

République Algérienne Démocratique et Populaire

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A.MIRA-BEJAIA**

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Spécialité : Biotechnologie microbienne



Réf :

Mémoire de fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme
Master
Thème

**Analyse de la réponse des plantes au stress
réplicatif : Étude de l'interaction de la
protéine LUMINIDEPENDENS (LD) avec
les protéines RPA**

Présenté par : BEN HAMED Kahina

Soutenu le 02-07-2023

Devant le jury composé de :

Mr AMIR Nadir	MCA	Encadreur
Mr Nabti El Hafid	Prof	Président
Mme Bensidhoum Leila	MCB	Examinatrice

Année universitaire : 2022/2023

Remerciement

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude à l'équipe dynamique des chromosomes pour leur accueil chaleureux et leur soutien tout au long de mon stage. Je voudrais particulièrement remercier mon oncle, Moussa Benhamed, le directeur de l'équipe, ainsi que ma co-promotrice, le Dr Cécile Raynaud, et mon promoteur Monsieur Amir Nadir, pour leurs précieuse guidance et leur expertise. Je souhaite également adresser mes remerciements à Monsieur David Latrassé pour sa contribution et à Clara Bergis pour son aide, ses conseils et sa gentillesse exceptionnelle.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance spéciale envers Christelle Mazubert pour tout ce qu'elle m'a enseigné en termes de compétences techniques. Vos connaissances et votre dévouement ont grandement enrichi mon expérience de stage.

Un grand merci également à Layla Chmaiss, Rim Brik-Chaouche, Jeannine Drouin-Wahbi, Xiaoning He, Jing An, Qingyi Wang, Chloé Dias Lopes, Hugo Zalzalé, Leonardo Peyrera Bistrain et à tous les membres de mon laboratoire pour leur aide et leur soutien. Votre collaboration précieuse a contribué à rendre mon stage plus enrichissant et productif.

Je suis reconnaissante envers chacun d'entre vous pour avoir partagé vos connaissances, votre expertise et votre amitié. Votre soutien inestimable a joué un rôle essentiel dans ma croissance professionnelle.

Un grand merci à Madame Bensidhoum Leila et Monsieur Nabti El Hafid, membres du jury. Leurs conseils et leur soutien ont été d'une importance capitale pour moi. Leur expertise et leur engagement ont grandement enrichi cette expérience. Je leur suis sincèrement reconnaissante pour leur temps et leur précieuse contribution

Dédicaces

Je tiens à dédier avec amour et gratitude à ma chère famille Benhamed,

À mes grands-parents, Abdelouahab et Mebarka, dont la sagesse, l'amour inconditionnel et les valeurs transmises ont été des piliers dans ma vie.

À mes chers parents, papa et maman, pour leur soutien indéfectible, leurs encouragements constants et leur amour incommensurable.

À mes frères, Smail, Maatoub, Sassa, Aymen et Razika, qui ont toujours été présents pour moi, me soutenant et partageant des moments inoubliables.

À mes oncles, Khaled, Hamouda, Lahcen, Ghano, Moussa, Samir et Nabil, dont la présence chaleureuse et les précieux conseils ont enrichi ma vie.

À mes cousines et cousins, Katia, Cici, Souzane, Sarah, Massilia, Hammou, Massi, Ines, Fadia, Maroua, Louiza, Youba, Ishak et Youcef, pour nos liens indéfectibles et les souvenirs partagés qui illuminent ma vie.

À mes tantes, Meriama, Chafia, Nadia, et Naïma, pour leur affection, leur soutien et leurs encouragements constants.

Et enfin, un remerciement spécial à Djamil pour avoir été à mes côtés tout au long de ce parcours.

C'est grâce à votre amour, votre soutien et vos encouragements que j'ai pu accomplir ce parcours. Vous êtes ma force et mon inspiration. Je vous suis infiniment reconnaissante d'être présents dans ma vie.

Avec tout mon amour, Kahina.

Liste des abréviations

LD : LUMINIDEPENDENS.

RPA : protéines de réplication A.

DDR : DNA Damage Response

BiFC: Bimolecular Fluorescence Complementation.

CPDs: Cyclobutane Pyrimidine Dimers.

MMR: Mismatch Repair.

NER: Nucleotide Excision Repair.

BER: Base Excision Repair.

CDT1: Chromatin Licensing and DNA Replication Factor 1.

CDC6: Cell Division Cycle 6.

MCMs: Minichromosome Maintenance Proteins.

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated.

ATR: Ataxia Telangiectasia and Rad3-related.

ATRIP: ATR-Interacting Protein.

SOG1: SUPPRESSOR OF GAMMA RESPONSE 1.

PCNA: Proliferating Cell Nuclear Antigen.

EMS: Ethyl Methanesulfonate.

Liste des tableaux

Tableau I : Résultats d'expérience de la spectrométrie de masse.....	11
Tableau II : Conditions des PCR et tailles attendues des amplicons pour les gènes RPA1C, RPA2B, RPA3A et RPA3B.....	14
Tableau III : Analyse des tailles attendues après digestion des plasmides recombinants.....	21
Tableau IV : Analyse des constructions RPA-pJET par digestion enzymatique et purification des fragments d'ADN.....	22
Tableau V : Conditions de PCR sur colonies des gènes RPA dans les plasmides pBIFP.....	26
Tableau VI : Digestion par XhoI des constructions RPA-pBIFP.....	27
Tableau VII : Résultats de la BiFC : Interactions testées et résultats positifs, négatifs et non testés.....	31

Liste des figures

Figure 01 : la formation de complexe pré-réplication.....	5
Figure 02 : Organisation de la fourche de réplication chez les eucaryotes.....	6
Figure 03 : L'activation de la réponse aux dommages de l'ADN.....	7
Figure 04 : schéma récapitulatif de la procédure de clonage.....	12
Figure 05 : Résultat de contrôle de PCR par électrophorèse montrant l'amplification des 4 gènes de RPA étudiés.....	19
Figure 06 : Résultat de contrôle de PCR sur colonies par électrophorèse révélant la présence du gène RPA1C de 2.5Kb.....	20
Figure 07 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique de construction RPA1C-pJET avec SalI, NotI, EcoRI.....	21
Figure 08 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique de pJET-RPA avec Sal, NotI, PvuI.....	22
Figure 09 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique de pENTR par SalI et NotI.....	23
Figure 10 : Résultat de contrôle de PCR sur colonies par électrophorèse : RPA1C de taille 2,5 kb dans DH5alpha.....	24
Figure 11 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique de RPA1C-Pentr.....	24
Figure 12 : Résultat de contrôle de PCR sur colonies par électrophorèse: RPA1C-pBIFP3 de taille 2kb dans <i>DH5alpha</i>	27
Figure 13 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique par XhoI de RPA1C-pBIFP3.....	28
Figure 14 : Résultat de contrôle de PCR sur colonies par électrophorèse: RPA1C-pBIFP3 de taille 2kb dans <i>GV3101</i>	28
Figure 15 : les résultats de la BiFC.....	30

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Introduction.....1

Synthèse bibliographique

I. La réplication de l'ADN et la réponse au stress réplicatif.....3

I.1. La réplication de l'ADN.....3

I.2. La DDR et la réponse au stress réplicatif.....4

II. La protéine LUMINIDEPENDENS et son rôle potentiel dans la DDR8

II.1. Mise en évidence de voies de signalisation de la DDR indépendantes de SOG1.....8

II.2. Identification de LD comme un nouvel acteur de la réponse au stress réplicatif.....8

Matériels et méthodes

I. Clonage des gènes codant les protéines RPA.....13

I.1. Amplification par PCR Touchdown avec Q5 High-Fidelity DNA Polymerase.....13

I.2. Purification des fragments.....14

I.3. Ligation de fragments dans un plasmide.....14

I.4. Purification de ligation.....15

I.5. La transformation bactérienne par électroporation.....15

I.6. PCR sur colonies.....15

I.7. La mini-préparation d'ADN plasmidique.....16

I.8. Digestion enzymatique de plasmides.....16

I.9. La Recombinaison par le système Gateway.....16

II. L'agro-infiltration sur les feuilles de *Nicotiana benthamiana*.....17

Résultats

I. Amplification des 4 cDNAs.....19

II. Clonage des 4 cDNA dans pJET.....20

III. Clonage des RPA dans pENTR.....23

IV. Clonage Gateway.....25

V. L'Agroinfiltration dans les feuilles de tabac.....29

DISCUSSION.....32

Conclusion et perspectives.....35

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

L'ADN est le support de l'information génétique, se présentant sous forme d'une double hélice complémentaire où les bases AT et CG sont liés par des liaisons hydrogènes. Avant la division cellulaire, la quantité d'ADN de la cellule doit doubler afin que chaque cellule fille hérite d'une copie complète du génome, identique à la copie présente dans la cellule mère.

La réplication de l'ADN est donc une étape essentielle pour la croissance et le développement des êtres vivants, et elle doit être bien régulée afin de garantir la transmission fidèle de l'information génétique d'une génération à l'autre (**Hills et Diffley, 2014**). Cependant, la réplication de l'ADN peut également être une source de lésions de l'ADN. Le taux d'erreur de la machinerie de réplication est estimé de 10^{-7} à 10^{-8} . Ce faible taux d'erreur est dû à la fidélité des polymérases de réplication, qui ont un taux d'erreur entre 10^{-6} et 10^{-7} , et à l'élimination efficace de 90 à 99% des bases incorrectement appariées grâce à l'activité de correction de ces complexes (**Kunkel, 2004**).

Outre l'apparition de mésappariements dus à des erreurs de réplication, l'ADN des cellules subit constamment des dommages qui ont différentes origines. Tout d'abord, comme elles utilisent la lumière pour produire leur propre matière organique grâce la photosynthèse, les plantes sont constamment exposées aux rayons UV. Ces radiations peuvent endommager l'ADN par la formation de cyclo-butane pyrimidine dimers (CPDs). De plus, le métabolisme photosynthétique des plantes est une source majeure de ROS (espèces réactives de l'oxygène), qui peuvent endommager l'ADN par l'oxydation des bases (**Gill et Tuteja, 2010**). Enfin, en tant qu'organismes sessiles, les plantes font en outre face à divers stress biotiques et abiotiques, tels que les pathogènes, les polluants chimiques, les variations de température et les carences en eau, qui peuvent tous causer des dommages à leur ADN (**Suzuki et al., 2014**).

Ces lésions ponctuelles de l'ADN sont réparées par des mécanismes spécifiques qui reposent sur l'excision de la lésion et suivie de synthèse d'ADN, tels que la réparation des mésappariements (MMR) (**Chen et al., 2021**), la réparation par excision des nucléotides (NER) (**Feltrin et al., 2020**), et la réparation par excision de bases (BER) (**Buzas, 2016 ; Schmid-Siegert et al., 2017**), à l'exception des CPDs qui sont généralement réparés par des photolyases, enzymes apparentées aux cryptochromes qui utilisent la lumière bleue pour scinder le dimère de pyrimidines (**Zhang et al., 2017**).

Malgré l'efficacité des voies de réparation de l'ADN, les milliers de lésions qui affectent le génome de chaque cellule chaque jour peuvent conduire à la formation de dommages plus

délétères pour la cellule, qui activent une réponse cellulaire appelée DDR (DNA Damage Response). Dans ce cas, outre des gènes impliqués dans la réparation, des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire sont activés, afin de ne permettre la poursuite du cycle cellulaire qu'une fois les lésions réparées, et ainsi d'éviter la perte de matériel génétique.

En effet, une réparation inefficace ou incomplète des lésions ponctuelles peut conduire à la formation de cassures double-brin, ou perturber la réplication de l'ADN (**Mullenders, 2018**), ce qui peut également aboutir à la perte d'information génétique. Ainsi, le stress répliatif, qui correspond à l'altération de la réplication de l'ADN qui conduit à des perturbations dans la fidélité et l'efficacité de la réplication de l'ADN, est considéré comme une source majeure de dommages à l'ADN chez tous les êtres vivants (**Carr et Lambert, 2013**), c'est pourquoi l'équipe Dynamique des Chromosomes au sein de laquelle j'ai effectué mon stage s'intéresse plus particulièrement à ce processus.

L'objectif de mon stage était de confirmer l'interaction entre les protéines RPAs et la protéine LD en utilisant la technique de complémentation par fluorescence bimoléculaire (BiFC) pour confirmer l'interaction entre les protéines RPA et LD. La BiFC repose sur la reconstitution d'une protéine fluorescente (YFP) à partir de deux fragments, chacun fusionné à une protéine d'intérêt.

Cette étude se concentre sur les protéines RPAs, qui font partie des protéines qui interagissent avec LD en réponse à l'hydroxyurée, plus spécifiquement dans des conditions de stress répliatif. Pour atteindre cet objectif, j'ai cloné ces quatre gènes de RPA dans un vecteur d'entrée afin de les recombiner par la méthode GATEWAY dans des plasmides pBIFC. Cette approche permettra de réaliser la complémentation par fluorescence biomoléculaire et ainsi de confirmer l'existence de l'interaction entre RPA et LD.

SYNTHÉSE
BIBLIOGRAPHIQUE

I. La réplication de l'ADN et la réponse au stress réplicatif

I.1. La réplication de l'ADN

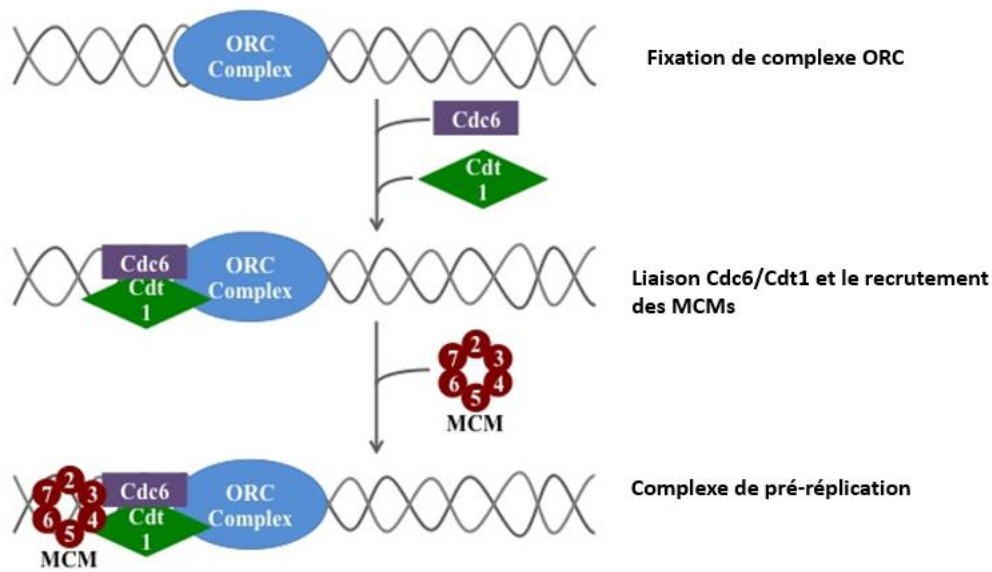
La réplication de l'ADN est semi-conservative, ce qui conduit à l'obtention de deux double-brins contenant chacun un brin matrice et un brin néo-synthétisé en fin de processus (**Meselson et Stahl, 1958**). Elle commence aux origines de réplication en phase G1, qui sont des régions spécifiques du génome chez les eucaryotes. Chez la levure, les origines de réplication sont identifiables par leur séquence (**Toyn et al., 1995**), tandis que chez les autres eucaryotes, elles n'ont pas de séquence consensus claire.

Le complexe ORC (Origin Recognition Complex) se fixe sur ces origines avec les protéines CDT1 (Chromatin Licensing and DNA Replication Factor 1) et CDC6 (Cell Division Cycle 6) et ensuite deux complexes MCMs (Minichromosome Maintenance Proteins) à activité hélicase sont recrutés de part et d'autre d'ORC. L'ensemble de ces protéines forme le complexe de pré-réplication qui reste inactif jusqu'à la phase S (**Figure 1**). En phase S, le complexe est activé par phosphorylation, et CDT1 et CDC6 se dissocient du complexe. C'est à ce stade que les ADN polymérases sont recrutées pour initier la réplication de l'ADN. Les doubles brins s'ouvrent par activité d'hélicase des MCMs qui dissocient les liaisons hydrogènes en hydrolysant de l'ATP. La protéine PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), qui est un facteur qui favorise la processivité des ADN polymérases, est également recrutée à cette étape, et permet la progression rapide de la fourche de réplication (**Bell et Labib, 2016**). Les brins séparés sont stabilisés par les protéines RPA (un hétérotrimère composé des protéines RPA1, 2 et 3). Pendant la réplication, L'ADN polymérase α synthétise des amorces d'ARN qui permet au ADN polymérase delta (Pol δ) de synthétiser de manière continue le brin précoce (leading strand) en ajoutant les nucléotides complémentaires le long du brin matrice. Sur le brin tardif (lagging strand) la primase synthétise des amorces d'ARN puis l'ADN polymérase α synthétise quelques bases d'ADN et ensuite l'ADN polymérase δ synthétise les fragments d'Okazaki et l'ADN polymérase α complète les espaces laissés par les amorces d'ARN. Enfin, les fragments d'ADN sont reliés les uns aux autres par une ADN ligase pour former un brin continu complet (**Leman et Noguchi, 2013**). L'organisation de la fourche de réplication est présentée sur la **Figure 2**.

I.2. La DDR et la réponse au stress réplicatif

Lorsque la réplication de l'ADN est perturbée, les cellules déclenchent un processus de signalisation appelé DDR (DNA Damage Response ou réponse aux dommages de l'ADN), permettant ainsi l'activation des points de contrôle ou checkpoints du cycle cellulaire et des mécanismes spécifiques de réparation de l'ADN. Les checkpoints du cycle cellulaire sont des mécanismes de contrôle essentiels pour garantir la précision de la division cellulaire et prévenir la prolifération de cellules anormales ou génétiquement endommagées (**Pedroza-Garcia et al., 2022**).

L'organisation générale de la signalisation au la DDR est conservée chez l'ensemble des eucaryotes, et son activation dépend de deux protéines kinases, Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) et Ataxia Telangiectasia and Rad3-related (ATR). ATM est principalement impliquée dans la réponse aux cassures double-brin de l'ADN, elle est activée par le complexe MNR (MRE11 NBS1 RAD50), alors qu'ATR est activée par l'arrêt de la progression de la fourche de réplication qui conduit à l'accumulation d'ADN simple brin. Elle est recrutée par les protéines RPA via d'autres complexes : ATRIP, 9-1-1 et RAD17/RFC (**Figure 3**). Ces deux voies de signalisation induisent à l'activation du facteur de transcription SOG1 qui contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans différents processus cellulaires. Il régule l'expression des gènes liés au contrôle du cycle cellulaire, à la mort cellulaire et à la réparation de l'ADN en réponse aux dommages (**Nisa et al., 2019**).



Figure

01 : la formation de complexe pré-réplication. (Valenzuela, 2012).

L'assemblage du complexe ORC (Origin Recognition Complex) sur les origines de réplication est initié par l'association avec les protéines CDT1 et CDC6, suivi du recrutement de deux complexes MCMs dotés d'une activité hélicase de part et d'autre du complexe ORC. Cette séquence d'interactions moléculaires donne lieu à la formation du complexe de pré-réplication (Diffley, 2011).

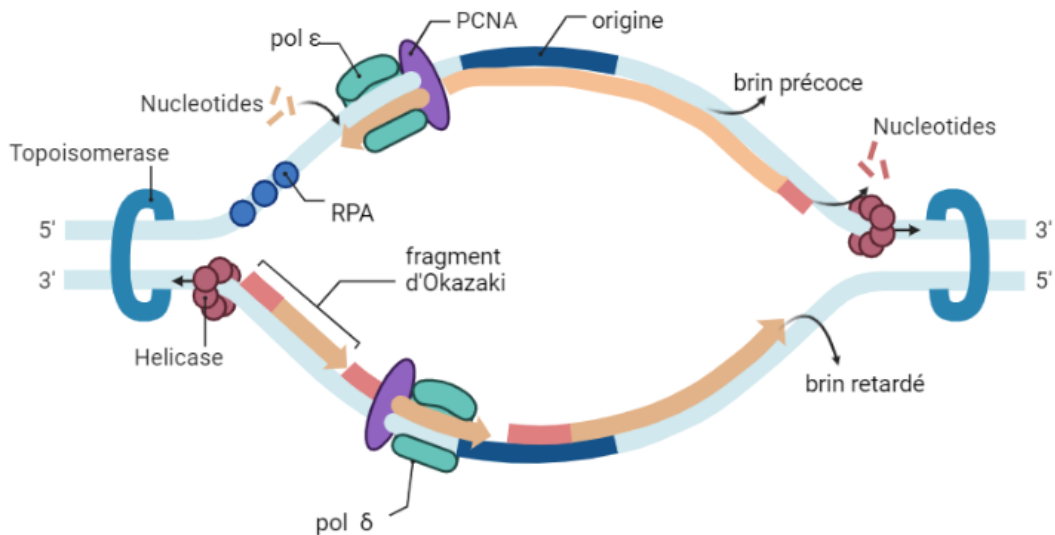


Figure 02 : Organisation de la fourche de réplication chez les eucaryotes (Magrin et al., 2021).

Les brins précoce et tardif sont répliqués respectivement par l'ADN polymérase ϵ et l'ADN polymérase δ . Les protéines PCNA (proliferating cell nuclear antigen) agissent comme un facteur de processivité, stabilisant les polymérases et facilitant leur déplacement le long de l'ADN. Les MCMs (Mini-Chromosome Maintenance) sont des complexes protéiques impliqués dans le déroulement de l'ADN, nécessaire pour exposer les brins matrices. Les RPA (replication protein A) sont des protéines de liaison à l'ADN simple brin qui protègent et stabilisent les brins exposés pendant la réplication. (Parker et al., 2017).

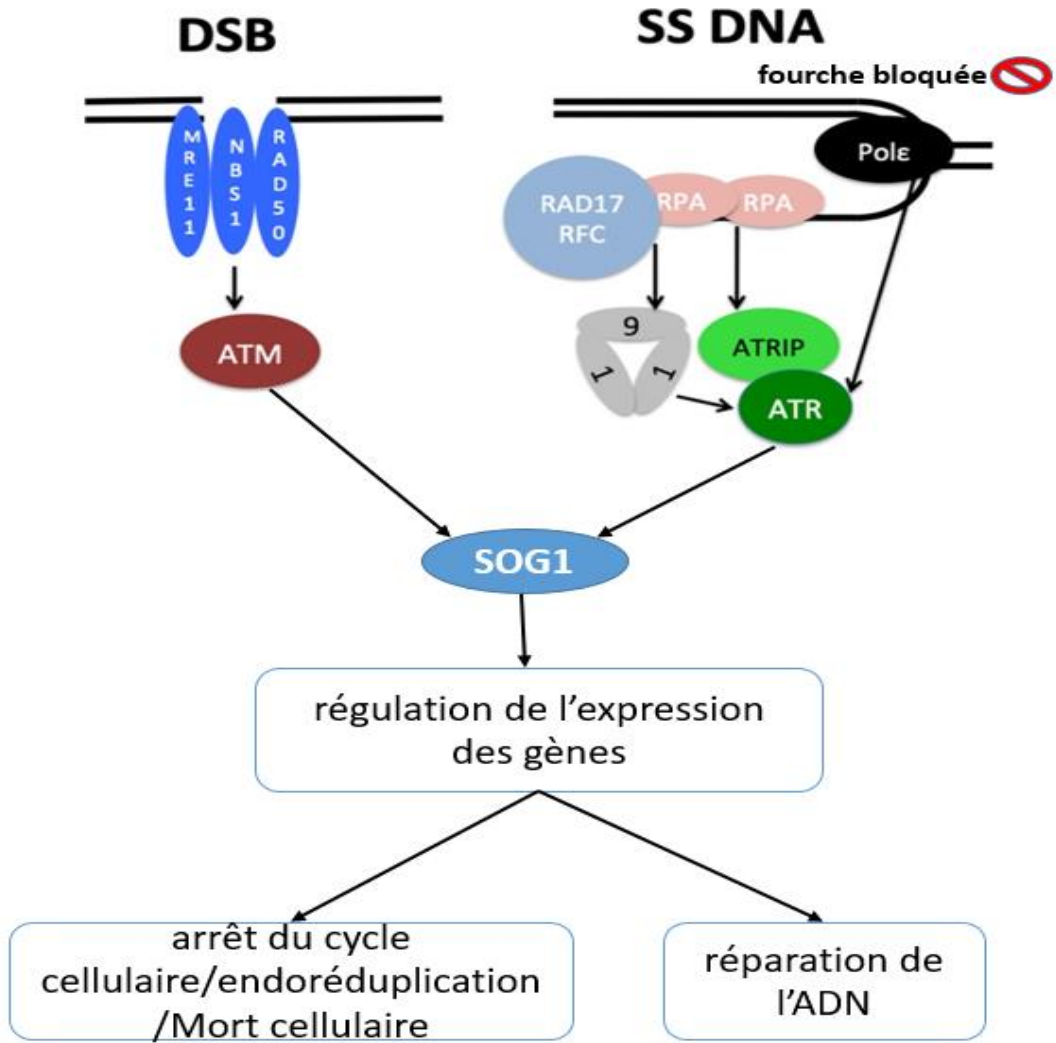


Figure 03 : L'activation de la réponse aux dommages de l'ADN (Nisa et al., 2019).

II. La protéine LUMINIDEPENDENS et son rôle potentiel dans la DDR

II.1. Mise en évidence de voies de signalisation de la DDR indépendantes de SOG1

Depuis plusieurs années, l'équipe Dynamique des Chromosomes s'intéresse aux mécanismes de réponse au stress réplicatif. Ils utilisent pour cela des lignées présentant une mutation ponctuelle dans le gène *POL2A*, qui code la sous-unité catalytique de l'ADN polymérase. Ce mutant présente un stress réplicatif constitutif (*Pedroza-Garcia et al., 2016, 2017*).

Afin de déterminer si les composants connus de la DDR étaient impliqués dans la réponse au stress réplicatif chez les plantes, le mutant *pol2a* a été croisé avec les mutants *atr* et *sog1*. Le double mutant *atr pol2a* présente un arrêt précoce du développement embryonnaire, ce qui montre que la protéine ATR est essentielle à la réponse au stress réplicatif. En revanche, le double mutant *sog1 pol2a* est viable, et une partie des gènes de la DDR restent activés dans ce double mutant (*Pedroza-Garcia et al., 2017*). Ce résultat démontre qu'il pourrait exister une voie alternative indépendante de SOG1 dans la réponse aux dommages de l'ADN lors du stress réplicatif.

II.2. Identification de LD comme un nouvel acteur de la réponse au stress réplicatif

Afin d'identifier des protéines impliquées dans cette voie indépendante de SOG1, l'équipe Dynamique des Chromosomes a développé une approche de génétique en recherchant des supprimeurs du mutant *pol2a*. Afin de disposer de deux critères de criblage, en suivant à la fois la restauration des défauts développementaux du mutant *pol2a*, et de l'expression des gènes de la DDR, ils ont utilisé des mutants *pol2a*, dans lesquels ils ont introduit un marqueur appelé CYCB1;1-GUS qui correspond au gène GUS, codant la bêta-glucuronidase, exprimée sous le contrôle du promoteur du gène *CYB1 ;1*. Ce marqueur permet de signaler l'activation de la DDR car la CYCB1;1 est induite par la DDR. La protéine GUS est une enzyme qui produit un précipité bleu en présence du substrat approprié. Après une mutagenèse avec de l'EMS pour induire des mutations aléatoires, les plantes ont été criblées à la génération M2, afin d'identifier les supprimeurs qui présentaient une croissance restaurée et une réduction de l'expression de *CYCB1;1*, puis ils ont réalisé un rétro-croisement. Les plantes de la génération BC2 ont été séparées en 2 groupes, l'un avec le phénotype parental (*pol2a*) et l'autre avec le phénotype

suppresseur. Puis ils ont identifié les SNP (Single-Nucleotide Polymorphism) propres aux supresseurs par séquençage du génome des deux pools de plantes et en comparant leur séquence d'ADN avec le génome de référence disponible dans la base de données TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource).

Enfin, dans le but d'éliminer les SNPs qui ne sont pas liés au phénotype supresseur, ils ont réalisé un génotypage dCAPS. Cette approche consiste à introduire un site de restriction spécifique par PCR afin de différencier deux allèles qui diffèrent par un SNP. En génotypant les plantes individuelles de la génération BC2, ils ont trouvé la mutation causale *soa225*. Cette mutation affecte le gène *LUMINIDEPENDENS* (*LD*). L'identification de *ld* comme supresseur des défauts de développement induits par le stress répliatif a été confirmée par l'obtention d'un mutant d'insertion dans le gène *LD* et la démonstration que les doubles mutants *ld pol2a* ont le même phénotype que *soa225*.

LUMINIDEPENDENS (*LD*) est un gène présent chez *Arabidopsis thaliana* et chez l'ensemble des végétaux terrestres. Il joue un rôle dans la régulation du temps de floraison en réponse aux conditions lumineuses. Selon l'annotation du génome, le gène *LD* code pour un facteur de transcription qui agit comme un répresseur de la floraison (Lee et al., 1994). *LD* est un composant du complexe de voie autonome (AuPC) impliqué dans la régulation de la floraison chez les plantes. Le complexe AuPC comprend également d'autres composants tels que *FLD*, *SDG26*, *EFL2*, *EFL4* et *APRF1* (Qi et al., 2022).

Une hypothèse simple permettant d'expliquer le rôle de *LD* dans la DDR aurait été qu'il régule des gènes de cette voie de signalisation. Cependant, les résultats obtenus jusqu'à présent au laboratoire suggèrent que *LD* aurait un rôle beaucoup plus général que celui de réguler quelques gènes impliqués dans un processus précis.

Ainsi, le mécanisme moléculaire impliquant *LD* dans la réponse au stress répliatif demeure mystérieux. Afin de mieux comprendre ce mécanisme, l'équipe a recherché les protéines capables d'interagir avec *LD* en conditions de stress répliatif : ils ont fusionné à la protéine *LD* une étiquette que l'on peut immunoprécipiter avec un anticorps, et ont réalisé l'expérience d'immuno-précipitation en conditions contrôle, ou en présence d'hydroxy-urée, une drogue induisant le stress répliatif. Cette drogue agit en inhibant la biosynthèse des désoxyribonucléotides, et bloque donc la répliation en privant les ADN polymérase de substrat. Les protéines associées à *LD* ont ensuite été identifiées par spectrométrie de masse.

La spectrométrie de masse a permis de voir toutes les protéines qui interagissent avec LD. On a trouvé 8 protéines dans la condition stress répliatif, et parmi ces protéines, 4 sont des protéines de répliation A (RPAs). Le complexe de répliation A est un complexe présent chez les eucaryotes, il est composé de trois sous-unités principales : RPA70 (RPA1) qui est la plus grande sous unité, RPA32 (RPA2), et RPA14 (RPA3). Ce complexe joue un rôle essentiel dans plusieurs processus liés à l'ADN, notamment la répliation, la réparation et la signalisation des dommages de l'ADN (**Krasikova et al., 2016**).

En outre, il a été observé que LD interagit également avec d'autres protéines(en condition control), notamment FLD et SDG26. Cette interaction est connue car LD fait partie du complexe de voie autonome (AuPC) qui est impliqué dans la régulation de la floraison chez les plantes (**Qi et al., 2022**).

Le tableau suivant représente les résultats de la spectrométrie de masse, où elle révèle des interactions entre LD et les différents sous unités de RPA (RPA1C, RPA2B, RPA3A et RPA3B) lors du stress répliatif, ainsi que des interactions LD-FLD et LD-SDG26 en condition contrôle. La présence de ces interactions dans la condition contrôle est un indicateur de la qualité de l'expérience, car ces partenaires sont déjà connus pour interagir avec la LD.

Tableau I : Résultats d'expérience de la spectrométrie de masse.

prot_acc	MQ enriched in 1 group (LFQ int)	prot_name
AT4G02560	no	LD Homeodomain-like superfamily protein
AT1G72630	no	ELF4-L2 ELF4-like 2
AT1G17455	no	ELF4-L4 ELF4-like 4
AT3G10390	no	FLD, RSI1 protein FLOWERING locus D-like protein
AT5G14530	no	APRF1 Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT1G76710	no	ASHH1, SDG26 SET domain group 26
AT4G18590	enriched with +HU vs standard	RPA3B Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
AT4G26410	no	RHIP1 chromosome-associated kinesin
AT3G24030	no	hydroxyethylthiazole kinase family protein
AT3G02420	no	dihydroflavonol 4-reductase/flavanone protein
AT5G15025	no	paired amphipathic helix Sin3-like protein
AT5G40480	no	EMB3012 embryo defective 3012
AT1G10390	no	DRA2 Nucleoporin autopeptidase
AT2G22370	no	MED18 mediator of RNA polymerase II transcription subunit
ATMG00640	no	ORF25 hydrogen ion transporting ATP synthases, rotational mechanism;zinc ion binding protein
AT1G14410	no	ATWHY1, PTAC1, WHY1 ssDNA-binding transcriptional regulator
AT3G18520	no	ATHDA15, HDA15 histone deacetylase 15
AT3G32930	no	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
AT3G56900	no	ALADIN Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein
AT5G53930	no	transcriptional regulator ATRX-like protein
AT3G02920	enriched with +HU vs standard	ATRPA32B, RPA2B, RPA32B Replication protein A, subunit RPA32
AT4G34700	no	AtCIB22, CIB22 LYR family of Fe/S cluster biogenesis protein
AT5G55100	no	SWAP (Suppressor-of-White-APricot)/surp domain-containing protein
AT4G09830	no	nuclear receptor family 2 group C protein
AT1G32990	no	PRPL11 plastid ribosomal protein l11
AT1G10890	no	arginine/glutamate-rich 1 protein
AT5G54800	no	ATGPT1, GPT1 glucose 6-phosphate/phosphate translocator 1
AT5G45400	enriched with +HU vs standard	ATRPA70C, RPA1C, RPA70C Replication factor-A protein 1-like protein
AT3G52630	enriched with +HU vs standard	RPA3A Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein
AT5G47040	no	APEM10, LON2 lon protease 2
AT1G72810	enriched with +HU vs standard	Pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzyme family protein
AT2G32000	no	DNA topoisomerase, type IA, core
AT3G14610	no	CYP72A7 cytochrome P450, family 72, subfamily A, polypeptide 7
AT1G29310	no	SecY protein transport family protein
AT4G32910	no	NUP85, SBB1 nuclear pore complex Nup85-like protein
AT5G18810	no	At-SCL28, SCL28 SC35-like splicing factor 28
AT2G03120	no	ATSP, SPP signal peptide peptidase
AT3G18610	no	ATNUC-L2, NUC2, NUC-L2, PARLL1 nucleolin like 2
AT2G45000	no	AtNUP62, EMB2766, NUP62 structural constituent of nuclear pore
AT1G14850	no	NUP155 nucleoporin 155
AT1G32220	no	NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein
AT3G07630	enriched with +HU vs standard	ADT2, AtADT2 arogenate dehydratase 2
AT1G48950	no	C3HC zinc finger-like protein
AT2G21790	enriched with +HU vs standard	ATRNR1, CLS8, DPD2, R1, RNR1 ribonucleotide reductase 1
AT1G79940	no	ATERDJ2A DnaJ / Sec63 Brl domains-containing protein
AT5G51200	no	EMB3142 nuclear pore complex protein (DUF3414)
AT2G34040	no	Apoptosis inhibitory protein 5 (API5)
AT2G41620	no	Nucleoporin interacting component (Nup93/Nic96-like) family protein
AT1G33410	no	ATNUP160, NUP160, SAR1 SUPPRESSOR OF AUXIN RESISTANCE1
AT3G07800	enriched with +HU vs standard	AtTK1a, TK1, TK1a Thymidine kinase
AT5G17410	no	Spc97 / Spc98 family of spindle pole body (SBP) component
AT5G13340	no	arginine/glutamate-rich 1 protein
AT3G20720	no	amino-terminal region of chorein
AT4G10930	no	RING/U-box protein
AT1G07950	no	MED22B Surfeit locus protein 5 subunit 22 of Mediator complex
AT5G43990	no	SDG18, SUVV2 SET-domain containing protein lysine methyltransferase family protein
AT1G04980	no	ATPDI10, ATPDIL2-2, PDI10, PDIL2-2 PDI-like 2-2
AT5G55660	no	DEK domain-containing chromatin associated protein
AT1G06230	no	GTE4 global transcription factor group E4

*Matériels et
méthodes*

II. Matériels et méthodes

La figure suivante résume les différentes étapes du clonage suivie lors de la réalisation du présent travail.

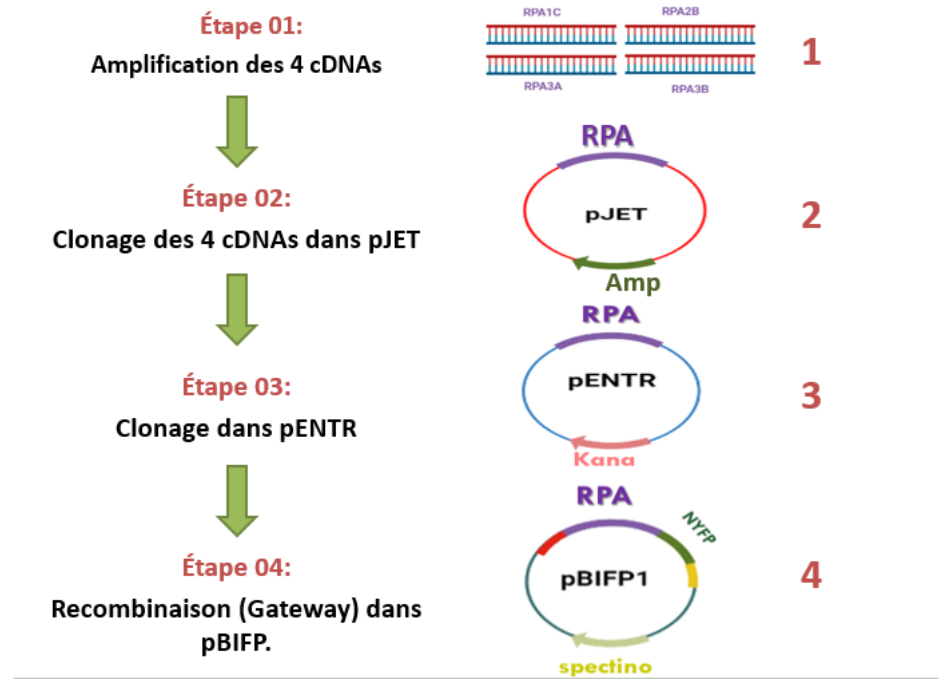


Figure 04 : Schéma récapitulatif de la procédure de clonage

La première étape consiste à amplifier les 4cDNAs (RPA1C, RPA2B, RPA3A, RPA3B) par PCR. Ensuite, nous avons utilisé le vecteur pJET pour cloner les quatre gènes de RPA. Le choix d'utiliser le vecteur pJET s'explique par sa facilité d'utilisation et sa capacité à cloner efficacement les fragments d'ADN. La troisième étape a impliqué le clonage des gènes RPA dans les vecteurs d'entrée pENTR. Ensuite, dans la dernière étape, nous avons effectué une recombinaison entre les constructions RPA-pENTR et le vecteur pBIFP en utilisant le système GATEWAY. Nous avons construit quatre vecteurs de pBiFP différents pour chaque RPA afin d'analyser spécifiquement l'interaction. Dans le premier vecteur, nommé pBiFP1, nous avons inséré la moitié N-terminale d'YFP avant le gène RPA. Dans le deuxième vecteur, pBiFP2, nous avons placé la moitié N-terminale d'YFP après le gène RPA. Pour le troisième vecteur, pBiFP3, nous avons introduit la moitié C-terminale d'YFP avant le gène RPA, et dans le quatrième vecteur, pBiFP4, nous avons intégré la moitié C-terminale d'YFP après le gène RPA.

I. Clonage des gènes codant les protéines RPA

I.1. Amplification par PCR Touchdown avec Q5 High-Fidelity DNA Polymerase

La PCR Touch-down utilise des températures d'hybridation décroissantes pour réduire l'amplification d'amorces non spécifiques et augmenter la spécificité de l'amplification de la séquence cible. Q5 L'enzyme High-Fidelity DNA polymerase (NEB) est utilisée pour amplifier des fragments d'ADN avec une grande fidélité et un faible taux d'erreurs de réplication. Elle est dérivée de l'espèce thermophile *Geobacillus stearothermophilus*. La réaction a été réalisée à partir d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*, selon les instructions du fabricant.

Toutes les amplifications par PCR ont été faites réalisées dans un volume final de 50 μ L avec :

- H2O.
- Tampon 5X Q5 Reaction Buffer.
- dNTPs 10mM de la marque PROMEGA.
- Q5 High-Fidelity DNA polymerase.
- 5X Q5 High GC Enhancer.
- Amorces sens et Amorces anti sens (Annexe 01).

Après amplification, l'ADN a été déposé sur gel d'agarose 0.5X Tris Acetate EDTA (de la marque Sigma-Aldrich) à 1% (g/V) et a migré dans un appareil d'électrophorèse après avoir été mélangé avec le tampon 0,5X Tris Acétate EDTA. Une photo du gel a été prise avec un Transilluminateur.

Les amplifications ont été faites avec une température de dénaturation à 94°C/30secondes et en ajustant la température d'hybridation pour chaque réaction en fonction de la température de fusion (T_m) des amorces, et le temps d'élongation en fonction de la taille de chaque fragment (**tableau II**).

Tableau II : Conditions des PCR et tailles attendues des amplicons pour les gènes RPA1C, RPA2B, RPA3A et RPA3B.

Noms	RPA1C	RPA2B	RPA3A	RPA3B
amorces	RPA70C (1C) FW+ RPA70C (1C) REV	RPA32B (2B) FW+ RPA32B (2B) REV	RPA3A FW+ RPA3A REV	RPA3B FW+ RPA3B REV
Conditions	-Touchdown : 60°C-55°C. -Élongation : 2min30.	-Touchdown: 60°C-55°C -Élongation : 1min	-Touchdown : 60°C-55°C -élongation : 30 secondes.	-Touchdown : 60°C-55°C -élongation :30 secondes.
Tailles attendues	2,5kb.	800pb.	300pb.	300pb.

I.2. Purification des fragments

La purification des fragments d'ADN à partir d'un gel d'agarose permet d'isoler les fragments spécifiques d'intérêt en éliminant le gel d'agarose.

Les purifications ont été faites en découpant la bande de gel contenant le fragment d'ADN d'intérêt sous une lumière UV, en utilisant un scalpel.

Toutes les purifications ont été faites en suivant le protocole de « DNA extraction from agarose gels » sur le kit de NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. ([T--Bielefeld-CeBiTec--MachereyNagel_PCRCleanup_Protocol.pdf \(igem.org\)](#)).

I.3. Ligation de fragments dans un plasmide

Avant la ligation, les concentrations d'inserts et de vecteurs sont estimées sur gel et la ligation s'effectue en présence d'un excès d'inserts par rapport au vecteur (environ 3 /1). On a inséré un fragment d'ADN dans un vecteur plasmidique, afin de produire un clone recombinant, en utilisant une enzyme appelée ligase, qui catalyse la formation de liaisons covalentes entre les extrémités complémentaires du fragment d'ADN et du plasmide.

Les ligations ont été faites en utilisant :

- 2µL de vecteur.
- 2µL de tampon NEB 10X.
- 1µL d'ADN ligase T4 NEB.
- H₂O (quantité suffisante pour 20µL).

Le mélange a été vortexé brièvement et centrifugé pendant 3 à 5 secondes, et incubé toute la nuit à 16°C dans un thermocycleur. La ligation a été dénaturée à 70°C pendant 10min.

I.4. Purification de ligation

Le produit de ligation a été purifié afin d'éliminer les contaminants tels que les enzymes et les réactifs.

Toutes les purifications ont été faites en suivant le protocole de « PCR clean-up » du kit de NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up. ([NucleoSpin Gel and PCR Clean-up User Manual \(takarabio.com\)](http://www.takarabio.com))

I.5. La transformation bactérienne par électroporation

Le but de la transformation bactérienne est d'insérer un plasmide contenant un gène d'intérêt dans une bactérie. Cette technique repose sur l'application d'un champ électrique à haute tension sur les cellules, ce qui crée des pores dans leur membrane et permet à l'ADN de pénétrer à l'intérieur.

Les transformations ont été réalisées en mélangeant 2-3µL de plasmides recombinants à 40µL de bactéries électro-compétentes. Ensuite le mélange a été incubé dans de la glace et transféré dans une cuve où une impulsion électrique unique de 1,8 kV a été appliquée à l'aide d'un électroporateur. Ensuite 700 µL de milieu de re-suspension SOC a été ajouté à la suspension cellulaire qui a été incubée à 37°C pour les *E.coli* et à 30°C pour l'*Agrobacterium* pendant 1 heure.

La suspension (toute la suspension pour *E.coli* et 5µL de suspension pour *Agrobacterium*) a été étalée sur une boîte de milieu solide LB contenant l'antibiotique approprié pour sélectionner les colonies contenant le plasmide transformé et elle a été incubée à 37°C sur la nuit pour *E.coli* et à 30°C pendant 48h pour l'*Agrobacterium*. Une PCR sur colonies a été faite afin de vérifier la présence du plasmide souhaité.

I.6. PCR sur colonies

La PCR sur colonies est une technique utilisée pour amplifier un fragment d'ADN spécifique à partir d'une colonie de bactéries qui contient un plasmide inséré.

Pour réaliser la PCR sur colonies, un petit échantillon bactérien est prélevé à l'aide d'une pointe de pipette stérile et déposé dans un tube de PCR contenant un mélange de :

- 2µL de Tampon 10X (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, 25mM MgCl₂, 1% Triton X-100).

- 0,5 µL de dnTP 10 mM.
- 0,5 µL d'amorces spécifiques 10 pmol/µL.
- 0,2 µL de Taq polymérase.
- H₂O (quantité suffisante pour 20 µL)

Puis les colonies ont été striées sur une boîte de milieu solide LB contenant l'antibiotique approprié.

La PCR débute par l'incubation du mélange réactionnel dans un thermocycleur, suivi d'une série de cycles de dénaturation, d'hybridation et d'extension. Une fois la PCR terminée, le produit amplifié doit être analysé par électrophorèse sur gel d'agarose pour vérifier sa présence et sa taille.

I.7. La mini-préparation d'ADN plasmidique

Cette technique permet d'isoler de petites quantités d'ADN plasmidique à partir d'une culture bactérienne.

Toutes les mini-préparations d'ADN plasmidique ont été faites en suivant le protocole suivant : « Protocol A. Plasmid DNA purification using centrifuges » à partir du kit « GeneJET Plasmid Miniprep » de Thermo Scientific ([Product Information: GeneJET Plasmid Midiprep Kit, #K0481 \(thermofisher.com\)](#))

I.8. Digestion enzymatique de plasmides

Cette technique est utilisée afin de cloner des fragments d'ADN ou d'analyser la structure du plasmide.

La digestion a été effectuée en préparant un mélange qui contient le tampon (FastDigest Green Buffer (1X)), 0,5µL d'enzyme de restriction adaptée et l'eau (pour un volume final de 20µL). Puis le mélange a été incubé à 37°C pendant au moins 30 min. Afin d'analyser les résultats de la digestion, une électrophorèse sur gel d'agarose a été effectuée.

I.9. La Recombinaison par le système Gateway

La recombinaison des plasmides est une méthode qui permet l'échange des fragments d'ADN entre deux plasmides. Elle est utilisée pour générer des constructions génétiques spécifiques. Elle a l'avantage de permettre un clonage orienté, et d'être précise à la base près ce qui permet de respecter le cadre de lecture pour réaliser des fusions traductionnelles.

Les recombinaisons ont été faites dans un volume final de 10 μ L en mélangeant 300ng de chaque construction RPA-pENTR, 300ng de vecteur pBIFP, 2 μ L de LR Clonase (qui contient le tampon) de la marque « Invitrogen by Thermo Fisher Scientific » et de H₂O.

Le mélange a été incubé dans un bain marie à 25°C pendant 1h, puis 1 μ L de protéinase K de la marque « Invitrogen by Thermo Fisher Scientific » a été ajouté au mélange qui a été incubé de nouveau dans un bloc chauffant à 37°C pendant 10min.

II. L'agro-infiltration sur les feuilles de *Nicotiana benthamiana*

Cette technique est largement utilisée en biotechnologie végétale pour introduire des gènes étrangers dans les tissus des plantes de manière transitoire. Dans ce protocole, nous avons utilisé l'agro-infiltration pour évaluer spécifiquement l'interaction entre les protéines RPA et LD en utilisant la technique de la BIFC.

Les agro-infiltrations ont été faites en suivant le protocole suivant :

Étape 1 : Préparation de la culture d'*Agrobacterium*

Une préculture d'*Agrobacterium* a été préparée en incubant 3 mL de celle-ci à 30°C pendant 16-18h.

Étape 2 : Préparation des cellules d'*Agrobacterium*

Après l'incubation, 2 ml de culture d'*Agrobacterium* ont été centrifugés à 2500g pendant 5 minutes pour séparer les cellules du milieu de culture.

Étape 3 : Rinçage des cellules d'*Agrobacterium*

Les cellules d'*Agrobacterium* ont été rincées pour éliminer les résidus du milieu de culture. Pour cela, un rinçage a été effectué en ajoutant 1 mL d'un tampon de rinçage préparé en mélangeant 1M de MgCl₂, de MES pH 5.2 à 0,5 M, et en complétant avec de l'eau. Le mélange a été vigoureusement vortexé puis centrifugé à 5000 g pendant 5 minutes. Cette étape de rinçage a été répétée une deuxième fois pour assurer une purification adéquate des cellules.

Étape 4 : Préparation du milieu d'infiltration

Les cellules d'*Agrobacterium* ont été resuspendues dans un milieu d'infiltration spécifique. Pour cela, les cellules ont été mélangées avec un milieu d'infiltration contenant de MgCl₂ à 1M, MES pH 5.2 à 1M, et complété avec de l'eau. En outre, 0.1M

d'Acetosyringone (une molécule qui stimule la virulence de l'agrobactérie) ont été ajoutés au milieu d'infiltration.

Étape 5 : Mesure de l'absorbance (OD 600)

L'absorbance de la suspension d'*Agrobacterium* a été mesurée à une longueur d'onde de 600 nm (OD 600) pour évaluer la densité cellulaire. Ensuite, la suspension a été diluée avec le milieu d'infiltration jusqu'à obtenir une valeur d'absorbance comprise entre 0.1 et 0.6 dans un volume total d'1 mL de milieu d'infiltration.

Étape 6 : Agitation dans un agitateur sur plateforme (rotamax 120 orbital shaker)

Après avoir ajusté l'absorbance, les tubes contenant les mélanges d'*Agrobacterium* et de milieu d'infiltration ont été placés dans un agitateur sur plateforme pendant 1 heure.

Étape 7 : Infiltration des feuilles de tabac

Les feuilles de tabac ont été infiltrées avec la suspension d'*Agrobacterium* préparée. À l'aide d'une seringue de 1 mL, 1 mL de la suspension a été délicatement injectée dans le tissu foliaire de la plante hôte, en créant des petites ouvertures à l'arrière de la feuille pour faciliter l'infiltration de la suspension.

Étape 8 : Observation des résultats de l'infiltration

Les résultats de l'infiltration ont été observés au bout de 3 jours après l'agro-infiltration à l'aide d'un microscope confocal. Les signaux fluorescents ont été analysés pour confirmer la présence d'interactions entre les protéines étudiées (LD-RPA).

Résultats

Résultats

I. Amplification des 4 cDNA

La première étape consiste à amplifier les ADNc que nous souhaitons cloner à partir d'ADNc totaux d'*Arabidopsis thaliana*. Cette amplification PCR a été réalisée en intégrant des sites de restriction spécifiques dans les amorces utilisées (**annexe 01**). Ces sites de restriction sont essentiels, car ils nous permettront ultérieurement de cloner les ADNc amplifiés dans le vecteur pENTR. Les réactions de PCR ont ensuite été soumises à une électrophorèse sur gel d'agarose, et les résultats de cette étape sont présentés sur la **figure 5**.

Les bandes correspondants à les bonnes tailles ont ensuite purifiées.

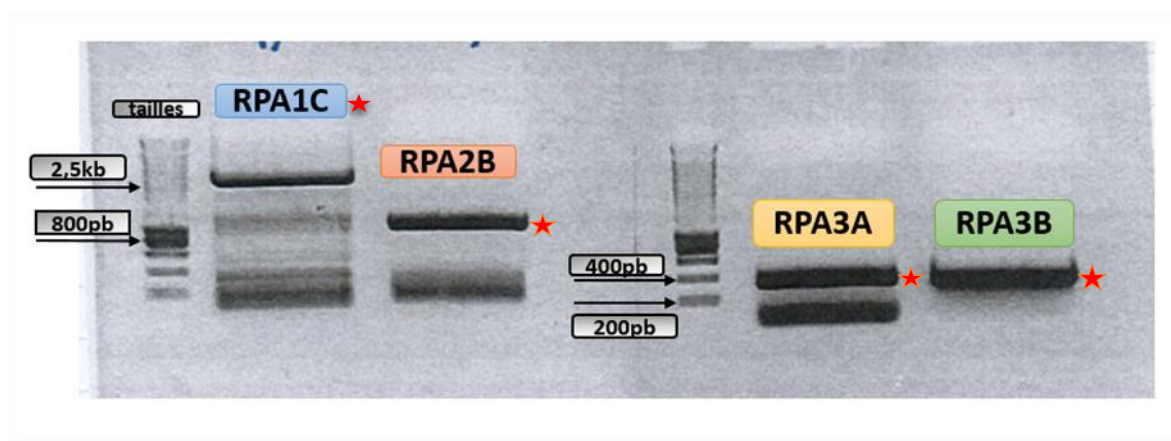


Figure 05 : Résultat de contrôle de PCR par électrophorèse montrant l'amplification des 4 gènes de RPA étudiés.

Dans cette photo de PCR, nous pouvons observer quatre bandes distinctes correspondant aux gènes RPA1C (2,5 kb), RPA2B (800 Pb), RPA3A (300 Pb) et RPA3B (300 Pb). Chaque bande marquée d'une étoile rouge représente l'amplification réussie d'une séquence spécifique d'ADN de la taille attendue. Un marqueur de taille (ladder) a été utilisé comme référence pour estimer la taille des produits amplifiés.

Les étapes suivantes le clonage étant identiques pour l'ensemble des constructions, elles seront illustrées à l'aide d'un seul exemple.

II. Clonage des 4 cDNA dans pJET

La 2ème étape consiste à liguer chaque fragment purifié dans pJET. Le vecteur pJET est commercialisé sous forme linéarisée et déphosphorylée, et les fragments d'ADN bord-francs sont directement ligués dans le vecteur.

Les plasmides recombinés ont été transformés dans des cellules hôtes *E.coli* électrocompétante et étalés sur milieu de culture LB contenant d'ampicilline a une concentration de 1µL/1mL. Puis une PCR sur colonies a été faite avec les mêmes amorces utilisées pour amplifier les 4 cDNAs.

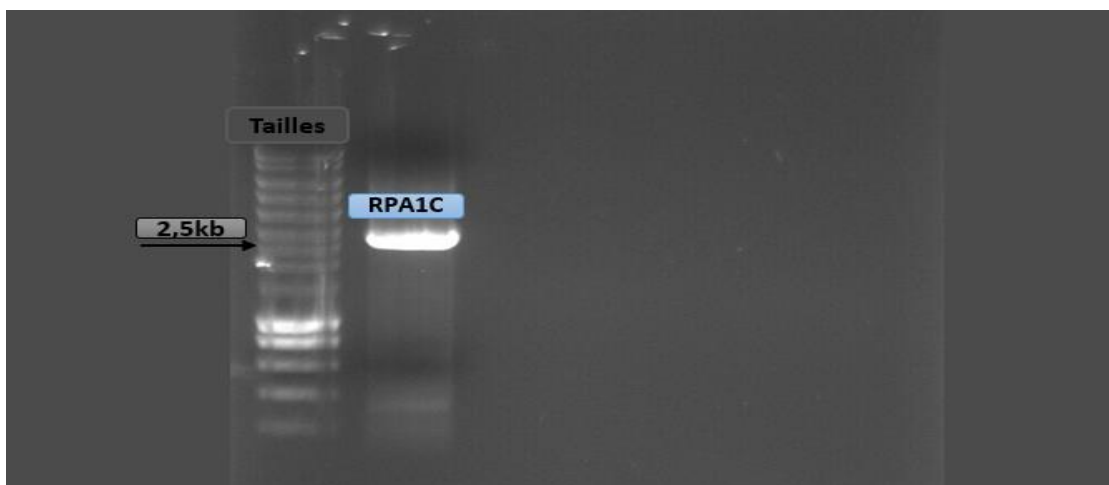


Figure 06 : Résultat de contrôle de PCR sur colonies par électrophorèse révélant la présence du gène RPA1C de 2.5Kb

La photo du gel de PCR sur colonie met en évidence la présence du gène RPA1C de 2.5Kb dans les colonies de la souche *E.coli* électrocompétante (DH5α). La bande d'ADN correspondante confirme l'amplification réussie du gène d'intérêt dans les colonies sélectionnées. Les résultats de PCR sur colonies ont été positifs pour les autres constructions.

En suite une Mini-préparations et digestion enzymatique de pJET a été réalisé pour vérifier.

Le **tableau III**, présente les plasmides recombinants RPA1C-pJET, RPA2B-pJET, RPA3A-pJET et RPA3B-pJET et les enzymes de restriction utilisées pour leur digestion. Les tailles attendues des fragments d'ADN après digestion sont également indiquées. Ces informations permettent de vérifier la réussite de la digestion et l'intégration du gène d'intérêt dans les vecteurs.

Tableau III : Analyse des tailles attendues après digestion des plasmides recombinants.

Noms	RPA1C-pJET	RPA2B-pJET	RPA3A-pJET	RPA3B-pJET
Enzymes de restriction	NotI, SalI, EcoR I	Not I, Sal I	NotI, SalI	NotI, SalI
Tailles attendues	-2,9kb -1,5kb -1kb	-2,9kb -800pb	-2,9kb -300pb	-2,9kb -300pb

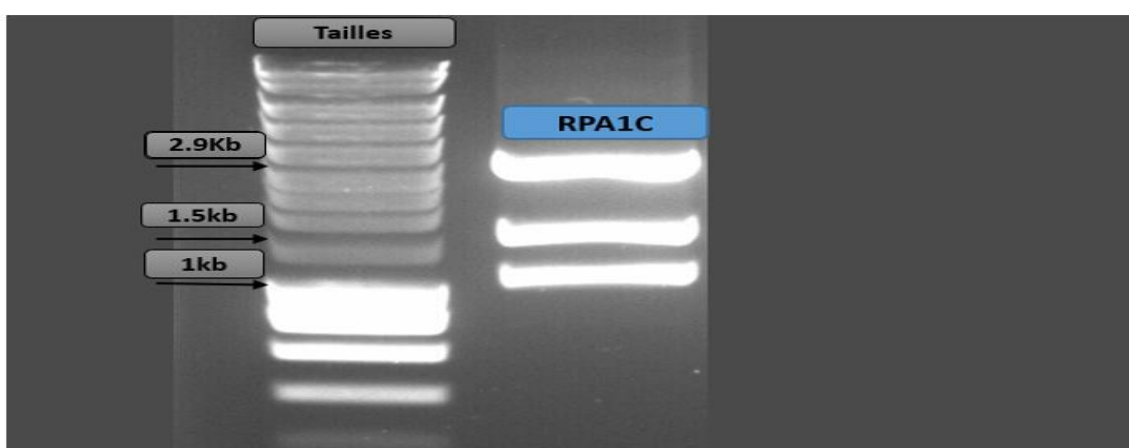


Figure 07 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique de construction RPA1C-pJET avec SalI, NotI, EcoRI.

La photo sur gel d'agarose montre le résultat de la digestion enzymatique de plasmide recombinant RPA1C-pJET. Les tailles des fragments d'ADN obtenus après digestion correspondent aux tailles attendues, confirmant ainsi une digestion réussie. Ce résultat confirme l'intégration réussie du gène d'intérêt dans les vecteurs. Les résultats ont été positifs pour les autres constructions.

Après le clonage dans pJET, nous avons vérifié qu'il n'y avait pas d'erreurs dans les séquences en envoyant les plasmides à séquencer à Eurofins. Une digestion des constructions dans pJET et purification des fragments.

Le tableau présente les constructions RPA1C, RPA2B, RPA3A et RPA3B, ainsi que les enzymes de restriction utilisées pour la digestion et les tailles des fragments d'ADN correspondants. En outre, il indique les fragments d'ADN spécifiques à purifier après la digestion, ce qui est essentiel pour isoler et utiliser ces fragments dans des étapes ultérieures

de l'expérience. Pour l'ensemble des constructions, les gènes RPA ont été clonés entre les sites Sall et NotI du vecteur pENTR3C. Cependant, pour RPA1C, la digestion par ces deux seules enzymes de la construction dans pJET aurait généré deux fragments de 2,5 et 2,9kb, qu'il aurait été très difficile de séparer sur gel d'électrophorèse. Nous avons donc ajouté une troisième enzyme, PvuI qui présente un site dans pJET, ce qui a permis de recouper le plasmide en deux, et ainsi d'isoler facilement le fragment correspondant à RPA1C.

Tableau IV : Analyse des constructions RPA-pJET par digestion enzymatique et purification des fragments d'ADN.

Noms	RPA1C	RPA2B	RPA3A	RPA3B
Enzymes	Sall	Sall	Sall	Sall
	NotI	NotI	NotI	NotI
	PvuI			
Tailles	2,5 kb	2,9kb	2,9kb	2,9kb
	1,7kb	800pb	300pb	300pb
	1,2kb			

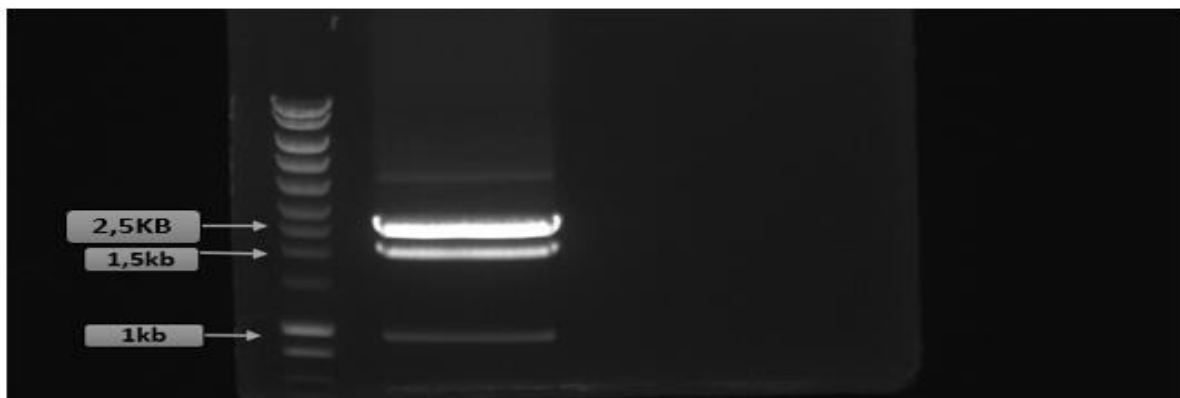


Figure 08 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique de pJET-RPA avec Sal, NotI, PvuI.

Les résultats de la digestion enzymatique de la construction RPA-pJET par les enzymes Sall, NotI et PvuI sont confirmés par la présence de bandes d'ADN sur le gel d'agarose. Les fragments d'ADN obtenus affichent des tailles attendues de 2,5 kb, 1,5 kb et 1,2 kb, indiquant une digestion réussie. Le fragment d'intérêt de 2,5Kb a été purifié.

Les résultats ont été positifs pour les autres constructions.

III. Clonage des RPA dans pENTR

Le clonage dans le vecteur pENTR se fait à l'aide d'enzymes de restriction, qui permettent de cloner les fragments d'ADN grâce aux extrémités cohésives générées par les enzymes de restriction dans l'orientation voulue, et en respectant le cadre de lecture

Digestion de pENTR avec Sall et NotI et purification du fragment de 2,7kb.

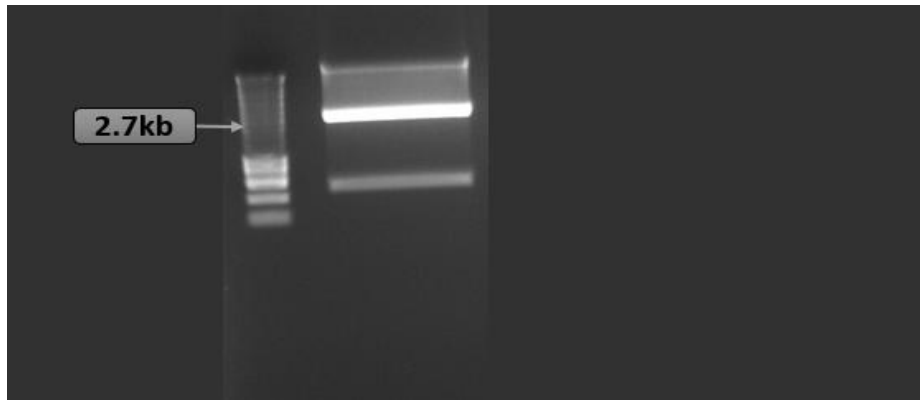


Figure 09 :Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique de pENTR par Sall et NotI.

Dans cette photo les résultats de la digestion enzymatique de pENRT par les enzymes de restriction Sall et NotI sont visibles. La présence d'une bande d'ADN de taille 2,7 kb confirme la digestion réussie de pENRT.

Après la digestion, une ligation de chaque gène dans pENTR a été effectuée. Ensuite, chaque construction (vecteur+ gène) a été transformé dans *E.coli* (DH5 α), et étaler sur milieu LB-kanamycine.

Les colonies obtenues suite à la culture sur milieu LB-Kanamycine (censés contenir le vecteur et le gène) ont été contrôlées par la PCR (en utilisant les memes couples d'amorces) suivie de l'électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%. Pour rappel les tailles attendues sont RPA1C (2,5Kpb), RPA2B (800pb), RPA3A (300pb) et RPA3B (300pb).

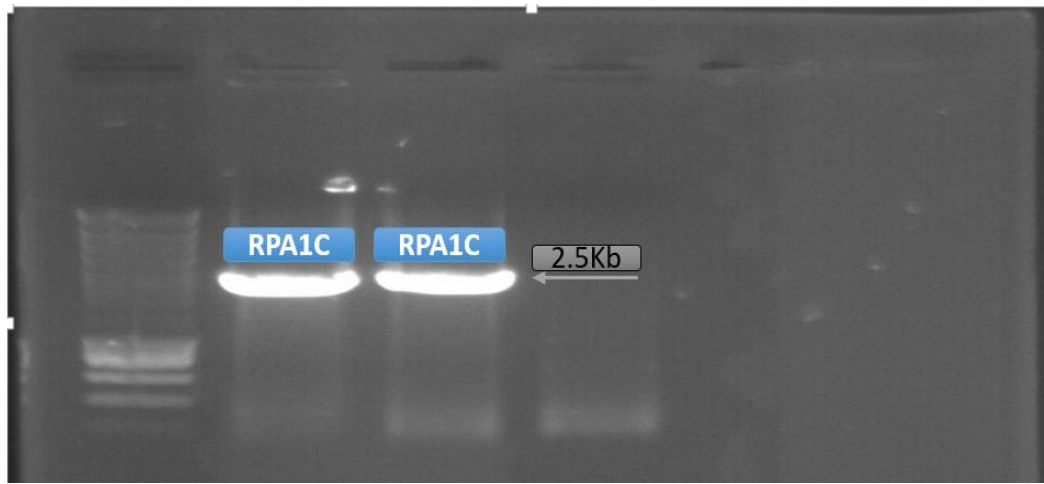


Figure 10 : Résultat de contrôle de PCR sur colonies par électrophorèse : RPA1C de taille 2,5 kb dans DH5alpha.

Sur cette photo de PCR sur colonies, les résultats sont positifs pour la présence de RPA1C dans DH5alpha. La présence d'une bande d'ADN de taille 2,5 kb confirme la réussite de l'amplification de RPA1C.

Des résultats positifs ont été trouvés pour les autres gènes.

Ensuite, une mini-préparation et digestion enzymatique ont été réalisées pour vérifier les constructions.

Les plasmides recombinants contenant les gènes RPA1C, RPA2B, RPA3A et RPA3B ont été soumis à une digestion enzymatique avec les enzymes de restriction SallI, NotI et PvuI. Les tailles attendues pour les produits de digestion sont dans le tableau suivant

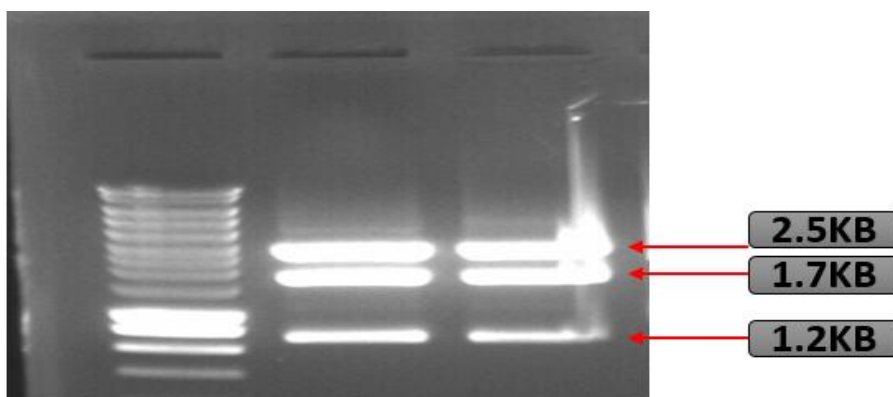


Figure 11 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique de RPA1C-pENTR.

La photo sur gel d'agarose présente les résultats de la digestion enzymatique de RPA1C-pENTR par les enzymes de restriction SallI, NotI et PvuI. Les différentes bandes observées sur le gel correspondent aux fragments d'ADN obtenus après la digestion. Les tailles des fragments, soit 2,5 kb, 1,7 kb et 1,2 kb, sont en accord avec les attentes théoriques. Ces résultats confirment le succès de la digestion enzymatique. Les résultats ont été positifs pour les autres digestions.

IV. Clonage Gateway

La dernière étape du clonage utilise le système Gateway™ (Invitrogen). Cette méthode de clonage permet de cloner un fragment d'ADN présent dans un vecteur d'entrée dans n'importe quel vecteur dit de destination. Comme un clonage par restriction, la réaction est orientée et se fait à la base près, ce qui permet de préserver le cadre de lecture. Le grand avantage de ce système est que le fait de disposer du gène d'intérêt cloné dans un vecteur d'entrée permet de générer grâce à une seule réaction toutes les constructions désirées en changeant seulement le vecteur de destination. Cette méthode est ainsi beaucoup plus rapide et efficace que le clonage par restriction.

Une préculture et minipréparation des 4 vecteurs de pBIFP (pBIFP1, pBIFP2, pBIFP3, pBIFP4) ont été réalisées. Ensuite chaque clone (RPA-pENTR) a été recombinaisonné dans les 4 vecteurs pBIFP. La réaction a été purifiée, et chaque plasmide recombinaisonné a été transformé dans *E.coli* (DH5 α). Ensuite une PCR sur colonies a été réalisée.

Ce tableau répertorie les conditions et les amorces ainsi que les tailles attendues des produits d'amplification par PCR sur colonies (DH5 α) pour les gènes RPA1C-pENTR, RPA2B-pENTR, RPA3A-pENTR et RPA3B-pENTR dans les 4 plasmides de pBIFP

Tableau V : Conditions de PCR sur colonies des gènes RPA dans les plasmides pBIFP

pBIFP1				
Gène	RPA1C	RPA2B	RPA3A	RPA3B
Primer fw	RPA1C FW	RPA2B FW	RPA3A FW	RPA3B FW
Primer rev	NYFP_REV	NYFP_REV	NYFP_REV	NYFP_REV
Condition pcr :	2min	1min30s	1min	1min
Élongation :72°C				
Taille attendue	2kb	1,1kb	600pb	600pb
pBIFP2				
Gène	RPA1C	RPA2B	RPA3A	RPA3B
Primer fw	35S dir	35S dir	35S dir	35S dir
Primer rev	RPA70C REV	RPA2B REV	RPA3A REV	RPA3B REV
Condition pcr :	2min30S	1min30s	1min	1min
Élongation 72°C				
Taille attendue	3kb	1,4kb	900pb	900pb
pBIFP3				
Gène	RPA1C	RPA2B	RPA3A	RPA3B
Primer fw	35S dir	35S dir	35S dir	35S dir
Primer rev	RPA70C REV	RPA2B REV	RPA3A REV	RPA3B REV
Condition pcr :	2min30s	1min30s	1min	1min
Élongation 72°C				
Taille attendue	3kb	1,4kb	900pb	900pb
pBIFP4				
Gène	RPA1C	RPA2B	RPA3A	RPA3B
Primer fw	RPA1C FW	RPA2B FW	RPA3A FW	RPA3B FW
Primer rev	CYFP1C_REV	CYFP1C_REV	CYFP1C_REV	CYFP1C_REV
Condition pcr	2min	1min30s	1min30s	1min30s
Élongation 72°C				
Taille attendue	2kb	1,1kb	600Pb	600Pb

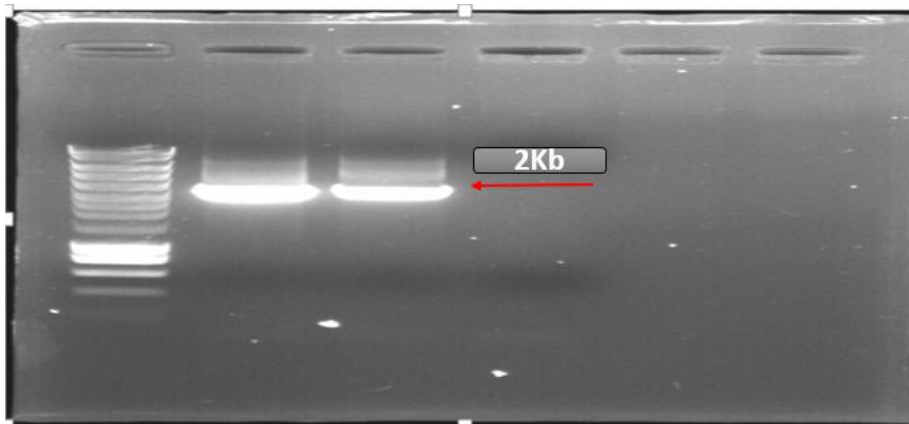


Figure 12 : Résultat de contrôle de PCR sur colonies par électrophorèse: RPA1C-pBIFP3 de taille 2kb dans *DH5alpha*.

La photo de PCR sur colonies confirme la présence réussie de RPA1C-pBIFP3 dans les bactéries DH5alpha, avec une bande d'ADN de taille 2 kb. Les autres PCR sur colonies ont également montré les tailles attendues.

Après PCR sur colonies, une préculture dans le milieu LB spectinomycine et mini préparations ont été réalisées. Ensuite une digestion par XhoI a été effectuée pour vérifier le bon déroulement de l'insertion.

Le tableau IV présente les tailles attendues des fragments de digestion pour chaque construction RPA-pBIFP avec l'enzyme de restriction XhoI. Les tailles attendues sont indiquées pour RPA1C-pBIFP, RPA2B-pBIFP, RPA3A-pBIFP et RPA3B-pBIFP, et elles devraient être un peu plus grandes pour pBIFP2 et pBIFP3 que pour pBIFP1 et pBIFP4 (environ 300pb d'écart). D'après les cartes des plasmides avec les positions du site de restriction XhoI (**Annexes02**).

Tableau VI : Digestion par XhoI des constructions RPA-pBIFP.

Noms	RPA1C-pBIFP	RPA2B-pBIFP	RPA3A-pBIFP	RPA3B-pBIFP
Taille attendues	10kb et 4,5kb	10kb et 2,8kb	10kb et 2,5kb	10kb et 2,5kb

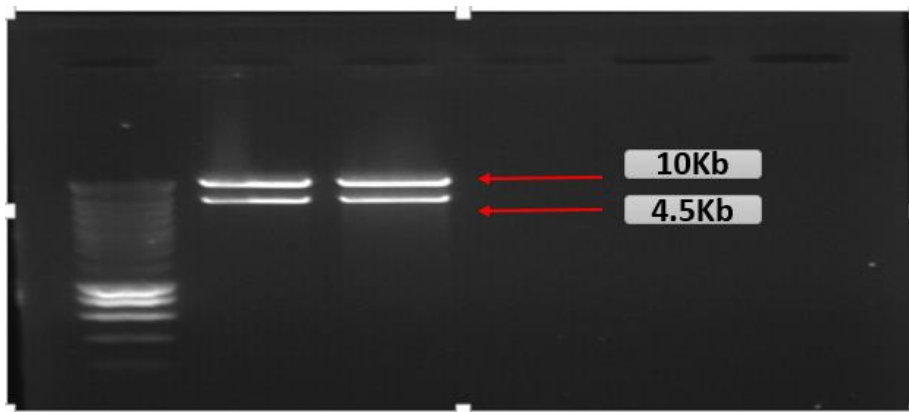


Figure 13 : Analyse par gel d'agarose de la digestion enzymatique par XhoI de RPA1C-pBIFP3

Ensuite, les constructions ont été transformées dans GV3101 *Agrobacterium* Electrocompétentes, et une PCR sur colonies a été effectuées avec les mêmes amorces pour vérifier que les bactéries sont bien transformées avec la construction souhaitée.

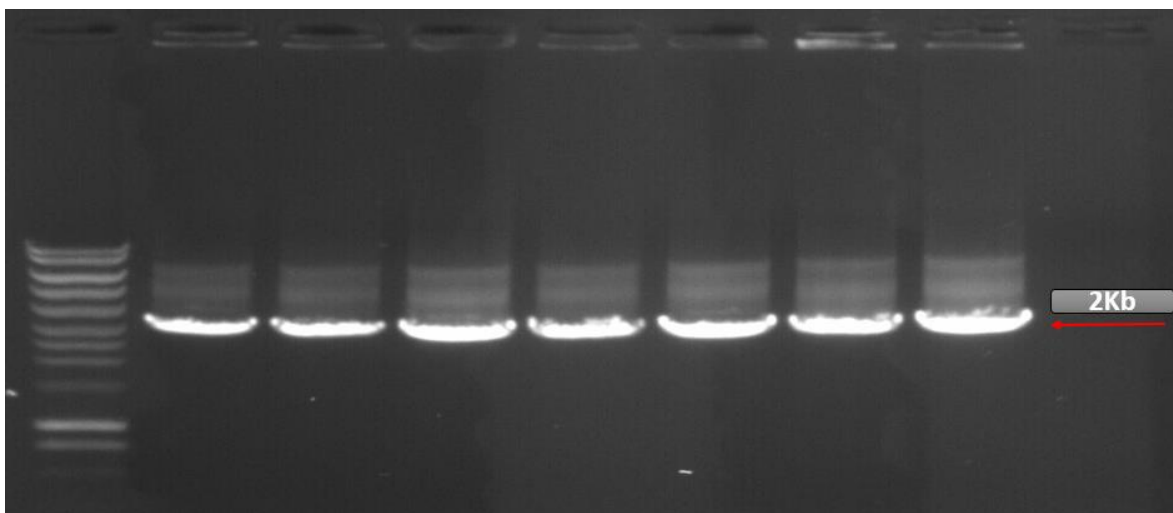


Figure 14 : Résultat de contrôle de PCR sur colonies par électrophorès: RPA1C-pBIFP3 de taille 2kb dans GV3101.

La vérification par PCR des colonies a confirmé avec succès la présence de RPA1C-pBIFP3 dans les bactéries *Agrobacterium*, en montrant une bande d'ADN de 2 kb, correspondant à la taille attendue. Les autres réactions de PCR réalisées ont également donné les résultats escomptés en termes de tailles d'ADN.

V. L 'Agroinfiltration dans les feuille de tabac

La dernière étape de mon projet consiste à réaliser une agro infiltration des constructions dans les feuilles de tabac en y ajoutant une souche spécifique d'*Agrobacterium* (HCPro) en plus des deux autres souches d'*Agrobacterium* (RPA-pBIIF) et (LD-pBIFP) Cette souche exprime un inhibiteur de silencing, et permet d'obtenir une meilleure expression des constructions d'intérêt. Une fois l'agro-infiltration réalisée, nous avons examiné les résultats en utilisant un microscope confocal pour observer la fluorescence. Ce type de microscope permet d'exciter les composés fluorescents à une longueur d'onde précise (514 nm), et ainsi de nous assurer de la spécificité de la fluorescence observée.

Dans chaque expérience, nous avons utilisé les facteurs de transcription NF-YB11 et NF-YC13 qui sont connus pour interagir, comme témoins positifs de l'expérience (**Figure 15a**). L'ensemble des interactions que nous avons testées est présenté dans le **Tableau VI**. Comme nous avons testé un très grand nombre de combinaisons, nous n'avons pas inclus de témoins négatifs dans cette première série d'expérience. Cependant, les combinaisons qui n'ont pas permis d'observer de la fluorescence peuvent être utilisées comme témoins négatifs pour interpréter nos résultats (**Figure 15b**), et nous montrent qu'aucun de nos constructions n'a donné de la fluorescence de manière systématique avec tous les partenaires testés, ce qui aurait pu révéler des interactions aspécifiques.

Nous avons observé que les protéines RPA1 et PRA2 (**Figure 15d**) sont capables d'interagir entre elles, ainsi que les protéines RPA2 et RPA3 (**Figure 15e**) De manière intéressante, ces protéines forment des foci à l'intérieur du noyau, ce qui suggère qu'elles s'associent de manière très localisée, peut-être au niveau de lésions de l'ADN. Enfin, nous avons pu observer une interaction entre LD et RPA2B ainsi qu'entre LD et RPA1C, mais ce de manière moins reproductible que les protéines RPA entre elles. Dans ce cas, les protéines ne s'associent pas sous forme de foci, mais semblent marquer l'ensemble du noyau de manière homogène. Cette difficulté à observer cette interaction suggère qu'elle est peut-être plus faible que celle des RPA entre elles, ou qu'elle nécessite un très fort niveau d'expression des deux partenaires pour être visible.

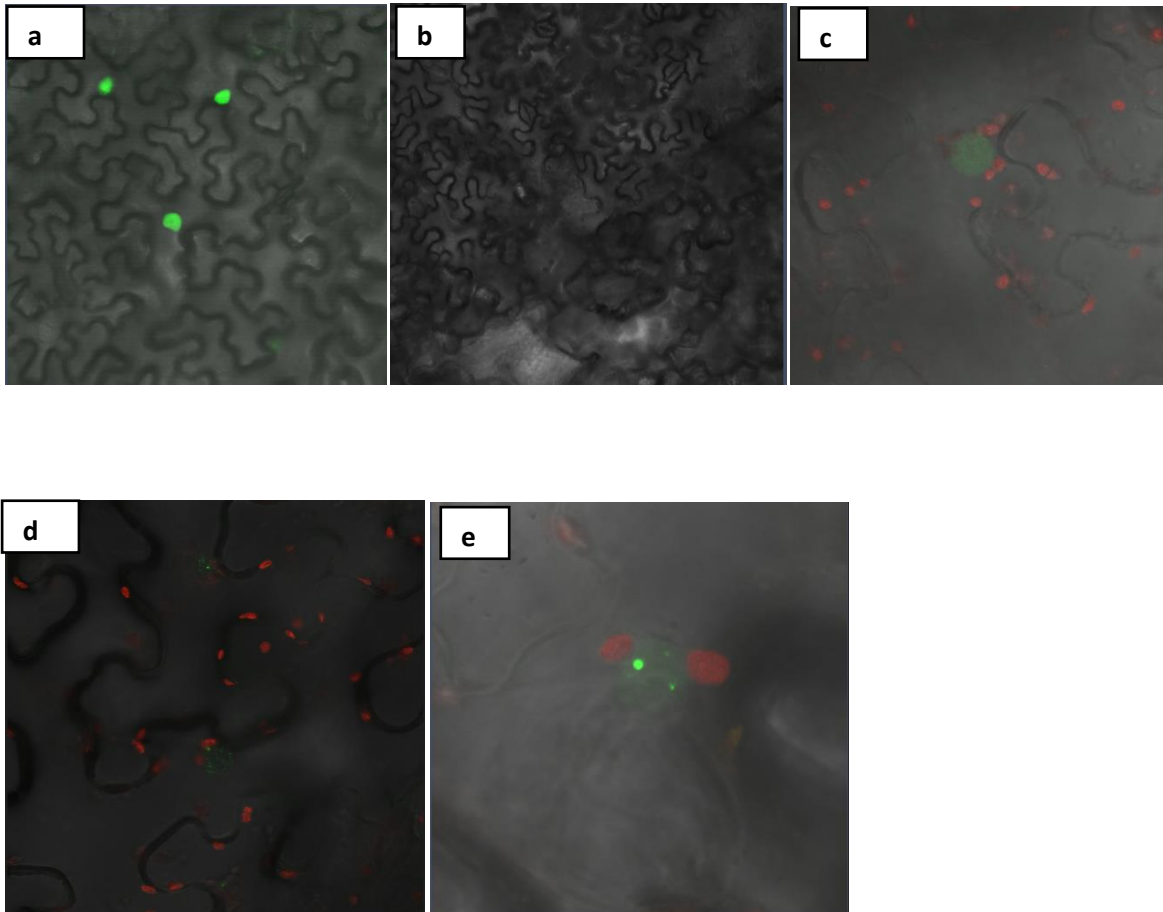


Figure 15 : les résultats de la BiFC.

(a) La première photo (témoin positif) montre une fluorescence verte intense localisée dans les noyaux, indiquant une interaction réussie. Ce témoin positif consiste en l'expression de NYFB11 dans le plasmide pBIFP2, contenant la moitié N-terminale de la protéine fluorescente YFP, et NYFC13 dans le plasmide pBIFP3, contenant la moitié C-terminale d'YFP.

(b) La deuxième photo (résultat négatif) présente l'absence de fluorescence verte dans les noyaux.

(c) La troisième photo montre une fluorescence verte intense localisée dans le noyau, confirmant spécifiquement l'interaction entre RPA2B dans pBIFP3, contenant la moitié C-terminale d'YFP, et LD dans pBIFP1, contenant la moitié N-terminale d'YFP. Ces résultats confirment de manière concluante l'interaction directe entre RPA2B et LD.

(d) La quatrième photo met en évidence une fluorescence verte localisée dans le noyau, confirmant spécifiquement l'interaction entre RPA2B dans pBIFP4, contenant la moitié C-terminale d'YFP, et RPA1C dans pBIFP1, contenant la moitié N-terminale d'YFP. Ces résultats apportent une preuve concluante de l'interaction directe entre RPA2B et RPA1C.

(c) la cinquième photo met en évidence une fluorescence verte localisée dans le noyau, confirmant spécifiquement l'interaction entre RPA2B dans pBIFP4, contenant la moitié C-terminale d'YFP, et RPA3B dans pBIFP1, contenant la moitié N-terminale d'YFP. Ces résultats confirment de manière concluante l'interaction directe entre RPA2B et RPA3B.

Le tableau VII, présente les résultats de l'analyse BiFC, mettant en évidence les interactions protéine-protéine. Les cases grises indiquent les interactions qui n'ont pas été testées. Les cases jaunes représentent les interactions testées, mais qui ont donné des résultats négatifs (0/3 indiquant aucun résultat positif sur 3 essais). En revanche, les cases vertes indiquent les interactions testées avec des résultats positifs (1/3 indiquant un résultat positif sur 3 essais).

Tableau VII : Résultats de la BiFC : Interactions testées et résultats positifs, négatifs et non testés.

	RPA1C- pbifp1	RPA2B- Pbifp1	RPA3A- pBIFP1	RPA3B- Pbifp1	RPA1C- pBIFP2	RPA2B- Pbifp2	RPA3A- Pbifp2	RPA3B- pBIFP2	LD- pBIFP1	LD- pBIFP2	NFYB11- pBIFP2
NFYC13- Pb3											
RPA1C- pBIFP3									0/3	0/3	
RPA2B- pBIFP3									1/3	0/3	
RPA3A- pBIFP3									0/3	0/3	
RPA3B- pBIFP3									0/3	0/3	
RPA1C- pBIFP4									0/3	0/3	
RPA2B- pBIFP4	2/3	0/2		2/3	2/3	0/3		2/3	0/3	0/3	
RPA3A- pBIFP4	0/2	0/2			0/2	0/2			0/3	0/3	
RPA3B- pBIFP4									0/3	0/3	
LD- pBIFP3	0/4	0/4	0/4	0/4	1/4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
LD- pBIFP4	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	

Discussion

Discussion

Le stress réplicatif est un type de stress extrêmement fréquent dans les cellules en prolifération chez tous les organismes. C'est un phénomène très étudié chez les animaux et notamment chez les mammifères, du fait de son implication potentielle dans l'apparition de maladies ou de cancers (**Patel et Kim,2023**). En revanche, chez les plantes, le stress réplicatif demeure relativement peu étudié, bien que l'équipe Dynamique des Chromosomes ait récemment montré que sa fréquence peut être augmentée par différents stress abiotiques (**Nisa et al.,2021**), ce qui pourrait faire de cette réponse un composant important de la réponse globale des plantes aux stress environnementaux.

En recherchant de nouveaux acteurs de la réponse stress réplicatif, l'équipe qui m'a accueillie a identifié la protéine LD. La fonction moléculaire de cette protéine au cours du stress réplicatif reste floue, mais elle pourrait agir en interagissant avec les protéines RPA, qui fixent l'ADN simple brin et jouent un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome, notamment lors de la réponse au stress réplicatif. Le présent travail visait à confirmer l'existence de cette interaction entre la protéine LD et les quatre protéines RPA (RPA1C, RPA2B, RPA3A, RPA3B) en réponse à l'hydroxy-urée.

Afin de mettre en évidence l'existence d'une éventuelle interaction entre les RPAs et LD, nous avons utilisé la technique de BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation). Nous avons pu observer une interaction entre les protéines RPA1C et RPA2B d'une part, et RPA2B et RPA3B d'autre part. Ces interactions avaient déjà été mises en évidence par **Byrne et Oakley,2019**. Ce résultat montre que les constructions RPA2B-pBIFP4 et RPA1C ou 3B dans pBIFP1 et 2 sont fonctionnelles. En effet, l'ajout d'une étiquette telle que l'YFP, ou même une portion de l'YFP peut interférer avec le repliement des protéines et empêcher d'observer des interactions qui pourtant existent entre les protéines natives. De manière surprenante, nous n'avons observé aucune interaction avec la protéine RPA3A, alors qu'elle est pourtant très proche de la protéine RPA3B (les deux protéines présentent en effet 81% d'identité). Les constructions contenant RPA3A pourront être vérifiées par séquençage afin de nous assurer qu'un décalage du cadre de lecture ne s'est pas produit lors de la dernière étape du clonage.

Nous pouvons également remarquer que les protéines RPA interagissent à l'intérieur des noyaux sous forme de foci, ce qui suggère qu'elles s'associent sur l'ADN, peut-être au niveau de lésions, ce qui expliquerait le petit nombre de foci observés dans chaque noyau (entre 1 et 5).

Nous avons également pu observer une interaction entre LD et RPA2B et LD et RPA1C. On peut remarquer que l'interaction entre LD et RPA1C a été obtenue avec une construction où la demi-YFP était fusionnée en N-terminal de LD, tandis que l'interaction avec RPA2B a été obtenue avec une fusion à l'extrémité C-terminale de LD. Ce résultat peut refléter l'organisation du complexe entre LD et les RPA, mais il reste à confirmer. En effet, contrairement aux interactions entre les protéines RPA, les interactions entre les RPA et LD n'ont été observées qu'une fois bien que l'expérience ait été reproduite plusieurs fois. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer ce résultat. Tout d'abord, les expériences ont été réalisées dans des feuilles de tabac complètement développées, en l'absence de stress réplicatif. Il est donc possible que dans ces conditions, l'affinité entre ces protéines soit faible, et qu'il faille des niveaux d'expression des deux partenaires très élevés pour que l'interaction soit visible. Afin de nous affranchir de ce problème, nous pourrions essayer de reproduire l'expérience dans de très jeunes feuilles de tabac, et éventuellement d'appliquer un traitement à l'hydroxy-urée. Une autre possibilité serait que l'interaction soit plus efficace en présence du complexe RPA complet, et non en présence d'une seule sous-unité. Pour tester cette hypothèse, il serait possible de faire des tests d'interaction tripartites, en ajoutant une autre protéine RPA non-étiquetée à l'interaction RPA1C/LD ou RPA2B/LD.

Malgré ces problèmes de reproductibilité, nos résultats suggèrent que LD est bien capable d'interagir avec le complexe RPA, ce qui peut nous aider à formuler des hypothèses sur son rôle dans la réponse au stress réplicatif. En effet, LUMINIDEPENDENS (LD) est impliqué dans la régulation du temps de floraison chez *Arabidopsis thaliana* (Lee et al., 1994 ; Hanke et al., 2007 ; Qi et al., 2022). Il régule ce processus avec les autres sous-unités du complexe de voie autonome (AuPC), les protéines FLD, SDG26, EFL2, EFL4 et APRF1 (Qi et al., 2022). Cette fonction semble a priori tout à fait déconnectée de la réponse au stress réplicatif. Cependant, le complexe formé par LD et FLD a probablement une fonction beaucoup plus générale dans la régulation de la transcription. En effet, FLD est une histone déméthylase qui catalyse le retrait d'une modification post-traductionnelle d'histone favorable à la transcription. Des résultats récents ont ainsi suggéré que LD et FLD pourraient réprimer la transcription d'un très grand nombre de gènes, notamment dans le cas où ils sont orientés de telle manière que leur transcription se fait de manière convergente. Ce mécanisme limiterait la tension au niveau de l'ADN (Inagaki et al., 2021). De plus, d'autres travaux ont montré que la transcription du locus *FLC*, qui est contrôlé par LD, peut interférer avec la progression de la fourche de réplication (Baxter et al., 2021). Un mécanisme possible serait donc que LD,

probablement en complexe avec FLD et d'autres protéines, pourrait jouer un rôle pour réprimer la transcription en cas de collision entre la fourche de réplication et une unité de transcription. Cette hypothèse est d'autant plus plausible que les protéines RPA qui ont été identifiées comme interagissant avec LD sont impliquées dans la réponse aux lésions de l'ADN. Par exemple, RPA1C appartient à une famille multigénique de 5 membres, et RPA1C et RPA1E paraissent jouer un rôle particulièrement important en réponse aux lésions de l'ADN (Aklilu,2014). De plus, la mutation *rpa1c* supprime partiellement l'hypersensibilité du mutant *atr* à l'hydroxyurée, ce qui montre l'implication spécifique de RPA1C dans la réponse au stress répliatif. De même, RPA2B semble impliquée dans la réponse aux lésions de l'ADN, et non faire partie des RPA qui assurent la réplication en l'absence de stress (Aklilu et al., 2020).

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Nos résultats, même s'ils restent à confirmer, suggèrent que la protéine LD interagit bien avec les protéines RPA. Afin de valider ces résultats, il sera important de finir de tester toutes les combinaisons possibles entre protéines RPA et LD par BiFC. Au-delà, il serait important de visualiser cette interaction dans des conditions plus physiologiques. Il serait notamment intéressant de réaliser des expériences d'immuno-localisation, afin de déterminer si LD et les protéines RPA se regroupent sous forme de foci dans le noyau des cellules en prolifération lorsqu'elles sont exposées à un stress répliatif.

Il serait également intéressant de déterminer si FLD s'associe également aux protéines RPA. L'équipe Dynamique des Chromosomes a montré que la mutation *fld* supprime également partiellement le phénotype du mutant *pol2a*, comme la mutation *ld*. Il est donc probable que FLD soit également associé aux protéines RPA en réponse au stress répliatif. À terme, il pourrait être intéressant de déterminer si les RPA recrutent LD et FLD au niveau des événements de stress répliatif.

Les protéines RPA identifiées étant spécifiquement impliquée dans la réponse aux lésions de l'ADN, et notamment dans la réponse au stress répliatif, un mécanisme possible pourrait être que le complexe RPA recrute la protéine LD au niveau des sites où la fourche de réplication est bloquée afin de ralentir la transcription, et ainsi de réduire les tensions due au super-enroulement de l'ADN, et/ou de stabiliser la fourche de réplication. Afin d'aller plus loin dans notre compréhension de ce mécanisme, plusieurs expériences pourront être menées. Tout d'abord, une expérience déjà en cours consistera en une quantification absolue des ARNs messagers dans les mutants *ld* par rapport aux plantes sauvages. En effet, si la fonction de LD est de moduler de manière très globale la transcription, nous pourrions ainsi observer des changements de quantité absolue de transcrits chez le mutant. La même expérience pourra être réalisée dans le double-mutant *ld pol2a*, pour le cas où cette fonction de LD ne serait observable qu'en condition de fort stress répliatif.

Ainsi, l'ensemble de ces expériences permettra de mieux comprendre comment LD est impliquée dans la réponse au stress répliatif, et d'affiner notre modèle sur son mécanisme d'action.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aklilu, B. B., Peurois, F., Saintomé, C., Culligan, K. M., Kobbe, D., Leasure, C., Chung, M., Cattoor, M., Lynch, R., Sampson, L., Fatora, J., & Shippen, D. E.** (2020). Functional Diversification of Replication Protein A Paralogs and Telomere Length Maintenance in Arabidopsis. *Genetics*, *215*(4), 989-1002.
- Aklilu, B. B., Soderquist, R. S., & Culligan, K. M.** (2014). Genetic analysis of the Replication Protein A large subunit family in Arabidopsis reveals unique and overlapping roles in DNA repair, meiosis and DNA replication. *Nucleic Acids Research*, *42*(5), 3104-3118.
- Baxter, C. L., Šviković, S., Sale, J. E., Dean, C., & Costa, S.** (2021). The intersection of DNA replication with antisense 3' RNA processing in Arabidopsis FLC chromatin silencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *118*(28), e2107483118.
- Bell, S. P., & Labib, K.** (2016). Chromosome Duplication in Saccharomyces cerevisiae. *Genetics*, *203*(3), 1027-1067.
- Bell, S. P., & Stillman, B.** (1992). ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature*, *357*(6374), 128-134.
- Buzas, D. M.** (2016). Emerging links between iron-sulfur clusters and 5-methylcytosine base excision repair in plants. *Genes & Genetic Systems*, *91*(2), 51-62.
- Carr, A. M., & Lambert, S.** (2013). Replication stress-induced genome instability : The dark side of replication maintenance by homologous recombination. *Journal of Molecular Biology*, *425*(23), 4733-4744.
- Cell cycle checkpoint control in response to DNA damage by environmental stresses—Pedroza-Garcia—2022—The Plant Journal—Wiley Online Library.* (s. d.).
- Chen, P. J., Hussmann, J. A., Yan, J., Knipping, F., Ravisankar, P., Chen, P.-F., Chen, C., Nelson, J. W., Newby, G. A., Sahin, M., Osborn, M. J., Weissman, J. S., Adamson, B., & Liu, D. R.** (2021). Enhanced prime editing systems by manipulating cellular determinants of editing outcomes. *Cell*, *184*(22), 5635-5652.e29.
- Diffley, J. F. X.** (2011). Quality control in the initiation of eukaryotic DNA replication. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *366*(1584), 3545-3553.
- Feltrin, R. D. S., Segatto, A. L. A., de Souza, T. A., & Schuch, A. P.** (2020). Open gaps in the evolution of the eukaryotic nucleotide excision repair. *DNA Repair*, *95*, 102955.

- Gill, S. S., & Tuteja, N.** (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 48(12), 909-930.
- Hanke, M.-V., Flachowsky, H., Peil, A., & Hättasch, C. (s. d.).**(2007)*No Flower no Fruit – Genetic Potentials to Trigger Flowering in Fruit Trees.*
- Hills, S. A., & Diffley, J. F. X.** (2014). DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Current Biology: CB*, 24(10), R435-444.
- Inagaki, S., Takahashi, M., Takashima, K., Oya, S., & Kakutani, T.** (2021). Chromatin-based mechanisms to coordinate convergent overlapping transcription. *Nature Plants*, 7(3), 295-302.
- Krasikova, Y. S., Rechkunova, N. I., & Lavrik, O. I.** (2016). [Replication protein A as a major eukaryotic single-stranded DNA-binding protein and its role in DNA repair]. *Molekuliarnaiia Biologiia*, 50(5), 735-750.
- Kunkel, T. A.** (2004). DNA replication fidelity. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(17), 16895-16898.
- Lee, I., Aukerman, M. J., Gore, S. L., Lohman, K. N., Michaels, S. D., Weaver, L. M., John, M. C., Feldmann, K. A., & Amasino, R. M.** (1994). Isolation of LUMINIDEPENDENS : A gene involved in the control of flowering time in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 6(1), 75-83.
- Lee, I., Aukerman, M. J., Gore, S. L., Lohman, K. N., Weaver, L. M., John, M. C., & Feldmann, K. A.** (1994). *Isolation of LUMINIDEPENDENS: A Gene Involved in the Control of Flowering Time in Arabidopsis.*
- Leman, A. R., & Noguchi, E.** (2013). The Replication Fork : Understanding the Eukaryotic Replication Machinery and the Challenges to Genome Duplication. *Genes*, 4(1), Article 1.
- Li, H., & Stillman, B.** (2012). The origin recognition complex : A biochemical and structural view. *Sub-Cellular Biochemistry*, 62, 37-58.
- Magrin, L., Fanale, D., Brando, C., Fiorino, A., Corsini, L. R., Sciacchitano, R., Filorizzo, C., Dimino, A., Russo, A., & Bazan, V.** (2021). POLE, POLD1, and NTHL1 : The last but not the least hereditary cancer-predisposing genes. *Oncogene*, 40(40), 5893-5901.
- Meselson, M., & Stahl, F. W.** (1958). THE REPLICATION OF DNA IN ESCHERICHIA COLI*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44(7), 671-682.
- Mullenders, L. H. F.** (2018). Solar UV damage to cellular DNA : From mechanisms to biological effects. *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the*

European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology, 17(12), 1842-1852.

Nisa, M.-U., Huang, Y., Benhamed, M., & Raynaud, C. (2019). The Plant DNA Damage Response : Signaling Pathways Leading to Growth Inhibition and Putative Role in Response to Stress Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 10, 653.

Oakley, G., Tillison, K., Opiyo, S., Glanzer, J., Horn, J. M., & Patrick, S. M. (2009). Physical Interaction between Replication Protein A (RPA) and MRN. *Biochemistry*, 48(31), 7473-7481.

Parker, M. W., Botchan, M. R., & Berger, J. M. (2017). Mechanisms and regulation of DNA replication initiation in eukaryotes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 52(2), 107-144

Patel, J. A., & Kim, H. (2023). The TIMELESS effort for timely DNA replication and protection. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 80(4), 84.

Pedroza-Garcia, J. A., Domenichini, S., Mazubert, C., Bourge, M., White, C., Hudik, E., Bounon, R., Tariq, Z., Delannoy, E., del Olmo, I., Piñeiro, M., Jarillo, J. A., Bergounioux, C., Benhamed, M., & Raynaud, C. (2016). Role of the Polymerase ϵ sub-unit DPB2 in DNA replication, cell cycle regulation and DNA damage response in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 44(15), 7251-7266.

Pedroza-García, J.-A., Mazubert, C., del Olmo, I., Bourge, M., Domenichini, S., Bounon, R., Tariq, Z., Delannoy, E., Piñeiro, M., Jarillo, J. A., Bergounioux, C., Benhamed, M., & Raynaud, C. (2017). Function of the Plant DNA Polymerase Epsilon in Replicative Stress Sensing, a Genetic Analysis. *Plant Physiology*, 173(3), 1735-1749.

Qi, P.-L., Zhou, H.-R., Zhao, Q.-Q., Feng, C., Ning, Y.-Q., Su, Y.-N., Cai, X.-W., Yuan, D.-Y., Zhang, Z.-C., Su, X.-M., Chen, S.-S., Li, L., Chen, S., & He, X.-J. (2022). Characterization of an autonomous pathway complex that promotes flowering in Arabidopsis. *Nucleic Acids Research*, 50(13), 7380-7395.

Remus, D., & Diffley, J. F. X. (2009). Eukaryotic DNA replication control : Lock and load, then fire. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(6), 771-777.

Schmid-Siegert, E., Sarkar, N., Iseli, C., Calderon, S., Gouhier-Darimont, C., Chrast, J., Cattaneo, P., Schütz, F., Farinelli, L., Pagni, M., Schneider, M., Voumard, J., Jaboyedoff, M., Fankhauser, C., Hardtke, C. S., Keller, L., Pannell, J. R., Reymond, A., Robinson-Rechavi, M., ... Reymond, P. (2017). Low number of fixed somatic mutations in a long-lived oak tree. *Nature Plants*, 3(12), 926-929.

Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *The New Phytologist*, 203(1), 32-43.

Toyn, J. H., Toone, W. M., Morgan, B. A., & Johnston, L. H. (1995). The activation of DNA replication in yeast. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(2), 70-73.

Valenzuela, M. S. (2012). Initiation of DNA Replication in the Human Genome. *Hereditary Genetics: Current Research, Suppl 1*(3), 4903.

Zhang, M., Wang, L., & Zhong, D. (2017). Photolyase : Dynamics and Mechanisms of Repair of Sun-Induced DNA Damage. *Photochemistry and photobiology*, 93(1), 78-92.

ANNEXES

Annexe 01

Tableau I : Les séquences d'amorces .

Gene	Amorces	Séquence
RPA1C	RPA70C (1C) FW	TTGTCGACCATGGCGGTGAGTTTGACGGA
	RPA70C (1C) REV	AAGCGGCCGCAAGTAGCTGCCTACATGTTGC
RPA2B	RPA32B (2B) FW	TTGTCGACCATGTACGGAGGCGATTTTGA
	RPA32B (2B) REV	AAGCGGCCGCGCGTTAGCAGTCGATTTGAA
RPA3A	RPA3A-FW	TTGTCGACCATGGATACTTCAAGTCCTTC
	RPA3A REV	AAGCGGCCGCAAGATGAACAAGTGCTTGA ACTC
RPA3B	RPA3B FW	TTGTCGACCATGGATACATCAAGTCCTGC
	RPA3B REV	AAGCGGCCGCAAGATGAACAAGTGTCTAAA

Annexe 02

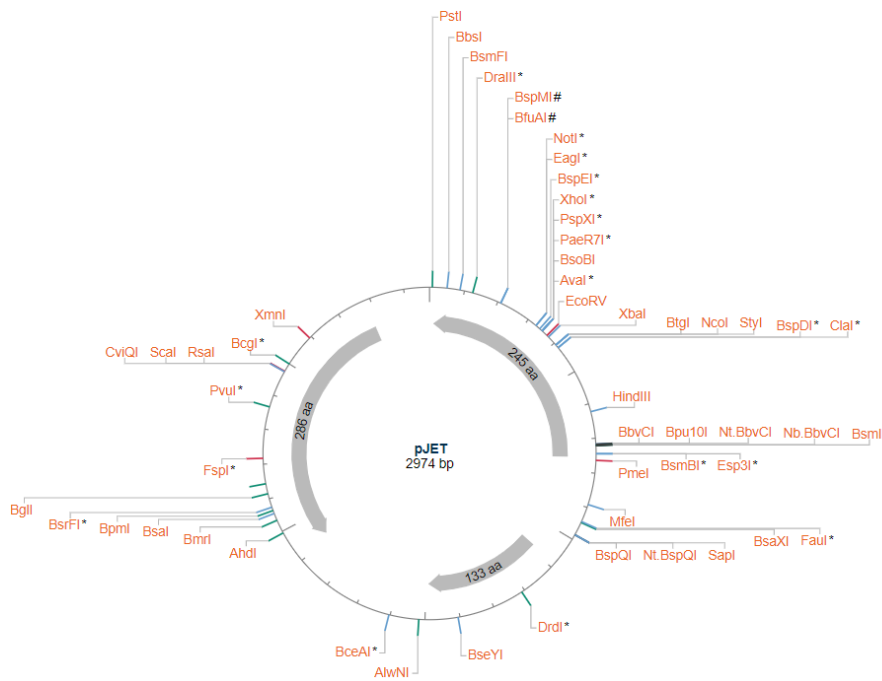


Figure 01 : La structure de pJET

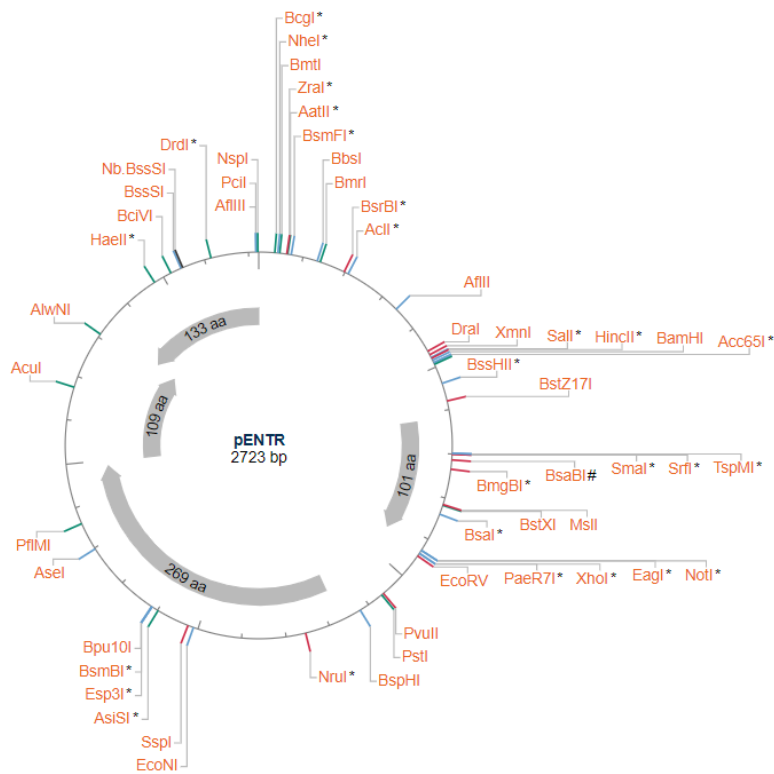


Figure 02 : La structure de plasmide pENTR

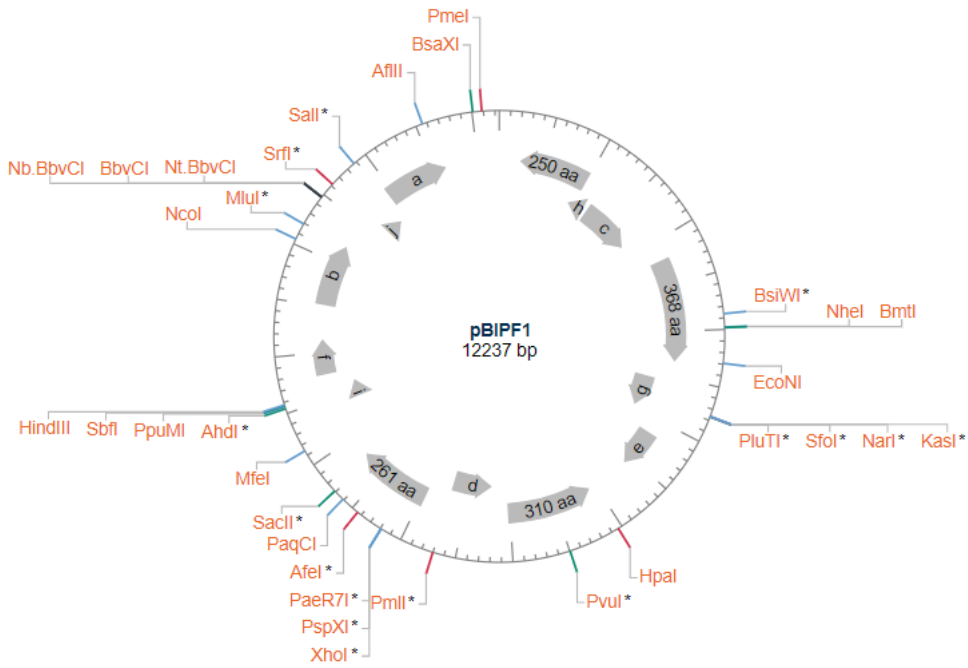


Figure 03 : La structure de plasmide pBIFP1

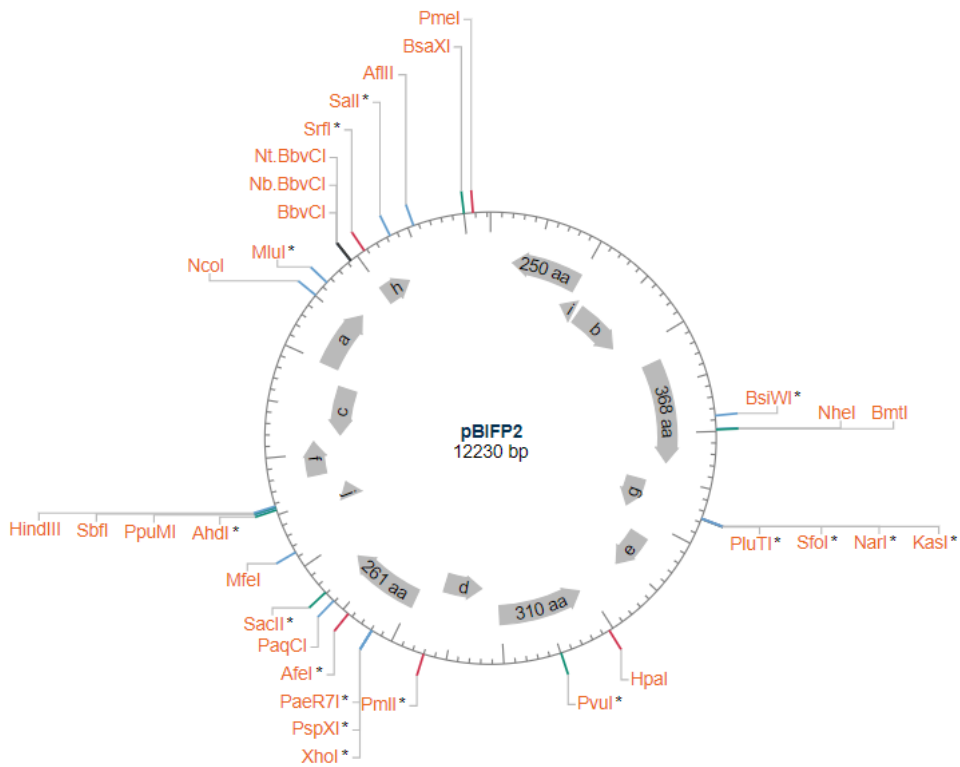


Figure 04 : La structure de plasmide pBIFP2

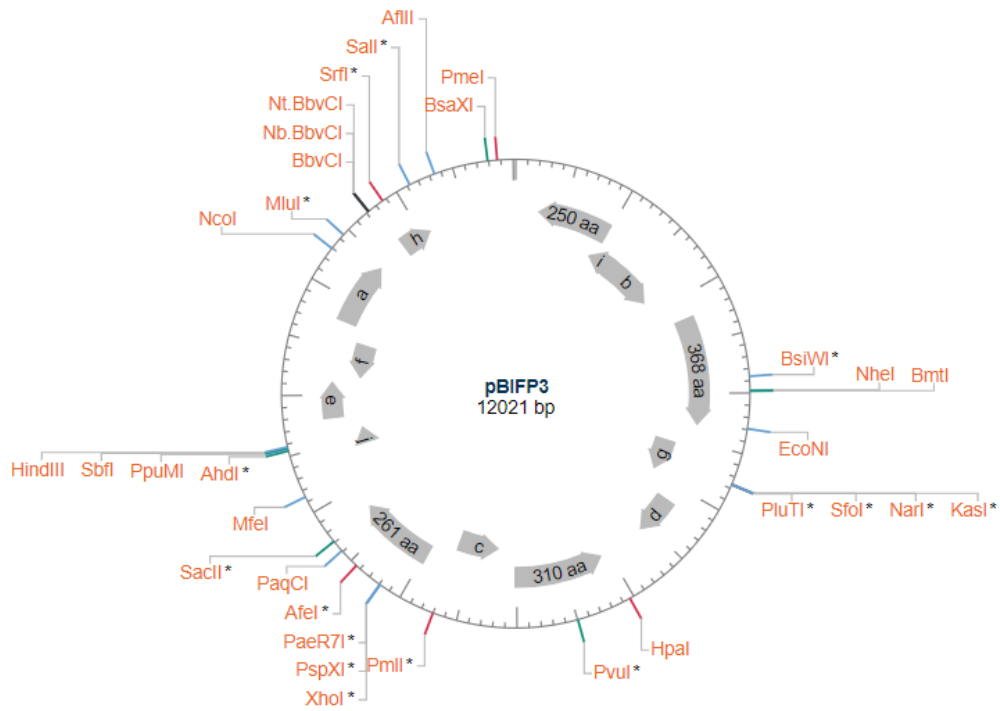


Figure 05 : La structure de plasmide pBIFP3

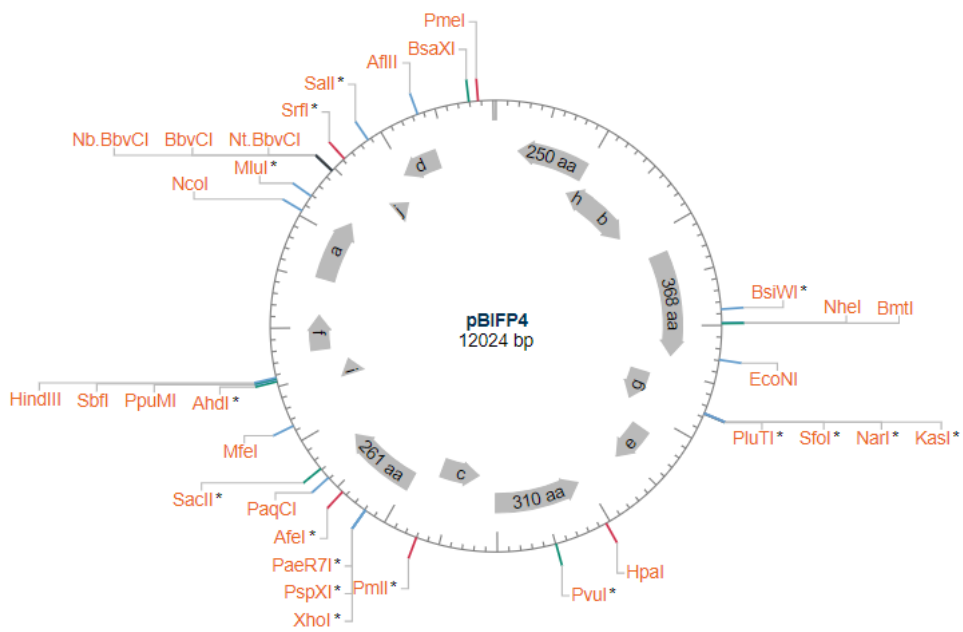


Figure 06 : La structure de plasmide Pbifp4

Résumé :

L'intégrité du génome est essentielle pour assurer la transmission fidèle de l'information génétique lors de la réplication de l'ADN. Cependant, l'ADN est constamment exposé à des lésions pouvant altérer sa structure et son fonctionnement. Ces lésions peuvent être causées par différents facteurs biotiques et abiotiques. La formation de lésions de l'ADN peut entraîner des erreurs de réplication, des cassures double-brin et d'autres altérations qui compromettent la stabilité et l'intégrité du génome.

Pour faire face à ces lésions, les cellules activent une réponse cellulaire appelée Réponse aux dommages de l'ADN (DDR). L'équipe Dynamique des Chromosomes, au sein de laquelle s'est déroulé mon stage, s'est intéressée à la compréhension du mécanisme de réponse au stress réplicatif. Ils ont identifié une protéine appelée LUMINIDEPENDENS (LD) comme un nouvel acteur potentiel dans cette voie. Cependant, le rôle précis de LD dans la réponse au stress réplicatif demeure encore mystérieux.

Pour mieux comprendre le mécanisme moléculaire impliquant LD, l'équipe a réalisé une expérience d'immuno-précipitation en présence d'hydroxy-urée. Ils ont identifié les protéines qui interagissent avec LD en utilisant la spectrométrie de masse. Les résultats obtenus ont révélé que LD interagit avec plusieurs protéines, dont quatre appartenant au complexe de réplication A (RPA). Ce complexe joue un rôle essentiel dans la réplication, la réparation et la signalisation des dommages de l'ADN. Les interactions entre LD et les différentes sous-unités de RPA ont été confirmées à l'aide de la technique de complémentation par fluorescence biomoléculaire (BiFC), qui permet de visualiser les interactions protéine-protéine. Plus spécifiquement, on a pu observer des interactions entre LD et RPA2B ainsi qu'entre LD et RPA1C. Nos résultats, même s'ils restent à confirmer, suggèrent que la protéine LD interagit bien avec les protéines RPA.

Summary:

Genome integrity is crucial for faithful transmission of genetic information during DNA replication. However, DNA is constantly exposed to damage that can alter its structure and function. These damages can be caused by various biotic and abiotic factors. The formation of DNA lesions can lead to replication errors, double-strand breaks, and other alterations that compromise genome stability and integrity.

To cope with these lesions, cells activate a cellular response called the DNA Damage Response (DDR). The Chromosome Dynamics team, where my internship took place, has been interested in understanding the mechanism of the replicative stress response. They have identified a protein called LUMINIDEPENDENS (LD) as a potential new player in this pathway. However, the precise role of LD in the replicative stress response remains mysterious.

To better understand the molecular mechanism involving LD, the team conducted an immunoprecipitation experiment in the presence of hydroxyurea. They identified the proteins that interact with LD using mass spectrometry. The results revealed that LD interacts with several proteins, including four belonging to the Replication Protein A complex (RPA). This complex plays an essential role in DNA replication, repair, and damage signaling. Interactions between LD and different subunits of RPA were confirmed using the bimolecular fluorescence complementation (BiFC) technique, which visualizes protein-protein interactions. Specifically, interactions were observed between LD and RPA2B, as well as between LD and RPA1C. Although our results need further confirmation, they suggest that the LD protein does indeed interact with RPA proteins.