus les plantes ARNi pour *AtTCTP* ou *AtCSN4* présentent également une diminution de la croissance mitotique (Betsch et al., 2019; Brioudes et al., 2010). Plus précisément, des essais d'incorporation d'EdU dans les racines de ces plantes montrent un délai de 3/4h du cycle cellulaire pour une durée de phase S inchangée (Betsch et al., 2019). Cela laisse supposer un délai soit dans la phase G1 et la transition pour entrer en phase S soit plus tardivement dans les phases G2 et M. Or mes données de *root tracking* (Figure I.19) indiquent que les phases G2 et M se déroulent normalement chez le mutant *tctp*. En regroupant ces deux résultats, il est possible de conclure que les mutants *tctp* présentent un délai impactant la durée de la phase G1, retardant ainsi l'entrée en phase S. Cela confirme bien les résultats obtenus chez le tabac qui mettaient en évidence un retard dans la transition G1/S.

Il aurait été particulièrement intéressant de suivre la transition G1/S par *root racking* dans les différents mutants. Malheureusement, je n'ai pas réussi à établir de marqueur approprié. Utiliser le marqueur publié *pAtPCNA1::AtPCNA1-sGFP* aurait permis de différencier les phases G1 et G2 (fluorescence dans le noyau entier), la phase S précoce (fluorescence ponctuelle), la phase S tardive (fluorescence tachetée) et la phase M (pas de fluorescence) (Yokoyama et al., 2016). Je n'ai cependant pas pu me procurer ces lignées, adaptées pour suivre le déroulement du cycle dans sa totalité.

En outre, il aurait aussi été crucial de suivre la progression du cycle cellulaire chez les mutants *csn4*. Dû à leur létalité peu après germination, cela n'est pas possible chez les mutants perte de fonction. Les mutants *csn4-2035* introgressés dans Col0 seront par contre un bon modèle d'étude, une fois croisés avec les différentes lignées rapportrices. Il sera intéressant d'y étudier non seulement la transition G1/S mais également la transition G2/M car des données contradictoires existent dans la littérature. Les mutants *csn4* ont premièrement été publiés comme présentant un délai dans la phase G2 (Dohmann et al., 2008a). Cependant les défauts mis en évidence dans cette étude comme la surexpression massive de *CYCBI;1* sont probablement liés en grande partie à la voie de dommages à l'ADN et à la mort cellulaire (Dohmann et al., 2008a). Au contraire, des données plus récentes montrent que le pourcentage de cellules exprimant la construction *pCYCBI;2::GUS* est semblable dans les embryons sauvages et *csn2*, suggérant que ces mutants ne présentent pas de délai de la phase G2 (Franciosini et al., 2015). Ainsi le rôle de CSN en général, et CSN4 en particulier, dans la transition G2/M demande à être précisé.

Pour mieux comprendre comment la voie TCTP/CSN4 régule spécifiquement la transition G1/S, j'ai étudié si l'accumulation d'AtTCTP ou éventuellement d'AtCSN4 étaient régulées spécifiquement en fonction de la phase du cycle cellulaire. J'ai démontré que ni le niveau de protéique de AtTCTP ni celui de AtCSN4 ne varie au cours du cycle cellulaire (Figure II.20.A,B). De même, la localisation de AtTCTP n'évolue pas au cours de la progression du cycle cellulaire (Figure II.20.C). Ces résultats montrent que aussi bien AtTCTP que AtCSN4 sont présentes tout au long du cycle cellulaire. Cela ne permet donc pas d'avancer sur les mécanismes responsables de la spécificité d'action de AtTCTP/AtCSN4 lors la transition G1/S. Parmi les hypothèses envisageables concernant ces mécanismes, il est possible de retenir notamment celle postulant que l'interaction entre TCTP et CSN4 se ferait spécifiquement lors de la transition G1/S. Cette hypothèse pourrait être testée en réalisant des co-immunoprécipitations à différents temps sur des cellules BY2 de tabac synchronisées. Néanmoins, ces expériences sont difficiles à réaliser à la vue de la quantité de matériel nécessaires pour la co-immunoprécipitation. Une hypothèse alternative serait d'envisager une spécificité importante parmi les cibles de la voie TCTP/CSN4 qui la relierait directement à la transition G1/S.

b- Étude transcriptomique des régulateurs clefs du cycle cellulaire

J'ai essayé de disséquer la voie moléculaire de régulation du cycle cellulaire par AtTCTP/AtCSN4. Pour cela, j'ai premièrement mené une approche transcriptomique. Cette approche a beaucoup de limites comme de nombreux joueurs de clefs dans la régulation du cycle cellulaire sont plutôt régulés post-traductionnellement (Partie I.2.C). Néanmoins, elle m'a permis de faire une étude quasi systématique d'un grand nombre de gènes. J'ai ainsi confirmé que les mutants *csn4* sont affectés à différents endroits du cycle cellulaire (Figure II.21,24). Comparer mes données avec celles déjà publiées (Dohmann et al., 2008a) a consolidé certains effets communs comme les surexpressions de *CYCA2;2*, *CYCA3;1* et *CYCBI;1* et la sous-expression de *KRP4*. Malheureusement, je n'ai pas pu comparer sur l'ensemble des gènes car l'étude ne donne les valeurs que pour ceux dont l'effet est le même pour les différents mutants *csn3-1*, *csn4-1* et *csn5a2 csn5b-1*. Ainsi, pour les gènes des autres *CYC* et *KRP*, les seules

données publiées ne permettent pas de trancher si leur expression était changée uniquement dans *csn4-1* et pas dans les autres mutants ou si aucun effet n'était visible.

Combinées à mes données, une hypothèse intéressante émerge : certains gènes dont l'expression est modifiée chez *csn4* dans mon étude, mais pour lesquels aucune donnée n'est précisée dans l'étude précédente (Dohmann et al., 2008a), seraient ainsi touchés chez *csn4* mais pas chez *csn3* et *csn5a csn5b*. Cela permettrait de séparer les gènes que j'ai étudiés en deux populations : ceux touchés en général chez les mutants *csn* dont l'expression dépendrait d'effets du complexe CSN entier (parmi lesquels *CYCA2;2*, *CYCA3;1*, *CYCB1;1* et *KRP4*) et ceux dont l'effet serait spécifique à la sous-unité *CSN4* (parmi lesquels *CYCD6;1*, *CYCD7;1*, *KRP3* et *KRP6*). Cela me semble particulièrement pertinent car on retrouve dans "les effets CSN-dépendants" des gènes impliqués dans les phases G2 et M et dans les "effets CSN4-spécifiques" des gènes impliqués dans la phase G1 et la transition vers la phase S. Pour valider cette hypothèse, il sera important de vérifier l'expression des gènes "à effet CSN4-spécifique" dans les autres mutants *csn*. Si l'hypothèse est confirmée, cela mettra à jour un mécanisme spécifique à *CSN4*, potentiellement en coopération avec TCTP comme certains des gènes "à effet CSN4-spécifique" sont également dérégulés chez les mutants *tctp* (*CYCD7;1* et *KRP6*, Figure II.21,24).

Ces données de RT-qPCR ont donc apporté des données intéressantes pour situer au cours du cycle les défauts des différents mutants. Elles ont ainsi contribué à confirmer que les mutants *tctp* étaient touchés uniquement au niveau de la transition G1/S qui est ralentie comme en témoigne la baisse du niveau d'expression de *CYCD7;1*, une cycline de G1 et l'augmentation de celui d'un inhibiteur : *KRP6*. Cet effet est également présent chez les mutants *csn4* et *csn4-2035* où il s'accompagne d'un effet à d'autres endroits du cycle cellulaire notamment lors de la transition G2/M qui est elle aussi compromise chez les mutants *csn4*. De plus, l'étude plus spécifique d'un rapporteur transcriptionnel semble montrer une expression ectopique de *CYCD6;1* uniquement dans les embryons *tctp* (Figure II.22). Cependant, une des grandes limites de mes données est l'impossibilité de différencier les causes et les conséquences des défauts observés. Les gènes dont l'expression est modifiée chez les mutants d'intérêt peuvent l'être en conséquence des défauts au niveau de la transition G1/S ou peuvent être en partie causaux de ces défauts. Étant donné que les modifications observées sont visibles au niveau de l'expression, il est probable que bon nombre de ces effets soient plutôt majoritairement les témoins d'un état perturbé du cycle cellulaire plutôt qu'une cause de cette perturbation. De premiers éléments obtenus par l'étude comparative des mutants *csn4* et *csn4-2035* peuvent participer à clarifier la situation. En effet, les mutants *csn4-2035* contrairement aux mutants *csn4* sont viables. Prendre en considération uniquement les gènes dérégulés chez l'ensemble de ces mutants permet d'éliminer de potentiels effets secondaires du processus de mort cellulaire spécifiques aux mutants *csn4*. Cette approche permet de mettre en évidence des candidats majeurs, ceux étant le plus massivement dérégulés. Néanmoins, elle n'est pas parfaite puisque la protéine *csn4-2035* conserve une partie de son activité, ce qui pourrait contribuer à éliminer des candidats pourtant impliqués. Une autre façon d'apporter des éléments permettant de trancher entre ces deux situations serait de réaliser une étude d'interaction génétique entre les mutants *tctp* et *csn4* d'un côté et les mutants de gènes candidats perturbés particulièrement intéressants comme *CYCD7;1* et *KRP6*.

c- Étude de la voie de neddylation et d'ubiquitination

AtCSN4 a un rôle pléiotropique, dû à la perturbation du niveau de neddylation de toutes les CUL modifiant les taux de dégradation par la voie Ubiquitine/Protéasome de nombreuses protéines (Partie I.4). Au contraire, AtTCTP semble avoir une fonction plus précise, touchant très majoritairement la progression du cycle cellulaire (Partie I.5). La question se pose alors de savoir si AtTCTP participe à la régulation de la neddylation d'autres CUL ou uniquement de AtCUL1. En plus de AtCUL1, un anticorps est disponible pour AtCUL3, impliquée notamment dans la régulation du développement embryonnaire et de la voie de l'éthylène (Partie I.4.C). Cet anticorps devrait reconnaître différentes protéines AtCUL3A (taille attendue : 85,3 kDa), AtCUL3B (taille attendue : 85,6 kDa), AtCUL3A^{NEDD8} et AtCUL3B^{NEDD8}. Malheureusement, je n'ai pas réussi à identifier ces différentes formes par *Western blot*, ne voyant qu'une bande faible aux alentours de 85 kDa (données non montrées).

Une façon de juger de l'implication de TCTP dans la régulation de la neddylation d'autres CUL que CUL1 est d'étudier CUL4 *via* son effet sur une des voies qu'elle régule, à savoir la voie des dommages à l'ADN (Partie I.4.C). Cela semble particulièrement pertinent comme la voie AtTCTP/AtCSN4 est liée à la régulation du cycle cellulaire qui est coordonnée précisément à l'état de dommage à l'ADN et comme CSN4 chez les plantes et les animaux (Chung and Dellaire, 2015), ainsi que TCTP chez les animaux (Hong and Choi, 2013; Zhang et al., 2012) ont été individuellement liés à la voie de dommage à l'ADN. Or mes données (Figure II.28) montrent qu'aucune surexpression des gènes de dommage à l'ADN n'est observable chez les mutants *tctp* contrairement à chez les mutants *csn4* et *csn4-2035*. Cela suggère que AtTCTP n'est pas impliqué dans le processus de réponse aux dommages à l'ADN chez *A. thaliana*, ou du moins pas dans la même mesure que AtCSN4. La voie AtCSN4 concernant les dommages à l'ADN est fort probablement indépendante de AtTCTP. Pour confirmer ces résultats, il aurait intéressant de rechercher des marques de dommage à l'ADN chez *tctp* par les mêmes méthodes que celles déjà utilisées chez *csn4* : par exemple essai TUNEL ou quantification du variant de H2AX phosphorylé γ H2AX (Dohmann et al., 2008a).

Ainsi, mes données confirment que si CSN4 est impliqué de manière générale dans la régulation de la neddylation des CUL, l'effet de TCTP semble plus spécifique à CUL1. La neddylation des CUL étant un paramètre de contrôle de l'activité des CRL et par là de la voie de dégradation Ub/Pr, il m'a semblé important d'étudier plus précisément cette dernière. De manière logique, le niveau global d'ubiquitination est nettement augmenté chez le mutant *csn4-2035* par rapport au sauvage (Figures II.25, II.26). Cela est cohérent à la fois avec la fonction enzymatique du complexe CSN dans la déneddylation des CUL et avec les données déjà publiées qui montrent une augmentation de l'ubiquitination chez les mutants *csn1* et *csn3* (Peng et al., 2001).

Par contre, contrairement à ce qui était attendu, je n'ai pas observé de diminution de l'ubiquitination globale chez les mutants *tctp* par rapport au sauvage (Figure II.25). Une explication probable est que TCTP ne contrôle la neddylation que de certains CRL1 et pas des CRL en général. Ainsi déréguler *TCTP* conduirait à une sous-régulation de quelques complexes CRL en particulier mais pas des CRL en général. Cela se traduirait par le fait que l'ubiquitination de certaines protéines spécifique uniquement serait diminuée sans que ce soit visible au niveau de l'ubiquitination générale. Cette hypothèse me semble particulièrement pertinente car l'approche utilisée ici ne permet de mettre en évidence que des différences

majeures du niveau global d'ubiquitination mais n'est pas assez précise pour mettre en évidence des différences subtiles. De plus, elle est cohérente avec le fait que certains complexes CRL ne semblent pas affectés chez les mutants *tctp*. En effet, la signalisation auxinique est inchangée chez les mutants *tctp* par rapport au sauvage (Betsch et al., 2019), ce qui suggère fortement que les complexes SCF^{TIR1} ne sont pas régulés par TCTP. Alternativement, le niveau constant d'ubiquitination globale des mutants *tctp* pourrait s'expliquer en partie par une régulation complexe des CRL où une hyponeddylation des CUL conduirait à un plus grand échange des protéines adaptatrices et donc une plus grande diversité de substrat. Il est donc possible que chez le mutant *tctp* il y ait un niveau d'ubiquitination global comparable aux sauvages mais avec les ubiquitines réparties sur un plus grand nombre de protéines cibles. Cette hypothèse ne pourra être testée qu'en caractérisant l'ensemble des protéines ubiquitinées des différents génotypes (Partie II.3.G.d).

d- Étude protéomique globale

Pour caractériser les conséquences de la dérégulation de la voie Ub/Pr chez les différents mutants et identifier de potentielles cibles de la voie TCTP/CSN4, j'ai lancé une étude de protéomique globale pour identifier les protéines dérégulées chez les mutants *tctp*, *35S::TCTP* et *csn4* (Figure II.27). Un premier résultat intéressant est que, parmi les protéines dérégulées chez le mutant *tctp-2*, se retrouvent une majorité de protéines surexprimées (28/34) et, parmi celles dérégulées chez le mutant *csn4-2035*, une majorité de protéines sous-exprimées (49/51). Ainsi, conformément à ce qui est observé sur la neddylation des CUL, les effets de AtTCTP et AtCSN4 sont opposés sur la régulation des niveaux protéiques. En effet, en absence de AtTCTP, la surexpression de protéines pourrait s'expliquer par une diminution de leur dégradation, en cohérence avec l'abondance de CUL1 déneddyllée observable chez ces mutants. À l'inverse, la sous-expression de protéines chez *csn4-2035* peut s'expliquer par un excès de leur dégradation, en accord avec un état hyperneddyllé des CUL dans ce mutant.

D'une manière très intéressante, une partie des protéines surexprimées chez le mutant *tctp* et sous-exprimées chez le mutant *csn4-2035* sont communes (Annexe 4). De plus, la majorité des protéines dérégulées chez les mutants *tctp* et *csn4-2035* sont impliquées dans des fonctions cellulaires semblables : traduction, métabolisme et biosynthèse des protéines. Ainsi la voie AtTCTP/AtCSN4 pourrait être impliquée dans la régulation de la traduction. Cette hypothèse est confortée par le fait que l'équipe a aussi trouvé (par immunoprécipitation de TCTP-GFP suivie de spectrométrie de masse, (Betsch, 2017) des protéines reliées à la machinerie de traduction parmi les interacteurs potentiels de AtTCTP. Parmi les protéines qui semblent impliquées, la protéine ribosomale 60S L19-1 pourrait être intéressante. Effectivement, en plus d'être à la fois surexprimée chez le mutant *tctp* et sous-exprimée chez le mutant *csn4-2035*, elle est également connue sous le nom de EMBRYO DEFECTIVE 2386 (EMB2386) car le mutant perte de fonction est arrêté lors du développement embryonnaire au stade globulaire (Meinke, 2020). Les seuls rôles connus de EMB2386 sont son implication dans la constitution du ribosome 60S et dans la liaison aux ARNm. Parmi les autres protéines dérégulées chez les deux mutants *tctp* et *csn4-2035*, toutes également des protéines ribosomales, aucune n'a de mutant au phénotype déjà décrit. Concernant les protéines ribosomales surexprimées dans le mutant *tctp*, notamment EMB2386, il pourrait être intéressant de croiser les mutants perte de fonction y correspondant avec le mutant *tctp* et voir si une

complémentation du phénotype est observée. Cependant, il est probable que la fonction TCTP soit importante pour réguler un grand nombre de ces protéines et pas une en particulier, auquel cas aucune complémentation (ou une complémentation uniquement partielle) ne pourra être observée. Cette approche pourrait toutefois permettre de révéler l'importance relative des différentes protéines ribosomales impliquées.

Cependant, de manière générale, différents phénotypes ont été mis en évidence pour les mutants des protéines ribosomales parmi lesquels la létalité embryonnaire, la morphologie des feuilles de rosette et la voie de l'auxine (Byrne, 2009). Les changements de morphologie foliaire pourraient s'expliquer en partie par une incapacité à maintenir un niveau de synthèse protéique suffisant pour assurer une prolifération cellulaire importante (Byrne, 2009). Le rôle spécifique de chaque protéine ribosomale est encore mal compris : la traduction de certains ARNm semble dépendante de la quantité de ribosomes, tandis que celle d'autres ARNm serait plus tributaire de la présence de protéines ribosomales particulières ou de leurs modifications post-traductionnelles (Byrne, 2009). Enfin, il est aussi suggéré que certaines protéines ribosomales pourraient agir de manière indépendante aux ribosomes (Byrne, 2009). Concernant plus précisément la régulation du cycle cellulaire, plusieurs effets ont été remarqués. Par exemple, EBP1, une protéine du complexe pré-ribosomal, semble réguler l'expression de gènes du cycle cellulaire comme *CYCD3;1* et *CDKB1;1* (Horváth et al., 2006). La protéine ribosomale mitochondriale L18 HEART STOPPER (HES) est aussi impliquée dans la régulation de la division cellulaire et du développement de la graine (Zhang et al., 2015). En effet l'embryon et l'albumen du mutant *hes* se développent plus lentement que les sauvages, ce qui, combiné avec une sous-expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire, témoigne de défauts de progression du cycle cellulaire (Zhang et al., 2015). Le développement du mutant *hes* s'arrête naturellement au stade de transition entre embryon globulaire et embryon cordiforme (Zhang et al., 2015). Ces mutants peuvent être partiellement sauvés par sauvetage embryonnaire, certains ne formant que des calls (Zhang et al., 2015). Cette étude, bien que traitant du cas particulier des protéines ribosomales mitochondriales, est particulièrement instructive car elle apporte la preuve qu'il peut exister un lien fort, entre protéines ribosomales et contrôle de la progression du cycle cellulaire.

Ce lien est certes encore mal caractérisé, mais il renforce l'hypothèse que les protéines ribosomales pourraient jouer un rôle d'intermédiaire entre AtTCTP/AtCSN4 et la régulation de la progression du cycle cellulaire. Un élément encore à déterminer serait si AtTCTP et AtCSN4 contrôle le niveau de protéines ribosomales par une voie impliquant la régulation de l'activité de complexes CRL. Pour cela, il serait intéressant de déterminer si ces protéines sont ubiquitinées et dégradées par la voie Ub/Pr. À ma connaissance, aucun mécanisme de ce genre n'a été détaillée pour les protéines ribosomales. Cependant, de tels mécanismes pourraient être favorisés car le protéasome semble interagir avec les ribosomes (Carroll, 2013). L'étape suivante serait donc de caractériser non plus le protéome global des mutants *tctp* et *csn4* mais plus spécifiquement leur "ubiquitinome". En effet, il me semble crucial d'arriver à déterminer précisément quelles sont les protéines ubiquitinées chez ces deux mutants de façon à mieux caractériser leur voie d'action moléculaire. Différentes stratégies sont envisageables pour cela, notamment la méthode appelée COFRADIC qui permet d'identifier avec précision les sites d'ubiquitination (Walton et al., 2016).

Par ailleurs, parmi les protéines dérégulées dans les mutants *35S::TCTP*, il n'y a que des protéines surexprimées (au nombre de 35). Cela est surprenant car il aurait été logique de retrouver des résultats inversés par rapport à ceux des mutants *tctp-2*, d'autant plus que le phénotype de neddylation de CUL1 est bien opposé à celui des mutants *tctp* (Betsch et al., 2019). De plus, ces protéines surexprimées sont très différentes entre elles et interviennent dans des processus variés, aucune fonction cellulaire ne semblant particulièrement enrichie. Cela pourrait s'expliquer au moins en partie par le fait que le phénotype des mutants *35S::TCTP* est cantonné au début du développement où une légère accélération de la croissance mitotique est visible (Brioudes et al., 2010). Pour l'étude protéomique, j'ai utilisé comme échantillons des groupements de jeunes feuilles caulinaires. Ces feuilles étaient dans la phase où la croissance mitotique est majoritaire et donc où des différences sont visibles chez les plantes sur-exprimant *AtTCTP* par rapport aux plantes sauvages. Néanmoins, le fait de regrouper plusieurs feuilles provenant de plantes différentes et n'ayant pas exactement le même âge a conduit à une certaine hétérogénéité du matériel de départ. Ainsi, il est probable que cette hétérogénéité ajoutée au phénotype relativement faible de ces plantes ait caché l'effet de la surexpression de *AtTCTP*.

Enfin, il est également important de noter une des faiblesses de l'étude par rapport au matériel utilisé. Pour avoir des quantités suffisantes de plantes *tctp*, j'ai dû utiliser des plantes adultes obtenues par sauvetage embryonnaire. Or ce processus permet de dépasser la phase critique de l'embryogenèse durant laquelle les embryons meurent habituellement. Il est donc probable que dépasser artificiellement ce stade par l'apport exogène de grandes quantités de nutriments conduise à relancer des processus défectueux chez le mutant *tctp*. Ainsi, les plantes adultes obtenues par sauvetage embryonnaire présenteraient un phénotype moléculaire très limité par rapport à celui des embryons *tctp*. Il est donc probable que travailler sur les plantes adultes ne permettent pas d'identifier l'ensemble des processus majeurs mis en jeu lors de l'embryogenèse et ne révèlent qu'une partie limitée des fonctions de TCTP.

III- Discussion générale

Pendant ma thèse j'ai caractérisé plus précisément les différentes fonctions de AtTCTP et AtCSN4 et plus spécifiquement de leur interaction pour réguler la progression du cycle cellulaire notamment au niveau de la transition G1/S. J'ai également étudié l'effet de cette interaction sur le développement d'*A. thaliana*. Mes données ont permis de préciser plus finement les voies moléculaires régulées en communs via l'interaction AtTCTP/AtCSN4 ainsi que de déterminer leurs rôles plus spécifiques en dehors de ce complexe, et ceci en lien avec les différents phénotypes observés aux échelles moléculaire et macroscopique. Elles ont aussi confirmé des éléments sur le niveau de conservation des mécanismes étudiés entre les plantes et les animaux. Tout cela m'a conduit à établir un nouveau modèle complétant celui proposé précédemment (Betsch et al., 2019).

1- Les diverses fonctions de AtTCTP et AtCSN4 et de leur interaction

A- Effets spécifiques à AtCSN4

Mes données acquises à différentes échelles ont permis de mettre en évidence à la fois des points communs et des différences majeures entre les phénotypes des plantes dérégulées pour *AtTCTP* et *AtCSN4*. De façon générale, j'ai pu noter une plus grande diversité des phénotypes des mutants *csn4* et *csn4-2035* par rapport aux mutants *tctp*. Se retrouvent chez les plantules *csn4* des défauts morphologiques majeurs (Figure I.13), une expression perturbée de très nombreux régulateurs clefs du cycle cellulaire (Figure II.21, II.24) et une surexpression des gènes de dommage à l'ADN (Figure II.28) qui ne sont pas visibles dans les mêmes proportions chez les mutants *tctp*. Cela indique fortement qu'une grande partie des fonctions de CSN4 sont indépendantes de TCTP.

Par exemple, les plantules *csn4* possèdent des phénotypes morphologiques majeurs (Figure I.13) notamment liés à des défauts de signalisation auxinique (Dohmann et al., 2008b) absents des plantules *tctp* obtenues par sauvetage embryonnaire (Betsch et al., 2019). En totale cohérence avec ces données, les plantes exprimant un *ARNi* contre *AtCSN4* présentent une perte de dominance apicale, un phénotype classique de perturbation de la voie auxinique, qui est absente des plantes exprimant un *ARNi* contre *AtTCTP* (Betsch et al., 2019), alors que les deux lignées partagent un phénotype de nanisme. Par ailleurs, l'expression du marqueur auxiniques *DR5::GUS* est drastiquement diminuée chez les mutants *csn4* (Dohmann et al., 2008b) alors qu'elle est constante chez les mutants *tctp* (Betsch et al., 2019). Ainsi, la modulation de la voie auxine est une fonction spécifique à CSN4 de façon indépendante de TCTP. Il en va de même pour la régulation de la voie des dommages à l'ADN et des phases G2 et M du cycle cellulaire pour lesquelles seule la fonction de CSN4 semble cruciale (Figure II.28). Ces données indiquent que TCTP n'est pas un régulateur global de la voie Ub/Pr *via* CSN4 en interférant de façon généralisée avec la fonction CSN. Au contraire, son rôle est plus subtil, limité à un contrôle spécifique de certains aspects impactant sur la transition G1/S du cycle cellulaire. Pour finaliser la confirmation de ces données, il serait important de préciser l'effet de dérégulations de *TCTP* sur la neddylation des autres CUL que CUL1 (CUL3A, CUL3B et CUL4). De plus, il serait important d'essayer d'identifier quels complexes contenant CUL1 sont régulés par TCTP,

notamment en confirmant *via* la construction *HS::AXR3NT-GUS* que les complexes SCF^{TIR1} régulant la réponse à l'auxine ne le sont pas.

B- Effets spécifiques à AtTCTP

Inversement, je n'ai pas mis en évidence beaucoup de données dévoilant un rôle spécifique pour AtTCTP indépendamment de AtCSN4. Un contre-exemple serait l'expression de KRP5 qui semble augmenter chez les mutants *tctp* alors qu'elle reste stable chez les mutants *csn4* et *csn4-2035* (Figure II.24). Ces données seraient à confirmer notamment en suivant l'expression de *KRP5* mais aussi la présence de la protéine KRP5 par des lignées rapportrices chez les différents mutants. Cependant, KRP5 ne paraît pas être un candidat principal pour agir en aval de TCTP car il a été avant tout plusieurs fois relié à l'élongation cellulaire plutôt qu'à la division, en lien avec l'endoréduplication (Jégu et al., 2013; Wen et al., 2013). De plus, il est exprimé principalement durant la phase S, phase inchangée chez les mutants *tctp* (Betsch et al., 2019; Menges et al., 2005). Pour ces raisons, j'ai choisi de ne pas me concentrer sur l'étude de KRP5. Néanmoins, ces études seront intéressantes à réaliser dans le futur.

Des premiers résultats ont mis en évidence une zone d'expression plus étendue de *CYCD6;1* dans les embryons *tctp* par rapport aux embryons sauvages et *csn4* (Figure I.23). Ces résultats semblent particulièrement intéressants et pourraient également souligner un effet spécifique au développement embryonnaire comme *CYCD6;1* ne semble pas surexprimée dans les plantules *tctp* selon les résultats de RT-qPCR (Figure I.22); résultats qui devront avant tout être confirmés par la lignée rapportrice *pCYCD6;1::GFP*. *CYCD6;1* est un candidat intéressant car elle est importante pour des divisions asymétriques, clefs pour l'établissement du cortex et de l'endoderme (Sozzani et al., 2010). Son expression dans une zone élargie pourrait donc avoir des conséquences importantes sur le développement embryonnaire. Au-delà de ces rôles spécifiques, une étude antérieure a montré que l'expression du marqueur *pCYCD6;1::GUS* (plus sensible que *pCYCD6;1::GFP*) est forte dans le tissu fondamental au stade globulaire, dans la provasculature et les cotylédons pendant les stades cœur et torpille puis déclinait ensuite dans les embryons plus matures (Collins et al., 2012). Ainsi, une expression faible de *CYCD6;1* pourrait s'étendre au-delà des cellules initiales du cortex et de l'endoderme et permettre donc un rôle plus général de *CYCD6;1* dans le développement embryonnaire. Ce rôle potentiel reste toutefois limité comme les mutants *cycd6,1* ne possèdent pas de phénotype majeur (Sozzani et al., 2010). Ces mutants perte de fonction pourraient être croisés avec ceux *tctp* (semblant surexprimer *CYCD6;1*) pour voir si une réduction du niveau de *CYCD6;1* permet de compléter leur phénotype.

Un autre rôle semblant spécifique à TCTP est son implication dans la voie de signalisation des cytokinines (Figure II.18). Aucune donnée n'a permis pour l'instant de faire un lien entre CSN et cytokinines. Cela peut être en partie relié au fait que la voie de signalisation fait intervenir en majorité des cascades de phosphorylation et non la voie Ub/Pr (Müller and Sheen, 2007), faisant que CSN n'avait pas été perçu comme candidat évident pour réguler la perception des cytokines et le lien entre les deux voies n'a donc pas été étudié. Il serait donc instructif de vérifier si AtCSN4 est ou non reliée à la voie de réponse aux cytokines. Les lignées *CSN4^{+/-} TCSn::GFP*, *CSN4^{+/-} ARR5::GFP* et *CSN4^{+/-} ARR7::GFP* que j'ai établies permettront d'avoir un premier aperçu d'un lien éventuel entre CSN4 et la signalisation des cytokinines.

C- Effets communs à AtCSN4 et AtTCTP

La majorité des effets de AtTCTP notamment sur la progression du cycle cellulaire pourrait donc passer par AtCSN4. Cela est conforté par le fait que, contrairement aux mutants *35S::TCTP* chez qui la croissance est accélérée (Betsch et al., 2019; Brioudes et al., 2010), les doubles mutants *35S::TCTP ARNi-CSN4* croissent à la même vitesse que les simples mutants *ARNi-CSN4* (Betsch et al., 2019). Ainsi, TCTP semble avoir besoin de CSN4 pour exercer sa fonction sur la croissance des plantes. De façon cohérente, j'ai mis en évidence des effets communs aux mutants *tctp*, *csn4* et *csn4-2035* sur l'expression de certains régulateurs du cycle cellulaire : sous-expression de *CYCD7;1* et surexpression de *KRP6* (Figures II.21, II.24). Cela fait de ces gènes de bons candidats pour expliquer le ralentissement de la transition G1/S chez les mutants concernés. Cependant comme ces protéines subissent des modifications post-traductionnelles, il est également important de vérifier leurs niveaux protéiques dans les différents mutants. De plus, des résultats préliminaires importants montrent que l'activité kinase des CKD/CYC diminuerait chez les mutants *tctp* et *csn4* (Figure II.23), apportant un autre élément sur les mécanismes moléculaires expliquant le ralentissement du cycle cellulaire chez ces mutants. Ces résultats ont besoin d'être confirmés, puis il serait intéressant de pouvoir différencier l'activité des complexes des différentes phases du cycle cellulaire.

Il a déjà été montré que *CYCD7;1* n'est pas exprimé lors de l'embryogenèse chez *A. thaliana* et que les graines des mutants *cycd7;1* ont un développement normal (Collins et al., 2012). Ainsi, une sous-expression de *CYCD7;1* ne peut pas expliquer le phénotype embryonnaire de *tctp* et *csn4*. Par ailleurs, l'expression ectopique de *CYCD7;1* dans l'embryon conduit à un fort retard embryonnaire associé à un nombre important de divisions ectopiques (Collins et al., 2012). Son expression ciblée dans la cellule centrale du gamétophyte femelle y relance le cycle cellulaire, menant à des cellules centrales multinuclées (Sornay et al., 2015). Dans les feuilles, l'expression ectopique de *CYCD7;1* conduit également à des divisions supplémentaires (Weimer et al., 2018). Comme *CYCD7;1* interagit physiquement et est co-exprimée avec RBR1 (Weimer et al., 2018), le mécanisme d'action de cette cycline doit passer par l'inactivation de RBR1 qui permet de passer la transition G1/S. De plus, cette action est dépendante de CDKB1 (une CDK habituellement mitotique) soit comme partenaire de *CYCD7;1* soit plus tardivement en aval pour passer la transition G2/M (Weimer et al., 2018). Cela montre qu'effectivement *CYCD7;1* peut avoir un rôle crucial dans le contrôle du cycle cellulaire.

Comme cette cycline est exprimée dans les cellules en division des feuilles (Collins et al., 2012), il est possible qu'elle joue un rôle en aval de TCTP et CSN4 dans les plantules (matériel utilisé pour les RT-qPCR). Plus précisément, il a été décrit que *CYCD7;1* est exprimée spécifiquement dans la lignée stomatique juste avant la division formant la cellule garde et qu'elle est essentielle à cette division (Weimer et al., 2018). Le mutant perte de fonction *cycd7;1-1* ne présente pas de phénotypes globaux à l'échelle de la plante mais présente un retard au niveau des divisions formant les cellules de garde (Weimer et al., 2018). Ainsi, *CYCD7;1* semble posséder uniquement un rôle très spécifique dans une division clef du développement des feuilles pour l'établissement de la lignée stomatique. Cela peut expliquer le faible niveau d'expression global observé en RT-qPCR (Figure II.21). Cela n'empêche pas qu'elle puisse être importante dans la cascade en aval de TCTP/CSN4, *a priori* pas dans un contexte général mais dans des contextes plus spécifiques. Il pourrait être intéressant d'étudier le développement des

stomates dans les mutants *tctp* et *csn4* pour initier un lien plus précis entre ces protéines et cette cycline. De plus, il sera avant tout crucial de suivre l'accumulation de CYCD7;1 dans des lignées *tctp* et *csn4* en utilisant la construction *pCYCD7;1::CYCD7;1-YFP* (Weimer et al., 2018).

Le rôle potentiel de CYCD7;1 doit donc être assuré par une autre cycline D dans les contextes où celle-ci n'est pas exprimée, notamment dans le cas des embryons. Il est possible de suggérer une implication des CYCD3 comme le triple mutant *cyd3;1 cyd3;2 cyd3;3* présente un délai dans le développement embryonnaire (Collins et al., 2012). Les CYCD3 sont des candidates particulièrement intéressantes car leur expression est induite en présence de sucre dans le milieu de culture (Riou-Khamlichi et al., 2000), tout comme la croissance des mutants *tctp* est relancée en présence de sucre dans le milieu de sauvetage embryonnaire. Il semble malheureusement difficile de vérifier l'expression de ces cyclines dans les embryons des différents mutants pour des questions de quantité de matériel biologique. Aucune variation majeure d'expression de CYCD3;1 n'est visible dans les plantules mutantes *tctp*, *csn4* et *csn4-2035* (Figure II.21), indiquant que si cette cycline a un rôle lors du développement embryonnaire, elle ne semble pas les conserver post germination. Il faudra cependant vérifier l'expression de *CYCD3;1* dans les mutants *tctp* a pu être observée même si elle concernait des variations trop faibles pour être considérée comme certaine (Figure II.21). Celle-ci devra donc être vérifiée par d'autres moyens comme une lignée rapportrice ou des hybridation *in situ*. De plus, il est important de noter qu'imaginer un changement dans les CYCD impliqués entre le stade embryonnaire et post-embryonnaire n'est pas forcément évident comme chaque CYCD peut avoir des spécificités d'action. En effet, en plus de stimuler les divisions cellulaires, l'expression ectopique de *CYCD7;1*, mais pas celle de *CYCD3;1*, conduit à en croissance accrue de certaines cellules (Collins et al., 2012), Cela suggère que CYCD7;1 mais pas CYCD3;1 peut stimuler la croissance cellulaire.

Un autre effet commun aux mutants *tctp*, *csn4* et *csn4-2035* est la surexpression de *KRP6*. Malheureusement, je n'ai pas pu vérifier si une hausse était également visible au niveau protéique. En effet, la construction *pKRP6::KRP6-GFP* ne fluoresce pas dans les embryons. Cela peut être dû à une absence de KRP6 lors de l'embryogenèse ou à un niveau protéique trop faible pour être visualisé par fluorescence auquel cas une construction avec un rapporteur plus sensible comme l'enzyme GUS pourrait être utile. Dans un premier temps, il sera important de d'étudier les lignées *pKRP6::KRP6-GFP* dans d'autres tissus pour lesquels une fluorescence a déjà été mise en évidence comme les tissus conducteurs et les cotylédons des plantules (Millan, 2011), même si ces tissus sont loin d'être idéaux pour les lignées létales *tctp* et *csn4*.

Malgré ces premiers résultats où KRP6 ne semble pas être impliqué dans l'embryogenèse, il reste un candidat particulièrement intéressant car il est exprimé pendant la transition G1/S (Menges et al., 2005) dans toute la plante (De Veylder et al., 2001). De plus, le ciblage pour dégradation de KRP6 par des E3 Ub-ligases à domaine RING, notamment par SCF^{F-box-like} 17 lors de la gamétogenèse mâle, est nécessaire à la progression du cycle cellulaire (Gusti et al., 2009; Kim et al., 2008a; Liu et al., 2008). Ces résultats établissent des liens entre KRP6 et la voie Ub/Pr pour réguler le cycle cellulaire et permettent de poser l'hypothèse du contrôle du niveau protéique de KRP6 *via* la régulation de la neddylation des CUL par TCTP/CSN4. Pour étudier cela, il pourrait être intéressant de croiser les mutants d'intérêt avec le mutant perte de fonction *krp6*. Ce mutant ne possède pas de phénotype drastique à l'âge adulte

(Millan, 2011). Toutefois, la germination des mutants *krp6* est plus rapide et hypersensible à un inhibiteur de l'acide gibbérellique (Nieuwland et al., 2016). Si KRP6 est bien impliqué dans la voie AtTCTP/AtCSN4, les embryons doubles mutants *tctp krp6* et *csn4 krp6* pourraient présenter des délais de croissance embryonnaire moindres que les simples mutants correspondants. Enfin, KRP6 est régulé par phosphorylation par SNF1-RELATED KINASE-1 (SnRK1) une kinase maintenant l'homéostasie de l'énergie cellulaire *via* le contrôle de la balance anabolisme/catabolisme (Guérinier et al., 2013). Si le lien entre AtTCTP/AtCSN4 et AtKRP6 est confirmé, une étude plus poussée pourrait utiliser différentes formes de KRP6 : AtKRP6, une forme non phosphorylable AtKRP6^{T152A} et une forme phosphomimétique AtKRP6^{T152D} (Guérinier et al., 2013) pour déterminer une éventuelle relation avec la voie SnRK1.

2- Les mutants *tctp* et *csn4* possèdent des phénotypes macroscopiques semblables mais des phénotypes moléculaires opposés

Différentes études ont ainsi mis en évidence des phénotypes macroscopiques communs aux mutants n'exprimant pas ou sous-exprimant *TCTP* ou *CSN4*. Ces phénotypes, reliés à un délai dans la progression du cycle cellulaire similaire pour les deux mutants, se manifestent au niveau moléculaire par la sous-expression de certaines cyclines de phase G1 et la surexpression de leur inhibiteur *KRP6*. D'autres études ont pourtant révélé des effets moléculaires opposés chez les mutants affectés pour *TCTP* ou *CSN4*. L'intégration des résultats issues de ma thèse m'a permis de générer un modèle expliquant en partie ces contradictions et par là le fonctionnement de l'interaction TCTP/CSN4 dans la régulation du cycle cellulaire.

A- Les mutants *tctp* et *csn4* possèdent des phénotypes moléculaires opposés quant à la neddylation de CUL1

Un effet intéressant découvert dans les travaux auxquels j'ai participé (Betsch et al., 2019) est l'inhibition par TCTP de la déneddylation des CUL. En effet, les CUL sont majoritairement déneddylées chez les mutants *tctp* et hyperneddylées chez les mutants *35S::TCTP* (Betsch et al., 2019). Ce phénotype démontre un antagonisme avec CSN4, essentiel à la déneddylation des CUL. Ainsi, TCTP et CSN4 ont à la fois des effets opposés sur la neddylation des CUL mais similaires sur la progression du cycle cellulaire et par là le développement des organes. Cela met en évidence ce qui pourrait sembler une contradiction importante.

J'ai donc voulu confirmer l'importance de l'effet sur la neddylation dans le phénotype des plantes *tctp* et *35S::TCTP*. J'ai initié une approche génétique qui consiste à tester s'il est possible de compléter au moins partiellement les phénotypes *tctp* ou *35S::TCTP* en modifiant génétiquement le niveau de neddylation de CUL1. Pour cela, j'ai cherché des mutants chez qui la neddylation des CUL est modifiée (Annexe 3). Certains mutants faibles de CSN : *csn1-10*, *csn2-5*, *csn5a-1*, *csn5a-2* affectent de façon importante l'activité de déneddylation de CSN (Singh and Chamovitz, 2019). Ils pourraient être de bons modèles pour essayer de limiter l'accumulation de CUL1 déneddylée dans *tctp*. Cependant, ces croisements seront durs à interpréter dans la mesure où la façon dont les voies TCTP et CSN *via* CSN4 sont liées est encore en cours d'éclaircissement. Il devrait toutefois être possible de tirer des conclusions en comparant ces croisements avec ceux de *tctp* avec des mutants faibles de CSN non affecté dans l'activité de déneddylation comme *csn3-3*, *csn5b-1*, *csn6a-1* et *csn6b-1* (Singh and Chamovitz, 2019).

Ces études restent complexes à traiter car il faut également différencier les mutants *csn1-10*, *csn2-5* et *csn3-3*, qui sont des mutants alléliques, des mutants d'insertion *csn5a-1*, *csn5a-2*, *csn5b-1*, *csn6a-1* et *csn6b-1*. Dans le premier cas, l'absence de létalité est due à une conservation d'une partie de la fonctionnalité de la protéine mutée par la protéine sauvage. Il faut noter que *csn2-5* et *csn3-3* peuvent s'intégrer dans le complexe CSN (Huang et al., 2013; Stuttmann et al., 2009a). Concernant *csn1-10*, les plantes mutantes possèdent deux formes d'ARNm : l'ARNm long classique qui produit une protéine CSN1 sauvage mais dans des quantités moindres chez les plantes sauvages et un ARNm tronqué dont le devenir n'a pas été clarifié (Zhang et al., 2008b). Il est donc probable que le problème majeur de ce mutant soit

une sous-expression de la protéine sauvage CSN1 conduisant à une quantité moindre de complexe CSN formé et actif. Toutefois, le rôle d'une hypothétique forme tronquée de CSN1 pourrait entrer en jeu. Il faudra donc garder cela en mémoire lors de l'étude future; d'autant plus qu'il est possible que CSN1 interagisse avec TCTP, ce qui n'est pas le cas de CSN2 et CSN3 donc *a priori* des formes *csn2-5* et *csn3-3* (Figure II.9). L'absence de létalité des mutants *csn5a-1*, *csn5a-2*, *csn5b-1*, *csn6a-1* et *csn6b-1* s'explique par la redondance partielle entre CSN5A et CSN5B (Dohmann et al., 2005; Gusmaroli et al., 2004) et importante entre CSN6A et CSN6B (Gusmaroli et al., 2007). Ces mutants possèdent donc uniquement un des deux paralogues pour CSN5 ou CSN6 mais toutes les protéines restent sous leur forme sauvage et n'interagisse donc *a priori* pas avec TCTP *in planta* (Figures II.9, II.11).

Une autre alternative aurait été d'utiliser le mutant *35S::RBX1a*, mutant impliqué dans la voie de conjugaison de NEDD8 présentant une augmentation de CUL1 neddylée (Gray et al., 2002) et *a priori* indépendant de la voie AtTCTP/AtCSN4, mais je n'ai pas pu me procurer ce mutant. Des mutations de protéines de cette même voie comme *axr1-3* et *axr1-12* qui affectent AtAXR1, une enzyme la voie de conjugaison de NEDD8 sur les CUL, conduisent à une diminution des CUL neddylées (Dharmasiri et al., 2007; Huang et al., 2013; Ruegger et al., 1998). Ces mutants peuvent être utilisés pour tenter de compléter *35S::TCTP* mais leur phénotype pléiotropique pausera problème pour conclure sur la présence ou non d'effet sur celui, plus limité, des surexprimeurs de *AtTCTP*.

Enfin, un autre moyen de déterminer génétiquement l'importance de la neddylation dans la voie TCTP serait de générer des lignées exprimant une CUL1 ne pouvant être neddylée ou au contraire constitutivement neddylée pour les croiser avec mes lignées d'intérêt. Des lignées exprimant une CUL1 non neddylable ont été générées chez les cellules humaines en mutant la lysine 720 qui forme habituellement la liaison avec NEDD8 en arginine (Bennett et al., 2010). Une lignée semblable, *cull1^{K722R}*, a été établie chez *Neurospora crassa* et a permis de préciser la dynamique d'assemblage des SCF et le lien avec CSN (Liu et al., 2017). Il est particulièrement intéressant de noter que l'expression de Myc-CUL1^{K722R} restaure les défauts phénotypiques observés chez les mutants *csn* de *N. crassa* (Liu et al., 2017). Pareillement, chez *Caenorhabditis elegans*, réduire le niveau de neddylation par un ARNi contre NEDD8 chez les mutants *csn* permet de réduire les phénotypes d'assemblage du complexe synaptonémal, complexe permettant l'association des chromosomes homologues (Brockway et al., 2014). Chez *A. thaliana*, la perte de fonction de *cul3A* ou *cul3B* complète les défauts des mutants *csn5a-2* (Gusmaroli et al., 2007). Ces différents exemples montrent que les phénotypes des mutants *csn* peuvent donc être atténués en réduisant le niveau d'expression des CUL ou leur neddylation.

Ainsi, croiser des lignées n'exprimant pas CUL1 ou exprimant une CUL1 non neddylable avec les mutants *csn4-2035* pourrait permettre de confirmer cet effet. Il serait particulièrement instructif de croiser ces lignées avec les mutants *tctp* et *35S::TCTP* pour voir si une complémentarité des phénotypes est observable. Pour construire une lignée exprimant une CUL1 non neddylable chez *A. thaliana*, l'approche la plus simple est d'adapter la stratégie utilisée dans les lignées humaines (Bennett et al., 2010) et chez *N. crassa* (Liu et al., 2017), en mutant la lysine homologue, qui est la lysine 682 de AtCUL1, en arginine (K682R). Cette lysine est bien celle qui est neddylée *in planta* (del Pozo and Estelle, 1999). La construction AtCUL1^{K682R} a déjà été utilisée en système double-hybride chez la levure pour contribuer à montrer que AtCAND1 interagit préférentiellement avec CUL1 non neddylée (Feng et al.,

2004). Il serait intéressant de pouvoir utiliser cette construction *in planta* et notamment voir dans quelle mesure elle complémente la létalité précoce des mutants *cul1* (Shen et al., 2002), puis celle des mutants *csn4*.

À l'inverse, une autre approche génétique consiste en la création de lignées exprimant une NEDD8 non clivable, menant à l'obtention de CUL constitutivement neddylées. Une telle stratégie a été utilisée chez *D. melanogaster* en mutant la leucine 73 du site de clivage de NEDD8 par CSN en proline (Suisse et al., 2018). Cette mutation conduit bien à augmenter la quantité de cullines neddylées (Suisse et al., 2018). Réaliser une mutation semblable chez *A. thaliana* (NEDD8^{L149P}) pourrait permettre d'augmenter la fraction de CUL1 neddylées dans les mutants *tctp* et ainsi voir si une complémentation du phénotype est observable.

Une stratégie alternative pourrait être une approche pharmacologique utilisant la drogue MLN4924, qui inhibe la neddylation en général et celle des CUL en particulier (Betsch et al., 2019; Hakenjos et al., 2011). Le MLN4924 affecte grandement le développement des racines traitées. Pour un traitement à 5 µM, les racines Col0 croissent environ deux fois moins vite que des racines non traitées entre 4 et 10 jours post-semis (données non montrées). Des concentrations élevées de MLN conduisent à une hypo-neddylation de CUL1 induisant la mort des plantules traitées (Betsch et al., 2019). Ainsi, il pourrait être informatif de comparer comment le traitement au MLN4924, à une concentration faible, affecte le développement racinaire des plantes *35S::TCTP* dont les CUL1 sont hyperneddylées et des plantes Col0. Cependant, le fait que le développement racinaire des plantes surexprimant *TCTP* ne soit que légèrement augmenté et uniquement au début du développement a nettement compliqué cette étude notamment en comparaison avec l'effet majeur du MLN4924 sur la croissance racinaire. Je n'ai donc pas réussi à déterminer si le MLN4924 affecte le développement racinaire des plantes *35S::TCTP* et Col0 de manière semblable ou différente.

B- Le phénotype macroscopique des mutants est lié à une perturbation de la balance de neddylation des CUL.

À première vue, mes résultats présentent ainsi une incohérence entre les effets similaires d'un manque de TCTP ou CSN4 sur le cycle cellulaire et le développement des organes et les effets opposés sur la neddylation de CUL1 et la stabilité des protéines. Malgré le côté surprenant de ces résultats, plusieurs éléments d'explication existent. Différents exemples dans la littérature présentent des données similaires. Par exemple, les mutants *35S::RBX1a* chez lesquels CUL1 est hyperneddylée possèdent un phénotype semblable à celui des mutants *axr1*, mutants de la voie de neddylation chez les lesquels CUL1 est donc hyponeddylée et qui se caractérisent par une stabilité accrue des AUX/IAA et une réponse à l'auxine diminuée (Gray et al., 2002). Les mutants affectés dans la déneddylation comme le mutant *ARNi-CSN5* et les mutants hypomorphiques *csn* présentent également un phénotype semblable notamment quant à la diminution de la réponse à l'auxine (Schwechheimer et al., 2001; Singh and Chamovitz, 2019). Dans ces cas, l'hyperneddylation ou l'hyponeddylation des CUL mènent toutes deux au même résultat, à savoir l'activité réduite des E3 Ub-ligases CRL.

La même tendance est retrouvée chez *N. crassa* où le phénotype des mutants hyponeddylés exprimant CUL1^{K722R} à l'état hétérozygote présentent des défauts phénotypiques semblables à ceux des mutants hyperneddylés *csn* (excepté *csn3* dont le phénotype est moins fort) : rythme de conidiation irrégulier, processus de régulation par la lumière perturbés,

croissance thermosensible (Liu et al., 2017). De plus, comme noté précédemment, le phénotype dû à la délétion de *csn* est complété par l'expression de Myc-Cul1^{K722R} (et pas de Myc-Cul1), c'est-à-dire par la réduction de la proportion de CUL1 neddyllée (Liu et al., 2017). Ainsi, c'est le ratio entre CUL1 neddyllée et CUL1 déneddyllée qui semble importante et non les quantités absolues des deux formes de CUL1.

Il est donc possible d'établir un modèle où perturber le ratio CUL1^{NEDD8}/CUL1 aboutit, quel que soit le sens de la perturbation, à une activité moindre des CRL et donc à des phénotypes similaires. Mécanistiquement, cela s'explique simplement dans le cas d'une hyponeddylation générale des CUL par l'absence de complexes CRL formés et actifs (Partie I.3.C). Dans le cas d'une hyperneddylation, cela peut s'expliquer par une dégradation accrue de certaines sous-unités des CRL suite à leur auto-ubiquitination (Partie I.3.C). Ce modèle est soutenu chez *N. crassa*, par le fait que la protéine F-Box GRR-1 (sous unité du complexe CRL) soit moins stable chez les mutants *csn*, alors que la stabilité de FREQUENCY (FRQ), une cible du complexe CRL, est accrue (Liu et al., 2017). Il est également en cohérence avec les résultats obtenus chez *D. melanogaster* où la présence de NEDD8 non clivable rend les CUL hyperneddyllés et incapables de promouvoir la dégradation de leurs substrats (Suisse et al., 2018). Ainsi, ce n'est pas le fait d'avoir des CUL neddyllés qui est important pour le fonctionnement correct des CRL mais la possibilité d'avoir des cycles de neddylation et déneddylation pour assurer un équilibre entre ces deux formes de CUL.

Ainsi, les effets de ralentissement du cycle cellulaire, observés chez les mutants qui sous-accumulent TCTP ou CSN4, seraient dus à un déséquilibre du ratio CUL^{NEDD8}/CUL, déséquilibre allant dans le sens d'une suraccumulation de CUL^{NEDD8} ou de CUL respectivement dans le cas des mutants *csn4* ou *tctp*. Quelque que soit le sens du déséquilibre, il conduirait à un dysfonctionnement semblable des CRL qui expliquerait donc la similitude des phénotypes obtenus chez les mutants *tctp* et *csn4*. Cependant, la prudence est de mise car la perte de fonction *csn* ne conduit pas forcément à une baisse d'activité des E3 Ub-ligases et une accumulation de leurs protéines cibles. Les différents exemples montrent une grande incohérence de la littérature à ce sujet. Par exemple, chez les mutants *csn* de *D. melanogaster*, les protéines cibles Cactus (Harari-Steinberg et al., 2007), Timeless (Knowles et al., 2009) et Cycline E (Doronkin et al., 2002) se sur-accumulent, alors que les protéines cibles Capicua (Suisse et al., 2017), Cubitus interruptus et Armadillo (Wu et al., 2011) sont déstabilisées. Ces exemples d'incohérence montrent qu'il est difficile de raisonner à l'échelle globale uniquement à partir des résultats d'une protéine cible particulière. En effet, les cycles de neddylation et déneddylation favorisent les changements de protéine adaptatrice dans les CRL et donc de protéines cibles. Il semble logique que l'état hyperneddyllé des CUL conduise à fixer la composition des CRL et donc à dégrader uniquement certaines cibles. Cela pourrait conduire à une dégradation accrue de certaines cibles tandis que d'autres se sur-accumulent.

C'est pourquoi il m'a semblé particulièrement important d'étudier les modifications de dégradation des protéines au niveau global et pas seulement pour quelques cibles candidates. Conformément aux données déjà publiées chez les mutants *csn1* et *csn3* (Peng et al., 2001), j'ai mis en évidence que le niveau global d'ubiquitination augmente chez les mutants *csn4-2035* (Figures II.25, II.26). Ainsi, de façon globale, l'hyperneddylation des CUL semble entraîner une activité accrue des complexes CRL.

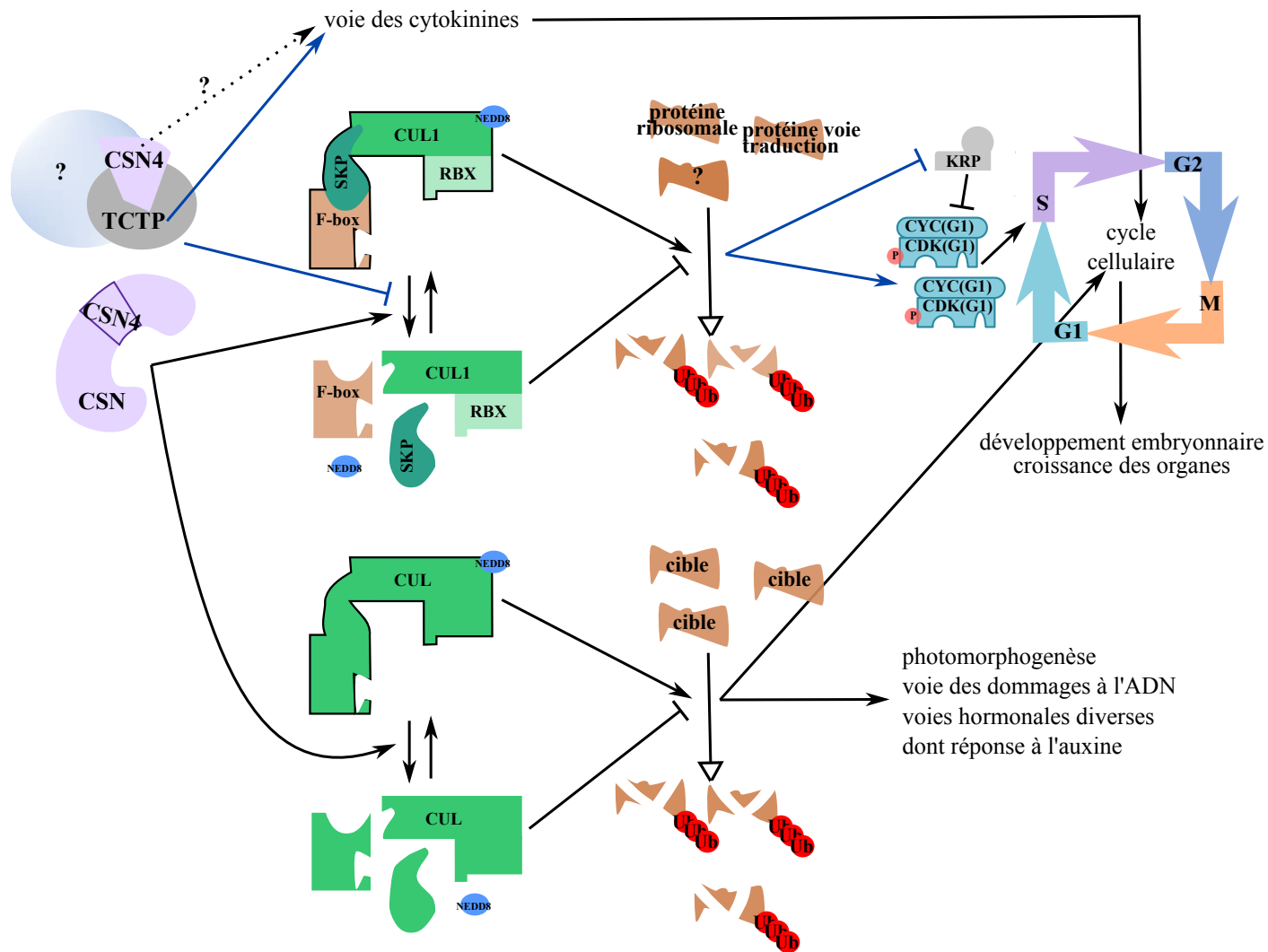


Figure III-1. Modèle d'action de TCTP et CSN4 sur la progression du cycle cellulaire chez *Arabidopsis thaliana*.

Différentes voies, communes ou spécifiques, permettent d'expliquer l'action de TCTP et CSN4 sur la progression du cycle cellulaire. La voie commune s'explique par l'interaction, en dehors du complexe CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME (CSN), entre TCTP/CSN4 qui régule la neddylation des CULLINES (CUL). Cela contribue à contrôler l'activité des complexes E3 UBIQUITINE (Ub)-ligase (encadrés en noir) et donc celle de la voie de dégradation par le système Ub/Protéasome, notamment en ce qui concerne la régulation de l'accumulation de protéines impliquées dans la traduction comme les protéines ribosomales. Tout cela contribue à la régulation de régulateurs clés du cycle cellulaire comme les CYCLINES (CYC) et leurs inhibiteurs, les KIP-RELATED PROTEIN (KRP).

Flèches pleines : stimulation, flèches vides : dégradation par la voie Ub/Protéasome, couleur bleue : voie dont les mécanismes précis sont encore inconnus.

CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE, NEDD8 : NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8, RBX : RING-BOX, SKP : S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN

Cela est également renforcé par les résultats de protéomique qui montrent un plus grand nombre de protéines absentes chez *csn4-2035* et présentes chez Col0 que de protéines présentes chez *csn4-2035* et absentes chez Col0 (Figure II.27). Du côté des mutants *tctp*, la situation est inversée : il y a davantage de protéines présentes chez *tctp* et absentes chez Col0 que des protéines absentes chez *tctp* et présentes chez Col0 (Figure II.27), montrant une sous-activité du système Ub/Pr. Par contre, cette sous-activité n'est pas visible au niveau de l'ubiquitination générale qui semble stable voire augmentée chez les mutants *tctp* (Figure II.25). Cela suggère que la sous-activité du système Ub/Pr est moins générale chez les mutants *tctp* que sa suractivité chez les mutants *csn4*, et donc pas visible par l'étude globale du niveau d'ubiquitination. Une autre hypothèse serait que le niveau d'ubiquitination reste bien constant chez les mutants *tctp* mais que la reconnaissance et/ou dégradation des protéines ubiquitinées par le protéasome est altérée. Pour éclaircir cela, il sera nécessaire d'utiliser le MG132, drogue bloquant l'activité du protéasome, afin de découpler les effets sur l'ubiquitination des protéines de ceux sur leur dégradation.

Dans tous les cas, la situation est donc différente de celle décrite précédemment (notamment dans l'article Liu et al., 2017) : les deux contextes conduisent à des effets opposés sur la neddylation des CUL qui semblent conduire également à des effets globaux opposés sur l'activité des CRL ou du moins sur la dégradation de certaines protéines. D'une manière intéressante, cela se traduit moléculairement par une surreprésentation des protéines impliquées dans la traduction, le métabolisme et la biosynthèse des protéines chez les mutants *tctp* et leur sous-représentation chez *csn4-2035* (Figure II.27, Partie II.3.G.d).

C- Établissement d'un modèle d'action de la voie TCTP/CSN4

L'intégration des résultats obtenus pendant ma thèse ont apporté des précisions sur comment TCTP/CSN4 régule le cycle cellulaire *via* la modification du niveau de neddylation des CUL. Les différentes données que j'ai obtenues ont permis de compléter la figure proposée dans les objectifs de thèse (Partie I.6, Figure I.21) et celui proposé précédemment par mon équipe (Betsch et al., 2019). J'ai dans un premier temps pu établir que AtTCTP et AtCSN4 n'interagissent pas au sein du complexe CSN entier, au moins AtCSN5 est exclu de l'interaction chez *A. thaliana* (Partie II.1). La présence de TCTP est nécessaire pour assurer une neddylation optimale de CUL1 (Betsch et al., 2019). Cependant, mes données indiquent que le mécanisme sous-jacent ne consiste pas uniquement en une séquestration de AtCSN4 en dehors de CSN par AtTCTP (Partie II.1, II.2). Comme l'action de AtTCTP nécessite la présence de AtCSN4 (Betsch et al., 2019), il est possible de supposer que l'interaction AtTCTP/AtCSN4 conduit, par une cascade encore inconnue, à stimuler la neddylation de AtCUL1 ou inhiber sa déneddylation (Figure III.1). Une régulation précise du ratio $CUL1^{NEDD8}/CUL1$ est nécessaire au contrôle de l'activité des CRL et donc à celui de la dégradation par la voie Ub/Pr (Figure III.1).

Ainsi, les mutants *csn4* et *csn4-2035*, chez qui le complexe CSN fonctionnel ne peut pas être formé, présentent un excès de $CUL1^{NEDD8}$ conduisant à une suractivité de la voie Ub/Pr et une sous-représentation de certaines protéines notamment impliquées dans la traduction (Partie II.3, Figure III.2). Au contraire, les mutants *tctp* présentent un excès de CUL1 déneddylée conduisant à une sous-activité de la voie Ub/Pr et une surreprésentation de certaines protéines notamment impliquées dans la traduction (Partie II.3, Figure III.3). Cette sous-activité n'est toutefois pas traduite par une hausse globale du niveau d'ubiquitination (Partie II.3).

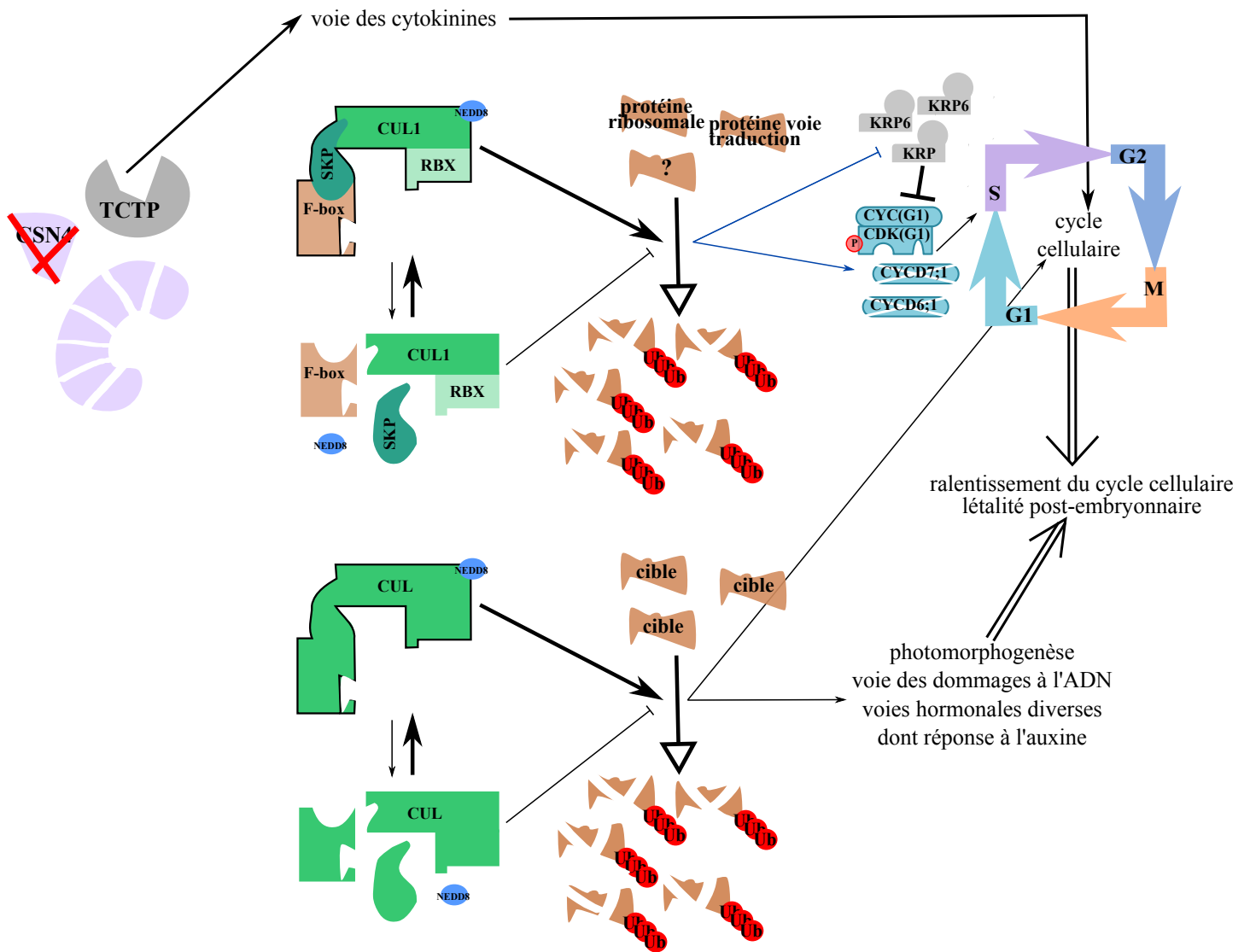


Figure 2. Effet de la perte de fonction de *CSN4* chez *Arabidopsis thaliana*.

L'absence de *CSN4* conduit à l'absence de formation du complexe CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME (CSN). Les CULLINES (CUL) appartenant aux complexes E3 UBIQUITINE (Ub)-ligase (encadrés en noir) sont donc majoritairement néddylées, et les complexes superactivés. Cela conduit à une dégradation majeure de nombreuses protéines dont des protéines impliquées dans la traduction, notamment des protéines ribosomales. Une surexpression des inhibiteurs de CYCLINES (CYC), les *KIP-RELATED PROTEIN* (KRP) et une sous-expression de certaines *CYCD* mènent à un ralentissement de la progression du cycle cellulaire. De nombreux autres effets notamment sur la voie des dommages à l'ADN ou sur différentes voies hormonales s'ajoutent à ces effets sur le cycle cellulaire pour expliquer la létalité post-embryonnaire des mutants *csn4*.

Flèches pleines : stimulation, flèches vides : dégradation par la voie Ub/Protéasome, couleur bleue : voie dont les mécanismes précis sont encore inconnus. L'épaisseur du trait est proportionnelle à la force de la voie.

CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE, NEDD8 : NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8, RBX : RING-BOX, SKP : S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN

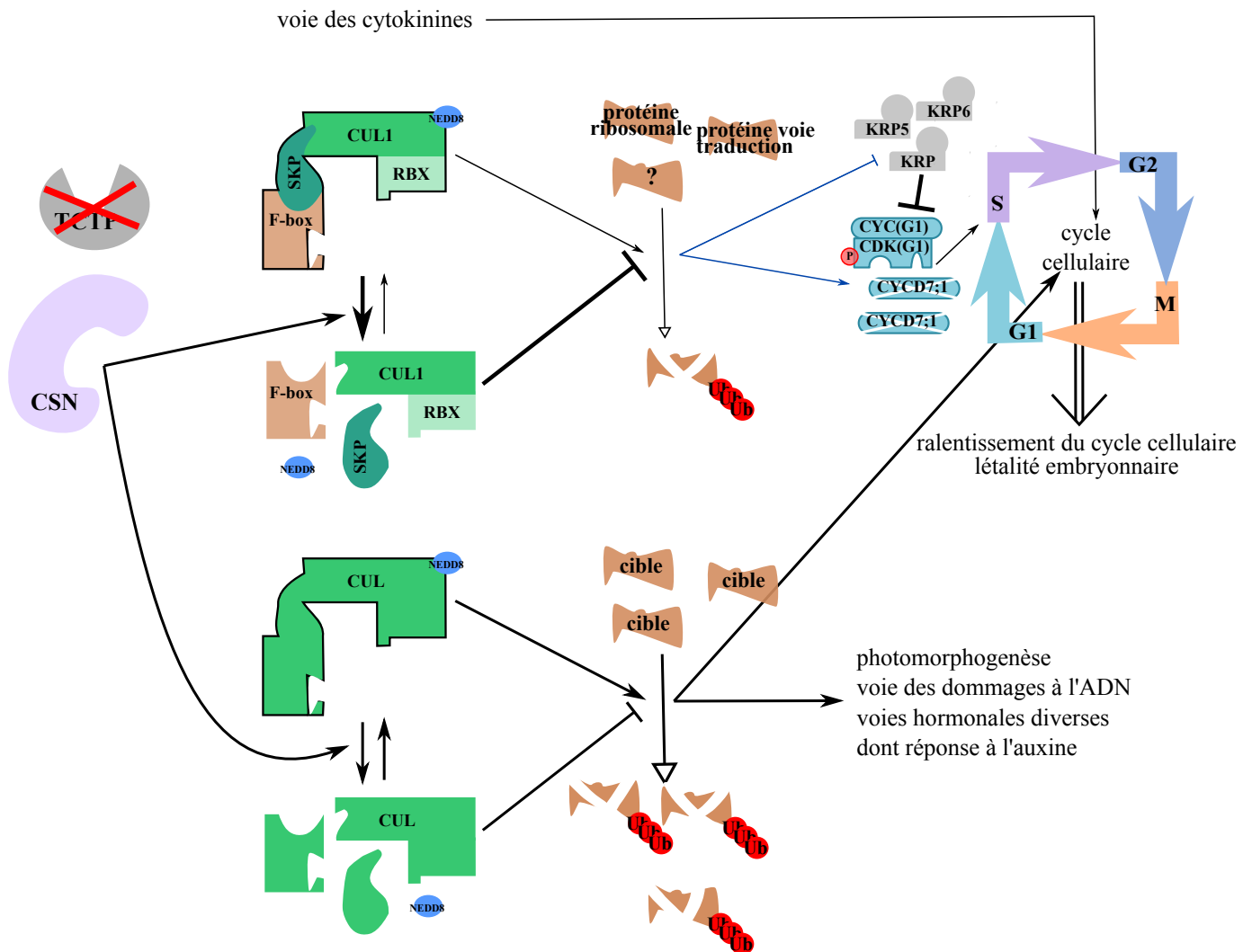


Figure 3. Effet de la perte de fonction de *TCTP* chez *Arabidopsis thaliana*.

L'absence de TCTP conduit à l'absence de formation du complexe TCTP/CSN4. Les CULLINES 1 (CUL1) appartenant aux complexes E3 UBIQUITINE (Ub)-ligase (encadrés en noir) sont donc majoritairement déubiquitinées, et les complexes sous-activés. Cela conduit à une accumulation de nombreuses protéines dont des protéines impliquées dans la traduction, notamment des protéines ribosomales. Une surexpression des inhibiteurs de CYCLINES (CYC), les *KIP-RELATED PROTEIN* (KRP) et une sous-expression de certaines *CYCD* mènent à un ralentissement de la progression du cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S, responsable de la létalité embryonnaire des mutants *tctp*.

Flèches pleines : stimulation, flèches vides : dégradation par la voie Ub/Protéasome, couleur bleue : voie dont les mécanismes précis sont encore inconnus. L'épaisseur des traits est proportionnelle à la force de la voie

CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE, NEDD8 : NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8, RBX : RING-BOX, SKP : S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN

Dans les deux cas, le déséquilibre de neddylation des CUL, qui mène à une dérégulation de la voie Ub/Pr, conduit à une baisse de l'activité kinase des complexes CDK/CYC (Partie II.3, Figures III.2, III.3). Cette baisse est probablement en partie due à la surexpression de certains de leurs inhibiteurs KRP et à la sous-expression de certaines *CYC* comme *CYCD7;1* (Partie II.3, Figures III.2, III.3). Tout cela mène à un ralentissement du cycle cellulaire notamment lors de la transition G1/S (Partie II.3, Figures III.2, III.3). Cela se traduit au niveau de l'organisme par un ralentissement du développement embryonnaire et une réduction de la taille des organes (Partie II.2, Figures III.2, III.3).

De nombreuses questions restent encore à éclaircir. Dans un premier temps, il serait intéressant de se pencher sur le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) l'interaction AtTCTP/AtCSN4 influe le niveau de neddylation de AtCUL1, notamment pour confirmer si cet effet est l'intermédiaire entre AtTCTP et la progression du cycle cellulaire (Figure III.1). De plus, il serait instructif de déterminer le lien entre la dérégulation opposée de l'accumulation de protéines impliquées dans la traduction chez les mutants *csn4* et *tctp* et leur effet similaire sur la progression du cycle cellulaire et le développement d'*A. thaliana* (Figure III.1). Enfin, sur un plan plus spécifique, il reste à préciser le rôle d'acteurs comme certaines cyclines de classe D, *CYCD6;1* et *CYCD7;1* et leurs inhibiteurs *KRP5* et *KRP6*, comme les cytokinines ou encore comme les protéines ribosomales dans la voie commune AtTCTP/AtCSN4 ou dans des voies spécifiques à AtTCTP ou AtCSN4 (Figure III.1).

D- Conservation de la voie AtTCTP/AtCSN4

Après avoir proposé un modèle expliquant l'action de AtTCTP sur la progression du cycle cellulaire, j'ai cherché à préciser si ce modèle peut être valable chez les animaux, notamment chez *D. melanogaster*. Comme développé en introduction (Partie I.5.A), les protéines AtTCTP, dTCTP et hTCTP sont bien conservées entre elles. Il a rapidement été découvert que la fonction de TCTP quant à la régulation de la progression du cycle cellulaire semble conservée entre animaux et végétaux. En effet, l'expression de *AtTCTP* (respectivement *dTCTP*) peut compléter les défauts de prolifération des mutants perte de fonction pour *dTCTP* (respectivement *AtTCTP* et *hTCTP*) (Brioudes et al., 2010; Hsu et al., 2007). Au-delà de la fonction principale, certains éléments précis de la voie sont également conservés : AtTCTP tout comme dTCTP interagissent avec AtCSN4 et la neddylation de CUL1 est inhibée chez les mutants perte de fonction pour *TCTP* chez *A. thaliana* et *D. melanogaster* (Betsch et al., 2019). Enfin, le rôle des protéines ribosomales en particulier et du contrôle de la traduction dans la voie semblent également conservés. Les interactomes de AtTCTP (Betsch, 2017), dTCTP (Kwon et al., 2019) et hTCTP (Li et al., 2016) révèlent tous trois un enrichissement des protéines impliquées dans la traduction, notamment de protéines ribosomales. Ces données sont renforcées par mes résultats qui montrent que ces protéines sont dérégulées chez les mutants *tctp* et *csn4-2035* d'*A. thaliana* (Figure II.27). Ainsi, il existerait une voie conservée chez les animaux et les végétaux où l'interaction TCTP/CSN4 contrôlerait la neddylation des CUL et le niveau de protéines impliquées dans la traduction comme les protéines ribosomales pour assurer la régulation de la progression du cycle cellulaire.

Cependant, il est important de noter que quelques divergences semblent exister entre ces voies dans les différents organismes. Tout d'abord, AtTCTP, contrairement à dTCTP, n'interagit pas avec AtCSN5 chez *A. thaliana* dans des essais de co-immunoprécipitation

(Figure II.11). De plus, dans l'interactome de hTCTP, ce n'est pas hCSN4 mais hCSN3 qui a été retrouvé (Li et al., 2017). Ainsi, il est possible que, en fonction des organismes, des complexes différents soient mis en place : AtTCTP/AtCSN4, dTCTP/dCSN4/dCSN5 et hTCTP/hCSN3. Ces différences pourraient en expliquer d'autres comme la présence d'un lien entre TCTP et la voie des dommages à l'ADN chez les animaux mais pas chez les végétaux (Figure II.28). En effet, ce lien pourrait passer en partie, du moins chez *H. sapiens*, par une interaction entre hTCTP et le module CSN/DNA DAMAGE-BINDING contenant notamment CSN2, CSN3 et CUL4A (Li et al., 2017). Enfin, l'action précise de la voie TCTP sur la progression du cycle cellulaire et plus spécifiquement la transition G1/S ne passe pas forcément par les mêmes acteurs moléculaires chez les animaux et les végétaux. CYCE (Hsu et al., 2007) et p53 (Amson et al., 2012; Funston et al., 2012; Rho et al., 2011) qui semblent être des régulateurs clefs chez les animaux n'ont pas d'homologues chez les végétaux chez qui ces rôles pourraient être assurés par KRP6 et CYCD7;1 par exemple (Figures II.21, II.24).

Ainsi, la forte conservation de la voie par laquelle TCTP *via* CSN4 contrôle la progression du cycle cellulaire et donc la prolifération cellulaire laisse présager que les connaissances acquises, notamment par mes travaux, chez *A. thaliana* sont en partie transposables chez les animaux. Malgré les différences, mieux connaître la voie TCTP/CSN4 chez *A. thaliana* pourrait donc permettre des avancées fondamentales mais également plus appliquées comme TCTP et le complexe CSN sont impliqués dans la cancérogenèse chez les animaux (Parties I.4.E et I.5.B) et ont été proposés comme cibles thérapeutiques (Schlierf et al., 2016; Seo et al., 2017). Il sera notamment important de mieux comprendre le lien entre cette voie et la traduction des protéines pour cibler au mieux les futurs traitements.

IV- Matériels et méthodes

1- Matériel biologique et conditions de culture

A- *Arabidopsis thaliana*

a- Lignées utilisées

L'ensemble des différentes lignées utilisées est présenté dans un tableau en Annexe 2. De manière générale, elles ont été obtenues du stock du NASC (*Nottingham Arabidopsis Stock Center*) lorsqu'elles y étaient disponibles (l'identifiant de la lignée est alors indiqué). Les autres lignées ont été fournies par l'auteur correspondant des articles cités en référence.

La lignée *csn4-2035* (Col0) a été établie par trois rétrocroisements (*backcross*) successifs de *csn4-2035* (Ws4) avec Col0. À chaque génération, la présence de la mutation A302V a été vérifiée par séquençage après amplification par PCR du fragment d'intérêt (amorces *csn4-2035fw* et *csn4-2035rev*, annexe 5). Les plantes dont le phénotype se rapprochait le plus de Col0 par rapport à Ws4 ont été préférentiellement conservées.

La lignée *pKRP6::KRP6-GFP* a été établie par transformation stable (IV.1.A.c) à partir des plasmides précédemment décrits (Millan, 2011) et fournis par C. Raynaud (*Institute of Plant Sciences Paris Saclay*, Équipe : *Chromosome Dynamics*).

Les différentes lignées exprimant *CYCD3;1* fusionnée en N- ou C-terminal à la GFP ou la m-cherry sous contrôle de son propre promoteur ont également été obtenues par transformation stable (IV.1.A.c). Le cadre de lecture (*open reading frame*, ORF) de *CYCD3;1* (AT4G34160) a été obtenu après amplification d'ADNc (amorces *CYCD3fw* et *CYCD3rev*, annexe 5). Le promoteur a été cloné en amplifiant les 2 kb situés en amont de l'ATG (amorces *pCYCD3fw* et *pCYCD3rev*, annexe 5). Le promoteur, l'ORF et la GFP (alternativement la m-cherry) ont été cloné dans le vecteur *pK7m34GW* en utilisant la technologie Gateway (Karimi et al., 2002).

Le génotype des descendants de lignées conservées à l'état hétérozygote (notamment celles *TCTP^{+/-}* et *CSN4^{+/-}*) pour cause de létalité des plantes homozygotes mutantes est identifiés par phénotypage ou génotypage. Pour le génotypage, ont été utilisées les amorces suivantes (Annexe 5) : pour *CSN4-1+* (absence de l'insert), *csn4-1fw* et *csn4-1rev*; pour *csn4-1-* (présence de l'insert), *LBb1* et *csn4-1rev*; pour *CSN4-2+*, *csn4-2fw* et *csn4-2rev*; pour *csn4-2-*, *LBb1* et *csn4-2rev*; pour *TCTP-1+*, *TCTP1LP* et *TCTP1RP*; pour *tctp-1-*, *LBSail* et *TCTP1RP*; pour *TCTP-2+*, *TCTPQ3* et *TCTP2RP*; pour *tctp-2-*, *LBgabi* et *TCTP2RP*.

b- Conditions de culture

Pour la culture *in vitro*, les graines ont été stérilisées dans des boîtes confinées par l'exposition au dichlore (3 mL HCl 40% dans 100 mL de javel) pendant 2 heures. Les graines stériles ont été semées sur du milieu solide *Murashige and Skoog* (MS, (Murashige and Skoog, 1962) complémenté avec les antibiotiques spécifiques adaptés pour la sélection du génotype. Après environ 10 jours de culture dans des chambres Sanyo (MLR-350) placées en jour continu à 20°C, les plantes résistantes sont repiquées en terre. Quand nécessaire au phénotypage, certaines plantes ont été cultivées au noir. Dans ce cas, elles ont été placées dans la même chambre mais au sein d'une boîte opaque entourée d'aluminium.

Le protocole de sauvetage embryonnaire a été réalisé comme précédemment décrit (Brioudes et al., 2010). Brièvement, il consiste à prélever stérilement les graines de siliques pas

encore matures (embryons de stade torpille à cotylédons courbés) pour les placer sur un milieu MS solide complétement avec 30 g/L de glucose. Une fois que les graines ont germé, les embryons sont déplacés sur un milieu MS solide complétement avec 10 g/L de glucose. Les plantules développées sont ensuite repiquées en terre.

Une fois repiquées en terre, les plantes sont cultivées dans des chambres de culture dans des conditions de jours longs (16h de lumière par jour) à 22°C avec une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{Em}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

c- Transformation stable d'*A. thaliana*

Les transformations ont été réalisées par trempage des fleurs d'*A. thaliana* dans une solution d'*Agrobacterium tumefaciens* préparée selon le protocole simplifié décrit dans la littérature (Logemann et al., 2006). Les graines ainsi obtenues ont été stérilisées en liquide dans de l'éthanol 96% puis de la javel avant plusieurs rinçages à l'eau distillée. Les graines ainsi stérilisées (T1) sont semées sur MS complétement avec l'antibiotique spécifique à la construction transformée. Les plantes résistantes, c'est-à-dire ayant intégré la construction apportée par transformation, sont repiquées en terre puis récoltées. Ces nouvelles graines (T2) sont semées après stérilisation au dichlore (IV.1.A.b) sur MS complétement avec l'antibiotique correspondant. Seules les lignées présentant une ségrégation de 75% de plantules vivantes pour 25% de mortes, témoin d'une insertion unique du transgène, sont conservées. Des plantes homozygotes pour le transgène (100% résistantes à l'antibiotique) sont ensuite recherchées dans la descendance de ces plantes (T3).

B- *Nicotiana*

a- *Nicotiana tabacum* L. cv. *Bright Yellow-2* (BY2)

Les cellules BY2 sont cultivées en milieu liquide (Nagata et al., 1992) à 25°C sous agitation (300 rpm/min). Chaque sept jours, une sous-culture est réalisée en diluant 10 fois la culture mère dans du milieu neuf.

Les cellules BY2 ont été synchronisées en utilisant de l'aphidicoline comme précédemment décrit. Des échantillons ont été collectés toutes les 3 heures pour extraction des noyaux et toutes les heures pour extraction des protéines. Pour vérifier la synchronisation, les noyaux ont été extraits en broyant 1,5 mL de culture liquide dans du tampon Galbraith (Galbraith et al., 1983) avec un pilon. La solution obtenue a été filtrée séquentiellement sur des filtres de 100 μm , 70 μm et 40 μm à l'aide d'une seringue. Du DAPI a été incorporé à une concentration finale de 1 $\mu\text{g/mL}$. L'intensité de fluorescence des noyaux marqués a été mesurée avec un cytomètre de flux (MACSQuant VYB Miltenyi). L'analyse du contenu de l'ADN a été réalisée en utilisant le logiciel FlowJo vX0.7).

b- *Nicotiana benthamiana*

Les graines de *N. Benthamiana* sont semées directement en terre, et les plantules repiquées environ 10 jours après germination. Elles sont cultivées en chambre de culture en condition de jours longs (16h de lumière par jour) à 22°C avec une intensité lumineuse de 70 $\mu\text{Em}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

Des plantes âgées d'environ six semaines sont utilisées pour les transformations transitoires. Les *A. tumefaciens* (lignée C5851) transformées avec la construction d'intérêt sont cultivées sur milieu YEB solide complétement des antibiotiques appropriés pendant 2 jours à 27°C. Elles sont ensuite resuspendues dans du tampon d'infiltration (10 mM MES pH 5.6, 10 mM MgCl_2 , 0,15 mM acetosyringone) à une $\text{OD}_{600\text{nm}}$ égale à 1. 1 mL de cette solution est

infiltré à l'aide d'une seringue (sans aiguille) dans 2 ou 3 feuilles de *N. benthamiana*. Les plantes sont ensuite cultivées 2/3 jours dans les mêmes conditions que précédemment avant étude de la fluorescence.

2- Études au niveau protéique

A- Extraction des protéines

Les différents tissus (échantillonnés à partir de plantes ou de cultures cellulaires) ont été broyés et les protéines ont été extraites en utilisant le kit "*Plant Total Protein Extraction Kit*" (PE0230 *Sigma*). Brièvement, les protéines ont été précipitées en utilisant du méthanol froid puis lavées avec de l'acétone froide. Les extraits protéiques totaux ont ensuite été dosés grâce au protocole utilisant du Bradford (Bradford, 1976).

B- Révélation des protéines

Une quantité égale de protéine pour chaque condition a été dénaturée par ajout de tampon Laemmli suivi d'un traitement à la chaleur (5 minutes à 98°C). Les protéines ont ensuite été déposées sur un gel d'acrylamide (10%, excepté pour les gels à 7,5% visant à quantifier le niveau d'ubiquitination) et la migration a été réalisée sous des conditions dénaturantes en présence du tampon de migration TG-SDS. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane d'acrylamide en utilisant le système de transfert sec iBlot 2 *ThermoFisher Scientific*.

La révélation par *Western Blot* des protéines a été réalisée de la manière suivante. Les membranes acrylamides ont été bloquées par incubation (1h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C) dans du TBST (Tris-buffered saline, Tween 20%) complété avec 2% de poudre de lait. Les membranes ont ensuite été incubées (1h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C) dans différents anticorps primaires dilués dans du TBST + 2% lait. Les différents anticorps utilisés sont les suivants : anti-AtTCTP (dilution 1/1000^e, (Brioude et al., 2010)), anti-AtCSN4 (dilution 1/2000^e, *Enzo Science Life*), anti-GFP (dilution 1/2000^e, *Roche*), anti- α TUB (dilution 1/2000^e, *ThermoFischer Scientific*), anti-UB (U5379, dilution 1/100^e, *Sigma-Aldrich*). Les anticorps contre les différentes sous-unités de CSN sont issus du kit "*COP9 signalosome subunits antibody sampler pack*" (BML-PW8945-001, *Enzo*). Après 4 lavages dans du TBST, les membranes ont été incubées 1h à température ambiante au noir dans les anticorps secondaires appropriés : IRDye® 800CW et/ou IRDye® 680RD (dirigés respectivement contre lapin et souris, dilution 1/10000^e, *LI-COR*). Après 4 lavages dans du TBST, les membranes ont été révélées en utilisant le système "Odyssey Clx imaging System ®". Les images ainsi obtenues ont permis la quantification des protéines en utilisant le logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012) selon le protocole déjà décrit (Davarinejad, 2017). Brièvement, l'intensité des bandes de la protéine d'intérêt a été normalisée par rapport à celle des bandes de TUB pour pouvoir comparer les différents échantillons.

C- Co-immunoprécipitation

Les expériences d'immunoprécipitation ont été réalisées en utilisant AtTCTP-GFP, dTCTP-GFP ou AtCSN4-GFP comme appât. Le protocole utilisé est celui du kit " *μ MAC GFP Isolation kit*" (*Mitenyi Biotec*). Brièvement, les extraits cellulaires venant des tissus étudiés sont incubés en présence d'anticorps anti-GFP couplés à des billes magnétiques μ MACS. Les billes

sont ensuite retenues dans des colonnes magnétiques et lavées avant élution des protéines fusionnées à la GFP et leurs complexes. Il est ensuite possible de révéler les protéines éluées comme décrit précédemment (Partie IV.2.B).

D- Test d'activité kinase

Les tests d'activité kinase ont été réalisés par C. Raynaud à l'IPS2 selon le protocole publié (Schönthal, 2004). Rapidement, à partir d'extraits des plantes étudiées, les complexes CDK/CYC sont purifiés à l'aide de billes de sépharose couplées à la protéine CKS. Les complexes sont ensuite mis en présence d'histone H1 (un de leurs substrats) et d'ATP marquée radioactivement. Le niveau de phosphorylation de H1, témoin du niveau d'activité des CDK/CYC, est ensuite révélé après migration sur gel d'acrylamide par autoradiographie.

E- Étude des protéines dérégulées entre plusieurs génotypes

Les protéines ont été extraites selon le protocole décrit précédemment (Partie IV.2.A). Elles ont ensuite été traitées par A. Page à la *Protein Science Facility* de la SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL). Les différentes protéines ont été identifiées par couplage nanoLC-MS/MS et quantifiées relativement entre les différents génotypes. La recherche pour l'identification des protéines a été faite avec la banque Swissprot pour *A. thaliana*.

3- Études par microscopie

A- Observation des embryons d'*A. thaliana*

Pour pouvoir comparer des siliques de même âge sur des plantes différentes, la fleur ouverte la plus âgée de chaque plante est marquée chaque jour d'un ruban de couleur différente. Après ouverture des siliques, les graines sont placées entre lame et lamelle dans de l'hydrate de chloral et laissées pendant environ 24h (processus de *clearing*). Pour les génotypes *CSN4^{+/-}*, les graines sont triées selon leur phénotype (graine vertes *CSN4⁺* et graines "violette" *csn4*) et placées sur des lames différentes. Pour les autres génotypes, les chapelets de graines sont directement placés sur la lame.

Les lames sont ensuite regardées avec un microscope Axio Imager 2 (*Zeiss*) en lumière visible. Des images sont prises pour chaque embryon de façon à déterminer son stade de développement. Pour chaque point temps (en jours après pollinisation, JAP) et chaque génotype, le nombre d'embryon de chaque stade est reporté pour chaque silique étudiée sur un tableur Excel d'où sont tirés les graphiques présentés.

B- Observation de marqueurs fluorescents

Les différentes observations ont été faites par microscopie à épifluorescence Axio Imager 2 (*Zeiss*) ou par microscopie confocale avec un appareil LSM 700 (*Zeiss*) en excitant avec un laser à 488 nm (GFP, YFP) ou un laser à 532 nm (RFP). Les images sont ensuite traitées avec le logiciel ImageJ (Schneider et al., 2012).

C- Complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC)

Les fragments d'ADN correspondants aux séquences codantes de CSN1 (AT3G61140), CSN2 (AT2G26990), CSN3 (AT5G14250), CSN5A (AT1G22920), CSN6A (AT5G56280), CSN6B (AT4G26430), CSN7 (AT1G02090) ont été amplifiés à partir d'ADNc de Col0 (CACCCdATG-csnx et csnx-rev, amorces en annexe 5). De même, la séquence codante de csn4-2035 a été amplifiée à d'ADNc du mutant csn4-2035 (Ws4) (CACCCdATG-csn4 et csn4-rev, amorces en annexe 5). L'obtention des troncations de CSN4 a été réalisée en amplifiant l'ADNc de Col0 avec les amorces CSN4(PCI)fw et CSN4(PCI)rev pour CSN4^{PCI} (nucléotides 590 à 1094) et les amorces CSN4(PCI)fw et CSN4(C-ter)rev pour CSN4^{PCICter} (nucléotides 590 à 1194) (amorces en annexe 5). L'obtention de la séquence codante de TCTP^{E12V} a déjà été décrite (Brioudes et al., 2010). Les fragments ont été clonés dans le vecteur pENTRTOPO® (*TOPO® Cloning procedure, ThermoFischer Scientific*) et séquencés. Ils ont ensuite été transférés dans les vecteurs pBiFP2 et pBiFP3 par la technologie *Gateway* (Azimzadeh et al., 2008). L'obtention des pBiFP contenant la séquence codante de AtTCTP (AT3G16640) et AtCSN4 (AT5G42970) a déjà été décrite (Betsch et al., 2019).

Les constructions ainsi obtenues ont été transformées dans *A. tumefaciens* pour être ensuite infiltrées dans *N. Benthamiana* selon le protocole décrit précédemment (Partie IV.1.B.b). Une solution d'infiltration était composée de trois constructions en quantités égales p19pBin61 (plasmide pBin61 contenant la protéine p19 supprimant le *post transcriptionnal gene silencing*), pBiFP2 (contenant ou non une protéine d'intérêt) et pBiFP3 (contenant ou non une protéine d'intérêt), infiltrées dans les mêmes feuilles. Chaque combinaison a été infiltrée dans au minimum deux feuilles lors de trois répétitions indépendantes. Les feuilles infiltrées ont été observées au microscope confocal (Partie IV.3.A) 3 jours après transformation.

D- Root tracking

Les graines Col0 et *35S::AtTCTP* ont été directement semées dans les chambres d'observation comme décrit précédemment (16). Des plantes homozygotes *tctp* ont été générées par sauvetage embryonnaire (Partie IV.1.A.b) et transférées dans des chambres d'observation juste après germination. Toutes les plantes ont été placées en conditions de jours courts (8 h/16 h jour/nuit à 22 °C/19 °C et 70 $\mu\text{Em}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Le *root tracking* a été réalisé en suivant le protocole déjà décrit (Doumane et al., 2017), en utilisant un microscope confocal inversé (modèle AxioObserver Z1, Zeiss) équipé d'un module disque rotatif (*spinning disk*, modèle CSU-W1-T3, Yokogawa) et en excitant avec les lasers à 488 nm pour la GFP et 532 nm pour la RFP. Des images de 30 μm d'épaisseur (*Z-stack*) ont été prises toutes les 5 minutes pendant 15 h.

Les images issues du confocal ont été traitées comme des hyperstacks avec ImageJ (Schneider et al., 2012). Après réalisation d'une projection en Z sur tous les points temps (option *sum slice*), j'ai utilisé le plugin "Stackreg" (Thévenaz et al., 1998) pour aligner les images des différents points temps et l'option *subtract background* d'ImageJ. Le plugin "Multi-measure" (Rasband et al., 2006) m'a permis de quantifier la fluorescence des différents noyaux au cours du temps. Les données ont été importées sur Excel. Pour chaque noyau, le graphe représentant l'intensité de fluorescence au cours du temps a été tracé pour déterminer le temps où la fluorescence apparaît et celui où elle disparaît (donnant ainsi la durée de fluorescence). L'analyse statistique et les graphes ont été réalisés sous R (R Core Team, 2017).

4- Études bioinformatiques

A- Alignement des séquences protéiques

Pour CSN4, les séquences protéiques venant des organismes suivants *Homo sapiens* (9BT78), *A. thaliana* (Q8L5U0), *D. melanogaster* (Q9V345), *Mus musculus* (O88544), *Caenorhabditis elegans* (Q9N359), *Schizosaccharomyces pombe* (O13895), *Danio rerio* (Q6P0H6), *Oryza sativa subsp. japonica* (S5QCB8), *Zea mays* (B4FCA4), *Hevea brasiliensis* (A0A2S0CTK6), *Physcomitrella patens* (A9TH34), *Glycine max* (I1L5P9), *Medicago truncatula* (0A072TFZ8), *Hordeum vulgare* (M0YES9), *Rosa chinensis* (A0A2P6PYL0) ont été récupérées sur UniProtKB. La séquence de *Cucurbita maxima* (XP_022975496) a été récupérée sur la base du NCBI. Les séquences et leurs annotations (domaines et résidus caractéristiques) des différents CSN chez *A. thaliana* ont été récupérées sur UniProtKB : CSN1 (P45432), CSN2 (Q8W207), CSN3 (Q8W575), CSN5A (Q8LAZ7), CSN5B (Q9FVU9), CSN6A (Q8W206), CSN6B (Q8W1P0), CSN7 (Q94JU3), CSN8 (P43255).

Les séquences ont été alignées avec le logiciel MulAlin (Corpet, 1988). L'alignement a ensuite été visualisé et mis en forme avec le logiciel Jalview (Waterhouse et al., 2009).

B- Modélisation des protéines

Les séquences des différentes protéines à modéliser : AtTCTP (UniProtKB P31265), AtCSN4 et Atcsn4-2025 ont été fournies au logiciel *I-Tasser* (Roy et al., 2012; Yang and Zhang, 2015; Zhang, 2009) qui a prédit les structures les plus probables à partir des structures connues des protéines humaines disponible sur la *Protein Data Bank* : hCSN4 (PDB_4D0P) et hTCTP (PDB_2HR9). La structure la plus probable de chaque protéine a été visualisée à l'aide du logiciel *Swiss-PdbViewer* (Guex and Peitsch, 1997).

Les comparaisons de structures entre les protéines de *H. sapiens* et *A. thaliana* ont été réalisées dans *Swiss-PdbViewer* selon le tutoriel *Superimposition* (https://spdbv.vital-it.ch/superpos_tut.html). Les deux structures ont premièrement été superposées grâce à la fonction *Magic fit*. Après génération de l'alignement structural, le RMSD (*Root Mean Square Deviation*) a été calculé et ses valeurs utilisées pour colorer les protéines selon leurs divergences.

5- Étude transcriptomique

L'expression de différents gènes : CYCD3;1 (AT4G34160), CYCD4;2 (AT5G10440), CYCD6;1 (AT4G03270), CYCD7;1 (AT5G02110), CYCA1;1 (AT1G44110), CYCA2;2 (AT5G11300), CYCA3;1 (AT1G47210), CYCA3;2 (AT1G47210), CYCB1;1 (AT4G37490), CYCB1;2 (AT5G06150), KRP1 (AT2G23430), KRP2 (AT3G48750), KRP3 (AT5G48820), KRP4 (AT2G32710), KRP5 (AT3G24810), KRP6 (AT3G19150), KRP7 (AT1G49620), WEE1 (AT1G02970), BRCA1 (AT4G21070), PARP1 (AT2G31320), PARP2 (AT4G02390), RAD51 (AT5G20850), TCTP (AT3G16640) et CSN4 (AT5G42970) a été étudiée par RT-qPCR selon le protocole suivant. 1 à 3µg d'ARN totaux de plantules des différents génotypes étudiés (passées par le protocole de sauvetage embryonnaire, voir partie IV.1.A.b) sont digérés avec la DNase ADN-free (*Ambion*) en suivant le protocole du fabricant. L'ARN est ensuite

rétro-transcrit à l'aide du kit SuperScript VILO cDNA synthesis (*Invitrogen*) selon les instructions du fabricant. Les réactions PCR sont réalisées dans une plaque optique 384 puits par la machine QuantStudio 6 Flex (*Applied Biosystems*), en utilisant l'agent intercalant FastStart Universal SyberGreen dans un volume final de 10 μ l. Les amorces utilisées sont listées sous le format : GèneQfor et GèneQrev (Annexe 5).

Toutes les PCR ont ensuite suivi ce profil thermique : 10 min à 95°C, puis 40 cycles de 10 sec à 95°C, 30 sec à 60°C. L'expression des gènes de GAPDH (AT1G16300), PDF2 (AT3G22480) et TUBULINE BETA CHAIN 4 (AT5G44340) a servi de contrôle pour la quantification. L'efficacité (E) de la PCR a été estimée par les données obtenues par l'amplification de la courbe standard, en utilisant l'équation $E = 10^{-1/\text{pente}}$. Les niveaux d'expression sont représentés sous la forme $E \cdot \Delta Ct$, où $\Delta Ct = Ct_{\text{Gène}} - \text{MOYENNE}(Ct_{\text{GAPDH}}; Ct_{\text{PDF2}}; Ct_{\text{TUBULINE}})$. Pour chaque gène, la valeur donnée est une moyenne de trois répliques techniques normalisée de telle façon que la valeur soit de 1 pour le génotype Col0. Les différentes RT-qPCR ont été réalisées en trois répliques biologiques indépendants pour les différents génotypes (excepté pour *Ws4* et *csn4-2035*, seulement deux répliques biologiques).

V- Références

- Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., et al.** (2011). Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 10004–10009.
- Aki, S. S. and Umeda, M.** (2016). Cytrap Marker Systems for In Vivo Visualization of Cell Cycle Progression in Arabidopsis. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1370**, 51–57.
- Amerik, A. Y. and Hochstrasser, M.** (2004). Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1695**, 189–207.
- Amson, R., Pece, S., Lespagnol, A., Vyas, R., Mazzarol, G., Tosoni, D., Colaluca, I., Viale, G., Rodrigues-Ferreira, S., Wynendaele, J., et al.** (2012). Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat. Med.* **18**, 91–99.
- Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R. and Machida, Y.** (2004). Mitotic Cyclins Stimulate the Activity of c-Myb-like Factors for Transactivation of G2/M Phase-specific Genes in Tobacco. *J. Biol. Chem.* **279**, 32979–32988.
- Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amiour, N., Parcy, F., Pastuglia, M. and Bouchez, D.** (2008). Arabidopsis TONNEAU1 Proteins Are Essential for Preprophase Band Formation and Interact with Centrin. *Plant Cell* **20**, 2146–2159.
- Bae, S.-Y., Byun, S., Bae, S. H., Min, D. S., Woo, H. A. and Lee, K.** (2017). TPT1 (tumor protein, translationally-controlled 1) negatively regulates autophagy through the BECN1 interactome and an MTORC1-mediated pathway. *Autophagy* **13**, 820–833.
- Barreau, C., Paillard, L. and Osborne, H. B.** (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* **33**, 7138–7150.
- Barth, E., Hübler, R., Baniahmad, A. and Marz, M.** (2016). The Evolution of COP9 Signalingosome in Unicellular and Multicellular Organisms. *Genome Biol. Evol.* **8**, 1279–1289.
- Bazile, F., Pascal, A., Arnal, I., Le Clainche, C., Chesnel, F. and Kubiak, J. Z.** (2009). Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells. *Carcinogenesis* **30**, 555–565.
- Bedford, L., Paine, S., Sheppard, P. W., Mayer, R. J. and Roelofs, J.** (2010). Assembly, structure, and function of the 26S proteasome. *Trends Cell Biol.* **20**, 391–401.
- Bennett, E. J., Rush, J., Gygi, S. P. and Harper, J. W.** (2010). Dynamics of cullin-RING ubiquitin ligase network revealed by systematic quantitative proteomics. *Cell* **143**, 951–965.
- Berger, F.** (2003). Endosperm: the crossroad of seed development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**, 42–50.

- Berger, J. P.** (2017). Comment l'information génétique est-elle transmise lors de la multiplication cellulaire ? http://www.jpbinagine.com/Sharjah/3_C4_2016/32genevol/doc32/Chap3/Chap132bilan.html
- Berkowitz, O., Jost, R., Pollmann, S. and Masle, J.** (2008). Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **20**, 3430–3447.
- Betsch, L.** (2017). TCTP and CSN4 interact to control cell cycle progression and development in *Arabidopsis thaliana*.
- Betsch, L., Savarin, J, Bendahmane, M and Szecsi, J** (In press). Roles of the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) in plant development.
- Betsch, L., Boltz, V., Brioude, F., Pontier, G., Girard, V., Savarin, J., Wipperman, B., Chambrier, P., Tissot, N., Benhamed, M., et al.** (2019). TCTP and CSN4 control cell cycle progression and development by regulating CULLIN1 neddylation in plants and animals. *PLOS Genet.* **15**, e1007899.
- Blanvillain, R., Young, B., Cai, Y., Hecht, V., Varoquaux, F., Delorme, V., Lancelin, J.-M., Delseny, M. and Gallois, P.** (2011). The *Arabidopsis* peptide kiss of death is an inducer of programmed cell death. *EMBO J.* **30**, 1173–1183.
- Böhm, H., Benndorf, R., Gaestel, M., Gross, B., Nürnberg, P., Kraft, R., Otto, A. and Bielka, H.** (1989). The growth-related protein P23 of the Ehrlich ascites tumor: translational control, cloning and primary structure. *Biochem. Int.* **19**, 277–286.
- Bommer, U.-A.** (2017). The Translational Controlled Tumour Protein TCTP: Biological Functions and Regulation. *Results Probl. Cell Differ.* **64**, 69–126.
- Bommer, U.-A. and Thiele, B.-J.** (2004). The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 379–385.
- Bommer, U.-A., Iadevaia, V., Chen, J., Knoch, B., Engel, M. and Proud, C. G.** (2015). Growth-factor dependent expression of the translationally controlled tumour protein TCTP is regulated through the PI3-K/Akt/mTORC1 signalling pathway. *Cell. Signal.* **27**, 1557–1568.
- Bommer, U.-A., Vine, K. L., Puri, P., Engel, M., Belfiore, L., Fildes, K., Batterham, M., Lochhead, A. and Aghmesheh, M.** (2017). Translationally controlled tumour protein TCTP is induced early in human colorectal tumours and contributes to the resistance of HCT116 colon cancer cells to 5-FU and oxaliplatin. *Cell Commun. Signal. CCS* **15**,
- Bosu, D. R. and Kipreos, E. T.** (2008). Cullin-RING ubiquitin ligases: global regulation and activation cycles. *Cell Div.* **3**, 7.
- Bouché, F.** (2017). *Arabidopsis* - Root cell types. https://figshare.com/articles/Arabidopsis_-_Root_cell_types/4688752/1
- Boudolf, V., Vlieghe, K., Beemster, G. T. S., Magyar, Z., Acosta, J. A. T., Maes, S., Van Der Schueren, E., Inzé, D. and De Veylder, L.** (2004). The Plant-Specific Cyclin-Dependent Kinase CDKB1;1 and Transcription Factor E2Fa-DPa Control the Balance

- of Mitotically Dividing and Endoreduplicating Cells in Arabidopsis. *Plant Cell* **16**, 2683–2692.
- Boudolf, V., Lammens, T., Boruc, J., Leene, J. V., Daele, H. V. D., Maes, S., Isterdael, G. V., Russinova, E., Kondorosi, E., Witters, E., et al.** (2009). CDKB1;1 Forms a Functional Complex with CYCA2;3 to Suppress Endocycle Onset. *Plant Physiol.* **150**, 1482–1493.
- Bowman, J. ed.** (1994). *Arabidopsis: An Atlas of Morphology and Development*. New York: Springer-Verlag.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brioudes, F.** (2010). Regulation of organ morphogenesis : Functional analysis of the TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN and of the transcription factor BIGPETALp in Arabidopsis thaliana.
- Brioudes, F., Thierry, A.-M., Chambrier, P., Mollereau, B. and Bendahmane, M.** (2010). Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 16384–16389.
- Brockway, H., Balukoff, N., Dean, M., Alleva, B. and Smolikove, S.** (2014). The CSN/COP9 signalosome regulates synaptonemal complex assembly during meiotic prophase I of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **10**, e1004757.
- Burgess, A., Labbé, J.-C., Vigneron, S., Bonneaud, N., Strub, J. M., Van Dorselaer, A., Lorca, T. and Castro, A.** (2008). Chfr interacts and colocalizes with TCTP to the mitotic spindle. *Oncogene* **27**, 5554–5566.
- Byrne, M. E.** (2009). A role for the ribosome in development. *Trends Plant Sci.* **14**, 512–519.
- Cans, C., Passer, B. J., Shalak, V., Nancy-Portebois, V., Crible, V., Amzallag, N., Allanic, D., Tufino, R., Argentini, M., Moras, D., et al.** (2003). Translationally controlled tumor protein acts as a guanine nucleotide dissociation inhibitor on the translation elongation factor eEF1A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 13892–13897.
- Cao, B., Lu, Y., Chen, G. and Lei, J.** (2010). Functional characterization of the translationally controlled tumor protein (TCTP) gene associated with growth and defense response in cabbage. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **103**, 217–226.
- Carroll, A. J.** (2013). The Arabidopsis Cytosolic Ribosomal Proteome: From form to Function. *Front. Plant Sci.* **4**.
- Cavadini, S., Fischer, E. S., Bunker, R. D., Potenza, A., Lingaraju, G. M., Goldie, K. N., Mohamed, W. I., Faty, M., Petzold, G., Beckwith, R. E. J., et al.** (2016). Cullin-RING ubiquitin E3 ligase regulation by the COP9 signalosome. *Nature* **531**, 598–603.
- Chan, T. H. M., Chen, L., Liu, M., Hu, L., Zheng, B., Poon, V. K.-M., Huang, P., Yuan, Y.-F., Huang, J., Yang, J., et al.** (2012). Translationally controlled tumor protein

- induces mitotic defects and chromosome missegregation in hepatocellular carcinoma development. *Hepatology* **55**, 491–505.
- Chen, L. and Hellmann, H.** (2013). Plant E3 Ligases: Flexible Enzymes in a Sessile World. *Mol. Plant* **6**, 1388–1404.
- Chen, S. H., Wu, P.-S., Chou, C.-H., Yan, Y.-T., Liu, H., Weng, S.-Y. and Yang-Yen, H.-F.** (2007). A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol. Biol. Cell* **18**, 2525–2532.
- Chen, H., Huang, X., Gusmaroli, G., Terzaghi, W., Lau, O. S., Yanagawa, Y., Zhang, Y., Li, J., Lee, J.-H., Zhu, D., et al.** (2010). Arabidopsis CULLIN4-damaged DNA binding protein 1 interacts with CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1-SUPPRESSOR OF PHYA complexes to regulate photomorphogenesis and flowering time. *Plant Cell* **22**, 108–123.
- Chen, B., Zhao, R., Su, C.-H., Linan, M., Tseng, C., Phan, L., Fang, L., Yang, H.-Y., Yang, H., Wang, W., et al.** (2012). CDK inhibitor p57 (Kip2) is negatively regulated by COP9 signalosome subunit 6. *Cell Cycle Georget. Tex* **11**, 4633–4641.
- Chen, K., Chen, S., Huang, C., Cheng, H. and Zhou, R.** (2013a). TCTP increases stability of hypoxia-inducible factor 1 α by interaction with and degradation of the tumour suppressor VHL. *Biol. Cell* **105**, 208–218.
- Chen, L., Lee, J. H., Weber, H., Tohge, T., Witt, S., Roje, S., Fernie, A. R. and Hellmann, H.** (2013b). Arabidopsis BPM Proteins Function as Substrate Adaptors to a CULLIN3-Based E3 Ligase to Affect Fatty Acid Metabolism in Plants[W]. *Plant Cell* **25**, 2253–2264.
- Chen, K., Huang, C., Yuan, J., Cheng, H. and Zhou, R.** (2014a). Long-term artificial selection reveals a role of TCTP in autophagy in mammalian cells. *Mol. Biol. Evol.* **31**, 2194–2211.
- Chen, J., Shin, J.-H., Zhao, R., Phan, L., Wang, H., Xue, Y., Post, S. M., Ho Choi, H., Chen, J.-S., Wang, E., et al.** (2014b). CSN6 drives carcinogenesis by positively regulating Myc stability. *Nat. Commun.* **5**, 5384.
- Chen, L.-Q., Lin, I. W., Qu, X.-Q., Sosso, D., McFarlane, H. E., Londoño, A., Samuels, A. L. and Frommer, W. B.** (2015). A Cascade of Sequentially Expressed Sucrose Transporters in the Seed Coat and Endosperm Provides Nutrition for the Arabidopsis Embryo[OPEN]. *Plant Cell* **27**, 607–619.
- Chen, P., Takatsuka, H., Takahashi, N., Kurata, R., Fukao, Y., Kobayashi, K., Ito, M. and Umeda, M.** (2017). Arabidopsis R1R2R3-Myb proteins are essential for inhibiting cell division in response to DNA damage. *Nat. Commun.* **8**, 1–12.
- Chen, K., Li, G.-J., Bressan, R. A., Song, C.-P., Zhu, J.-K. and Zhao, Y.** (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *J. Integr. Plant Biol.* **62**, 25–54.
- Cheng, Y., Cao, L., Wang, S., Li, Y., Shi, X., Liu, H., Li, L., Zhang, Z., Fowke, L. C., Wang, H., et al.** (2013). Downregulation of multiple CDK inhibitor ICK/KRP genes

- upregulates the E2F pathway and increases cell proliferation, and organ and seed sizes in Arabidopsis. *Plant J.* **75**, 642–655.
- Chitpatima, S. T., Makrides, S., Bandyopadhyay, R. and Brawerman, G.** (1988). Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res.* **16**, 2350.
- Choi, H. H., Guma, S., Fang, L., Phan, L., Ivan, C., Baggerly, K., Sood, A. and Lee, M.-H.** (2015). Regulating the stability and localization of CDK inhibitor p27(Kip1) via CSN6-COP1 axis. *Cell Cycle Georget. Tex* **14**, 2265–2273.
- Chuang, H., Zhang, W. and Gray, W. M.** (2004). Arabidopsis ETA2, an Apparent Ortholog of the Human Cullin-Interacting Protein CAND1, Is Required for Auxin Responses Mediated by the SCFTIR1 Ubiquitin Ligase. *Plant Cell* **16**, 1883–1897.
- Chun, Y., Lee, M., Park, B. and Lee, S.** (2013). CSN5/JAB1 interacts with the centromeric components CENP-T and CENP-W and regulates their proteasome-mediated degradation. *J. Biol. Chem.* **288**, 27208–27219.
- Chung, D. and Dellaire, G.** (2015). The Role of the COP9 Signalosome and Neddylation in DNA Damage Signaling and Repair. *Biomolecules* **5**, 2388–2416.
- Churchman, M. L., Brown, M. L., Kato, N., Kirik, V., Hülskamp, M., Inzé, D., De Veylder, L., Walker, J. D., Zheng, Z., Oppenheimer, D. G., et al.** (2006). SIAMESE, a Plant-Specific Cell Cycle Regulator, Controls Endoreplication Onset in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell* **18**, 3145–3157.
- Collins, C., Dewitte, W. and Murray, J. A. H.** (2012). D-type cyclins control cell division and developmental rate during Arabidopsis seed development. *J. Exp. Bot.* **63**, 3571–3586.
- Considine, M. J., Diaz-Vivancos, P., Kerchev, P., Signorelli, S., Agudelo-Romero, P., Gibbs, D. J. and Foyer, C. H.** (2017). Learning To Breathe: Developmental Phase Transitions in Oxygen Status. *Trends Plant Sci.* **22**, 140–153.
- Cope, G. A. and Deshaies, R. J.** (2003). COP9 Signalosome: A Multifunctional Regulator of SCF and Other Cullin-Based Ubiquitin Ligases. *Cell* **114**, 663–671.
- Cope, G. A. and Deshaies, R. J.** (2006). Targeted silencing of Jab1/Csn5 in human cells downregulates SCF activity through reduction of F-box protein levels. *BMC Biochem.* **7**, 1.
- Cope, G. A., Suh, G. S. B., Aravind, L., Schwarz, S. E., Zipursky, S. L., Koonin, E. V. and Deshaies, R. J.** (2002). Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cull1. *Science* **298**, 608–611.
- Corpet, F.** (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* **16**, 10881–10890.
- Criqui, M. C. and Genschik, P.** (2002). Mitosis in plants: how far we have come at the molecular level? *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**, 487–493.

- Culligan, K., Tissier, A. and Britt, A.** (2004). ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 1091–1104.
- Culligan, K. M., Robertson, C. E., Foreman, J., Doerner, P. and Britt, A. B.** (2006). ATR and ATM play both distinct and additive roles in response to ionizing radiation. *Plant J.* **48**, 947–961.
- Davarinejad, H.** (2017). Quantifications of western blots with Image J.
- De Schutter, K., Joubès, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babiychuk, E., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Kushnir, S., Inzé, D., et al.** (2007). Arabidopsis WEE1 Kinase Controls Cell Cycle Arrest in Response to Activation of the DNA Integrity Checkpoint. *Plant Cell* **19**, 211–225.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Beemster, G. T. S., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., Van Der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M. and Inzé, D.** (2001). Functional Analysis of Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* **13**, 1653–1668.
- De Veylder, L., Beeckman, T. and Inzé, D.** (2007). The ins and outs of the plant cell cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 655–665.
- De Veylder, L., Larkin, J. C. and Schnittger, A.** (2011). Molecular control and function of endoreplication in development and physiology. *Trends Plant Sci.* **16**, 624–634.
- del Pozo, J. C. and Estelle, M.** (1999). The Arabidopsis cullin AtCUL1 is modified by the ubiquitin-related protein RUB1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 15342–15347.
- del Pozo, J. C., Dharmasiri, S., Hellmann, H., Walker, L., Gray, W. M. and Estelle, M.** (2002a). AXR1-ECR1-Dependent Conjugation of RUB1 to the Arabidopsis Cullin AtCUL1 Is Required for Auxin Response. *Plant Cell* **14**, 421–433.
- del Pozo, J. C., Boniotti, M. B. and Gutierrez, C.** (2002b). Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* **14**, 3057–3071.
- Dello Ioio, R., Nakamura, K., Moubayidin, L., Perilli, S., Taniguchi, M., Morita, M. T., Aoyama, T., Costantino, P. and Sabatini, S.** (2008). A genetic framework for the control of cell division and differentiation in the root meristem. *Science* **322**, 1380–1384.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolaï, M., Bedu, M., Robaglia, C. and Meyer, C.** (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep.* **8**, 864–870.
- Dessau, M., Halimi, Y., Erez, T., Chomsky-Hecht, O., Chamovitz, D. A. and Hirsch, J. A.** (2008). The Arabidopsis COP9 signalosome subunit 7 is a model PCI domain protein with subdomains involved in COP9 signalosome assembly. *Plant Cell* **20**, 2815–2834.
- Dewitte, W., Riou-Khamlichi, C., Scofield, S., Healy, J. M. S., Jacquard, A., Kilby, N. J. and Murray, J. A. H.** (2003). Altered Cell Cycle Distribution, Hyperplasia, and

- Inhibited Differentiation in Arabidopsis Caused by the D-Type Cyclin CYCD3. *Plant Cell* **15**, 79–92.
- Dewitte, W., Scofield, S., Alcasabas, A. A., Maughan, S. C., Menges, M., Braun, N., Collins, C., Nieuwland, J., Prinsen, E., Sundaresan, V., et al.** (2007). Arabidopsis CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 14537–14542.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. and Estelle, M.** (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441–445.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Karunarathna, N., Jurgens, G. and Estelle, M.** (2007). AXL and AXR1 have redundant functions in RUB conjugation and growth and development in Arabidopsis. *Plant J.* **52**, 114–123.
- Dill, A., Thomas, S. G., Hu, J., Steber, C. M. and Sun, T.-P.** (2004). The Arabidopsis F-box protein SLEEPY1 targets gibberellin signaling repressors for gibberellin-induced degradation. *Plant Cell* **16**, 1392–1405.
- Dimova, N. V., Hathaway, N. A., Lee, B.-H., Kirkpatrick, D. S., Berkowitz, M. L., Gygi, S. P., Finley, D. and King, R. W.** (2012). APC/C-mediated multiple monoubiquitylation provides an alternative degradation signal for cyclin B1. *Nat. Cell Biol.* **14**, 168–176.
- Dohmann, E. M. N., Kuhnle, C. and Schwechheimer, C.** (2005). Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in Arabidopsis. *Plant Cell* **17**, 1967–1978.
- Dohmann, E. M. N., Levesque, M. P., De Veylder, L., Reichardt, I., Jürgens, G., Schmid, M. and Schwechheimer, C.** (2008a). The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Dev. Camb. Engl.* **135**, 2013–2022.
- Dohmann, E. M. N., Levesque, M. P., Isono, E., Schmid, M. and Schwechheimer, C.** (2008b). Auxin responses in mutants of the Arabidopsis CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome. *Plant Physiol.* **147**, 1369–1379.
- Dohmann, E. M. N., Nill, C. and Schwechheimer, C.** (2010). DELLA proteins restrain germination and elongation growth in Arabidopsis thaliana COP9 signalosome mutants. *Eur. J. Cell Biol.* **89**, 163–168.
- Doll, N. M., Royek, S., Fujita, S., Okuda, S., Chamot, S., Stintzi, A., Widiez, T., Hothorn, M., Schaller, A., Geldner, N., et al.** (2020). A two-way molecular dialogue between embryo and endosperm is required for seed development. *Science* **367**, 431–435.
- Dong, X., Yang, B., Li, Y., Zhong, C. and Ding, J.** (2009). Molecular Basis of the Acceleration of the GDP-GTP Exchange of Human Ras Homolog Enriched in Brain by Human Translationally Controlled Tumor Protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 23754–23764.
- Doré, K. A., Kashiwakura, J., McDonnell, J. M., Gould, H. J., Kawakami, T., Sutton, B. J. and Davies, A. M.** (2018). Crystal structures of murine and human Histamine-

- Releasing Factor (HRF/TCTP) and a model for HRF dimerisation in mast cell activation. *Mol. Immunol.* **93**, 216–222.
- Doronkin, S., Djagaeva, I. and Beckendorf, S. K.** (2002). CSN5/Jab1 mutations affect axis formation in the *Drosophila* oocyte by activating a meiotic checkpoint. *Dev. Camb. Engl.* **129**, 5053–5064.
- Doumane, M., Lionnet, C., Bayle, V., Jaillais, Y. and Caillaud, M.-C.** (2017). Automated Tracking of Root for Confocal Time-lapse Imaging of Cellular Processes. *Bio-Protoc.* **7**.
- Drisch, R. C. and Stahl, Y.** (2015). Function and regulation of transcription factors involved in root apical meristem and stem cell maintenance. *Front. Plant Sci.* **6**.
- Dubiel, D., Rockel, B., Naumann, M. and Dubiel, W.** (2015). Diversity of COP9 signalosome structures and functional consequences. *FEBS Lett.* **589**, 2507–2513.
- Dubois, M., Van den Broeck, L. and Inzé, D.** (2018). The Pivotal Role of Ethylene in Plant Growth. *Trends Plant Sci.* **23**, 311–323.
- Duda, D. M., Borg, L. A., Scott, D. C., Hunt, H. W., Hammel, M. and Schulman, B. A.** (2008). Structural Insights into NEDD8 Activation of Cullin-RING Ligases: Conformational Control of Conjugation. *Cell* **134**, 995–1006.
- Dumas, C. and Rogowsky, P.** (2008). Fertilization and early seed formation. *C. R. Biol.* **331**, 715–725.
- Dumbliauskas, E., Lechner, E., Jaciubek, M., Berr, A., Pazhouhandeh, M., Alioua, M., Cognat, V., Brukhin, V., Koncz, C., Grossniklaus, U., et al.** (2011). The Arabidopsis CUL4-DDB1 complex interacts with MSI1 and is required to maintain MEDEA parental imprinting. *EMBO J.* **30**, 731–743.
- Estelle, M. A. and Somerville, C.** (1987). Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol. Gen. Genet. MGG* **206**, 200–206.
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S. P., Wei, N. and Deng, X. W.** (2003). The COP9 signalosome interacts physically with SCF COI1 and modulates jasmonate responses. *Plant Cell* **15**, 1083–1094.
- Feng, S., Shen, Y., Sullivan, J. A., Rubio, V., Xiong, Y., Sun, T. and Deng, X. W.** (2004). Arabidopsis CAND1, an Unmodified CUL1-Interacting Protein, Is Involved in Multiple Developmental Pathways Controlled by Ubiquitin/Proteasome-Mediated Protein Degradation. *Plant Cell* **16**, 1870–1882.
- Feng, Y., Liu, D., Yao, H. and Wang, J.** (2007). Solution structure and mapping of a very weak calcium-binding site of human translationally controlled tumor protein by NMR. *Arch. Biochem. Biophys.* **467**, 48–57.
- Figueiredo, D. D., Batista, R. A., Roszak, P. J. and Köhler, C.** (2015). Auxin production couples endosperm development to fertilization. *Nat. Plants* **1**, 1–6.

- Figueiredo, D. D., Batista, R. A., Roszak, P. J., Hennig, L. and Köhler, C.** (2016). Auxin production in the endosperm drives seed coat development in *Arabidopsis*. *eLife* **5**,.
- Figuroa, P., Gusmaroli, G., Serino, G., Habashi, J., Ma, L., Shen, Y., Feng, S., Bostick, M., Callis, J., Hellmann, H., 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.
- Fleischer, T. C., Weaver, C. M., McAfee, K. J., Jennings, J. L. and Link, A. J.** (2006). Systematic identification and functional screens of uncharacterized proteins associated with eukaryotic ribosomal complexes. *Genes Dev.* **20**, 1294–1307.
- Forzani, C., Aichinger, E., Sornay, E., Willemsen, V., Laux, T., Dewitte, W. and Murray, J. A. H.** (2014). WOX5 suppresses CYCLIN D activity to establish quiescence at the center of the root stem cell niche. *Curr. Biol. CB* **24**, 1939–1944.
- Fourquin, C., Beauzamy, L., Chamot, S., Creff, A., Goodrich, J., Boudaoud, A. and Ingram, G.** (2016). Mechanical stress mediated by both endosperm softening and embryo growth underlies endosperm elimination in *Arabidopsis* seeds. *Dev. Camb. Engl.* **143**, 3300–3305.
- Franciosini, A., Moubayidin, L., Du, K., Matari, N. H., Boccaccini, A., Butera, S., Vittorioso, P., Sabatini, S., Jenik, P. D., Costantino, P., et al.** (2015). The COP9 SIGNALOSOME Is Required for Postembryonic Meristem Maintenance in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* **8**, 1623–1634.
- Frescas, D. and Pagano, M.** (2008). Deregulated proteolysis by the F-box proteins SKP2 and β -TrCP: tipping the scales of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 438–449.
- Friml, J., Vieten, A., Sauer, M., Weijers, D., Schwarz, H., Hamann, T., Offringa, R. and Jürgens, G.** (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical–basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* **426**, 147–153.
- Funston, G., Goh, W., Wei, S. J., Tng, Q. S., Brown, C., Jiah Tong, L., Verma, C., Lane, D. and Ghadessy, F.** (2012). Binding of Translationally Controlled Tumour Protein to the N-Terminal Domain of HDM2 Is Inhibited by Nutlin-3. *PLoS ONE* **7**,.
- Gachet, Y., Tournier, S., Lee, M., Lazaris-Karatzas, A., Poulton, T. and Bommer, U. A.** (1999). The growth-related, translationally controlled protein P23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Sci.* **112**, 1257–1271.
- Gagne, J. M., Downes, B. P., Shiu, S.-H., Durski, A. M. and Vierstra, R. D.** (2002). The F-box subunit of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 11519–11524.
- Gaillochet, C. and Lohmann, J. U.** (2015). The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Dev. Camb. Engl.* **142**, 2237–2249.

- Galbraith, D. W., Harkins, K. R., Maddox, J. M., Ayres, N. M., Sharma, D. P. and Firoozabady, E.** (1983). Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* **220**, 1049–1051.
- Genschik, null, Criqui, null, Parmentier, null, Derevier, null and Fleck, null** (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.
- Gnanasekar, M., Thirugnanam, S., Zheng, G., Chen, A. and Ramaswamy, K.** (2009). Gene silencing of translationally controlled tumor protein (TCTP) by siRNA inhibits cell growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Int. J. Oncol.* **34**, 1241–1246.
- Gonzali, S., Novi, G., Loreti, E., Paolicchi, F., Poggi, A., Alpi, A. and Perata, P.** (2005). A turanose-insensitive mutant suggests a role for WOX5 in auxin homeostasis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **44**, 633–645.
- Graidist, P., Phongdara, A. and Fujise, K.** (2004). Antiapoptotic Protein Partners Fortilin and MCL1 Independently Protect Cells from 5-Fluorouracil-induced Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**, 40868–40875.
- Graidist, P., Yazawa, M., Tonganunt, M., Nakatomi, A., Lin, C. C.-J., Chang, J.-Y., Phongdara, A. and Fujise, K.** (2007). Fortilin binds Ca²⁺ and blocks Ca²⁺-dependent apoptosis in vivo. *Biochem. J.* **408**, 181–191.
- Gray, W. M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. and Estelle, M.** (2001). Auxin regulates SCF TIR1 -dependent degradation of AUX/IAA proteins. *Nature* **414**, 271.
- Gray, W. M., Hellmann, H., Dharmasiri, S. and Estelle, M.** (2002). Role of the *Arabidopsis* RING-H2 Protein RBX1 in RUB Modification and SCF Function. *Plant Cell* **14**, 2137–2144.
- Gu, Z., Pan, W., Chen, W., Lian, Q., Wu, Q., Lv, Z., Cheng, X. and Ge, X.** (2019). New perspectives on the plant PARP family: *Arabidopsis* PARP3 is inactive, and PARP1 exhibits predominant poly (ADP-ribose) polymerase activity in response to DNA damage. *BMC Plant Biol.* **19**,.
- Guérinier, T., Millan, L., Crozet, P., Oury, C., Rey, F., Valot, B., Mathieu, C., Vidal, J., Hodges, M., Thomas, M., et al.** (2013). Phosphorylation of p27(KIP1) homologs KRP6 and 7 by SNF1-related protein kinase-1 links plant energy homeostasis and cell proliferation. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **75**, 515–525.
- Guex, N. and Peitsch, M. C.** (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**, 2714–2723.
- Gupta, M., Yoshioka, H., Ohnishi, K., Mizumoto, H., Hikichi, Y. and Kiba, A.** (2013). A Translationally Controlled Tumor Protein Negatively Regulates the Hypersensitive Response in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell Physiol.* **54**, 1403–1414.
- Gusmaroli, G., Feng, S. and Deng, X. W.** (2004). The *Arabidopsis* CSN5A and CSN5B subunits are present in distinct COP9 signalosome complexes, and mutations in their

- JAMM domains exhibit differential dominant negative effects on development. *Plant Cell* **16**, 2984–3001.
- Gusmaroli, G., Figueroa, P., Serino, G. and Deng, X. W.** (2007). Role of the MPN Subunits in COP9 Signalosome Assembly and Activity, and Their Regulatory Interaction with Arabidopsis Cullin3-Based E3 Ligases. *Plant Cell* **19**, 564–581.
- 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**,.
- Gutiérrez-Galeano, D. F., Toscano-Morales, R., Calderón-Pérez, B., Xoconostle-Cázares, B. and Ruiz-Medrano, R.** (2014). Structural divergence of plant TCTPs. *Front. Plant Sci.* **5**,.
- Haas, A. L., Warms, J. V., Hershko, A. and Rose, I. A.** (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J. Biol. Chem.* **257**, 2543–2548.
- Haghighat, N. G. and Ruben, L.** (1992). Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei*: properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 99–110.
- Hakenjos, J. P., Richter, R., Dohmann, E. M. N., Katsiarimpa, A., Isono, E. and Schwechheimer, C.** (2011). MLN4924 Is an Efficient Inhibitor of NEDD8 Conjugation in Plants. *Plant Physiol.* **156**, 527–536.
- Han, Y.-J., Kim, Y.-M., Hwang, O.-J. and Kim, J.-I.** (2015). Characterization of a small constitutive promoter from Arabidopsis translationally controlled tumor protein (AtTCTP) gene for plant transformation. *Plant Cell Rep.* **34**, 265–275.
- Harari-Steinberg, O., Cantera, R., Denti, S., Bianchi, E., Oron, E., Segal, D. and Chamovitz, D. A.** (2007). COP9 signalosome subunit 5 (CSN5/Jab1) regulates the development of the Drosophila immune system: effects on Cactus, Dorsal and hematopoiesis. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **12**, 183–195.
- Heisler, M. G., Ohno, C., Das, P., Sieber, P., Reddy, G. V., Long, J. A. and Meyerowitz, E. M.** (2005). Patterns of Auxin Transport and Gene Expression during Primordium Development Revealed by Live Imaging of the Arabidopsis Inflorescence Meristem. *Curr. Biol.* **15**, 1899–1911.
- Hershko, A., Heller, H., Elias, S. and Ciechanover, A.** (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J. Biol. Chem.* **258**, 8206–8214.
- Hetfeld, B. K. J., Helfrich, A., Kapelari, B., Scheel, H., Hofmann, K., Guterman, A., Glickman, M., Schade, R., Kloetzel, P.-M. and Dubiel, W.** (2005). The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr. Biol. CB* **15**, 1217–1221.

- Hinojosa-Moya, J., Xoconostle-Cázares, B., Piedra-Ibarra, E., Méndez-Tenorio, A., Lucas, W. J. and Ruiz-Medrano, R.** (2008). Phylogenetic and structural analysis of translationally controlled tumor proteins. *J. Mol. Evol.* **66**, 472–483.
- Hoepflinger, M. C., Reitsamer, J., Geretschlaeger, A. M., Mehlmer, N. and Tenhaken, R.** (2013). The effect of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) on programmed cell death in plants. *BMC Plant Biol.* **13**, 135.
- Hong, S.-T. and Choi, K.-W.** (2013). TCTP directly regulates ATM activity to control genome stability and organ development in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Commun.* **4**, ncomms3986.
- Horváth, B. M., Magyar, Z., Zhang, Y., Hamburger, A. W., Bakó, L., Visser, R. G. F., Bachem, C. W. B. and Bögre, L.** (2006). EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants. *EMBO J.* **25**, 4909–4920.
- Hotton, S. K. and Callis, J.** (2008). Regulation of Cullin RING Ligases. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**, 467–489.
- Hove, C. A. ten, Lu, K.-J. and Weijers, D.** (2015). Building a plant: cell fate specification in the early Arabidopsis embryo. *Development* **142**, 420–430.
- Hsu, Y.-C., Chern, J. J., Cai, Y., Liu, M. and Choi, K.-W.** (2007). Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* **445**, 785–788.
- Hu, C.-D., Chinenov, Y. and Kerppola, T. K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**, 789–798.
- Huang, H., Quint, M. and Gray, W. M.** (2013). The eta7/csn3-3 auxin response mutant of Arabidopsis defines a novel function for the CSN3 subunit of the COP9 signalosome. *PLoS One* **8**, e66578.
- Huang, L., Yan, H., Jiang, X., Zhang, Y., Zhang, X., Ji, Y., Zeng, B., Xu, B., Yin, G., Lee, S., et al.** (2014). Reference gene selection for quantitative real-time reverse-transcriptase PCR in orchardgrass subjected to various abiotic stresses. *Gene* **553**, 158–165.
- Imai, K. K., Ohashi, Y., Tsuge, T., Yoshizumi, T., Matsui, M., Oka, A. and Aoyama, T.** (2006). The A-Type Cyclin CYCA2;3 Is a Key Regulator of Ploidy Levels in Arabidopsis Endoreduplication. *Plant Cell* **18**, 382–396.
- Inzé, D. and De Veylder, L.** (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* **40**, 77–105.
- Jean, T.** (2014). Construction d'une Angiosperme Eudicotylédone. <https://www.svt-tanguy-jean.com/uploads/1/2/0/4/120408978/ats-a3-2-angiospermes.pdf>
- Jégu, T., Latrassé, D., Delarue, M., Mazubert, C., Bourge, M., Hudik, E., Blanchet, S., Soler, M.-N., Charon, C., De Veylder, L., et al.** (2013). Multiple Functions of Kip-

- Related Protein5 Connect Endoreduplication and Cell Elongation[C][W]. *Plant Physiol.* **161**, 1694–1705.
- Jeong, S., Eilbert, E., Bolbol, A. and Lukowitz, W.** (2016). Going mainstream: How is the body axis of plants first initiated in the embryo? *Dev. Biol.* **419**, 78–84.
- Johansson, H., Vizlin-Hodzic, D., Simonsson, T. and Simonsson, S.** (2010). Translationally controlled tumor protein interacts with nucleophosmin during mitosis in ES cells. *Cell Cycle* **9**, 2160–2169.
- Jung, J., Kim, M., Kim, M.-J., Kim, J., Moon, J., Lim, J.-S., Kim, M. and Lee, K.** (2004). Translationally Controlled Tumor Protein Interacts with the Third Cytoplasmic Domain of Na,K-ATPase α Subunit and Inhibits the Pump Activity in HeLa Cells. *J. Biol. Chem.* **279**, 49868–49875.
- Jürgens, G.** (1992). Pattern formation in the flowering plant embryo. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2**, 567–570.
- Kamitani, T., Kito, K., Nguyen, H. P. and Yeh, E. T.** (1997). Characterization of NEDD8, a developmentally down-regulated ubiquitin-like protein. *J. Biol. Chem.* **272**, 28557–28562.
- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A.** (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193–195.
- Kaufmann, W. K. and Paules, R. S.** (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *FASEB J.* **10**, 238–247.
- Kawashima, T. and Goldberg, R. B.** (2010). The suspensor: not just suspending the embryo. *Trends Plant Sci.* **15**, 23–30.
- Kim, H. J., Oh, S. A., Brownfield, L., Hong, S. H., Ryu, H., Hwang, I., Twell, D. and Nam, H. G.** (2008a). Control of plant germline proliferation by SCF(FBL17) degradation of cell cycle inhibitors. *Nature* **455**, 1134–1137.
- Kim, J. E., Koo, K. H., Kim, Y. H., Sohn, J. and Park, Y. G.** (2008b). Identification of potential lung cancer biomarkers using an in vitro carcinogenesis model. *Exp. Mol. Med.* **40**, 709–720.
- Kim, E., Yoon, S.-J., Kim, E.-Y., Kim, Y., Lee, H.-S., Kim, K.-H. and Lee, K.-A.** (2011). Function of COP9 signalosome in regulation of mouse oocytes meiosis by regulating MPF activity and securing degradation. *PLoS One* **6**, e25870.
- Kim, Y.-M., Han, Y.-J., Hwang, O.-J., Lee, S.-S., Shin, A.-Y., Kim, S. Y. and Kim, J.-I.** (2012). Overexpression of Arabidopsis Translationally Controlled Tumor Protein Gene AtTCTP Enhances Drought Tolerance with Rapid ABA-Induced Stomatal Closure. *Mol. Cells* **33**, 617–626.
- Knowles, A., Koh, K., Wu, J.-T., Chien, C.-T., Chamovitz, D. A. and Blau, J.** (2009). The COP9 Signalosome Is Required for Light-Dependent Timeless Degradation and Drosophila Clock Resetting. *J. Neurosci.* **29**, 1152–1162.

- Kob, R., Kelm, J., Posorski, N., Baniahmad, A., von Eggeling, F. and Melle, C.** (2009). Regulation of the anaphase-promoting complex by the COP9 signalosome. *Cell Cycle Georget. Tex* **8**, 2041–2049.
- Komaki, S. and Schnittger, A.** (2017). The Spindle Assembly Checkpoint in Arabidopsis Is Rapidly Shut Off during Severe Stress. *Dev. Cell* **43**, 172–185.e5.
- Koo, N., Shin, A.-Y., Oh, S., Kim, H., Hong, S., Park, S.-J., Sim, Y. M., Byeon, I., Kim, K. Y., Lim, Y. P., et al.** (2020). Comprehensive analysis of Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) provides insights for lineage-specific evolution and functional divergence. *PLoS ONE* **15**,.
- Křeček, P., Skůpa, P., Libus, J., Naramoto, S., Tejos, R., Friml, J. and Zažímalová, E.** (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol.* **10**, 249.
- Kwon, Y. V., Zhao, B., Xu, C., Lee, J., Chen, C.-L., Vinayagam, A., Edgar, B. A. and Perrimon, N.** (2019). The role of translationally controlled tumor protein in proliferation of Drosophila intestinal stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 26591–26598.
- Lafon-Placette, C. and Köhler, C.** (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **17**, 64–69.
- Larrieu, A. and Vernoux, T.** (2016). Q&A: How does jasmonate signaling enable plants to adapt and survive? *BMC Biol.* **14**, 79.
- Lee, J.-H. and Kim, W. T.** (2011). Regulation of abiotic stress signal transduction by E3 ubiquitin ligases in Arabidopsis. *Mol. Cells* **31**, 201–208.
- Lee, M.-H., Zhao, R., Phan, L. and Yeung, S.-C. J.** (2011). Roles of COP9 signalosome in cancer. *Cell Cycle Georget. Tex* **10**, 3057–3066.
- Leppert, U., Henke, W., Huang, X., Müller, J. M. and Dubiel, W.** (2011). Post-transcriptional fine-tuning of COP9 signalosome subunit biosynthesis is regulated by the c-Myc/Lin28B/let-7 pathway. *J. Mol. Biol.* **409**, 710–721.
- Levine, A. J.** (1997). p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. *Cell* **88**, 323–331.
- Li, W., Chen, C., Markmann-Mulisch, U., Timofejeva, L., Schmelzer, E., Ma, H. and Reiss, B.** (2004). The Arabidopsis AtRAD51 gene is dispensable for vegetative development but required for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 10596–10601.
- Li, D., Deng, Z., Liu, X. and Qin, B.** (2013). Molecular cloning, expression profiles and characterization of a novel translationally controlled tumor protein in rubber tree (*Hevea brasiliensis*). *J. Plant Physiol.* **170**, 497–504.
- Li, S., Chen, M., Xiong, Q., Zhang, J., Cui, Z. and Ge, F.** (2016). Characterization of the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) Interactome Reveals Novel Binding Partners in Human Cancer Cells. *J. Proteome Res.* **15**, 3741–3751.

- Li, Y., Sun, H., Zhang, C., Liu, J., Zhang, H., Fan, F., Everley, R. A., Ning, X., Sun, Y., Hu, J., et al.** (2017). Identification of translationally controlled tumor protein in promotion of DNA homologous recombination repair in cancer cells by affinity proteomics. *Oncogene*.
- Lingaraju, G. M., Bunker, R. D., Cavadini, S., Hess, D., Hassiepen, U., Renatus, M., Fischer, E. S. and Thomä, N. H.** (2014). Crystal structure of the human COP9 signalosome. *Nature* **512**, 161–165.
- Liu, J., Furukawa, M., Matsumoto, T. and Xiong, Y.** (2002). NEDD8 modification of CUL1 dissociates p120(CAND1), an inhibitor of CUL1-SKP1 binding and SCF ligases. *Mol. Cell* **10**, 1511–1518.
- Liu, H., Peng, H.-W., Cheng, Y.-S., Yuan, H. S. and Yang-Yen, H.-F.** (2005). Stabilization and Enhancement of the Antiapoptotic Activity of Mcl-1 by TCTP. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 3117–3126.
- Liu, J., Zhang, Y., Qin, G., Tsuge, T., Sakaguchi, N., Luo, G., Sun, K., Shi, D., Aki, S., Zheng, N., et al.** (2008). Targeted degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor ICK4/KRP6 by RING-type E3 ligases is essential for mitotic cell cycle progression during Arabidopsis gametogenesis. *Plant Cell* **20**, 1538–1554.
- Liu, C., Guo, L.-Q., Menon, S., Jin, D., Pick, E., Wang, X., Deng, X. W. and Wei, N.** (2013). COP9 signalosome subunit Csn8 is involved in maintaining proper duration of the G1 phase. *J. Biol. Chem.* **288**, 20443–20452.
- Liu, Q., Zhou, Y., Tang, R., Wang, X., Hu, Q., Wang, Y. and He, Q.** (2017). Increasing the Unneddylated Cullin1 Portion Rescues the csn Phenotypes by Stabilizing Adaptor Modules To Drive SCF Assembly. *Mol. Cell. Biol.* **37**,.
- Liu, X., Reitsma, J. M., Mamrosh, J. L., Zhang, Y., Straube, R. and Deshaies, R. J.** (2018). Cand1-Mediated Adaptive Exchange Mechanism Enables Variation in F-Box Protein Expression. *Mol. Cell* **69**, 773–786.e6.
- Logemann, E., Birkenbihl, R. P., Ulker, B. and Somssich, I. E.** (2006). An improved method for preparing Agrobacterium cells that simplifies the Arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods* **2**, 16.
- Lydeard, J. R., Schulman, B. A. and Harper, J. W.** (2013). Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO Rep.* **14**, 1050–1061.
- Ma, Q., Geng, Y., Xu, W., Wu, Y., He, F., Shu, W., Huang, M., Du, H. and Li, M.** (2010). The role of translationally controlled tumor protein in tumor growth and metastasis of colon adenocarcinoma cells. *J. Proteome Res.* **9**, 40–49.
- Magyar, Z., Bögre, L. and Ito, M.** (2016). DREAMs make plant cells to cycle or to become quiescent. *Curr. Opin. Plant Biol.* **34**, 100–106.
- Mahapatra, K. and Roy, S.** (2020). An insight into the mechanism of DNA damage response in plants- role of SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1: An overview. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **819–820**, 111689.

- Maller, J. L., Gautier, J., Langan, T. A., Lohka, M. J., Shenoy, S., Shalloway, D. and Nurse, P.** (1989). Maturation-promoting factor and the regulation of the cell cycle. *J. Cell Sci.* **1989**, 53–63.
- Marrocco, K., Criqui, M.-C., Zervudacki, J., Schott, G., Eisler, H., Parnet, A., Dunoyer, P. and Genschik, P.** (2012). APC/C-mediated degradation of dsRNA-binding protein 4 (DRB4) involved in RNA silencing. *PLoS One* **7**, e35173.
- Matsunaga, S., Katagiri, Y., Nagashima, Y., Sugiyama, T., Hasegawa, J., Hayashi, K. and Sakamoto, T.** (2013). Chapter Six - New Insights into the Dynamics of Plant Cell Nuclei and Chromosomes. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (ed. Jeon, K. W.), pp. 253–301. Academic Press.
- Meinke, D. W.** (2020). Genome-wide identification of EMBRYO-DEFECTIVE (EMB) genes required for growth and development in Arabidopsis. *New Phytol.* **226**, 306–325.
- Menges, M., De Jager, S. M., Gruissem, W. and Murray, J. A. H.** (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control: Global analysis of plant core cell cycle regulators. *Plant J.* **41**, 546–566.
- Menges, M., Samland, A. K., Planchais, S. and Murray, J. A. H.** (2006). The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 893–906.
- Menon, S., Chi, H., Zhang, H., Deng, X. W., Flavell, R. A. and Wei, N.** (2007). COP9 signalosome subunit 8 is essential for peripheral T cell homeostasis and antigen receptor-induced entry into the cell cycle from quiescence. *Nat. Immunol.* **8**, 1236–1245.
- Meyuhas, O. and Kahan, T.** (2015). The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* **1849**, 801–811.
- Millan, L.** (2011). Caractérisation d'inhibiteurs de complexes CDK-cycline chez Arabidopsis thaliana.
- Miller, C. O., Skoog, F., Okumura, F. S., Von Saltza, M. H. and Strong, F. M.** (1956). Isolation, Structure and Synthesis of Kinetin, a Substance Promoting Cell Division^{1,2}. *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1375–1380.
- Miricescu, A., Goslin, K. and Graciet, E.** (2018). Ubiquitylation in plants: signaling hub for the integration of environmental signals. *J. Exp. Bot.* **69**, 4511–4527.
- Molinier, J., Lechner, E., Dumbliauskas, E. and Genschik, P.** (2008). Regulation and role of Arabidopsis CUL4-DDB1A-DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *PLoS Genet.* **4**, e1000093.
- Morgan, D., Owen** (2006). *The Cell Cycle: Principles of Control*. OUP Oxford.

- Morimoto, M., Nishida, T., Nagayama, Y. and Yasuda, H.** (2003). Nedd8-modification of Cull1 is promoted by Roc1 as a Nedd8-E3 ligase and regulates its stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **301**, 392–398.
- Mosadeghi, R., Reichermeier, K. M., Winkler, M., Schreiber, A., Reitsma, J. M., Zhang, Y., Stengel, F., Cao, J., Kim, M., Sweredoski, M. J., et al.** (2016). Structural and kinetic analysis of the COP9-Signalosome activation and the cullin-RING ubiquitin ligase deneddylation cycle. *eLife* **5**,.
- Müller, B. and Sheen, J.** (2007). Arabidopsis cytokinin signaling pathway. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* **2007**, cm5.
- Müller, B. and Sheen, J.** (2008). Cytokinin and auxin interplay in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**, 1094–1097.
- Murashige, T. and Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* **15**, 473–497.
- Nagata, T., Nemoto, Y. and Hasezawa, S.** (1992). Tobacco BY-2 Cell Line as the “HeLa” Cell in the Cell Biology of Higher Plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**, 1–30.
- Nakagami, H., Kawamura, K., Sugisaka, K., Sekine, M. and Shinmyo, A.** (2002). Phosphorylation of retinoblastoma-related protein by the cyclin D/cyclin-dependent kinase complex is activated at the G1/S-phase transition in tobacco. *Plant Cell* **14**, 1847–1857.
- Nieuwland, J., Maughan, S., Dewitte, W., Scofield, S., Sanz, L. and Murray, J. A. H.** (2009). The D-type cyclin CYCD4;1 modulates lateral root density in Arabidopsis by affecting the basal meristem region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 22528–22533.
- Nieuwland, J., Stamm, P., Wen, B., Randall, R. S., Murray, J. A. H. and Bassel, G. W.** (2016). Re-induction of the cell cycle in the Arabidopsis post-embryonic root meristem is ABA-insensitive, GA-dependent and repressed by KRP6. *Sci. Rep.* **6**, 23586.
- Oh, W., Lee, E.-W., Sung, Y. H., Yang, M.-R., Ghim, J., Lee, H.-W. and Song, J.** (2006). Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2. *J. Biol. Chem.* **281**, 17457–17465.
- Ohme-Takagi, M., Taylor, C. B., Newman, T. C. and Green, P. J.** (1993). The effect of sequences with high AU content on mRNA stability in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 11811–11815.
- Ormenese, S., de Almeida Engler, J., De Groot, R., De Veylder, L., Inzé, D. and Jacquard, A.** (2004). Analysis of the spatial expression pattern of seven Kip related proteins (KRPs) in the shoot apex of Arabidopsis thaliana. *Ann. Bot.* **93**, 575–580.
- Oron, E., Tuller, T., Li, L., Rozovsky, N., Yekutieli, D., Rencus-Lazar, S., Segal, D., Chor, B., Edgar, B. A. and Chamovitz, D. A.** (2007). Genomic analysis of COP9 signalosome function in Drosophila melanogaster reveals a role in temporal regulation of gene expression. *Mol. Syst. Biol.* **3**,.

- Pacurar, D. I., Pacurar, M. L., Lakehal, A., Pacurar, A. M., Ranjan, A. and Bellini, C.** (2017). The Arabidopsis Cop9 signalosome subunit 4 (CSN4) is involved in adventitious root formation. *Sci. Rep.* **7**,.
- Panattoni, M., Maiorino, L., Lukacs, A., Zentilin, L., Mazza, D., Sanvito, F., Sitia, G., Guidotti, L. G. and Pardi, R.** (2014). The COP9 signalosome is a repressor of replicative stress responses and polyploidization in the regenerating liver. *Hepatol. Baltim. Md* **59**, 2331–2343.
- Pardee, A. B.** (1974). A Restriction Point for Control of Normal Animal Cell Proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 1286–1290.
- Parry, G. and Estelle, M.** (2004). Regulation of cullin-based ubiquitin ligases by the Nedd8/RUB ubiquitin-like proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 221–229.
- Peng, Z., Serino, G. and Deng, X.-W.** (2001). A role of Arabidopsis COP9 signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. *Development* **128**, 4277–4288.
- Peth, A., Berndt, C., Henke, W. and Dubiel, W.** (2007). Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects the CSN complex and target protein stability. *BMC Biochem.* **8**, 27.
- Planchais, S., Samland, A. K. and Murray, J. A. H.** (2004). Differential stability of Arabidopsis D-type cyclins: CYCD3;1 is a highly unstable protein degraded by a proteasome-dependent mechanism. *Plant J.* **38**, 616–625.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.-P., Segers, G., Veylder, L. D., Barrôco, R. de P., Casteels, P., Montagu, M. V., Inzé, D. and Mironov, V.** (2001). A Plant-specific Cyclin-dependent Kinase Is Involved in the Control of G2/M Progression in Plants. *J. Biol. Chem.* **276**, 36354–36360.
- Pozo, J. C. del, Diaz-Trivino, S., Cisneros, N. and Gutierrez, C.** (2006). The Balance between Cell Division and Endoreplication Depends on E2FC-DPB, Transcription Factors Regulated by the Ubiquitin-SCFSKP2A Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 2224–2235.
- R Core Team** (2017). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*.
- Rao-Naik, C., DelaCruz, W., Laplaza, J. M., Tan, S., Callis, J. and Fisher, A. J.** (1998). The rub family of ubiquitin-like proteins: Crystal structure of arabidopsis RUB1 and expression of multiple rubs in arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **273**, 34976–34982.
- Rasband, W., Dougherty, B., Collins, T., Karperian, A. and Stervo, U.** (2006). *Multi-Measure*.
- Rehmann, H., Brüning, M., Berghaus, C., Schwarten, M., Köhler, K., Stocker, H., Stoll, R., Zwartkruis, F. J. and Wittinghofer, A.** (2008). Biochemical characterisation of TCTP questions its function as a guanine nucleotide exchange factor for Rheb. *FEBS Lett.* **582**, 3005–3010.

- Reidt, W., Wurz, R., Wanieck, K., Chu, H. H. and Puchta, H.** (2006). A homologue of the breast cancer-associated gene BARD1 is involved in DNA repair in plants. *EMBO J.* **25**, 4326–4337.
- Ren, H., Santner, A., del Pozo, J. C., Murray, J. A. H. and Estelle, M.** (2008). Degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor KRP1 is regulated by two different ubiquitin E3 ligases. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **53**, 705–716.
- Rho, S. B., Lee, J. H., Park, M. S., Byun, H.-J., Kang, S., Seo, S.-S., Kim, J.-Y. and Park, S.-Y.** (2011). Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53. *FEBS Lett.* **585**, 29–35.
- Rinnerthaler, M., Lejskova, R., Grousl, T., Stradalova, V., Heeren, G., Richter, K., Breitenbach-Koller, L., Malinsky, J., Hasek, J. and Breitenbach, M.** (2013). Mmi1, the Yeast Homologue of Mammalian TCTP, Associates with Stress Granules in Heat-Shocked Cells and Modulates Proteasome Activity. *PLoS ONE* **8**.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J. M. and Murray, J. A.** (2000). Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of Arabidopsis D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4513–4521.
- Robert, H. S., Grones, P., Stepanova, A. N., Robles, L. M., Lokerse, A. S., Alonso, J. M., Weijers, D. and Friml, J.** (2013). Local auxin sources orient the apical-basal axis in Arabidopsis embryos. *Curr. Biol. CB* **23**, 2506–2512.
- Roeder, A. H. K., Chickarmane, V., Cunha, A., Obara, B., Manjunath, B. S. and Meyerowitz, E. M.** (2010). Variability in the Control of Cell Division Underlies Sepal Epidermal Patterning in Arabidopsis thaliana. *PLoS Biol.* **8**.
- Roy, A., Yang, J. and Zhang, Y.** (2012). COFACTOR: an accurate comparative algorithm for structure-based protein function annotation. *Nucleic Acids Res.* **40**, W471–W477.
- Rozen, S., Füzesi-Levi, M. G., Ben-Nissan, G., Mizrachi, L., Gabashvili, A., Levin, Y., Ben-Dor, S., Eisenstein, M. and Sharon, M.** (2015). CSNAP Is a Stoichiometric Subunit of the COP9 Signalosome. *Cell Rep.* **13**, 585–598.
- Ruegger, M., Dewey, E., Gray, W. M., Hobbie, L., Turner, J. and Estelle, M.** (1998). The TIR1 protein of Arabidopsis functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast Grr1p. *Genes Dev.* **12**, 198–207.
- Saeki, Y.** (2017). Ubiquitin recognition by the proteasome. *J. Biochem. (Tokyo)* **161**, 113–124.
- Santa Brígida, A. B., dos Reis, S. P., de Nazaré Monteiro Costa, C., Cardoso, C. M. Y., Lima, A. M. and de Souza, C. R. B.** (2014). Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response. *Mol. Biol. Rep.* **41**, 1787–1797.
- Sarkar, A. K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R. and Laux, T.** (2007). Conserved factors regulate signalling in Arabidopsis thaliana shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811–814.

- Schlierf, A., Altmann, E., Quancard, J., Jefferson, A. B., Assenberg, R., Renatus, M., Jones, M., Hassiepen, U., Schaefer, M., Kiffe, M., et al.** (2016). Targeted inhibition of the COP9 signalosome for treatment of cancer. *Nat. Commun.* **7**, 13166.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S. and Eliceiri, K. W.** (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675.
- Schnittger, A., Schöbinger, U., Bouyer, D., Weinl, C., Stierhof, Y.-D. and Hülskamp, M.** (2002). Ectopic D-type cyclin expression induces not only DNA replication but also cell division in *Arabidopsis* trichomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 6410–6415.
- Schönthal, A. H.** (2004). Measuring cyclin-dependent kinase activity. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **281**, 105–124.
- Schwechheimer, C.** (2018). NEDD8—its role in the regulation of Cullin-RING ligases. *Curr. Opin. Plant Biol.* **45**, 112–119.
- 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.
- Seo, E.-J., Fischer, N. and Efferth, T.** (2017). Role of TCTP for Cellular Differentiation and Cancer Therapy. *Results Probl. Cell Differ.* **64**, 263–281.
- 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.
- Sertic, S., Evolvi, C., Tumini, E., Plevani, P., Muzi-Falconi, M. and Rotondo, G.** (2013). Non-canonical CRL4A/4B(CDT2) interacts with RAD18 to modulate post replication repair and cell survival. *PLoS One* **8**, e60000.
- Sharon, M., Mao, H., Boeri Erba, E., Stephens, E., Zheng, N. and Robinson, C. V.** (2009). Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. *Struct. Lond. Engl.* **17**, 31–40.
- Shen, W.-H., Parmentier, Y., Hellmann, H., Lechner, E., Dong, A., Masson, J., Granier, F., Lepiniec, L., Estelle, M. and Genschik, P.** (2002). Null Mutation of AtCUL1 Causes Arrest in Early Embryogenesis in *Arabidopsis*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1916–1928.
- Shimotohno, A., Umeda-Hara, C., Bisova, K., Uchimiya, H. and Umeda, M.** (2004). The Plant-Specific Kinase CDKF;1 Is Involved in Activating Phosphorylation of Cyclin-Dependent Kinase-Activating Kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 2954–2966.
- Singer, R., Atar, S., Atias, O., Oron, E., Segal, D., Hirsch, J. A., Tuller, T., Orian, A. and Chamovitz, D. A.** (2014). *Drosophila* COP9 signalosome subunit 7 interacts with multiple genomic loci to regulate development. *Nucleic Acids Res.* **42**, 9761–9770.
- Singh, A. K. and Chamovitz, D. A.** (2019). Role of Cop9 Signalosome Subunits in the Environmental and Hormonal Balance of Plant. *Biomolecules* **9**,

- Sornay, E., Forzani, C., Forero-Vargas, M., Dewitte, W. and Murray, J. A. H. (2015).** Activation of CYCD7;1 in the central cell and early endosperm overcomes cell-cycle arrest in the Arabidopsis female gametophyte, and promotes early endosperm and embryo development. *Plant J.* **84**, 41–55.
- Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, M. A., Busch, W., Van Norman, J. M., Vernoux, T., Brady, S. M., Dewitte, W., Murray, J. A. H. and Benfey, P. N. (2010).** Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* **466**, 128–132.
- Stahl, Y., Wink, R. H., Ingram, G. C. and Simon, R. (2009).** A signaling module controlling the stem cell niche in Arabidopsis root meristems. *Curr. Biol. CB* **19**, 909–914.
- Stahl, Y., Grabowski, S., Bleckmann, A., Kühnemuth, R., Weidtkamp-Peters, S., Pinto, K. G., Kirschner, G. K., Schmid, J. B., Wink, R. H., Hülsewede, A., et al. (2013).** Moderation of Arabidopsis root stemness by CLAVATA1 and ARABIDOPSIS CRINKLY4 receptor kinase complexes. *Curr. Biol. CB* **23**, 362–371.
- Stratmann, J. W. and Gusmaroli, G. (2012).** Many jobs for one good cop – The COP9 signalosome guards development and defense. *Plant Sci.* **185–186**, 50–64.
- Stuttman, J., Lechner, E., Guérois, R., Parker, J. E., Nussaume, L., Genschik, P. and Noël, L. D. (2009a).** COP9 signalosome- and 26S proteasome-dependent regulation of SCFTIR1 accumulation in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **284**, 7920–7930.
- Stuttman, J., Parker, J. E. and Noël, L. D. (2009b).** Novel aspects of COP9 signalosome functions revealed through analysis of hypomorphic csn mutants. *Plant Signal. Behav.* **4**, 896–898.
- Suisse, A., He, D., Legent, K. and Treisman, J. E. (2017).** COP9 signalosome subunits protect Capicua from MAPK-dependent and -independent mechanisms of degradation. *Development* **144**, 2673–2682.
- Suisse, A., Békés, M., Huang, T. T. and Treisman, J. E. (2018).** The COP9 signalosome inhibits Cullin-RING E3 ubiquitin ligases independently of its deneddylase activity. *Fly (Austin)* **12**, 118–126.
- Sun, L., Shi, L., Wang, F., Huangyang, P., Si, W., Yang, J., Yao, Z. and Shang, Y. (2011).** Substrate phosphorylation and feedback regulation in JFK-promoted p53 destabilization. *J. Biol. Chem.* **286**, 4226–4235.
- Susini, L., Besse, S., Duflaut, D., Lespagnol, A., Beekman, C., Fiucci, G., Atkinson, A. R., Busso, D., Poussin, P., Marine, J.-C., et al. (2008).** TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ.* **15**, 1211–1220.
- Szécsi, J., Joly, C., Bordji, K., Varaud, E., Cock, J. M., Dumas, C. and Bendahmane, M. (2006).** BIGPETALp, a bHLH transcription factor is involved in the control of Arabidopsis petal size. *EMBO J.* **25**, 3912–3920.

- Takahashi, N., Ogita, N., Takahashi, T., Taniguchi, S., Tanaka, M., Seki, M. and Umeda, M.** (2019). A regulatory module controlling stress-induced cell cycle arrest in *Arabidopsis*. *eLife* **8**, e43944.
- Tang, H. and Thomas, P. D.** (2016). PANTHER-PSEP: predicting disease-causing genetic variants using position-specific evolutionary preservation. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **32**, 2230–2232.
- Tao, J.-J., Cao, Y.-R., Chen, H.-W., Wei, W., Li, Q.-T., Ma, B., Zhang, W.-K., Chen, S.-Y. and Zhang, J.-S.** (2015). Tobacco Translationally Controlled Tumor Protein Interacts with Ethylene Receptor Tobacco Histidine Kinase1 and Enhances Plant Growth through Promotion of Cell Proliferation1[OPEN]. *Plant Physiol.* **169**, 96–114.
- Teixeira, L. K. and Reed, S. I.** (2013). Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu. Rev. Biochem.* **82**, 387–414.
- Tenbaum, S. P., Papaioannou, M., Reeb, C. A., Goeman, F., Escher, N., Kob, R., von Eggeling, F., Melle, C. and Baniahmad, A.** (2007). Alien inhibits E2F1 gene expression and cell proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1447–1454.
- Thaw, P., Baxter, N. J., Hounslow, A. M., Price, C., Waltho, J. P. and Craven, C. J.** (2001). Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 701–704.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A. and Browse, J.** (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**, 661–665.
- Thomann, A., Lechner, E., Hansen, M., Dumbliuskas, E., Parmentier, Y., Kieber, J., Scheres, B. and Genschik, P.** (2009). *Arabidopsis* CULLIN3 Genes Regulate Primary Root Growth and Patterning by Ethylene-Dependent and -Independent Mechanisms. *PLoS Genet.* **5**.
- Thomas, G., Thomas, G. and Luther, H.** (1981). Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**, 5712–5716.
- Tian, Q., Nagpal, P. and Reed, J. W.** (2003). Regulation of *Arabidopsis* SHY2/IAA3 protein turnover. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **36**, 643–651.
- Tomoda, K., Kubota, Y., Arata, Y., Mori, S., Maeda, M., Tanaka, T., Yoshida, M., Yoneda-Kato, N. and Kato, J.** (2002). The Cytoplasmic Shuttling and Subsequent Degradation of p27Kip1 Mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 Signalosome Complex. *J. Biol. Chem.* **277**, 2302–2310.
- Toscano-Morales, R., Xoconostle-Cázares, B., Cabrera-Ponce, J. L., Hinojosa-Moya, J., Ruiz-Salas, J. L., Galván-Gordillo, V. S., Guevara-González, R. G. and Ruiz-Medrano, R.** (2015). AtTCTP2, an *Arabidopsis thaliana* homolog of Translationally Controlled Tumor Protein, enhances in vitro plant regeneration. *Front. Plant Sci.* **6**.

- Tuynder, M., Fiucci, G., Prieur, S., Lespagnol, A., Géant, A., Beaucourt, S., Duflaut, D., Besse, S., Susini, L., Cavarelli, J., et al.** (2004). Translationally controlled tumor protein is a target of tumor reversion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 15364–15369.
- Ullah, Z., Buckley, M. S., Arnosti, D. N. and Henry, R. W.** (2007). Retinoblastoma protein regulation by the COP9 signalosome. *Mol. Biol. Cell* **18**, 1179–1186.
- Umeda, M., Shimotohno, A. and Yamaguchi, M.** (2005). Control of Cell Division and Transcription by Cyclin-dependent Kinase-activating Kinases in Plants. *Plant Cell Physiol.* **46**, 1437–1442.
- Van Leene, J., Boruc, J., De Jaeger, G., Russinova, E. and De Veylder, L.** (2011). A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. *Trends Plant Sci.* **16**, 141–150.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S. and Inzé, D.** (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 903–916.
- Vandepoele, K., Vlieghe, K., Florquin, K., Hennig, L., Beemster, G. T. S., Gruitsem, W., Van de Peer, Y., Inzé, D. and De Veylder, L.** (2005). Genome-wide identification of potential plant E2F target genes. *Plant Physiol.* **139**, 316–328.
- Vanneste, S. and Friml, J.** (2009). Auxin: A Trigger for Change in Plant Development. *Cell* **136**, 1005–1016.
- Vanstraelen, M., Balaban, M., Da Ines, O., Cultrone, A., Lammens, T., Boudolf, V., Brown, S. C., De Veylder, L., Mergaert, P. and Kondorosi, E.** (2009). APC/CCCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 11806–11811.
- Vedadi, M., Lew, J., Artz, J., Amani, M., Zhao, Y., Dong, A., Wasney, G. A., Gao, M., Hills, T., Brokx, S., et al.** (2007). Genome-scale protein expression and structural biology of Plasmodium falciparum and related Apicomplexan organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* **151**, 100–110.
- Velappan, Y., Signorelli, S. and Considine, M. J.** (2017). Cell cycle arrest in plants: what distinguishes quiescence, dormancy and differentiated G1? *Ann. Bot.* **120**, 495–509.
- Venugopal, T.** (2005). Evolution and expression of Translationally Controlled Tumour Protein (TCTP) of fish. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* **142**, 8–17.
- Verkest, A., Manes, C.-L. de O., Vercruyse, S., Maes, S., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Genschik, P., Kuiper, M., Inzé, D. and De Veylder, L.** (2005). The Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor KRP2 Controls the Onset of the Endoreduplication Cycle during Arabidopsis Leaf Development through Inhibition of Mitotic CDKA;1 Kinase Complexes. *Plant Cell* **17**, 1723–1736.
- Walker, J. D., Oppenheimer, D. G., Concienne, J. and Larkin, J. C.** (2000). SIAMESE, a gene controlling the endoreduplication cell cycle in Arabidopsis thaliana trichomes. *Dev. Camb. Engl.* **127**, 3931–3940.

- Walton, A., Stes, E., Cybulski, N., Van Bel, M., Iñigo, S., Durand, A. N., Timmerman, E., Heyman, J., Pauwels, L., De Veylder, L., et al.** (2016). It's Time for Some "Site"-Seeing: Novel Tools to Monitor the Ubiquitin Landscape in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **28**, 6–16.
- Wang, H., Zhou, Y., Gilmer, S., Whitwill, S. and Fowke, L. C.** (2000). Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **24**, 613–623.
- Wang, X., Feng, S., Nakayama, N., Crosby, W. L., Irish, V., Deng, X. W. and Wei, N.** (2003). The COP9 signalosome interacts with SCF UFO and participates in *Arabidopsis* flower development. *Plant Cell* **15**, 1071–1082.
- Wang, H., Zhou, Y., Bird, D. A. and Fowke, L. C.** (2008a). Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *J. Microsc.* **231**, 234–246.
- Wang, X., Fonseca, B. D., Tang, H., Liu, R., Elia, A., Clemens, M. J., Bommer, U.-A. and Proud, C. G.** (2008b). Re-evaluating the Roles of Proposed Modulators of Mammalian Target of Rapamycin Complex 1 (mTORC1) Signaling. *J. Biol. Chem.* **283**, 30482–30492.
- Wang, J., Hu, Q., Chen, H., Zhou, Z., Li, W., Wang, Y., Li, S. and He, Q.** (2010). Role of Individual Subunits of the *Neurospora crassa* CSN Complex in Regulation of Deneddylation and Stability of Cullin Proteins. *PLoS Genet.* **6**, e1001232.
- Wang, Z. Q., Li, G. Z., Gong, Q. Q., Li, G. X. and Zheng, S. J.** (2015). OsTCTP, encoding a translationally controlled tumor protein, plays an important role in mercury tolerance in rice. *BMC Plant Biol.* **15**,.
- Wang, L., Zheng, J.-N. and Pei, D.-S.** (2016). The emerging roles of Jab1/CSN5 in cancer. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* **33**, 90.
- Wasternack, C. and Hause, B.** (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* **111**, 1021–1058.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. and Barton, G. J.** (2009). Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191.
- Wei, N. and Deng, X.-W.** (1992). COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **4**, 1507–1518.
- Wei, N. and Deng, X. W.** (1999). Making sense of the COP9 signalosome. A regulatory protein complex conserved from *Arabidopsis* to human. *Trends Genet. TIG* **15**, 98–103.
- Wei, N. and Deng, X. W.** (2003). The COP9 signalosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 261–286.

- Wei, N., Serino, G. and Deng, X.** (2008). The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem. Sci.* **33**, 592–600.
- Weimer, A. K., Biedermann, S., Harashima, H., Roodbarkelari, F., Takahashi, N., Foreman, J., Guan, Y., Pochon, G., Heese, M., Van Damme, D., et al.** (2016). The plant-specific CDKB1-CYCB1 complex mediates homologous recombination repair in Arabidopsis. *EMBO J.* **35**, 2068–2086.
- Weimer, A. K., Matos, J. L., Sharma, N., Patell, F., Murray, J. A. H., Dewitte, W. and Bergmann, D. C.** (2018). Lineage- and stage-specific expressed CYCD7;1 coordinates the single symmetric division that creates stomatal guard cells. *Dev. Camb. Engl.* **145**,.
- Weingartner, M., Pelayo, H. R., Binarova, P., Zwerger, K., Melikant, B., Torre, C. de la, Heberle-Bors, E. and Bögre, L.** (2003). A plant cyclin B2 is degraded early in mitosis and its ectopic expression shortens G2-phase and alleviates the DNA-damage checkpoint. *J. Cell Sci.* **116**, 487–498.
- Wen, B., Nieuwland, J. and Murray, J. A. H.** (2013). The Arabidopsis CDK inhibitor ICK3/KRP5 is rate limiting for primary root growth and promotes growth through cell elongation and endoreduplication. *J. Exp. Bot.* **64**, 1–13.
- Wildwater, M., Campilho, A., Perez-Perez, J. M., Heidstra, R., Blilou, I., Korthout, H., Chatterjee, J., Mariconti, L., Gruijsem, W. and Scheres, B.** (2005). The RETINOBLASTOMA-RELATED Gene Regulates Stem Cell Maintenance in Arabidopsis Roots. *Cell* **123**, 1337–1349.
- Wu, J.-T., Lin, W.-H., Chen, W.-Y., Huang, Y.-C., Tang, C.-Y., Ho, M. S., Pi, H. and Chien, C.-T.** (2011). CSN-mediated deneddylation differentially modulates Ci155 proteolysis to promote Hedgehog signalling responses. *Nat. Commun.* **2**, 182.
- Wu, H., Gong, W., Yao, X., Wang, J., Perrett, S. and Feng, Y.** (2015). Evolutionarily conserved binding of translationally controlled tumor protein to eukaryotic elongation factor 1B. *J. Biol. Chem.* **290**, 8694–8710.
- Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N.** (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **124**, 471–484.
- Xu, J. and Zhang, Y.** (2010). How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5? *Bioinformatics* **26**, 889–895.
- Yang, J. and Zhang, Y.** (2015). I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res.* **43**, W174–W181.
- Yang, X., Menon, S., Lykke-Andersen, K., Tsuge, T., Di Xiao, null, Wang, X., Rodriguez-Suarez, R. J., Zhang, H. and Wei, N.** (2002). The COP9 signalosome inhibits p27(kip1) degradation and impedes G1-S phase progression via deneddylation of SCF Cull1. *Curr. Biol. CB* **12**, 667–672.
- Yang, Y., Yang, F., Xiong, Z., Yan, Y., Wang, X., Nishino, M., Mirkovic, D., Nguyen, J., Wang, H. and Yang, X.-F.** (2005). An N-terminal region of translationally controlled tumor protein is required for its antiapoptotic activity. *Oncogene* **24**, 4778–4788.

- Yang, S., Johnston, N., Talideh, E., Mitchell, S., Jeffree, C., Goodrich, J. and Ingram, G.** (2008). The endosperm-specific ZHOUP1 gene of *Arabidopsis thaliana* regulates endosperm breakdown and embryonic epidermal development. *Development* **135**, 3501–3509.
- Yao, X., Liu, Y.-J., Cui, Q. and Feng, Y.** (2019). Solution structure of a unicellular microalgae-derived translationally controlled tumor protein revealed both conserved features and structural diversity. *Arch. Biochem. Biophys.* **665**, 23–29.
- Yarm, F. R.** (2002). Plk Phosphorylation Regulates the Microtubule-Stabilizing Protein TCTP. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6209–6221.
- Yenofsky, R., Bergmann, I. and Brawerman, G.** (1982). Messenger RNA species partially in a repressed state in mouse sarcoma ascites cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**, 5876–5880.
- Yi, D., Alvim Kamei, C. L., Cools, T., Vanderauwera, S., Takahashi, N., Okushima, Y., Eekhout, T., Yoshiyama, K. O., Larkin, J., Van den Daele, H., et al.** (2014). The *Arabidopsis* SIAMESE-RELATED cyclin-dependent kinase inhibitors SMR5 and SMR7 regulate the DNA damage checkpoint in response to reactive oxygen species. *Plant Cell* **26**, 296–309.
- Yokoyama, R., Hirakawa, T., Hayashi, S., Sakamoto, T. and Matsunaga, S.** (2016). Dynamics of plant DNA replication based on PCNA visualization. *Sci. Rep.* **6**.
- Yoshida, A., Yoneda-Kato, N., Panattoni, M., Pardi, R. and Kato, J.** (2010). CSN5/Jab1 controls multiple events in the mammalian cell cycle. *FEBS Lett.* **584**, 4545–4552.
- Zemla, A., Thomas, Y., Kedziora, S., Knebel, A., Wood, N. T., Rabut, G. and Kurz, T.** (2013). CSN- and CAND1-dependent remodelling of the budding yeast SCF complex. *Nat. Commun.* **4**, 1641.
- Zhang, Y.** (2009). I-TASSER: fully automated protein structure prediction in CASP8. *Proteins* **77 Suppl 9**, 100–113.
- Zhang, Y. and Skolnick, J.** (2004). Scoring function for automated assessment of protein structure template quality. *Proteins* **57**, 702–710.
- Zhang, X.-C., Chen, J., Su, C.-H., Yang, H.-Y. and Lee, M.-H.** (2008a). Roles for CSN5 in control of p53/MDM2 activities. *J. Cell. Biochem.* **103**, 1219–1230.
- Zhang, W., Ito, H., Quint, M., Huang, H., Noël, L. D. and Gray, W. M.** (2008b). Genetic analysis of CAND1–CUL1 interactions in *Arabidopsis* supports a role for CAND1-mediated cycling of the SCFTIR1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 8470–8475.
- Zhang, J., de Toledo, S. M., Pandey, B. N., Guo, G., Pain, D., Li, H. and Azzam, E. I.** (2012). Role of the translationally controlled tumor protein in DNA damage sensing and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E926–E933.
- Zhang, L., Li, W., Han, S., Yang, W. and Qi, L.** (2013a). cDNA cloning, genomic organization and expression analysis during somatic embryogenesis of the

- translationally controlled tumor protein (TCTP) gene from Japanese larch (*Larix leptolepis*). *Gene* **529**, 150–158.
- Zhang, W., Swarup, R., Bennett, M., Schaller, G. E. and Kieber, J. J.** (2013b). Cytokinin Induces Cell Division in the Quiescent Center of the Arabidopsis Root Apical Meristem. *Curr. Biol.* **23**, 1979–1989.
- Zhang, J.-M., Ma, L.-F., Li, W., Zhang, J., Li, D.-D. and Li, X.-B.** (2014). Cotton TCTP1 gene encoding a translationally controlled tumor protein participates in plant response and tolerance to aphids. *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC* **117**, 145–156.
- Zhang, H., Luo, M., Day, R. C., Talbot, M. J., Ivanova, A., Ashton, A. R., Chaudhury, A. M., Macknight, R. C., Hrmova, M. and Koltunow, A. M.** (2015). Developmentally regulated HEART STOPPER, a mitochondrially targeted L18 ribosomal protein gene, is required for cell division, differentiation, and seed development in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* **66**, 5867–5880.
- Zhang, H., Zhong, A., Sun, J., Chen, M., Xie, S., Zheng, H., Wang, Y., Yu, Y., Guo, L. and Lu, R.** (2017). COPS5 inhibition arrests the proliferation and growth of serous ovarian cancer cells via the elevation of p27 level. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **493**, 85–93.
- Zhao, D., Yu, Q., Chen, M. and Ma, H.** (2001). The ASK1 gene regulates B function gene expression in cooperation with UFO and LEAFY in Arabidopsis. *Dev. Camb. Engl.* **128**, 2735–2746.
- Zhao, R., Yeung, S.-C. J., Chen, J., Iwakuma, T., Su, C.-H., Chen, B., Qu, C., Zhang, F., Chen, Y.-T., Lin, Y.-L., et al.** (2011). Subunit 6 of the COP9 signalosome promotes tumorigenesis in mice through stabilization of MDM2 and is upregulated in human cancers. *J. Clin. Invest.* **121**, 851–865.
- Zhao, X., Harashima, H., Dissmeyer, N., Pusch, S., Weimer, A. K., Bramsiepe, J., Bouyer, D., Rademacher, S., Nowack, M. K., Novak, B., et al.** (2012). A General G1/S-Phase Cell-Cycle Control Module in the Flowering Plant Arabidopsis thaliana. *PLOS Genet.* **8**, e1002847.
- Zheng, J., Yang, X., Harrell, J. M., Ryzhikov, S., Shim, E. H., Lykke-Andersen, K., Wei, N., Sun, H., Kobayashi, R. and Zhang, H.** (2002). CAND1 binds to unneddylated CUL1 and regulates the formation of SCF ubiquitin E3 ligase complex. *Mol. Cell* **10**, 1519–1526.
- Zhou, Y., Wang, H., Gilmer, S., Whitwill, S. and Fowke, L. C.** (2003a). Effects of co-expressing the plant CDK inhibitor ICK1 and D-type cyclin genes on plant growth, cell size and ploidy in Arabidopsis thaliana. *Planta* **216**, 604–613.
- Zhou, C., Wee, S., Rhee, E., Naumann, M., Dubiel, W. and Wolf, D. A.** (2003b). Fission Yeast COP9/Signalosome Suppresses Cullin Activity through Recruitment of the Deubiquitylating Enzyme Ubp12p. *Mol. Cell* **11**, 927–938.
- Zürcher, E., Tavor-Deslex, D., Lituiev, D., Enkerli, K., Tarr, P. T. and Müller, B.** (2013). A Robust and Sensitive Synthetic Sensor to Monitor the Transcriptional Output of the Cytokinin Signaling Network in *Plant*1[C][W][OA]. *Plant Physiol.* **161**, 1066–1075.

VI- Annexes

1- Liste des abréviations

A- Gènes et Protéines

5'-TOP : 5' Terminal Oligo Pyrimidine
ACR4 : CRINKLY 4
APC/C : ANAPHASE PROMOTING COMPLEX/CYCLOSOME
ARF : AUXINE RESPONSE FACTORS
ARR : ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR
ARR-A : ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR de type A
ARR-B : ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR de type B
ATM : ATAXIA TELANGIECTASIA MUTATED
ATR : ATM-AND-RAD3-RELATED
AXL : AXRI-LIKE
AXR1 : AUXIN RESISTANT 1
CAK : CDK-ACTIVATING KINASES
CAND1 : CULLIN-ASSOCIATED NEDD8-DISSOCIATED 1
CasK : CSN-ASSOCIATED KINASES
CCS52A : CELL CYCLE SWITCH 52A
CDC20 : CELL DIVISION CYCLE 20
CDK : CYCLIN DEPENDENT KINASE
CDT1 : CHROMATIN LICENSING AND DNA REPLICATION FACTOR 1
CK2 : CSN-ASSOCIATED KINASE 2
CKI : CYCLIN KINASE INHIBITORS
CLE40 : CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED 40
CLV1 : CLAVATA 1
CmTCTP : TCTP de *Cucurbita max*
CO11 : JA CORONATINE-INSENSITIVE 1
COP9 : CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9
CRL : ligases CULLIN-RING
CSN : COP9 SIGNALOSOME
CSNAP : CSN Acidic Protein
CYC : CYCLINES
DDB1 : DNA DAMAGE DAMAGE BINDING PROTEIN 1
DP : DIMERIZATION PARTNER
E2F : E2 PROMOTOR-BINDING FACTOR
ECR1 : E1 C-TERMINAL RELATED 1
eEF1A : eucaryotic Elongation Factor 1A
EMB2386 : EMBRYO DEFECTIVE 2386
FRQ : FREQUENCY
GDP : guanosine diphosphate
GEF : Guanine nucleotide exchange factor
GhTCTP : TCTP de *Gossypium hirsutum*

GTP : guanosine triphosphate
 GTPase : *Guanine Tri Phosphatase*
 HECT : *Homology to E6-AP C-Terminus*
 HES : protéine ribosomale mitochondriale L18 HEART STOPPER
 ICK : *IINTERACTORS OF CDC2 KINASE*
 JA : *jasmonates*
 JAMM : *JAB1/MPN domain metalloenzyme*
 JAZ : *JASMONATE ZIM DOMAIN*
 KRP : *KIP RELATED PROTEINES*
 LAX2 : *AUXIN TRANSPORTER-LIKE PROTEIN 2*
 Mdm2 : *Transformed Mouse 3T3 Cell Double Minute 2*
 MPF : *Maturation Promoting Factor*
 MPN : *MPR1/PAD1/N-terminal domain*
 MYB3R : *R1R2R3-MYB-LIKE*
 NAE : *NEDD8 ACTIVATING ENZYME*
 NCE : *NEDD8 CONJUGATING ENZYME*
 NEDD8 : *NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWN-REGULATED 8*
 NTHK1 : *N. tabacum HISTIDINE KINASE1*
 ORC : *ORIGIN REPLICATION COMPLEX*
 OsTCTP : *TCTP d'Oriza sativa*
 PCI : *Proteasome, COP9, Initiation factor 3*
 PCNA : *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGENE*
 PRC2 : *POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2*
 pTWS : *pTWISTEDSEED*
 pZOU : *pZHOUPI*
 RAD51 : *RADIATION SENSITIVE 51*
 RBR : *RETINOBLASTOMA-RELATED*
 RBX1 : *RING-BOX1*
 RCE1 : *RUB CONJUGATING ENZYME 1*
 RING : *Really Interesting New Gene*
 RUB : *RELATED TO UBIQUITIN*
 SCF : *S-PHASE KISASE ASSOCIATED PROTEIN (SKP)/CULLIN (CUL)/F-BOX CONTAINING*
 SHY2 : *SHORT HYPOCOTYL 2*
 SIM : *SIAMESE*
 SMR : *SIM RELATED PROTEINS*
 SnRK1 : *SNF1-RELATED KINASE-1*
 SOG1 : *SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1*
 TCSn : *TWO-COMPONENT-OUTPUT-SENSOR NEW*
 TCTP : *TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN*
 TIR1 : *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1*
 TOR : *TARGET OF RAPAMYCIN*
 Ub/Pr : *Ubiquitine/Protéasome*

UBA : Ub-Activating enzyme
UBC : Ub- conjugating enzyme
UBM : Ub Binding Domain
UFO : UNUSUAL FLORAL ORGANS
WHB : winged-helix B
WOX5 : *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 5*
YFP : YELLOW FLUORESCENT PROTEIN

B- Notation des mutants

35S::AtCSN4-Flag : lignées surexprimant CSN4 fusionné avec le peptide Flag sous le contrôle du promoteur constitutif *CaMV 35S*.

35S::AtTCTP-GFP : TCTP fusionné à la GFP sous le contrôle du promoteur constitutif *CaMV 35S*.

AtTCTPg-GFP : TCTP fusionné à la GFP sous son promoteur endogène.

AtCSN4^{Nter} : partie N-terminale de AtCSN4 (acides aminés 1 à 197)

AtCSN4^{PCI} : domaine PCI de AtCSN4 (acides aminés 198 à 365)

AtCSN4^{PCI-Cter} : domaines PCI et C-terminal (acides aminés 198 à 397)

De manière générale, pour un gène x, sont notés :

gènex : mutant perte de fonction *gènex^{-/-}*

GÈNEX⁺ : l'ensemble des plantes *GÈNEX^{+/+}* et *GÈNEX^{+/-}*

C- Méthodes

Backcross : rétrocroisements

FRET : transfert d'énergie entre molécules fluorescentes

JAF : jours après fécondation

JAP : jours après pollinisation

KO : perte de fonction

MS : Murashige and Skoog

RMSD : Root Mean Square Deviation

Root tracking : suivi *in vivo* automatisé de la racine en croissance

D- Autres

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*

cop/det/fus : constitutive photomorphogenesis/de-etiolated/fusca

D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*

DDR : *DNA damage response*

DUB : déubiquitination

G1 : Gap-1

G2 : Gap-2

HR : hypersensitive response

M : mitose

MAC : méristème apical caulinaire

MAR : méristème apical racinaire

NASC : *Nottingham Arabidopsis Stock Center*

ORF : *Open Reading Frame*

SAC : *Spindle Assembly Checkpoint*

UTR : *UnTranslated Regions*

2- Liste des lignées d'*A. thaliana* utilisés dans ma thèse

Ce tableau présente brièvement les différents mutants d'*A. thaliana* utilisés durant ma thèse. Pour les résistances aux antibiotiques et herbicides, les abréviations suivantes sont utilisées : Basta : Glufosinate-ammonium, Kana : kanamycine, Sulfa : sulfadiazine.

Mutant (écotype)	Type de mutation / Locus concerné	Phénotype marquant/Résistance	Référence
<i>tctp-1</i> (Col0) SAIL_28_C03	Insertion (perte de fonction)/AT3G16640	Létalité embryonnaire au stade torpille entraînée par un retard important de développement/Basta	Berkowitz et al., 2008 Brioude et al., 2010
<i>tctp-2</i> (Col0) GABI_901E08	Insertion (perte de fonction)/AT3G16640	Létalité embryonnaire au stade torpille entraînée par un retard important de développement/Sulfa	Brioude et al., 2010
<i>pTCTP::TCTP-GFP</i> (Col0), noté <i>AtTCTPg-GFP</i>	Rapporteur fluorescent /AT3G16640	Aucun, fluorescence dans les zones de forte croissance mitotique/Kana	Brioude et al., 2010
<i>35S::AtTCTP</i> et <i>35S::AtTCTP-GFP</i> (Col0)	Surexpression /AT3G16640	Croissance légèrement accélérée dans les premiers stades de développement/Kana	Brioude et al., 2010
<i>35S::dTCTP-GFP</i> (Col0)	Surexpression de <i>dTCTP</i> chez <i>A. thaliana</i>	Croissance légèrement accélérée dans les premiers stades de développement/Kana	Brioude et al., 2010
<i>csn4-1</i> (Col0) Salk_043720	Insertion (perte de fonction) /AT5G42970	Phénotype pléiotrope dont perte réponse à l'auxine et anthocyanisation conduisant à une létalité post-germination/Kana	Dohmann et al., 2008a et 2008b
<i>csn4-2</i> (Col0) Salk_053839	Insertion (perte de fonction) /AT5G42970	Phénotype pléiotrope dont perte réponse à l'auxine et anthocyanisation conduisant à une létalité post-germination	Dohmann et al., 2008b
<i>csn4-2035</i> (Ws4) et <i>csn4-2035</i> (Col0)	Mutation ponctuelle (Ala 302 Val) /AT5G42970	Nanisme, diminution de la réponse à l'auxine, déneddylation des collines affectée	Pacurar 2017 et al., cette thèse
<i>35S::AtCSN4-GFP</i> et <i>35S::AtCSN4-Flag</i> (Col0)	Surexpression /AT5G42970	Aucun/Respectivement kana et basta	Betsch et al., 2019
<i>35S::GFP</i> (Col0)	Surexpression	Aucun/Kana	Donnée par C. Tréhin, RDP

Mutant (écotype)	Type de mutation /Locus concerné	Phénotype marquant/Résistance	Référence
<i>TCSn::GFP</i> (Col0)	Rapporteur fluorescent	Aucun. Signal fluorescent correspondant à l'activité globale de la voie des cytokinines/Basta	Zurcher 2013
<i>ARR5::GFP</i> (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT3G48100	Aucun. Signal fluorescent marque l'expression de <i>ARR5</i> , cible et régulateur négatif de la voie des cytokinines/Kana	Muller 2008
<i>ARR7::GFP</i> (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT1G19050	Aucun. Signal fluorescent marque l'expression de <i>ARR7</i> , cible et régulateur négatif de la voie des cytokinines/Basta	Zürcher et al., 2013
<i>pCYCB1::CYCB1-GFP</i> (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT4G37490	Aucun. Fluorescence de la fin de la phase G2 à l'anaphase en phase M du cycle cellulaire/Basta	Uki and Umeda, 2016
<i>pHTR2::CDT1a-RFP</i> (Col0)	Rapporteur fluorescent	Aucun. Fluorescence pendant les phases S et G2 du cycle cellulaire/Kana	Uki and Umeda, 2016
<i>pCYCD3;1::CYCD3;1-GFP</i> et <i>pCYCD3;1::GFP-CYCD3;1</i> (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT4G34160	Aucun. Aucune fluorescence observée. Lignées également testées avec la m-cherry à la place de la GFP/Kana	Cette thèse
<i>pCYCD6;1::GUS-GFP</i> (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT4G03270	Aucun. Expression restreinte à certaines divisions formatives/Kana	Sozzani et al., 2010
<i>pKRP6::KRP6-GFP</i> (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT3G19150	Aucun. Aucune fluorescence visible dans les embryons/Kana	Millan, 2011 et cette thèse

3- Liste des lignées d'*A. thaliana* simplement cités dans ma thèse

Mutant (écotype)	Type de mutation / Locus concerné	Phénotype marquant	Référence
<i>ARNi-AtTCTP</i> (Col0)	Sous-expression /AT3G16640	Nanisme, retard de développement	Brioudes et al., 2010
<i>ARNi-CSN4</i> (Col0)	Sous-expression /AT5G42970	Nanisme, retard de développement, perte de dominance apicale	Betsch et al., 2019
<i>csn1-10</i> (Col0)	Mutation ponctuelle (S305A) /AT3G61140	Nanisme modéré, diminution de la réponse à l'auxine, déneddylation des cullines affectée	Zhang et al., 2008b
<i>csn2-5</i> (Ler)	Mutation ponctuelle (G237D) /AT2G26990	Nanisme modéré, diminution de la réponse à l'auxine, déneddylation des cullines affectée	Stuttman et al., 2009a et 2009b
<i>csn3-3</i> (Col0)	Mutation ponctuelle (G293E) /AT5G14250	Diminution de la réponse à l'auxine, n'affecte pas la déneddylation des cullines	Huang et al., 2013
<i>csn5a-1</i> (Col0) SALK_063436	Insertion (perte de fonction) /AT1G22920	Nanisme sévère, diminution des réponses à l'auxine et aux jasmonates, affecte la déneddylation des cullines	Dohmann et al., 2005
<i>csn5a-2</i> (Col0) SALK_027705	Insertion (perte de fonction) /AT1G22920	Nanisme sévère, diminution des réponses à l'auxine et aux jasmonates, affecte la déneddylation des cullines	Dohmann et al., 2005
<i>csn5b-1</i> (Col0) Salk_007134	Insertion (perte de fonction) /AT1G71230	Phénotype presque identique au sauvage, croissance racinaire sensible à l'auxine et aux jasmonates	Dohmann et al., 2005
<i>csn6a-1</i> (Col0) Salk_146926	Insertion (perte de fonction) /AT5G56280	Pas de phénotype majeur	Gusmaroli et al., 2007
<i>csn6b-2</i> (Col0) Salk_036965	Insertion (perte de fonction) /AT4G26430	Pas de phénotype majeur	Gusmaroli et al., 2007

Mutant (écotype)	Type de mutation /Locus concerné	Phénotype marquant	Référence
ARNi-CSN5 (Col0)	Sous-expression /AT1G22920	Nanisme, réponse à l'auxine diminuée dont perte de dominance apicale	Schwechheimer et al., 2001
pAtPCNA1::AtPCNA1-sGFP (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT1G07370	Aucun. Le signal fluorescent évolue selon la phase du cycle cellulaire.	Yokoyama et al., 2016
pCYCD7;1::CYCD7;1-YFP (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT5G02110	Aucun.	Weimer et al., 2018
cyd7;1-1 (Ws4 et Col0) FLAG_369E02	Insertion (perte de fonction) /AT5G02110	Pas de phénotype majeur, retard au niveau des divisions formant les cellules de garde	Weimer et al., 2018
cyd7;1-2 (Ws4 et Col0) FLAG_498H08	Insertion (perte de fonction) /AT5G02110	Pas de phénotype majeur, retard au niveau des divisions formant les cellules de garde	Collins et al., 2002 Weimer et al., 2018
cyd6;1 (Col0) GK-368E07	Insertion (perte de fonction) /AT4G03270	Pas de phénotype majeur, défauts sur un nombre réduit de divisions cellulaires péricleinales embryonnaires	Sozzani et al., 2010
krp6-1 (Col0)	Insertion (perte de fonction) /AT3G19150	Pas de phénotype majeur, germination accélérée.	Nieuwland et al., 2016
krp6 (Col0) SAIL_548_B03	Insertion (perte de fonction) /AT3G19150	Pas de phénotype majeur	Millan, 2010
DR5rev::GFP et DR5::GUS (Col0)	Rapporteur	Aucun. Signal correspond à la réponse globale à l'auxine	Friml et al., 2003
PIN1::PIN1-GFP (Col0)	Rapporteur fluorescent /AT1G73590	Aucun. Signal fluorescent rend compte du transport polarisé de l'auxine	Heisler et al., 2005

Mutant (écotype)	Type de mutation /Locus concerné	Phénotype marquant	Référence
<i>HS::AXR3NT-GUS</i> (Col0)	Rapporteur /AT1G04250	Aucun. Après induction par un choc thermique, le signal GUS témoigne du niveau de AXR3, une cible de SCF ^{TIR1} et donc de l'activité de la voie de l'auxine	Gray et al., 2001
<i>35S::RBX1a</i>	Surexpression /AT5G20570	Nanisme, diminution de la réponse à l'auxine, augmentation de la neddylation des cullines	Gray et al., 2002
<i>axr1-3</i> (Col0) N3075	Insertion (perte de fonction) /AT1G05180	Nanisme modéré, perte de dominance apicale, affecte la neddylation des cullines	Dharmasiri et al., 2007
<i>axr1-12</i> (Col0) N3076	Insertion (perte de fonction) /AT1G05180	Nanisme, perte de dominance apicale, baisse de fertilité, affecte la neddylation des cullines	Ruegger et al., 1998 Huang et al., 2013
<i>cul3a</i> (Col0) SALK_050756	Insertion (perte de fonction) /AT1G26830	Pas de phénotype majeur	Figueroa et al., 2005
<i>cul3b</i> (Ws4) GABI_003D02	Insertion (perte de fonction) /AT1G69670	Pas de phénotype majeur	Figueroa et al., 2005
<i>atcu1-1</i> (Ws4)	Insertion (perte de fonction) /AT4G02570	Létalité embryonnaire précoce durant la première division zygotique	Shen et al., 2002
<i>atcu1-2</i> (Ws4)	Insertion (perte de fonction) /AT4G02570	Létalité embryonnaire précoce durant la première division zygotique	Shen et al., 2002
<i>hes</i> (Ler)	Mutation ponctuelle (G141R) / AT1G08845	Létalité embryonnaire au stade transition	Zhang et al., 2015

4- Étude protéomique : listes des protéines dérégulées chez les mutants *tctp*, *35S::AtTCTP* et *csn4-2035*.

Les listes suivantes viennent compléter les résultats présentés Partie II.3.E et Figure II.27.

A- Protéines sous-représentées chez *tctp-2*

Description	Accession	Ratio d'abondance (log2) <i>tctp-2</i> / Col0	P-Value ajustée <i>tctp-2</i> / Col0
Pathogenesis-related protein 5	P28493	-2,29	1,294E-14
Lectin-like protein	Q9LZF5	-1,68	5,7465E-13
Translationally-controlled tumor protein 1	P31265	-1,52	7,1512E-11
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform	P33157	-1,3	5,2239E-08
Aspartyl protease AED1	Q9LEW3	-1,11	5,874E-06
Glutamine synthetase cytosolic isozyme 1-1	Q56WN1	-1,08	1,8214E-05

B- Protéines surreprésentées chez *tctp-2*

Description	Accession	Ratio d'abondance (log2) <i>tctp-2</i> / Col0	P-Value ajustée <i>tctp-2</i> / Col0
60S acidic ribosomal protein P1-3	Q8LEQ0	1	0,00150688
60S ribosomal protein L18-3	Q940B0	1	0,00318036
DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 39	Q56X76	1	0,00017583
60S ribosomal protein L13a-1	Q9SFU1	1,01	0,00057465
60S ribosomal protein L35a-4	P51422	1,02	0,00072331
60S ribosomal protein L28-2	Q9M0E2	1,04	0,00066601
60S ribosomal protein L17-2	P51413	1,05	0,00072331
60S ribosomal protein L13a-2	Q9LRX8	1,07	0,00019091
60S ribosomal protein L17-1	Q93VI3	1,08	0,00052681
40S ribosomal protein S25-2	Q9SIK2	1,1	0,00018995
60S ribosomal protein L7a-1	P49692	1,11	0,00011265
40S ribosomal protein S17-1	P49205	1,13	6,3303E-05
60S ribosomal protein L4-1	Q9SF40	1,14	5,5842E-05
60S ribosomal protein L37a-2	Q8RXU5	1,15	4,1836E-05
40S ribosomal protein S26-3	Q9LYK9	1,17	0,00019392
40S ribosomal protein S11-1	P16181	1,19	1,8839E-05
60S ribosomal protein L21-2	Q9FDZ9	1,19	0,00014681
60S ribosomal protein L34-1	Q42351	1,2	1,7588E-05
60S ribosomal protein L18-2	P42791	1,23	2,4875E-05

60S ribosomal protein L24-1	Q42347	1,25	5,874E-06
60S ribosomal protein L36a	O23290	1,27	3,5527E-05
60S ribosomal protein L7a-2	Q9LZH9	1,28	1,5409E-05
60S ribosomal protein L37-2	Q43292	1,36	1,1475E-06
60S ribosomal protein L36-2	Q9M352	1,39	2,0661E-06
60S ribosomal protein L10-2	Q08770	1,49	6,5537E-10
40S ribosomal protein S30	P49689	1,55	9,1444E-09
60S ribosomal protein L29-2	Q84WM0	1,61	1,6008E-11
60S ribosomal protein L19-1	Q9SRX2	1,71	1,1211E-10
60S ribosomal protein L36-3	Q9LZ57	1,96	1,294E-14

C- Protéines surreprésentées chez *35S::AtTCTP*

Description	Accession	Ratio d'abondance (log2) <i>35S::AtTCTP</i> / Col0	P-Value ajustée <i>35S::AtTCTP</i> / Col0
Formate dehydrogenase, chloroplastic/mitochondrial	Q9S7E4	1	0,03399501
Aquaporin TIP1-2	Q41963	1	0,03411427
30S ribosomal protein S7, chloroplastic	P61841	1,01	0,03051052
ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit CLPT1, chloroplastic	Q93WL3	1,01	0,02926735
Aquaporin PIP2-1	P43286	1,03	0,02245069
Probable ATP synthase 24 kDa subunit, mitochondrial	Q9SJ12	1,03	0,02464261
Histone H2A variant 1	O23628	1,04	0,0203839
Endochitinase CHI	O24603	1,06	0,01670767
Ribosome-recycling factor, chloroplastic	Q9M1X0	1,07	0,01516966
Oxygen-evolving enhancer protein 3-1, chloroplastic	Q9XFT3	1,08	0,01338053
Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 1, chloroplastic	P52032	1,09	0,01203058
Patellin-1	Q56WK6	1,12	0,00842244
Thioredoxin H5	Q39241	1,13	0,00755252
Probable plastid-lipid-associated protein 4, chloroplastic	Q9LU85	1,13	0,0070215
40S ribosomal protein S15-1	Q08112	1,14	0,00626515
Plasma membrane-associated cation-binding protein 1	Q96262	1,16	0,00504406
NDR1/HIN1-like protein 3	Q9FNH6	1,17	0,00477528

50S ribosomal protein L4, chloroplastic	O50061	1,19	0,00362101
Probable peroxygenase 3	O22788	1,19	0,00393375
Membrane-associated protein VIPP1, chloroplastic	O80796	1,21	0,0026856
Hypersensitive-induced response protein 3	Q9SRH6	1,22	0,00233881
Glycine-rich protein 3 short isoform	Q9ZSJ6	1,27	0,00098853
BURP domain protein RD22	Q08298	1,27	0,00098853
Histone H2B.6	O23629	1,33	0,00040617
Probable histone H2A.3	O81826	1,37	0,00019534
40S ribosomal protein S7-2	Q9M885	1,38	0,00015716
Sugar transport protein 1	P23586	1,46	2,9514E-05
Glutathione S-transferase F6	P42760	1,5	1,7009E-05
Nitrilase 2	P32962	1,51	0,00001523
Beta-D-xylosidase 1	Q9FGY1	1,53	1,0103E-05
Histone H2B.3	Q9SI96	1,55	8,1606E-06
Hypersensitive-induced response protein 2	Q9CAR7	1,58	4,5392E-06
Glutathione S-transferase F2	P46422	1,61	2,7375E-06
Oxygen-evolving enhancer protein 3-2, chloroplastic	Q41932	1,64	1,7855E-06
Translationally-controlled tumor protein 1	P31265	2,14	2,2986E-12
Vacuolar protein sorting-associated protein 2 homolog 1	Q9SKI2	2,5	2,588E-14

D- Protéines sous-représentées chez *csn4-2035*

Description	Accession	Ratio d'abondance (log2) <i>csn4-2035</i> / Col0	P-Value ajustée <i>csn4-2035</i> / Col0
Protein COLD-REGULATED 15A, chloroplastic	Q42512	-1,76	1,1773E-06
30S ribosomal protein S7, chloroplastic	P61841	-1,7	2,1312E-06
60S ribosomal protein L7a-1	P49692	-1,64	3,2943E-06
60S ribosomal protein L19-1	Q9SRX2	-1,58	2,3957E-06
Stress-induced protein KIN2	P31169	-1,56	1,3971E-05
Endochitinase CHI	O24603	-1,54	2,3957E-06
Pathogenesis-related protein 5	P28493	-1,52	2,4271E-05
60S ribosomal protein L22-3	Q9FE58	-1,52	1,3906E-05
Histone H2B.7	Q9LZT0	-1,48	4,0788E-05
60S ribosomal protein L4-2	P49691	-1,48	1,7491E-05
60S ribosomal protein L37-2	Q43292	-1,47	2,9536E-05
Pathogenesis-related protein 1	P33154	-1,43	8,5627E-05

Probable histone H2A.7	Q9FJE8	-1,4	0,00012507
40S ribosomal protein S26-3	Q9LYK9	-1,37	0,0001896
Probable thionin-2.4	Q9C8D6	-1,35	0,0003974
Allene oxide cyclase 2, chloroplastic	Q9LS02	-1,33	0,00014748
50S ribosomal protein L34, chloroplastic	Q9LP37	-1,33	0,0001896
Protein COLD-REGULATED 15B, chloroplastic	Q9SIN5	-1,32	0,00041598
60S ribosomal protein L18a-2	P51418	-1,32	0,00027945
60S ribosomal protein L36a	O23290	-1,27	0,00046153
60S ribosomal protein L7-2	P60040	-1,24	0,00046153
60S ribosomal protein L23	P49690	-1,22	0,00154472
40S ribosomal protein S15-1	Q08112	-1,19	0,00154472
Beta-D-glucopyranosyl abscisate beta-glucosidase	Q9SE50	-1,18	0,00232388
Nascent polypeptide-associated complex subunit beta	Q9CAT7	-1,17	0,00166603
Probable histone H2A.3	O81826	-1,16	0,00166603
60S ribosomal protein L6-1	Q9FZ76	-1,16	0,00503575
60S ribosomal protein L35-1	Q9SF53	-1,13	0,00343179
40S ribosomal protein S29	Q680P8	-1,13	0,00350669
Defensin-like protein 2	Q39182	-1,12	0,00432997
60S ribosomal protein L17-2	P51413	-1,12	0,00438067
60S ribosomal protein L15-1	O23515	-1,12	0,00350669
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase, acidic isoform	P33157	-1,08	0,00631444
60S ribosomal protein L22-2	Q9M9W1	-1,08	0,00801421
Early nodulin-like protein 3	Q8LC95	-1,07	0,00486472
40S ribosomal protein S6-2	P51430	-1,07	0,00505919
GDSL esterase/lipase ESM1	Q9LJG3	-1,06	0,00777937
50S ribosomal protein L17, chloroplastic	Q9M385	-1,06	0,00549511
40S ribosomal protein S16-3	Q42340	-1,05	0,01002522
EG45-like domain containing protein 2	Q9ZV52	-1,04	0,00974068
MLP-like protein 423	Q93VR4	-1,04	0,00974068
Tubulin beta-8 chain	P29516	-1,04	0,00578338
Monodehydroascorbate reductase 2	Q93WJ8	-1,04	0,00828671
60S ribosomal protein L13a-2	Q9LRX8	-1,03	0,00573144
Plastidial pyruvate kinase 2	Q9FLW9	-1,03	0,01418285
Dehydrin HIRD11	Q9SLJ2	-1,03	0,01002522
60S ribosomal protein L3-1	P17094	-1,03	0,01132852
30S ribosomal protein S15, chloroplastic	P56805	-1,01	0,02025387
60S ribosomal protein L28-1	O82204	-1	0,00838091

E- Protéines surreprésentées chez *csn4-2035*

Description	Accession	Ratio d'abondance (log2) <i>csn4-2035</i> / Col0	P-Value ajustée <i>csn4-2035</i> / Col0
Beta-D-xylosidase 1	Q9FGY1	1,03	0,00046153
Fasciclin-like arabinogalactan protein 9	Q9ZWA8	1,27	1,0739E-05

F- Protéines surreprésentées chez *tctp-2* et sous-représentées chez *csn4-2035*

Description de la protéine	Accession	Nom du gène	Locus
60S ribosomal protein L17-2	P51413	RPL17B	AT1G67430
60S ribosomal protein L13a-2	Q9LRX8	RPL13AB	AT3G24830
60S ribosomal protein L7a-1	P49692	RPL7AA	AT2G47610
40S ribosomal protein S26-3	Q9LYK9	RPS26C	AT3G56340
60S ribosomal protein L36a	O23290	RPL36A RPL36B	AT3G23390 AT4G14320
60S ribosomal protein L37-2	Q43292	RPL37B	AT1G52300
60S ribosomal protein L19-1 EMBRYO DEFECTIVE 2336	Q9SRX2	RPL19A	AT1G02780

5- Listes des amorces utilisées durant ma thèse

Nom	Séquence 5' -> 3'	Utilisation
CACcdATG-csn1	CACCGAGCGAGACGAAGAAGCGA	Clonage
CACcdATG-csn2	CACCGCTTCAGATGCTGACATGGA	Clonage
CACcdATG-csn3	CACCATCGGAGCTGTGAACTCGGT	Clonage
CACcdATG-csn4	CACCGATGAAGCTTTGACGAACGCTTCT	Clonage
CACcdATG-csn5A	CACCGAAGGTTCTCGTCAGCCAT	Clonage
CACcdATG-csn6A	CACCGCACCTTCGTCATCAAGCG	Clonage
CACcdATG-csn6B	CACCGCGCCTTCTTCGTCGAG	Clonage
CACcdATG-csn7	CACCGATATCGAGCAGAAGCAAGC	Clonage
csn1-rev	TCAAAGTTTCCTTGCCGATCTGGCAT	Clonage
csn2-rev	TTAACAGACTCGGCTGGTGATATTTGAAGA	Clonage
csn3-rev	TTACATGGAGAACTTCTGAGGAACAGTATC	Clonage
csn4-1fw	AAAAAGCGAGAGAGAAATCAAAACC	Génotypage
csn4-1rev	CAATGCCACACACTTCATT	Génotypage
csn4-2035fw	GAAGGTTATGCTCAATGTTA	Génotypage
csn4-2035rev	GGCCACATCAGGTATGGACT	Génotypage
csn4-2fw	GAACTAAGGCCACATCAGGTATGGACTGTG	Génotypage
csn4-2rev	GGTGCCGGCTTGATAAAAGATTGTGTGTA	Génotypage
csn4-rev	TCAGACAGGAACAGACATGCCTTTCTTG	Clonage
CSN4(C-ter)rev	TCAACAGGAACAGACATGCCTTTCTTG	Clonage
CSN4(PCI)fw	CACCCACTTCGGTATTACGGCATAT CTCAGA	Clonage
CSN4(PCI)rev	TCTTCCACGTCATCCTCAAATGAATC	Clonage
csn5A-rev	TCACGATGTAATCATGGGCTCTGGAT	Clonage
csn6A-rev	TTACATGAATGCAGTTCTTCCACCTCTTCG	Clonage
csn6B-rev	TTACATGAACGCAGTCCTACCACCTCTT	Clonage
csn7-rev	CTACCTTGTTACAGGATGCCTCCTCC	Clonage
CYCD3fw	CACCGCGATTCGGAAGGAGGAA	Clonage
CYCD3rev	TTATGGAGTGGCTACGATTGCC	Clonage
LBb1	CAGCGTGGACCGCTTGCTTGCTGCAACTCT	Génotypage
LBgabi	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Génotypage
LBsail	TAGCATCTGAATTTCATAACCAATCTCGATAC AC	Génotypage
pCYCD3fw	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGACGAC GACTGTACCTGGAC	Clonage
pCYCD3rev	GGGGACTGCTTTTTTTGTACAAACTTGAGAGA AGGCCGAGAGATGG	Clonage
TCTP1LP	ATTGAGCTTACCGATTCGTTG	Génotypage
TCTP1RP	ATAAACATGCCTCGAGATTCG	Génotypage
TCTP2RP	GTTCAAAGCTATCATCGTCATTC	Génotypage
TCTPQ3	CATGCATACCCTCCCCAACAA	Génotypage

WEE1Qfor	GAAACGCCGATGAAGCAACA	RT-qPCR
WEE1Qrev	ATCTTCGTGCTTCTGAGGCT	RT-qPCR
BRCA1Qfor	GCAAGAGACACCAAGGAGCT	RT-qPCR
BRCA1Qrev	ACAATAGGCCCAGGTGCATC	RT-qPCR
PARP1Qfor	CAAACCTTCTCGTGCCGGTTG	RT-qPCR
PARP1Qrev	TTTGTTACCCGGGCCTTCAG	RT-qPCR
PARP2Qfor	TTTGTTACCCGGGCCTTCAG	RT-qPCR
PARP2Qrev	ACTTGGGATGTGGGATAAAC	RT-qPCR
RAD51Qfor	GCTTTCTCTGGTGACCCGAA	RT-qPCR
RAD51Qrev	CTGGTTTCTACGCTGCTCCA	RT-qPCR
KRP1Qfor	TCGTCCGGTGATAATGGAGTTT	RT-qPCR
KRP1Qrev	TTCTTTAACCGCCGATTCAAAT	RT-qPCR
KRP2Qfor	AACGGTTACGATCGTGAAACA	RT-qPCR
KRP2Qrev	CCTGCGGCGAGACTCTACATC	RT-qPCR
KRP3Qfor	GTCTCGCGTTGACTCGGTTA	RT-qPCR
KRP3Qrev	CTCTCCCTTGTGCTGTGTCT	RT-qPCR
KRP4Qfor	ATCCCGGGGTTGTCATGATTT	RT-qPCR
KRP4Qrev	TTGGCCAAAATTTCTTCGACC	RT-qPCR
KRP5Qfor	TTGGCCAAAATTTCTTCGACC	RT-qPCR
KRP5Qrev	TTGGCCAAAATTTCTTCGACC	RT-qPCR
KRP6Qfor	CAGTCCAAGCTTTTCCACTAGG	RT-qPCR
KRP6Qrev	GACGTCATGAGAGTCCGGTG	RT-qPCR
KRP7Qfor	TCCAGCAGCGAAACTAACGA	RT-qPCR
KRP7Qrev	TCTCCAGATTCTCGCTTGA	RT-qPCR
CYCA1;1Qfor	CGTCTCCGGTACAAGCCTAT	RT-qPCR
CYCA1;1Qrev	TATGGTTCACTTCCTTGCTG	RT-qPCR
CYCA2;2Qfor	TCGACCGGTTTCTGTCCAAC	RT-qPCR
CYCA2;2Qrev	GCAAGAGACACCAAGGAGCT	RT-qPCR
CYCA3;1Qfor	ATCAACCATGGCCGACGAAA	RT-qPCR
CYCA3;1Qrev	TCTATTGCCGCTTCCATGGA	RT-qPCR
CYCA3;2Qfor	TCTATTGCCGCTTCCATGGA	RT-qPCR
CYCA3;3Qrev	TCTCCGTCAATACCCATCGC	RT-qPCR
CYCB1;1Qfor	CGATCTCAAATCCCACGCTTC	RT-qPCR
CYCB1;1Qrev	CGGCTTTGGTACTGCGTTTC	RT-qPCR
CYCB1;2Qfor	GCAAGAGACACCAAGGAGCT	RT-qPCR
CYCB1;2Qrev	GCAAGAGACACCAAGGAGCT	RT-qPCR
CYCD3;1Qfor	AAAACCATCTCTCGGCCTTCTC	RT-qPCR
CYCD3;1Qrev	TCTATGGAAACGTGCAGTGGTT	RT-qPCR
CYCD4;2Qfor	TCAATGTCAGAATCCAAGCCCT	RT-qPCR
CYCD4;2Qrev	CAGTCCAAGCTTTTCCACTAGG	RT-qPCR
CYCD6;1Qfor	TTCGACGACCCATCTCTGAC	RT-qPCR
CYCD6;1Qrev	GGCTTTGACTGCGGCATATC	RT-qPCR

CYCD7;1Qfor	ATTGATCATCAGTCGTCGAG	RT-qPCR
CYCD7;1Qrev	CAACAGACTCAGAATACTCCTC	RT-qPCR
PDF2Qfor	GTGGCCAAAATGATGCAATCTCTCA	RT-qPCR
PDF2Qrev	TGGAGAGCTTGATTTGCGAAATACC	RT-qPCR
GAPDHQfor	AAACTTGTCGCTCAATGCAA	RT-qPCR
GAPDHQrev	GAATCCCGAAGGCAAACACTCAA	RT-qPCR
TUB4Qfor	CTCTCCGGCTGTAGCATCTT	RT-qPCR
TUB4Qrev	AGGCTTTCCTTGGTACA	RT-qPCR
TCTPQfor	ACACCCAAGCTCAGCGAAGAA	RT-qPCR
TCTPQrev	CATGCATACCCTCCCCAACAA	RT-qPCR
CSN4Qfor	TGCACTTCGGTATTACGGCA	RT-qPCR
CSN4Qrev	TGGTACATGTGACAGCAGCT	RT-qPCR

6- Liste des publications

Betsch, L., Boltz, V., Brioude, F., Pontier, G., Girard, V., Savarin, J., Wiperman, B., Chambrier, P., Tissot, N., Benhamed, M., et al. (2019). TCTP and CSN4 control cell cycle progression and development by regulating CULLIN1 neddylation in plants and animals. *PLoS Genet.* **15**, e1007899.

Pontier G., Bendahmane M., Szécsi J. (In preparation). Involvement of COP9 SIGNALOSOME (CSN) in cell cycle regulation.

Pontier G., Betsch L., Boltz V., Raynaud C., Bendahmane M., Szécsi J. TCTP and CSN4 control cell cycle progression and development in *Arabidopsis thaliana*. Poster présenté au congrès "Workshop on Molecular Mechanisms controlling flower development" (Presqu'île de Giens, 18-22 juin 2019)

Involvement of CSN in cell cycle regulation

Pontier G., Bendahmane M., Szécsi J.

In preparation

Keywords : CSN, cell cycle, checkpoints, proliferation, cullins, deneddylation, protein degradation.

CSN is an eight subunit complex notably involved in cell cycle regulation. Its main action, through CSN5, is the removal of the ubiquitin-related protein NEDD8 from cullins, which are part of cullin-RING type E3-ubiquitin ligases (CRLs). CSN also influences CRL self-ubiquitination. Thus, CSN directly regulates both CRL activity and substrate specificity, and indirectly regulates the stability of CRL targets. Besides, CSN can influence the localisation of specific proteins and their level of phosphorylation. CSN has also been proposed as a transcriptional regulator. All these different functions are involved in the regulation of key cell cycle genes and pathways. Indeed, CSN controls both cell cycle progression at every checkpoint and the overall proliferative status of a cell.

Introduction

In all eukaryotes, the progression through cell cycle is tightly regulated by the assembly, the activation, and the degradation of CYCLIN DEPENDANT KINASE- CYCLIN complexes (CDKs-CYCs) (1). Phase-dependent degradation of proteins such as CYCs is crucial and is mediated by the Ubiquitin-Proteasome System (UPS). The first stage consisting in polyubiquitination of the target is performed successively by enzymes called E1, E2, and E3-ligases. The main class of E3-ligases is the CULLIN-RING UBIQUITIN LIGASE complexes (CRLs) which are composed of a REALLY INTERESTING NEW GENE domain-containing protein, a CULLIN (CUL), and an F-BOX protein responsible for substrate specificity. Assembly and dissociation of CRLs are tightly regulated to ensure the timely degradation of their different substrates (2).

One way to regulate CRL activity is through CUL neddylation: the post-translational addition of a ubiquitin-related protein NEURAL PRECURSOR CELL EXPRESSED DEVELOPMENTALLY DOWNREGULATED 8 (NEDD8). The CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 9 SIGNALOSOME (CSN) is an enzymatic complex responsible for CUL deneddylation (2). Interestingly, even if deneddylated CULs lead to inactive CRLs *in vitro*, CSN is not only a CRL inhibitor *in vivo* but is also crucial for CRL stability and specificity. Indeed, neddylated CRLs are degraded more rapidly than deneddylated ones and cycles of neddylation and deneddylation are necessary for substrate specificity through complex re-assembly (3) (Fig.1A). The importance of cycles of neddylation and deneddylation to finely tune CRL activity has been highlighted by the recent observation that *csn* flies do not resemble flies expressing a uncleavable form of NEDD8 (4). Thus, CSN is implied in protein degradation by the UPS and consequently in cell cycle control.

CSN was first discovered in *Arabidopsis thaliana* as a negative regulator of constitutive photomorphogenesis (5). It is highly conserved in all eukaryotes, in a great majority of which it is composed of eight subunits (CSN1-8) (3). CSN1-4,7,8 contain a

PCI (Proteasome- COP9 signalosome-Initiation factor 3) domain mediating formation of the complex. CSN5,6 contain a MPN (MPR1-PAD1-N-terminal) domain which harbors the catalytic activity. Only the MPN domain of CSN5, and not of CSN6, possesses a JAMM (JAB1/MPN domain metalloenzyme) motif which acts as the catalytic center for CSN deneddylase activity. However, CSN5 is only active within the holocomplex whose structure allows the formation of NEDD8-binding pocket. In addition, CSN is also associated with kinases such as CSN-ASSOCIATED KINASE 2 (CK2) and with deubiquitinating enzymes. Other than the holocomplex form (CSN1-8, hereafter referred to as CSN), the existence of CSN5-free complexes has been confirmed *in vivo* (6). The existence of other subcomplexes containing CSN5 (e.g. CSN4-8, CSN4-7) has been postulated by several studies but their exact composition is still unclear. Besides, as the stoichiometry of CSN subunits is regulated by miRNAs and as only CSN5 can be released by the holocomplex, only free CSN5 can possibly be found *in vivo*.

To determine CSN functions, numerous studies characterized the phenotypes of knockouts for different subunits in various species. One of the main visible effects is defect in cell proliferation, often leading to premature death (3). Therefore, this review focuses on the role of CSN in controlling the cell cycle precisely at different phases, and more generally through the modulation of cell proliferation. It notably addresses the involvement of mechanisms other than CRL deneddylation.

CSN controls cell cycle progression

G1 phase and G1-S transition

The first cell cycle checkpoint: the G1-S transition is dependent on the activation of E2 PROMOTING BINDING FACTOR (E2F) which stimulates the transcription of S phase entry genes (1) (Fig.2). E2F is activated when dissociated from RETINOBLASTOMA PROTEIN (Rb) after phosphorylation of Rb by specific CDKs-CYCs which have previously been formed and phosphorylated. Moreover, CDKs-CYCs are only active

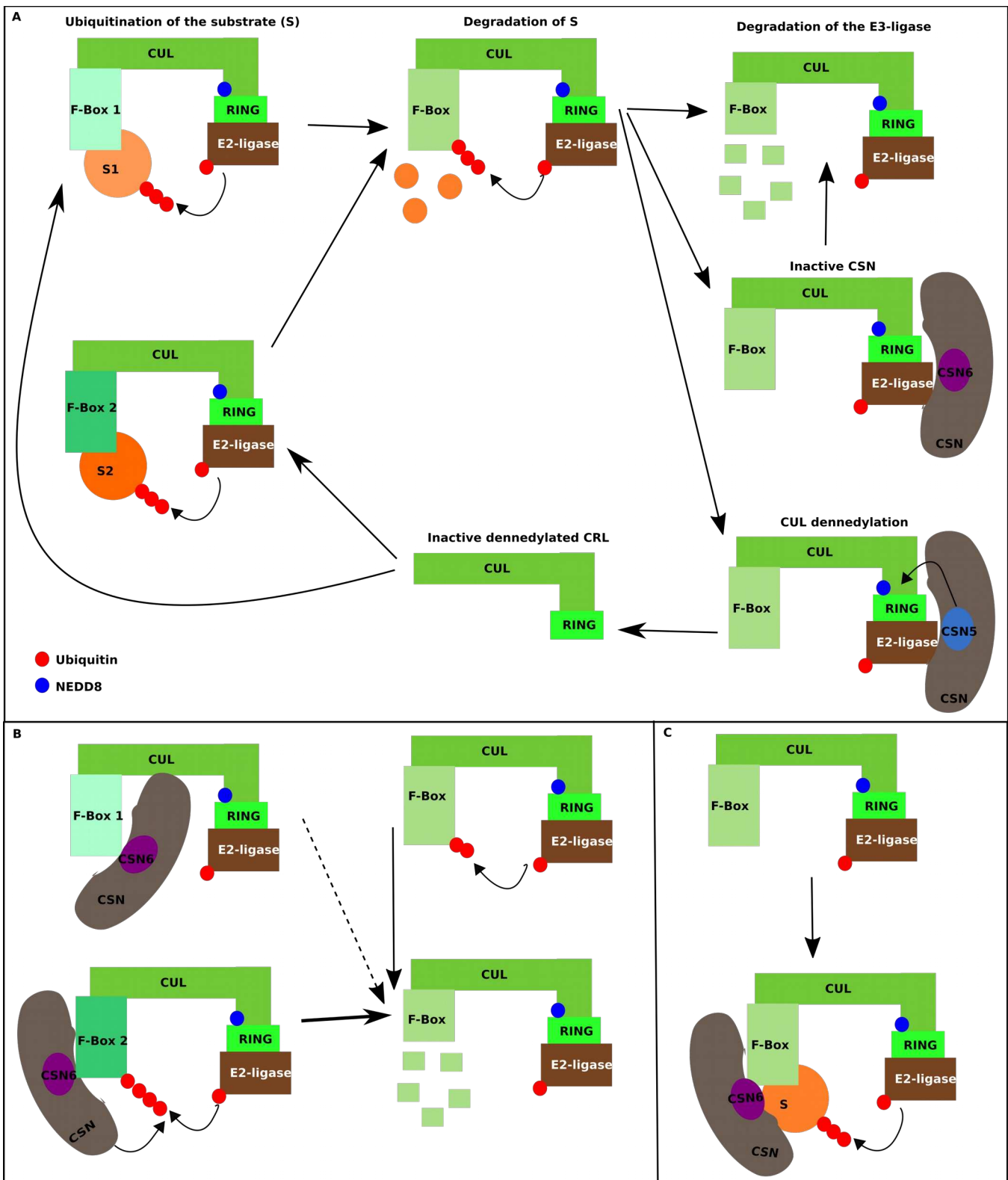


Figure 1. CSN controls CRL activity. A. Through CSN5 (blue), CSN (grey) can deneddylate CUL from CRLs (CUL, F-BOX and RING in different shades of green), which inactivates and stabilises them (e.g. SCFs and APC/C). It can also trigger CRL re-assembly leading to a change of substrate. CSN6 (purple) can compete with CSN5 for CUL binding (e.g. Fbxw17), thus promoting neddylated CULs. B. CSN6 interaction with F-BOX promotes (e.g. with MEK1 and CHIP) or inhibits (e.g. with MDM2) their self-ubiquitination and thus their stability. C. CSN can act as a linker between an F-BOX and its substrate (e.g. Skp2 and p57).

after degradation of CDK inhibitors (CDKIs) from the Kip family such as p27 and p57. The effect of CSN on the G1 phase has been described through knockdown studies. A decrease of CSN8 levels in mouse

embryonic fibroblasts (MEFs) and in HeLa cells leads to an increase of cell proliferation characterized by a shortened G1 phase (7). These results suggest that CSN8 is necessary for proper G1 phase duration.

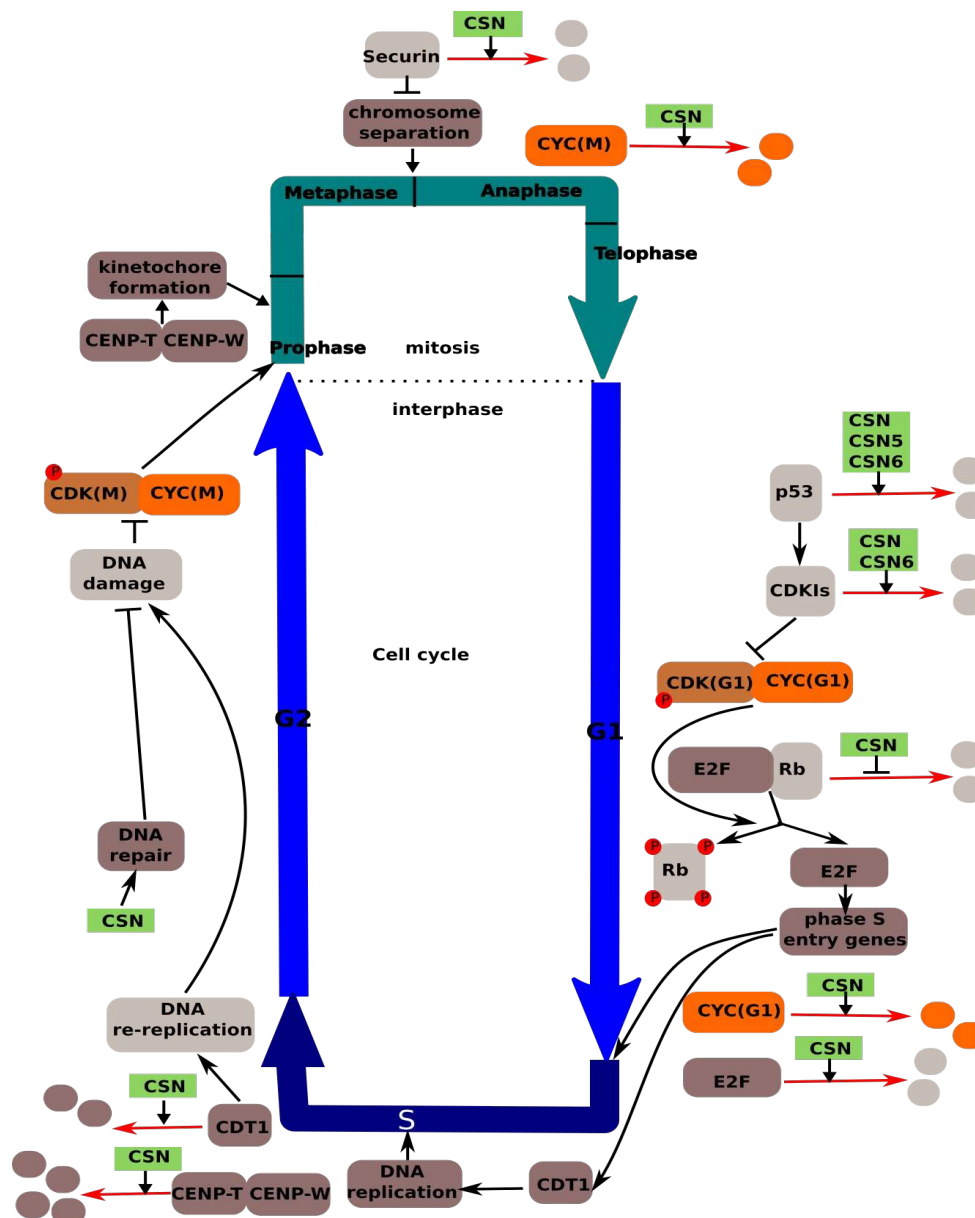


Figure 2. CSN controls cell cycle progression. CSN (green) modulates the UPS-mediated degradation (red arrow) of key cell cycle regulators which stimulates (dark grey) or inhibits (light grey) cell cycle progression.

CSN8 decrease is correlated with an increase of CSN5 outside the holocomplex (7). Thus, CSN8 could affect G1 duration not directly, but by modulating the relative proportion of CSN and CSN5 subcomplexes. This hypothesis is strengthened by the fact that the neddylation pattern of CULs is disrupted in CSN8 knockdown MEFs (7).

To specify the role of CSN, knockouts of different subunits in mice and drosophila have been characterized. Those mutants accumulate G1 cell cycle regulators such as p53, p27, and CYCE (3), suggesting a major role for CSN in the regulation of their stability (Fig.2). CSN controls through the classical deneddylation pathways SCF E3-ligases responsible for the ubiquitination of CYCE and p27 (8) (Fig.1A). Less classical mechanisms have also been described: for example, after phosphorylation by CK2 (9), p27 is translocated from the nucleus to the

cytoplasm in a CSN/CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1)-dependent manner (10). COP1 is an E3-ligase which is then responsible for p27 ubiquitination. CSN is necessary to recruit and stabilize COP1 by preventing its self-ubiquitination. Moreover, a specific role in p27 localization has been proposed for CSN5 (11). Indeed, in serous ovarian cancer, CSN5 knockdown leads to a G1/G0 arrest linked to an increased cytoplasmic localization of p27 whereas either CSN6 knockdown or the utilization of an inhibitor of CSN5, CSN5i-3 leads to a S-phase arrest, with a strong nuclear localization of p27 (11). These data suggest that the monomeric presence of CSN5 independently of its enzymatic activity is more crucial for p27 translocation to the nucleus, and thus G1-S progression, than the activity of the holocomplex. A similar G0/G1 arrest following CSN5 knockdown and linked to apoptosis has also been observed in non-small cell lung cancer cells (12). In this tissue, it has

been linked to CSN5 ability to bind and favor the ubiquitination of SURVIVIN, involving not only CSN5 but the holocomplex and its associated enzymes. Thus, the role of CSN5 in going through the G1/S transition seems to be mediated by both CSN5-specific and holocomplex-dependent mechanisms.

Other mechanisms involve specific interactions between CSN subunits and cell cycle regulator. In human cell lines, CSN6 C-terminal domain binds to p57 and to the F-BOX protein Skp2 – but not through Skp2 F-box domain– leading to the Skp2-mediated ubiquitination of p57 (13) (Fig.1C). Even if this action may be specific to CSN6, it is more likely that this subunit acts in the CSN holocomplex, as free CSN6 cannot be detected in normal conditions (6). Besides, through a mechanism conserved between plants and animal, CSN4 seems to be sequestered by TRANSLATIONALLY CONTROLLED TUMOR PROTEIN (TCTP) leading to a regulation of the CSN holocomplex formation and thus of the neddylation status of CUL1 impacting the G1/S transition (14).

CSN can use different pathways leading to the degradation of the same molecules, thus bringing robustness to the system. For example, the stability of the tumor suppressor p53 is regulated both by CSN and CSN subunits (Fig.2). Only after phosphorylation by CSN associated kinases, p53 can be recognized by F-BOX PROTEIN 42 and is consequently targeted for UPS-mediated degradation (15). Moreover, CSN6 can specifically interact with MURINE DOUBLE MINUTE 2 (MDM2) –an E3-ligase responsible for p53 degradation– at the MDM2 self-ubiquitination region, thus preventing MDM2 degradation and decreasing p53 level (16) (Fig.1B). Only CSN6, and not CSN5, interaction *in vitro* with MDM2 leads to a decrease of polyubiquitinated MDM2 (16), suggesting a specific function for CSN6. Besides, CSN5 can also decrease p53 levels in coordination with MDM2 in a different manner by inducing p53 nuclear export and subsequent degradation (17). The N-terminal domain of CSN5 –required for p53 nuclear export– and the JAMM domain –necessary for p53 degradation– can regulate p53 without being incorporated into CSN holocomplex. Thus, CSN5 could act on MDM2-dependent p53 degradation in small subcomplexes. It does not exclude that CSN5 could have the same role in the holocomplex. Because p53 is a major regulator of cell cycle progression and because CSN tightly regulates p53, high levels of p53 in *csn5*^{-/-} mutants could be the main reason for the cell proliferation arrest in these mutants. However, *csn5*^{-/-} *p53*^{-/-} MEFs are not proliferating (18), indicating that CSN control on G1-S transition is much more complex than an effect on a single key regulator.

CSN can affect the same molecules by different concordant ways, which strengthens its action on cell cycle, and by different opposite ways, which allows a tight regulation. In *drosophila*, CSN stabilizes Rb leading to a stabilization of inactive E2F during the early G1 phase (19) Moreover, it also stabilizes CUL4-E3-ligases that are responsible for the degradation of active E2F after its dissociation from Rb (20). CSN

dual effect on E2F degradation may contribute to a fine-tune regulation of cell cycle and of its progression (Fig.2).

A major remaining question is whether CSN only acts on G1-S regulators by controlling their UPS-mediated degradation. Some studies have suggested a role for CSN on transcription. CSN can bind to the chromatin and regulates transcription factor degradation, thus indirectly regulating transcription (3,21). However, after treatment with a proteasome inhibitor the levels of G1 CDKs-CYCs in *CSN8*-deficient T cells do not go back to their physiological value (22). This result suggests that CSN can act independently of the UPS. Besides, CSN subunits can be recruited to promoters close to transcription complexes. A DNA adenyl methyltransferase identification study in *drosophila* (23) has shown that CSN7 can directly interact with DNA, probably by its PCI domain which contains a putative helix-turn-helix motif. More interestingly, targets for CSN7 binding overlap greatly with genes whose levels of expression are modified upon deregulation of different CSN subunits. Most of those genes are involved in G1-S transition and wing disk development which is consistent with the phenotype of *CSN7* RNAi flies. These results strongly suggest that CSN can directly act on transcription. The underlying mechanism(s) remain(s) unknown. The fact that it has not been possible to find an enriched motif for CSN7 DNA binding (23) leads to the hypothesis that CSN7 has a general affinity for DNA which could be modulated by interaction with different transcription factors.

Even if some mechanisms remain to be discovered, both CSN holocomplex and subunits play a crucial role in G1 phase and most importantly in passing the G1-S checkpoint. They mainly act on the turnover of key regulators but the existence of other pathways such as transcription regulation has to be considered. The regulation of the G1-S transition is a key function in animals since it has been confirmed in *drosophila*, mice, and different types of human cells. In plants, most studies did not report G1-related phenotypes in *csn* mutants, which is consistent with the absence of homologues for key G1 regulators influenced by CSN such as p53 and p27 (24). However, a recent study (14) proposed a role for CSN in G1/S regulation in both plants and animals, demonstrating that this function of CSN is not restricted to animals and suggesting the existence of conserved pathways.

From S phase to G2-M transition

After passing the G1-S checkpoint, the cell goes through S phase. S phase regulators are especially important to ensure a single start of DNA replication and its correct progression (1). Among them, CHROMATIN LICENSING AND DNA REPLICATION FACTOR 1 (CDT1) is part of the pre-replication complex. After S phase completion, the next important checkpoint is the G2-M transition (1). It is involved in insuring DNA integrity: the presence of DNA damage leads to inhibitory phosphorylations of CDKs-CYCs and thus cell cycle arrest in G2 (Fig.2).

In plants, *csn* mutants present a G2 delay (25). They

are characterized by the presence of DNA double-strand breaks which leads to the activation of the repair machinery and to arrest at the G2-M transition. This phenotype can also be observed in mammals, for example in mice myoblasts (26) and hepatocytes (27). CSN3 knockdown in murine myoblast model cell line leads to cell proliferation defects characterized by a delay in S to G2 progression and a decrease in protein levels of p21, p27 and CDK6 (26), suggesting a role for CSN in both G1/S and S progression. Besides, *csn5*^{-/-} liver cells stop proliferating in S or G2 phases (27). They also present markers of replicative stress and an increase in ploidy due to DNA re-replication. Thus, the presence of DNA damage in absence of a functional CSN could result from defaults in DNA replication. One mechanism explaining this role of CSN is its cooperation with the non-canonical CRL4A/4B^{CDT2} E3-ligase (28). CRL4A/4B^{CDT2} together with CSN has been implied in the degradation of CDT1 during S and G2 phases (Fig.2). CDT1 accumulation when its degradation is not completed leads to DNA re-replication. CLR4A/4B^{CDT2} can also limit re-replication in cooperation with RAD 18 through PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN mono-ubiquitination which promotes error-free post-replication repair (28). The implication of CSN on that particular mechanism is still unclear but must be of importance as CSN associates with CLR4A/4B^{CDT2}.

All these studies confirmed that CSN is implied in S phase progression and G2-M transition in both animals and plants. These functions are tightly linked with DNA damage that is the main cause of arrest at the G2-M checkpoint. CSN has not only been involved in preventing DNA damage –e.g. through limiting DNA re-replication– but also in repairing DNA damage (29,30) (Fig.2).

M phase progression

The last crucial cell cycle checkpoint, called spindle checkpoint, occurs at the transition during metaphase and anaphase during mitosis. The main regulator is the Anaphase Promoting Complex (APC/C), an E3-ligase mediating degradation of targets such as mitotic CYCs (1).

Other interesting phenotypes of CSN knockdowns in HeLa cells are the observations of misaligned chromosomes, and multipolar spindles correlated with a longer M phase (31). These phenotypes may be due to the dispersion in prophase of CENP-W and CENP-T, two centromeric proteins implied in kinetochore formation. CSN5 can bind to CENP-W and CENP-T and enhance their proteosomal degradation (31). It only occurs during the S phase, when these three proteins are all localized in the nucleolar compartment. This binding leads to an interphase CSN5-dependent turnover of CENP-W and CENP-T which is necessary for their correct recruitment to the kinetochore later during mitosis (Fig.2). As CENP-W and CENP-T never interact with CSN1, this function seems to be restricted to CSN5 subcomplexes.

Other mechanisms explain defaults in chromosome segregation of CSN mutants. In human cells, CSN

and more specifically CSN2 binds to APC/C and influences the stability of its targets (32). These results have been confirmed in mouse oocytes (33). Indeed, CYCB1 and SECURIN –two major targets of APC/C– are not degraded during the meiosis I following CSN3 or CSN5 knockdown, respectively leading to a deregulation of the mitotic CDK-CYC and to unseparated chromosomes due to the degradation of Separase (Fig.2). Thus, a more classical mechanism for CSN action on an E3-ligase also leads to mitotic and meiotic defects (Fig.1A).

CSN is also implied in meiotic specific processes. A screen in *Caenorhabditis elegans* revealed a role for CSN in the synaptonemal complex (SC) assembly (34). After the initiation of SC assembly, CSN limits the aggregation of SYNAPSIN IN MEIOSIS ABNORMAL (SYP) 1,3,4 but without influencing their degradation. It may act through deneddylation of CUL4 and regulation of SYPs by ubiquitination not followed by degradation. CSN also stimulates pachytene exit through MAP KINASE 1 signaling. Both these roles are assumed by the holocomplex because defects are seen in *csn-2*, *csn-3*, and *csn-5* mutants. Nevertheless, small differences in phenotypes of the different mutants exist (34). For example, homologous pairing is totally absent in *csn-2* whereas it is initiated in *csn-5*. These differences suggest that there may also be more specific roles for CSN subunits.

To summarize, CSN is implied in every step of cell cycle progression, especially in key checkpoints such as G1-S and G2-M transitions. More than having a specific role in a specific organism, it seems that CSN is a general cell cycle regulator in all species, acting through classical deneddylation mechanisms but also indubitably through sub-unit specific mechanisms as highlighted by the presence of phenotypic differences between knockdown and knockout mutants of the different subunits in several organisms. Besides, CSN also affects the cell cycle in a different manner, not by controlling its progression but by playing a role in its initiation.

CSN controls the proliferative status of a cell

Cell cycle entry

CSN plays a key role in entering the cell cycle by regulating the G0-G1 transition (3) (Fig.3). *csn*^{-/-} MEFs and *csn8*^{-/-} T-cells are unable to re-initiate proliferation due to the lack of expression of genes essential to cell cycle re-entry (e.g. G1 CYCs, CDKs, and E2F) and to the overexpression of the CDKI p21 (7). This may be a general function of CSN since a similar phenotype is observed following CSN3 knockdown in hepatocellular carcinoma cells (35). Indeed, the growth of these cells is inhibited through cell-cycle arrest in G0 and G1 phases. This growth inhibition is not only linked to quiescence, but also to cell death as pro-apoptotic proteins are induced, which is consistent with the role of CSN in degrading p53.

Besides, the CSN5 subunit also has an action on both cell cycle re-entry and cell death (36). In *csn5*^{-/-}

MEFs, the transcription of *CYCD1* –required to exit the G0 phase– is low and the CDK2-CYCE complex is inactive, impairing G1 progression. The mechanism by which CSN5 influences *CYCD1* transcription is still unknown, contrary to the mechanism concerning the CDK2-CYCE complex. Outside of the holocomplex, CSN5 specifically binds to CDK2 and prevents its phosphorylation by Akt, thus allowing its nuclear import. In the absence of CSN5, CDK2 is sequestered into the cytoplasm, which leads to the cytoplasmic retention of CYCE. CYCE accumulation is then responsible for p53-independent senescence in those cells. CYCE accumulation could also be in part due to a lack of degradation because of SCF inactivation in absence of the holocomplex (see above). Nevertheless, CYCE does not accumulate in *csn8*^{-/-} cells in which CSN5 level is not altered, confirming that the alternative CSN5-specific mechanism plays a key role in controlling senescence.

A specific role for CSN2 in maintaining pluripotency of embryonic stem cells has also been demonstrated (37). First, CSN2, contrary to CSN5, directly binds Nanog, a key transcription factor for pluripotency maintenance, and prevents its proteasomal degradation in a CSN-independent way. Moreover, a high correlation between genes upregulated in CSN2 knockdown and genes occupied by CSN2 in chromatin immunoprecipitation assays suggests that CSN2 acts as a transcriptional repressor. CSN2 seems to play an important role in controlling the balance between cell proliferation and differentiation through different mechanisms at least in embryonic stem cells.

Thus, both CSN holocomplex and CSN subunits are necessary for the balance between proliferation, differentiation and cell death by controlling key pathways such as cell cycle re-entry, apoptosis, and senescence.

Classical proliferation pathways

In addition to directly influencing cell cycle progression through regulation of key proteins, CSN also controls it indirectly through modulation of several proliferation pathways. Among those pathways, the kinase Akt, the transcription factors β -catenin, c-Myc, and c-Jun, and the EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR (EGFR) are key regulators involved in the regulation of cell survival, growth, proliferation, and differentiation (Fig.3). For example, by stabilizing COP1 (see above), CSN stimulates the ubiquitination and subsequent degradation of 14-3-3 σ , a chaperone involved in the regulation of apoptosis, cell migration, cell cycle, and DNA damage response (38). Interestingly, 14-3-3 σ is a negative regulator of Akt. Moreover, those pathways are tangled as 14-3-3 σ is a downstream target of p53 which is regulated by CSN and as Akt positively regulates CSN6 (39) (Fig.3). Indeed, Akt phosphorylates CSN6 resulting in CSN6 stabilization by limiting ubiquitination. Akt also induces CSN6 nuclear import. This example illustrates the complexity of the cellular network involving CSN, which cannot be seen as linear and includes cross-regulations.

Another level of complexity is added through the time-dependent action of CSN. For example, CSN stimulates the short-term degradation of β -catenin. However, in the long term, a CSN5 knockdown results in a decrease of β -catenin levels and of the transcription of its targets (40) (Fig.3). One of the mechanisms implied is CSN regulation of the E3-ligase SEVEN IN ABSENTIA HOMOLOG-1 (SIAH-1) which promotes the degradation of β -catenin (41). CSN reduces the stability of SIAH-1 through a pathway dependent on CSN5 deneddylase activity. As SIAH-1-mediated degradation of β -catenin seems to be slow (42), this pathway could be involved in CSN long-term upregulation of β -catenin. Nevertheless, CSN also has the opposite effect on SIAH-1 by increasing *SIAH-1* transcription, possibly through p53. Thus, CSN regulation of SIAH-1 is finely tuned by opposite effects on gene transcription and protein stability. Studies at different time points are necessary to understand the kinetics of the CSN/SIAH-1/ β -catenin pathway. Furthermore, the existence of a pathway regulated by CSN6 could also explain the dual role of CSN on β -catenin. Indeed, CSN6 stabilizes β -catenin by preventing its ubiquitination by its main regulator: the F-BOX protein β -Trcp (43). More specifically, CSN6 increases the ubiquitination and subsequent degradation of β -Trcp. One possible explanation is that CSN6 would compete with CSN5 for β -Trcp binding, thus preventing β -Trcp deneddylation and resulting in β -Trcp degradation. This model has not been demonstrated yet for CSN6 and β -catenin but for CSN6 and c-Myc (44).

c-Myc is a downstream effector of β -catenin tightly regulated by the E3-ligase Fbxw7. CSN6 promotes the neddylation of CUL1 leading to self-ubiquitination and degradation of Fbxw7 (44). *In vitro* assays revealed competition between CSN5 and CSN6 for CUL1 binding through their shared MPN domain. Thus, the more CSN6 is present, the less CSN5 can bind to CUL1 and deneddylate it, the more Fbxw7 is degraded, and the less c-Myc is degraded (Fig.1A). The remaining question is how CSN5 and CSN6 can compete with one another, that is to say which forms of CSN (sub)complexes could have different stoichiometry of CSN5/6.

CSN6 may also have a role of its own in regulating protein stability. It acts on the c-Jun pathway by promoting the ubiquitination of MEK KINASE 1 (MEKK1), an E3-ligase for c-Jun (45) (Fig.1B). Surprisingly, the MPN domain of CSN6 is not sufficient to act on MEKK1 ubiquitination, but the whole-length CSN6 is needed. Therefore, CSN6 does not influence the c-Jun pathway through competition with CSN5 but by another mechanism that is still unknown. Moreover, CSN6 can bind to CARBOXYL TERMINUS OF HEAT-SHOCK PROTEIN 70-INTERACTING PROTEIN (CHIP), an E3-ligase promoting EGFR degradation, and stimulates its self-ubiquitination leading to the stabilization of EGFR (46) (Fig.1B). These last two mechanisms need to be taken with caution as they mainly result from studies of cells overexpressing CSN6. Thus, the interaction of CSN6 with MEKK1 and CHIP may only happen when the concentration

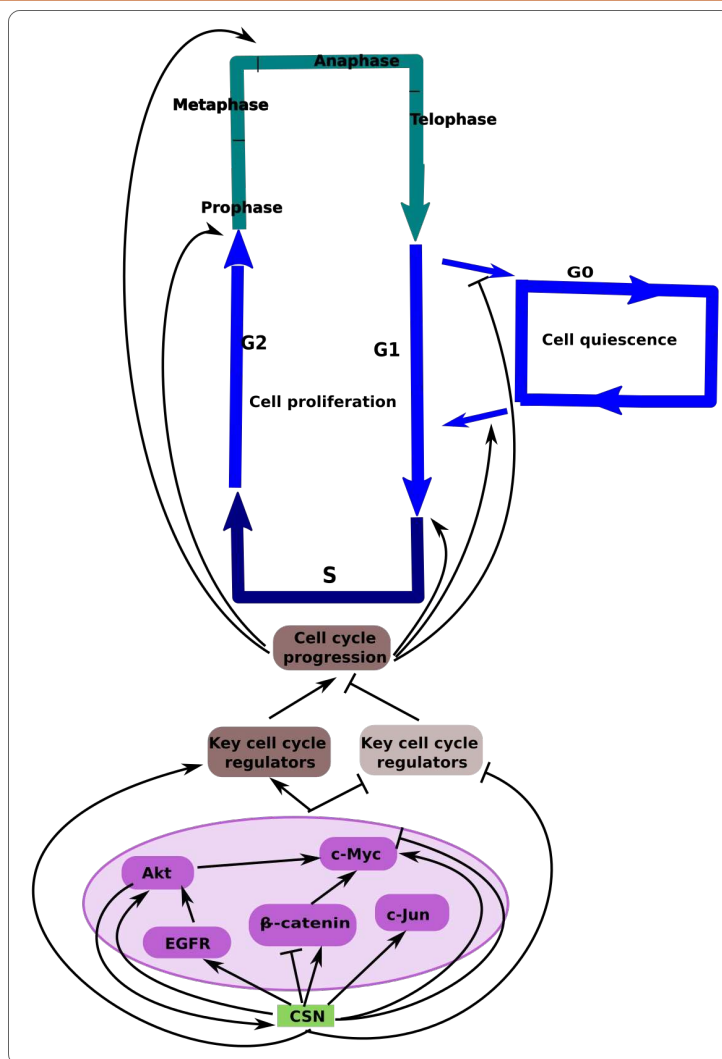


Figure 3. CSN controls cell proliferation and cell quiescence. CSN stimulates both directly and indirectly via several proliferation pathways (purple) key cell cycle regulators. Those regulators act at different phases of the cell cycle to modulate cell proliferation.

in CSN6 is very high, and then would not be relevant in physiological conditions.

Other studies point to a specific role for some subunits such as CSN1b in flies (47). Losses or knockdowns of different subunits : CSN1b, CSN4 or CSN5 lead to deregulation of the EGFR pathway as shown by the overexpression of ARGOS (AOS), one of its targets. This is linked with a global role of CSN in promoting the stability of CAPICUA (CIC) -a repressor of AOS directly regulated by MAPK- in a proteasome-dependent manner through regulation of SCF^{Ago}. Besides, in *csn5* mutants the stability of a CIC protein lacking its domain interacting with MAPK is no more affected; contrary to *csn1b* mutants in which such protein still is over-degraded. These data suggest that CIC can be regulated by CSN according to two different pathways : one CSN holocomplex and MAPK signaling- dependent and one CSN1b-dependent and MAPK signaling-independent.

Conclusion

The well-described role of CSN on CUL deneddylation is a key mechanism for CSN to ensure its function through the regulation of CRLs (Fig.1A). The competition for CUL binding between the enzymatically active CSN5 and inactive CSN6 provides another level of regulation of CRL activity. Nevertheless, deneddylase activity is not enough to explain all the effects of CSN on cell cycle. CSN also modulates CRL activity independently of neddylation by regulating positively or negatively their self-ubiquitination and by linking CRL to their substrates (Fig.1B, C). Moreover, mechanisms other than protein degradation, such as phosphorylation by CSN-associated kinases and nuclear export and import, need to be considered. In a completely different way, CSN seems also to directly regulate the transcription of key cell cycle genes. All these data confirm that CSN must not be only considered as a deneddylase enzyme but that its other functions must be further investigated. Besides, even if the deneddylase activity of CSN has been known for a long time, a still open question is whether CSN could deneddylate other substrates than CULs. Those substrates are less

abundant than CULs, which stay the main target of neddylation, and seem to be deneddylated at least in part by other enzymes than CSN such as DENEDDYLASE1.

Another key question is whether other forms than CSN can be active. Differences between the phenotypes of the mutants for the different subunits suggest specificity of action. CSN5 subcomplexes and free CSN5, which cannot deneddylate CULs, can influence protein stability. Specific roles have also been demonstrated for CSN6. However, further studies are needed to clarify in which complexes CSN6 can perform those roles, especially as free CSN6 is not detected in physiological conditions. Besides, most of CSN5,6's specific functions have been demonstrated following overexpression of the subunit. Thus, even if those mechanisms are relevant in tumor cells in which the gene is upregulated, they still need to be confirmed in physiological conditions.

CSN plays a key role in cell cycle regulation at different levels. First, CSN directly controls cell cycle progression through regulation of the three major checkpoints: G1-S, G2-M and the metaphase-anaphase transitions (Fig.2). Regulation of the S, G2, and M phases seems to be important for all eukaryotes and is related to the role of CSN in DNA repair. CSN also indirectly controls cell cycle through the modulation of cell proliferation (Fig.3). Destabilization of CSN leads to important cell cycle defects. In most cases, a downregulation of CSN leads to cell cycle arrest at multiple positions, whereas an upregulation leads to overproliferation. Interestingly, CSN5 and CSN6 are overexpressed in several types of cancers, participate to carcinogenesis, and are associated with poor prognosis (48,49). Thus, they have been proposed as new therapeutic targets. It is important to better decipher the relative importance of CSN different pathways during tumorigenesis to address the possible efficiency of such therapies. For example, targeting CSN-dependent activation of p53 would be inefficient as p53 is inactivated in most of the tumors. The multiplicity of CSN-dependent pathways involved in the regulation of cell cycle and of cell proliferation could give CSN inhibitors a high efficiency to prevent cancer progression.

References

1. Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol.* juill 2013;23(7):345-56.
2. Choi CM, Gray WM, Mooney S, Hellmann H. Composition, roles, and regulation of cullin-based ubiquitin e3 ligases. *Arab Book Am Soc Plant Biol.* 2014;12:e0175.
3. Wei N, Serino G, Deng X. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci.* déc 2008;33(12):592-600.
4. Suisse A, Békés M, Huang TT, Treisman JE. The COP9 signalosome inhibits Cullin-RING E3 ubiquitin ligases independently of its deneddylase activity. *Fly (Austin).* 3 avr 2018;12(2):118-26.
5. Wei N, Deng X-W. COP9: a new genetic locus involved in light-regulated development and gene expression in arabidopsis. *Plant Cell.* 1992;4(12):1507-1518.
6. Dubiel D, Rockel B, Naumann M, Dubiel W. Diversity of COP9 signalosome structures and functional consequences. *FEBS Lett.* 14 sept 2015;589(19 Pt A):2507-13.
7. Liu C, Guo L-Q, Menon S, Jin D, Pick E, Wang X, et al. COP9 signalosome subunit Csn8 is involved in maintaining proper duration of the G1 phase. *J Biol Chem.* 12 juill 2013;288(28):20443-52.
8. Cope GA, Deshaies RJ. COP9 Signalosome: A Multifunctional Regulator of SCF and Other Cullin-Based Ubiquitin Ligases. *Cell.* 19 sept 2003;114(6):663-71.
9. Huang X, Wagner E, Dumdey R, Peth A, Berse M, Dubiel W, et al. Phosphorylation by COP9 Signalosome-Associated CK2 Promotes Degradation of p27 during the G1 Cell Cycle Phase. *Isr J Chem.* 2006;46(2):231-238.
10. Choi HH, Guma S, Fang L, Phan L, Ivan C, Baggerly K, et al. Regulating the stability and localization of CDK inhibitor p27(Kip1) via CSN6-COP1 axis. *Cell Cycle Georget Tex.* 2015;14(14):2265-73.
11. Zhang H, Zhong A, Sun J, Chen M, Xie S, Zheng H, et al. COPS5 inhibition arrests the proliferation and growth of serous ovarian cancer cells via the elevation of p27 level. *Biochem Biophys Res Commun.* 04 2017;493(1):85-93.
12. Li J, Li Y, Wang B, Ma Y, Chen P. CSN5/Jab1 facilitates non-small cell lung cancer cell growth through stabilizing survivin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 juin 2018;500(2):132-8.
13. Chen B, Zhao R, Su C-H, Linan M, Tseng C, Phan L, et al. CDK inhibitor p57 (Kip2) is negatively regulated by COP9 signalosome subunit 6. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 déc 2012;11(24):4633-41.
14. Betsch L, Boltz V, Brioudes F, Pontier G, Girard V, Savarin J, et al. TCTP and CSN4 control cell cycle progression and development by regulating CULLIN1 neddylation in plants and animals. *PLOS Genet.* 29 janv 2019;15(1):e1007899.
15. Sun L, Shi L, Wang F, Huangyang P, Si W, Yang J, et al. Substrate phosphorylation and feedback regulation in JFK-promoted p53 destabilization. *J Biol Chem.* 11 févr 2011;286(6):4226-35.
16. Zhao R, Yeung S-CJ, Chen J, Iwakuma T, Su C-H, Chen B, et al. Subunit 6 of the COP9 signalosome promotes tumorigenesis in mice through stabilization of MDM2 and is upregulated in human cancers. *J Clin Invest.* mars 2011;121(3):851-65.
17. Oh W, Lee E-W, Sung YH, Yang M-R, Ghim J, Lee H-W, et al. Jab1 induces the cytoplasmic localization and degradation of p53 in coordination with Hdm2. *J Biol Chem.* 23 juin 2006;281(25):17457-65.
18. Yoshida A, Yoneda-Kato N, Panattoni M, Pardi

- R, Kato J. CSN5/Jab1 controls multiple events in the mammalian cell cycle. *FEBS Lett.* 19 nov 2010;584(22):4545-52.
19. Ullah Z, Buckley MS, Arnosti DN, Henry RW. Retinoblastoma protein regulation by the COP9 signalosome. *Mol Biol Cell.* avr 2007;18(4):1179-86.
20. Raj N, Zhang L, Wei Y, Arnosti DN, Henry RW. Rbf1 degron dysfunction enhances cellular DNA replication. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 oct 2012;11(20):3731-8.
21. Chamovitz DA. Revisiting the COP9 signalosome as a transcriptional regulator. *EMBO Rep.* avr 2009;10(4):352-8.
22. Menon S, Chi H, Zhang H, Deng XW, Flavell RA, Wei N. COP9 signalosome subunit 8 is essential for peripheral T cell homeostasis and antigen receptor-induced entry into the cell cycle from quiescence. *Nat Immunol.* nov 2007;8(11):1236-45.
23. Singer R, Atar S, Atias O, Oron E, Segal D, Hirsch JA, et al. Drosophila COP9 signalosome subunit 7 interacts with multiple genomic loci to regulate development. *Nucleic Acids Res.* sept 2014;42(15):9761-70.
24. Schwechheimer C, Isono E. The COP9 signalosome and its role in plant development. *Eur J Cell Biol.* févr 2010;89(2-3):157-62.
25. Dohmann EMN, Levesque MP, De Veylder L, Reichardt I, Jürgens G, Schmid M, et al. The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Dev Camb Engl.* juin 2008;135(11):2013-22.
26. Ba MA, Surina J, Singer CA, Valencik ML. Knockdown of subunit 3 of the COP9 signalosome inhibits C2C12 myoblast differentiation via NF-KappaB signaling pathway. *BMC Pharmacol Toxicol.* 17 2017;18(1):47.
27. Panattoni M, Maiorino L, Lukacs A, Zentilin L, Mazza D, Sanvito F, et al. The COP9 signalosome is a repressor of replicative stress responses and polyploidization in the regenerating liver. *HepatoL Baltim Md.* juin 2014;59(6):2331-43.
28. Sertic S, Evolvi C, Tumini E, Plevani P, Muzi-Falconi M, Rotondo G. Non-canonical CRL4A/4B(CDT2) interacts with RAD18 to modulate post replication repair and cell survival. *PloS One.* 2013;8(3):e60000.
29. Hannß R, Dubiel W. COP9 signalosome function in the DDR. *FEBS Lett.* 16 sept 2011;585(18):2845-52.
30. Chung D, Dellaire G. The Role of the COP9 Signalosome and Neddylation in DNA Damage Signaling and Repair. *Biomolecules.* 2015;5(4):2388-416.
31. Chun Y, Lee M, Park B, Lee S. CSN5/JAB1 interacts with the centromeric components CENP-T and CENP-W and regulates their proteasome-mediated degradation. *J Biol Chem.* 20 sept 2013;288(38):27208-19.
32. Kob R, Kelm J, Posorski N, Baniahmad A, von Eggeling F, Melle C. Regulation of the anaphase-promoting complex by the COP9 signalosome. *Cell Cycle Georget Tex.* 1 juill 2009;8(13):2041-9.
33. Kim E, Yoon S-J, Kim E-Y, Kim Y, Lee H-S, Kim K-H, et al. Function of COP9 signalosome in regulation of mouse oocytes meiosis by regulating MPF activity and securing degradation. *PloS One.* 2011;6(10):e25870.
34. Brockway H, Balukoff N, Dean M, Alleva B, Smolikove S. The CSN/COP9 signalosome regulates synaptonemal complex assembly during meiotic prophase I of *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* nov 2014;10(11):e1004757.
35. Yu Y, Tang Z, Pan Q, Chen X, Liu X, Zang G. Inhibition of Csn3 expression induces growth arrest and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol.* mai 2012;69(5):1173-80.
36. Yoshida A, Yoneda-Kato N, Kato J. CSN5 specifically interacts with CDK2 and controls senescence in a cytoplasmic cyclin E-mediated manner. *Sci Rep.* 2013;3:1054.
37. Zhang W, Ni P, Mou C, Zhang Y, Guo H, Zhao T, et al. Cops2 promotes pluripotency maintenance by Stabilizing Nanog Protein and Repressing Transcription. *Sci Rep.* 2016;6:26804.
38. Choi HH, Gully CP, Su C-H, Velazquez-Torres G, Chou P-C, Tseng C, et al. COP 9 Signalosome Subunit 6 Stabilizes COP1, which Functions as an E3 Ubiquitin Ligase for 14-3-3 σ . *Oncogene.* 1 déc 2011;30(48):4791-801.
39. Xue Y, Chen J, Choi H-H, Phan L, Chou P-C, Zhao R, et al. HER2-Akt signaling in regulating COP9 signalosome subunit 6 and p53. *Cell Cycle Georget Tex.* 15 nov 2012;11(22):4181-90.
40. Schütz AK, Hennes T, Jumpertz S, Fuchs S, Bernhagen J. Role of CSN5/JAB1 in Wnt/ β -catenin activation in colorectal cancer cells. *FEBS Lett.* 4 juin 2012;586(11):1645-51.
41. Jumpertz S, Hennes T, Asare Y, Vervoorts J, Bernhagen J, Schütz AK. The β -catenin E3 ubiquitin ligase SIAH-1 is regulated by CSN5/JAB1 in CRC cells. *Cell Signal.* sept 2014;26(9):2051-9.
42. Matsuzawa SI, Reed JC. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol Cell.* mai 2001;7(5):915-26.
43. Fang L, Lu W, Choi HH, Yeung S-CJ, Tung J-Y, Hsiao C-D, et al. ERK2-Dependent Phosphorylation of CSN6 Is Critical in Colorectal Cancer Development. *Cancer Cell.* 10 août 2015;28(2):183-97.
44. Chen J, Shin J-H, Zhao R, Phan L, Wang H, Xue Y, et al. CSN6 drives carcinogenesis by positively regulating Myc stability. *Nat Commun.* 14 nov 2014;5:5384.
45. Shin J, Phan L, Chen J, Lu Z, Lee M-H. CSN6 positively regulates c-Jun in a MEKK1-dependent manner. *Cell Cycle Georget Tex.* 2015;14(19):3079-87.
46. Hou J, Deng Q, Zhou J, Zou J, Zhang Y, Tan P,

et al. CSN6 controls the proliferation and metastasis of glioblastoma by CHIP-mediated degradation of EGFR. *Oncogene*. 23 2017;36(8):1134-44.

47. Suisse, Annabelle, He, DanQing, Legent, Kevin, Treisman, Jessica E. COP9 signalosome subunits protect Capicua from MAPK-dependent and -independent mechanisms of degradation | *Development* [Internet]. [cité 25 janv 2019]. Disponible sur:

<http://dev.biologists.org/content/144/14/2673>

48. Lee M-H, Zhao R, Phan L, Yeung S-CJ. Roles of COP9 signalosome in cancer. *Cell Cycle Georget Tex*. 15 sept 2011;10(18):3057-66.

49. Wang L, Zheng J-N, Pei D-S. The emerging roles of Jab1/CSN5 in cancer. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. août 2016;33(8):90.

RESEARCH ARTICLE

TCTP and CSN4 control cell cycle progression and development by regulating CULLIN1 neddylation in plants and animals

Léo Betsch¹, Véronique Boltz¹, Florian Brioudes^{1,2a}, Garance Pontier¹, Victor Girard², Julie Savarin¹, Barbara Wiperman¹, Pierre Chambrier¹, Nicolas Tissot^{1,2b}, Moussa Benhamed³, Bertrand Mollereau², Cécile Raynaud³, Mohammed Bendahmane^{1*}, Judit Szécsi^{1*}

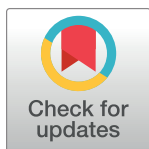
1 Laboratoire Reproduction et Développement des Plantes, Univ Lyon, ENS de Lyon, UCB Lyon 1, CNRS, INRA, UMS 3444 Biosciences Lyon Gerland, Ecole Normale Supérieure, Lyon, France, **2** Laboratory of Biology and Modelling of the Cell, UMR5239 CNRS/ENS de Lyon, INSERM U1210, UMS 3444 Biosciences Lyon Gerland, Univ Lyon, Lyon, France, **3** Institute of Plant Sciences Paris-Saclay (IP2S), CNRS, INRA, University Paris-Sud, University of Evry, University Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cite, University of Paris-Saclay, Orsay, France

☞ These authors contributed equally to this work.

^{2a} Current address: Institute of Molecular Plant Biology, Swiss Federal Institute of Technology, Zürich, Switzerland

^{2b} Current address: Department of Botany and Plant Biology, University of Geneva, Sciences III, Geneva, Switzerland

* mohammed.bendahmane@ens-lyon.fr (MB); judit.szecsi@ens-lyon.fr (JS)



OPEN ACCESS

Citation: Betsch L, Boltz V, Brioudes F, Pontier G, Girard V, Savarin J, et al. (2019) TCTP and CSN4 control cell cycle progression and development by regulating CULLIN1 neddylation in plants and animals. *PLoS Genet* 15(1): e1007899. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007899>

Editor: Jian Hua, Cornell University, UNITED STATES

Received: March 16, 2018

Accepted: December 15, 2018

Published: January 29, 2019

Copyright: © 2019 Betsch et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by funds from the French “Agence Nationale de la Recherche” grants ANR-09-BLAN-0006 and ANR-13-BSV7-0014, by the “Biologie et Amélioration des Plantes” Department of the French “Institut National de la Recherche Agronomique”, by the “Ecole Normale Supérieure de Lyon”, by Rijk Zwaan company and by the CIFRE program of the ANRT. The funders

Abstract

Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) controls growth by regulating the G1/S transition during cell cycle progression. Our genetic interaction studies show that TCTP fulfills this role by interacting with CSN4, a subunit of the COP9 Signalosome complex, known to influence CULLIN-RING ubiquitin ligases activity by controlling CULLIN (CUL) neddylation status. In agreement with these data, downregulation of *CSN4* in *Arabidopsis* and in tobacco cells leads to delayed G1/S transition comparable to that observed when *TCTP* is downregulated. Loss-of-function of *AtTCTP* leads to increased fraction of deneddylated CUL1, suggesting that *AtTCTP* interferes negatively with COP9 function. Similar defects in cell proliferation and CUL1 neddylation status were observed in *Drosophila* knockdown for *dCSN4* or *dTCTP*, respectively, demonstrating a conserved mechanism between plants and animals. Together, our data show that CSN4 is the missing factor linking TCTP to the control of cell cycle progression and cell proliferation during organ development and open perspectives towards understanding TCTP’s role in organ development and disorders associated with TCTP miss-expression.

Author summary

During organism development, the correct implementation of organs with unique shape, size and function, is the result of coordinated cellular processes, such as cell proliferation

had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

and expansion. Deregulation of these processes affect human health and can lead to severe diseases. While plants and animals have largely diverged in several aspects, some biological functions, such as cell proliferation, are conserved between these kingdoms. Previously we reported that the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP), a highly-conserved protein among all eukaryotes, positively regulates cell proliferation and this role is conserved between plants and animals. In agreement with these data, animals TCTP was reported to highly accumulate in tumor cells, and thus represents a target for cancer research and therapies. To discover how TCTP regulates cell proliferation, we conducted studies to identify factors acting in the TCTP pathway. Using the model plant *Arabidopsis*, we identified that TCTP fulfil its role by interacting with CSN4, a subunit of the conserved COP9 complex. TCTP interferes with the role of COP9 to regulate the downstream complex CRL known to control cell proliferation in eukaryotes. We further demonstrate that this role is conserved in the fly *Drosophila*, thus corroborating the conservation of TCTP pathway between plants and animals. We believe that, the data here will provide exciting perspectives, beyond plant research, that will help understand developmental disorders associated with TCTP malfunction, such as cancer.

Introduction

The correct implementation of organs with unique shape, size and function is fundamental to the development of all multicellular organisms and is the result of coordinated cellular processes requiring key molecular actors. One such key player in eukaryotes is the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP). TCTP was discovered in the 1980's as a protein positively regulated at the translational level in many tumors [1,2]. TCTP is a highly-conserved protein found in all eukaryotes. TCTP was reported to be involved in several cellular processes, including cell proliferation, cell growth, malignant transformation, apoptosis and protection against various cellular stresses [3–8].

In plants as in animals, TCTP loss of function leads to embryonic lethality, because of slower cell cycle progression and reduced cell proliferation [6] and reduced cell proliferation associated with excessive cell death [9,10], respectively. The fact that TCTP loss of function is lethal demonstrates its major role in eukaryote development, but also hampered the full comprehension of its exact roles. By performing embryo rescue, we generated the first *TCTP* full knockout adult organism which allowed us to demonstrate that TCTP controls cell cycle progression by regulating G1/S transition and that this role is conserved between plants and animals [6]. However, how TCTP controls the G1/S transition and cell proliferation remains unknown in plants as in animals. To better understand such a role, we searched for TCTP interacting proteins and identified that TCTP interacts physically with CSN4, one of the eight subunits of the Constitutive Photomorphogenesis 9 (COP9) Signalosome (CSN), initially discovered in plants [11,12] and conserved in eukaryotes [13]. CSN regulates the activity, the assembly and/or subunits stability of CULLIN-RING ubiquitin Ligase (CRLs) complexes, a major class of the E3 ligase complexes in eukaryotes [14] involved in the polyubiquitination of proteins targeted to degradation [15]. The proper functioning of CRL has been shown to be absolutely required for various functions associated with the control of cell cycle, transcription, stress response, self-incompatibility, pathogen defense and hormones and light signaling [16–18].

CSN mainly regulates CLR activity through the removal of the post-translational modification RUB/NEDD8 (Related to UBiquitin/Neural Precursor Cell Expressed, Developmentally

Down-Regulated 8) from its CULLIN (CUL) subunit [18]. The eight subunits of CSN are mandatory for the deneddylation activity [19–21].

Here, we show that TCTP interacts physically and genetically with CSN4 to control cell cycle progression. Our data demonstrate that downregulation of *TCTP* or *CSN4* both leads to retarded G1/S transition, slower cell cycle progression and delay in plant development. Consistent with these data, knockout of *TCTP* is associated with increased CUL1 deneddylation. Conversely, over-accumulation of TCTP leads to accelerated cell cycle and plant development, associated with over-accumulation of neddylated CUL1. We also show that in *Drosophila*, the downregulation of dTCTP or dCSN4 is associated with defects in cell proliferation. Moreover, similar to our observations in plants, dTCTP downregulation is accompanied by increased CUL1 deneddylation. These data suggest that TCTP interacts with CSN4 and such interaction acts on the CUL1 neddylation status and affects CRL complex activity early during cell cycle progression influencing organ development both in plants and animals.

Results

TCTP and CSN4 interact physically and genetically to control growth

To gain insights into how TCTP controls cell cycle progression, we searched for its interacting proteins. Immunoprecipitation followed by mass spectrometry (IP/MS) experiments were performed using protein extracts from *Arabidopsis* line expressing *35S::AtTCTP-GFP*. Wild-type (WT) Col-0 and free-GFP-overexpressing plants lines (*35S::GFP*) served as controls. Among the proteins that co-immunoprecipitated with TCTP-GFP, but were absent in the control samples, we identified AtCSN4, a subunit of COP9 Signalosome, that was previously shown to be involved in the regulation of cell cycle progression [22]. To confirm this interaction, we generated line *AtTCTPg-GFP* that expresses a TCTP-GFP fusion under the control of its own promoter and line *AtTCTPg-GFP/35S::AtCSN4-Flag*, that, in addition, expresses *AtCSN4-Flag* under the control of the constitutive CaMV 35S promoter (*35S::AtCSN4-Flag*). Anti-GFP antibody was used to immunoprecipitate the TCTP-GFP fraction from total proteins extracted from 10 days-old seedlings (S1A Fig), or from mature green seeds harvested from green siliques (S1B Fig).

The presence of CSN4 (46 kDa) was then revealed in the immunoprecipitated fraction. AtCSN4 was found in the *AtTCTP-GFP* enriched fraction from both 10 days-old seedlings and mature green seeds (S1A and S1B Fig, respectively). No trace of AtCSN4 was detected in WT Col-0 used as control and treated in parallel.

Next, we confirmed that endogenous AtCSN4 is able to co-immunoprecipitate with AtTCTP. For this, we performed immunoprecipitation on total proteins extracted from inflorescence of *AtTCTPg-GFP* and *35S::AtTCTP-GFP*. As shown in Fig 1A, CSN4 co-immunoprecipitated with AtTCTP-GFP in both lines (Figs 1A and S1C). The interaction was further confirmed by pulling-down AtCSN4. Using plant lines *35S::AtCSN4-GFP*, overexpressing AtCSN4, and *35S::AtCSN4-GFP/35S::AtTCTP*, overexpressing both proteins, we show that TCTP co-immunoprecipitates with AtCSN4-GFP from both plant lines (Figs 1B and S1D).

Finally, to address if *Drosophila* TCTP also interacts with CSN4, we performed co-immunoprecipitation experiments using plant lines expressing *Drosophila* dTCTP in *tctp* knockout genetic background (line *35S::dTCTP-GFP*). Previously we demonstrated that dTCTP was able to fully complement loss-of-function *tctp* [6]. As shown in Fig 1A, CSN4 co-immunoprecipitated with AtTCTP-GFP and also with dTCTP-GFP (Figs 1A and S1C), thus suggesting conservation of the TCTP/CSN4 interaction between plants and animals.

Next, we investigated the sub-cellular localization of CSN4 compared to TCTP. In agreement with co-immunoprecipitation data, co-expression of AtTCTP-mCherry and

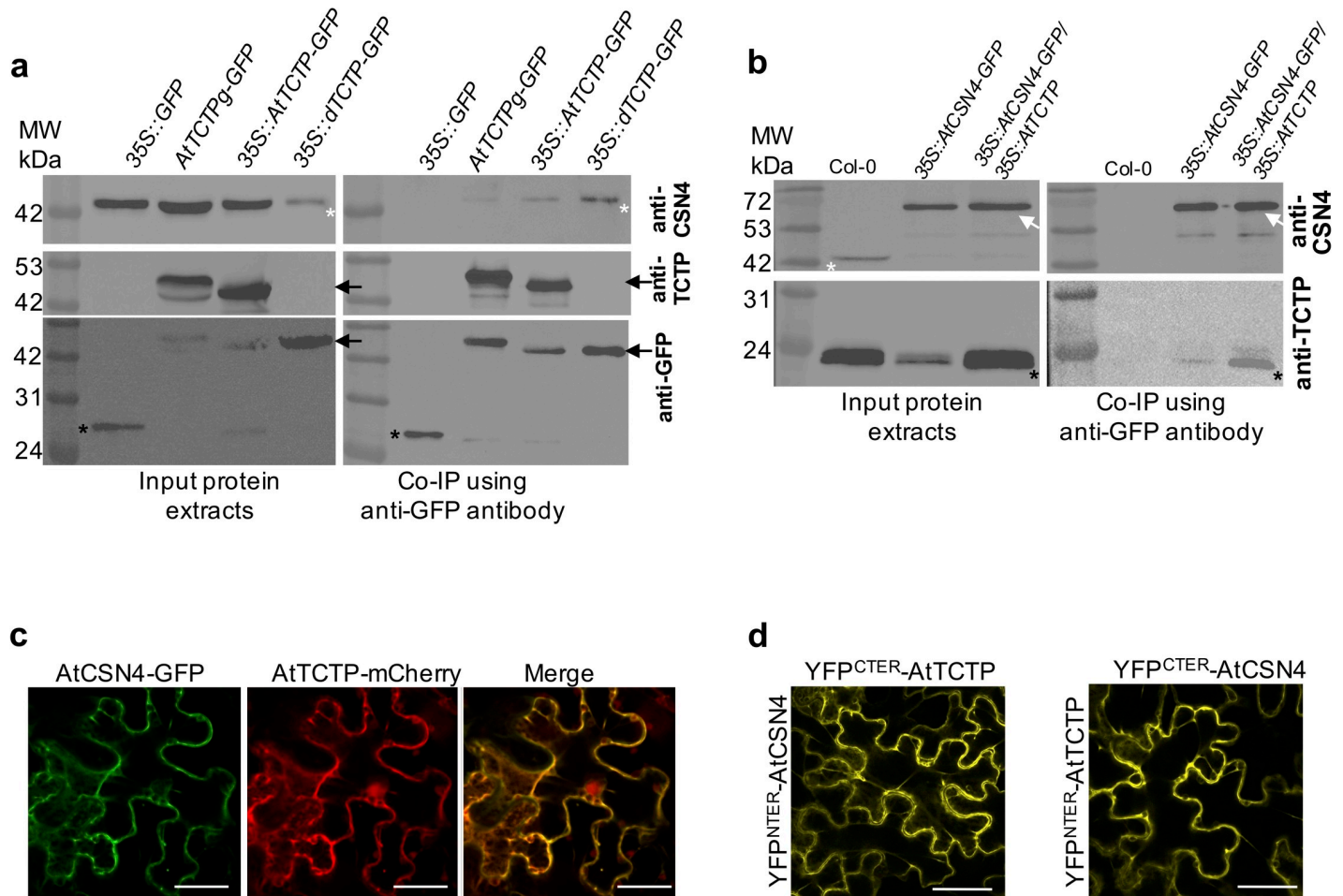


Fig 1. AtTCTP and AtCSN4 interact *in vitro* and *in vivo*. (a) TCTP interacting proteins were co-immunoprecipitated from protein extracts prepared from inflorescences of *35S::GFP*, *AtTCTP_g-GFP*, *35S::AtTCTP-GFP* and *35S::ΔTCTP-GFP/tctp* plants using anti-GFP coupled magnetic beads. Co-immunoprecipitated proteins were detected by Western blotting using anti-CSN4 (upper panel), anti-TCTP (middle panel) or anti-GFP (lower panel) antibodies. White asterisks: CSN4 protein; black arrows: TCTP-GFP protein; black asterisks: free GFP. (b) CSN4 interacting proteins were co-immunoprecipitated from protein extracts prepared from inflorescences of Col-0, *35S::AtCSN4-GFP* and *35S::AtCSN4-GFP/35S::AtTCTP* plants using anti-GFP coupled magnetic beads. Co-immunoprecipitated proteins were detected by Western blotting using anti-CSN4 (upper panel) or anti-TCTP (lower panel) antibodies. White asterisks: CSN4 protein; white arrow: CSN4-GFP protein; black asterisks: TCTP protein. (c) AtCSN4-GFP (green) and AtTCTP-mCherry (red) co-localize in tobacco leaves. Bars: 50 μm. (d) Bi-molecular Fluorescence complementation experiments in tobacco leaves show that AtTCTP and AtCSN4 fused with either C- or N-terminal YFP moieties, interact *in vivo*. Bars: 50 μm. As shown in S2 Fig, no signal was observed in the control BiFC assays in which AtTCTP or AtCSN4 fused with N- or C-terminal YFP moieties was co-infiltrated with an empty plasmid.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007899.g001>

AtCSN4-GFP in tobacco leaf epidermal cells showed that these proteins co-localize *in planta* (Fig 1C). To further investigate AtTCTP-AtCSN4 interaction, we performed Bi-molecular Fluorescence Complementation (BiFC [23]) experiments by protein fusion to split YFP moieties and co-expression in tobacco cells. The data demonstrate that AtTCTP and AtCSN4 interact *in planta* (Fig 1D), confirming the co-immunoprecipitation results. Similar BiFC complementation results were obtained regardless if AtTCTP and AtCSN4 were fused to YFP^{Cter} or YFP^{Nter} (Fig 1D). BiFC experiments also showed that both AtTCTP and AtCSN4 were able to form homodimers (S2 Fig). However, the localization of AtTCTP-AtCSN4 heterodimer was distinct from that of the AtTCTP or AtCSN4 homodimers, thus corroborating TCTP-CSN4 *in vivo* interaction. No signal was observed when one of the vectors was empty

(S2 Fig). Taken together these data demonstrate that AtTCTP and AtCSN4 interact physically *in vivo*.

To understand the biological significance of the AtTCTP-AtCSN4 interaction, we performed genetic interaction analyses using knockdown or overexpressor lines for both proteins. Previously, we showed that while *AtTCTP* knockout leads to embryo lethality, its down-regulation *via* RNAi (*RNAi-AtTCTP* lines) gave viable plants that nevertheless showed developmental defects [6]. Similar to plants mutants for *AtTCTP*, plants knockout for *AtCSN4* showed severe developmental defects during early seed germination leading to seedling death in few days after germination (S3 Fig), thus in agreement with Dohmann *et al.* [22]. To overcome this difficulty, we generated knockdown plants *via* expression of a RNAi directed against *AtCSN4* (line *RNAi-AtCSN4*). Western blot analyses confirmed the downregulation of *AtTCTP* and *AtCSN4* in the corresponding RNAi lines (S4 Fig).

RNAi-AtCSN4 exhibited significant delay in rosette development compared to Col-0, thus a similar phenotype as *RNAi-AtTCTP* plants (Fig 2A–2C). Measurements of growing rosette diameters from 8 days post-germination until bolting, confirmed that these genotypes are impaired in development and that the difference in growth starts to be visible as early as 8 days after germination (Fig 2C). Similar to *RNAi-AtTCTP* plants, the inflorescence stems of *AtCSN4-RNAi* plants were shorter and the plants exhibited a dwarf phenotype (Figs 2B and S5). Additionally, *RNAi-AtCSN4* plants had very short internodes between siliques resulting in a “bushy” plant phenotype (Figs 2B and S5).

Plants overexpressing *AtCSN4* (line 35S::*AtCSN4*) had normal development and adult plants had similar size as WT Col-0 plants (Fig 2). Plants overexpressing *AtTCTP* (line 35S::*AtTCTP*) exhibited accelerated growth and reached adult size earlier than the wild-type (Fig 2), in agreement with previously reported data [6]. The double overexpressor line (35S::*AtCSN4/35S::AtTCTP*) exhibited no additive effect and behaved as the single overexpressor line 35S::*AtTCTP* (Fig 2).

Crosses between *RNAi-AtTCTP* and *AtCSN4* overexpressor lines on the one hand (line *RNAi-AtTCTP/35S::AtCSN4*) and between *RNAi-AtCSN4* and *AtTCTP* overexpressor lines on the other hand (35S::*AtTCTP/RNAi-AtCSN4*), yielded plants with delayed growth compared to the WT, thus a phenotype similar to the single *RNAi-AtTCTP* and *RNAi-AtCSN4* knock-down plants, respectively (Fig 2A–2C). We should note that 35S::*AtTCTP/RNAi-AtCSN4* plants grew a little slower than *RNAi-AtCSN4*, and *RNAi-AtTCTP/35S::AtCSN4* plants grew a little faster than *RNAi-AtTCTP* plants. However, adult plants of the double transformant lines were indistinguishable from simple RNAi plants, demonstrating similar dwarf phenotype (Fig 2B). These data show that overexpression of *AtTCTP* or *AtCSN4* could not compensate the developmental anomalies induced by knockdown of *AtCSN4* or *AtTCTP*, respectively, and suggest that TCTP requires functional CSN4 to control growth. Despite several attempts, by plant genetic crossing or by genetic transformation, we were unable to generate the *RNAi-AtTCTP/RNAi-AtCSN4* double knockdown line. It is likely that double TCTP/CSN4 knock-down leads to plant lethality.

AtTCTP and AtCSN4 regulate cell cycle progression and mitotic growth

To explore the cause of the growth defects observed in *RNAi-AtTCTP* and *RNAi-AtCSN4* plants, we analyzed cell division and cell expansion profiles. Previously, we demonstrated that downregulation of *AtTCTP* and the resulting decrease in plant organs size are correlated with reduced cell proliferation activity [6]. To explore if *AtCSN4* down-regulation is also associated with defects in cell proliferation, we performed kinematic analysis of leaf growth on plantlets grown *in vitro* [6,24]. Previously, kinematic of leaf growth analyses demonstrated that

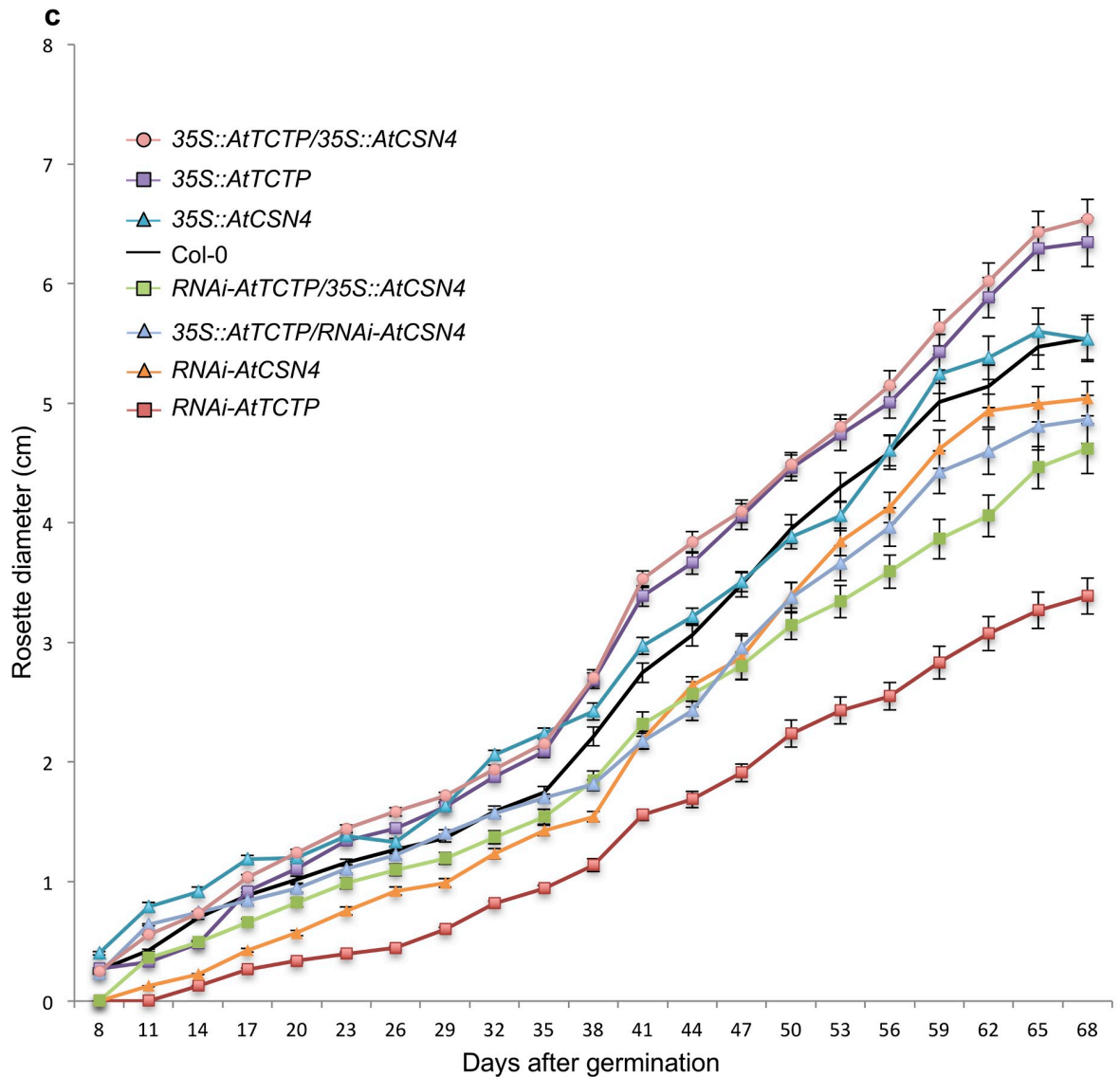
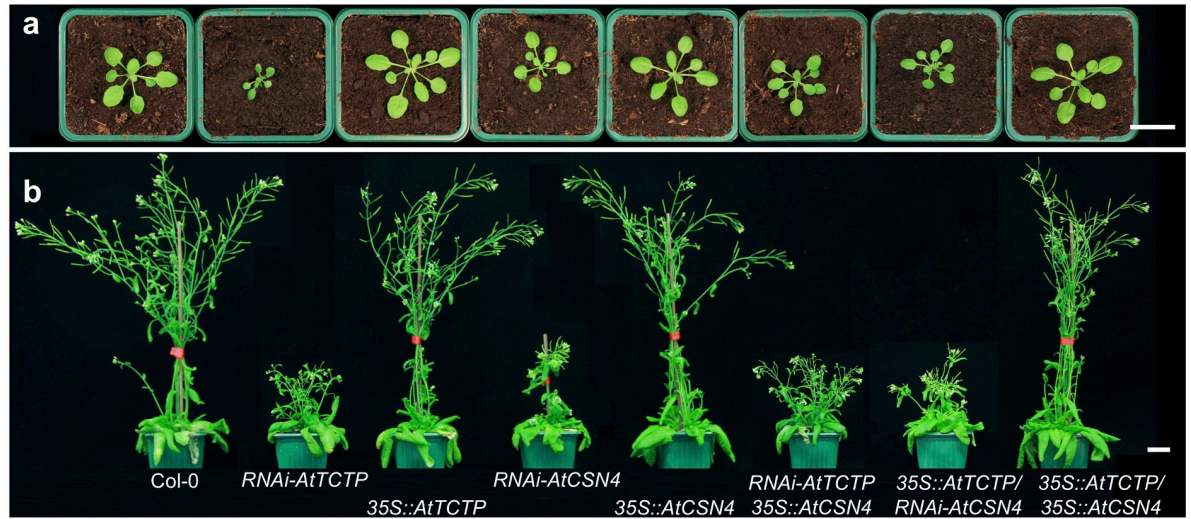


Fig 2. AtTCTP and AtCSN4 control plant development. (a-b) Plants knockdown for *CSN4* (*RNAi-AtCSN4*) exhibit a delay in development similar to that of *RNAi-AtTCTP* plants. *RNAi-AtCSN4* or *RNAi-AtTCTP* plants overexpressing *AtTCTP* or *AtCSN4*, respectively, show similar phenotype as the simple RNAi lines. Pictures of plants were taken 59 days (a) and 92 days (b) after sowing. Bars: 2 cm. (c) Rosette diameter was measured from 8 days until 68 days after germination. The error bars represent standard errors. n = 18.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007899.g002>

downregulation of *AtTCTP* results in smaller leaves compared to the WT, due to slower cell proliferation [6]. Similarly, in line *RNAi-AtCSN4* a significant reduction in leaf area was observed compared to the WT Col-0, starting from seven days after germination and the reduction was maintained during the whole observation period (Fig 3A). The reduction in leaf size correlated with about 20% decrease in cell number starting from day seven after germination and was maintained all along the observation period (Fig 3C), while no differences in cell size were observed (Fig 3B), thus again similar to *RNAi-AtTCTP* [6]. These data demonstrate that, similar to *AtTCTP*, the leaf growth defects associated with *AtCSN4* knockdown (*RNAi-AtCSN4*) correlated with the decrease in cell number, while cell size remained unchanged.

Using the slope of the log 2-transformed number of cell per leaf [25], we calculated the cell division rate in *RNAi-AtCSN4* plants. We observed that the cell division rate in *RNAi-AtCSN4* was slower than in WT Col-0 plants (Fig 3D) in the early stage of leaf development where the cell division activity is higher [26]. Previously, we reported a similar tendency for *RNAi-AtTCTP* lines [6]. Determination of the number of newly produced cells per hour during leaf development showed that the lower cell division rate in *RNAi-AtCSN4* line resulted in less newly produced cells at the beginning of leaf development (S6 Fig). Interestingly, the cell division rate was maintained at a higher level for longer time in the *RNAi-AtCSN4*, which indicates that a compensation mechanism likely exists. However, this was not enough to compensate the delay in leaf development, and therefore *RNAi-AtCSN4* leaves stayed smaller than WT (Fig 3A). Later in leaf development, cell division in both plants was reduced to a very low level (Fig 3D).

We investigated root growth in both *RNAi-AtTCTP* and *RNAi-AtCSN4* lines. Similar to leaf growth, we also observed reduced root growth in developing seedlings of both lines (S7A Fig). Both *RNAi-AtTCTP* and *RNAi-AtCSN4* roots were shorter compared to WT starting as early as 3 days after germination (S7A Fig).

Similar to leaves and roots, petals of *RNAi-AtCSN4* were also smaller in size compared to WT Col-0 (S7B Fig). The petal size reduction was associated with reduced cell number, thus a phenotype similar to that observed in *RNAi-AtTCTP* (S7B Fig) [6]. These data corroborate the results obtained in leaves and demonstrate that, like for *AtTCTP*, downregulation of *AtCSN4* leads to reduced organ size as a result of altered cell proliferation. However, conversely to leaves, we observed that in petals of both *RNAi-AtCSN4* and *RNAi-AtTCTP* the defects in cell proliferation were associated with an increase in cell size (S7B Fig), suggesting a compensation mechanism in the petals. *AtTCTP* overexpression (line 35S::*AtTCTP*) resulted in petals with increased size, but cell size was not affected, thus in agreement with Brioude *et al.* [6]. *AtCSN4* overexpression (line 35S::*AtCSN4*) did not affect petal development, (S7B Fig), thus corroborating the observed normal development of plants overexpressing *AtCSN4* (Fig 2). Similar to observation during rosette development, overexpression of *AtTCTP* or *AtCSN4* in *RNAi-AtCSN4* and *RNAi-AtTCTP*, respectively, could not compensate for the petal developmental defects of the RNAi lines (S7B Fig). Line overexpressing both *AtTCTP* and *AtCSN4* showed similar phenotype to 35S::*AtTCTP* (S7B Fig).

These data together show that the downregulation of *AtCSN4* leads to slower cell proliferation associated with reduced organs size, thus a phenotype similar to that observed in *AtTCTP* mutant plants.

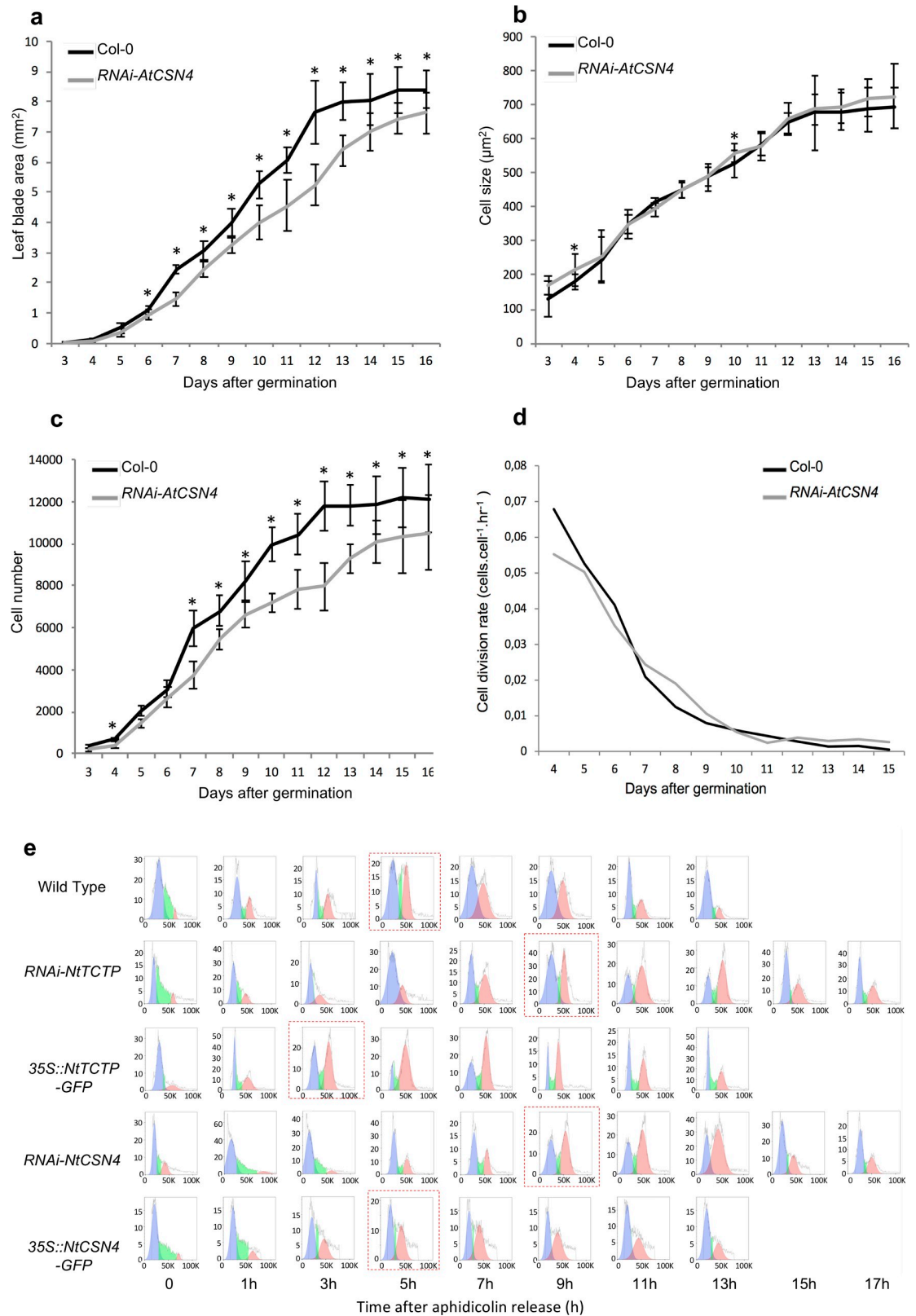


Fig 3. TCTP and CSN4 control cell proliferation and cell cycle progression. Leaf blade area (a) and cell number per leaf (c) are reduced in *RNAi-AtCSN4* plants compared to Col-0 WT due to a decrease in cell division rate (d). Cell size in developing leaves

(b) of *RNAi-AtCSN4* was the same as in *Col-0* WT. n = 10; *: p-value <0,05. (e) Cell cycle progression at G1/S transition is slower in *RNAi-NtCSN4* and *RNAi-NtTCTP* aphidicolin synchronized BY-2 cells compared to WT. The blue plots show cell population in G1 (2N), green plots are cells in S phase, and the red plots are cells in G2 (4N) phase.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007899.g003>

To further identify the origin of this reduced cell proliferation activity, we investigated cell cycle progression in tobacco BY-2 cells down-regulating or overexpressing *NtCSN4* (line *RNAi-NtCSN4* and *35S::NtCSN4*, respectively) or *NtTCTP* (*RNAi-NtTCTP*, *35S::NtTCTP*, respectively). Both, CSN4 and TCTP proteins accumulated at low levels in *RNAi* BY-2 cells and over-accumulated in overexpressor BY-2 cells, as demonstrated by Western blot analysis (S8 Fig).

Wild-type BY-2 cells and BY-2 cells under- or over-accumulating TCTP (*RNAi-NtTCTP*, *35S::NtTCTP*) or CSN4 (*RNAi-NtCSN4*, *35S::NtCSN4*) were synchronized using aphidicolin. Cell cycle progression was followed every 2 hours after aphidicolin release (AAR) using flow cytometry (Fig 3E). Normal progression of cell cycle over time was observed in wild-type BY-2 cells with rapid reduction of G1 cells (2N) and a concomitant increase of G2 cells (4N) over the first 5 hours AAR, followed by a decrease of G2 cells with mitosis ending at about 13h AAR. In agreement with previously reported data [6], the G1/S transition in *RNAi-NtTCTP* BY-2 cells occurred with 4 hours delay compared to the wild-type and this delay was maintained all along the cell cycle (Fig 3E). Similarly, *RNAi-NtCSN4* BY-2 cells also showed a slower cell cycle progression with about the same 4 hours delay at the G1/S transition compared to wild-type BY-2 cells (Fig 3E). Like for *RNAi-NtTCTP*, the 4 hours delay of cell cycle progression in *RNAi-NtCSN4* was maintained until the end of the cell cycle, thus corroborating the kinematic of growth data obtained in *Arabidopsis* leaves (Fig 3).

These data together demonstrate that the downregulation of either *NtTCTP* or *NtCSN4* leads to comparable delays in cell cycle progression and that such delay occurs at G1 and/or early S phase.

Conversely to BY-2 cells knockdown for *NtTCTP*, BY-2 cells overexpressing *NtTCTP* (*35S::NtTCTP*) entered G1/S transition about 2 hours earlier than wild-type BY-2 (Fig 3E). However, these cells completed their first cell cycle the same time as WT BY-2 cells, at 13h AAR. This indicates that *35S::NtTCTP* BY-2 cells has longer S or M2 phase to compensate faster G1. In agreement with the absence of cell proliferation and developmental defects in *35S::AtCSN4*

Table 1. TCTP and CSN4 does not control S-phase length during cell cycle progression.

		Cell Cycle Length (h)	Confidence Interval 95%	S-phase length (h)	Confidence Interval 95%
1	<i>Col-0</i>	15	[13,5–16]	1,5	[0,6–2,4]
	<i>RNAi-AtTCTP</i>	18**	[16,8–20]	1,5	[0,5–2,3]
	<i>RNAi-AtCSN4</i>	19***	[16,5–23,2]	1,9	[0,4–3,9]
	<i>35S::AtTCTP</i>	15	[13,5–15,8]	1,7	[0,9–2,5]
	<i>35S::AtCSN4</i>	15	[13,5–15,8]	1,5	[0,53–2,2]
2	<i>Col-0</i>	15	[13,6–15,9]	2,8	[0,9–3,1]
	<i>RNAi-AtTCTP</i>	19***	[16,4–20,3]	2,7	[0,8–3,2]
	<i>RNAi-AtCSN4</i>	19***	[16,5–23,1]	2,8	[1–3,7]
	<i>35S::AtTCTP</i>	15	[13,5–16]	2,8	[0,9–3,8]
	<i>35S::AtCSN4</i>	15	[12,8–16,1]	2,7	[0,8–3,7]

EdU incorporation in *Arabidopsis* root tips demonstrated in both *RNAi-AtTCTP* and *RNAi-AtCSN4* lines cell cycle duration is about 4h longer compared to *Col-0* WT. Note that the length of S-phase was not affected in any of these lines. Data show results of two independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences (** p<0.01; *** p<0.001).

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007899.t001>

Arabidopsis line (Figs 2 and S7B), no significant difference in cell cycle progression was observed in 35S::NtCSN4 BY-2 cells, compared to the wild-type (Fig 3E).

To further explore at which step of the cell cycle TCTP and CSN4 precisely act and to confirm BY-2 results directly *in planta*, we performed cumulative EdU labeling in the root tips of the different *Arabidopsis* lines to estimate S-phase length and total cell cycle length. Results show that, similar to observations in BY-2 cells, total cell cycle length in root tips was increased by 4 hours, both in *RNAi-AtTCTP* and *RNAi-AtCSN4* lines, while S-phase length remained unchanged (Table 1). Likewise, no substantial changes were observed in cell cycle length in 35S::AtTCTP and 35S::AtCSN4 lines (Table 1), again consistent with the results obtained in BY-2 cells (Fig 3C). Interestingly, S-phases lengths again remained unchanged, suggesting that the observed cell cycle slow-down after the rapid progression through G1/S phase seen in 35S::NtTCTP BY2 cells, did not affect S-phase but probably G2/M phase.

All these data together with the TCTP-CSN4 co-immunoprecipitation and the *in vivo* interactions studies suggest that TCTP and CSN4 interact physically to control G1/S transition during cell cycle progression.

TCTP/CSN4 interaction impact CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio in plants and animals

CSN4 is one of the eight subunits of the CSN that regulates CRL activity *via* the post-translational RUB/NEDD8 modification of its CUL subunit. To investigate the biological significance of AtTCTP/AtCSN4 interaction, we evaluated the neddylation status of the *Arabidopsis* CULIN1 (CUL1), a major target of CSN. Using an antibody against CUL1, we were able to distinguish free CUL1 and the neddylated CUL1 (CUL1^{NEDD8}) forms (Figs 4A–4C and S9A–S9C).

By growing plants on medium with increasing concentrations of MLN4924, a drug that inhibits CUL neddylation [27], we confirmed that the observed protein bands indeed correspond to CUL1 and CUL1^{NEDD8} (Figs 4C and S9C). In WT plants, we observed about 8–10 times more CUL1^{NEDD8} than free CUL1 while at 50μM MLN4924 we observed that almost all CUL1 were non-neddylated (Figs 4C and S9C). Moreover, we demonstrate that WT inflorescence contains more neddylated CUL1, while in WT seedlings non-neddylated CUL1 is more present (Figs 4B and S9B). Inflorescence of a weak mutant of *csn4* contains almost exclusively neddylated CUL1 (Fig 4B) in accordance with previous results [28].

Next, CUL neddylation status was analyzed in two independent *tctp* knockout lines (*tctp-1* and *tctp-2*), in 35S::AtTCTP, *RNAi-AtCSN4* and 35S::AtCSN4 (Figs 4A and S9A). For both *tctp-1* and *tctp-2*, we observed a drastic decrease (Fig 4A) to complete absence (S9A Fig) of the CUL^{NEDD8}, with a concomitant increase of free CUL1, leading to a drop in CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio in knockout lines (Figs 4A and S9A). Overexpression of AtTCTP led to a slight increase in CUL1^{NEDD8} (Fig 4A) in agreement with the fact that although 35S::AtTCTP plants grow faster, fully adult plants showed a phenotype similar to the wild-type [6] (Fig 2). These data suggest a role for AtTCTP in the regulation of CUL1 neddylation status, which in turn influences the activity of CRL complexes. Only small changes of CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio were observed in *RNAi-AtCSN4* plants (Fig 4A). This is likely due to the fact that flowers already accumulated high level of neddylated CUL1 (Fig 4B) and that in *RNAi-AtCSN4* lines we do not have full obliteration of AtCSN4 (S4A and S4B Fig).

In 35S::AtCSN4, no decrease of CUL1^{NEDD8} was observed and the CUL1 neddylation status was similar to wild-type (Fig 4A). This is in agreement with previous studies showing that overexpression of only one subunit of the COP9 complex does not modify its deneddylation activity [29]. The data also corroborate the fact that CSN4 overexpression does not affect cell cycle progression as well as organ and plant development (Figs 2 and 3E and S7).

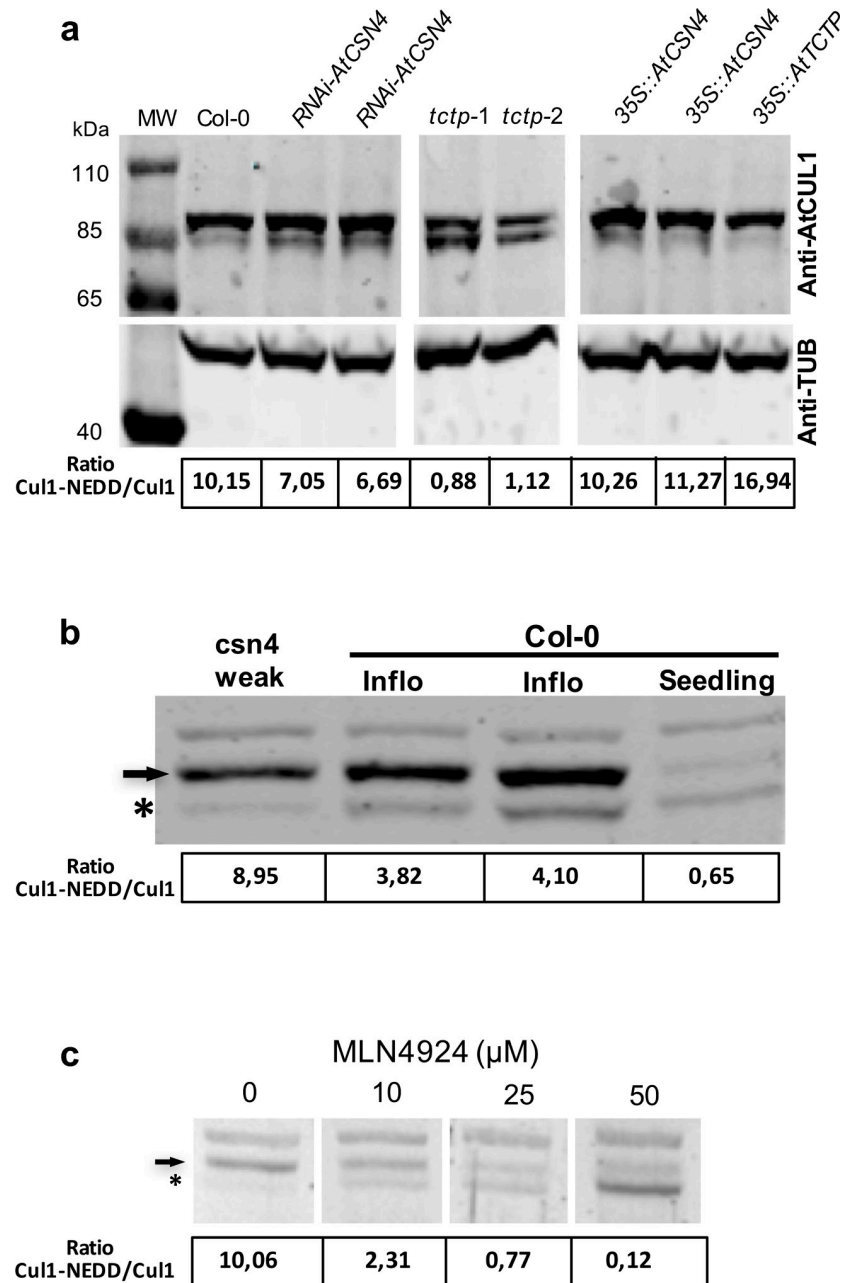


Fig 4. The CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio is modified in Arabidopsis *tctp* mutants. (a) CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio decreases in a similar manner in the two independent *tctp* knockout lines, *tctp-1* and *tctp-2*, while in plants overexpressing AtTCTP (35S::AtTCTP) increased CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio was observed. (b) CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio in inflorescence and seedlings of Col-0 WT plants and in inflorescence of weak mutant of *csn4*. (c) Treatment of WT Col-0 with MLN4924, a drug that inhibits neddylation, results in an increase of the free CUL1 form with concomitant decrease of the CUL1^{NEDD8} form, confirming that the observed bands correspond to CUL1 at different neddylation status. CUL1 protein was detected by Western blot using anti-CUL1 antibody. Quantifications of CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio are shown under each lane. Anti-TUB is shown as control. Star: free CUL1; Arrow: CUL1^{NEDD8} form.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007899.g004>

We demonstrated that CUL1 neddylation is affected in *tctp* mutants, suggesting that CRLs function in general might be affected. The best characterized SCF/CRL in *Arabidopsis* is SCF^{TIR1} implicated in auxin perception and signaling [30,31]. Therefore, we investigated if

auxin responses are affected in *tctp* mutant. Auxin homeostasis reporter *DR5rev::GFP* and auxin efflux reporter *PIN1::PIN1-GFP* [32] were introgressed into *tctp* knockout plants. Similar to WT embryos, in *tctp* embryos *PIN1::PIN1-GFP* accumulated in apical cell lineage at globular and transition stage, then at heart stage the pattern switches to a PIN1 localization in the future cotyledons and across the provasculature (S10A Fig). In agreement with these data, in *tctp* mutant embryos the accumulation pattern of auxin homeostasis reporter *DR5rev::GFP* was similar to that of WT embryos. Moreover, the accumulation pattern of auxin homeostasis reporter *DR5rev::GFP* in response to exogenous treatment with synthetic auxin 2,4D was also similar in WT and *tctp* embryos (S10B Fig). These data show that the modification in CUL1 neddylation associated with *AtTCTP* mutation do not affect the auxin pathway nor the signaling via SCF^{TIR1}, indicating that the role of TCTP-CSN4 interaction in regulating CUL neddylation and CRL activity is specific to cell cycle.

Previously, we demonstrated that the role of TCTP in regulating cell proliferation was conserved between plants and animals. Furthermore, we demonstrated that AtCSN4 is able to interact with dTCTP (Figs 1A and S1C). Therefore, we investigated if the TCTP-CSN4 pathway has similar roles in *Drosophila* development as observed in plants. Using the UAS/GAL4 system [33], first, we generated flies in which the expression of *dTCTP* was silenced *via* the expression of a *dTCTP* RNAi under the control of the eye-specific promoter *eyless* (line *ey>dTCTPi*). *eyless* promoter drives gene expression in the eye imaginal disk anterior to the furrow at the time when eye cell progenitors are actively dividing [34]. Interference with *dTCTP* using the *eyless* promoter led to a significant size reduction of the eye, in agreement with Brioudes *et al* [6] (Fig 5A).

To study the role of CSN4 in the *Drosophila* eye, we used the P-element recessive lethal lines *CSN4*^{k08018} from the UCLA URFCG collection. Previous analysis of *CSN4*^{k08018} reported a rough eye associated with loss of photoreceptor and patterning defects [35,36]. To further analyze the loss of dCSN4 function, we used the mosaic Tomato/GFP-FLP/FRT method in combination with the caspase inhibitor p35 [36,37]. In this system, the absence of red fluorescence (tdTomato) marks *dCSN4*^{-/-} mutant photoreceptors in a background where all photoreceptors express GFP in the adult *Drosophila* eye. This method allowed the observation of mosaic eyes, in which regions where the *dCSN4* gene have been inactivated can be detected by the absence of the tomato reporter (Fig 5B, middle panel). *dCSN4* inactivation led to a strong loss of photoreceptors as seen by the lack or diffuse GFP staining in *dCSN4*^{-/-} mutant clones of *Drosophila* adult retina (Fig 5B, left panel). Importantly, no effector caspase (*dcp-1*, death caspase-1) staining was detected in *dCSN4*^{-/-} mutant clones in third instar eye discs (Fig 5C). Moreover the loss of photoreceptor in *dCSN4*^{-/-} mutant clones was not rescued by the expression of the caspase inhibitor p35 (Fig 5B, lower panels), a protein that prevents apoptosis [38]. This indicates that the loss of photoreceptors in *dCSN4*^{-/-} mutant clones is not due to increased apoptosis but rather impaired proliferation as in *dTCTP* mutants.

Next, we examined the expression of the neuronal marker ELAV, which is progressively acquired in differentiating photoreceptor posterior to the morphogenetic furrow in third instar eye discs [34]. We observed a delay and a reduction of ELAV staining in *dCSN4*^{-/-} mutant clones compared to wild type (Fig 5D and 5E). The delay in the acquisition of ELAV marker in *dCSN4*^{-/-} mutant clones could be the consequence of a delay in the proliferation of dividing photoreceptor progenitors as previously described in *dachsund* mutant that allows a tight coordination of proliferation and differentiation [39].

To explore whether the effect of TCTP on CUL1 neddylation is also conserved between plants and animals, we investigated CUL1 neddylation in *Drosophila* knockdown for *dTCTP* under the control of *TUBULIN* constitutive promoter (line *tub>dTCTPi*). Interference with *dTCTP* under the *TUBULIN* constitutive promoter (*tub>dTCTPi*) led to severe larval

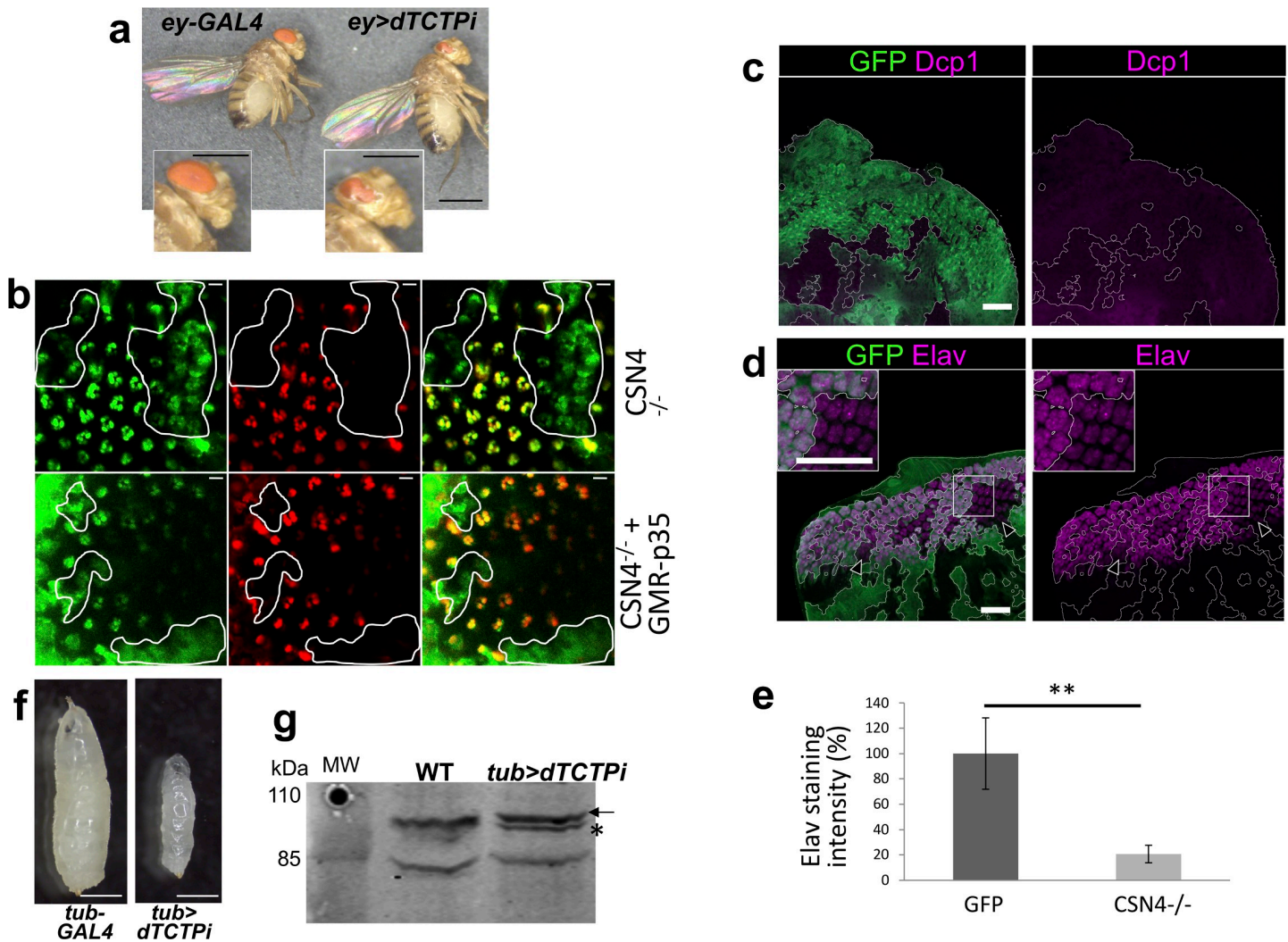


Fig 5. The role of TCTP and CSN4 in the control of CULLIN neddylation and cell proliferation is conserved in *Drosophila*. (a) Downregulation of *dTCTP* specifically in the eyes (*ey>dTCTPi*) of *Drosophila* leads to small eye phenotype. Close up images of wild type adult eye and of eye expressing *ey>dTCTPi* are shown (Bars = 500 μ m). (b) *Drosophila* adult retina visualized by immersion microscopy with the Tomato/GFP-FLP/FRT method. CSN4 mutant clones are visualized by the expression of Rh1-GFP and by the absence of tomato (red) and are delineated by a white line. Photoreceptors are visualized by Rh1-GFP (Left panels), Rh1-tdTomato (Middle panels) or in the merge (Right panels). Photoreceptor absence is indicated by loss or diffuse GFP fluorescence in CSN4^{k08018} mutant clones (CSN4^{-/-}, upper panels). CSN4^{k08018} mutant clones in which p35 is overexpressed (CSN4^{-/-} + GMIR-p35, lower panels) still show loss or diffuse GFP staining in mutant clone. Bars = 5 μ m. (c-e) CSN4 mutant photoreceptors show a delay in the acquisition of neuronal identity but not in caspase staining. Third instar eye imaginal discs carrying *dCSN4*^{-/-} mutant clones visualized by the lack of GFP (green) Bars = 25 μ m. (c) eye imaginal discs stained with anti-Dcp-1 (purple) show no increase of staining in *dCSN4*^{-/-} mutant clones. (d) Eye imaginal discs stained with anti-Elav show a delay of expression (arrowheads) at the morphogenetic furrow and a reduced level in *dCSN4*^{-/-} mutant clones. (e) Quantification of Elav staining in (d) shows significant reduction in *dCSN4*^{-/-} mutant clones compared to wild type (GFP) (n = 5; p < 0,01). (f) Downregulation of *dTCTP* in all tissues of *Drosophila* larvae (*tub>dTCTPi*) leads to developmental arrest with reduced size and subsequent larval lethality at the first instar larvae. 7 days after egg-laying, control larvae (*tub-GAL4*) are at third instar (left) while *tub>dTCTPi* larvae stay at first instar (right). Bars = 500 μ m. (g) Impaired larval development is associated with a decrease of the CUL1^{NEDD8} abundance in the *tub>dTCTPi* compared to *tub-GAL4*. Star: free CUL1; Arrow: CUL1^{NEDD8} form.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007899.g005>

developmental defects and to growth arrest after the first larvae instar (Fig 5F). We evaluated the CUL1 neddylation status in *tub>dTCTPi* larvae knockdown for *dTCTP* exhibiting severe developmental delay, as compared to the wild-type flies and we observed a drastic decrease of the CUL1^{NEDD8} with a concomitant increase of free CUL1 (Fig 5G). These data strongly suggest that, like in *Arabidopsis*, knockdown of *dTCTP* or *dCSN4* led to impaired cell proliferation. Moreover, knockdown of *dTCTP* in *Drosophila* also affects CUL1 neddylation status in a

similar manner than in *Arabidopsis*, suggesting a conserved role of TCTP in the control of CUL neddylation between plants and animals. Importantly, the fact that AtCSN4 interacts with dTCTP (Fig 1C) suggests that, similar to plant AtTCTP, *Drosophila* dTCTP controls CUL1 neddylation likely via its interaction with CSN4.

Discussion

In plants and in animals, TCTP is known to be implicated in many cellular processes, but its mode of action is largely unknown. Previously, we demonstrated that in *Arabidopsis* and in *Drosophila*, TCTP has a conserved role in the control of organ growth by regulating cell proliferation. We showed that TCTP regulates cell cycle progression more specifically at the G1/S transition [6]. To gain insight into the pathway by which TCTP fulfills this function, we identified its interactors in *Arabidopsis*. Here, we establish a functional relationship between TCTP and CSN4, one of the eight subunits of the COP9 Signalosome, a complex conserved among eukaryotes [12].

Like *tctp* null mutants, *csn4* mutants are not viable [22] (and this study). We therefore analyzed partial loss-of-function lines using RNAi. Both *RNAi-AtTCTP* and *RNAi-AtCSN4 Arabidopsis* lines display dwarf phenotype and reduced organ size due to decreased cell proliferation, and more specifically to a delay in the G1/S transition as evidenced by tobacco BY-2 cell synchronization and EdU incorporation assays in *Arabidopsis* root meristematic cells.

The ability of AtTCTP and AtCSN4 to interact and the similarity of the phenotypes of RNAi lines suggest that they could function in the same pathway, which was corroborated by our genetic analyses. No additive phenotypic effect was observed in the double overexpressor and the down-regulation of AtCSN4 was epistatic on AtTCTP overexpression, and reciprocally, AtCSN4 overexpression did not fully rescue the developmental defects of *RNAi-AtTCTP* plants. However, we observed that although the *RNAi-AtTCTP* plants that overexpress *AtCSN4* exhibited delayed development compared to the wild-type, they grew faster than *RNAi-AtTCTP* plants. This could be due to the fact that *CSN4* is likely involved in other biological process required for plant development, separately from *AtTCTP* [40]. We were unable to generate *RNAi-AtTCTP/RNAi-AtCSN4* double knockdown line, likely because these plants are not viable. This could be due to the fact that both simple RNAi lines are only partially loss of function, and that simultaneous down-regulation of AtTCTP and AtCSN4 leads to defects comparable to what is observed in *tctp* or *csn4* knockout lines. However, we cannot rule out the possibility that AtTCTP and AtCSN4 could also be separately involved in several other biological processes required for plant development [3,4,6,40]. This is supported by the fact that *AtTCTP* and *AtCSN4* proteins are not always co-localized in the cell (Fig 1C). Thus, TCTP/CSN4 interaction is most likely required at a defined time points during cell proliferation, but both proteins have additional functions independently of their interaction.

Using synchronized BY-2 cells and EdU incorporation assays, we determined that both *RNAi-AtTCTP* and *RNAi-AtCSN4* present similar delays at the G1/S transition, reinforcing the idea that the two proteins act in the same pathway. On the other hand, adding more AtTCTP leads to accelerated cell cycle progression. The fact that no effect on cell cycle progression was observed in plants over-accumulating AtCSN4, suggests that AtTCTP is likely the limiting factor to control cell cycle progression in the AtTCTP-AtCSN4 pathway.

CSN4 is part of the COP9 complex known to control CUL *via* neddylation status of their CULLINS (CUL) subunits [17]. We therefore asked whether TCTP and CSN4 might control CUL neddylation status. Indeed, we observed that both *AtTCTP* and *dTCTP* misexpression strongly impacts CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio supporting an elegant hypothesis relative to how TCTP controls G1/S transition. In fact, it is conceivable that *via* its interaction TCTP could

sequester CSN4, preventing its association with the COP9 complex specifically at the G1/S transition. It is well established that the lack of one of the eight COP9 sub-units is sufficient to suppress the deneddylation activity [19,20,30,41]. Moreover, in *Drosophila* it was previously reported that during development, CSN4 functions to maintain self-renewal of stem cells, and the switch from self-renewal to differentiation requires the sequestration of CSN4 from the CSN by the protein Bam [42]. Another subunit, CSN5 was also demonstrated to be sequestered by the small protein Rig-G, in order to negatively regulate SCF-E3 ligase activity in mammalian cells [43]. We can thus imagine that a similar scenario exists between TCTP and CSN4 to drive cell cycle through the G1/S transition and maintain cell proliferation. This is the first time that a sequestration mechanism to regulate CSN activity is described in plants.

This model is also consistent with the phenotypic defects triggered by TCTP deficiency (Fig 6). Franciosini *et al.* [44] suggested that during embryo maturation COP9 became deactivated, and subsequently reactivated at germination. It is possible that the role of TCTP during embryogenesis is to sequester CSN4 and prevent assembly and activity of COP9 complex during the G1/S transition. Moreover, it was demonstrated that CUL1 neddylation is increased during normal embryo development, thus the reduced neddylation in *tctp* embryos could explain their delayed development and death [6,44].

To our surprise, although *AtCSN4* down-regulation induced severe developmental defects, we were not able to detect strong modification in CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio in *RNAi-AtCSN4* lines. This is probably due to the fact that CUL1^{NEDD8} level is already too high in the inflorescence to see a small increase due to reduced level of CSN4 accumulation and also to additional functions of CSN4 [16,18,40] independently of its interaction with TCTP. Also, because the CUL1^{NEDD8}/CUL1 homeostasis is known to be highly dynamical process that is strictly regulated during plant development [44], it is possible that *AtCSN4* down-regulation in our RNAi lines is not strong enough to have measurable CUL1^{NEDD8} ratio changes at the studied developmental stages. However, we assumed that the developmental phenotypes observed in this line were due to compromised COP9 complex function. Indeed, previous work on dominant negative, weak alleles or RNAi lines of different CSN subunits demonstrated that the developmental defects, similar to those observed in our *RNAi-AtCSN4* line, were due to disturbance of CSN activity [28,31,41,44].

TCTP down-regulation leads to a decrease of the CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio. Since CSN4 is involved in the deneddylation of CULs, its down-regulation would be expected to increase this ratio, as described in *csn4* mutant [22]. *TCTP* and CSN4 thus appear to act antagonistically on CULs neddylation, and one could therefore expect *RNAi-AtCSN4* and *RNAi-AtTCTP* lines to display opposite phenotypic defects instead of the similarities we report here. However, the effect of neddylation on CRLs activity is extremely complex: *csn* mutants that produce more neddylated CUL are expected to increase CRL activity resulting in positive effect on development. However, all *csn* mutants are delayed in their development. On the other hand, treatment of plants with MLN924, a drug that inhibits neddylation resulting in the accumulation of deneddylated CUL1, also leads to plant lethality [27], thus a similar phenotype as when *TCTP* is mutated. It is now well established that in addition to the CUL^{NEDD8}/CUL ratio, the temporal kinetics of CUL and NEDD8 association/dissociation controls CRL activity [45–48]. Indeed, to be fully active, CRLs need to undergo a cycle of neddylation and de-neddylation [14,49] and inactivation of factors with opposite roles on this cycle can thus result in the same cellular defects. On the other hand, CRL acts both on positive and negative cell cycle regulators and the timing of the degradation of these regulators has to be tightly coordinated [16]. Thus, opposite perturbation of CRL activity by *TCTP* or CSN4 downregulation can lead to similar phenotypes.

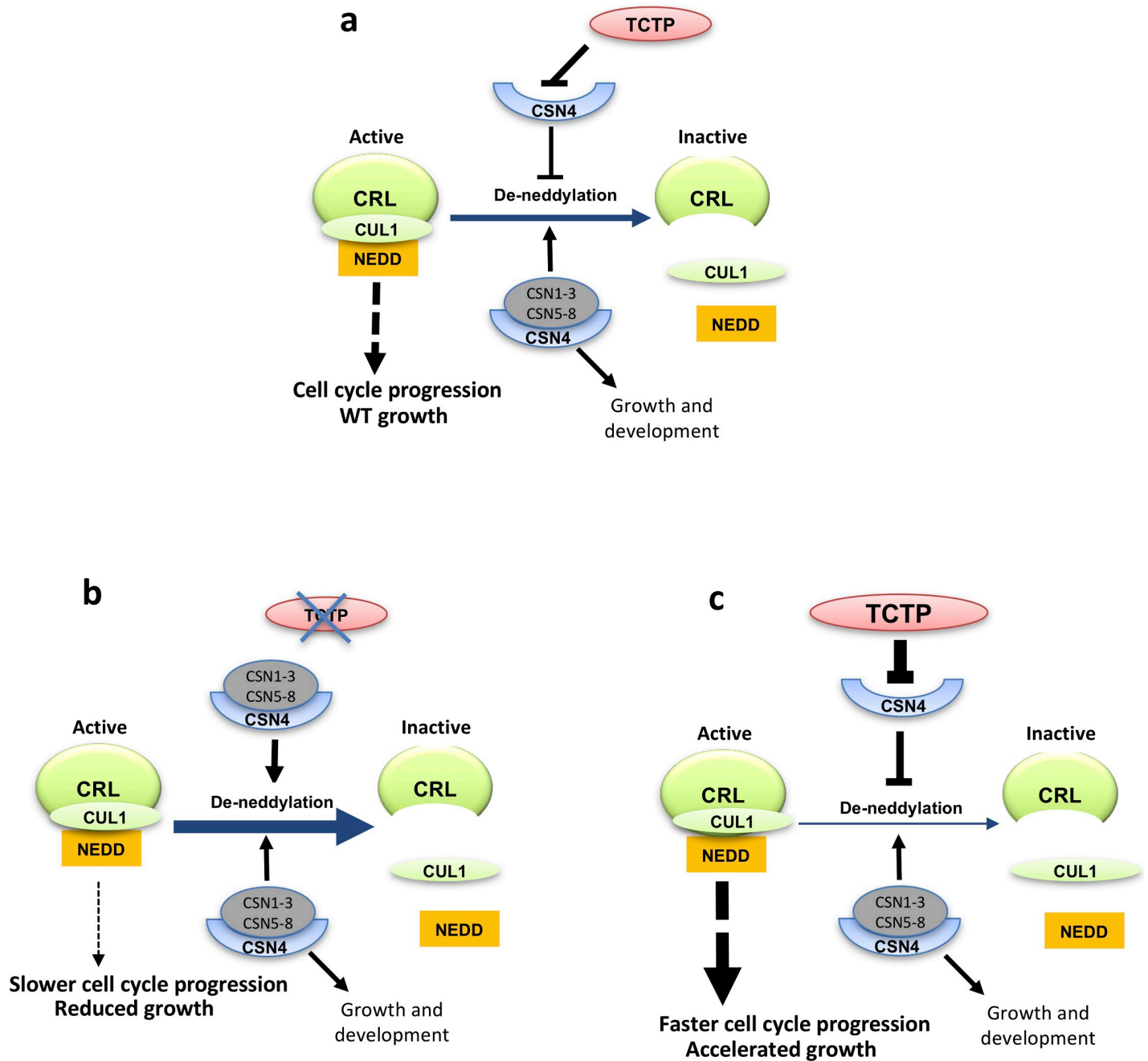


Fig 6. Model showing the interaction of TCTP and CSN4 and its impact on CUL neddylation and CRL complex and growth. (a) Wild type situation. (b) Mutation of TCTP leads to enhanced deneddylation of CUL and inactivation of CRL, resulting in slower cell cycle progression and reduced growth. (c) The inverse is observed when TCTP is overexpressed. Other pathways involving CUL neddylation *via* CSN are not shown. CSN1-3 and CSN5-8: subunits of the Cop9 complex forming the active COP9 complex when associated with CSN4.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007899.g006>

Together, our results provide evidence for the role of TCTP and CSN4 in the control of cell cycle regulation *via* the modification of CUL1 neddylation status that affects CRL activity (summarized in Fig 6). However, the nature of the CRLs and their targets that account for this role on cell cycle regulation remains to be established.

In plants, the mechanisms controlling the G1/S transition are poorly known. However, it seems that there are close similarities compared to animals. Indeed, overexpression of CKI results in G1 arrest of the cell cycle in plants [50]. Furthermore, ICK2/KRP2, a CKI related protein, and other central cell cycle regulators such as E2Fc, a central transcription factor controlling G1/S transition in plants, must be degraded via the ubiquitin/26S proteasome pathway to allow the cells to go through the G1/S transition [51,52]. Although it was suggested that AtCSN4 is implicated in the G2/M transition [22], it has also been reported that G1/S phase specific core cell cycle genes were overexpressed in *csn4* mutant [22,53]. Furthermore, in human cells, it was reported that the downregulation of different CSN subunits can affect cell cycle in opposite ways, and the resulting perturbation of COP9 activity affect both G1/S and G2/M transition [54]. These published data suggest that CSN is likely equally important for G1/S and G2/M transitions in both plants and animals, and thus corroborate our findings here. They are also consistent with the fact that CUL neddylation affects the activity of multiple CRL complexes.

Our data show that TCTP regulates G1/S transition, in agreement with Brioude *et al* [6]. It is likely that TCTP/CSN4 interaction is specifically interfering with CSN function at G1/S. In this scenario, TCTP controls cell cycle through sequestration of CSN4, leading to CSN assembly impairment that in turn impacts neddylation status and stability of CRL complexes. CRLs have major role in several biological processes, among which hormone transduction and signaling are well studied [17]. The fact that no changes were observed in auxin flux and homeostasis in *tctp* knockout embryo during development is in favor of the conclusion that TCTP/CSN4 interaction likely controls CRLs specifically involved in cell cycle control but not in auxin signaling. It was reported that perturbation of CUL neddylation do not necessarily affect the activity of all CRLs. In mice, deletion of CSN8 did not affect SCF/CRL function in general, as a subset of CRLs maintained their capacity to degrade their substrate [55]. Similarly, in *Drosophila csn4* and *csn5* mutants, some but not all SCF/CRLs implicated in circadian rhythm maintenance are affected [56]. Therefore, it is likely that in *tctp* embryos, only a specific subset of CRLs implicated in cell cycle progression is affected, resulting in arrest of development, while auxin signaling remains normal. This is also supported by the fact that conversely to *tctp*, auxin signaling mutants are able to complete embryo development and produce mature seeds [57].

Previously, we demonstrated that TCTP function in the regulation of cell proliferation is conserved between plants and animals [6]. *Arabidopsis* AtTCTP and *Drosophila* dTCTP share only 38% amino acids identity, but many of the essential amino acids and domains known to be required for TCTP functions are conserved between plant and animal TCTPs [3,6]. Previously we showed that AtTCTP and dTCTP were able to homodimerize, but also to dimerize with each other *in vivo* [6], thus another argument that despite the overall relatively divergent protein sequences, their function is conserved. In support of a conservation and importance of TCTP/CSN4 interaction in animals, we show that, similar to *dTCTP* loss of function, *dCSN4* loss of function result in a loss of photoreceptors in adult *Drosophila* retina accompanied by a delayed acquisition of neuronal identity, which requires a tight coordination with cell proliferation in the developing eye disc. Furthermore, we show that, like for AtTCTP, down-regulation of *Drosophila* dTCTP also led to a decrease of CUL1^{NEDD8}. Moreover, co-immunoprecipitation results show that dTCTP is able to interact with AtCSN4, which indicates that TCTP/CSN4 interaction is likely conserved between plants and animals.

In summary, our data provide evidences that TCTP functions as a key growth regulator by controlling cell proliferation together with CSN4. We propose that TCTP could sequester CSN4 to control CUL1 neddylation status and thus CRL activity (Fig 6), and this role is conserved between plants and animals. These data add a new piece to resolve the puzzle of developmental biology processes by connecting two evolutionary conserved pathways, TCTP and

COP9, for cell proliferation. Our work will help future studies to better understand growth disorders and malignant transformation, associated with *TCTP* miss-expression.

Materials and methods

Constructs, plant biological material and growth conditions

T-DNA insertion knockout lines *tctp-1* (SAIL_28_C03), *tctp-2* (GABI_901E08) as well as the *RNAi-AtTCTP*, *35S::AtTCTP*, *35S::AtTCTP-GFP*, *35S::dTCTP-GFP* and the *AtTCTPg-GFP* lines harboring the *AtTCTP* genomic sequence including the promoter region, exons, introns, and the 3' UTR region in which the GFP was inserted in frame with *AtTCTP* (At3g16640), have been previously described [6]. *csn4* knockout line (Salk_043720C) was provided by NASC. The weak allele mutant of *AtCSN4* was kindly provided by C. Bellini (Umea University, Sweden).

AtCSN4-RNAi lines: The DNA fragment corresponding to the ORF of *AtCSN4* (At5g42970) without start codon ATG was cloned into the vector pB7GWIWG2D(II) [58] under the control of the CaMV 35S constitutive promoter. The resulting construct was then used to transform *A. thaliana* Col-0 plants. Lines are referred to as *RNAi-AtCSN4*.

AtCSN4-GFP overexpressing line: The DNA fragment corresponding to the ORF of *AtCSN4* was cloned into the pK7WGF2 [58] under the control of the CaMV 35S promoter. Lines are referred to as *35S::AtCSN4*.

The above lines were then crossed to generate the *35S::AtTCTP/RNAi-AtCSN4*, the *35S::AtCSN4/RNAi-AtTCTP* and the *35S::AtTCTP/35S::AtCSN4* lines.

AtTCTPgGFP/35S::AtCSN4-Flag line: The DNA fragment corresponding to the ORF of *AtCSN4* was cloned into pEarleyGate202 vector containing Flag motif [59]. The resulting construct was then used to transform *Arabidopsis* line *AtTCTPg-GFP* that harbors *pTCTP::TCTPg-GFP* construct [6].

Arabidopsis thaliana Columbia-0 (Col-0) was used as the wild-type (WT) for all experiments.

Embryo rescue of homozygous *tctp-1* and *tctp-2* embryos was performed as described previously [6]. During all steps, embryos from wild type siliques were used as control.

PIN1::PIN1-GFP/TCTP^{+/-} and *DR5rev::GFP/TCTP^{+/-}* were generated by crossing *tctp-2^{+/-}* with *PIN1::PIN1-GFP* or *DR5rev::GFP*, respectively. Embryo from white seeds and green seeds were then isolated [6] and observed under LSM 710 confocal microscope (Zeiss). *In vitro* culture of *Arabidopsis* embryo and hormone treatments with 2,4D were performed as previously described [60].

All seedlings were grown in culture chambers under short-day condition (8h/16h day/night at 22°C/19°C) for 4 weeks, then transferred to long-day condition (22°C, 16h/8h light/dark) to promote flowering, with light intensity of 70 $\mu\text{Em}^{-2} \text{sec}^{-1}$.

Fly analyses

All flies were maintained on standard corn/yeast medium at 25°C.

eyless>dTCTPi line: Expression of *dTCTPi* was carried out using the GAL4/UAS expression system [33]. We crossed *eyless-GAL4* line (Bloomington Drosophila Stock Center) with UAS::*dTCTPi* [10] and analyzed the F1 adult progeny.

tub>dTCTPi line: Expression of *dTCTPi* was carried out using the GAL4/UAS expression system. We crossed *tub-GAL4* line (Bloomington Drosophila Stock Center) with UAS::*dTCTPi* [10] and analyzed the F1 larvae.

We generated *dCSN4* mosaic clones in the eye using Tomato/GFP-FLP/FRT method [36,37]. The following fly strains were used: P{neoFRT}42D P{lacW}CSN4^{k08018}/CyO (Kyoto

Center), ey-FLP; FRT42D, Rh1-tdTomato[ninaC]/CyO; GMR-p35, Rh1-GFP/TM6B and ey-FLP; FRT42D, Rh1-tdTomato 94.1/CyO; UAS-GFP. Living adult flies were anesthetized using CO₂ and embedded in a dish containing 1% agarose covered with cold water, as described [37] and imaged using a Leica SP5 upright confocal microscope using a water immersion objective. Photoreceptors were marked by Rh1-GFP or Rh1-tdTomato.

Mosaic clones were also generated using ey-FLP; FRT42D Ubi-GFP and eye discs analyzed at third instar larvae as previously described [61]. Dissected eye discs were stained with a rat anti-ELAV (Developmental Hybridoma Bank, 1/10) or anti-Dcp-1 (Cell Signaling, 1/300) and a rabbit anti-GFP (Invitrogen, 1/400) and imaged using a LSM800 Zeiss confocal microscope.

BY-2 cell lines

RNAi-NtTCTP and *35S::NtTCTP-GFP* BY-2 cell lines have been described previously [6].

RNAi-NtCSN4 and *35S::NtCSN4-GFP* BY-2 cell lines: DNA corresponding to *NtCSN4* ORF was amplified using primers BY2-CSN4-F (CACCATGGAGAGTGCGTTCGCTAGTG) and BY2-CSN4-R (CTAGACAGGAATAGGGAGCCCCTTCT) and cloned into the vector pK7GWIWG2 or pK7WGF2, respectively [58]. The resulting constructs were used to transform tobacco BY-2 (*N. tabacum* L. cv. Bright Yellow-2) cell suspension as previously described [62]. BY-2 cells were grown in the dark at 25°C constant temperature and with agitation at 150 rpm.

Cell cycle synchronization of BY-2 cells and DNA content analyses

BY-2 cells were synchronized using aphidicolin (Sigma) as previously described [6]. Samples were collected every two hours and flow cytometry analyses were performed essentially as previously described [6]. Fluorescence intensity of stained nuclei was measured with MACSQuant VYB flow cytometer (BD Bioscience), using 405nm excitation blue laser. DNA content analysis was performed using FlowJo, LLC software version 10.

EdU incorporation assay

Seeds of the relevant lines were germinated on half strength MS. Five days after germination, plantlets were transferred to EdU (10 μM, Sigma-Aldrich) supplemented medium and harvested after 3h, 6h, 9h and 12h of incubation. Experiments were performed as described [63]. The percentage of EdU positive nuclei increases linearly with time, and follows an equation that can be written as $P = at + b$ where P is the percentage of EdU positive nuclei and t is time. Total cell cycle length is estimated as $100/a$, and S phase length is b/a . The parameters of the equation and their confidence intervals were estimated with the R statistics software using the least-square method.

Plant and organ growth analyses

Kinematic of leaf growth was performed as previously described [24] on the two first initiated-leaves of Col-0 WT and *RNAi-AtCSN4* plants grown *in vitro*. Leaf size as well as number and size of abaxial epidermal cells were determined starting of day 3 and until day 16 after germination. The average cell division rates were determined by calculating the slope of the Neperian Logarithmic-transformed number of cells per leaf, which was done using five-point differentiation formulas [25]. The number of newly produced cells were calculated by 72h time period.

Rosette diameter was determined starting of 8 days after germination, until bolting. Rosette area was measured every 3 days with a caliper. Each measure was performed using 18 plants

for each genotype. Experiments were performed on two independent transformation events and in three biological replicates.

To investigate root growth, seeds were germinated on half strength MS and 5 day-old plantlets were transferred to a new plate and grown vertically for 6 days. Root length of each plant was measured using the Fiji software at day 0, 3 and 6 after transfer.

Petal area, petal cell number and size measurements were performed as previously described [64]. Briefly, petals were cleared overnight in a solution containing 86% ethanol and 14% acetic acid followed by two incubations of 4h each in ethanol 86%. Petals were dissected and photographed using Leica MZ12 stereomicroscope. Cells from cleared petals were observed with a Nikon Optiphot 2 microscope with Nomarski optics. Petal area and cell density i.e. number of cells per surface unit, were determined from digital images using ImageJ software (U. S. National Institutes of Health).

Proteins interactions *in planta*

Co-localization experiments: cDNA fragments corresponding to the coding sequences of *AtTCTP* and *AtCSN4* were PCR amplified and then fused to RFP and GFP, respectively. Resulting constructs were used to infiltrate leaf epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* plants as previously described [65].

Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) experiments: cDNA fragments corresponding to the coding sequences of *AtTCTP* and *AtCSN4* were PCR amplified and then cloned into the pBiFP1, pBiFP2, pBiFP3 and pBiFP4 vectors [66] using the Gateway technology. Resulting constructs were used to infiltrate leaf epidermal cells of *Nicotiana benthamiana* plants as previously described [65]. BiFC was observed four days post-infiltration using a LSM 710 Confocal microscope (Zeiss).

Immunoprecipitation

Co-immunoprecipitation experiments using *AtTCTP*-GFP or *AtCSN4*-GFP as bait were performed using the μ MACS GFP Isolation Kit (Miltenyi Biotec). Three biological replicates were performed for each sample. Wild-type Col-0 and 35S::GFP plants were used as controls. Tissues of 10 days-old seedlings, mature seeds harvested from green siliques or inflorescences were ground to a fine powder in liquid nitrogen using mortar and pestle. The tissue powder (200 mg) was resuspended with 1ml pre-cooled (4°C) Miltenyi lysis buffer complemented with one tablet of cOmplete Mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) for 5 ml of lysis buffer. Cellular extracts were incubated on ice 10 min and then centrifuged 10 min at 21 000g (4°C). The supernatants were incubated with 50 μ l anti-GFP antibody coupled to magnetic μ MACS microbeads for specific isolation of GFP-tagged protein during 1 hour at 4°C on orbital shaker. Microbeads were bound to magnetic columns and washed as described by the manufacturer, before elution of GFP-tagged proteins and bound proteins. Eluted proteins were analyzed by Western blot. For the immunoprecipitation followed by mass spectrometry (IP/MS) we visualized proteins by silver staining of the SDS-PAGE gel (ProteoSilver Plus Silver Stain Kit, SIGMA).

Protein extraction and western blot analysis

Tissue (plants or cell culture) were grinded and total proteins were extracted using « Plant Total Protein Extraction Kit » (Sigma).

Protein from *Drosophila* larvae were extracted using approximately 10 larvae in 100 μ l of protein extraction buffer (20 mM HEPES pH:7,5, 100 mM KCl, 5% Glycerol, 10 mM EDTA, 0,1% Tween, 1 μ M DTT, 1 μ M PMSF, 5 μ l/ml Protease Inhibitor Cocktail (Sigma), 5 μ l/ml

Phosphatase Inhibitor (Sigma)). After centrifugation for 10 min at 160000 g, proteins contained in the supernatant were dosed using Bradford method[67].

Proteins were analyzed by Western blot using antibodies directed against AtTCTP (1/500 dilution) [6], AtCUL1 (1/2000 dilution; Enzo LifeScience), dCUL1 (1/500 dilution; Thermo Scientific), AtCSN4 (1/2000 dilution; Enzo LifeScience), Flag (1/1000 dilution; Sigma-Aldrich); α -Tubulin (1/1000 dilution; Sigma) or GFP (1/2000 dilution; Roche). IRDye 800CW and IRDye 680RD (1/10 000 dilution; LI-COR) were used as secondary antibodies and the signal was revealed using Odyssey Clx imaging system and signal intensity was quantified using the Image Studio Lite software (LI-COR). HRP conjugated anti-mouse or anti-rabbit IgG were used as secondary antibodies (1/5000 dilution) and the signal was revealed using Clarity Western ECL substrate and the ChemiDocTouch imaging system (Biorad). Intensity of the bands was quantified using ImageJ software (U. S. National Institutes of Health).

Supporting information

S1 Fig. AtTCTP and AtCSN4 interact *in vitro* and *in vivo*. (a-c) TCTP interacting proteins were co-immunoprecipitated from protein extracts prepared from seedlings (a) or from mature green seeds (b) of *AtTCTPg-GFP/35S::AtCSN4-Flag* plants, and from inflorescences (c) of *35S::GFP*, *AtTCTPg-GFP* (two independent lines 1 & 2), *35S::AtTCTP-GFP* and *35S::dTCTP-GFP/tctp* (two independent lines 1 & 2) plants, using anti-GFP coupled magnetic beads. Co-immunoprecipitated proteins were detected by Western blotting using anti-Flag (a, lower panel; b, left panel), anti-GFP (a, upper panel; c, lower panel), anti-TCTP (c, middle panel) or anti-CSN4 (b, right panel; c, upper panel) antibodies. Red asterisks: CSN4 protein; white arrows: CSN4-Flag protein; black arrows: TCTP-GFP protein; black asterisks: free GFP. (d) CSN4 interacting proteins were co-immunoprecipitated from protein extracts prepared from inflorescences of Col-0, *35S::GFP* and *35S::AtCSN4-GFP* plants using anti-GFP coupled magnetic beads. Co-immunoprecipitated proteins were detected by Western blotting using anti-CSN4 (upper panel), anti-TCTP (middle panel) or anti-GFP (lower panel) antibodies. Red asterisks: CSN4 protein; white arrows: CSN4-GFP protein; blue arrows: TCTP protein; black arrows: TCTP-GFP protein; black asterisks: free GFP. (TIF)

S2 Fig. AtTCTP and AtCSN4 homodimerise *in vivo*. (a) Bimolecular fluorescence complementation assays show that AtTCTP or AtCSN4 fused with N- and C-terminal YFP moieties are able to form homodimers. No signal was observed in the control assays in which AtTCTP or AtCSN4 fused with N- or C-terminal YFP moieties was co-infiltrated with an empty plasmid (b, c; respectively). (TIF)

S3 Fig. *csn4* exhibits constitutive photomorphogenesis and severe delay in seedling development. Wild type Col-0 and *csn4* seedlings grown in light (a) or dark (b) show severe developmental delay. Plants at 10 days after germination are shown. *csn4* seedlings grown in dark show no hypocotyl elongation (b), confirming the constitutive photomorphogenesis phenotype. Bars = 500 μ m. (TIF)

S4 Fig. Quantification of AtTCTP and AtCSN4 accumulation. AtCSN4 (a,b) and of AtTCTP (c,d) protein accumulation was assessed by Western blot in the different plant lines downregulated and/or overexpressor of AtCSN4 or AtTCTP. Relative AtCSN4 or AtTCTP accumulation in the different plant lines was determined compared to accumulation in the WT Col-0 (= 1). Values are shown under each lane.

Black arrow indicates AtCSN4-GFP. Red arrow indicates endogenous AtCSN4. Blue arrow: AtTCTP. *: α -Tubulin (TUB) was used as loading control.
(TIF)

S5 Fig. RNAi-AtCSN4 and RNAi-AtTCTP inflorescence phenotype. RNAi-AtCSN4 and RNAi-AtTCTP plants exhibit similar dwarf phenotype of flower stem with short internodes. Bars = 1cm.
(TIF)

S6 Fig. Reduced cell division during leaf development in RNAi-AtCSN4 line. The number of newly produced cells per hour was reduced in RNAi-AtCSN4 plants compared to Col-0 WT. The number of newly produced cells was determined by 72h period. The error bars represent standard errors. n = 10; *: p-value <0,05.
(TIF)

S7 Fig. Root growth, and petal size and cell size measurements. (a) RNAi-AtTCTP and RNAi-AtCSN4 plants exhibit reduced root growth compared to the wild-type (Col-0). Root length was measured at day 5, 8 and 11 days after germination. Values are average +/- standard error (n = 30 for RNAi-AtTCTP and n = 20 for RNAi-AtCSN4). Asterisks indicate statistically relevant differences (T-test; p-value <0.01).
(b) Compared to the WT, mature petals of lines *tctp*, RNAi-AtTCTP, RNAi-AtCSN4, RNAi-AtTCTP/35S::AtCSN4 and 35S::TCTP/RNAi-AtCSN4 are reduced in size with increased cell size, suggesting lower cell division rate. Conversely, mature petals of lines overexpressing AtTCTP (lines 35S::AtTCTP) and the double overexpressor 35S::AtTCTP/35S::AtCSN4 are larger in size while cell size was unaffected or smaller, respectively, compared to Col-0. This suggest increased cell division rate in these lines. The stars indicate significant differences relative to the WT Col-0 (T-test; p-value < 0,001).
(TIF)

S8 Fig. NtTCTP and NtCSN4 accumulation in BY-2 cell lines. Western blot assay to evaluate the accumulation of NtTCTP (a) and NtCSN4 (b) in WT BY-2 tobacco cells, and in BY-2 cells knockdown and overexpressor for these genes. The relative accumulation of NtTCTP and NtCSN4 based on Western blot data is shown under each lane. Black arrows indicate GFP fused proteins (NtTCTP-GFP or NtCSN4-GFP). Red arrows indicate endogenous NtTCTP and NtCSN4 proteins.
(TIF)

S9 Fig. CUL1 neddylation is modified in *tctp* mutant lines. (a) CUL1 neddylation is decreased in *tctp* mutants. Three independent samples (1–3) were analyzed using two independent *tctp* knockouts (*tctp-1* and *tctp-2*). (b) CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio in inflorescence and seedlings of Col-0 plants. (c) Treatment with MLN4924, a drug that inhibits neddylation, results in an increase of the free CUL1 form with concomitant decrease of the CUL1^{NEDD8} form, confirming that the observed two bands correspond to neddylated and non neddylated CUL1. CUL1 protein was detected by Western blot using anti-CUL1 antibody. Quantification of CUL1^{NEDD8}/CUL1 ratio is shown under each lane. Star: CUL1. Arrow: CUL1^{NEDD8}.
(TIF)

S10 Fig. Auxin transport and accumulation is not modified in *Arabidopsis tctp* mutants. (a) PIN1::PIN1-GFP localization in *tctp* knockout embryos is similar to that in WT embryos, indicating that auxin efflux is not disturbed by *tctp* loss-of-function. Embryos at globular, transition and heart stages are shown. Bars: 20 μ m.
(b) The accumulation of GFP, expressed under the control of synthetic auxin response DR5rev

promoter, is not disturbed in *tctp* mutant embryos compared to WT embryos, indicating that auxin transduction pathway is not disturbed by *tctp* loss-of-function. Exogenous treatment with synthetic auxin, 2,4-D leads to similar expansion of DR5rev-GFP expression in *tctp* mutant and WT embryos. Bars = 20 μ m.

(TIF)

S1 File. File containing numerical data underlying the graphs in Figs 2, 3, 5 and S6 and S7.

(XLSX)

Acknowledgments

We thank Alexis Lacroix, Justin Berger and Patrice Bolland (RDP-ENS-Lyon) for plant handling. We thank C. Bellini (Umea University, Sweden) for providing the *csn4* weak allele mutant seeds. We acknowledge the contribution of SFR Biosciences (UMS3444/CNRS, US8/Inserm, ENS de Lyon, UCBL) facilities: PLATIM microscopy facility for confocal imaging assistance, the ARTHRO-TOOLS fly facility, Cytometry facility and Protein Science facility. We thank Veronique Barateau for assistance with the FACS experiments.

Author Contributions

Conceptualization: Mohammed Bendahmane, Judit Szécsi.

Data curation: Bertrand Mollereau, Judit Szécsi.

Funding acquisition: Mohammed Bendahmane.

Investigation: Léo Betsch, Véronique Boltz, Florian Brioudes, Garance Pontier, Victor Girard, Julie Savarin, Barbara Wipperman, Pierre Chambrier, Nicolas Tissot, Moussa Benhamed, Cécile Raynaud, Judit Szécsi.

Project administration: Mohammed Bendahmane, Judit Szécsi.

Supervision: Bertrand Mollereau, Cécile Raynaud, Mohammed Bendahmane, Judit Szécsi.

Validation: Mohammed Bendahmane, Judit Szécsi.

Writing – original draft: Mohammed Bendahmane, Judit Szécsi.

Writing – review & editing: Bertrand Mollereau, Cécile Raynaud, Mohammed Bendahmane, Judit Szécsi.

References

1. Chitpatima S.T., Makrides S., Bandyopadhyay R. & Brawerman G. Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucleic Acids Res* 16, 2350 (1988). PMID: [3357792](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3357792/)
2. Thomas G., Thomas G. & Luther H. Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after serum stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 5712–6 (1981). PMID: [6946510](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6946510/)
3. Betsch L., Savarin J., Bendahmane M. & Szécsi J. Roles of the Translationally Controlled Tumor Protein (TCTP) in Plant Development. *Results Probl Cell Differ* 64, 149–172 (2017). https://doi.org/10.1007/978-3-319-67591-6_7 PMID: [29149407](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29149407/)
4. Bommer U.A. Cellular function and regulation of the translationally controlled tumour protein TCTP. *The Open Allergy Journal* 5, 19–32. (2012).
5. Bommer U.A. & Thiele B.J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol* 36, 379–85 (2004). PMID: [14687915](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14687915/)

6. Brioudes F., Thierry A.M., Chambrier P., Mollereau B. & Bendahmane M. Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 16384–9 (2010). <https://doi.org/10.1073/pnas.1007926107> PMID: 20736351
7. Susini L. et al. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function. *Cell Death Differ* 15, 1211–20 (2008). <https://doi.org/10.1038/cdd.2008.18> PMID: 18274553
8. Thayanyithy V. Evolution and expression of translationally controlled tumour protein (TCTP) of fish. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 142, 8–17 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.04.011> PMID: 16006164
9. Chen S.H. et al. A knockout mouse approach reveals that TCTP functions as an essential factor for cell proliferation and survival in a tissue- or cell type-specific manner. *Mol Biol Cell* 18, 2525–32 (2007). <https://doi.org/10.1091/mbc.E07-02-0188> PMID: 17475776
10. Hsu Y.C., Chern J.J., Cai Y., Liu M. & Choi K.W. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase. *Nature* 445, 785–8 (2007). <https://doi.org/10.1038/nature05528> PMID: 17301792
11. Serino G. et al. Arabidopsis cop8 and fus4 mutations define the same gene that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome. *Plant Cell* 11, 1967–80 (1999). PMID: 10521526
12. Wei N. & Deng X.W. The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 261–86 (2003). <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.112449> PMID: 14570571
13. Barth E., Hubler R., Baniahmad A. & Marz M. The Evolution of COP9 Signalosome in Unicellular and Multicellular Organisms. *Genome Biol Evol* 8, 1279–89 (2016). <https://doi.org/10.1093/gbe/evw073> PMID: 27044515
14. Lydeard J.R., Schulman B.A. & Harper J.W. Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiquitin ligases. *EMBO Rep* 14, 1050–61 (2013). <https://doi.org/10.1038/embor.2013.173> PMID: 24232186
15. Teixeira L.K. & Reed S.I. Ubiquitin ligases and cell cycle control. *Annu Rev Biochem* 82, 387–414 (2013). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060410-105307> PMID: 23495935
16. Genschik P., Marrocco K., Bach L., Noir S. & Criqui M.C. Selective protein degradation: a rheostat to modulate cell-cycle phase transitions. *J Exp Bot* 65, 2603–15 (2014). <https://doi.org/10.1093/jxb/ert426> PMID: 24353246
17. Hotton S.K. & Callis J. Regulation of cullin RING ligases. *Annu Rev Plant Biol* 59, 467–89 (2008). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.58.032806.104011> PMID: 18444905
18. Schwechheimer C. & Isono E. The COP9 signalosome and its role in plant development. *Eur J Cell Biol* 89, 157–62 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2009.11.021> PMID: 20036030
19. Busch S. et al. An eight-subunit COP9 signalosome with an intact JAMM motif is required for fungal fruit body formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 8089–94 (2007). <https://doi.org/10.1073/pnas.0702108104> PMID: 17470786
20. Dohmann E.M., Kuhnle C. & Schwechheimer C. Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the cop/det/fus mutant phenotype in Arabidopsis. *Plant Cell* 17, 1967–78 (2005). <https://doi.org/10.1105/tpc.105.032870> PMID: 15923347
21. Sharon M. et al. Symmetrical modularity of the COP9 signalosome complex suggests its multifunctionality. *Structure* 17, 31–40 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.str.2008.10.012> PMID: 19141280
22. Dohmann E.M. et al. The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Development* 135, 2013–22 (2008). <https://doi.org/10.1242/dev.020743> PMID: 18434413
23. Ohad N., Shichrur K. & Yalovsky S. The analysis of protein-protein interactions in plants by bimolecular fluorescence complementation. *Plant Physiol* 145, 1090–9 (2007). <https://doi.org/10.1104/pp.107.107284> PMID: 18056859
24. De Veylder L. et al. Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of Arabidopsis. *Plant Cell* 13, 1653–68 (2001). <https://doi.org/10.1105/TPC.010087> PMID: 11449057
25. Erickson R.O. Modeling of Plant Growth. *Annual Review of Plant Physiology* 27, 407–434 (1976).
26. Donnelly P.M., Bonetta D., Tsukaya H., Dengler R.E. & Dengler N.G. Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of Arabidopsis. *Dev Biol* 215, 407–19 (1999). <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9443> PMID: 10545247
27. Hakenjos J.P. et al. MLN4924 is an efficient inhibitor of NEDD8 conjugation in plants. *Plant Physiol* 156, 527–36 (2011). <https://doi.org/10.1104/pp.111.176677> PMID: 21527421
28. Pacurar D.I. et al. The Arabidopsis Cop9 signalosome subunit 4 (CNS4) is involved in adventitious root formation. *Sci Rep* 7, 628 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00744-1> PMID: 28377589

29. Dessau M. et al. The Arabidopsis COP9 signalosome subunit 7 is a model PCI domain protein with sub-domains involved in COP9 signalosome assembly. *Plant Cell* 20, 2815–34 (2008). <https://doi.org/10.1105/tpc.107.053801> PMID: [18854373](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18854373/)
30. Dohmann E.M., Levesque M.P., Isono E., Schmid M. & Schwechheimer C. Auxin responses in mutants of the Arabidopsis CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome. *Plant Physiol* 147, 1369–79 (2008). <https://doi.org/10.1104/pp.108.121061> PMID: [18467458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18467458/)
31. Schwechheimer C. et al. Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* 292, 1379–82 (2001). <https://doi.org/10.1126/science.1059776> PMID: [11337587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11337587/)
32. Benkova E. et al. Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell* 115, 591–602 (2003). PMID: [14651850](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14651850/)
33. Brand A.H. & Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118, 401–15 (1993). PMID: [8223268](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8223268/)
34. Mollereau B. & Domingos P.M. Photoreceptor differentiation in Drosophila: from immature neurons to functional photoreceptors. *Dev Dyn* 232, 585–92 (2005). <https://doi.org/10.1002/dvdy.20271> PMID: [15704118](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15704118/)
35. Chen J. et al. Discovery-based science education: functional genomic dissection in Drosophila by undergraduate researchers. *PLoS Biol* 3, e59 (2005). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030059> PMID: [15719063](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15719063/)
36. Gambis A., Dourlen P., Steller H. & Mollereau B. Two-color in vivo imaging of photoreceptor apoptosis and development in Drosophila. *Dev Biol* 351, 128–34 (2011). <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.12.040> PMID: [21215264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21215264/)
37. Dourlen P., Levet C., Mejat A., Gambis A. & Mollereau B. The Tomato/GFP-FLP/FRT method for live imaging of mosaic adult Drosophila photoreceptor cells. *J Vis Exp*, e50610 (2013). <https://doi.org/10.3791/50610> PMID: [24084155](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24084155/)
38. Hay B.A., Wolff T. & Rubin G.M. Expression of baculovirus P35 prevents cell death in Drosophila. *Development* 120, 2121–9 (1994). PMID: [7925015](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7925015/)
39. Bras-Pereira C. et al. dachshund Potentiates Hedgehog Signaling during Drosophila Retinogenesis. *PLoS Genet* 12, e1006204 (2016). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006204> PMID: [27442438](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27442438/)
40. Wei N., Serino G. & Deng X.W. The COP9 signalosome: more than a protease. *Trends Biochem Sci* 33, 592–600 (2008). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.09.004> PMID: [18926707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18926707/)
41. Serino G. & Deng X.W. The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. *Annu Rev Plant Biol* 54, 165–82 (2003). <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134847> PMID: [14502989](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14502989/)
42. Pan L. et al. Protein competition switches the function of COP9 from self-renewal to differentiation. *Nature* 514, 233–6 (2014). <https://doi.org/10.1038/nature13562> PMID: [25119050](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25119050/)
43. Xu G.P. et al. Rig-G negatively regulates SCF-E3 ligase activities by disrupting the assembly of COP9 signalosome complex. *Biochem Biophys Res Commun* 432, 425–30 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.01.132> PMID: [23415865](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23415865/)
44. Franciosini A. et al. The COP9 SIGNALOSOME Is Required for Postembryonic Meristem Maintenance in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant* 8, 1623–34 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.08.003> PMID: [26277260](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26277260/)
45. Choo Y.Y. et al. Characterization of the role of COP9 signalosome in regulating cullin E3 ubiquitin ligase activity. *Mol Biol Cell* 22, 4706–15 (2011). <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-03-0251> PMID: [22013077](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22013077/)
46. Cope G.A. & Deshaies R.J. COP9 signalosome: a multifunctional regulator of SCF and other cullin-based ubiquitin ligases. *Cell* 114, 663–71 (2003). PMID: [14505567](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14505567/)
47. Denti S., Fernandez-Sanchez M.E., Rogge L. & Bianchi E. The COP9 signalosome regulates Skp2 levels and proliferation of human cells. *J Biol Chem* 281, 32188–96 (2006). <https://doi.org/10.1074/jbc.M604746200> PMID: [16943200](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16943200/)
48. Peth A., Berndt C., Henke W. & Dubiel W. Downregulation of COP9 signalosome subunits differentially affects the CSN complex and target protein stability. *BMC Biochem* 8, 27 (2007). <https://doi.org/10.1186/1471-2091-8-27> PMID: [18093314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18093314/)
49. Mosadeghi R. et al. Structural and kinetic analysis of the COP9-Signalosome activation and the cullin-RING ubiquitin ligase deneddylation cycle. *Elife* 5(2016).
50. Jasinski S. et al. The CDK inhibitor NtKIS1a is involved in plant development, endoreduplication and restores normal development of cyclin D3; 1-overexpressing plants. *J Cell Sci* 115, 973–82 (2002). PMID: [11870216](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11870216/)

51. del Pozo J.C., Boniotti M.B. & Gutierrez C. Arabidopsis E2Fc functions in cell division and is degraded by the ubiquitin-SCF(AtSKP2) pathway in response to light. *Plant Cell* 14, 3057–71 (2002). <https://doi.org/10.1105/tpc.006791> PMID: 12468727
52. Verkest A., Weinel C., Inze D., De Veylder L. & Schnittger A. Switching the cell cycle. Kip-related proteins in plant cell cycle control. *Plant Physiol* 139, 1099–106 (2005). <https://doi.org/10.1104/pp.105.069906> PMID: 16286449
53. Menges M., de Jager S.M., Gruijsem W. & Murray J.A. Global analysis of the core cell cycle regulators of Arabidopsis identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J* 41, 546–66 (2005). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2004.02319.x> PMID: 15686519
54. Liu Y. et al. Anti-tumor effect of germacrone on human hepatoma cell lines through inducing G2/M cell cycle arrest and promoting apoptosis. *Eur J Pharmacol* 698, 95–102 (2013). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2012.10.013> PMID: 23117090
55. Menon S. et al. COP9 signalosome subunit 8 is essential for peripheral T cell homeostasis and antigen receptor-induced entry into the cell cycle from quiescence. *Nat Immunol* 8, 1236–45 (2007). <https://doi.org/10.1038/ni1514> PMID: 17906629
56. Knowles A. et al. The COP9 signalosome is required for light-dependent timeless degradation and *Drosophila* clock resetting. *J Neurosci* 29, 1152–62 (2009). <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0429-08.2009> PMID: 19176824
57. Moller B. & Weijers D. Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1, a001545 (2009). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001545> PMID: 20066117
58. Karimi M., Inze D. & Depicker A. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7, 193–5 (2002). PMID: 11992820
59. Earley K.W. et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J* 45, 616–29 (2006). <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113X.2005.02617.x> PMID: 16441352
60. Muller B. & Sheen J. Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* 453, 1094–7 (2008). <https://doi.org/10.1038/nature06943> PMID: 18463635
61. Domingos P.M. et al. Spalt transcription factors are required for R3/R4 specification and establishment of planar cell polarity in the *Drosophila* eye. *Development* 131, 5695–702 (2004). <https://doi.org/10.1242/dev.01443> PMID: 15509769
62. Mayo K.J., Gonzales B.J. & Mason H.S. Genetic transformation of tobacco NT1 cells with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat Protoc* 1, 1105–11 (2006). <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.176> PMID: 17406390
63. Pedroza-Garcia J.A. et al. Role of the Polymerase sub-unit DPB2 in DNA replication, cell cycle regulation and DNA damage response in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 44, 7251–66 (2016). <https://doi.org/10.1093/nar/gkw449> PMID: 27193996
64. Szecsi J., Wippermann B. & Bendahmane M. Genetic and phenotypic analyses of petal development in Arabidopsis. *Methods Mol Biol* 1110, 191–202 (2014). https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9408-9_8 PMID: 24395257
65. Tai T.H. et al. Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14153–8 (1999). PMID: 10570214
66. Azimzadeh J. et al. Arabidopsis TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* 20, 2146–59 (2008). <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056812> PMID: 18757558
67. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248–54 (1976). PMID: 942051

