



HAL
open science

Etude de deux régulateurs de l'APC/C et de leurs rôles dans le contrôle du cycle cellulaire et de la cohésion lors de la méiose chez *Arabidopsis thaliana*

Laurence Cromer

► **To cite this version:**

Laurence Cromer. Etude de deux régulateurs de l'APC/C et de leurs rôles dans le contrôle du cycle cellulaire et de la cohésion lors de la méiose chez *Arabidopsis thaliana*. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112046 . tel-00978052

HAL Id: tel-00978052

<https://theses.hal.science/tel-00978052>

Submitted on 17 Apr 2014

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.



UNIVERSITE PARIS-SUD – UFR des Sciences
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DU VEGETAL



Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ PARIS SUD

Par

Laurence CROMER

**Etude de deux régulateurs de l'APC/C et de leurs rôles
dans le contrôle du cycle cellulaire et de la cohésion lors
de la méiose chez *Arabidopsis thaliana*.**

Soutenue le **11 Avril 2013**, devant le jury d'examen :

Pascal GENSHIK	DR CNRS, IBMP – Strasbourg	Examineur
Olivier HAMANT	CR INRA, LRDP – Lyon	Examineur
Jean-Paul JAVERZAT	DR CNRS, IBGC – Bordeaux	Rapporteur
Raphaël MERCIER	DR INRA, IJPB – Versailles	Directeur de thèse
Jacqui SHYKOFF	DR CNRS, ESE - Orsay	Examineur
Marie-Hélène VERLHAC	DR CNRS, Collège de France - Paris	Rapporteur

Remerciements

Je tiens à remercier les membres du jury, Marie-Hélène VERLHAC, Jacqui SHYKOFF, Jean-Paul JAVERZAT, Pascal GENSHIK et Olivier HAMANT pour avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je voudrais particulièrement remercier Raphaël Mercier pour m'avoir permis d'intégrer la grande équipe Méiose et Recombinaison et pour m'accorder sa confiance depuis bientôt cinq ans. Merci de m'avoir permis de réaliser cette thèse et de m'avoir confié une thématique nouvelle dans l'équipe. Merci de m'avoir consacré tant de temps et d'énergie, de m'avoir tant appris sur les joies de la recherche et d'avoir partagé ton enthousiasme sur "Le résultat du Vendredi". Enfin merci d'avoir recruté l'ingénieur que j'étais il y a cinq ans et de m'avoir permis de devenir l'ingénieur-docteur que je suis maintenant.

Un grand merci à Sylvie Jolivet pour son aide technique si précieuse, son efficacité, sa bonne humeur et sa gentillesse à toute épreuve.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont participé à ces travaux. Merci à Isabelle d'Erfurth qui durant son post-doc a introduit la thématique cycle cellulaire dans l'équipe et qui sera toujours mon maître Jedi de la biologie moléculaire. Merci à Christine Horlow pour notre collaboration sur la protection de la cohésion. Merci à Liudmila Chelysheva pour son aide si précieuse en cytologie et nos longues discussions derrière les binoculaires ou les microscopes. Merci à nos collaborateurs : Katja Wassmann, Jefri Heyman, Arp Schnittger et Lieven De Veylder. Merci à mes deux stagiaires, Chloé et Emilie, qui ont survécu à cette expérience.

Je remercie tous les membres de l'équipe Méiose et Recombinaison. Merci à Mathilde, Christine, Fabien et Eric de s'être intéressé à mes histoires de cyclines et de m'avoir apporté leur aide et leur soutien.

Je remercie mes copines du labo pour tous les moments de détente. Merci pour votre soutien et pour toutes nos discussions autour de bières.

Je remercie également les serristes qui s'occupent quotidiennement de nos plantes ainsi que les membres de la plateforme de Cytologie et Imagerie Végétale.

Et merci à tous les membres passés et présents du bâtiment 7.

Liste des principales Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADN-T : ADN transféré

APC/C : Anaphase Promoting Complex / Cyclosome

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine-5'-triphosphate

EMS : Ethyl methanesulfonate

GFP : Green Fluorescent Protein

kDa : KiloDalton

pb, Kb, Mb : paire de bases, kilobase, mégabase

RNAi : RNA interference

SAC : Spindle Assembly Checkpoint

At : Arabidopsis thaliana

Ce : Caenorhabditis elegans

Dm : Drosophila melanogaster

Hs : Homo sapiens

Mm : Mus musculus

Os : Oryza sativa

Sc : Saccharomyces cerevisiae

Sp : Schizosaccharomyces pombe

Xl : Xenopus laevis

Zm : Zea mays

Liste des Tableaux et Figures

Figure B.I.1 : Cycle cellulaire et modification du cycle cellulaire

Figure B.I.2 : La méiose chez *Arabidopsis thaliana*

Figure B.II.1 : Arbre phylogénétique des différents gènes des CDKs et CDKs-like (CKL) identifiés chez *Arabidopsis thaliana*

Figure B.II.2 : Phylogénie et structure des domaines des 49 cyclines d'*Arabidopsis thaliana*

Figure B.II.3 : Représentation schématique de l'APC/C

Figure B.II.4 : Contrôle de la ségrégation des chromatides sœurs par le SAC (Spindle Assembly Checkpoint)

Figure B.II.5 : Progression au cours de la phase M

Figure B.II.6 : Régulation de l'APC/C au cours du cycle cellulaire

Figure B.II.7 : Progression au cours de la méiose

Figure B.II.8 : Régulation de l'APC/C au cours de la méiose

Figure B.II.9 : Modèle de régulation de l'APC/C par SpMES1 au cours de la méiose

Tableau B.II.1 : Composants et régulateurs de l'APC/C chez *Arabidopsis thaliana*

Tableau B.II.2 : Protéines impliquées dans l'activité CYC/CDK en méiose chez les levures

Tableau B.II.3 : Protéines impliquées dans la transition méiose I-méiose II

Figure B.III.1 : Dynamique des cohésines lors du cycle cellulaire mitotique et méiotique

Figure B.III.2 : Le complexe de cohésines et l'élimination de la cohésion

Figure B.III.3 : Les cohésines au cours du cycle cellulaire

Figure B.III.4 : Comportement des cohésines en mitose

Figure B.III.5 : Comportement des cohésines en méiose

Figure B.III.6 : Localisation de REC8 chez *Arabidopsis thaliana*

Figure B.III.7 : Elimination de la cohésion en méiose I

Figure B.III.8 : Comportement de la cohésion méiotique chez un mutant déficient dans la protection de la cohésion centromérique

Figure B.III.9 : Modèle du mécanisme moléculaire de la protection de la cohésion centromérique

Figure B.III.10 : Modèle de la déprotection de la cohésion centromérique par la tension

Tableau B.III.1 : Les sous-unités des cohésines chez les différents organismes modèles

Tableau B.III.2 : Shugoshin chez les différents organismes modèles

Figure B.IV.1 : Attachement du fuseau de microtubules aux chromosomes lors de la mitose et la méiose I.

Figure B.IV.2 : Différents types d'attachement kinétochores-microtubules.

Figure B.IV.3 : Organisation des kinétochores en méiose I et méiose II dans des oocytes de porc

Figure B.IV.4 : Modèle de l'organisation du centromère et des cohésines en mitose et en méiose I chez *S. pombe*.

Figure B.IV.5 : Position d'Aurora B selon la tension aux kinétochores en mitose et méiose I.

Tableau B.IV.1 : Les protéines impliquées dans la mono-orientation des kinétochores en méiose I.

Figure C.I.1 : *Arabidopsis thaliana*

Figure C.I.2 : Cycle de vie chez *Arabidopsis thaliana*

Tableau D.I.1 : Phénotype des mutants impliqués dans la progression du cycle méiotique

Article1 – Figures & Tableaux

Article2 – Figures & Tableaux

Article3 – Figures & Tableaux

Table des Matières

A.	CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE	8
B.	INTRODUCTION	10
I.	DIVISIONS CELLULAIRES.....	10
1.	<i>Généralités</i>	10
2.	<i>La méiose</i>	11
	Les différentes phases de la méiose	11
3.	<i>Méiose versus Mitose</i>	12
II.	REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE	14
1.	<i>Le cycle cellulaire</i>	14
1.1.	L'activité cycline/CDK	14
1.2.	L'APC/C.....	15
1.2.1.	Structure de l'APC/C.....	16
1.2.2.	Les activateurs de l'APC/C.....	16
1.2.3.	Les substrats de l'APC/C.....	17
1.3.	Contrôle de la progression du cycle cellulaire	18
1.4.	La progression au cours de la phase M.....	19
1.5.	La régulation de l'APC/C permet la progression ordonnée du cycle	19
1.5.1.	Régulation par le SAC	19
1.5.2.	Régulation par EMI1 chez les vertébrés	20
1.5.3.	Régulation par ACM1 chez <i>S. cerevisiae</i>	20
1.5.4.	Autres régulations de l'APC/C	20
2.	<i>Le "cycle cellulaire" méiotique</i>	21
2.1.	Cas particulier de la méiose femelle chez les vertébrés	21
2.2.	La prophase prolongée retarde l'entrée en méiose I	22
2.3.	L'activité CYC/CDK en méiose.....	22
2.3.1.	Chez <i>S. cerevisiae</i>	22
2.3.2.	Chez <i>S. pombe</i>	23
2.3.3.	Chez les vertébrés	23
2.3.4.	Chez les plantes.....	24
2.4.	La transition méiose I-méiose II.....	24
2.4.1.	Mise en évidence d'une activité résiduelle CYC/CDK lors de la transition méiose I-méiose II	25
2.4.2.	Maintien d'une activité CYC/CDK résiduelle.....	25
2.4.3.	Autres protéines essentielles à la transition méiose I-méiose II	27
2.5.	Autres particularités de l'APC/C en méiose.....	28
III.	LA COHESION.....	30
1.	<i>Cohésion</i>	30
1.1.	La cohésion lors de la mitose.....	30
1.2.	La cohésion lors de la méiose	30
2.	<i>Les cohésines en mitose</i>	31
2.1.	Structure des cohésines.....	31
2.2.	Chargement des cohésines sur la chromatine.....	32
2.3.	Mise en place et maintien de la cohésion entre chromatides sœurs	32
2.4.	Mécanismes d'élimination de la cohésion en mitose.....	33
2.4.1.	Destruction des cohésines par la séparase	33
2.4.2.	La "prophase pathway"	34
2.4.3.	Dégradation ou recyclage des cohésines	35
3.	<i>La cohésion et la ségrégation des chromosomes méiotiques</i>	35
3.1.	Les cohésines en méiose	35
3.1.1.	REC8, la kléisine méiose-spécifique.....	36
3.1.2.	La localisation des cohésines en méiose	36
3.2.	Elimination de la cohésion en méiose	37
3.3.	Protection de la cohésion centromérique	39
3.3.1.	Découverte des premières protéines impliquées dans la protection de la cohésion centromérique 39	
3.3.2.	Description des Shugoshins.....	40
3.3.2.1.	Rôle de Shugoshin chez <i>S. cerevisiae</i>	40
3.3.2.2.	Rôle des Shugoshin chez <i>S. pombe</i>	41
3.3.2.3.	Rôle de Shugoshin/MEI-S332 chez <i>D. melanogaster</i>	42
3.3.2.4.	Rôle des Shugoshin chez les vertébrés.....	42

3.3.2.5.	Rôle de Shugoshin chez <i>C. elegans</i>	43
3.3.2.6.	Rôle des Shugoshin chez les plantes.....	43
3.3.3.	La phosphatase PP2A coopère avec Shugoshin pour protéger la cohésion centromérique	44
3.3.3.1.	PP2A interagit avec SGO.....	44
3.3.3.2.	PP2A protège la cohésion centromérique en méiose et en mitose en déphosphorylant les cohésines	45
3.3.4.	La localisation centromérique du complexe de protection de la cohésion	46
3.3.4.1.	BUB1 recrute SGO qui recrute PP2A.....	46
3.3.4.2.	SWI6 est nécessaire à la localisation centromérique de SGO.....	46
3.3.5.	Elimination de SGO et déprotection de la cohésion centromérique	47
3.3.5.1.	Déprotection via l'APC/C	47
3.3.5.2.	Autres mécanismes d'élimination	48
3.3.5.3.	Modèle de la déprotection par la tension	48
3.4.	Régulateurs impliqués dans le maintien de la cohésion en méiose	49
IV.	ORIENTATION DES KINETOCHORES LORS DE MEIOSE.....	51
1.	<i>Le Kinétochore</i>	51
2.	<i>Orientation monopolaire des kinétochores lors de la première division méiotique</i>	52
2.1.	Le complexe monopoline	53
2.1.1.	Le complexe monopoline chez <i>S. cerevisiae</i>	53
2.1.2.	MOA1 chez <i>S. pombe</i>	53
2.2.	Rôle de la cohésion dans l'orientation monopolaire des kinétochores.....	54
2.2.1.	Protection de la cohésion centromérique et orientation monopolaire des kinétochores	55
2.3.	Rôle des kinases Aurora dans l'orientation monopolaire des kinétochores.....	56
3.	<i>Orientation des kinétochores en méiose II</i>	57
C.	LE MODELE D'ETUDE: ARABIDOPSIS THALIANA	58
1.	<i>Cycle de vie d'Arabidopsis thaliana</i>	58
2.	<i>Les mutants d'Arabidopsis thaliana</i>	59
D.	RESULTATS	60
I.	CARACTERISATION FONCTIONNELLE DE PROTEINES IMPLIQUEES DANS LA PROGRESSION DU CYCLE MEIOTIQUE	60
1.	<i>Préambule</i>	60
2.	<i>Caractérisation du mutant tam et de son rôle dans la progression du cycle méiotique</i>	61
2.1.	Principaux Résultats	61
2.2.	Article 1 : " The CYCLIN-A CYCA1;2/TAM Is Required for the Meiosis I to Meiosis II Transition and Cooperates with OSD1 for the Prophase to First Meiotic Division Transition" PLoS Genetics 2010	62
3.	<i>Etude de la progression méiotique chez A. thaliana</i>	79
3.1.	Principaux Résultats	79
3.2.	Article 2 : "OSD1 promotes meiotic progression via APC/C inhibition and forms a regulatory network with TDM and CYCA1;2/TAM" PLoS Genetics 2012.....	80
4.	<i>Données supplémentaires</i>	96
5.	<i>Discussions et perspectives</i>	97
6.	<i>Conclusion</i>	99
PATRONUS ET LA REGULATION DE L'APC/C DANS LA PROTECTION DE LA COHESION CENTROMERIQUE		101
1.	<i>Préambule</i>	101
2.	<i>La protection de la cohésion centromérique en méiose chez A. thaliana</i>	101
2.1.	Principaux résultats	101
2.2.	Article 3 : " Centromeric cohesion is protected twice at meiosis, by SHUGOSHINS at anaphase I and by PATRONUS, a putative APC/C regulator, at meiosis interkinesis" (en préparation)	102
3.	<i>Données supplémentaires</i>	116
4.	<i>Discussions et perspectives</i>	116
E.	DISCUSSION GENERALE	119
F.	MATERIELS & METHODES	120
G.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	122

A. CONTEXTE ET OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THESE

La méiose est un mécanisme essentiel à la formation des gamètes et commun chez les eucaryotes à reproduction sexuée. Des défauts dans le processus méiotique peuvent conduire à des problèmes de stérilité ainsi qu'à la formation de descendants aneuploïdes. La plupart des mutants méiotiques présentent des phénotypes communs entre les espèces étudiées. Au cours de ces dernières années, *Arabidopsis thaliana* est devenu un modèle majeur dans le domaine de l'étude de la méiose. Les outils génétiques, moléculaires, cytologiques ainsi que la possibilité de mener de grands cribles génétiques ont permis de confirmer mais également de découvrir de nouveaux gènes impliqués en méiose.

Depuis quelques années, l'équipe « Méiose & Recombinaison » de l'INRA de Versailles s'attache à comprendre les différents processus méiotiques tels que l'initiation de la recombinaison, la localisation et la distribution des crossing-over, les voies de réparation des cassures double brin ou encore le contrôle de la recombinaison méiotique chez les espèces polyploïdes.

La plupart des études sur la méiose chez *Arabidopsis*, porte sur la recombinaison méiotique. A ce jour, peu de données sont disponibles sur les autres mécanismes méiotiques. L'objectif de mon travail de thèse était de décrypter les mécanismes moléculaires permettant l'enchaînement de deux divisions "équilibrées" pour la production de gamètes haploïdes. Au cours de ces travaux, j'ai cherché à appréhender plus particulièrement les mécanismes impliqués dans la progression du cycle et la dynamique des chromosomes en méiose.

Afin d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans le processus méiotique chez *Arabidopsis*, un crible transcriptomique basé sur des données d'expression de gène d'*Arabidopsis* a été mené. Ce crible *in silico* permet de comparer le profil relatif d'expression de deux gènes. Ainsi, en utilisant des gènes méiotiques connus comme appâts, une centaine de gènes ont été retenus (d'Erfurth et al., 2008). Des lignées d'insertion, dans ces gènes, ont été analysées et trois présentaient des défauts méiotiques originaux. Le premier gène, *AtPS1*, a été caractérisé au sein de l'équipe comme impliqué dans l'orientation des fuseaux en méiose II (d'Erfurth et al., 2008). Lorsque j'ai intégré le laboratoire le second mutant, *Atosd1*, avait été caractérisé (d'Erfurth et al., 2009).

Dans un premier temps, j'ai réalisé une étude plus approfondie d'*AtOSD1* et recherché d'autres protéines nécessaires au contrôle du cycle cellulaire méiotique. J'ai réalisé une analyse fonctionnelle des gènes correspondants et j'ai mis en évidence un réseau fonctionnel de protéines impliquées dans la progression du cycle méiotique. J'ai également mis en évidence la nécessité de protéger la cohésion centromérique au cours de l'interkinèse méiotique en étudiant un troisième mutant issu de ce crible, *patronus*.

Ainsi dans ce manuscrit, j'ai choisi de présenter une introduction générale divisée en trois parties. Après une courte présentation des divisions cellulaires, la première partie décrit la régulation du cycle cellulaire et aborde les mécanismes de régulation mis en place au cours de la méiose. La seconde partie est consacrée à la cohésion et particulièrement aux mécanismes de protection de la cohésion centromérique. Enfin la dernière partie présente les mécanismes impliqués dans l'orientation des kinétochores en méiose.

Après une présentation du modèle d'étude : *Arabidopsis thaliana*, les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse seront présentés sous forme de trois articles scientifiques.

La nomenclature des gènes, des protéines et des mutants diffère entre les organismes modèles. Afin d'uniformiser ce manuscrit, la nomenclature d'*Arabidopsis thaliana* a été utilisée : les protéines sont indiquées en lettres capitales, les gènes en capitales italiques et les mutants en minuscules italiques.

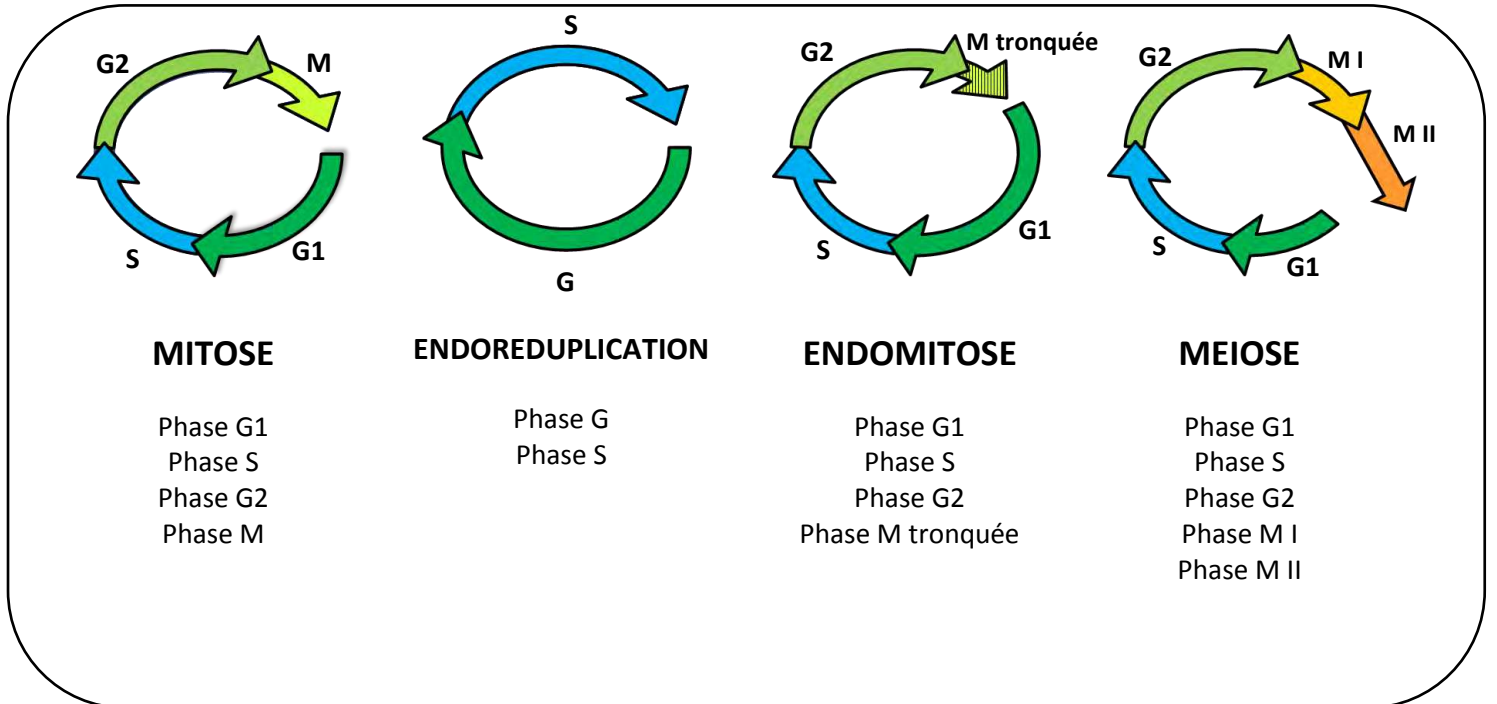
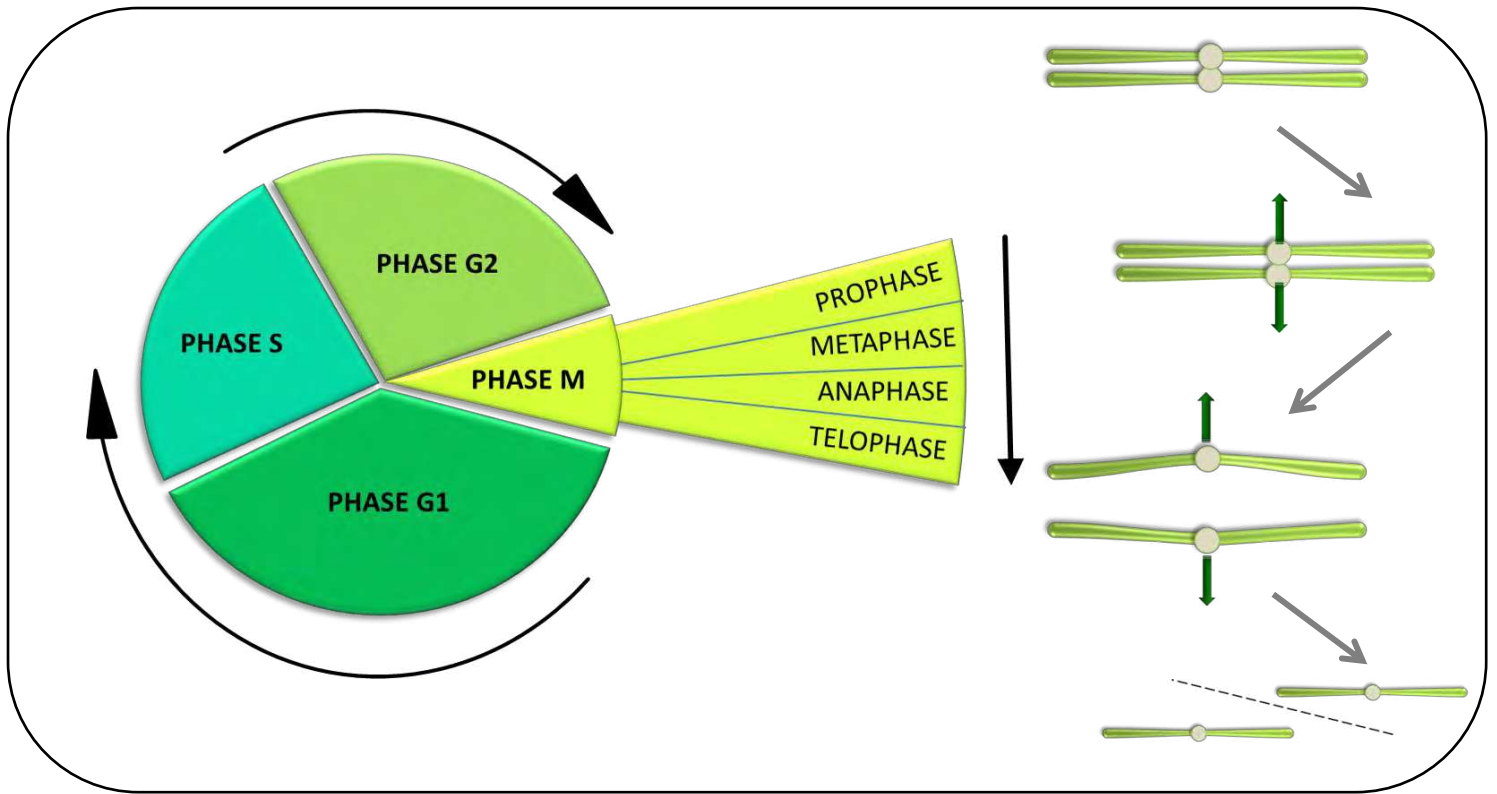


Figure B.I.1 : Cycle cellulaire et modifications du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : la phase S (synthèse d'ADN), la phase M (mitose) et les phases G1 et G2 (gap). La phase M est divisée en quatre stades : Prophase, Métaphase, Anaphase et Télophase. Les cellules eucaryotes peuvent modifier ce cycle, entraînant la formation de(s) cellule(s) fille(s) non-identique(s) à la cellule mère. Dans le cas de l'endoréduplication et de l'endomitose, la quantité d'ADN dans les cellules filles est doublée par rapport à la cellule mère. En méiose, la quantité d'ADN est divisée par deux dans les quatre cellules filles, par rapport à la cellule mère.

B. INTRODUCTION

I. Divisions cellulaires

1. Généralités

La division cellulaire correspond au mode de multiplication des cellules. C'est un processus fondamental pour tous les organismes. Les organismes eucaryotes peuvent être constitués de milliards de cellules qui proviennent toutes d'une même cellule œuf. Pour pouvoir se multiplier, une cellule doit dupliquer son matériel génétique et diviser ses chromosomes de façon équitable pour former deux cellules filles génétiquement identiques. Ces processus sont coordonnés lors du cycle cellulaire qui correspond à l'intervalle de temps qui sépare une division cellulaire de la suivante. Le cycle cellulaire se divise en quatre phases successives (Figure B.I.1) : la phase G1 (Gap 1) au cours de laquelle la cellule effectue sa croissance, la phase S (Synthèse) au cours de laquelle l'ADN est répliqué, la phase G2 (Gap2) et enfin la phase M (Mitose) au cours de laquelle a lieu la division nucléaire et la division cytoplasmique. On appelle fréquemment interphase la succession des phases G1, S et G2 (Francis, 2007).

La mitose est divisée en plusieurs étapes : prophase, prométaphase, métaphase, anaphase et télophase (Figure B.I.1). Au cours de la prophase, les chromosomes se condensent, les deux chromatides sœurs issues de la réplication restent maintenues ensemble par la cohésion. La rupture de l'enveloppe nucléaire marque la fin de la prophase. Le fuseau constitué de fibres de microtubules, qui assurera la séparation des chromatides sœurs, est mis en place en prométaphase. Puis les chromosomes vont s'aligner sur la plaque métaphasique. Chaque chromatide sœur est alors capturée, au niveau des kinétochores, par des fibres de microtubules émanant des pôles opposés de la cellule. Le kinétochore est un complexe protéique présent sur chaque chromatide sœur qui sert de point d'attachement des fibres de microtubules. L'élimination de la cohésion entre les chromatides sœurs déclenche l'anaphase. Les chromatides sœurs s'éloignent l'une de l'autre grâce à la force exercée par le fuseau, pour former deux lots génétiquement identiques. Enfin, en télophase le fuseau est désassemblé, les chromosomes se décondensent et la division s'achève par la cytodierèse et la formation de deux cellules filles.

Il existe des modifications du cycle cellulaire entraînant la formation de cellule(s) fille(s) non-identique(s) à la cellule mère (Figure B.I.1). Dans le cas de l'endoréduplication, le cycle cellulaire est simplifié et ne comprend que les phases G et S. L'ADN est répliqué mais le matériel génétique n'est pas divisé entraînant une polyploïdisation de la cellule. Chez les plantes, l'endoréduplication est fréquemment observée dans différents organes comme les

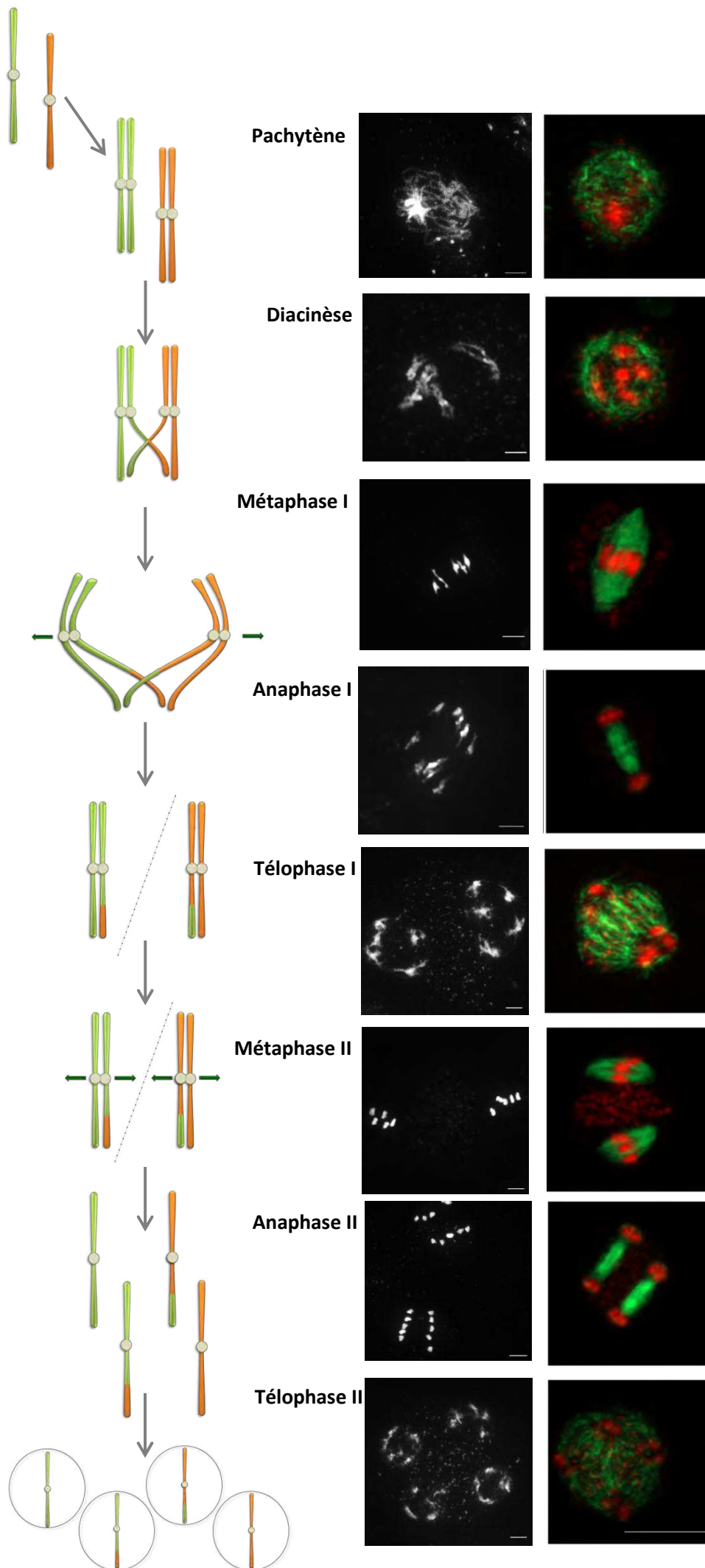


Figure B.I.2 : La méiose chez *Arabidopsis thaliana*

Photos : Etalements de chromosomes méiotiques mâles marqués au DAPI et Immunomarquage Tubuline α et iodure de propidium sur méiocytes mâles d'*Arabidopsis thaliana* $2n=10$ Barre : $5\mu\text{m}$ (données personnelles).

La **phase de réplication** est suivie d'une phase G2/**prophase** pendant laquelle les chromosomes homologues s'apparient et échangent par recombinaison homologue des fragments d'ADN (ici pachytène). En **diacynèse**, les chromosomes se condensent. On observe à ce stade cinq bivalents constitués chacun de deux chromosomes homologues. Les bivalents s'alignent sur la plaque métaphasique en **métaphase I** et les homologues se séparent en **anaphase I**. Après une phase de décondensation (**télaphase I/G2**). Les deux lots de cinq chromosomes s'alignent en **métaphase II** et les chromatides sœurs se séparent en **anaphase II**. En **télaphase II**, les quatre lots de cinq chromatides se décondensent et la cytotéiérèse permet la formation de quatre spores haploïdes.

racines, les feuilles, les trichomes ou les fruits. Bien que le rôle physiologique de l'endoréplication n'ait pas été clairement établi, la polyploïdisation des cellules pourrait, en outre, permettre de tamponner les mutations accumulées par les cellules et ainsi maintenir des copies fonctionnelles des gènes (Inzé and De Veylder, 2006). L'endomitose entraîne également la formation de cellules contenant une quantité d'ADN supérieure à la cellule mère. Lors de l'endomitose, la phase M est initiée mais s'arrête avant la séparation complète des chromosomes (Figure B.I.1), c'est le cas par exemple des mégacaryocytes de mammifères à l'origine des plaquettes sanguines (Edgar and Orr-Weaver, 2001).

Des modifications du cycle cellulaire sont nécessaires lors de la méiose, la division cellulaire à l'origine de la formation des gamètes. Lors de la méiose, la phase S est suivie d'une phase G2 qui précède deux phases M successives entraînant une diminution de la quantité d'ADN présente dans les quatre cellules filles (Figure B.I.1).

2. La méiose

La méiose est une division cellulaire très particulière à l'origine de la formation des gamètes, essentiels à la reproduction sexuée. Contrairement à la mitose, qui permet de maintenir la ploïdie entre la cellule mère et les deux cellules filles, le mécanisme de méiose induit la formation de quatre cellules haploïdes (n) à partir d'une cellule diploïde ($2n$). La réduction du nombre de chromosomes lors de la méiose est nécessaire pour maintenir le niveau de ploïdie de l'espèce lors de la fécondation. La méiose assure également un brassage génétique entre chromosomes maternels et paternels grâce à la recombinaison méiotique d'une part et à la ségrégation des chromosomes parentaux dans les cellules filles d'autre part.

On ne peut pas réellement parler d'un "cycle cellulaire" méiotique, car la méiose n'est pas un cycle. Un produit de méiose ne pouvant pas à nouveau entrer en méiose. L'usage du terme cycle apparaît comme un abus de langage mais se réfère au cycle cellulaire qui englobe les mécanismes de progression à travers une division.

Les différentes phases de la méiose

La méiose est constituée de deux divisions successives (nommées méiose I et méiose II) précédées d'un événement unique de réplication. La première division est dite réductionnelle car elle permet la ségrégation des chromosomes homologues parentaux. La méiose II est, quant à elle, équationnelle et se rapproche d'une mitose car elle permet la séparation des chromatides sœurs. Lors de la méiose I et de la méiose II, la phase M est divisée en quatre étapes : la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase, notées respectivement I et II (Figure B.I.2).

La phase S pré-méiotique précède une phase G2 et une prophase (nommée également prophase I) pendant laquelle a lieu la recombinaison méiotique. La prophase est divisée en 5 stades distincts : le leptotène, le zygotène, le pachytène, le diplotène et la diacinèse. Suite à la phase de réplication, les chromosomes sont composés de deux chromatides sœurs

identiques maintenues ensemble par la cohésion. Au stade leptotène, les cassures double-brin se forment le long des chromosomes qui commencent à s'aligner. A ce stade, une structure protéique appelée élément axial se forme le long de chaque paire de chromatides sœurs pour former une structure continue. Lors du zygotène, les chromosomes homologues commencent à s'apparier, les éléments axiaux de chaque homologue s'assemblent pour former le complexe synaptonémal. En pachytène, le synapsis est complet entre les chromosomes homologues. La recombinaison méiotique s'achève par la réparation des cassures double brin conduisant, entre autre, à la formation de crossing-over qui sont des échanges réciproques de matériel génétique. En diplotène, le complexe synaptonémal se dépolymérise et le synapsis disparaît. Finalement en diacinèse, les chromosomes se condensent. En cytologie, les chromosomes homologues sont facilement identifiables à ce stade et les chiasmata (manifestation cytologique des crossing-over) sont visibles au niveau des bras chromosomiques (Figure B.I.2). L'enveloppe nucléaire disparaît en fin de diacinèse (Pawlowski and Cande, 2005; Hamant et al., 2006).

Après la prophase, la ségrégation des chromosomes débute. Les chromosomes homologues sont alors maintenus ensemble par les chiasmata et stabilisés grâce à la cohésion le long des bras, cette structure est appelée bivalent. En métaphase I, les bivalents se placent et s'alignent sur la plaque métaphasique. Chaque homologue est alors capturé par des fibres de microtubules émanant des pôles opposés de la cellule. Les kinétochores sœurs (présents sur chaque chromatide sœur) vont être orientés vers le même pôle de la cellule. L'élimination de la cohésion le long des bras permet de résoudre les chiasmata et déclenche l'anaphase I. Les chromosomes homologues s'éloignent l'un de l'autre grâce à la force exercée par le fuseau pour former deux lots de chromosomes à deux chromatides (Figure B.I.2). En télophase I, le fuseau méiotique disparaît, les chromosomes se décondensent et une nouvelle membrane nucléaire peut apparaître. A ce stade, la cytotélerèse n'est pas obligatoire. Chez le riz par exemple, une paroi cellulaire est mise en place en fin de méiose I alors que ce n'est pas le cas chez *Arabidopsis* (Chen et al., 2005).

Suite à cette première division, une seconde va être initiée sans phase de réplication préalable. En méiose II, les chromosomes vont à nouveau se condenser. Lors de la métaphase II, ces chromosomes à deux chromatides vont s'aligner sur la plaque métaphasique et le fuseau de microtubules se forme à nouveau. Les kinétochores sœurs vont être orientés vers les pôles opposés de la cellule. Ainsi chaque chromatide sœur est capturée par des fibres de microtubules et attirée vers les pôles opposés de la cellule après destruction de la cohésion encore présente au centromère. En fin d'anaphase II, quatre cellules haploïdes sont produites (Marston and Amon, 2004).

3. Méiose versus Mitose

Sans parler de l'intérêt évolutif de la reproduction sexuée, on peut se demander quelle est l'origine de la méiose. Sur ce sujet, deux hypothèses ont été émises. Au cours de l'évolution des eucaryotes, mitose et méiose pourraient avoir évolué en parallèle à partir

d'une division cellulaire commune. L'autre hypothèse suggère que la méiose a évolué à partir de la mitose. Cette théorie se base sur les similitudes entre la machinerie moléculaire mitotique et méiotique, suggérant que certains mécanismes mitotiques ont été détournés pour permettre la formation des gamètes (Wilkins and Holliday, 2009).

On note quatre modifications fondamentales qui permettent de distinguer la mitose de la méiose. (1) La recombinaison méiotique et la formation de crossing-over entre chromosomes homologues, (2) l'inhibition d'une phase de réplication entre les deux divisions méiotiques, (3) l'élimination séquentielle de la cohésion et (4) la mono-orientation des kinétochores sœurs en méiose I. Au cours de mes travaux de thèse, j'ai caractérisé des mutants d'*Arabidopsis thaliana* présentant des défauts dans la progression méiotique, la protection de la cohésion centromérique et l'orientation des kinétochores. Ainsi les chapitres suivants reprennent les données bibliographiques concernant les points (2), (3) et (4).

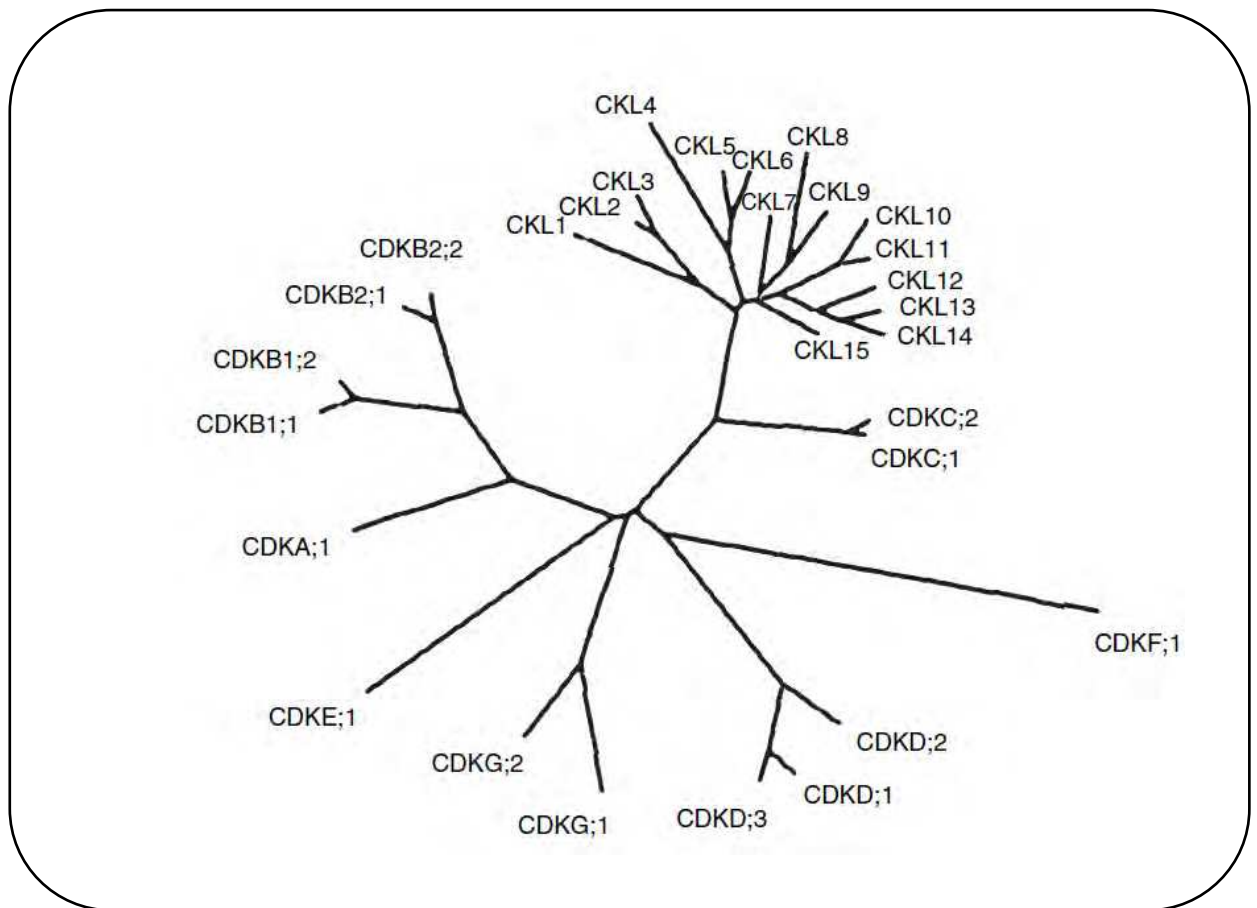


Figure B.II.1 : Arbre phylogénétique des différents gènes des CDKs et CDKs-like (CKL) identifiés chez *Arabidopsis thaliana*

D'après Menges *et al.* 2005

II. Régulation du cycle cellulaire

Les protéines et les mécanismes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire ont principalement été mis en évidence dans un contexte somatique. Afin de décrire les mécanismes impliqués dans la régulation du cycle méiotique, les composants et les mécanismes de régulation du cycle cellulaire sont brièvement décrits en mettant l'accent sur les mécanismes de phase M.

1. Le cycle cellulaire

1.1. L'activité cycline/CDK

Les mécanismes à l'origine de la progression du cycle cellulaire ont été mis en évidence chez la levure *S. pombe*. L'analyse de mutants thermosensibles a permis d'identifier les premiers gènes codant pour des CDK (Cyclin Dependent Kinase)(Nurse, 1997). Tous les eucaryotes possèdent au moins une CDK contenant un domaine très conservé appelé PSTAIRE. Ces sérine/thréonine kinases doivent être associées à une cycline pour être actives. Sachant qu'une CDK peut s'associer à des cyclines différentes et qu'une cycline peut s'associer à des CDK différentes, les combinaisons peuvent être multiples. L'association d'une cycline et d'une CDK permet d'activer l'activité kinase, nommée également activité cycline/CDK (noté CYC/CDK). Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, la plupart des complexes connus CYC/CDK se forment avec la même CDK (ScCDC28 et SpCDC2, respectivement). Chez les eucaryotes pluricellulaires, il existe plusieurs gènes codant des CDK, chez *Arabidopsis thaliana*, 29 séquences correspondant à des CDK ont pu être identifiées dans le génome. Ces différentes CDK ont été divisées en 7 classes (CDKA à CDKE), la huitième classe correspond aux CDK-like (CKL) (Menges et al., 2005) (Figure B.II.1). Parmi ces 7 classes, les CDKA et CDKB semblent jouer un rôle essentiel dans la progression du cycle cellulaire. AtCDKA;1 possède la plus forte homologie de séquence avec SpCDC2 et ScCDC28 et peut compléter partiellement les mutants thermosensibles *Scdc28* (Ferreira et al., 1991). AtCDKA;1 est impliquée dans les transitions G1-S, G2-M et au cours de la phase M, en s'associant avec différentes cyclines. Les AtCDKB sont impliquées dans la progression de la mitose en s'associant avec des cyclines de type A et B (Menges et al., 2005; Van Leene et al., 2010).

En plus de l'association cycline et CDK, le complexe CYC/CDK peut être régulé par divers mécanismes tels que la phosphorylation/déphosphorylation ou l'association avec des protéines régulatrices (Inzé and De Veylder, 2006; Perry and Kornbluth, 2007).

Les cyclines sont indispensables à l'activité CYC/CDK. La quantité de cyclines varie au cours du cycle permettant ainsi l'activation ou le désassemblage du complexe CYC/CDK, la quantité de CDK restant, quant à elle, constante au cours du cycle (Murray, 2004). Ainsi la cycline va donner la spécificité de substrat à la CDK et déterminer sa période d'action.

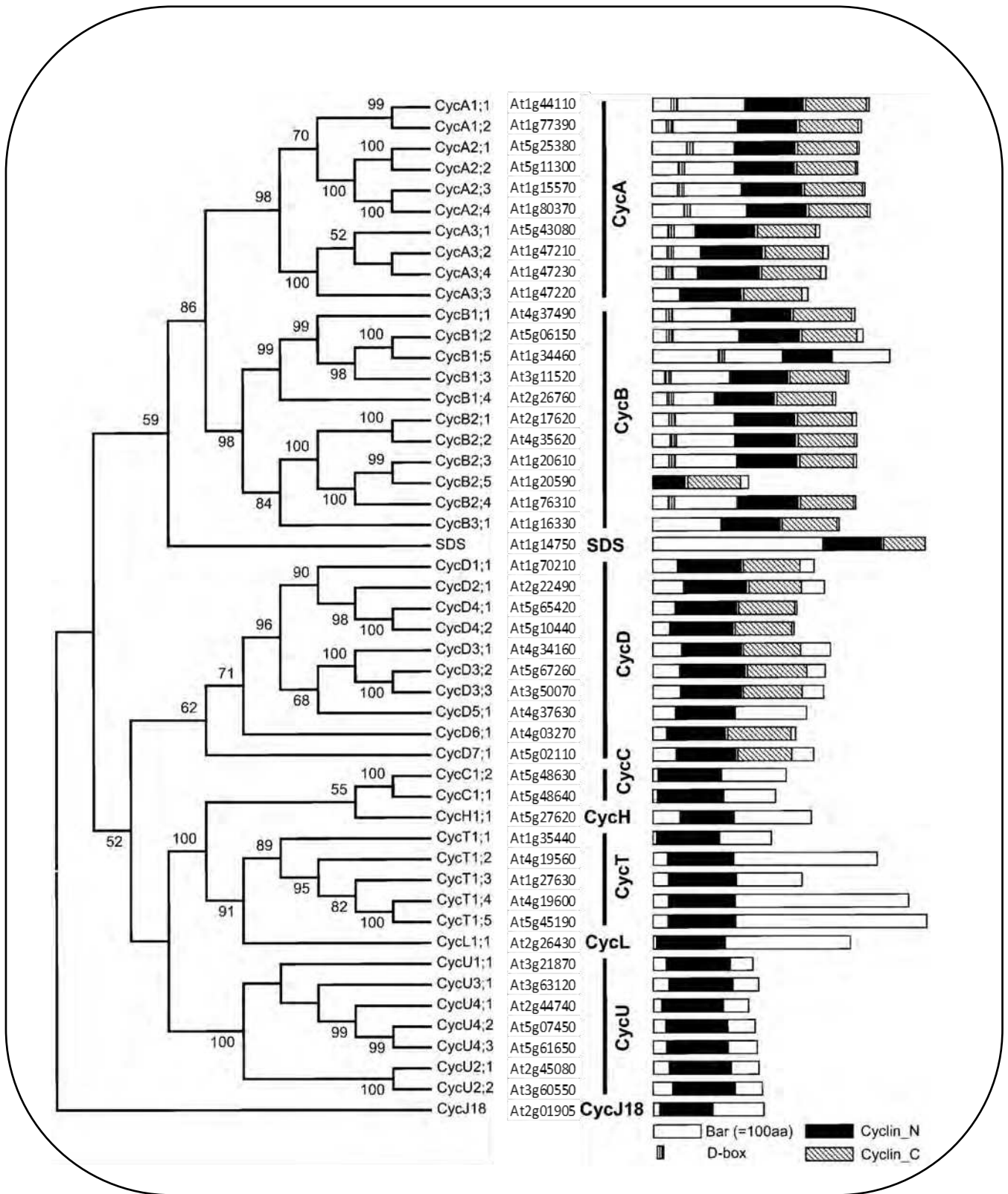


Figure B.II.2 : Phylogénie et structure des domaines des 49 cyclines d'*Arabidopsis thaliana*

Toutes les cyclines possèdent une cycline-box (noté ici Cyclin_N). Les cyclines de type A, B, D et SDS contiennent en plus un domaine Cyclin_C. Seules les 9 cyclines A et les 9 cyclines B possèdent une D-box. Phylogénie E-value à 0.01. D'après Wang *et al.* 2004a

Les cyclines sont des protéines d'environ 30 à 50 kDa qui se caractérisent par la présence d'un domaine conservé: la cycline-box (noté cyclin_N sur la Figure B.II.2). Ce domaine est essentiel pour la fixation des cyclines aux CDK. Les cyclines, impliquées en phase M, contiennent un autre motif conservé: la destruction-box (ou D-box) dont le motif minimum correspondant aux résidus RxxLxxxxN (où x est un acide aminé variable). Ce motif est un signal de dégradation (appelé également dégron) reconnu par l'APC/C (Anaphase Promoting Complex/ Cyclosome), une E3-ligase impliquée dans la destruction de protéines par une voie dépendante du protéasome 26S (Glotzer et al., 1991)(voir B.II.1.2). La destruction des différentes cyclines mitotiques est précisément régulée, chronologiquement et spatialement, de façon à assurer la succession correcte des différents événements cellulaires (Sullivan and Morgan, 2007).

On trouve dans le génome d'*Arabidopsis thaliana* environ 50 gènes codant des cyclines (Figure B.II.2). Ces dernières ont été classées en différentes familles dont les cyclines de type A et B, cette nomenclature est basée sur des similarités fonctionnelles avec les cyclines décrites chez les mammifères (Renaudin et al., 1996; Inzé and De Veylder, 2006). Les cyclines de type A et B s'expriment principalement dans les tissus en division (Menges et al., 2005; Wolgemuth and Roberts, 2010). Les cyclines A de plantes se caractérisent par la présence d'un motif LVEVxEEY et ont été réparties en trois groupes (cyclines A1, A2 et A3) sur la base de leur similarité de séquence. Les cyclines de type B sont réparties en trois groupes: CYCB1, CYCB2 et CYCB3 (Wang et al., 2004a). Dans des cellules synchronisées, il a été montré que les CYCA3 sont exprimées lors de la transition G1/S puis les cyclines A1 et A2 sont exprimées en G2. Les cyclines B commencent à s'exprimer en début de phase M puis leurs expressions diminuent au cours cette phase (Menges and Murray, 2002; Menges et al., 2005). Il existe une grande variété de cyclines chez les plantes avec des profils d'expression différents au cours du cycle cellulaire suggérant que chaque cycline a une fonction différente. Cependant les mutants de cyclines présentent rarement un phénotype laissant penser à une grande redondance fonctionnelle des cyclines chez les plantes (Wang et al., 2004a).

Les CDK, associées aux cyclines, permettent de réguler et de coordonner les différents événements du cycle cellulaire. Bien que des substrats des CDK aient été identifiés, leurs implications dans les différents événements du cycle restent mal connues (Errico et al., 2010).

1.2. L'APC/C

La dégradation des protéines est un mécanisme important lors du cycle cellulaire, elle permet, entre autre, de modifier rapidement la concentration de certaines protéines au sein de la cellule. Chez les eucaryotes, la majorité des protéines sont dégradées *via* le protéasome 26S. Ce complexe multiprotéique dégrade les protéines étiquetées par des molécules d'ubiquitine (Xie, 2010). Trois types d'enzymes sont impliquées dans la réaction d'ubiquitinylation : les enzymes ubiquitine-activatrices (E1), les enzymes de conjugaison (E2)

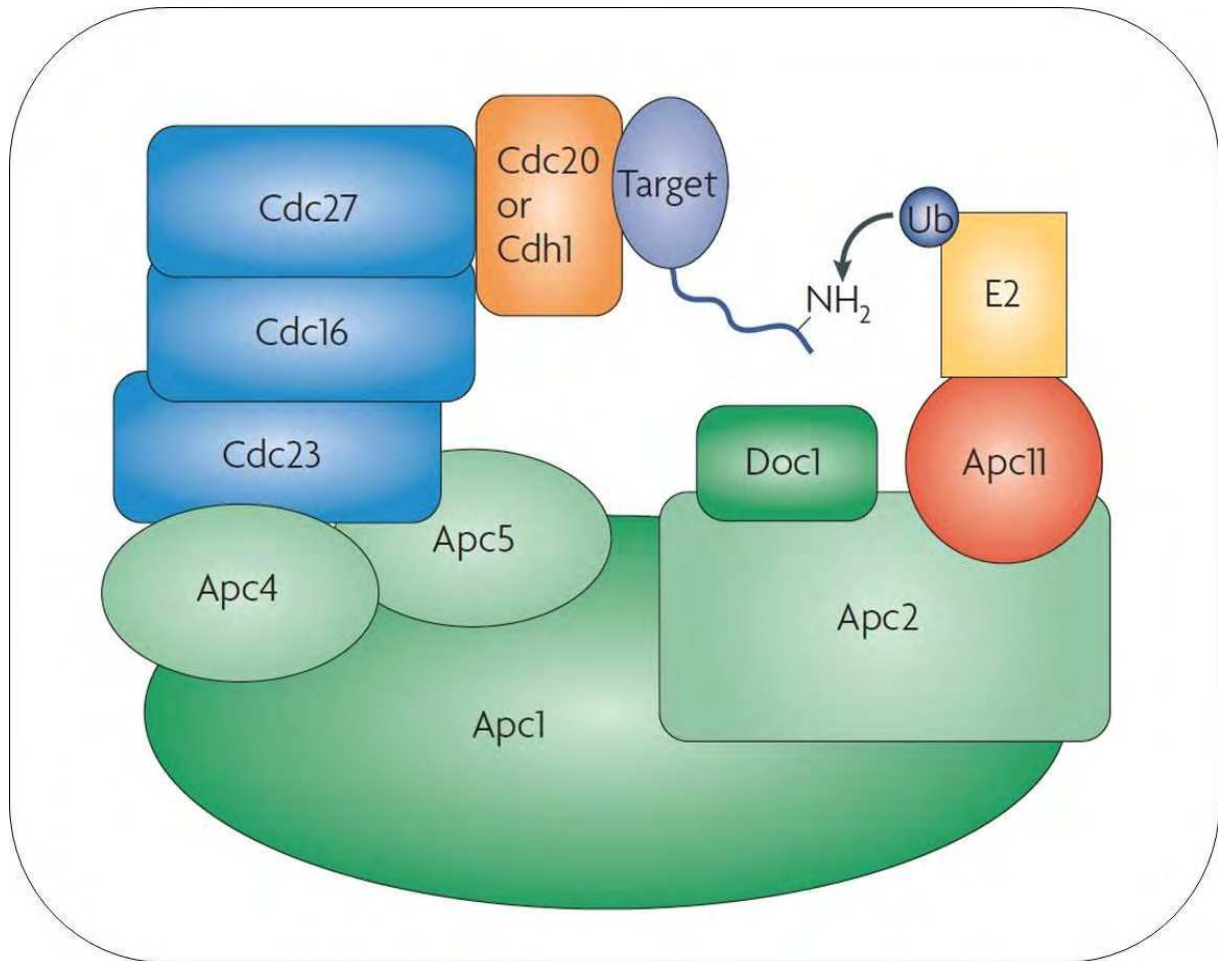


Figure B.II.3 : Représentation schématique de l'APC/C

L'APC/C est une E3 ubiquitine ligase formée de 11 à 13 sous-unités en fonction des organismes. Les activateurs (CDC20 ou CDH1 en orange) se fixent au niveau de CDC27. CDC27 est une des sous-unités à TRP (ici en bleu). Les sous-unités impliquées dans l'organisation et la structure, ainsi que les sous-unités catalytiques sont indiquées en vert. D'après Sullivan et al. 2007

et enfin les enzymes ubiquitine-ligases (E3), qui greffent une chaîne d'ubiquitine sur le substrat à dégrader. L'APC/C est une ubiquitine ligase (E3) très conservée chez les eucaryotes. Son nom vient du rôle essentiel qu'elle joue lors de la transition métaphase-anaphase. Sans APC/C fonctionnel, une cellule ne peut pas séparer ses chromatides sœurs, sortir de la mitose et produire des cellules filles (Peters, 2006).

1.2.1. Structure de l'APC/C

L'APC/C est formé de 11 à 13 sous-unités en fonction des organismes. La plupart de ces protéines sont conservées chez tous les eucaryotes (Peters, 2006). Les protéines APC1, APC4 et APC5 semblent impliquées dans l'organisation de la structure du complexe. Le cœur catalytique est composé d'APC2, APC11 et APC10/DOC1. Il interagit avec l'enzyme de conjugaison (E2). Ces protéines sont essentielles à l'activité d'ubiquitynilation. L'APC/C contient également des homodimères de trois protéines (APC8/CDC23, APC6/CDC16 et APC3/CDC27) à TPR (tetratricopeptide repeat). Ce sous-complexe jouerait un rôle important de coordination entre le cœur catalytique et la reconnaissance du substrat. APC3/CDC27 pouvant interagir avec les IR-tail d'APC10/DOC1 et des activateurs de l'APC/C. Les études structurales ont permis de mettre en évidence une forme triangulaire de l'APC/C avec une cavité centrale pouvant accueillir le substrat à ubiquitynyler (Figure B.II.3) (Peters, 2006; Sullivan and Morgan, 2007; da Fonseca et al., 2011; Foe and Toczyski, 2011) Chez *Arabidopsis thaliana*, chaque sous-unité de l'APC/C est codée par un seul gène à l'exception de CDC27 qui est codée par deux gènes, *AtCDC27a* et *AtCDC27b* (Capron et al., 2003a). Les mutations homozygotes dans les sous-unités de l'APC/C sont létales (la double mutation *Atcdc27a/Atcdc27b* également). De plus, la plupart des mutants hétérozygotes de ces sous-unités présentent des défauts dans le développement du gamétophyte mâle ou femelle liés à une accumulation excessive de cyclines (Tableau B.II.1) (Heyman and De Veylder, 2012).

1.2.2. Les activateurs de l'APC/C

L'APC/C est impliqué dans la dégradation de nombreuses protéines. Pour ubiquitynyler de façon spécifique ses substrats et être active, l'APC/C se lie à des activateurs. Les principales protéines activatrices de l'APC/C sont les protéines CDC20 (Cell Division Cycle 20) et CDH1 (CDC20 Homolog 1). L'association de l'APC/C avec l'activateur CDC20, par exemple, est noté APC/C^{CDC20}. Ces protéines contiennent sept domaines WD40 en C-terminal qui sont impliqués dans la reconnaissance du substrat par l'APC/C. Une C-Box et une IR-tail sont nécessaires à la fixation de l'activateur à l'APC/C. L'activateur CDC20 possède des motifs de destruction, sa dégradation est dépendante de l'APC/C^{CDH1}. Ainsi CDC20 est un activateur et une cible de l'APC/C.

APC/C^{CDC20} est impliqué dans la dégradation de protéines lors de l'anaphase alors qu'APC/C^{CDH1} cible des protéines en sortie de phase M et en phase G1 (Peters, 2006; Pesin and Orr-Weaver, 2008). Les activateurs étant indispensables à l'activité de l'APC/C et à la

Nom	Type de sous-unité	Phénotype somatique du mutant (type de mutation)				Phénotype méiotique du mutant (type de mutation)		Références
		Viabilité		Gamétophytique				
APC1	Structure	Non (T-DNA)		Défaut gamétophytique femelle (T-DNA)		-		Wang et al. 2012c
APC2	Catalytique	Non (T-DNA)		Défaut gamétophytique femelle (T-DNA)		-		Capron et al. 2003
APC3a/CDC27a	TPR	Oui (T-DNA)	Non (T-DNA)	Léger (T-DNA)	Défaut gamétophytique femelle (T-DNA)	N.D		Perez-Perez et al. 2008
APC3b/HOBBIT	TPR	Non (T-DNA) Plante naine (EMS)		Non (T-DNA) Non (EMS)		Non (EMS)		Willemsen et al. 1998 Perez-Perez et al. 2008
APC4	Structure	Non (T-DNA)		Défaut gamétophytique femelle (T-DNA)		-		Wang et al. 2012b
APC5	Structure	N.D		N.D		N.D		
APC6/Nomega	TPR	Non (T-DNA) Plante naine (bns) (RNAi)		Défaut gamétophytique femelle (T-DNA)		Non (RNAi)		Kwee et al. 2003 Marrocco et al. 2009
APC7	TPR	N.D		N.D		N.D		
APC8	TPR	Plante naine (EMS)		Défaut gamétophytique mâle (EMS)		N.D		Zheng et al. 2011
APC10	Catalytique	Non (T-DNA) Plante naine (bns) (RNAi)		Défaut gamétophytique femelle (T-DNA)		- Non (RNAi)		Eloy et al. 2011 Marrocco et al. 2009
APC11	Catalytique	N.D		N.D		N.D		
APC13	Associée au TPR	Plante naine (T-DNA) Plante naine (RNAi)		Défaut gamétophytique mâle (T-DNA)		N.D		Saze et al. 2007 Zheng et al. 2011
CDC20-1	Activateur	Oui (T-DNA)	Plante naine (RNAi)	N.D		-	Oui (RNAi)	Kevei et al. 2011
CDC20-2	Activateur	Oui (T-DNA)				-		
CDC20-3	Activateur	Oui (T-DNA)		aucun (T-DNA)		N.D		Kevei et al. 2011
CDC20-4	Activateur	Oui (T-DNA)		aucun (T-DNA)		N.D		Kevei et al. 2011
CDC20-5	Activateur	Oui (T-DNA)		aucun (T-DNA)		N.D		Kevei et al. 2011
CCS52A1	Activateur	Oui (T-DNA)		-		aucun (T-DNA)		Larson-Rabin et al. 2009
CCS52A2	Activateur	Oui(T-DNA)				aucun (T-DNA)		Lammens at al. 2008
CCS52B	Activateur	Oui(T-DNA)		N.D		aucun (T-DNA)		
UVI4/PYM	Inhibiteur	Oui (T-DNA) Oui (EMS)		-		aucun (EMS)		Heyman et al. 2011
OSD1/UVI4-Like/GIGAS	Inhibiteur	Oui (T-DNA) Oui (EMS)		-		Méiose I uniquement (T-DNA)		D'Erfurth et al. 2009 Iwata et al. 2011
SAMBA	Activateur	Oui (T-DNA)		Défaut gamétophytique mâle (T-DNA)		aucun (T-DNA)		Eloy et al. 2012

Tableau B.II.1 : Composants et Régulateurs de l'APC/C chez *Arabidopsis thaliana*

N.D : non déterminé ; bns : bonsai ; EMS : Ethylmethylsulfonate

spécificité de substrat, APC/C^{CDC20} et APC/C^{CDH1} doivent être finement régulés afin de dégrader leurs cibles au bon moment.

Chez *Arabidopsis thaliana*, on compte cinq gènes codant des homologues de CDC20 et trois codant des homologues de CDH1 (nommés chez les plantes CCS52) (Tableau B.II.1). L'expression des gènes *AtCDC20-3*, *AtCDC20-4* et *AtCDC20-5* n'a pas été détectée, suggérant qu'il pourrait s'agir de pseudogènes. Un RNAi dirigé contre les deux gènes *AtCDC20-1* et *AtCDC20-2* présente un phénotype de plantes naines (Kevei et al., 2011). Les protéines AtCCS52A1 et AtCCS52A2 semblent impliquées dans la régulation de l'endoréplication, les mutants correspondants présentent une diminution du niveau de ploïdie (Lammens et al., 2008; Larson-Rabin et al., 2009; Kasili et al., 2010). Peu d'informations sont disponibles sur le rôle du troisième homologue de CDH1, AtCCS52B.

1.2.3. Les substrats de l'APC/C

L'APC/C reconnaît ces cibles grâce à des motifs de dégradation (ou dégrons). Le motif principal de dégradation, la D-box (RxxLxxxxN), a été mis en évidence chez une cycline B. La D-box est un motif suffisant pour induire la dégradation et peut être transposée sur d'autres protéines afin d'induire leur dégradation en phase M (Glotzer et al., 1991).

La KEN-box est également un motif de dégradation, il est constitué de trois résidus conservés une lysine (K), un glutamate (E) et une asparagine (N) (Pfleger and Kirschner, 2000). D'autres motifs ont été décrits dont : la GxEN-box présente chez une chromokinéase de xénope (Castro and Vigneron, 2003) et la A-box (AQRxLxxSxxxQRVL) présente chez les kinases AURORA-A (Song and Rape, 2011). Pour les substrats de l'APC/C, les mutations dans ces motifs entraînent la stabilisation du substrat.

APC/C^{CDC20} et APC/C^{CDH1} ne sont pas impliqués dans la dégradation des mêmes substrats et agissent à des moments différents du cycle, suggérant que les activateurs jouent un rôle important dans la spécificité du substrat. Les études suggèrent qu'APC/C^{CDH1} reconnaît des cibles contenant une KEN-box alors qu'APC/C^{CDC20} reconnaît des cibles contenant une D-box. Cependant il existe des substrats contenant des D-box qui sont reconnus par APC/C^{CDC20} et APC/C^{CDH1} (Pfleger and Kirschner, 2000; Sullivan and Morgan, 2007). Certains auteurs suggèrent que de légères différences au niveau de la séquence consensus du dégron ou des modifications post-traductionnelles pourraient influencer la reconnaissance du substrat par différents APC/C (Sullivan and Morgan, 2007). Par exemple, la phosphorylation de la sécurine à proximité de sa D-box inhibe son ubiquitinylation par l'APC/C. Cette inhibition de l'ubiquitinylation est plus importante lorsque la sécurine phosphorylée est incubée *in vitro* avec APC/C^{CDC20} qu'avec APC/C^{CDH1} (Holt et al., 2008).

La reconnaissance du substrat semble également impliquer APC10/DOC1. Jusqu'à présent, aucune interaction directe entre APC10/DOC1 et le substrat n'a été mise en évidence mais les données structurales indiquent que CDH1 et APC10/DOC1 sont des co-récepteurs de la D-box (Peters, 2006; da Fonseca et al., 2011).

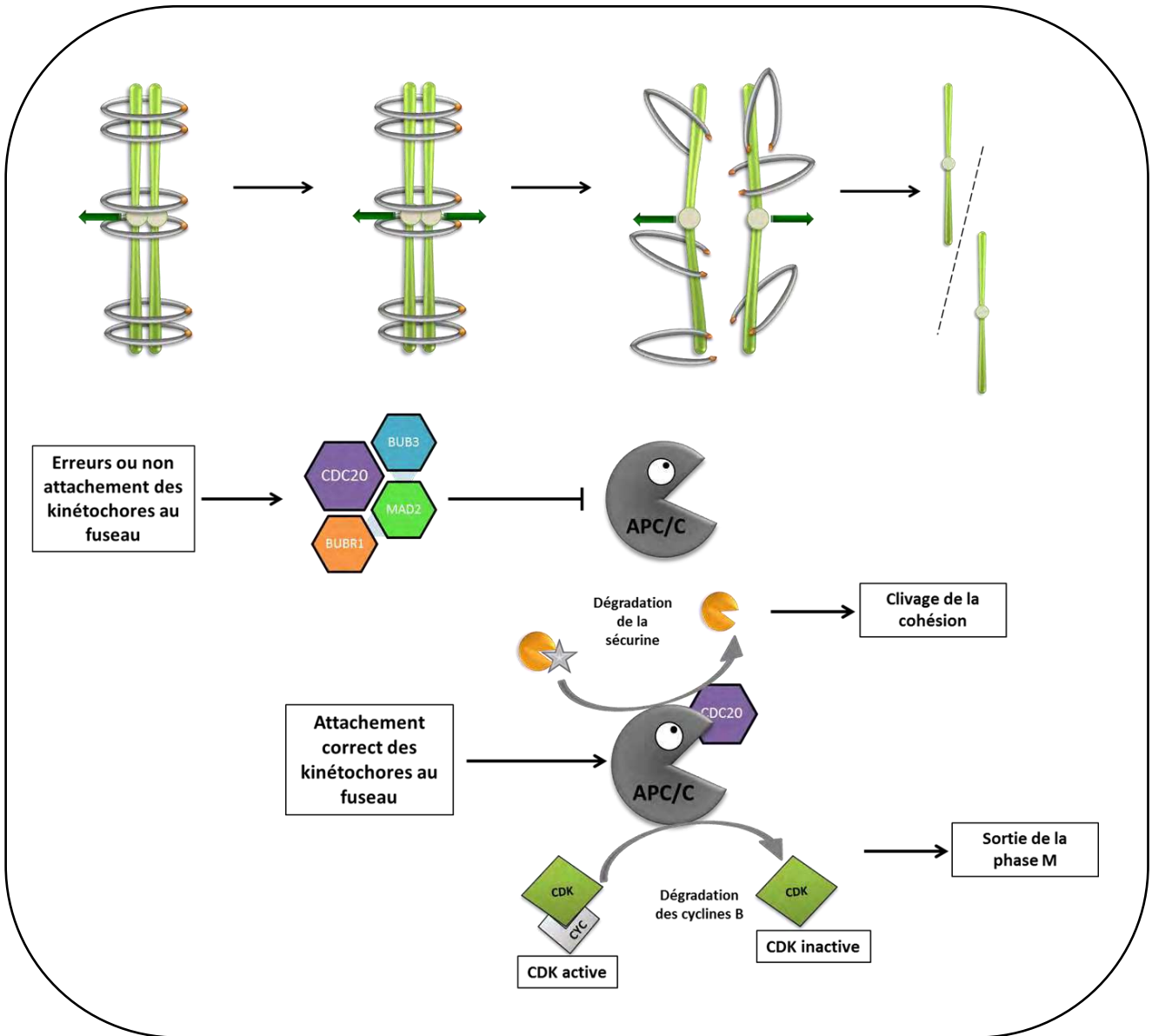


Figure B.II.4 : Contrôle de la ségrégation des chromatides sœurs par le SAC (Spindle Assembly Checkpoint)

Les erreurs ou l'absence d'attachement du kinétochore aux microtubules activent le SAC. MAD2, BUB3 et BUBR1 piègent la sous-unité activatrice CDC20 de l'APC/C afin d'empêcher l'APC/C^{CDC20} de détruire la sécurine et les cyclines B. Lorsque l'attachement des kinétochores aux microtubules est correct, CDC20 est libéré. APC/C^{CDC20} peut alors détruire la sécurine qui libère la séparase. La séparase va cliver le complexe de cohésines et permettre la séparation des chromatides sœurs. APC/C^{CDC20} va également détruire les cyclines B, l'activité CYC/CDK est inactivée et la cellule sort de la phase M (D'après Lara-Gonzalez et al. 2012).

1.3. Contrôle de la progression du cycle cellulaire

L'enchaînement des différentes étapes du cycle cellulaire est très précisément régulé. Afin de transmettre fidèlement l'information génétique aux cellules filles, les différents stades du cycle doivent se dérouler de manière ordonnée et sans erreur. Comme les différents processus du cycle cellulaire sont interdépendants, l'initiation d'un processus dépend du bon déroulement et de l'achèvement du précédent. Les points de contrôle sont des points de décision où des mécanismes de contrôle détectent et empêchent la progression dans le cycle si les étapes précédentes n'ont pas été complétées.

En phase G1, la cellule peut entrer en division et répliquer son ADN ou sortir du cycle pour se différencier. Si les conditions ne sont pas favorables à la division, le point de contrôle "G1" va empêcher la cellule d'entrer en phase S. Lors de la phase S, le point de contrôle "intra-S" va retarder la progression du cycle si la réplication ne se déroule pas correctement. Puis le point de contrôle "G2" ou "dommage à l'ADN" permet de bloquer la cellule avant la phase M si l'ADN présente des lésions (Johnson and Walker, 1999).

Au cours de la phase M, le point de contrôle du fuseau (SAC pour Spindle assembly checkpoint) est essentiel pour assurer une ségrégation correcte des chromosomes lors de l'anaphase car les erreurs d'attachement du fuseau peuvent entraîner des ségrégations déséquilibrées. Le SAC permet de retarder l'anaphase afin de laisser le temps à la cellule d'établir les connexions appropriées entre kinétochores et microtubules, assurant ainsi une ségrégation chromosomique équilibrée. Un seul chromosome présentant un défaut dans l'attachement du kinétochore au fuseau est suffisant pour activer ce point de contrôle et inhiber le déclenchement de l'anaphase. Les principales protéines du SAC (MAD1, MAD2, BUBR1, BUB1, BUB3 et MPS1) sont communes à tous les eucaryotes. Lors d'une division, les protéines du SAC s'accumulent au niveau des kinétochores. Ces dernières détectent l'absence ou les erreurs d'attachements du fuseau aux kinétochores. Le SAC va séquestrer CDC20 jusqu'à l'attachement correct des chromosomes au fuseau mitotique (Figure B.II.4) (May and Hardwick, 2006; Lara-Gonzalez et al., 2012). Lorsque le SAC est satisfait, CDC20 est libéré et l'anaphase débute.

Cependant chez certaines espèces, ces points de contrôle peuvent être contournés ou sont peu actifs. Chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines MAD2, BUBR1 et BUB3 localisent au niveau des kinétochores (Caillaud et al., 2009). Mais les mutants *Atmad2* ne présentent pas de gros défauts végétatifs (Ding et al., 2012) contrairement aux embryons de souris *Mmmad2* qui dégènèrent rapidement (Dobles et al., 2000). Au cours de la méiose chez *A. thaliana*, le SAC semble peu actif. En effet chez un mutant *Atspo11*, ne formant pas de bivalent, les chromosomes homologues ségrégent de façon aléatoire en méiose I et les chromatides sœurs vont se séparer en méiose II (Grelon et al., 2001). Il semblerait donc que chez *A. thaliana*, les erreurs d'attachement du fuseau n'entraînent pas un arrêt du cycle mais une ségrégation aberrante des chromosomes, suggérant un point de contrôle faible ou inexistant.

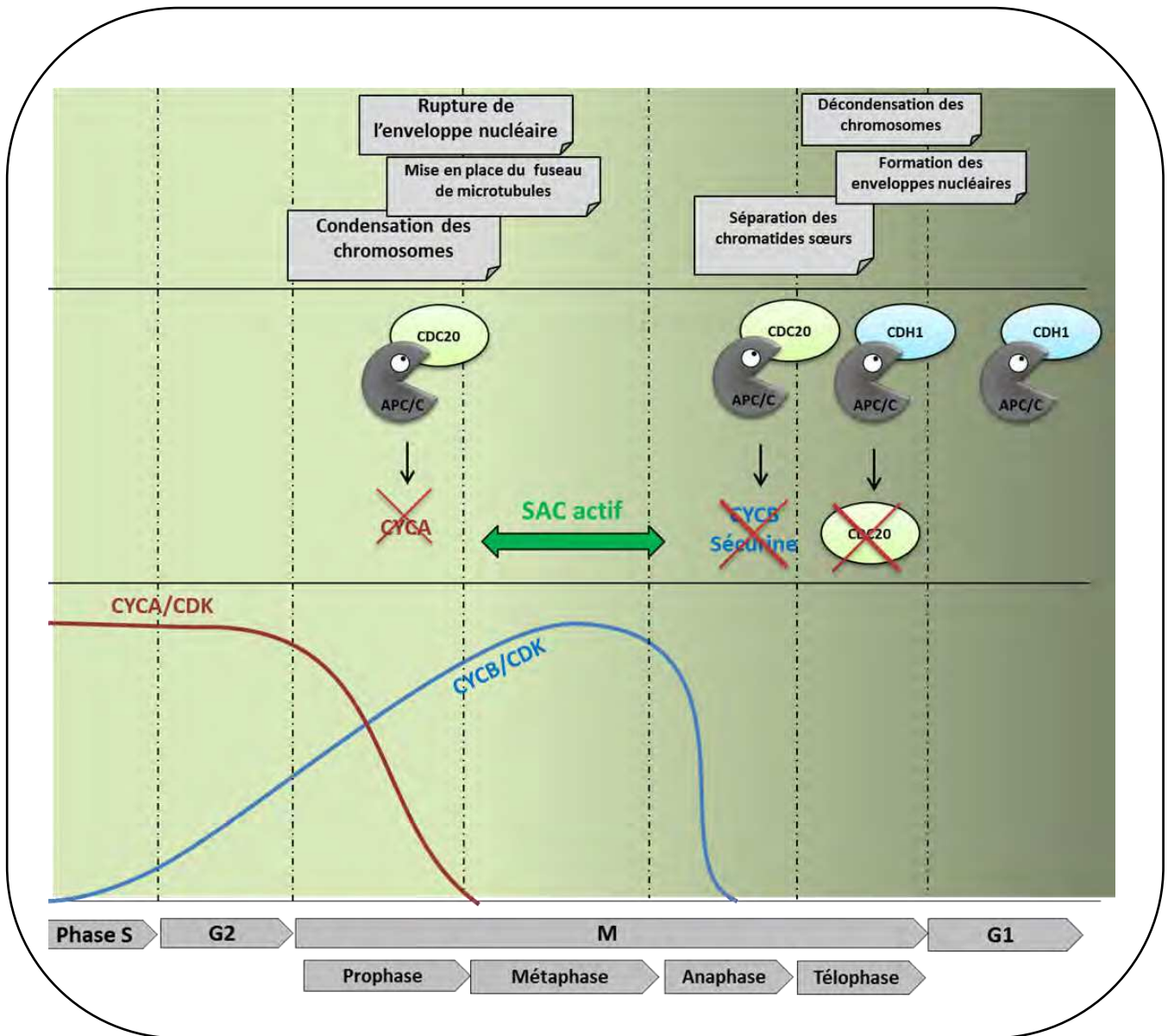


Figure B.II.5 : Progression au cours de la phase M

L'activité CYCA/CDK (en rouge) de phase S diminue dès l'entrée en phase M sous l'action de l'APC/C^{CDC20} qui détruit les cyclines A. Parallèlement, l'activité CYCB/CDK (en bleu) augmente et permet l'entrée en phase M. Le SAC va être activé afin de prolonger la métaphase si des erreurs d'attachement des microtubules au fuseau sont détectées. En anaphase, les cyclines B sont dégradées par l'APC/C^{CDC20}, l'activité CYCB/CDK chute complètement, le fuseau est désassemblé, les chromosomes se décondensent et les deux cellules filles se forment. L'APC/C^{CDH1} va alors dégrader CDC20 et rester actif jusqu'à la phase S du cycle suivant.

1.4. La progression au cours de la phase M

Les études réalisées chez les différents organismes modèles, notamment les levures, ont permis d'établir un mécanisme général pour l'entrée et la progression en phase M (Figure B.II.5). Cependant, les organismes pluricellulaires possèdent souvent de nombreuses CDK et de nombreuses cyclines, suggérant qu'il existe des régulations bien plus importantes que celles présentées ici.

Lors de l'entrée en phase M l'activité CYCA/CDK, nécessaire à la phase S, est encore présente et l'augmentation de la quantité de cyclines B dans la cellule va permettre l'activation du complexe CYCB/CDK. Lorsque cette activité atteint un certain seuil, la cellule entre en division : les chromosomes se condensent, l'enveloppe nucléaire disparaît et le fuseau de microtubules se met en place (Figure B.II.5). Les cyclines A sont détruites en prométaphase par APC/C^{CDC20}, malgré l'activation du SAC (Di Fiore and Pines, 2010). L'activité CYCB/CDK est maintenue jusqu'à la transition métaphase-anaphase. Lorsque le SAC est satisfait, CDC20 est libérée. L'activation de l'APC/C^{CDC20} va permettre la séparation des chromatides sœurs par la dégradation de la sécurine (ce point est repris dans le chapitre III.2.4.3). APC/C^{CDC20} va également détruire les cyclines B, entraînant une chute de l'activité CYCB/CDK. L'observation d'une fusion CYCB::GFP dans des cellules HeLa montre une diminution du signal GFP lorsque le dernier chromosome est aligné sur la plaque métaphasique (Clute and Pines, 1999). La diminution de cette activité va permettre la décondensation des chromosomes et la formation des nouvelles enveloppes nucléaires (Figure B.II.5). En fin de mitose, la phosphatase CDC14 va faire chuter l'activité CYC/CDK en activant des inhibiteurs de CDK et en activant CDH1 (Visintin et al., 1998). Ainsi à la fin de l'anaphase l'APC/C se lie à CDH1, l'APC/C^{CDH1} est responsable de la destruction de CDC20 *via* son dégron. APC/C^{CDH1} va rester actif tout au long de la phase G1 puis sera inhibé dès la phase S du cycle suivant (Peters, 2006; Sullivan and Morgan, 2007; Hochegger et al., 2008).

1.5. La régulation de l'APC/C permet la progression ordonnée du cycle

La régulation de l'APC/C joue un rôle important dans le choix et le timing des cibles à dégrader. Cette régulation fine assure l'enchaînement des différentes étapes du cycle (Figure B.II.6).

1.5.1. Régulation par le SAC

Comme indiqué précédemment, le SAC régule l'activité de l'APC/C^{CDC20}. Ce point de contrôle permet d'assurer une ségrégation équilibrée des chromosomes. Tant que les kinétochores sont attachés de manière incorrecte au fuseau ou non attachés au fuseau, les protéines du SAC vont piéger CDC20 et ainsi inhiber APC/C^{CDC20}. Lorsque les kinétochores sont correctement attachés au fuseau, CDC20 est relâchée. L'APC/C^{CDC20} peut alors détruire

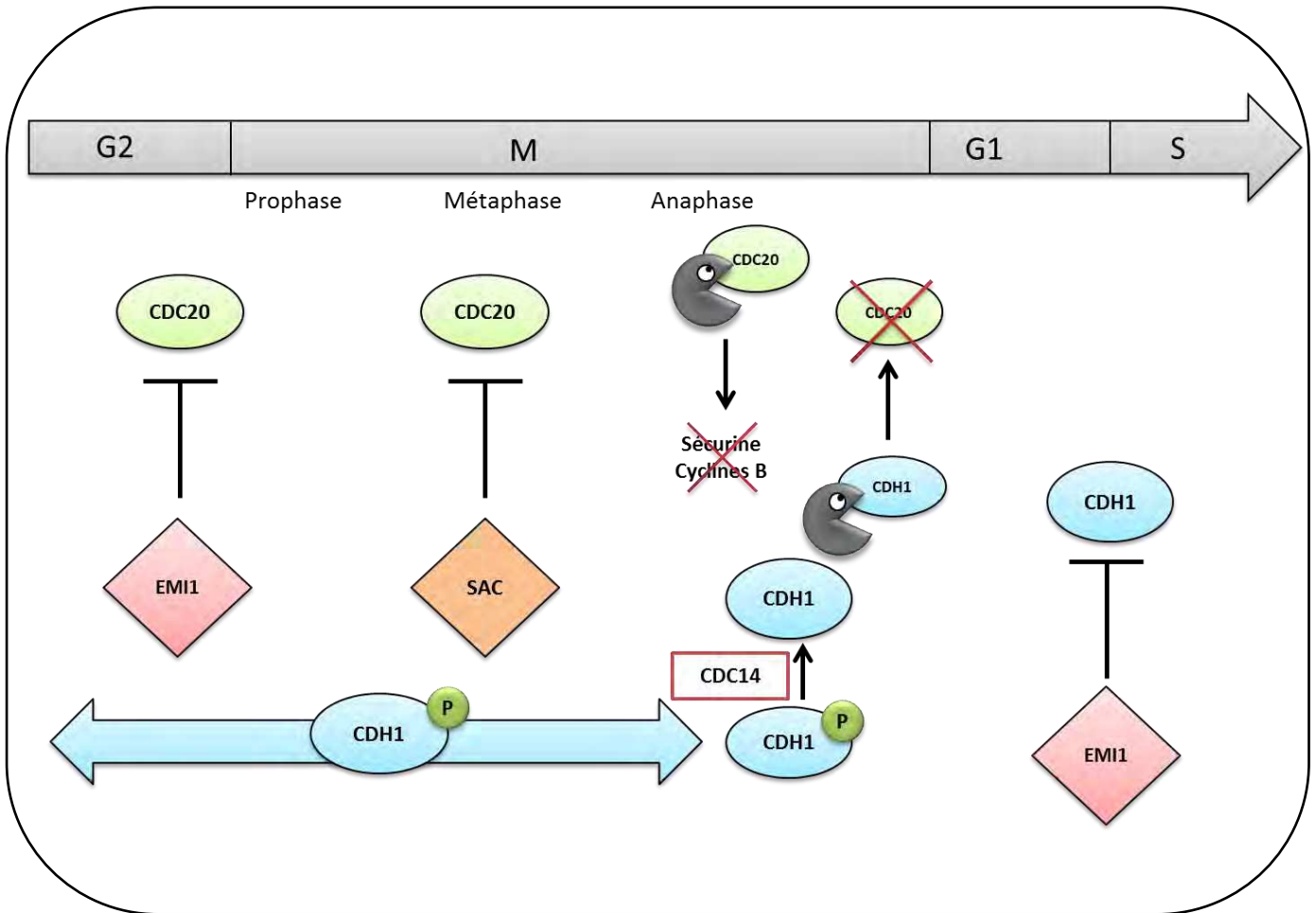


Figure B.II.6 : Régulation de l'APC/C au cours du cycle cellulaire

Jusqu'à l'anaphase, l'APC/C^{CDC20} est inhibé car l'activateur CDC20 est piégé successivement par EMI1 puis le SAC. Lorsque le fuseau de microtubules est correctement attaché aux kinétochores, CDC20 est libérée. L'APC/C^{CDC20} ainsi activé va détruire la securine et les cyclines B permettant la séparation des chromatides sœurs. En fin de phase M, l'activateur CDH1 maintenu phosphorylé jusqu'à ce stade, est déphosphorylé par la phosphatase CDC14. L'APC/C^{CDH1} va alors détruire CDC20 et permettre la sortie de la phase M. L'APC/C^{CDH1} reste actif jusqu'à la transition G1-S où CDH1 est inhibée par EMI1 pour permettre la réplication.

la sécurine et les cyclines de phase M (Lara-Gonzalez et al., 2012), déclenchant ainsi l'anaphase (Figure B.II.6).

1.5.2. Régulation par EMI1 chez les vertébrés

Bien que CDC20 soit présente dans la cellule dès la phase S, APC/C^{CDC20} ne doit pas être actif avant la phase M afin de permettre l'accumulation des cyclines B. De la même manière CDH1 est présente tout au long du cycle mais APC/C^{CDH1} doit être inhibé lors de la transition G1-S, la surexpression de CDH1 entraînant un arrêt en G1 (Hsu et al., 2002). Chez les vertébrés, la protéine EMI1 (Early Mitotic Inhibitor 1) a été mise en évidence comme un inhibiteur de l'APC/C^{CDC20} et APC/C^{CDH1}. Pour cela EMI1 se fixe au niveau de l'APC/C comme un inhibiteur compétitif, son domaine D-box se fixant au niveau du récepteur D-box de l'APC/C. EMI1 possède une RL-tail en C-terminal qui semble essentielle à son activité inhibitrice (Ohe et al., 2010). EMI1 serait responsable de l'inhibition de l'APC/C^{CDH1} à partir de la transition G1- S. EMI1 serait également responsable de l'inhibition de l'APC/C^{CDC20} en G2. La dégradation de EMI1 en prophase tardive par une autre E3 ubiquitine ligase, le complexe SCF, permettrait ainsi à l'APC/C^{CDC20} de détruire les cyclines A (Di Fiore and Pines, 2008; Pesin and Orr-Weaver, 2008). La protéine RCA1 (Regulator of Cyclin A) de *D. melanogaster* est un orthologue d'EMI1, mais RCA1 inhiberait uniquement l'APC/C^{CDH1} en G2 en interagissant avec CDH1 et CDC27 (Grosskortenhaus and Sprenger, 2002) (Figure B.II.6).

1.5.3. Régulation par ACM1 chez *S. cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, ACM1 (APC/C^{CDH1} Modulator 1) est un inhibiteur de l'APC/C^{CDH1}. ACM1 agit comme un pseudosubstrat de l'APC/C^{CDH1}, la protéine prend la place du substrat grâce à ses dégrons. Ces motifs sont reconnus par CDH1 qui ne peut alors plus reconnaître ses cibles, limitant ainsi l'activité de l'APC/C^{CDH1}, pendant les phases S et G2. ACM1 serait détruit lors de la transition métaphase-anaphase entraînant l'activation de l'APC/C^{CDH1} en fin de phase M. Aucun homologue d'ACM1 n'a été mis en évidence chez d'autres organismes (Enquist-Newman et al., 2008).

1.5.4. Autres régulations de l'APC/C

La phosphorylation des activateurs est une autre voie de régulation de l'APC/C. Chez *S. cerevisiae*, l'étude des points de contrôle des dommages à l'ADN a mis en évidence que la présence de cassures simple brin de l'ADN induit la phosphorylation de ScCDC20 par la PKA (Protein Kinase cAMP-dependent). Dans ce cas l'APC/C^{CDC20} ne dégrade plus la cycline mitotique, inhibant de ce fait la transition métaphase-anaphase (Searle et al., 2004). La phosphorylation de CDH1 induit également l'inhibition du complexe APC/C^{CDH1}. Chez *S. cerevisiae*, CDH1 est phosphorylée de la phase S jusqu'à la fin de l'anaphase. C'est la CDK ScCDC28, qui en association avec une cycline, est responsable de la phosphorylation de CDH1. Puis CDH1 est déphosphorylée par ScCDC14 en fin de mitose et en G1 pour activer

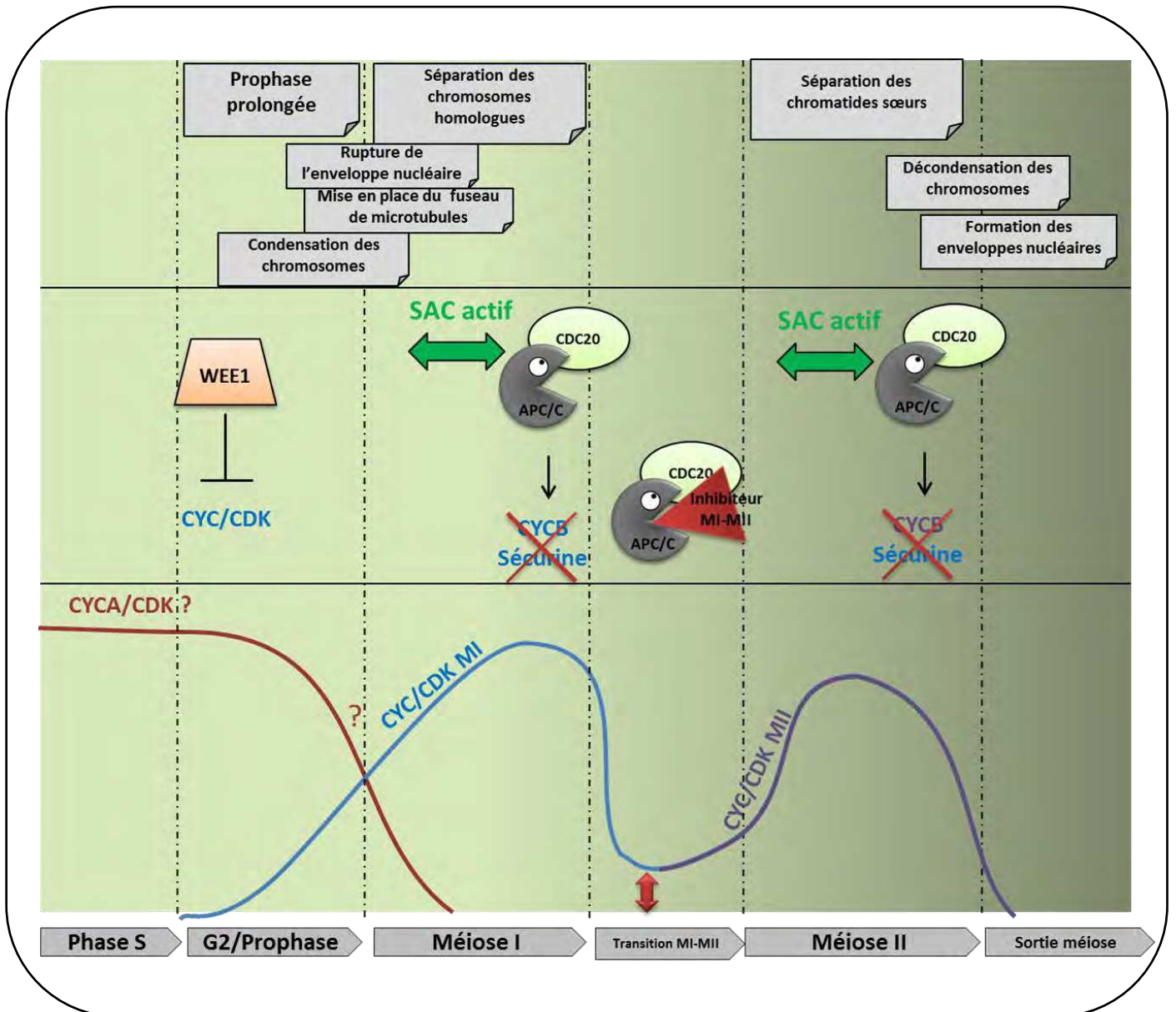


Figure B.II.7 : Progression au cours de la méiose

L'activité CYC/CDK méiotique (en bleu) augmente en prophase I pour permettre l'entrée en méiose I. Le SAC va être activé afin de prolonger la métaphase I si des erreurs d'attachement des microtubules au fuseau sont détectées. En anaphase, les cyclines de méiose I sont dégradées par l'APC/C^{CDC20}. Lors de la transition méiose I-méiose II, l'activité CYC/CDK est partiellement inactivée afin de permettre la dépolymérisation du fuseau et d'éviter l'activation des complexes de pré-réplication. L'inhibition de l'APC/C^{CDC20} par un inhibiteur méiose-spécifique permet d'éviter la dégradation complète des cyclines. Puis l'activité CYC/CDK de méiose II augmente pour permettre l'entrée en division. Le SAC est à nouveau activé. Lorsque les kinétochores sont correctement attachés au fuseau, l'APC/C^{CDC20} détruit les cyclines, l'activité CYC/CDK chute et la cellule sort de méiose. La dégradation d'une activité CYCA/CDK de phase S n'a pas été établie en méiose.

APC/C^{CDH1} (Jaspersen et al., 1999). Des mécanismes identiques ont été décrits chez les vertébrés et la drosophile (Peters, 2006) (Figure B.II.6).

Des études récentes ont mis en évidence trois nouveaux régulateurs de l'APC/C chez les plantes. La protéine SAMBA présente des similarités avec la sous-unité APC16 des vertébrés. SAMBA pourrait être un régulateur négatif de la croissance en agissant comme un compétiteur des activateurs de l'APC/C. En interagissant avec AtCDC27b, SAMBA se substituerait à CDC20 ou CDH1. Cependant, SAMBA pourrait participer à la dégradation des cyclines de type A en activant l'APC/C lors du développement de la graine et de la plantule chez *Arabidopsis thaliana*. La mutation *samba* entraîne une augmentation de CYCA2 ;3 à ces stades, suggérant que SAMBA pourrait être un potentiel activateur de l'APC/C. L'analyse du mutant indique que SAMBA n'est pas impliquée en méiose (Eloy et al., 2012). Deux autres inhibiteurs de l'APC/C chez *Arabidopsis thaliana*, UVI4 et OSD1/GIG1, jouent un rôle dans la régulation du cycle mitotique (Heyman et al., 2011; Iwata et al., 2011). L'analyse du rôle méiotique de ces protéines fait partie de mes travaux de thèse, leurs modes d'action seront décrits dans le chapitre Résultats.

2. Le "cycle cellulaire" méiotique

La plupart des éléments de la machinerie cellulaire utilisée en mitose sont également requis lors de la méiose. Cependant le cycle méiotique présente des modifications qui la différencient d'un cycle mitotique ; une prophase prolongée, deux divisions successives différentes précédées d'une unique phase de réplication.

En méiose, la première division chromosomique est précédée d'une prophase prolongée pendant laquelle les chromosomes homologues subissent la recombinaison méiotique. Au cours de cette prophase prolongée, l'activité CYC/CDK est maintenue à un niveau bas. En méiose I, l'activité CYC/CDK augmente puis chute pour permettre la séparation des chromosomes homologues. Cette activité n'est que partiellement inactivée lors de la transition méiose I-méiose II afin d'empêcher la réplication de l'ADN entre les deux ségrégations de chromosomes. L'activité CYC/CDK augmente à nouveau en méiose II pour permettre la séparation des chromatides sœurs. Puis, l'inactivation complète de cette activité permet la séparation des chromatides sœurs et la sortie de la méiose (Marston and Amon, 2004) (Figure B.II.7).

2.1. Cas particulier de la méiose femelle chez les vertébrés

Chez la plupart des organismes, lorsqu'une cellule entre en méiose, le déroulement de la méiose se poursuit sans interruption jusqu'à la production de cellules haploïdes. Cependant lors de la formation des gamètes femelles chez les vertébrés, le cycle méiotique s'arrête à différents stades. Ainsi l'oocyte s'arrête au stade diplotène de prophase I, lors du développement embryonnaire. A la puberté, le cycle méiotique reprend jusqu'à la métaphase II. C'est la fécondation qui permet la reprise de la seconde division et la fin de la

	CDK	Cyclines	Expression	Activité CYC/CDK
<i>S. cerevisiae</i>	ScCDC28	CLB1	Méiose I et Méiose II	Méiose I
		CLB3	Méiose I et Méiose II	Méiose II
		CLB4	Méiose I et Méiose II	Méiose I à métaphase II
		CLB5	Phase S pré-méiotique Méiose I et Méiose II	Phase S - Méiose I- Méiose II - Absence d'activité lors de la transition méiose I-méiose II
		CLB6	Phase S pré-méiotique	Phase S
<i>S. pombe</i>	SpCDC2	SpCIG2	Phase S pré-méiotique Méiose I et Méiose II	Phase S - Méiose I - Méiose II
		SpCDC13	Phase S pré-méiotique Méiose I et Méiose II	Méiose I - Méiose II
		SpREM1	Phase S pré-méiotique	Phase S - Prophase

Tableau B.II.2 : Protéines impliquées dans l'activité CYC/CDK en méiose chez les levures

méiose. La méiose femelle des vertébrés utilise des mécanismes particuliers afin de stopper la progression méiotique lors de ces arrêts (Whitaker, 1996).

2.2. La prophase prolongée retarde l'entrée en méiose I

La présence de point de contrôle en prophase permet de coordonner dans le temps la recombinaison et la méiose I. L'activation de ces points de contrôle permet de transmettre un signal à différents mécanismes cellulaires, dont la progression du cycle cellulaire, retardant ainsi l'entrée en méiose I afin de compléter toutes les étapes de la recombinaison méiotique (Hochwagen and Amon, 2006).

Chez *S. cerevisiae*, l'entrée en méiose I requiert le facteur de transcription méiose-spécifique, ScNDT80. ScNDT80 permet le désassemblage du complexe synaptonémal ainsi que la formation du fuseau, en favorisant la transcription des cyclines de phase M (ScCLB1 et ScCLB4) (Chu and Herskowitz, 1998). La présence de cassures double brins inhiberait l'accumulation de ScNDT80 empêchant ainsi l'accumulation des cyclines (Tung et al., 2000). L'activité CYC/CDK de phase M ne peut alors pas atteindre le seuil minimum nécessaire pour entrer en phase M. Parallèlement, lorsque ces points de contrôle sont activés, la kinase ScWEE1 est stabilisée et phosphoryle ScCDC28 au niveau de sites essentiels à son activité, inhibant ainsi l'activité CYC/CDK (Leu and Roeder, 1999) (Figure B.II.7).

Des études récentes montrent que chez *S. cerevisiae*, l'activateur de l'APC/C méiose-spécifique AMA1 jouerait un rôle important dans l'entrée en méiose I. Chez un mutant *Scama1*, la prophase I est réduite et le fuseau de microtubules est assemblé prématurément. En prophase I, l'APC/C^{AMA1} serait responsable de la dégradation du facteur de transcription mitose-spécifique ScNDD1, permettant ainsi à ScNDT80 de réguler l'entrée en méiose I. Ces résultats suggèrent que certains mécanismes mitotiques doivent être éliminés pour laisser la place à un contrôle méiose-spécifique (Okaz et al., 2012).

2.3. L'activité CYC/CDK en méiose

2.3.1. Chez *S. cerevisiae*

S. cerevisiae possède six cyclines de type B (CLB1 à CLB6) (Dahmann and Futcher, 1995). CLB2, la cycline majoritaire en mitose, n'est pas exprimée et ne joue pas de rôle en méiose. Les cyclines CLB5 et CLB6 ont été montrées comme nécessaires lors de la phase de réplication pré-méiotique (Stuart and Wittenberg, 1998; DeCesare and Stuart, 2012). Grâce à des méiocytes synchronisés où le gène *ScNDT80* est placé derrière un promoteur inductible, les cyclines impliquées en méiose ont été identifiées. Les quatre cyclines (CLB1, CLB3, CLB4 et CLB5) sont surexprimées en méiose I et réprimées en fin de méiose II. Mais CLB1 est associée avec la CDK uniquement en méiose I, suggérant un mécanisme d'inhibition de CLB1 en méiose II. L'activité CLB5/CDK est présente en méiose I et II mais disparaît lors de la transition méiose I-méiose II, suggérant une dégradation spécifique de CLB5. L'activité CLB4/CDK, disparaît quant à elle, au cours de la méiose II alors que CLB3 serait uniquement

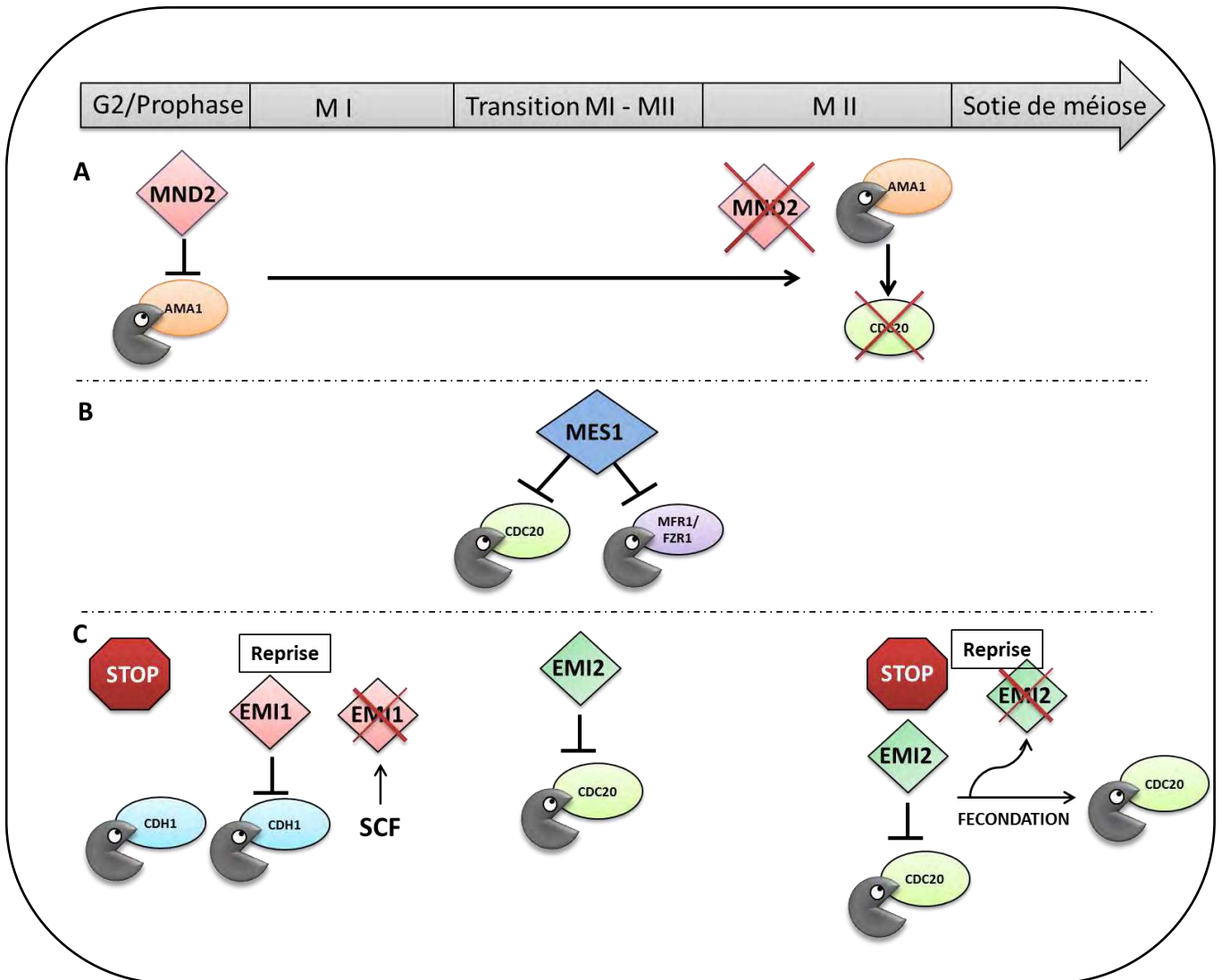


Figure B.II.8 : Régulation de l'APC/C au cours de la méiose

A : Chez *S. cerevisiae*, MND2 inhibe l'APC/C^{AMA1} en prophase. Cette inhibition subsiste jusqu'à la dégradation de MND2 en fin de méiose II. L'activité de l'APC/C^{AMA1} permet la dégradation de ScCDC20 et la sortie de la méiose.

B : Chez *S. pombe*, l'APC/C^{CDC20} et l'APC/C^{MFR1/FZR1} sont inhibés par SpMES1 lors de la transition méiose I-méiose II.

C : Chez les vertébrés, après l'arrêt en prophase I, EMI1 inhibe APC/C^{CDH1} afin de permettre l'accumulation des cyclines B et la progression en méiose I. Puis EMI1 est dégradée par le complexe SCF. Lors de la transition méiose I-méiose II, EMI2/ERP1 inhibe partiellement APC/C^{CDC20} pour maintenir une activité CYC/CDK résiduelle et empêcher la réplication. Lors de l'arrêt en métaphase II, EMI2/ERP1 inhibe l'APC/C^{CDC20} jusqu'à la fécondation.

D'après Pesin *et al.* 2008

active en méiose II. Ces résultats suggèrent que l'activité CYC/CDK est différente entre la méiose I et la méiose II. De plus, lorsqu'on force l'activité de CLB3 en méiose I, on observe une séparation des chromatides sœurs. Les mêmes résultats ont été obtenus quand on force l'expression de la cycline mitotique CLB2 en méiose I (Carlile and Amon, 2008)(Tableau B.II.2).

2.3.2. Chez *S. pombe*

Chez *S. pombe* la CDK, SpCDC2, est nécessaire à la réplication pré-méiotique et aux deux divisions méiotiques. L'activité kinase de SpCDC2 augmente lors de la phase S pré-méiotique et atteint un sommet lors des divisions méiotiques (Murakami and Nurse, 1999). Trois cyclines ont été mises en évidence pour leur rôle en méiose. SpCIG2 s'associe avec SpCDC2, le complexe CIG2/CDC2 est actif lors de la réplication pré-méiotique et une activité CIG2/CDC2 est présente en méiose I. SpCIG2 est également requise en méiose II (Borgne et al., 2002). CDC13 est la cycline B de phase M et est essentielle aux deux divisions (Grallert and Sipiczki, 1991; Iino et al., 1995). La cycline B, REM1, est présente uniquement en méiose. Elle est exprimée dès la phase S pré-méiotique. REM1 et CIG2 sont nécessaires à la réplication pré-méiotique. De plus, le mutant *rem1* présente des défauts de recombinaison méiotique (Malapeira et al., 2005) (Tableau B.II.2).

2.3.3. Chez les vertébrés

Chez la souris femelle, l'oocyte arrêté en diplotène contient une faible quantité de cycline B1 (Ledan et al., 2001; Solc et al., 2010). Les études ont mis en évidence que l'arrêt en prophase I est préservé grâce à une inhibition de CDK1 et un complexe APC/C^{CDH1} actif qui empêche l'accumulation de la cycline B1 (Reis et al., 2008). L'activité de l'APC/C^{CDH1} serait stimulée par BUBR1 (un composant du SAC) qui stabiliserait CDH1 (Homer et al., 2009). Lors de la reprise de la méiose, l'inhibiteur EMI1 empêche l'APC/C^{CDH1} de détruire la cycline B1 permettant son accumulation et l'entrée en division (Marangos et al., 2007). Puis EMI1 est dégradée par le complexe SCF lors de la rupture de l'enveloppe nucléaire (Figure B.II.8). Ainsi la quantité de CYCB1 augmente et l'activité CYCB1/CDK atteint un pic en fin de première division (Verlhac et al., 1994). L'activation de l'APC/C est nécessaire pour achever la méiose I, notamment pour la dégradation de la cycline B1 et de la sécurine (Ledan et al., 2001; Terret et al., 2003). L'expression de CYCB1 non destructible entraîne un blocage en métaphase I (Herbert et al., 2003). Lors de l'entrée en méiose II, l'activité CYCB1/CDK1 augmente à nouveau et cette activité se maintient à un niveau élevé lors de l'arrêt en métaphase II. L'inhibition de l'APC/C est un des mécanismes à l'origine du maintien d'une activité CYCB/CDK élevée. La protéine EMI2 (endogenous meiotic inhibitor 2 ou Emi1-related protein 1 XIERP1), un paralogue d'EMI1, est un inhibiteur de l'APC/C qui permet de maintenir un niveau élevé d'activité CYCB/CDK lors de l'arrêt en métaphase II (Madgwick and Jones, 2007; Perry and Verlhac, 2008; Von Stetina and Orr-Weaver, 2011).

La cycline A2 a récemment été mise en évidence pour son rôle lors de la méiose femelle chez la souris. CYCA2 est nécessaire à l'entrée en méiose I et à la séparation des chromatides sœurs en méiose II. Lorsque CYCA2 est présente artificiellement en méiose I, on observe une séparation prématurée des chromatides sœurs et un arrêt en anaphase I. Ainsi CYCA2 doit être présente pour entrer en méiose I mais absente lors de la progression en méiose I. Puis CYCA2 doit à nouveau être présente en méiose II pour permettre la séparation des chromatides sœurs (Touati et al., 2012).

2.3.4. Chez les plantes

Peu de données sont actuellement disponibles sur la progression méiotique chez les plantes. C'est AtCDKA;1 qui semble être le régulateur clé de la progression méiotique. Le mutant *Atcdka;1* n'est pas viable mais un allèle faible de ce gène présente des défauts lors de la méiose mâle et femelle (Dissmeyer et al., 2007). Cependant on ne peut exclure l'activité d'autres CDK lors de la méiose chez *Arabidopsis thaliana*.

La cycline AtCYCA1;2/TAM (Tardy Asynchronous Meiosis) a été identifiée comme impliquée dans la progression méiotique, car une mutation ponctuelle dans ce gène entraîne un ralentissement de la progression lors de la méiose mâle (Magnard et al., 2001; Wang et al., 2004b). L'étude de TAM fait partie des travaux que j'ai réalisés au cours de ma thèse, les données obtenues seront reprises dans le chapitre Résultats.

Deux protéines impliquées dans la sortie de la méiose ont également été décrites chez *Arabidopsis thaliana*. AtSMG7 (Suppressor with Morphogenetic effects on Genitalia7) est une protéine conservée et impliquée dans le RNA decay. La mutation *Atsmg7* induit une stérilité suite à un arrêt en méiose au stade anaphase II. Cet arrêt est lié à une activité CYC/CDKA;1 qui ne diminue pas après la ségrégation des chromosomes en anaphase II (Riehs et al., 2008; Bulankova et al., 2010). TDM1 (Three Division Mutant 1) est le premier régulateur du cycle méiotique à avoir été identifié chez *A. thaliana*. TDM1 est une protéine de fonction inconnue qui semble méiose-spécifique. Le mutant *Attdm1* présente un défaut méiotique original où la méiose II mâle est suivie d'une troisième division entraînant la formation de spores aberrantes (Ross et al., 1997; Glover et al., 1998; Bulankova et al., 2010).

2.4. La transition méiose I-méiose II

L'absence de phase de réplication entre les deux divisions méiotiques est une particularité présente uniquement en méiose et qui nécessite une régulation fine. Lors de la transition méiose I-méiose II, l'activité CYC/CDK doit être assez faible pour permettre la dépolymérisation du fuseau mais pas complètement éteinte afin d'empêcher l'activation des complexes de pré-réplication (Figure B.II.7)(Marston and Amon, 2004).

2.4.1. Mise en évidence d'une activité résiduelle CYC/CDK lors de la transition méiose I-méiose II

L'analyse d'oocytes de *X. laevis in vitro* a permis de montrer qu'une faible activité CDK persiste après la fin de la méiose I. Cette activité résiduelle est nécessaire pour inhiber l'entrée en phase de réplication entre les deux divisions méiotiques (Furuno et al., 1994; Iwabuchi et al., 2000). L'injection d'une forme dominante négative de XICDK1 dans des oocytes de *X. laevis* entraîne une réplication prématurée de l'ADN lors de la transition méiose I-méiose II (Furuno et al., 1994). De plus, lorsque la cycline B est complètement dégradée en fin de méiose I, la cellule entre en interphase au lieu d'entrer en méiose II (Iwabuchi et al., 2000; Ledan et al., 2001). Ces études montrent que cette activité résiduelle serait plutôt liée à la stabilisation d'une partie des cyclines B plutôt qu'à une nouvelle synthèse (Kobayashi et al., 1991). Cependant une autre étude montre que le maintien d'une activité résiduelle, chez *X. laevis*, est également lié à la néo-synthèse de cyclines B lors de la transition méiose I-méiose II (Hochegger et al., 2001).

Chez *S. pombe*, l'étude de la cycline, SpCDC13 suggère également une diminution et pas une disparition complète de la quantité de cycline lors de la transition méiose I-méiose II car l'activité CDC13/CDK reste élevée au cours des deux divisions méiotiques. Cependant une diminution de SpCDC13 n'a pas pu être observée directement dans les cellules synchronisées (Borgne et al., 2002). L'analyse, par quantification, d'une fusion SpCDC13::GFP montre une baisse de la quantité de la cycline SpCDC13 d'environ 50% entre la métaphase I et l'anaphase I et pas une disparition complète du signal GFP (Izawa et al., 2005).

2.4.2. Maintien d'une activité CYC/CDK résiduelle

Une dégradation partielle des cyclines pourrait être à l'origine de cette activité résiduelle. On peut alors facilement imaginer que l'inhibition de l'APC/C lors de la transition soit à l'origine de la dégradation partielle des cyclines B (Gross et al., 2000).

L'analyse du mutant *Spmes1* chez *S. pombe*, a permis de faire le lien entre l'inhibition de l'APC/C et la dégradation partielle de la cycline B, CDC13. Le mutant *Spmes1* produit des spores diploïdes car sa méiose se termine avant l'entrée en méiose II (Shimoda et al., 1985). L'observation de la cycline SpCDC13 fusionnée à la GFP montre que SpCDC13 est complètement détruite en fin d'anaphase I chez un mutant *Spmes1* (Izawa et al., 2005). Grâce à un crible suppresseur, cette équipe a identifié une mutation dans SpCDC20 capable de supprimer le phénotype du mutant *Spmes1*, suggérant que SpMES1 peut inhiber l'APC/C^{CDC20}. *S. pombe* possède également un activateur méiose-spécifique MFR1/FZR1. APC/C^{MFR1/FZR1} est impliquée dans la dégradation de la cycline SpCDC13 en fin de méiose II nécessaire à la formation des spores (Blanco et al., 2001; Kimata et al., 2011). Cependant MFR1/FZR1 participe également à la dégradation de SpCDC13 lors des deux divisions méiotiques car la dégradation de SpCDC13 est ralentie en anaphase I et II chez un mutant *Spmfr1/fzr1* (Yamamoto et al., 2008). Cette étude montre également que l'APC/C^{MFR1/FZR1} n'est pas inhibé efficacement par le SAC et que MFR1/FZR1 n'interagit pas avec SpMAD2,

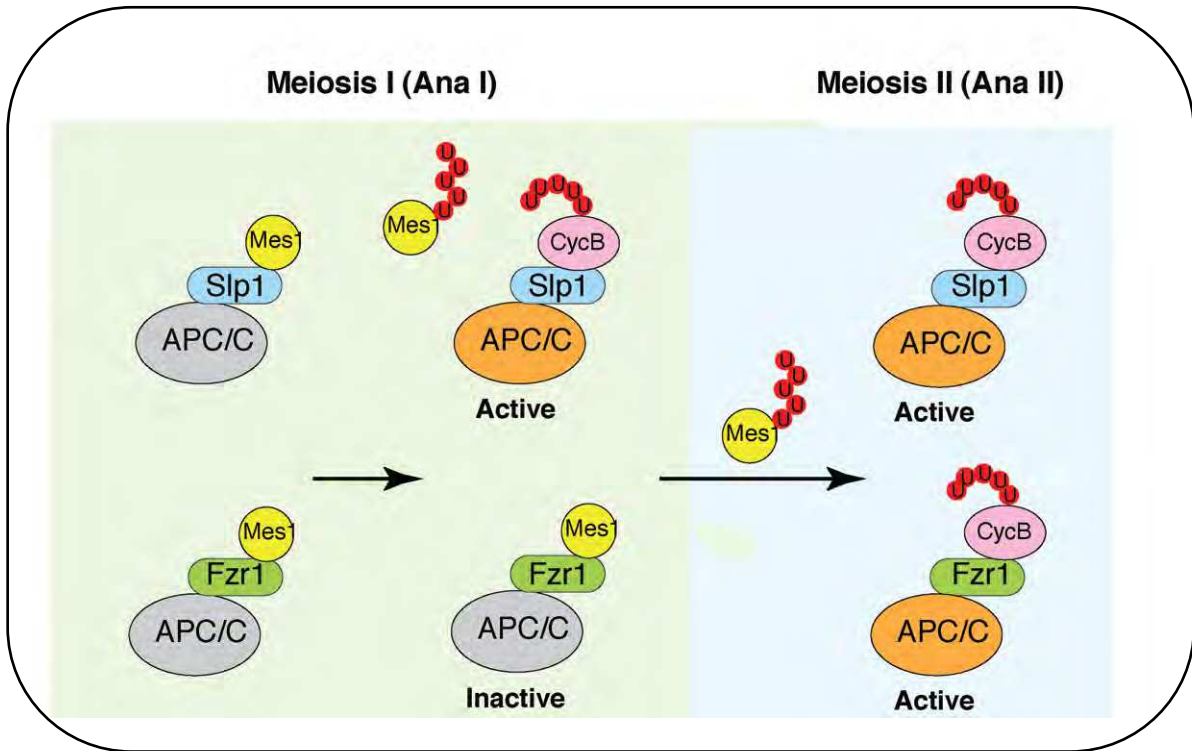


Figure B.II.9 : Modèle de régulation de l'APC/C par SpMES1 au cours de la méiose

Sur le schéma : Slp1 = SpCDC20 et FZR1 = SpMFR1/FZR1

SpMES1 se fixe à SpCDC20 et SpMFR1/FZR1 pour inhiber APC/C^{CDC20} et APC/C^{MFR1/FZR1} en méiose I. Puis l'APC/C^{CDC20} ubiquitinyne SpMES1 et se libère de son inhibition. En méiose II, SpMES1 est ubiquitynilée et dégradée. APC/C^{CDC20} et APC/C^{MFR1/FZR1} sont activés pour achever la méiose II. D'après Kimata *et al.* 2011

suggérant qu'APC/C^{MFR1/FZR1} aide APC/C^{CDC20} à accomplir l'anaphase rapidement. L'inhibiteur de l'APC/C méiose-spécifique, SpMES1, est nécessaire pour éviter la dégradation complète des cyclines B en fin de méiose I. SpMES1 est reconnue par les domaines WD40 de SpCDC20 grâce à ses domaines D-box et KEN-box. L'interaction entre SpMES1 et SpCDC20 est indispensable à la fonction inhibitrice de SpMES1 (Izawa et al., 2005; Kimata et al., 2008). Une étude plus récente montre que SpMES1 inhibe APC/C^{CDC20} et APC/C^{MFR1/FZR1} en agissant comme un substrat compétitif sur l'APC/C en méiose I. Puis l'APC/C^{CDC20} ubiquitynile SpMES1 et se libère de son inhibition pour être à nouveau actif, mais l'APC/C^{MFR1/FZR1} reste inactif. En méiose II, SpMES1 est détruit, l'APC/C^{CDC20} et l'APC/C^{MFR1/FZR1} peuvent alors dégrader complètement les cyclines pour sortir de la méiose (Figure B.II.8 et 9). Chez *S. pombe*, une régulation différente des deux activateurs de l'APC/C, par SpMES1, est donc requise lors de la transition méiose I-méiose II (Kimata et al., 2011).

Des études réalisées chez la souris et le xénope ont permis d'identifier MmEMI2/XIERP1 comme un inhibiteur de l'APC/C responsable de l'activité résiduelle CYC/CDK lors de la transition méiose I-méiose II (Madgwick et al., 2006; Ohe et al., 2007; Tang et al., 2008a) (Figure B.II.8). Chez le xénope, XIERP1 est détectée dans les oocytes juste avant la transition et persiste jusqu'à l'arrêt en métaphase II. De plus, les oocytes *Xlerp1* n'entrent pas en méiose II et répliquent leur ADN après la première division (Ohe et al., 2007). Chez la souris, MmEMI2 est essentielle à la stabilisation des cyclines B en fin de méiose I et à la formation du fuseau en méiose II (Madgwick et al., 2006). La protéine MmEMI2 est finement régulée au cours de la méiose femelle, les études ont montré que la présence d'une quantité importante de MmEMI2 en méiose I entraîne un arrêt en métaphase I (Madgwick et al., 2006). En méiose I, MmEMI2 serait dégradée par une voie de phosphorylation faisant intervenir l'activité CYCB/CDK. Les auteurs suggèrent que l'activité CYCB/CDK en méiose I est plus importante (ou différente) qu'en méiose II. Ainsi MmEMI2 serait dégradée jusqu'en fin de méiose I puis présente dans l'oocyte de la transition méiose I-méiose II, pour inhiber la destruction complète des cyclines B, jusqu'à l'arrêt en métaphase II pour maintenir une activité CYCB/CDK élevée (Tang et al., 2010). Différentes études ont montré qu'EMI2 agit comme un substrat compétitif de l'APC/C, sa D-box entre en compétition avec celle des substrats de l'APC/C et son domaine ZBR (Zinc binding région) bloque l'activité ubiquitine ligase de l'APC/C (Miller and Summers, 2006). La D-box et le ZBR de MmEMI2/XIERP1 sont également nécessaires à l'inhibition de l'APC/C. Néanmoins, l'interaction entre la D-box et l'APC/C serait partielle et non-essentielle à l'inhibition (Nishiyama et al., 2007; Tang et al., 2010). La RL-tail, présente en C-terminale, serait le point d'ancrage de MmEMI2/XIERP1 (et d'EMI1) à l'APC/C via la sous-unité CDC27, permettant aux domaines D-box et ZBR d'inhiber l'APC/C. L'analyse de l'interaction MmEMI2/XIERP1-CDC27 montre que le site de fixation de la RL-tail d'EMI2 est distinct du site de fixation de l'IR-tail de CDC20 à l'APC/C, confirmant que les membres de cette famille d'inhibiteur de l'APC/C ne sont pas des compétiteurs des activateurs de l'APC/C (Ohe et al., 2010). Tang *et al.* propose un modèle où MmEMI2/XIERP1 inhiberait l'APC/C^{CDC20} en bloquant le transfert des ubiquitines de l'APC/C vers le substrat (Tang et al., 2010).

	Protéine	Mutant	Phénotype méiotique du mutant	Rôle de la protéine
<i>S. cerevisiae</i>	ScCLB1	<i>Scclb1/Scclb4</i>	Absence de seconde division	Protéines impliquées dans l'activité CYC/CDK en méiose
	ScCLB3	<i>Scclb1/Scclb3</i>	Absence de seconde division	
	ScCLB4	<i>Scclb1/Scclb3/Scclb4</i>	Absence de seconde division	
	ScSPO13	<i>Scspo13</i>	Une division équationnelle	Inconnu
	ScSPO12	<i>Scspo12</i>	Une seule division, comprenant la méiose I et II	Protéines impliquées dans les mécanismes de sortie de division
	ScSLK19	<i>Scslk19</i>		
<i>S. pombe</i>	SpMES1	<i>Spmes1</i>	Absence de seconde division	Inhibition de l'APC/C
<i>X. laevis</i>	XIERP1/EMI2	<i>Xlerp1/emi2</i>	Absence de seconde division	Inhibition de l'APC/C
<i>A. thaliana</i>	AtOSD1	<i>Atosd1</i>	Absence de seconde division	Voir Résultats

Tableau B.II.3 : Protéines impliquées dans la transition méiose I-méiose II

2.4.3. Autres protéines essentielles à la transition méiose I-méiose II

L'observation de mutants n'effectuant pas la transition méiose I-méiose II chez les différentes espèces modèles a permis d'identifier d'autres composants de la machinerie cellulaire indispensable à la progression méiotique (Tableau B.II.3).

Chez *S. cerevisiae*, la progression des divisions méiotiques nécessite cinq cyclines B. Les mutants de chacune de ces cyclines ne présentent pas de phénotype méiotique. Cependant l'absence de deux ou trois de ces cyclines (*clb1clb4*, *clb1clb3* ou *clb1clb3clb4*) entraîne la formation de spores diploïdes viables (Dahmann and Futcher, 1995). L'analyse du double mutant *clb1clb4* montre que le phénotype est lié à une absence de seconde division méiotique (Kiburz et al., 2008). Ainsi chez *S. cerevisiae*, la distribution de l'activité des différentes cyclines au cours de la méiose et l'analyse des mutants montrent qu'au moins deux cyclines (dont CLB1) sont nécessaires à la transition méiose I-méiose II (Tableau B.II.3).

La protéine ScSPO13 est impliquée, entre autre, dans la progression méiotique. ScSPO13 est une protéine méiotique, présente uniquement chez les levures apparentées à *S. cerevisiae* et de fonction inconnue. Chez le mutant *Scspos13*, la méiose se limite à une unique division équationnelle (Klapholz and Esposito, 1980). Le rôle de ScSPO13 dans la ségrégation des chromosomes homologues sera repris dans les chapitres B.III et B.IV. Au niveau du cycle méiotique, ScSPO13 serait un régulateur négatif de la progression car le phénotype du mutant *Scspos13* peut être partiellement supprimé en ralentissant la méiose et la surexpression de *ScSPO13* retarde l'achèvement de la méiose I (Mccarroll and Esposito, 1994). Les auteurs suggèrent que ScSPO13 pourrait compenser la chute de l'activité CYC/CDK lors de la transition méiose I-méiose II pour permettre l'entrée en deuxième division sans phase de réplication. L'analyse de la surexpression de *ScSPO13* en mitose montre que ScSPO13 peut retarder l'anaphase en inhibant l'APC/C (Varela et al., 2010). Cependant le rôle exact de ScSPO13 lors de la progression méiotique reste inconnu (Tableau B.II.3).

Deux autres mutants de *S. cerevisiae*, *Scspos12* et *Scslk19*, présentent une méiose réduite à une seule division (Klapholz and Esposito, 1980). Chez ces mutants, le fuseau n'est pas désassemblé à la fin de l'anaphase I, la méiose se poursuit et les chromatides sœurs se séparent à ce moment-là. Ceci suggère que la méiose II est initiée avant la fin de la méiose I et que ScSPO12 et ScSLK19 appartiennent à un mécanisme de surveillance qui bloque la progression du cycle tant que la méiose I n'est pas terminée (Buonomo et al., 2003; Marston et al., 2003). ScSLK19 et ScSPO12 appartiennent à la voie FEAR (CDC fourteen early anaphase release) et sont impliquées dans le relargage de CDC14 en anaphase. La phosphatase CDC14 joue un rôle essentiel dans l'inactivation de l'activité CYC/CDK nécessaire à la sortie du cycle (Visintin et al., 1998). Les mutations *Scspos12* et *Scslk19* retardent le relargage de CDC14 et donc le désassemblage du fuseau mais la méiose continue et la seconde division sépare les chromatides sœurs (Tableau B.II.3).

Un crible transcriptomique mené chez *A. thaliana* a permis l'identification d'AtOSD1 (Omission of Second Division), une protéine essentielle à la transition méiose I-méiose II. Le mutant *Atosd1* produit des spores diploïdes viables car chez ce mutant la méiose se limite à une unique division réductionnelle (d'Erfurth et al., 2009). J'ai réalisé une analyse fonctionnelle d'AtOSD1 au cours de ma thèse, les données obtenues seront décrites dans le chapitre Résultats.

2.5. Autres particularités de l'APC/C en méiose

Comme indiqué précédemment, *S. pombe* possède un activateur et un inhibiteur de l'APC/C méiose spécifique, SpMFR1/FZR1 et SpMES1. Les vertébrés possèdent l'inhibiteur de l'APC/C spécifique à la méiose, EMI2/ERP1 (Figure B.II.8).

Chez *S. cerevisiae*, l'activateur de l'APC/C, AMA1, est exprimé uniquement en méiose et est nécessaire à la production de spores. AMA1 est présent dès la phase S pré-méiotique mais son activité est requise en méiose tardive (Cooper et al., 2000). Au cours de la méiose, APC/C^{AMA1} est inhibée par ScMND2 pour éviter une séparation précoce des chromosomes (Oelschlaegel et al., 2005; Penkner et al., 2005). Chez un mutant *Scmnd2*, la cohésion est éliminée précocement et la méiose s'arrête à un stade prophase-like suite à l'activation du checkpoint de recombinaison. ScMND2 disparaît au cours de l'anaphase II, permettant ainsi l'activation de l'APC/C^{AMA1}. Ainsi en fin de méiose, l'APC/C^{AMA1} permet la dégradation de ScCDC20 et participe à la sortie de la méiose II et à la formation des spores (Diamond et al., 2009; Tan et al., 2011) (Figure B.II.8). Cependant, une étude récente montre que l'activité de l'APC/C^{AMA1} est essentielle à la prophase prolongée et à la transition prophase I-méiose I (Okaz et al., 2012).

Chez *D. melanogaster*, deux activateurs méiose-spécifiques ont été identifiés. DmCORTEX est impliquée dans la dégradation des cyclines en anaphase I chez la femelle. L'activateur DmFZR2 est, quant à lui, impliqué dans la dégradation des cyclines lors de la méiose mâle (Pesin and Orr-Weaver, 2008).

En méiose aussi, le SAC apparaît comme indispensable à la ségrégation des chromosomes en méiose I et II (Figure B.II.7). L'observation de la méiose de *S. pombe* en direct montre que l'anaphase I et II, par l'observation de la diminution du signal SpCDC13::GFP, sont fortement retardées lorsque des erreurs d'attachement des kinétochores sont induites grâce à des mutations affectant la ségrégation des chromosomes. Le SAC inhibe l'APC/C^{CDC20} car une mutation *Spcdc20* peut limiter le retard observé en anaphase chez un mutant *Spspo11*. Il semblerait que le SAC ne puisse pas inhiber l'APC/C^{MFR1/FZR1}, de plus MFR1/FZR1 n'interagit pas avec MAD2 en double hybride (Yamamoto et al., 2008). Chez *S. cerevisiae*, ScMAD2 régule l'activité de l'APC/C^{CDC20} en métaphase I (Shonn, 2000). De plus, en absence de ScMAD2, l'activation précoce de l'APC/C^{CDC20} accélère l'activité de l'APC/C^{AMA1}. L'activation précoce de l'APC/C^{AMA1} va perturber l'enchaînement des événements du cycle (Tsuchiya et al., 2011). La présence d'un contrôle par le SAC en méiose I chez les vertébrés a longtemps été controversée. Cependant,

l'analyse d'oocytes de souris montre que MmMAD2 est présente au cours de la méiose et se localise au niveau des kinétochores non-attachés pour retarder l'anaphase I (Wassmann et al., 2003). On retrouve une localisation de MAD2 au niveau des kinétochores en méiose I et II chez le maïs (Yu et al., 1999).

En méiose, l'APC/C joue un rôle important dans le contrôle de la ségrégation des chromosomes, la progression du cycle, la coordination des différentes phases méiotiques et les arrêts du cycle au cours de la méiose femelle des vertébrés. L'identification d'activateurs et de régulateurs de l'APC/C méiose-spécifiques a permis de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu au cours des divisions méiotiques. Les différentes étapes de la méiose nécessitent, en plus des composants mitotiques, des complexes APC/C-activateurs ainsi que des régulateurs méiose-spécifiques, montrant qu'un contrôle complexe de la machinerie cellulaire est nécessaire à la formation de cellules haploïdes.

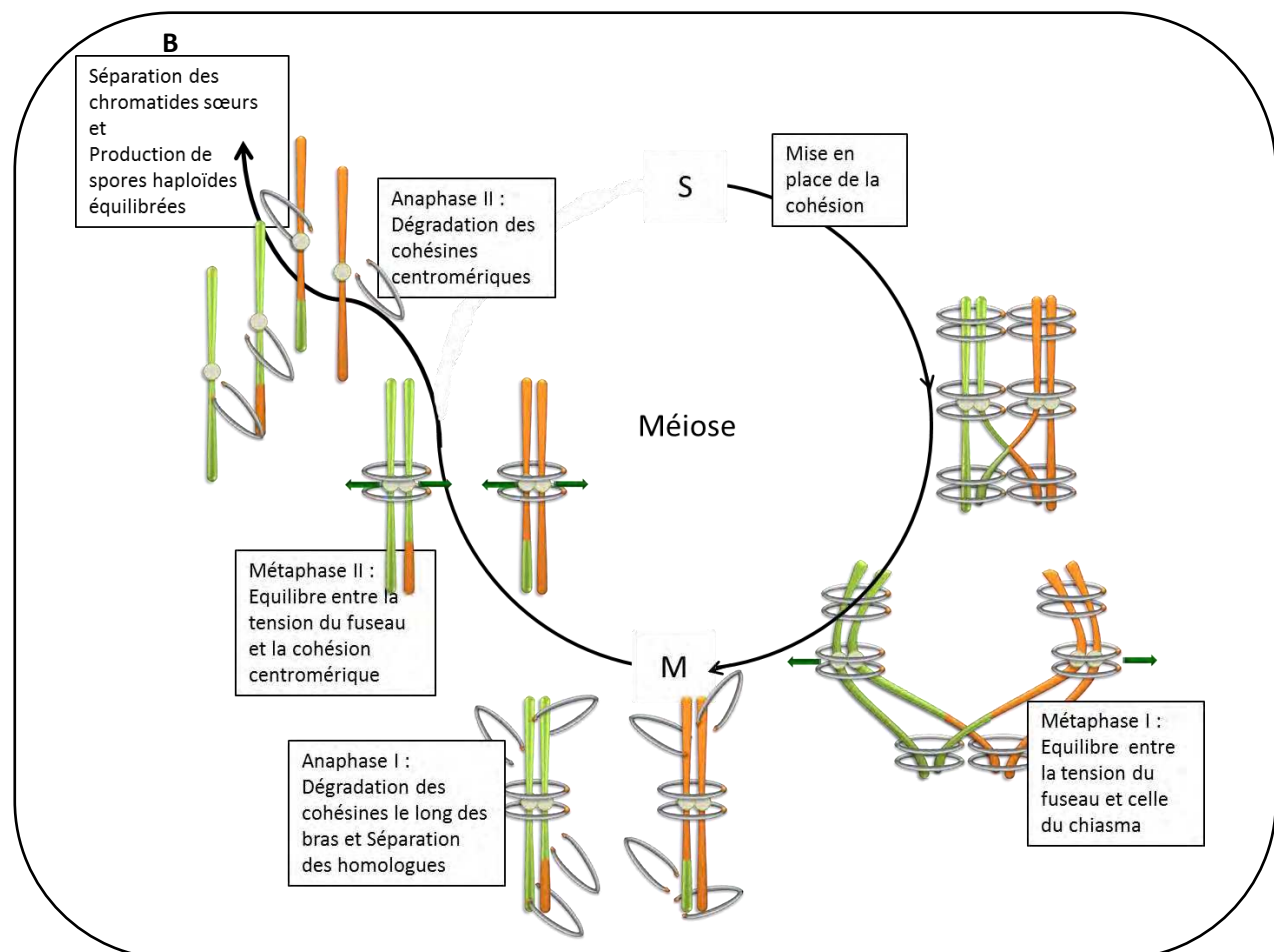
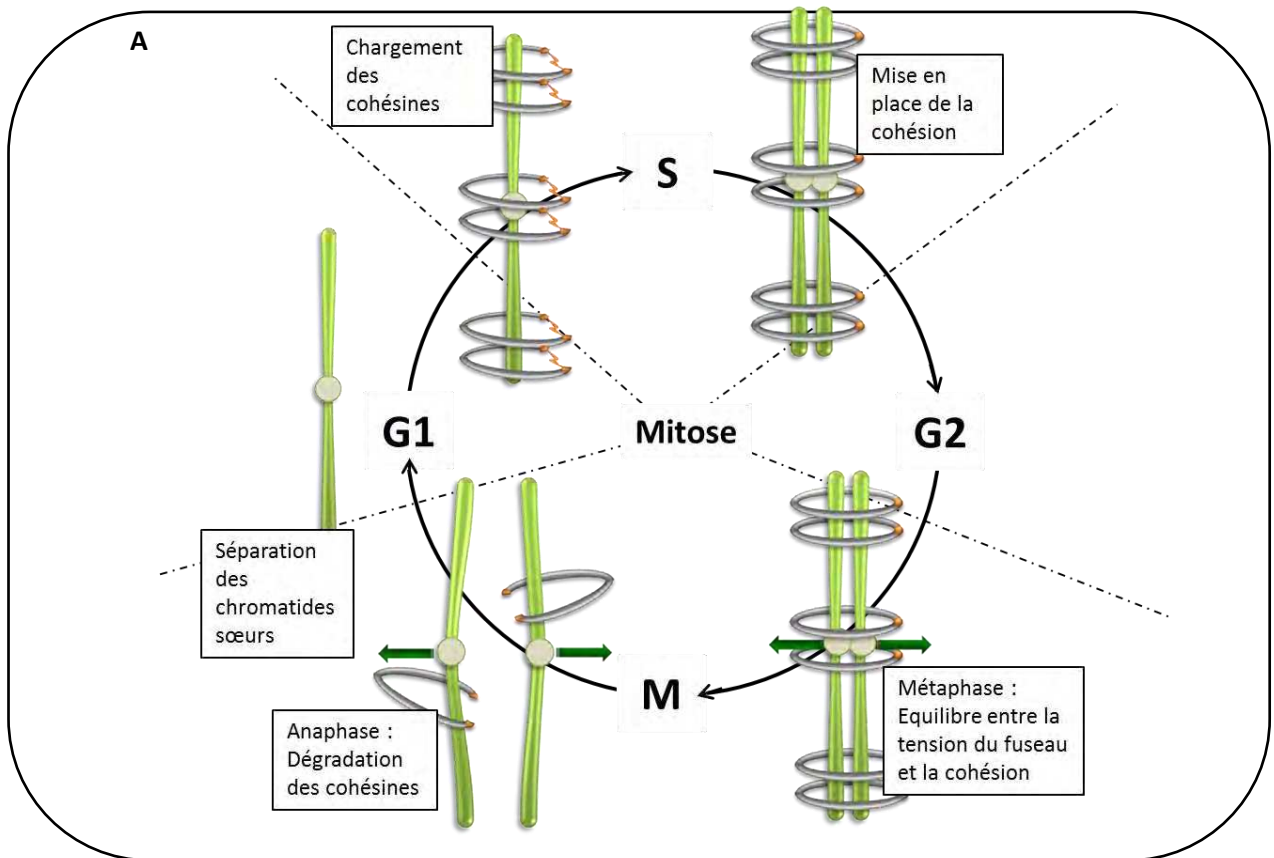


Figure B.III.1 : Dynamique des cohésines lors du cycle cellulaire mitotique (A) et méiotique (B)

III. La cohésion

1. Cohésion

La ségrégation équilibrée des chromatides sœurs est une étape essentielle lors des divisions cellulaires. La cohésion, mise en place lors de la réplication, maintient ensemble les deux chromatides génétiquement identiques. Ce lien physique permet de les maintenir ensemble afin de les séparer correctement en mitose et en méiose lors de l'anaphase.

1.1. La cohésion lors de la mitose

Lors de la mitose, une cellule mère se divise pour donner naissance à deux cellules filles identiques (Figure B.III.1(A)). À l'issue de la phase S, l'ensemble du génome a été répliqué et les chromosomes sont formés de deux chromatides maintenues ensemble par la cohésion. En phase M, les chromatides sœurs doivent être réparties équitablement entre les deux cellules filles. Au niveau des centromères, les kinétochores assurent la connexion entre les chromosomes et le fuseau de microtubules. Ainsi, en métaphase, les chromosomes sont soumis à deux forces opposées : la force générée par le fuseau et la résistance exercée par la cohésion entre les chromatides sœurs. Lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau et bien sous tension, l'anaphase débute. C'est l'élimination de la cohésion par la séparase qui permet de libérer les chromatides sœurs qui vont migrer vers les pôles opposés de la cellule sous l'action du fuseau (Figure B.III.1(A))(Sakuno and Watanabe, 2009).

1.2. La cohésion lors de la méiose

En méiose, la succession d'une phase de réplication suivie de deux étapes de ségrégation de chromosomes nécessite une élimination séquentielle de la cohésion (Figure B.III.1(B)). Comme en mitose, la cohésion est mise en place lors de la phase S. En méiose I, les chromosomes homologues sont liés par les crossing-over, qui ont induit un échange réciproque d'ADN entre deux chromatides non-sœurs. En métaphase I, le mécanisme de recombinaison est achevé et la cohésion entre chromatides sœurs permet de stabiliser les chiasmata. Elle permet de maintenir les homologues ensemble jusqu'à leur séparation équilibrée en anaphase I. Lors de la transition métaphase I-anaphase I, la cohésion est éliminée le long des bras permettant de supprimer le lien physique entre les chromosomes homologues. En anaphase I, la force qui maintenait les homologues entre eux est éliminée, du fait de la destruction de la cohésion de long des bras. La force exercée par le fuseau entraîne les homologues aux pôles opposés de la cellule grâce à la mono-orientation des kinétochores sœurs. La cohésion entre les chromatides sœurs reste néanmoins présente au

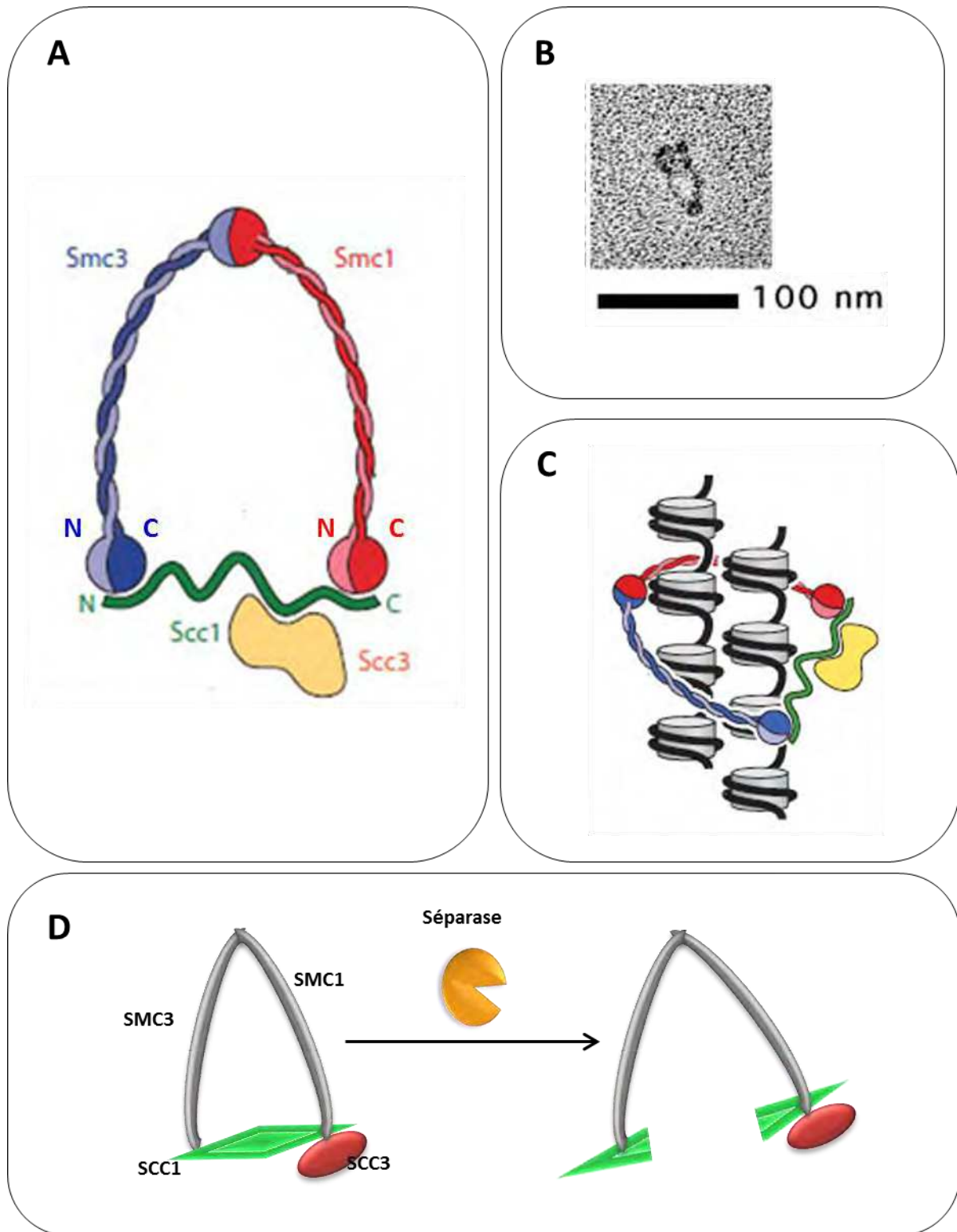


Figure B.III.2: Le complexe de cohésines et l'élimination de la cohésion
 (A) Structure du complexe de cohésines. Le complexe de cohésines forme un anneau protéique composé de quatre sous-unités (D'après Nasmyth et al. 2009) (B) Image de microscopie électronique d'un complexe de cohésines humaines (D'après Anderson et al. 2002) (C) Illustration du modèle de l'encercllement des deux molécules d'ADN sœurs par l'anneau de cohésine (D'après Nasmyth et al. 2009) (D) Le clivage de la sous-unité kléisine (ici SCC1) par la séparase et ouverture de l'anneau de cohésines.

niveau des centromères. Cette cohésion centromérique permet de contrecarrer la force exercée par le fuseau en métaphase II et de mettre les chromosomes sous tension. L'élimination de cette cohésion centromérique permet de séparer équitablement les chromatides sœurs en anaphase II. Cette élimination de la cohésion en deux étapes nécessite des mécanismes de régulation spécifique à la méiose afin de maintenir une cohésion centromérique jusqu'en métaphase II (Figure B.III.1(B))(Sakuno and Watanabe, 2009).

2. Les cohésines en mitose

La nature de la cohésion a été mise en évidence à la fin les années 90 (Melby et al., 1998; Haering et al., 2002). Le complexe multi-protéiques nommé "cohésines" est nécessaire au maintien de la cohésion entre les chromatides sœurs de la réplication jusqu'au déclenchement de l'anaphase (Wood et al., 2010).

2.1. Structure des cohésines

Le complexe de cohésines est formé de quatre sous-unités : SMC1 et SMC3 qui appartiennent à la famille des protéines SMC (Structural Maintenance of Chromosomes), une kléisine (SCC1) et une sous unité SCC3 (Sister Chromatid Cohesion)(Figure B.III.2(A)). Ces quatre protéines sont conservées chez tous les eucaryotes. Cependant, on trouve chez certains organismes des variants de ces sous-unités permettant la formation de complexes de cohésines de compositions différentes. (TABLEAU B.III.1) (Nasmyth and Haering, 2009; Wood et al., 2010).

Les protéines SMC possèdent un domaine coiled-coil antiparallèle qui se replie sur lui-même et qui permet de rapprocher les domaines Nt et Ct (Figure B.III.2(A)). Ces protéines présentent une structure globulaire formant un demi-domaine ATPase, composé grâce à l'association des acides aminés Nt et Ct. Les acides aminés présents au centre du domaine coiled-coil antiparallèle forment une région charnière. Les régions charnières de SMC1 et SMC3 se dimérisent pour former un hétérodimère en forme de V. Les demi-domaines ATPase de SMC1 et SMC3 se situent ainsi à l'extrémité des "bras" (Figure B.III.2(A)) (Haering et al., 2002). Le domaine globulaire de SMC3 est capable d'interagir avec l'extrémité Nt de SCC1, l'extrémité Ct de SCC1 interagit avec le domaine globulaire de SMC1 (Haering et al., 2002; Gruber et al., 2003). SCC1 appartient à une famille de protéine, les kleisines (du grec fermeture) et permettrait de relier les deux domaines globulaires de SMC1 et SMC3 pour former une structure tripartite. Indépendamment, SCC1 interagit avec SCC3 (Haering et al., 2002). La structure et la fonction de SCC3 sont peu connues cependant SCC3 contient des domaines HEAT, suggérant une structure flexible de la protéine et une facilité à établir des interactions protéine-protéine.

La structure en anneau de ce complexe, montré par des observations en microscopie électronique (Figure B.III.2(B)), serait à l'origine de la cohésion entre les chromatides sœurs

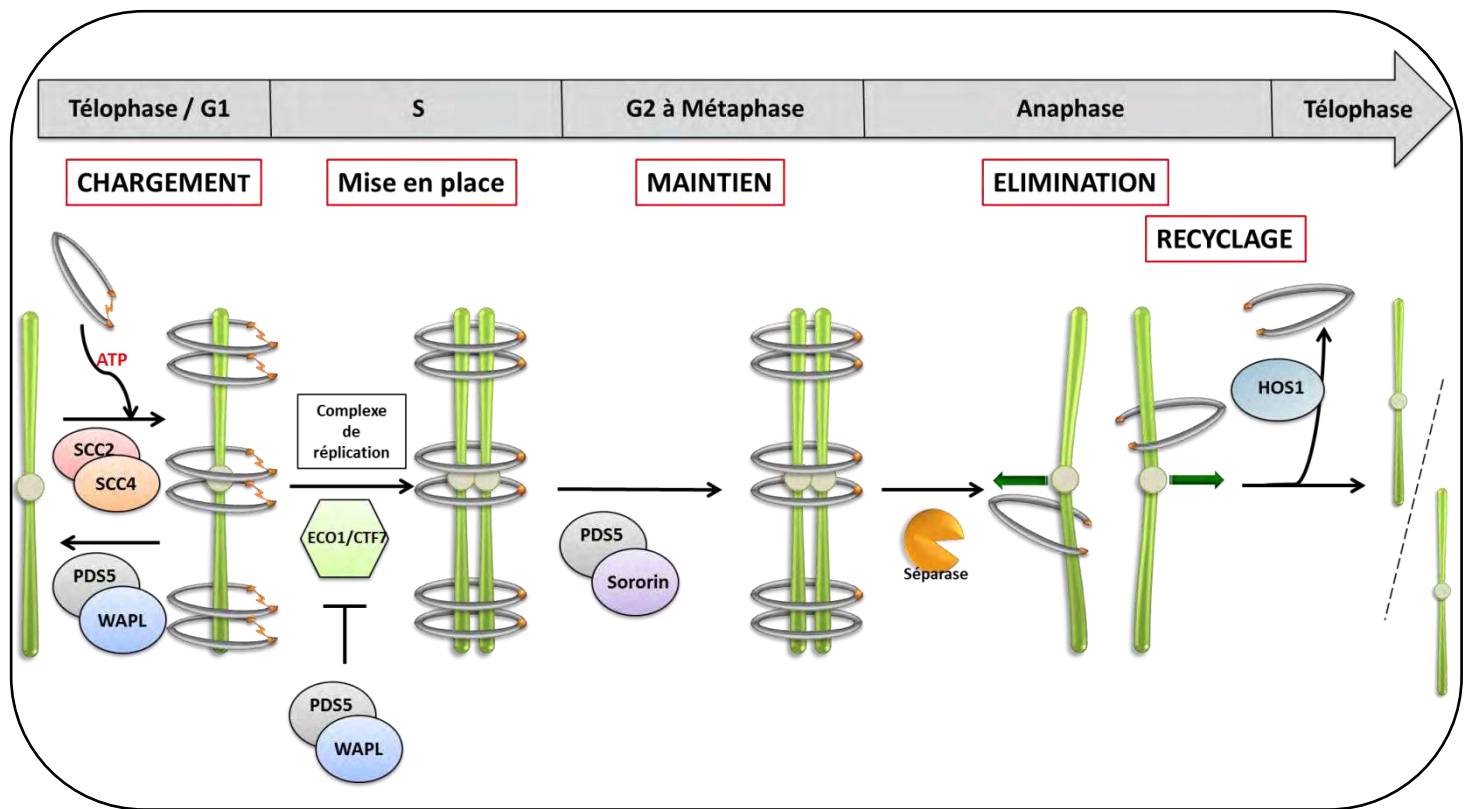


Figure B.III.3 : Les cohésines au cours du cycle cellulaire

Les cohésines sont chargées et déchargées de façon dynamique avant la phase de réplication. La cohésion est établie au cours de la phase S. ECO1/CTF7 et les composants du complexe de réplication sont nécessaires à la mise en place de la cohésion. Jusqu'à la transition métaphase–anaphase, les cohésines sont maintenues au niveau des chromosomes grâce à PDS5 et Sororin. Lors de la transition métaphase–anaphase, la séparase clive la kléisine de l'anneau de cohésines, les chromatides sœurs se séparent. En fin de phase M, les cohésines intactes peuvent être recyclées pour le cycle suivant.

(Haering et al., 2002). Cette structure en anneau a amené les auteurs à proposer le modèle de l'encerclement des deux molécules d'ADN sœurs par l'anneau de cohésine (Figure B.III.2(C)) (Nasmyth and Haering, 2005). Cependant ce modèle n'exclut pas la présence d'autres configurations (Gruber et al., 2006; Haering et al., 2008)

2.2. Chargement des cohésines sur la chromatine

Les cohésines doivent être préalablement chargées sur l'ADN pour permettre l'établissement de la cohésion lors de la phase S. L'hydrolyse de l'ATP au niveau des têtes globulaires de SMC1 et SMC3 et l'action de SCC2 et SCC4, sont nécessaires à ce chargement. Le chargement des cohésines est un mécanisme dynamique où le complexe SCC2/SCC4 charge les cohésines et le complexe WAPL/PDS5 les décharge (Bernard et al., 2008; Nasmyth, 2011) (Figure B.III.3).

Les sites de fixation des cohésines ont été identifiés par immunoprécipitation de la chromatine chez *S. cerevisiae*. Ces expériences montrent que les cohésines se fixent environ tous les 10 kb mais qu'aucune séquence spécifique n'influence la fixation des cohésines (Glynn et al., 2004; Peters et al., 2008). On observe chez la plupart des eucaryotes, un enrichissement en cohésines au niveau du centromère. Les cohésines centromériques sont importantes car les centromères sont directement exposés à la tension du fuseau. Elles participent à l'orientation des kinétochores. C'est la présence de marques sur la chromatine aux centromères qui influencerait le chargement des cohésines. En effet, les cohésines sont plus nombreuses au niveau des régions d'hétérochromatine et cet enrichissement est dépendant de la protéine SWI6 chez *S. pombe*. SpSWI6 est un homologue de HsHP1 (Heterochromatin Protein 1), un composant essentiel de l'hétérochromatine qui se fixe sur les résidus K9 triméthylés de l'histone H3 au niveau des centromères. Chez un mutant *Spswi6*, la quantité de cohésines centromériques est réduite, entraînant des défauts de ségrégation (Bernard et al., 2001b; Nonaka et al., 2002). Cependant le mécanisme d'action de SWI6 pour le chargement des cohésines reste inconnu et n'a été observé que chez *S.pombe*. Dans des cellules humaines, on observe une faible réduction de la quantité de cohésine chez un mutant *Hshp1*, suggérant qu'il existe d'autres mécanismes impliqués dans la localisation des cohésines aux centromères (Peters et al., 2008).

2.3. Mise en place et maintien de la cohésion entre chromatides sœurs

Les cohésines sont préalablement chargées sur l'ADN mais le lien physique qui permet de maintenir ensemble les deux chromatides sœurs n'est établi que lors de la phase S. La protéine ECO1/CTF7 s'associe avec les composants du complexe de réplication pour établir la cohésion (Toth et al., 1999)(Figure B.III.3). ECO1 code une acétyl-transférase qui acétyle la sous-unité SMC3 du complexe de cohésines lors de la mise en place de la cohésion. Cette activité serait contrecarrée par WAPL et PDS5, qui auraient également un rôle antagoniste à ECO1 (Ben-Shahar et al., 2008; Vaur et al., 2012). Les protéines PDS5 et

	SMC1	SMC3	Kléisine	HEAT repeat subunit	Separase	Securin
<i>S.pombe</i>	PSM1	PSM3	RAD21 REC8	PSC3 REC11	CUT1	CUT2
<i>S.cerevisiae</i>	SMC1	SMC3	SCC1=MCD1 REC8	SCC3=IRR1	ESP1	PDS1
<i>C.elegans</i>	HIM1	SMC3	SCC1 COH1 REC8 COH3 COH4	SCC3	SEP-1	IFY-1
<i>D.melanogaster</i>	SMC1	CAP	RAD21 C(2)M	SA SA2	SSE THR	PIM
<i>Mammifères</i>	SMC1a SMC1b	SMC3	RAD21 RAD21L REC8	SA1 SA2 SA3	ESPL1	PTTG1
<i>X.laevis</i>	SMC1a SMC1b	SMC3	RAD21			
<i>A.thaliana</i>	SMC1	SMC3	SYN2 SYN3 SYN4 REC8=SYN1=DIF1	SCC3	AESP1	?

Tableau B.III.1 : Les sous-unités des cohésines chez les différents organismes modèles
 Les protéines en rouge indiquent les sous-unités montrées comme méiose-spécifiques
 D'après Nasmyth *et al.*, 2009, Nasmyth 2011 et Schubert *et al.*, 2009.

Sororin, ont été mises en évidence pour leur rôle dans le maintien de la cohésion après la phase de réplication (Rankin, 2005; Xiong and Gerton, 2010; Vaur et al., 2012)(Figure B.III.3). Les oocytes de mammifères sont un exemple du maintien de la cohésion, ils sont bloqués en prophase méiotique jusqu'à l'ovulation qui peut intervenir après des dizaines d'années. La cohésion, aux centromères et le long des bras, est présente jusqu'à l'ovulation ce qui illustre bien la stabilité de la cohésion et la présence de mécanismes de maintien (Tachibana-Konwalski et al., 2010).

2.4. Mécanismes d'élimination de la cohésion en mitose

L'élimination de la cohésion est nécessaire à la ségrégation des chromatides sœurs. Le complexe de cohésines doit être clivé, par la séparase, pour rompre le lien physique qui maintient les chromatides ensemble. En mitose, chez les levures, l'élimination de la cohésion se déroule en une étape lors de la transition métaphase - anaphase. Chez les vertébrés, la cohésion est éliminée en deux étapes. La cohésion présente le long des bras est éliminée en prophase selon un processus nommé "Prophase Pathway". Puis lors de la transition métaphase-anaphase, les cohésines centromériques sont clivées par la séparase (Figure B.III.4).

2.4.1. Destruction des cohésines par la séparase

Lors de la transition métaphase-anaphase, il est impératif de libérer les chromatides sœurs pour permettre leur séparation. Ainsi toute la cohésion présente sur les chromatides doit être éliminée (Figure B.III.4 (A)). Ce mécanisme doit être fortement surveillé pour éviter les erreurs de ségrégations délétères pour les cellules filles.

Des travaux réalisés chez la levure ont montré que le clivage de SCC1 par une endopeptidase, nommée séparase, est responsable de la libération des chromatides sœurs (Uhlmann et al., 2000)(Figure B.III.2 (D)). De plus, l'expression d'une version non-clivable de SCC1, dans des cellules HeLa entraîne un arrêt du cycle en métaphase (Hauf et al., 2001). Des études *in vitro* ont montré que la polo-like kinase (PLK) pouvait phosphoryler SCC1. La phosphorylation de SCC1 favorise la capacité de SCC1 à être clivé par la séparase lors de la transition métaphase-anaphase (Sumara et al., 2002). *Arabidopsis* possède un gène codant une séparase, les mutants d'insertion dans ce gène ne sont pas viables (Liu and Makaroff, 2006). Cependant l'analyse d'un mutant thermosensible dans ce gène a mis en évidence des défauts de séparation des chromatides sœurs entraînant une fragmentation des chromosomes lors de la mitose (Wu et al., 2010). Le clivage de la kléistine par la séparase permet l'élimination de la cohésion et la séparation des chromatides sœurs. Ainsi la séparase ne doit pas être activée avant la transition métaphase-anaphase. L'activité de la séparase est inhibée par une protéine chaperonne, la sécurine, évitant une séparation précoce des chromatides sœurs. Les sécurines ont été mises en évidence de façon indépendante chez *S. pombe* et *S. cerevisiae* car elles ne présentent pas d'homologie de

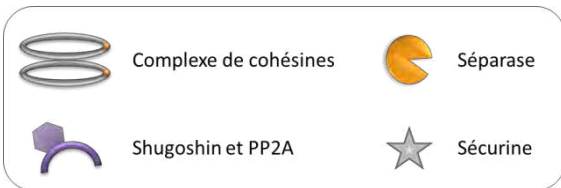
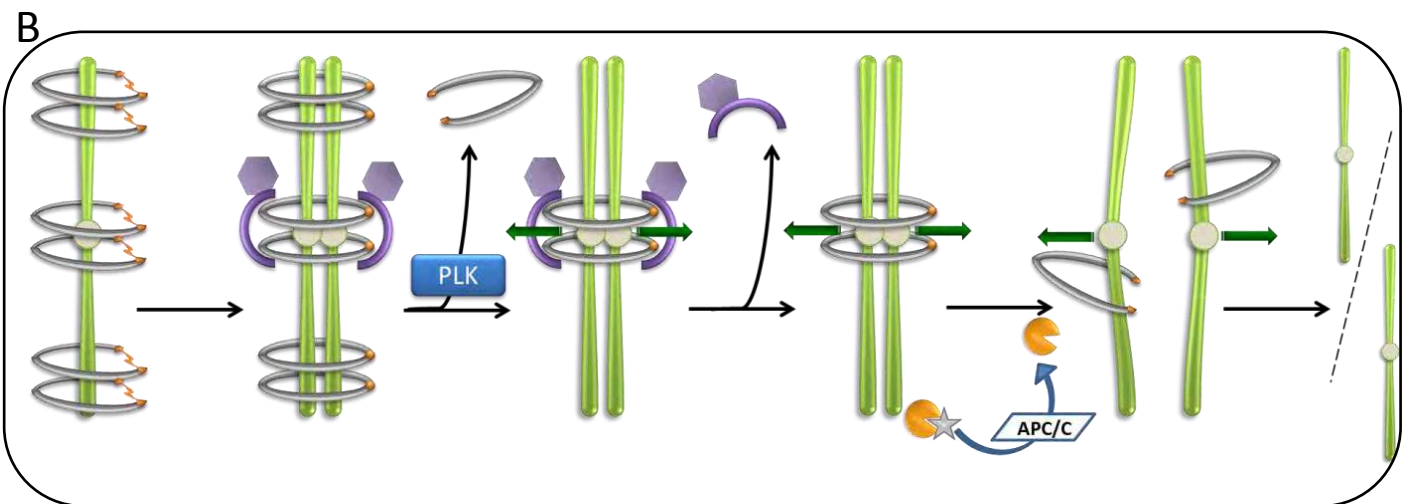
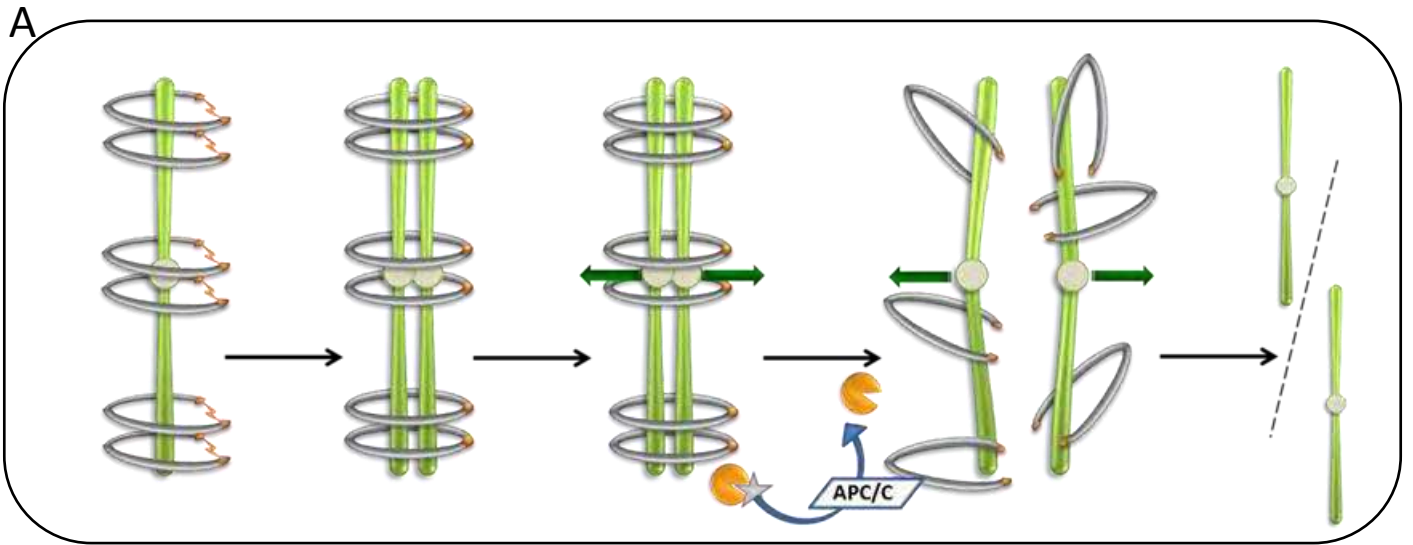


Figure B.III.4: Comportement des cohésines en mitose

Comparaison entre une mitose de levure (A), une mitose de vertébrés avec "Prophase Pathway" (B)

(A) : la cohésion est éliminée en une étape lors de la transition métaphase-anaphase. (B) : La cohésion est d'abord éliminée le long des bras lors de la prophase, la cohésion centromérique est protégée pour être libérée lors de la transition métaphase-anaphase.

séquences (Uhlmann et al., 2000). La sécurine de mammifère a, quant à elle, été découverte en co-immunoprécipitant les protéines interagissant avec la séparase. Les sécurines de vertébrés présentent des homologies de séquence entre elles mais aucune similarité avec les sécurines de levures (Zou, 1999). Jusqu'à présent, aucun gène homologue à la sécurine n'a été identifié chez les plantes.

Afin d'éviter une ségrégation aléatoire des chromatides sœurs, la sécurine ne libère la séparase que lorsque les chromosomes sont correctement attachés au fuseau de microtubules. Le SAC (voir B.II.1.3 et Figure B.II.4) régule donc indirectement l'élimination de la cohésion. Lorsque tous les chromosomes sont correctement attachés au fuseau, MAD2 libère CDC20, et l'APC/C^{CDC20} ubiquitinylye et détruit la sécurine. La séparase ainsi libérée clive SCC1 et déclenche la séparation des chromatides sœurs (Uhlmann et al., 2000; Nasmyth and Haering, 2009) (Figure B.II.4).

2.4.2. La "prophase pathway"

Chez les vertébrés, la majeure partie des cohésines (à l'exception des cohésines centromériques) est éliminée lors de la prophase et de la prométaphase par un mécanisme qui n'implique pas la séparase (Figure B.III.4 (B)). Ce mécanisme est appelé "prophase pathway". Des études *in vitro* ont montré que la polo-like kinase (PLK) phosphoryle SA2 (un des homologues de SCC3) (Sumara et al., 2002). Cette phosphorylation de SA2 par la PLK est essentielle à l'élimination des cohésines de long des bras lors de la "prophase pathway". Ainsi, dans des cellules exprimant une version non-phosphorylable de SA2, le phénotype est similaire à celui d'un mutant *plk*. Dans ces cellules, on n'observe pas d'élimination de la cohésion le long des bras en prophase-prométaphase mais l'anaphase se déroule normalement, suggérant un rôle mineur de la "prophase pathway" dans le déroulement de la mitose (Hauf et al., 2005). D'autres facteurs, comme WAPL, interviennent dans le mécanisme de "prophase pathway". Dans des cellules de mammifères *wapl*, la plupart des cohésines restent présentes au niveau des bras. Une forme hyperphosphorylée de WAPL s'associerait aux cohésines et favoriserait leur élimination en prophase (Nasmyth and Haering, 2009).

Ce mécanisme ne semble pas essentiel à la ségrégation des chromosomes en mitose. Certains auteurs suggèrent que l'élimination des cohésines le long des bras favoriserait la déconcaténation par la topoisomérase II et ainsi faciliterait la ségrégation des chromatides en anaphase. La "prophase pathway" permettrait également la libération de complexes de cohésines non clivés par la séparase qui pourraient être recyclés lors du cycle suivant (Nasmyth and Haering, 2009).

La "prophase pathway" est pas ou peu visible chez les levures et aucune étude ne permet de conclure sur sa présence chez les plantes. Chez *O. sativa*, OsRAD21-3, une des quatre kléisines présentes chez le riz, est détectable uniquement en prophase mitotique (Tao et al., 2007) suggérant une élimination du complexe de cohésines contenant OsRAD21-3 en fin de prophase dans des cellules de pointes racinaires. Cependant on ne peut exclure la

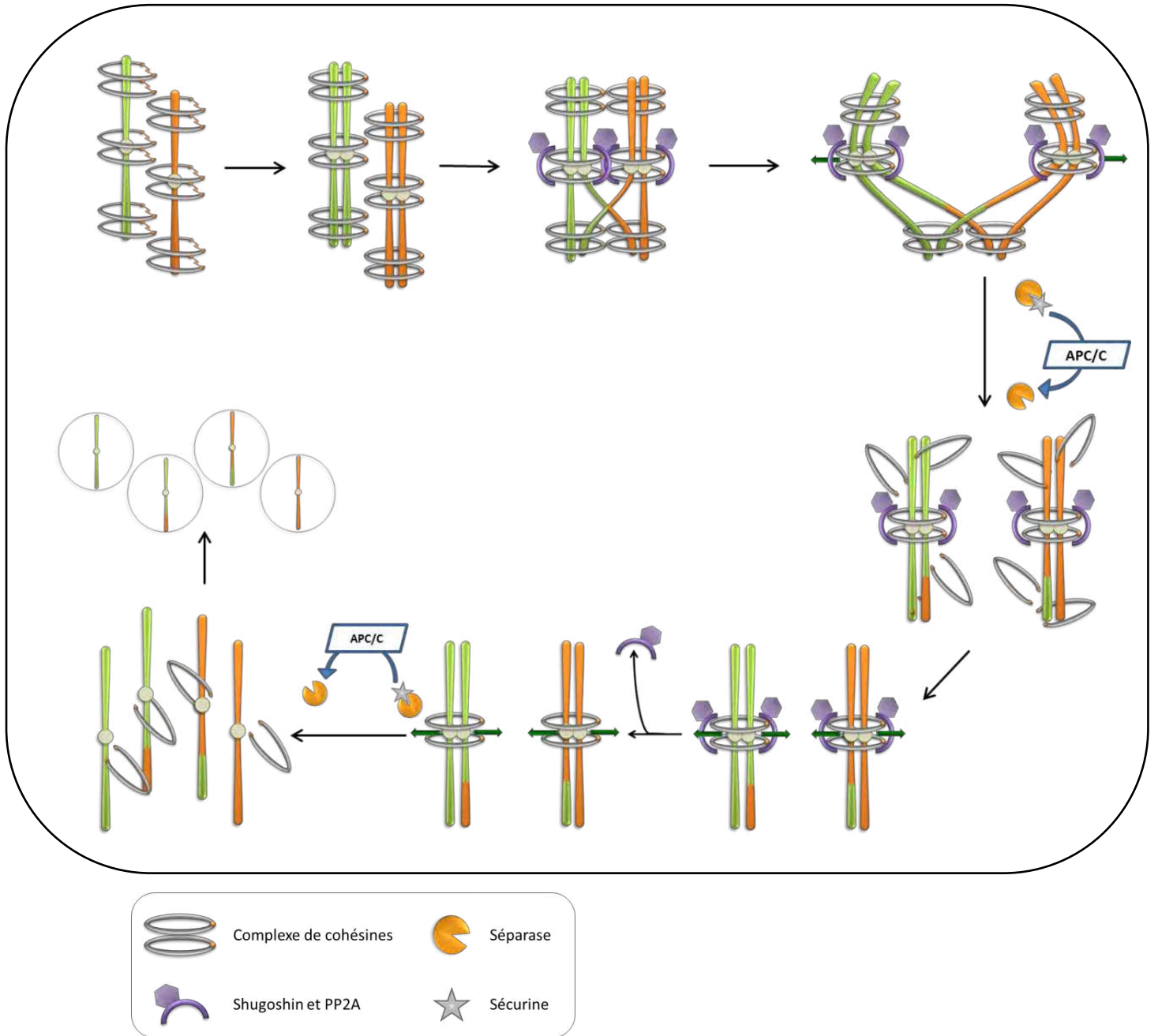


Figure B.III.5: Comportement des cohésines en méiose

En méiose, la cohésion est éliminée le long des bras lors de la transition métaphase I-anaphase I pour permettre la résolution des chiasmata et la séparation des chromosomes homologues. La cohésion centromérique est préservée jusqu'à la transition métaphase II-anaphase II. En anaphase II, l'élimination de la cohésion centromérique permet la séparation équitable des chromatides sœurs pour produire des spores haploïdes.

présence de complexes de cohésines contenant une autre kléisine le long des bras en métaphase. La forme en "X" des chromosomes en prométaphase – métaphase est une conséquence cytologique de la "prophase pathway". Dans les pointes racinaires, les chromosomes métaphasiques de riz ne présentent pas cette forme en "X" mais une forme en bâton suggérant que la cohésion le long des bras est toujours présente en métaphase de mitose (Wang et al., 2011). Cependant, on observe des chromosomes mitotiques présentant une forme en "X" sur des étalements de chromosomes mitotiques d'*Arabidopsis* (d'Erfurth et al., 2009).

Bien que les cohésines soient éliminées le long des bras chromosomiques lors de la prophase, la cohésion centromérique doit être maintenue intacte jusqu'à la transition métaphase–anaphase. Les mécanismes impliqués dans la protection de la cohésion centromérique en mitose seront évoqués dans le chapitre B.III.3.3.

2.4.3. Dégradation ou recyclage des cohésines

Le complexe de cohésines est relargué de la chromatine suite au clivage de la kléisine par la séparase lors de la transition métaphase – anaphase. On trouve peu de données sur les mécanismes d'élimination ou de recyclage des cohésines en fin de phase M. Des expériences réalisées chez *S. cerevisiae* semblent indiquer qu'un des fragments résultant du clivage de ScSCC1 par la séparase est dégradé selon un mécanisme dépendant de l'ubiquitylation et du protéasome (Rao et al., 2001). A l'inverse, les autres sous-unités du complexe de cohésines ne sont pas clivées lors du relargage du complexe et pourraient être réutilisées lors du cycle suivant. Des études récentes ont mis en évidence le rôle d'une déacétylase, ScHOS1, dans le recyclage de ScSMC3. En anaphase, HOS1 aurait la capacité de déacétyler SMC3 afin de le rendre disponible lors de l'établissement de la cohésion. Avant la phase S, SMC3 doit être déacétylée car elle est la cible de l'activité acétyltransférase de ECO1, nécessaire à l'établissement de la cohésion (Beckouët et al., 2010; Borges et al., 2010; Xiong et al., 2010) (Figure B.III.3).

3. La cohésion et la ségrégation des chromosomes méiotiques

3.1. Les cohésines en méiose

En méiose, les cohésines mitotiques coexistent avec des cohésines méiose-spécifiques (TABLEAU B.III.1). Le complexe de cohésines en méiose est également composé de quatre sous-unités : deux SMC (SMC1 et SMC3), une sous-unité de type SCC3 et une kléisine. La plupart des sous-unités du complexe de cohésines sont communes à la mitose et à la méiose. On observe cependant des sous-unités qui sont exprimées uniquement en méiose. Chez *S. pombe*, le complexe de cohésines peut contenir deux protéines SCC3 ; SpPSC3 et SpREC11 qui est méiose spécifique, formant ainsi deux complexes de cohésines distincts. Les mammifères possèdent trois protéines SCC3 ; SA1, SA2 et SA3 qui n'est présent qu'en méiose. On retrouve également chez les mammifères la sous-unité SMC1 β exprimée

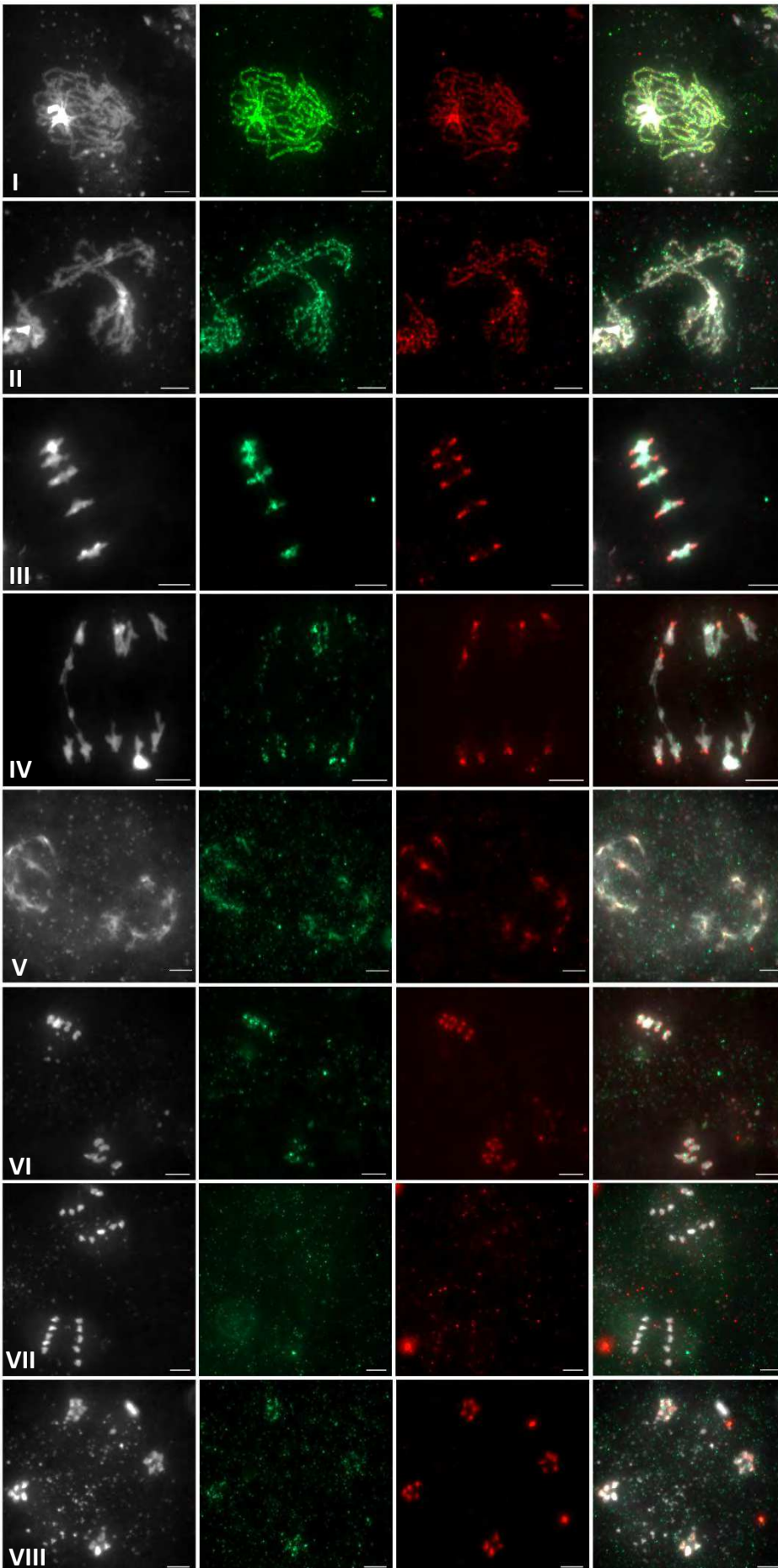


Figure B.III.6 : Localisation de REC8 chez *A. thaliana*

L'ADN, marqué au DAPI, est en blanc. L'immunolocalisation de REC8 est en vert et l'immunolocalisation de l'histone centromérique HTR12 en rouge. (I) Prophase, (II) Diacytèse, (III) Métaphase I, (IV) Anaphase I, (V) Télaphase I, (VI) Métaphase II, (VII) Anaphase II, (VIII) Télaphase II. Barre : 5 μ m. (Données personnelles)

uniquement dans les testicules (Revenkova et al., 2004; Watanabe, 2004). Mais la modification la plus conservée concerne la kléisine. Chez tous les eucaryotes, on trouve en plus de SCC1, la kléisine méiose-spécifique REC8 (Figure B.III.5).

3.1.1.REC8, la kléisine méiose-spécifique

L'analyse des mutants *rec8* confirme la spécificité méiotique de cette protéine. En plus de présenter des défauts de cohésion, les mutants *rec8* sont affectés dans de nombreux processus méiotiques qui requièrent des complexes de cohésines contenant REC8 ; la recombinaison, la formation du complexe synaptonémal et l'orientation monopolaire des kinétochores (Bardhan, 2010b). Les études fonctionnelles, réalisées chez les différents organismes modèles, montrent que le rôle de REC8 est largement conservé chez ces espèces. L'expression ectopique de la kléisine mitotique SpSCC1 en méiose, dans un mutant *Sprec8*, ne permet de restaurer que partiellement un phénotype sauvage (Yokobayashi et al., 2003). Des résultats similaires ont été obtenus chez *S. cerevisiae* (Toth et al., 2000). Ces résultats montrent que REC8 possède des caractéristiques que ne possèdent pas les autres kléisines.

3.1.2.La localisation des cohésines en méiose

La localisation des cohésines en méiose a été étudiée chez la plupart des espèces modèles dont *Arabidopsis thaliana* (Figure B.III.6). D'une manière générale, les cohésines apparaissent en phase S pré-méiotique. En prophase, elles sont présentes le long des chromosomes et forme un signal continu. Jusqu'en métaphase I, elles sont localisées au niveau des régions centromériques et le long des bras. Puis lors de la transition métaphase I-anaphase I le signal diminue drastiquement et se restreint aux régions centromériques. Un signal centromérique persiste en métaphase II.

On note cependant des différences de localisation en fonction de la sous-unité observée :

- L'observation des kléisines a mis en évidence que SCC1 et REC8 sont toutes deux présentes en méiose. Chez les levures, SCC1 est présente en prophase méiotique et ne colocalise pas avec REC8 (Klein et al., 1999; Watanabe and Nurse, 1999). Chez les mammifères, SCC1 et REC8 ont été observées de la prophase, au niveau des centromères et des bras chromosomiques, jusqu'à la métaphase II (Lee et al., 2003; Xu et al., 2004). Une autre kléisine, RAD21L, a été observée uniquement en prophase méiotique (Lee and Hirano, 2011). Sur les quatre kléisines d'*A. thaliana*, seule REC8 a été finement observée. AtREC8 est présente de la phase S préméiotique jusqu'à la métaphase II. On observe cependant une absence de signal AtREC8 au niveau des centromères en métaphase I (Cai et al., 2003; Chelysheva et al., 2005) (Figure B.III.6). La kléisine AtSYN3 a été observée uniquement au cours des stades précoces de la méiose et est présente de la phase S pré-méiotique au diplotène tardif (Yuan et al., 2012). Chez le riz, le signal REC8 n'est plus détecté en

métaphase I (Shao et al., 2011). On peut imaginer que l'absence de signal détectable après ce stade est due à des limitations techniques ou qu'une autre des quatre sous-unités kléisines du riz est impliquée dans le complexe de cohésines présent en métaphase I. Chez la plupart des espèces, le signal REC8 disparaît en anaphase II. L'observation des mitoses post-méiotiques montre une absence de REC8, suggérant une disparition complète de REC8 en fin de méiose. Chez les mammifères, lors de la fécondation on observe que REC8 est rapidement remplacée par SCC1 (Tachibana-Konwalski et al., 2010). On observe cependant un faible signal résiduel de REC8 en anaphase II chez la souris (Lee et al., 2003). Ce signal pourrait correspondre aux vestiges de REC8 après clivage du complexe de cohésines. L'observation de ce signal chez les autres organismes est peut être limitée pour des raisons techniques.

- Chez *S. cerevisiae* la sous-unité ScSMC3 colocalise avec ScREC8 jusqu'en métaphase II, suggérant que SMC3 fait partie du complexe de cohésines présent en méiose (Klein et al., 1999). Chez les mammifères, SMC1 et SMC1 β sont présentes en méiose mais seul SMC1 β est détectable aux centromères jusqu'en métaphase II, suggérant que SMC1 β est important pour le maintien de la cohésion centromérique en méiose (Revenkova et al., 2001). Chez *A. thaliana*, AtSMC3 est détectée au niveau des chromosomes jusqu'en métaphase. De manière surprenante, AtSMC3 est également présente au niveau du fuseau de microtubules en métaphase-anaphase I et en métaphase-anaphase II (Lam et al., 2005).

- Les sous-unités SCC3 présentent également une répartition précise en méiose. Chez *S. pombe*, le complexe de cohésines en méiose peut contenir deux protéines SCC3 ; SpPSC3 et SpREC11. Le complexe de cohésines formé avec SpREC11 se situe le long des bras chromosomiques alors que le complexe formé avec SpPSC3 se retrouve principalement à proximité des centromères. Mais SpPSC3 et SpREC11 colocalisent avec SpREC8 (Kitajima et al., 2003). Chez les mammifères, le signal SA3 disparaît des chromosomes en anaphase I (Prieto et al., 2001), suggérant que, comme SpREC11, le complexe formé avec SA3 est requis pour maintenir la cohésion uniquement en méiose I. Une étude récente réalisée chez le criquet montre que SA1 est présente le long des bras et au niveau des centromères, contrairement aux sous-unités SMC1, SMC3 et RAD21L qui n'ont été détectées que le long des bras (Calvente et al., 2013). *A. thaliana* ne possède qu'un gène codant une sous-unité de type SCC3, la localisation de AtSCC3 en méiose est quasiment identique à celle de AtREC8 (Chelysheva et al., 2005).

3.2. Elimination de la cohésion en méiose

La localisation des cohésines confirme une perte de cohésion le long des bras lors de la transition métaphase I-anaphase I. La cohésion résiduelle au niveau des centromères est quant à elle éliminée lors de la transition métaphase II-anaphase II (Figure B.III.5).

REC8 appartient à la famille des kléisines et possède également des sites de clivage par la séparase. Des études réalisées chez *S. cerevisiae* ont mis en évidence que REC8 est bien un substrat de la séparase, et l'expression d'une version mutée de REC8 au niveau de ces sites

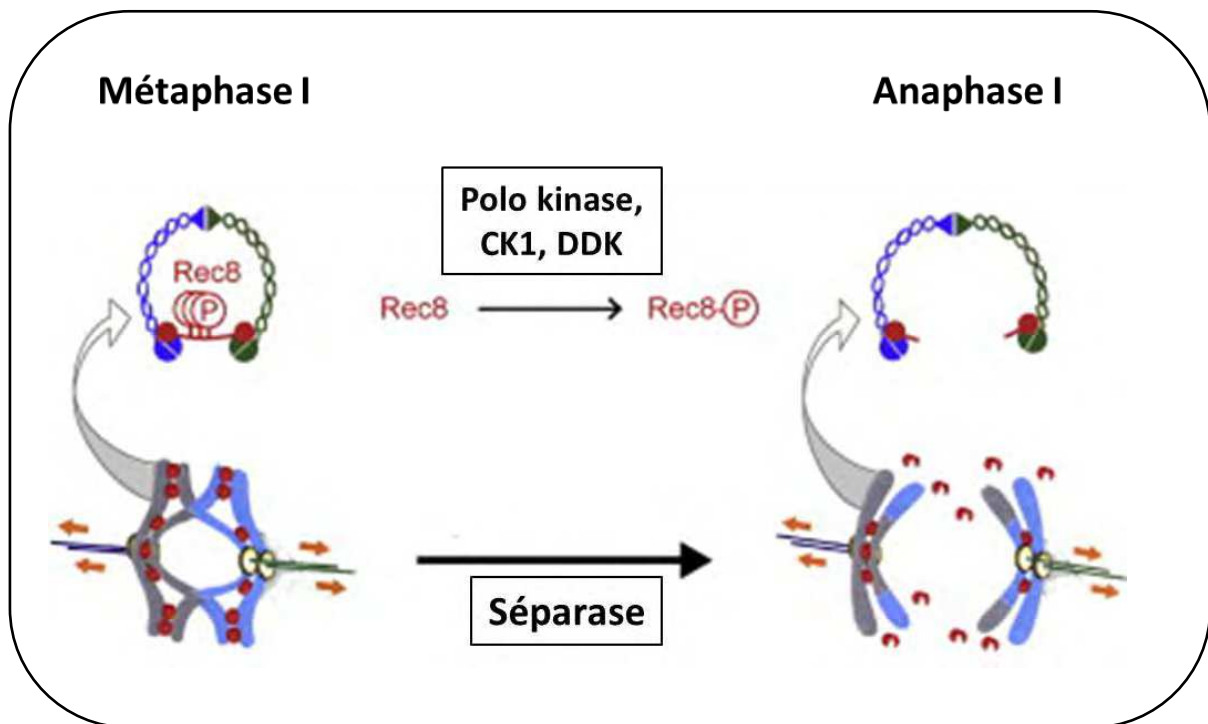


Figure B.III.7 : Elimination de la cohésion en méiose I

Lors de la transition métaphase I- anaphase I, les cohésines sont éliminées le long des bras chromosomiques. La phosphorylation multiple de REC8 est nécessaire à son clivage par la séparase. L'élimination de la cohésion le long des bras permet la séparation des chromosomes homologues en méiose I. D'après Katis *et al.* 2010.

de clivage bloque la séparation des homologues en première division. Ce phénotype est identique à celui d'un mutant *séparase* (Buonomo et al., 2000). La séparase est donc nécessaire à l'élimination des cohésines le long des bras pour permettre la résolution des chiasmata et la séparation des chromosomes homologues en anaphase I. Lorsqu'on cumule une version non clivable de REC8 (ou un mutant *séparase*) avec une mutation *spo11* (qui permet d'abolir la formation des bivalents par absence de cassures double brin), les homologues ségrégent aléatoirement en méiose I. Le lien physique qui maintient les homologues ensemble n'étant pas présent, la séparase n'est pas nécessaire pour séparer les deux homologues. Cependant l'absence de tension entre des deux homologues lors de l'anaphase induit une ségrégation aléatoire. Ainsi la combinaison des mutations *séparase* et *spo11* permet de s'affranchir de l'arrêt en métaphase I du mutant *séparase* seul. Dans ce cas, les chromatides sœurs ne se séparent pas en méiose II. Le clivage de REC8 par la séparase est donc nécessaire à la ségrégation des chromosomes en méiose I et en méiose II. Chez un mutant *Atséparase*, les chromosomes sont également bloqués en métaphase I puisque AtREC8 reste présent sur toute la longueur du chromosome. Le rôle de la séparase en méiose II n'a pas été clairement établi chez *Arabidopsis thaliana* (Liu and Makaroff, 2006; Yang et al., 2009). Chez les mammifères, la séparase est également responsable de la séparation des homologues (Terret et al., 2003; Kudo et al., 2006).

Comme indiqué précédemment, lors de la mitose la séparase est inhibée par la sécurine jusqu'à l'anaphase. Lorsque les chromosomes sont correctement attachés au fuseau, l'APC/C^{CDC20} détruit la sécurine pour libérer la séparase (Figure B.II.4). En méiose, l'étude de la localisation de la sécurine chez *S. cerevisiae* a mis en évidence une disparition du signal en anaphase I et en anaphase II. La sécurine est présente dans les méiocytes jusqu'en anaphase I. Le signal réapparaît après le désassemblage du fuseau et disparaît à nouveau avant l'anaphase II. A l'inverse le signal CDC20 apparaît après la formation du fuseau et persiste jusqu'en anaphase en méiose I et en méiose II (Salah and Nasmyth, 2000). La destruction de la sécurine par APC/C^{CDC20} est nécessaire à la ségrégation des chromosomes en méiose I et méiose II.

Des études plus récentes ont mis en évidence l'impact de la phosphorylation de REC8 lors de son clivage par la séparase. La protéine ScREC8 possède 24 sites de phosphorylation. Lorsque ces 24 sites sont mutés, REC8 n'est plus clivable par la séparase *in vitro* (Brar et al., 2006; Katis et al., 2010). Trois kinases ont été décrites comme impliquées dans le processus de phosphorylation de REC8 : Polo kinase, Casein kinase 1 δ/ϵ (CK1), Dbf4-dépendent Cdc7 kinase (DDK) (Clift and Marston, 2011). De plus, la phosphorylation constitutive de 14 de ces sites entraîne une perte précoce de la cohésion centromérique en méiose I suggérant que REC8 doit être déphosphorylée au centromère pour maintenir la cohésion centromérique jusqu'en métaphase II (Katis et al., 2010) (Figure B.III.7).

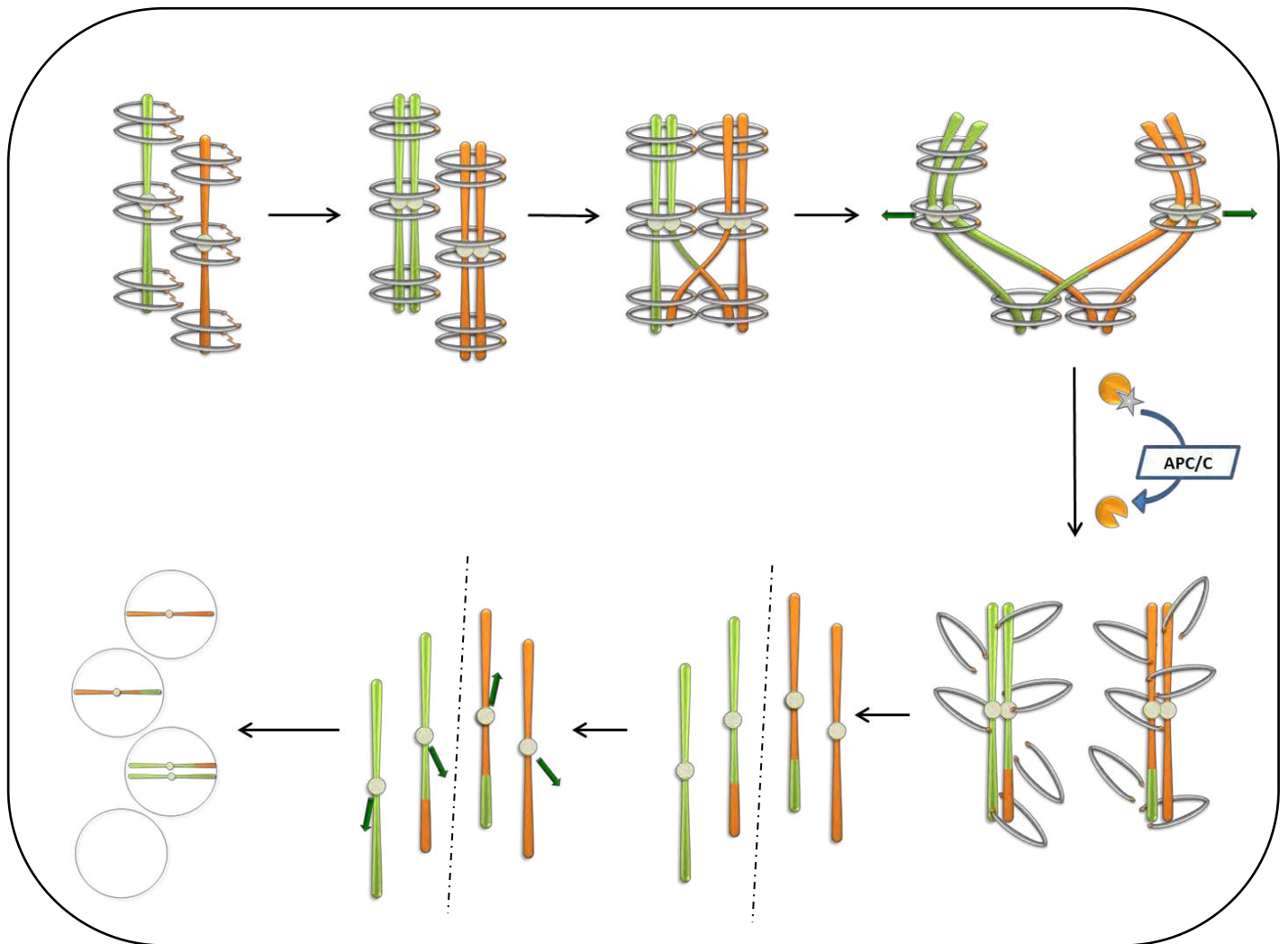


Figure B.III.8 : Comportement des chromosomes en méiose chez un mutant déficient dans la protection de la cohésion centromérique.

Chez ce mutant, la cohésion centromérique est éliminée en même temps que la cohésion des bras lors de la transition métaphase I – anaphase I. Les chromatides sont libres en fin de méiose I. En métaphase II, les chromatides libres ne peuvent s’aligner sur la plaque métaphasique et la tension exercée par le fuseau les sépare aléatoirement.

3.3. Protection de la cohésion centromérique

L'élimination de la cohésion par la séparase au niveau des bras va permettre de libérer les homologues en anaphase I en éliminant le lien physique qui les maintenait ensemble. La cohésion centromérique n'influence pas la ségrégation des chromosomes en première division mais cette dernière doit être préservée jusqu'en métaphase II lors de la ségrégation des chromatides sœurs. Il est impératif de protéger la cohésion centromérique de la séparase en méiose I pour qu'elle persiste jusqu'en métaphase II. (Figure B.III.5 et Figure B.III. 8)

3.3.1. Découverte des premières protéines impliquées dans la protection de la cohésion centromérique

Le premier mutant montrant un phénotype lié à un défaut de protection centromérique a été identifié chez la drosophile. Le mutant méiotique, *mei-S332*, a été isolé d'une population naturelle de *Drosophila melanogaster* (Sandler et al., 1968), l'analyse cytologique montrait une ségrégation aléatoire des chromatides sœurs en méiose II. Chez ce mutant la cohésion entre chromatides sœur disparaît en fin d'anaphase I dans plus de 90% des spermatocytes, entraînant des erreurs de ségrégation en méiose II et des gamètes non viables (Davis, 1971). Dans les années 90, la mutation a été finement cartographiée et des études de localisation ont ainsi permis d'observer MEI-S332 au niveau des centromères des chromosomes méiotiques de la prométaphase I jusqu'à la transition métaphase II – anaphase II, confirmant son rôle dans la protection centromérique (Kerrebrock et al., 1995). Cependant, à l'époque, aucun homologue de MEI-S332 n'a pu être identifié dans les bases de données limitant ainsi une étude approfondie du mécanisme de la protection centromérique.

D'autres protéines impliquées, entre autre dans la protection centromérique, ont été mises en évidence chez les levures. La mutation *Scspo13* a été identifiée dans une population naturelle de *S. cerevisiae*. La méiose, chez un mutant *Scspo13*, se limite à une première division souvent équationnelle (Klapholz and Esposito, 1980), la quantité de REC8 au centromère est nettement diminuée suggérant un rôle de SPO13 dans la protection de REC8 aux centromères (Klein et al., 1999; Shonn et al., 2002).

Chez *S. pombe*, BUB1, un composant du SAC, participe à la protection centromérique de la cohésion. Chez un mutant *Spbub1*, on observe également une disparition prématurée de la protéine REC8 au niveau du centromère en anaphase I. Ces résultats suggèrent que BUB1 est nécessaire au maintien de la cohésion centromérique en anaphase I en empêchant l'élimination de REC8 aux centromères (Bernard et al., 2001a).

En 2004, trois cribles génétiques indépendants ont permis d'identifier, shugoshin (SGO1), une protéine clé dans la protection de la cohésion centromérique méiotique. Chez *S. pombe*, *SpSGO1* a été identifiée grâce à un crible de génétique direct basé sur la toxicité

			Rôle en méiose	Rôle en mitose	Présence en méiose	domaines de destruction (*)	Autres domaines (*)
<i>S. pombe</i>	SpSGO1	NP_595378	Protection cohésion centromérique		Prophase – Anaphase I	KENbox (1)	
	SpSGO2	NP_594301	Orientation des kinétochores	Tension-sensing		-	Site de phosphorylation par Plk (6)
<i>S. cerevisiae</i>	ScSGO1	NP_014716	Protection cohésion centromérique	Tension-sensing	Prophase-Métaphase II	-	Site de phosphorylation par Plk (6)
<i>C. elegans</i>	CeSGO1	AAA82271				-	Site de phosphorylation par Plk (2)
<i>D. melanogaster</i>	MEI-S332	NP_476634	Protection cohésion centromérique	?	Prométaphase I - Métaphase II	-	Site de phosphorylation par Plk (3), Domaine de clivage par séparase **
<i>H. sapiens</i>	HsSGO1	NP_001012409 (isoforme A1)		Protection cohésion centromérique		Dbox (3) KENbox (1)	Site de phosphorylation par Plk (2)
	HsSGO2	NP_689737		Recrutement du MCAK	Prophase-Anaphase (1)	Dbox (2) KENbox (4)	Site de phosphorylation par Plk (5)
<i>M. musculus</i>	MmSGO1	NP_082508	Protection cohésion sur les bras	?		Dbox (1)	Site de phosphorylation par Plk (2)
	MmSGO2	NP_950172	Protection cohésion centromérique	?	Diploène -Métaphase II	Dbox (2) KENbox (3)	Site de phosphorylation par Plk (4)
<i>X. laevis</i>	XISGO1	NP_001090071		Protection cohésion centromérique	Prophase-Métaphase	Dbox (1)	Site de phosphorylation par Plk (8)
	XISGO2	NP_001243696		Recrutement du MCAK		Dbox (1) KENbox (1)	Site de phosphorylation par Plk (9)
<i>A. thaliana</i>	AtSGO1	AEE74907 At3g10440				Dbox (1) KENbox (2)	Site de phosphorylation par Plk (4)
	AtSGO2	ABM06005 At5g04320				Dbox (3) KENbox (2)	Site de phosphorylation par Plk (3)
<i>O. sativa</i>	OsSGO1	ADO32586 Os02g55570	Protection cohésion centromérique		Leptotène - Métaphase I	Dbox (3) KENbox (1)	Site de phosphorylation par Plk (3), Mad2 binding domain
	OsSGO2	AK063553 Os10g31930				Dbox (3) KENbox (2)	-
<i>Z. msa</i>	ZmSGO1	AY964185 Zm07g04530	Protection cohésion centromérique		Leptotène - Anaphase I	KENbox (1)	Site de phosphorylation par Plk (2), Mad2 binding domain
	ZmSGO2	EU967226 Zm01g43250				Dbox (2)	Site de phosphorylation par Plk (1)

* : ELM - the database of eukaryotic linear motifs

(n) : nombre de domaine prédit

** Lee *et al.* 2004b

Tableau B.III.2 : Shugoshin chez les différents organismes modèles

induite par la coexpression en mitose de REC8 et d'un protecteur de la cohésion méiotique (Kitajima et al., 2004). *SpSGO1* a également été identifiée lors d'un crible reverse basé sur des analyses transcriptomiques après induction de la méiose (Rabitsch et al., 2004). Parallèlement, *SGO1* a été mis en évidence chez *S. cerevisiae* lors du crible d'une banque de mutant de délétion contenant un marquage homozygote GFP au niveau du chromosome III (Marston et al., 2004). L'analyse phénotypique des mutants *sgo1* montre, chez *S. pombe* et *S. cerevisiae*, une ségrégation aléatoire des chromatides sœurs en seconde division méiotique liée à une absence de cohésion centromérique en métaphase II.

3.3.2. Description des Shugoshins

Les protéines Shugoshin appartiennent à une famille de protéine conservées chez les eucaryotes, dont MEI-S332 est l'homologue chez *D. melanogaster* (Watanabe, 2005) (Tableau B.III.2). Les homologies entre les différentes protéines Shugoshin se limitent souvent à la présence d'un domaine coiled coil en N-terminal et une région basique bien conservée en C-terminal, la taille des protéines pouvant aller de 30 à 130 kDa (Yao and Dai, 2012). De façon surprenante, certains eucaryotes ne possèdent qu'une copie du gène *SGO1* c'est le cas de *S. cerevisiae*, *D. melanogaster* et *C. elegans*. Alors que chez la plupart des eucaryotes, on trouve un paralogue, nommé *SGO2*. La dénomination *SGO1* / *SGO2* ayant été définie arbitrairement, l'homologue fonctionnel de *SGO1* chez une espèce peut correspondre à *SGO2* chez une autre.

3.3.2.1. Rôle de Shugoshin chez *S. cerevisiae*

S. cerevisiae ne possède qu'un seul gène appartenant à la famille des *Shugoshin* (noté *ScSGO1*) qui s'exprime en mitose et en méiose. Lors de la méiose, *ScSGO1* est impliquée dans la protection de REC8 au centromère. Un mutant *Scsgo1* montre une séparation prématurée des chromatides sœurs en fin d'anaphase I (Figure B.III.7). Ce défaut concorde avec la disparition prématurée du signal REC8 en anaphase I chez ce mutant, alors que REC8 persiste aux centromères jusqu'en métaphase II chez le sauvage. *ScSGO1* est localisée au niveau des centromères en méiose I et disparaît seulement des chromosomes en anaphase II lorsque la cohésion centromérique est éliminée (Katis et al., 2004a; Kitajima et al., 2004; Marston et al., 2004).

Chez les levures, lors de la transition métaphase-anaphase de mitose, les cohésines sont éliminées sur toute la longueur des chromosomes. Ainsi la protection de la cohésion centromérique en mitose n'est pas nécessaire à la ségrégation des chromatides sœurs, et le mutant *Scsgo1* n'a pas de défaut majeur de mitose. Cependant *ScSGO1* est exprimé en mitose suggérant que Shugoshin possède d'autres fonctions que la protection de la cohésion centromérique. En effet, les mutants *Scsgo1* ne présentent pas une séparation prématurée des chromatides sœurs mais une croissance ralentie et une sensibilité accrue aux drogues qui dépolymérisent le fuseau (Katis et al., 2004a; Kitajima et al., 2004; Marston et al., 2004).

En mitose, ScSGO1 est localisée au niveau des kinétochores jusqu'en anaphase et semble impliqué dans la perception de l'attachement des microtubules aux kinétochores (Indjeian et al., 2005). La fonction "tension-sensing" de ScSGO1 est également requise lors de la méiose I. Un léger défaut de ségrégation des homologues en méiose I (environ 10% des cellules) est observé chez un mutant *Scsgo1*. Ce phénotype est moins fort que ceux observés chez des mutants du SAC mais ScSGO1 permettrait de stabiliser partiellement la sécurine en absence de tension entre les chromosomes homologues. Les auteurs suggèrent que ScSGO1 est impliqué dans la mono-orientation des kinétochores lors de la méiose I (Kiburz et al., 2008).

3.3.2.2. Rôle des Shugoshin chez *S. pombe*

Contrairement à *S. cerevisiae*, *S. pombe* possède deux gènes *Shugoshin*. SpSGO1 a été identifiée pour son rôle dans la protection de la cohésion centromérique en méiose I. Le mutant *Spsgo1* ne présente pas de défaut de croissance végétative mais un phénotype méiotique. Chez ce mutant, la ségrégation aléatoire des chromatides sœurs en méiose II est la conséquence de la disparition prématurée de REC8 en anaphase I. Cette incapacité à maintenir la cohésion centromérique est due à un clivage prématuré de REC8 par la séparase (Rabitsch et al., 2004). SpSGO1 apparaît comme un protecteur de la cohésion centromérique en méiose chez *S. pombe*. Ce rôle est renforcé par sa localisation dans les régions d'hétérochromatine péricentromériques de la prophase tardive jusqu'à la métaphase I (Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004). SpSGO1 disparaît complètement des chromosomes en anaphase I et ne réapparaît pas en méiose II.

Comme chez *S. cerevisiae*, la mitose se déroule sans "prophase pathway" chez *S. pombe* et ni SpSGO1 ni SpSGO2 ne sont impliquées dans un mécanisme de protection de la cohésion centromérique en mitose. Cependant SpSGO2 a une fonction mitotique. Chez un mutant *Spsgo2*, on observe des erreurs de ségrégation des chromatides ainsi qu'une sensibilité au TBZ (drogue qui dépolymérise les microtubules) (Kitajima et al., 2004). SpSGO2 semble impliquée dans le ciblage des protéines du CPC (chromosomal passenger complex) au centromère, ces protéines jouent un rôle dans le recrutement des protéines du SAC aux kinétochores (Vanoosthuyse, 2007). SpSGO2 serait impliquée dans la perception de la tension au niveau des centromères. Le mutant *Spsgo2* présente, en plus de son défaut mitotique, un phénotype méiotique. Lors de la méiose I, la mutation de *SpSGO2* provoque des erreurs dans l'orientation des chromosomes homologues. Dans environ 20% des cellules d'un mutant *Spsgo2*, la méiose I est équationnelle, indiquant un rôle de SpSGO2 dans l'orientation monopolaire des kinétochores en méiose I. Mais SpSGO2 ne semble pas impliquée dans la protection de la cohésion centromérique car dans le cas des 80% des cellules qui ségrègent leurs homologues normalement, la cohésion centromérique est toujours présente et la méiose II est équationnelle chez un mutant *Spsgo2* (Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004). Ainsi SpSGO2 n'influence pas la protection de la cohésion centromérique.

Le phénotype du double mutant *Spsgo1/Spsgo2*, cumule les défauts des deux simples mutants présentant ainsi des méioses I réductionnelles et équationnelles mais toujours une ségrégation aléatoire des chromatides sœurs en méiose II. Ce phénotype rappelle celui du mutant *Spbub1* (voir B.III.3.2.1), suggérant que les activités de SpSGO1 et SpSGO2 dépendent de SpBUB1 (Rabitsch et al., 2004; Vaur et al., 2005).

3.3.2.3. Rôle de Shugoshin/MEI-S332 chez *D. melanogaster*

L'unique représentant de la famille Shugoshin chez *D. melanogaster*, MEI-S332, est également impliqué dans la protection de la cohésion centromérique en méiose. Chez un mutant *Dmmei-s332*, les chromosomes homologues ségrégent normalement lors de la première division alors que les chromatides sœurs se séparent de façon aléatoire lors de la seconde division (voir III.3.2.1). MEI-S332, comme ScSGO1, se comporte différemment de SpSGO1 car la protéine est maintenue au niveau du centromère jusqu'à la métaphase II, suggérant que la cohésion centromérique est protégée par SGO/MEI-S332 jusqu'à la transition métaphase II - anaphase II (Kerrebrock et al., 1995; Moore et al., 1998).

Le mutant *Dmmei-s332* ne présente pas de phénotype somatique bien que MEI-S332 soit exprimé en mitose. Cependant la surexpression de MEI-S332 entraîne une létalité embryonnaire et l'observation de neuroblastes surexprimant MEI-S332 montre une séparation prématurée des chromatides sœurs (LeBlanc et al., 1999). MEI-S332 pourrait être impliquée dans la division mitotique bien que son rôle ne soit pas essentiel à la viabilité chez *D. melanogaster*.

3.3.2.4. Rôle des Shugoshin chez les vertébrés

Les vertébrés possèdent également deux gènes *Shugoshin* qui ont été étudiés chez *H. sapiens*, *M. musculus* et *X. laevis*. Mais le contexte est différent car la cohésion est éliminée de façon séquentielle non seulement en méiose mais également en mitose chez les vertébrés (voir B.III.2.5.1).

Les fonctions méiotiques de SGO ont principalement été étudiées chez la souris. L'analyse de mutant knockout *Mmsgo2* montre un phénotype essentiellement méiotique. Les embryons présentent un développement normal sans défaut manifeste jusqu'à l'âge adulte où les mâles et les femelles sont stériles. Chez ces mutants, la stérilité est due à la présence de chromatides libres en méiose II, phénotype que l'on observe également dans des oocytes *MmSgo2* RNAi. Comme chez les levures, la séparation prématurée des chromatides sœurs est liée à une disparition de la protéine REC8 au centromère en anaphase I (Lee et al., 2008; Llano and Gómez, 2008). La protéine MmSGO2 apparaît au centromère en diplotène tardif dans les oocytes et disparaît en métaphase II. En métaphase I, MmSGO2 colocalise avec REC8 au niveau du centromère. Puis en métaphase II, SGO2 est relocalisée autour de REC8 (Gómez et al., 2007; Lee et al., 2008). Ainsi SGO2 est impliquée

dans la protection de la cohésion centromérique en méiose. Malgré une étude contradictoire (Yin et al., 2008), MmSGO1 ne semble pas impliqué dans la protection de la cohésion centromérique en méiose.

L'analyse des fonctions mitotiques des gènes *SGO1* et *SGO2* chez les mammifères a été principalement réalisée à l'aide de cellules HeLa où l'expression de *SGO1* et *SGO2* ont été inactivées par RNAi notamment à cause de la létalité des souris knockout *Mmsgo1*. L'inactivation de *HsSGO1* entraîne une perte de cohésion centromérique entraînant des erreurs de ségrégation des chromatides sœurs et un arrêt mitotique (Salic et al., 2004; Kitajima et al., 2005; McGuinness et al., 2005). Chez *X. laevis*, l'analyse de *XISGO1* confirme que *SGO1*, chez les vertébrés, est impliquée dans la protection de la cohésion centromérique en mitose (Rivera and Losada, 2009).

L'étude de *HsSGO2* dans des cellules HeLa montre que cette protéine n'est pas nécessaire à la protection centromérique en mitose, contrairement à *HsSGO1* (Huang et al., 2007; Orth et al., 2011). Mais *HsSGO2* est indispensable au recrutement centromérique de MCAK (mitotic centromere-associated kinesin), une protéine qui intervient dans les mécanismes de surveillance de l'attachement des kinétochores aux microtubules (Huang et al., 2007). Des résultats similaires ont été obtenus chez *X. laevis* (Rivera et al., 2012).

3.3.2.5. Rôle de Shugoshin chez *C. elegans*

Chez *C. elegans* les chromosomes sont dits holocentriques, le centromère n'a pas de position définie et c'est la position du crossing-over qui détermine un bras long et un bras court. Lors de la transition métaphase I-anaphase I, la cohésion est éliminée le long du bras court. La cohésion présente sur le bras long est préservée jusqu'à la métaphase II. *C. elegans* possède un gène *Shugoshin* qui ne semble pas être nécessaire à la protection de la cohésion du bras long. Une autre protéine, nommée LAB-1, protège les cohésines du bras long en contrebalançant la phosphorylation des cohésines par la kinase Aurora B. *C. elegans* semble avoir évolué vers un mécanisme de protection de la cohésion indépendant de SGO, probablement lié à la structure de ses chromosomes (Carvalho et al., 2008).

3.3.2.6. Rôle des Shugoshin chez les plantes

Les homologies de séquence ont permis de mettre en évidence deux gènes *Shugoshin* chez les plantes (Kitajima et al., 2004). La première étude fonctionnelle d'un Shugoshin de plantes a été réalisée chez le maïs. Le mutant *Zmsgo1* présente un phénotype méiotique similaire aux autres mutants *sgo1* (et *sgo2* chez les vertébrés). Les chromosomes ne présentent pas la forme en X caractéristique lors de la télophase I et se retrouvent sous forme de chromatides libres en métaphase II. Mais contrairement à *S. pombe* et *D. melanogaster* (Kitajima et al., 2004; Lee et al., 2004b), REC8 est indispensable à la présence de ZmSGO1 au centromère. Chez un mutant *Zmrec8 (afd1-1)*, ZmSGO1 n'est pas présent au centromère. Chez un sauvage, ZmSGO1 est localisée au niveau des centromères et plus

particulièrement au niveau des régions péri-centromériques (Li and Dawe, 2009). On l'observe du leptotène jusqu'à la métaphase I. Malgré cette localisation précoce au niveau des chromosomes, ZmSGO1 ne semble pas jouer de rôle dans les mécanismes liés à la recombinaison méiotique, car aucun défaut de prophase n'est observé chez *Zmsgo1*. Réciproquement, ZmSGO1 est toujours présent au niveau des centromères des univalents dans un mutant présentant des défauts de recombinaison méiotique (Hamant et al., 2005).

L'analyse de SGO1 chez le riz confirme une localisation précoce à partir du leptotène jusqu'à la métaphase I. Le mutant *Ossgo1* présente, en plus du phénotype de perte de cohésion en télophase I, une séparation précoce des homologues en pachytène tardif. Ce défaut en prophase I ne semble cependant pas influencer la séparation des chromosomes homologues en métaphase I (Wang et al., 2011).

Les mutants SGO1 de riz et de maïs ne présentent pas de phénotype somatique, suggérant un rôle de SGO1 uniquement méiotique chez les plantes. Le riz et le maïs possèdent un deuxième gène Shugoshin. Mais pour l'instant, aucune étude n'est parue sur l'analyse de SGO2 chez ces plantes. L'analyse des mutants *Atsgo1* et *Atsgo2* sera développée dans le chapitre Résultats.

3.3.3. La phosphatase PP2A coopère avec Shugoshin pour protéger la cohésion centromérique

3.3.3.1. PP2A interagit avec SGO

Grâce à des analyses d'immunoaffinité et de spectrométrie de masse, trois groupes ont identifié PP2A comme un partenaire de SGO (Kitajima et al., 2006; Riedel et al., 2006; Tang et al., 2006). PP2A est une serine/thréonine phosphatase présente dans les cellules sous forme d'un hétérotrimère composé d'une sous-unité catalytique "PP2A-C", d'une sous-unité de structure "PP2A-A" et d'une sous-unité variable "PP2A-B" qui donne sa spécificité et sa localisation à PP2A (Janssens and Goris, 2001). Ces études ont montré que SGO interagit exclusivement avec une PP2A contenant une sous-unité B appartenant à la sous-famille PR61/B'. En méiose, SpSGO1 interagit avec une PP2A contenant la sous-unité B, codée par le gène *SpPAR1* et ScSGO1 avec ScRTS1. Les analyses réalisées sur des cellules HeLa montrent que HsSGO1 forme un complexe avec PP2A contenant l'isoforme α B56 (Kitajima et al., 2006; Riedel et al., 2006; Tang et al., 2006).

Le complexe, formé par SGO-PP2A, est composé d'un homodimère de SGO associé avec une holoenzyme PP2A via le domaine coiled-coil de SGO. La formation de l'homodimère de SGO est essentielle à l'interaction avec PP2A, suggérant que SGO recrute PP2A au centromère (Xu et al., 2009).

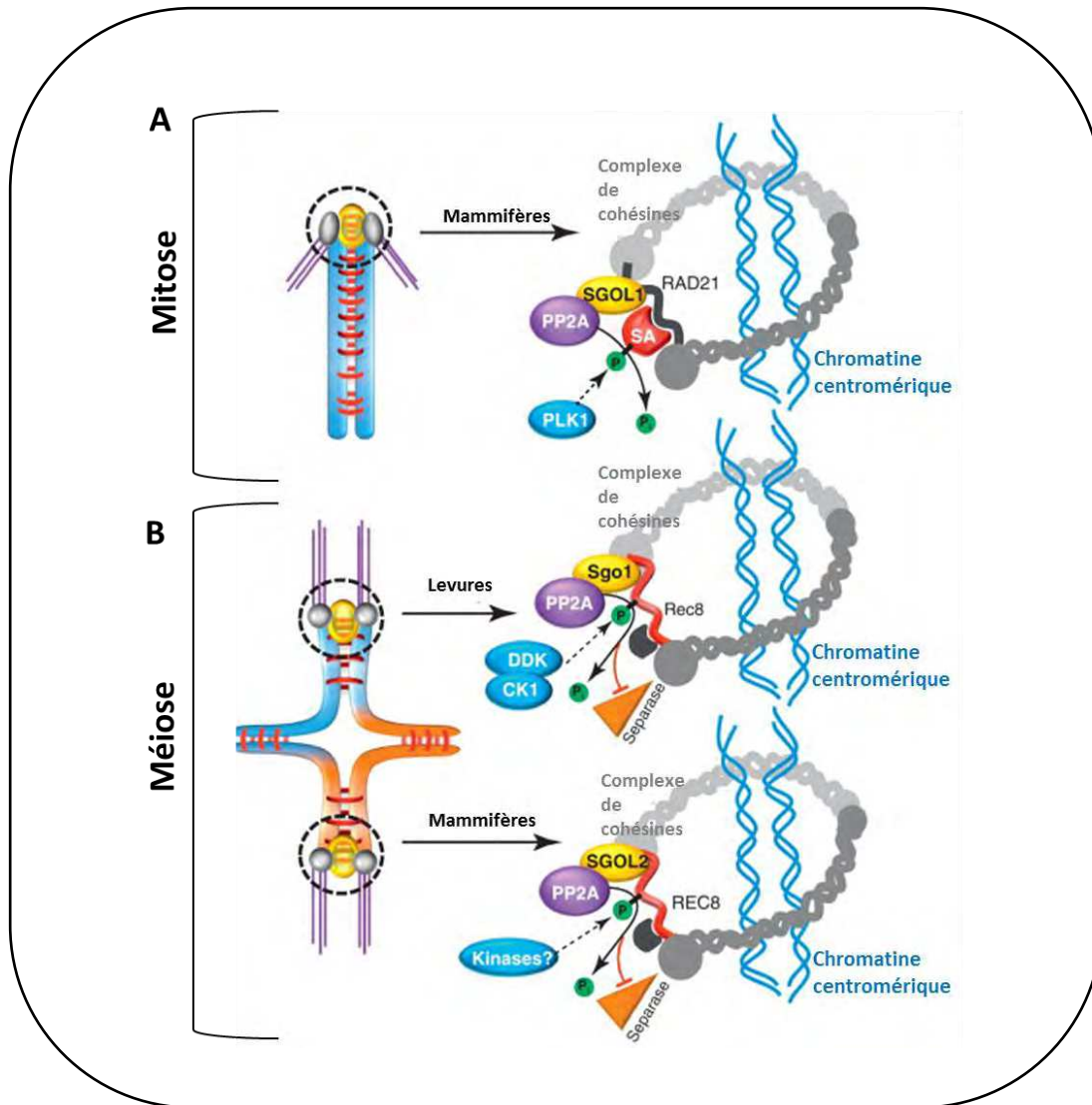


Figure B.III.9 : Modèle du mécanisme moléculaire de la protection de la cohésion centromérique.

(A) : En mitose chez les mammifères, la cohésion doit être protégée de la “prophase pathway” pour permettre la séparation équilibrée des chromatides sœurs en anaphase. La protéine SGO1 (ici SGOL1) recrute la phosphatase PP2A au centromère pour contrecarrer la phosphorylation de SCC3 (ici SA) par la Polo kinase

(B) : En méiose I, SGO1 chez les levures et SGO2 (ici SGOL2) chez les mammifères protègent la cohésion centromérique en recrutant la phosphatase PP2A au centromère. PP2A protège REC8 de la séparase en éliminant les groupements phosphates ajoutés par les kinases (DDK et CK1 chez les levures). La déphosphorylation de REC8 en anaphase I permet de maintenir une cohésion centromérique jusqu’en métaphase II-anaphase II. D’après Gutiérrez-Caballero *et al.* 2012.

3.3.3.2. PP2A protège la cohésion centromérique en méiose et en mitose en déphosphorylant les cohésines

Comme indiqué précédemment, REC8 doit être phosphorylée pour permettre son clivage par la séparase (voir B.III.3.2). Des études, réalisées sur des oocytes de souris, montrent que l'application d'acide okadaïque (une phycotoxine qui inhibe spécifiquement les phosphatases PP1 et PP2A) entraîne, entre autre, une séparation prématurée des chromatides sœurs en méiose I (Mailhes et al., 2003).

L'analyse des mutants de la sous unité B' de PP2A en méiose, *Sppar1* et *Scrts1*, montre une ségrégation aléatoire des chromatides sœurs et une perte du signal REC8 au centromère en méiose II, semblable au phénotype d'un mutant *sgo* (Riedel et al., 2006). Lorsque PP2A est localisée artificiellement le long des bras grâce à la fusion de la sous unité B' en Ct de SpREC11 (SCC3-like), on n'observe pas de ségrégation des chromosomes. PP2A serait ainsi capable de déphosphoryler seule sa cible et donc suffisant à la protection de la cohésion chez *S. pombe* (Riedel et al., 2006).

En méiose, le complexe SGO/PP2A protégerait REC8 de la séparase en la déphosphorylant. En effet, la phosphorylation des 24 sites de phosphorylation de REC8 est nécessaire à son clivage par la séparase et une protéine REC8 phosphorylée constitutivement est clivée par la séparase (Katis et al., 2010) (voir B.III.3.2). Empêcher la phosphorylation ou déphosphoryler REC8 est indispensable en méiose I pour maintenir une cohésion centromérique. Des études *in vitro* montrent que la sous unité B' de PP2A de *S. pombe* peut déphosphoryler REC8 préalablement phosphorylée par la caséine kinase, CK1 (Ishiguro et al., 2010). Dans ce modèle, le complexe SGO-PP2A protège REC8 de la séparase en éliminant les groupements phosphates ajoutés par les kinases (Figure B.III.9(B)).

Le mécanisme de régulation de la protection centromérique en mitose implique également la phosphorylation. En effet, dans des cellules HeLa *Hssgo1*, l'expression de la sous-unité SCC3/SA2 non phosphorylable permet de supprimer partiellement le phénotype de perte de cohésion centromérique de *Hssgo1*, ainsi la perte de cohésion centromérique dans les cellules *Hssgo1* serait due à une hyperphosphorylation de SA2 au centromère (McGuinness et al., 2005). L'analyse du mutant dans la sous-unité A de PP2A dans des cellules HeLa montre que PP2A participe également à la protection de la cohésion centromérique en mitose (Δ Hspp2a-A α présente le même phénotype que Δ Hsgo1) (Tang et al., 2006). HsSGO1 et HsSGO2 coopèrent aux centromères lors de la mitose (voir B.III.3.3.2.4). Des analyses *in vitro* montrent que les complexes associés à HsSGO1 et HsSGO2 sont capables de déphosphoryler spécifiquement SA2 et SA1, préalablement phosphorylés par Plk1 (voir B.III.2.4.2) (Kitajima et al., 2006). Le rôle du complexe SGO-PP2A serait de déphosphoryler SCC3/SA2 au centromère en mitose chez les mammifères afin de protéger la cohésion centromérique de PLK1 lors de la "prophase pathway" (Figure B.III.9(A)).

3.3.4. La localisation centromérique du complexe de protection de la cohésion

3.3.4.1. BUB1 recrute SGO qui recrute PP2A

Les études réalisées chez la levure et les mammifères ont mis en évidence que BUB1 est nécessaire à la localisation centromérique de SGO (Kitajima et al., 2004, 2005; Tang et al., 2004; Riedel et al., 2006). BUB1 est un composant essentiel du SAC, le mécanisme de surveillance qui permet de retarder l'anaphase si les kinétochores sont mal attachés aux microtubules. En plus de son rôle dans le SAC, BUB1 est impliquée dans la protection de la cohésion centromérique méiotique chez *S. pombe* (voir B.III.3.3.1). Chez un mutant *Spbub1*, 40% des méioses I sont équationnelles et les 60% restantes sont réductionnelles mais présentent une ségrégation aléatoire des chromatides sœurs en métaphase II. Les autres protéines du SAC (BUBR1, MAD2, MPS1...) ne présentent pas de tels phénotypes méiotiques lorsque leurs gènes sont mutés (Kitajima et al., 2005; Vaur et al., 2005).

BUB1 est également localisée au centromère, *via* son domaine kinase (Bernard et al., 2001a; Vaur et al., 2005; Riedel et al., 2006). Dans des cellules HeLa, HsBUB1 est localisée au niveau des kinétochores et forme ainsi deux foyers au niveau du centromère. HsSGO1 est présente sous forme d'un seul foyer avec un patron similaire à celui de SCC1 (Tang et al., 2004).

Les études cytologiques des protéines SGO, BUB1 et PP2A ont montré que chez les levures, BUB1 est indispensable à la localisation de SGO1 et PP2A (SpPAR1 et ScRTS1) et que SGO1 est indispensable à la localisation de PP2A. Par contre PP2A n'est pas nécessaire à la localisation de BUB1 et SGO1 au centromère (Kitajima et al., 2006; Riedel et al., 2006). Dans des cellules HeLa, HsSGO2 serait responsable de la localisation de PP2A sur les centromères des chromosomes mitotiques (Kitajima et al., 2006; Tang et al., 2006). Une étude récente, montre que l'homologue de BUB1 chez le riz est impliqué dans la localisation centromérique de OsSGO1 en méiose (Wang et al., 2012a).

Lors du mécanisme de protection de la cohésion centromérique, BUB1 est nécessaire au recrutement de SGO qui recrute à son tour PP2A au centromère. Il semblerait que ce ne soit pas la sous-unité B de PP2A (qui confère généralement la spécificité et la localisation au complexe PP2A) qui soit responsable de la localisation de l'holoenzyme au centromère mais la protéine shugoshin.

3.3.4.2. SWI6 est nécessaire à la localisation centromérique de SGO

La protéine SpSWI6 a été mise en évidence comme nécessaire à la localisation centromérique des complexes de cohésines (voir B.III.2.2). Le mutant *Spswi6* montre comme un mutant *Spsgo1*, une ségrégation aléatoire des chromatides sœurs en méiose II (Yamagishi et al., 2008). Mais ce défaut est à peine supprimé si on force la localisation centromérique des cohésines, suggérant que SpSWI6 n'est pas uniquement nécessaire au recrutement des cohésines centromériques. Des expériences de double hybride et de co-

immunoprécipitation ont mis en évidence que SpSWI6 interagissait avec SpSGO1 et que cette interaction est nécessaire à la localisation de SpSGO1 au centromère. Chez un sauvage, SpSWI6 et SpSGO1 co-localisent aux centromères en métaphase I alors que SpSGO1 n'est pas détectée chez un mutant *Spswi6*. L'homologue de SWI6 chez les vertébrés, HP1, interagit également avec SGO1 dans des cellules HeLa et est nécessaire à sa localisation centromérique (Yamagishi et al., 2008). Ainsi la structure de l'hétérochromatine au centromère est essentielle au maintien de la cohésion centromérique, probablement via le recrutement de SGO1 par la protéine SWI6.

3.3.5. Elimination de SGO et déprotection de la cohésion centromérique

Lors de l'anaphase, en mitose et en méiose II, la cohésion centromérique doit être éliminée afin de permettre la séparation des chromatides sœurs. Il faut déprotéger les cohésines pour permettre leur clivage par la séparase. Les mécanismes de déprotection n'ont pas encore été clairement identifiés et semblent différents en fonction des organismes étudiés. Chez *S. pombe* et chez les plantes, SGO1 disparaît en anaphase I, suggérant que la protection centromérique par SGO n'est plus nécessaire en anaphase I (voir B.III.3.3.2). Alors que chez *S. cerevisiae*, les mammifères et la drosophile, SGO est présent au niveau des centromères jusqu'en deuxième division méiotique, suggérant que la déprotection de la cohésion centromérique nécessaire à l'anaphase II n'est pas liée à l'élimination de SGO (voir B.III.3.3.2). Un mécanisme de type disparition – inactivation ne semble pas être généralisable à tous les organismes, où SGO est toujours présent aux centromères alors que les chromatides sont libres.

3.3.5.1. Déprotection via l'APC/C

La présence de sites de destruction par l'APC/C chez la plupart des protéines Shugoshin (Tableau B.III.2) semble indiquer une élimination de SGO qui soit dépendante de l'APC/C. Chez *S. pombe*, la protéine est préservée aux centromères dans des cellules déficientes pour l'APC/C, alors qu'elle est dégradée normalement dans des cellules déficientes pour la séparase (Kitajima et al., 2004). Des études *in vivo* chez *X. laevis* montrent que SGO est un substrat de l'APC/C et peut être dégradée par APC/C^{CDH1} et APC/C^{CDK20} (Salic et al., 2004). Une dégradation par APC/C^{CDK20} suggère que SGO est détruit lors de la transition métaphase-anaphase, éliminant ainsi la protection de la cohésion centromérique. Ce qui coïncide avec la disparition de SGO1 au niveau des kinétochores lors de cette transition chez *X. laevis*. Cependant, chez d'autres espèces SGO est toujours présent en anaphase II (Lee et al., 2008) (Tableau B.III.2). Ces résultats laissent penser que chez ces espèces, la destruction de SGO n'est pas responsable de l'élimination de la protection de la cohésion centromérique.

Deux études ont cherché à caractériser les motifs de destruction de HsSGO1 dans des cellules HeLa. La première étude montre que la D-box 1 [457-465] est nécessaire à la dégradation par APC/C et qu'un mutant *Hssgo1ΔD1* entraîne des défauts de séparation des

chromosomes et un arrêt en métaphase (Fu et al., 2007). Ces résultats sont contestés dans une seconde étude qui montre que la KEN-box et une autre D-box 2 [438-446] sont nécessaires à la dégradation de HsSGO1 par APC/C^{CDH1}. Mais la version non destructible de HsSGO1 ne modifie pas sa localisation au niveau des kinétochores et complémente le mutant RNAi SGO1. Ces résultats indiquent que la dégradation de HsSGO1 par l'APC/C n'est pas nécessaire à la séparation des chromatides sœurs en mitose (Karamysheva et al., 2009).

3.3.5.2. Autres mécanismes d'élimination

Une étude réalisée chez *D. melanogaster* montre que la disparition de MEI-S332 aux centromères en anaphase de méiose II et mitose ne semble pas impliquer l'APC/C. C'est la phosphorylation de MEI-S332 par la Polo kinase qui permet sa délocalisation. Chez un mutant *Dspolo*, MEI-S332 reste localisée aux centromères après la transition métaphase II-anaphase II. La méiose II se déroule normalement impliquant qu'un autre mécanisme que la disparition de MEI-S332 est responsable de la libération de la cohésion centromérique (Clarke et al., 2005).

Des données similaires ont été obtenues dans des cellules HeLa. HsSGO1 n'est pas présente aux centromères chez un mutant *pp2a-Aα* mais la localisation centromérique de HsSGO1 est restaurée dans un double mutant *Hsplk1/pp2a-Aα*. Ces résultats suggèrent que HsPLK1 est responsable de la disparition de HsSGO1 aux centromères dans un mutant *pp2a-Aα* (Tang et al., 2006). Ainsi PP2A pourrait protéger SGO aux centromères en contrecarrant son élimination par la Polo kinase.

Un autre mécanisme d'élimination a été décrit chez *D. melanogaster*. Chez la drosophile, la disparition de MEI-S332 des centromères correspond à la dégradation des cohésines par la séparase. La présence de deux sites putatifs de clivage par la séparase chez MEI-S332 suggère une élimination de MEI-S332 synchronisée avec celle des cohésines par la séparase lors de la transition métaphase II – anaphase II. Dans des embryons de drosophile, mutés soit pour la séparase soit par la sécurine, MEI-S332 est présente au centromère lors de la mitose mais le signal persiste en interphase, contrairement aux embryons sauvages. Les auteurs suggèrent que la délocalisation de MEI-S332 est dépendante de la séparase bien qu'aucune expérience ne montre un clivage direct de MEI-S332 par la séparase (Lee et al., 2004b) de plus le rôle mitotique de MEI-S332 n'a pas été clairement établi.

3.3.5.3. Modèle de la déprotection par la tension

La tension exercée, pour séparer les chromatides sœurs, lors de la méiose II pourrait être à l'origine de l'inactivation de SGO aux centromères. Des observations réalisées chez la souris montrent une relocalisation de MmSGO2 en métaphase II, de la région péricentromérique (où SGO2 co-localise avec REC8) vers les kinétochores, alors que REC8 reste localisée dans la région péricentromérique (Gómez et al., 2007; Lee et al., 2008). Cette

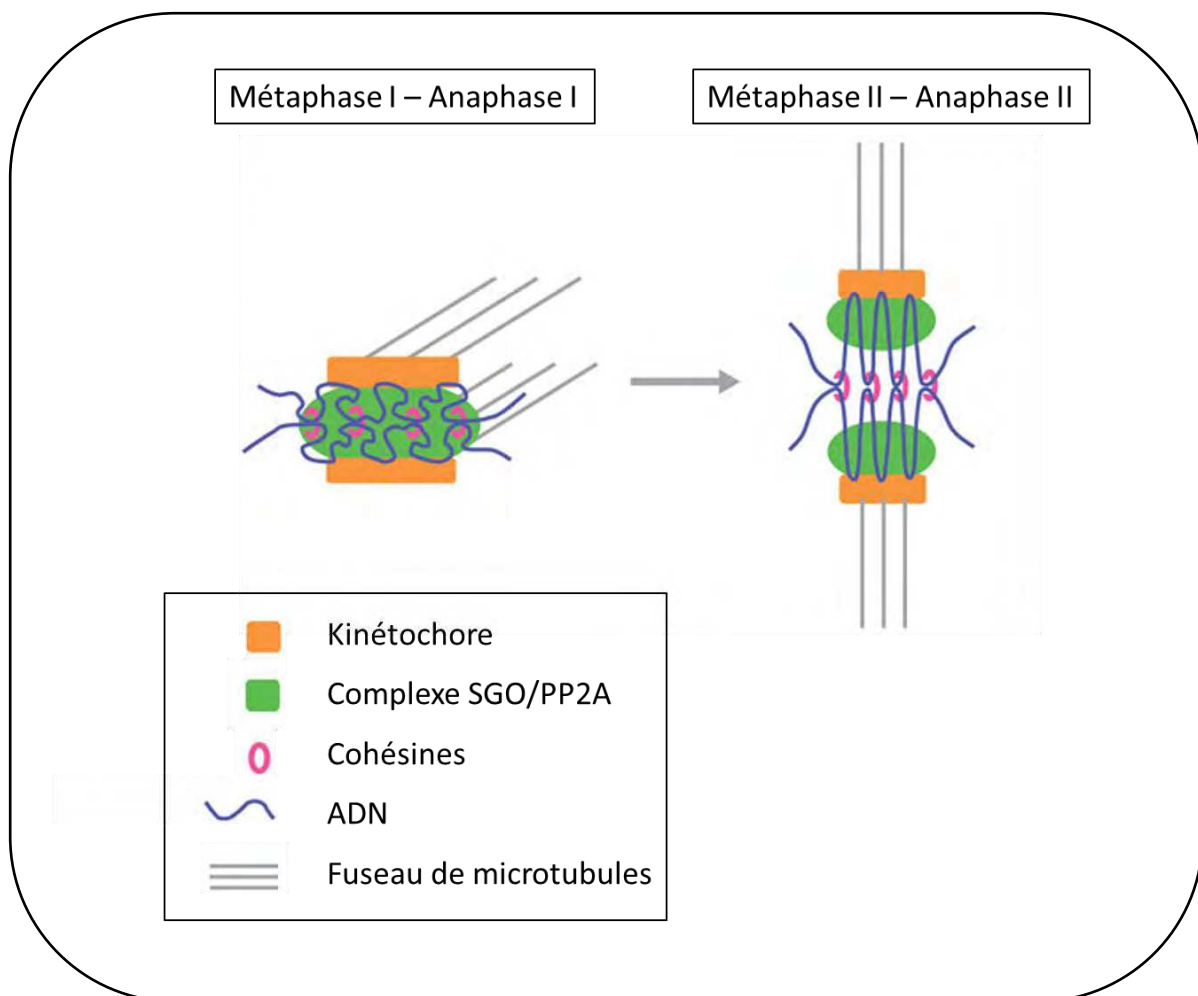


Figure B.III.10 : Modèle de la déprotection de la cohésion centromérique par la tension

En méiose I, les kinétochores sœurs sont mono-orientés. Le complexe SGO/PP2A est à proximité des cohésines centromériques et protège REC8 de la séparase. En méiose II, les kinétochores sœurs sont bi-orientés. La tension exercée par le fuseau de microtubules permet la délocalisation du complexe SGO/PP2A. Le complexe de cohésines contenant REC8 n'est plus à proximité de la phosphatase PP2A. Les kinases phosphorylent REC8. REC8 est alors clivée par la séparase lors de la transition métaphase II-anaphase II et les chromatides sœurs se séparent. D'après Lee *et al.* 2008.

délocalisation de SGO, qui entraîne la déprotection de REC8, aurait pour origine la tension appliquée aux kinétochores sœurs bi-orientés qui s'éloignent en entraînant SGO (Lee et al., 2008)(Figure B.III.10). Chez un mutant *Spsgo2*, la plupart des chromosomes séparent leurs chromatides sœurs en méiose I car les kinétochores sont bi-orientés. Dans ce cas, la tension exercée par le fuseau de microtubules attire les chromatides sœurs vers les pôles opposés de la cellule et la cohésion centromérique est éliminée lors de la transition métaphase I-anaphase I (Vaur et al., 2005). Les mêmes observations ont été faites chez la souris, avec un mutant achiasmatique (Kouznetsova et al., 2007). Lorsque les kinétochores sœurs sont bi-orientés, la tension exercée par le fuseau serait à l'origine de la déprotection de la cohésion centromérique via la délocalisation de SGO.

Cependant chez des mutants de monopoline de *S. cerevisiae* (protéines responsables de la mono-orientation des kinétochores en méiose I), les kinétochores sont bi-orientés en méiose I mais la cohésion centromérique n'est pas libérée avant la méiose II (Petronczki et al., 2006). *S. cerevisiae* pourrait utiliser un mécanisme différent pour inactiver SGO, on peut également supposer que la tension exercée sur des kinétochores bi-orientés en méiose I n'est pas équivalente à la tension exercée en méiose II chez *S. cerevisiae*.

3.4. Régulateurs impliqués dans le maintien de la cohésion en méiose

Chez *Arabidopsis thaliana*, AtSWI1 a été montrée comme impliquée dans la mise en place de la cohésion en méiose. Chez le mutant *Atswi1-2*, on observe une perte progressive de la cohésion ; d'abord le long des bras ce qui entraîne la formation de chromosomes en "X", puis aux centromères. Chez ce mutant, on trouve 20 chromatides libres en métaphase I qui ségrégent de façon aléatoire entraînant la formation de spores aberrantes. La localisation précoce de AtSWI1 de la phase G1 jusqu'au leptotène suggère que AtSWI1 jouerait un rôle dans la mise en place plutôt que dans le maintien de la cohésion entre chromatides sœurs (Mercier et al., 2001b, 2003; Agashe et al., 2002; Boateng et al., 2008; Pawlowski et al., 2009). AtSWI1 semble être présent uniquement chez les plantes car aucune homologie n'a été mise en évidence avec des protéines d'autres eucaryotes suggérant, que le contrôle de la mise en place de la cohésion en méiose n'est pas conservé au sein des eucaryotes.

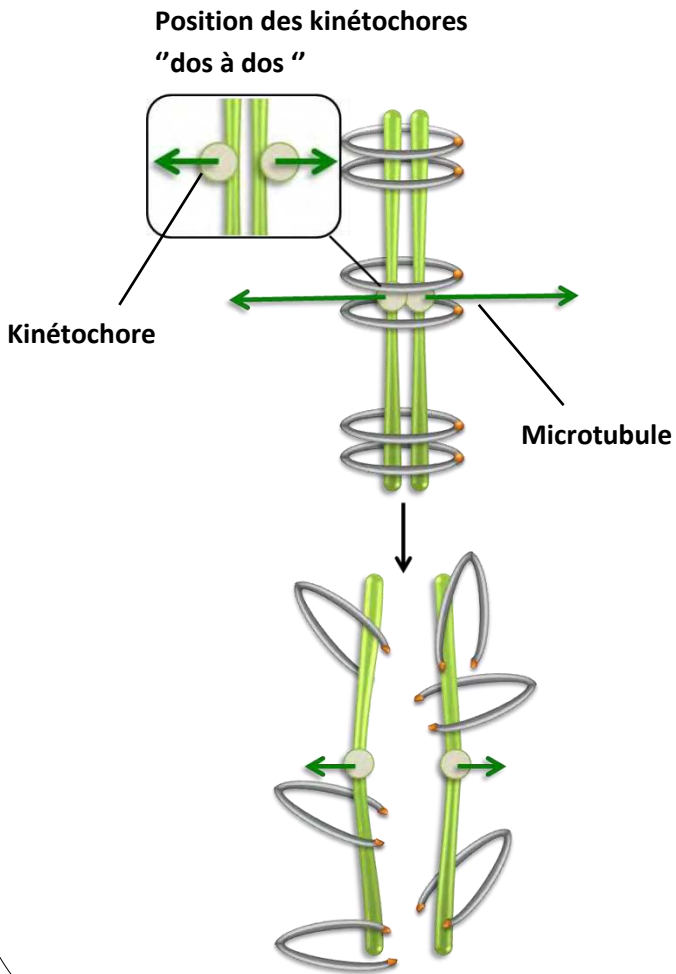
Chez *S. cerevisiae*, *ScMND2* a été initialement identifié lors d'un crible direct visant à identifier les gènes surexprimés en méiose (Rabitsch et al., 2001). Le mutant *Scmnd2* ne présente pas de phénotype végétatif mais un arrêt en prophase méiotique lié à l'activation du checkpoint "DNA damage". En évitant la recombinaison, le mutant *Scmnd2* poursuit la méiose au-delà de la prophase. Dans ce cas, on observe un clivage précoce de ScREC8 lié à l'activation prématurée de la séparase. Chez ce mutant, la sécurine est détruite en prophase par APC/C^{AMA1} (voir B.II.2.6.1). ScMND2 est un inhibiteur de l'APC/C^{AMA1} qui empêche la destruction de la sécurine en prophase méiotique (Oelschlaegel et al., 2005; Penkner et al., 2005). ScMND2 semble également impliquée dans la stabilité de ScSGO1 en méiose. Chez un mutant *Scmnd2*, ScSGO1 est instable en prophase, suggérant que ScSGO1 pourrait être un

substrat de l'APC/C^{AMA1}. Parallèlement chez un mutant *Scama1* la quantité de ScSGO1 présente en anaphase II est plus importante que chez un sauvage (Penkner et al., 2005).

La protéine ScSPO13, en plus de son rôle dans la régulation du cycle et l'orientation des kinétochores en méiose I, joue un rôle dans la protection de la cohésion centromérique chez *S. cerevisiae* (Shonn et al., 2002). La caractérisation de cette protéine montre que ScSPO13 est localisée au niveau des régions centromériques mais n'est pas essentielle à la localisation de ScSGO1 aux centromères en méiose I. ScSPO13 serait également un inhibiteur de l'APC/C^{AMA1}. Chez un mutant *Scspo13*, on n'observe pas de réaccumulation de la sécurine en méiose II. Ceci suggère que chez ce mutant, l'absence de sécurine en fin de première division (ou début de seconde division) entraîne une réactivation prématurée de la séparase qui détruit la cohésion centromérique. ScSPO13 pourrait inhiber APC/C^{AMA1}, car chez un double mutant *Scspo13/Scama1* la sécurine est détruite en anaphase I et à nouveau présente en seconde division, ainsi la mutation *Scama1* supprime le phénotype du mutant *Scspo13* (Katis et al., 2004b; Lee et al., 2004a).

Une étude récente montre que HsRBMX, une protéine possédant un domaine de fixation à l'ARN et présente sur le chromosome X, s'associe avec la chromatine et joue un rôle dans le maintien et la protection centromérique de la cohésion en mitose. Chez un mutant *Hsrbmx*, les cellules HeLa sont arrêtées en prométaphase suite à une perte de cohésion entre les chromatides sœurs. Les signaux centromériques HsSGO1 et HsB56 α sont absents chez ce mutant, suggérant un défaut dans la protection de cohésion centromérique face au mécanisme de la "prophase pathway". Les expériences montrent que HsRBMX pourrait être un régulateur du maintien de la cohésion avant la phase M. L'analyse de ce mutant montre qu'un défaut dans le maintien de la cohésion peut être à l'origine d'un phénotype de perte de cohésion centromérique (Matsunaga et al., 2012).

Mitose



Méiose

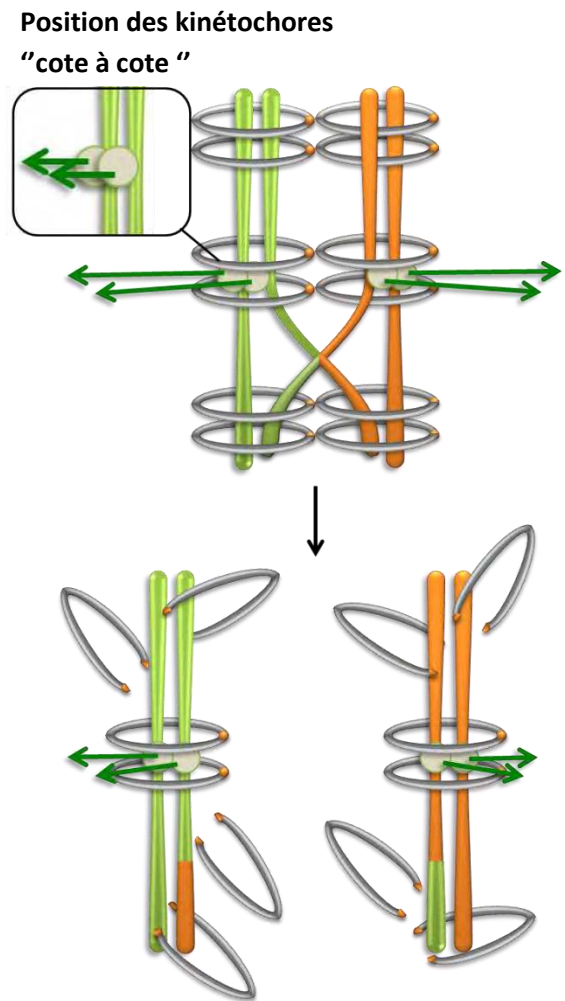


Figure B.IV.1 : Attachement du fuseau de microtubules aux chromosomes lors de la mitose et la méiose I.

Pour ne pas surcharger le schéma, une seule fibre de microtubules est représentée pour chaque kinétochore. En mitose, les kinétochores sœurs sont bi-orientés (positionnés "dos à dos"). La cohésion est éliminée sur toute la longueur du chromosome permettant la séparation des chromatides sœurs vers les pôles opposés. En méiose, les kinétochores sœurs sont attachés aux microtubules émanant du même pôle car les kinétochores sœurs sont mono-orientés (positionnés "côte à côte"). Chaque homologue est attaché aux microtubules émanant des pôles opposés, ainsi en anaphase I, l'élimination de la cohésion le long des bras permet de séparer les homologues.

IV. Orientation des kinétochores lors de méiose

Chez les eucaryotes, la ségrégation des chromosomes est réalisée grâce aux kinétochores qui se forment aux niveaux des régions centromériques. Les kinétochores conditionnent la ségrégation des chromosomes en fixant le fuseau de microtubules qui va tirer les chromosomes pour les séparer. Les fibres de microtubules vont s'attacher de façon aléatoire au niveau des kinétochores. Ce mécanisme est dynamique, les fibres vont s'attacher et se détacher jusqu'à ce que les chromosomes soient sous tension. Les erreurs d'attachement du fuseau aux kinétochores vont être corrigées pour empêcher les ségrégations aberrantes. Les erreurs de ségrégation peuvent induire la formation de cellules aneuploïdes pouvant entraîner la mort cellulaire, la formation de cancer ou la formation de gamètes anormaux (Hassold et al., 2007).

Lors de la mitose, les chromatides sœurs sont attachées à des faisceaux de microtubules émanant des pôles opposés de la cellule pour être séparées de façon équationnelle en anaphase. En mitose, comme en méiose II, les kinétochores sœurs sont bi-orientés (ou attachés de façon amphitélique) (Figure B.IV.1 et B.IV.2). En méiose I, les kinétochores sœurs sont attachés à des microtubules émanant du même pôle pour permettre la séparation des chromosomes homologues. Dans ce cas, les kinétochores sœurs sont mono-orientés (ou attachés de façon syntélique) (Figure B.IV.1 et B.IV.2). Le mécanisme à l'origine de l'orientation des kinétochores en mitose a été adapté en méiose I pour permettre la mono-orientation des chromatides sœurs entraînant la ségrégation des chromosomes homologues.

1. Le Kinétochore

Le kinétochore est un complexe formé de plus de 100 protéines dont la plupart sont conservées chez tous les eucaryotes. Le kinétochore peut être divisé en 2 parties: le kinétochore interne qui se fixe à l'ADN centromérique et le kinétochore externe qui fixe les microtubules.

Les protéines du kinétochore interne se fixent au niveau du centromère, qui correspond à la constriction, présente au niveau des chromosomes condensés, visible en cytologie. Le centromère est une région chromosomique contenant CENH3 (ou CENP-A), un variant de l'histone H3. On distingue la région centrale du centromère ("core" centromère), qui correspond à la région où s'associe le kinétochore interne, et la région d'hétérochromatine péricentromérique qui est essentielle à la cohésion entre chromatides sœurs. La taille des centromères peut varier de 125pb chez *S. cerevisiae* à plusieurs mégabases chez les mammifères et les plantes. Les régions centromériques sont communément constituées de séquences répétées d'ADN et de rétrotransposons (Birchler et al., 2011; Burrack and Berman, 2012).

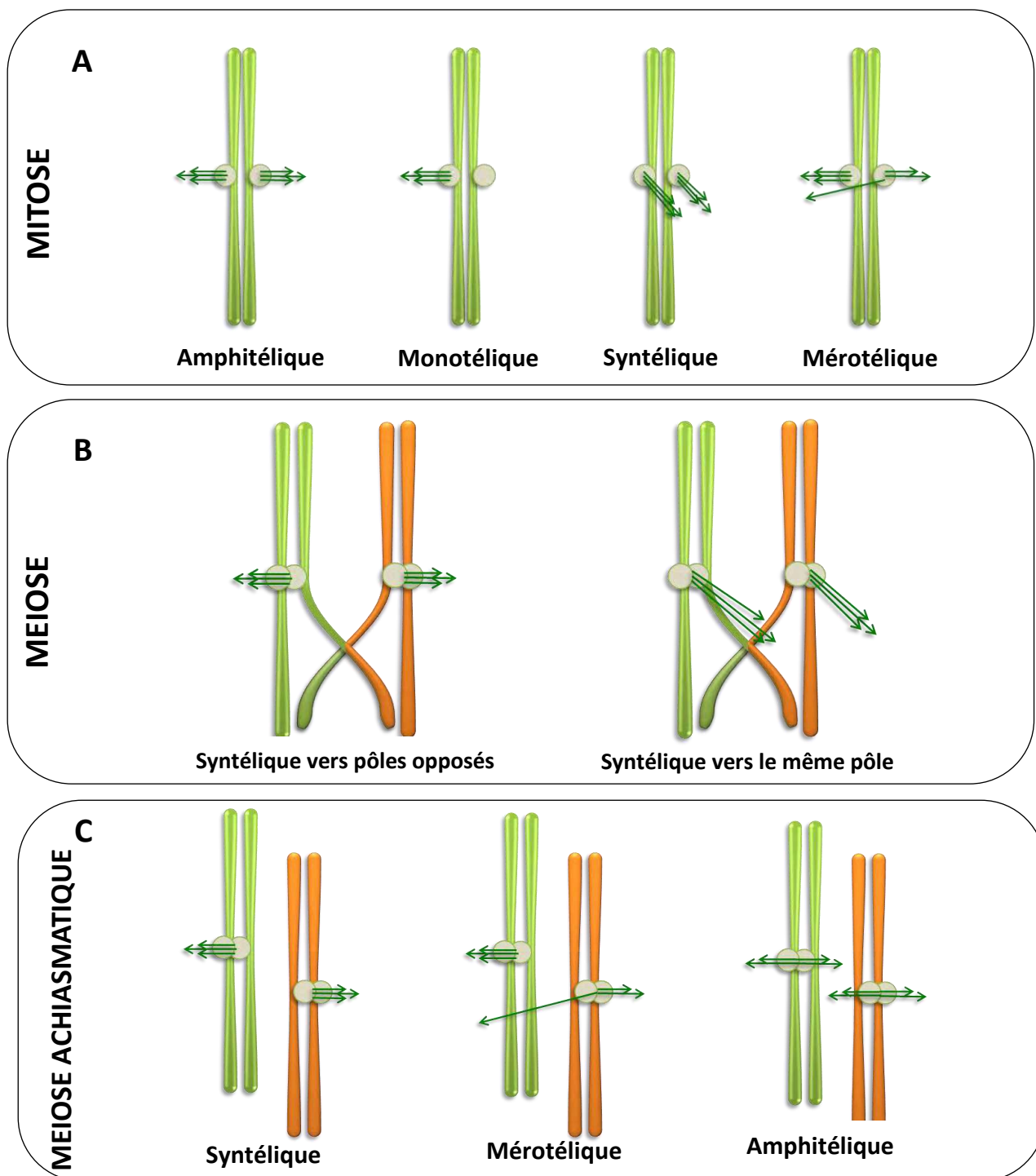


Figure B.IV.2 : Différents types d'attachement kinétochores-microtubules

(A) En mitose (et méiose II), les kinétochores sont "dos à dos". L'attachement amphitélique permet la séparation des chromatides sœurs. Les attachements monotéliques, syntéliques et mérotéliques peuvent apparaître et sont corrigés pour éviter la formation de cellules aneuploïdes. (B) En méiose I, les kinétochores sont "côte à côte". L'attachement syntélique permet la séparation des chromosomes homologues. Des chromosomes homologues peuvent être attachés à des microtubules émanant du même pôle, cet attachement est instable et doit être corrigé. (C) Lors de méiose achiasmatique (présente chez les mutants de recombinaison), les kinétochores sœurs sont toujours fusionnés. Dans ce cas, des attachements monotéliques et mérotéliques peuvent se produire mais ne permettent pas de mettre les chromosomes sous tension. L'attachement amphitélique satisfait des conditions de tension mais la protection de la cohésion au centromère empêche la ségrégation des chromatides sœurs.

Chez les espèces possédant des centromères “ponctuels”, comme *S. cerevisiae* le kinétochore ne capture qu’une seule fibre de microtubules (Winey et al., 2005). Chez les autres espèces, plusieurs fibres de microtubules s’associent aux kinétochores.

2. Orientation monopolaire des kinétochores lors de la première division méiotique

En méiose I, l’orientation des kinétochores doit être modifiée par rapport à la mitose ou à la méiose II pour permettre la séparation des chromosomes homologues et la co-migration des chromatides sœurs. Les chiasmata font le lien physique entre les chromosomes homologues et permettent la mise en place de la tension, exercée par les fuseaux de microtubules, entraînant chaque homologue vers un pôle opposé de la cellule. Ce ne sont cependant pas les chiasmata (ni la tension) qui sont à l’origine de l’orientation des kinétochores car dans la plupart des cas chez les mutants de recombinaison, les deux chromatides sœurs d’un monovalent ségrégent au même pôle.

On pourrait facilement imaginer que des facteurs cellulaires présents dans le cytoplasme en méiose I ou le fuseau de microtubules sont à l’origine de cette mono-orientation. Des études réalisées chez la sauterelle ont mis en évidence que les propriétés à l’origine de la mono-orientation des kinétochores sont portées par les chromosomes eux-mêmes. Par micromanipulation, les auteurs ont transféré des bivalents (deux chromosomes homologues maintenus ensemble par un ou plusieurs chiasmata) d’une cellule en méiose I vers une cellule en méiose II. Dans ce cas, les bivalents se comportent comme en méiose I, les homologues se séparent grâce à la mono-orientation des kinétochores sœurs. Réciproquement un chromosome de méiose II, composé de deux chromatides, sépare ses chromatides sœurs lorsqu’il est transféré dans une cellule en méiose I (Paliulis and Nicklas, 2000).

Le kinétochore se fixe au niveau du centromère. Un bivalent, composé de deux chromosomes possédant chacun deux centromères, contient donc quatre kinétochores (Figure B.IV.1). Afin d’assurer la ségrégation des chromosomes homologues, on pourrait penser qu’un seul des deux kinétochores sœurs est attaché aux microtubules et que l’autre est inactivé. L’observation des kinétochores en méiose nous montre que les deux kinétochores sœurs sont fonctionnels (Goldstein, 1981; Parra et al., 2004) et qu’ils adoptent une configuration “côte à côte” en méiose I alors qu’ils sont “dos à dos” en mitose et en méiose II (Lee et al., 2000)(Figure B.IV.3).

L’orientation des kinétochores est définie très tôt au cours de la méiose. Chez *S. pombe*, une cellule entrant artificiellement en méiose après une phase S mitotique va séparer ses chromatides sœurs en méiose I (Watanabe et al., 2001), suggérant que les propriétés d’orientation du kinétochore sont établies dès la phase de réplication pré-méiotique.

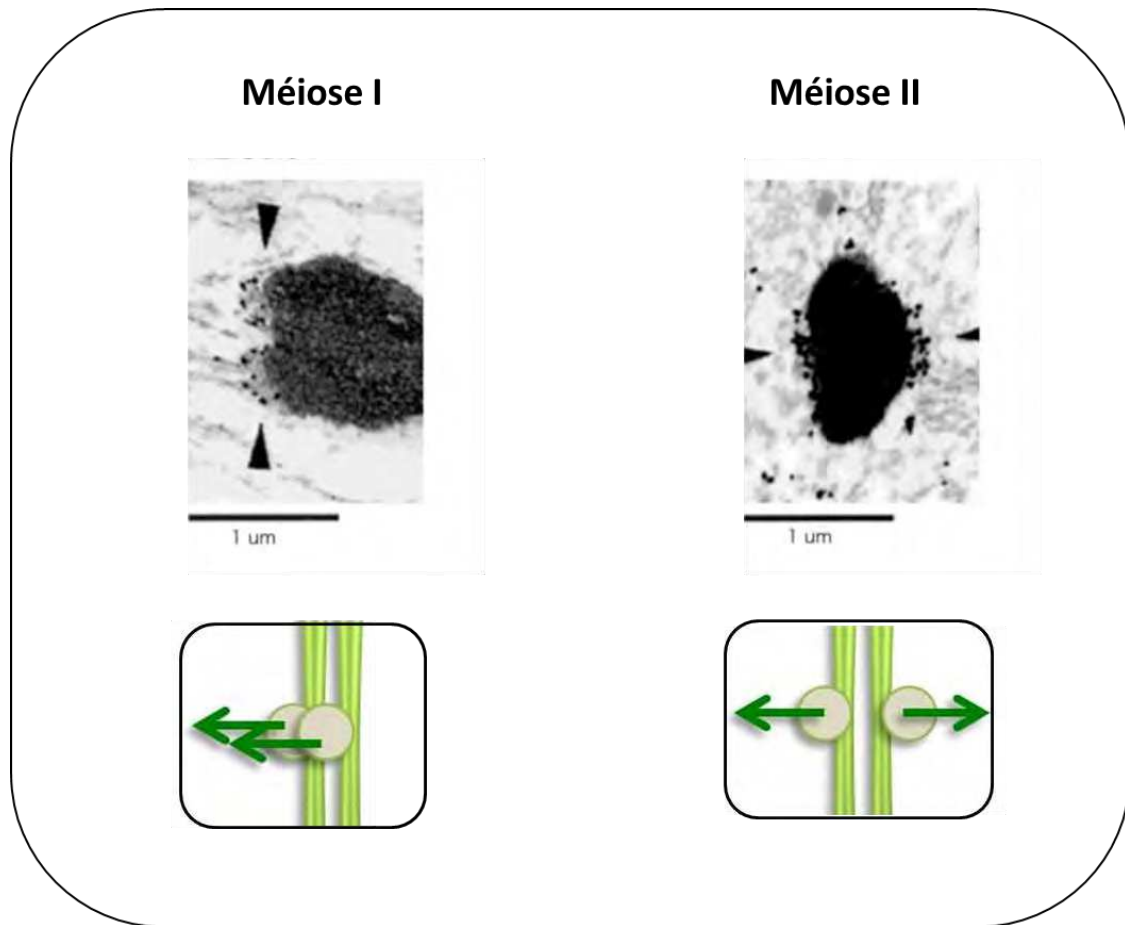


Figure B.IV.3 : Organisation des kinétochores en méiose I et méiose II dans des oocytes de porc

Ces images de microscopie électronique montrent des kinétochores sœurs en méiose I et méiose II dans des oocytes de porc (indiqués par les flèches). La protéine centromérique CENP-E est présente sur la partie externe du kinétochoire et est marquée par des particules d'or (D'après Lee *et al.* 2000).

2.1. Le complexe monopoline

2.1.1. Le complexe monopoline chez *S. cerevisiae*

C'est grâce à un crible visant à identifier des gènes exprimés spécifiquement au cours de la méiose chez *S. cerevisiae* que *MAM1* (monopolar microtubule attachment during meiosis I) a été identifié. Chez un mutant *Scmam1*, les kinétochores sœurs sont bi-orientés en métaphase I mais ni les chromosomes homologues ni les chromatides sœurs ne ségrégent en méiose I. En effet chez ce mutant, la cohésion centromérique n'est pas éliminée en anaphase I et maintient les chromatides sœurs ensemble empêchant leur ségrégation. Il faut remplacer REC8 par SCC1 dans un mutant *Scmam1* pour observer une division équationnelle en méiose I (Toth et al., 2000). ScMAM1 est présente uniquement du pachytène à l'anaphase I et colocalise avec des protéines du kinétochore, suggérant un rôle direct de ScMAM1 sur l'orientation des kinétochores. Des études complémentaires ont identifié d'autres protéines essentielles à la mono-orientation des kinétochores. ScMAM1, ScCSM1, ScLRS4 et une caséine kinase ScHRR25 forme le complexe monopoline (Rabitsch et al., 2001, 2003; Petronczki et al., 2006). ScHRR25 est nécessaire à la localisation des autres protéines du complexe au niveau du kinétochore mais ce rôle est indépendant de son activité kinase (Petronczki et al., 2006). Deux autres kinases ScCDC5 et ScCDC7 sont également requises à la localisation du complexe monopoline aux kinétochores (Bardhan, 2010a). Les cibles de ces kinases ainsi que le mode d'action du complexe monopoline n'ont pas encore été mis en évidence.

ScSPO13 est également impliqué dans l'orientation des kinétochores chez *S. cerevisiae* (voir B.III.3.3.1), le mutant *Scspo13* réalise une unique division méiotique équationnelle (Klapholz and Esposito, 1980). ScSPO13 est localisée au niveau des kinétochores et est nécessaire à la localisation du complexe monopoline aux kinétochores (Katis et al., 2004b; Lee et al., 2004a). Cependant la fonction exacte de ScSPO13 n'a pas été déterminée.

2.1.2. MOA1 chez *S. pombe*

Le complexe monopoline de *S. cerevisiae* ne semble pas être conservé chez les autres eucaryotes. Bien que des homologues de ScCSM1 et ScLRS4 soient présents chez *S. pombe*, ils ne sont pas impliqués dans les mécanismes nécessaires à la mono-orientation des kinétochores en méiose I (Rabitsch et al., 2001, 2003).

Une protéine impliquée dans la mono-orientation des kinétochores a cependant été identifiée chez *S. pombe*. Une souche haploïde entrant en méiose mais ne réalisant qu'une première division méiotique produit majoritairement des spores non viables à cause de l'orientation monopolaire des kinétochores, les chromatides sœurs n'étant que rarement toutes présentes dans la même spore. La mutagenèse réalisée sur cette souche a permis d'identifier une mutation dans le gène *SpMOA1* qui induit une division équationnelle (>95%) et ainsi la production de spores viables. La mutation *Spmoa1* en contexte diploïde n'induit

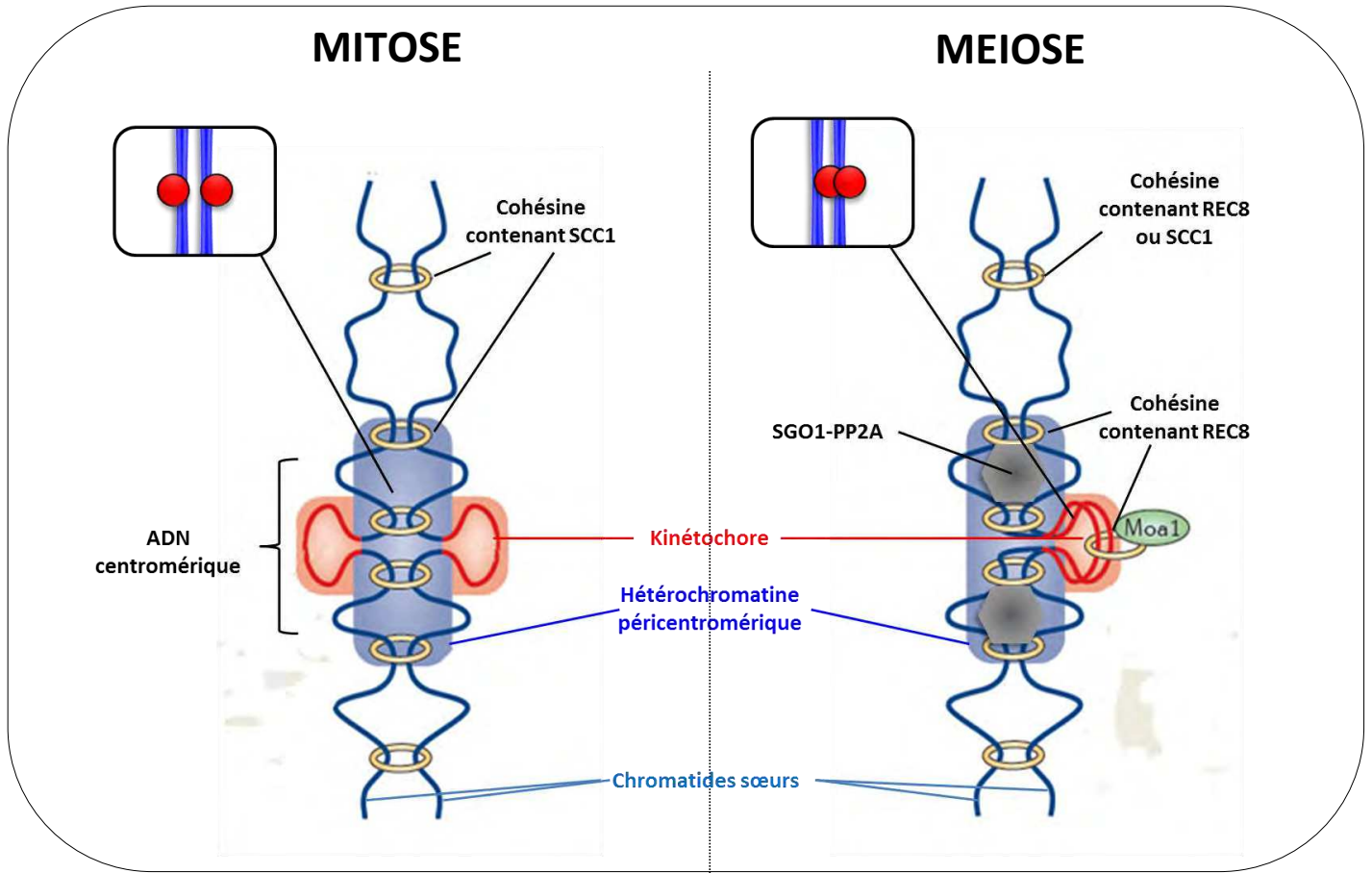


Figure B.IV.4 : Modèle de l'organisation du centromère et des cohésines en mitose et en méiose chez *S.pombe*

En mitose, les cohésines contenant SCC1 sont présentes dans l'hétérochromatine péricentromérique et au niveau des bras chromosomique. Il n'y a pas de cohésine au niveau du "core" centromère et les kinétochores sœurs sont positionnés "dos à dos". En méiose, les cohésines le long des bras peuvent contenir REC8 ou SCC1. Les cohésines péricentromériques contiennent REC8 et sont protégées de la séparase par le complexe SGO1-PP2A. Contrairement à la mitose, des cohésines contenant REC8 sont présentes au "core" centromère grâce à MOA1 (Adapté de Watanabe *et al.* 2012).

que 20% de divisions équationnelles mais ce taux atteint 95% dans un double mutant *Spmoa1/Spspo11*, suggérant que la présence de chiasmata influence l'orientation des kinétochores. Comme ScMAM1, SpMOA1 apparaît en prophase et disparaît en anaphase I et colocalise avec des protéines du kinétochore (Yokobayashi and Watanabe, 2005).

2.2. Rôle de la cohésion dans l'orientation monopolaire des kinétochores

Chez *S. pombe*, la mutation *rec8* entraîne une bi-orientation des kinétochores et ainsi une division équationnelle en méiose I (Watanabe and Nurse, 1999). Chez *Sprec8*, SCC1 est capable de maintenir la cohésion (au moins centromérique) jusqu'en métaphase I (Yokobayashi et al., 2003). Mais seul le complexe de cohésine contenant la sous-unité REC8 permet la mono-orientation des kinétochores sœurs en méiose I. Des résultats similaires ont été obtenus chez *A. thaliana* dans un double mutant *Atrec8/Atspo11* où la fragmentation chromosomique observée chez un simple mutant *Atrec8* est supprimée par la mutation *spo11*. Le double mutant *Atrec8/Atspo11* réalise en méiose I, une mitose-like où les kinétochores sœurs sont bi-orientés, alors que chez un mutant *Atspo11*, les kinétochores sont mono-orientés en méiose I. En méiose II, les chromatides sont libres et ségrégent de façon aléatoire. Le mutant *Atscc3/Atspo11* présente le même phénotype (Chelysheva et al., 2005). AtREC8 et AtSCC3 sont tous les deux nécessaires à la mono-orientation des kinétochores en méiose I. Ainsi REC8 est nécessaire à l'orientation monopolaire des kinétochores et au maintien de la cohésion centromérique jusqu'en méiose II. Le rôle de REC8 dans la mono-orientation des kinétochores semble également conservé chez les mammifères (Parra et al., 2004; Watanabe, 2012). Néanmoins chez *S. cerevisiae*, la sous-unité REC8 n'est pas essentielle à la mono-orientation des kinétochores en méiose I car la substitution de ScREC8 par ScSCC1 ne perturbe pas l'orientation monopolaire des kinétochores sœurs (Toth et al., 2000).

La répartition des cohésines au niveau du centromère joue un rôle important dans l'orientation des kinétochores. Que ce soit en mitose ou en méiose, le complexe de cohésine contenant SCC1 est présent sur toute la longueur du chromosome, à l'exception du "core" centromère. Alors que le complexe contenant REC8 est présent sur toute la longueur du chromosome et au niveau du "core" centromère en méiose (Watanabe et al., 2001)(Figure B.IV.4). Ces résultats suggèrent que REC8 est nécessaire à la cohésion au niveau du "core" centromère et faciliterait la disposition côte à côte des kinétochores sœurs en méiose I. Cependant la localisation de REC8 au niveau du "core" centromère n'est pas suffisante à l'orientation monopolaire car l'expression de REC8 en mitose n'induit pas l'orientation monopolaire des kinétochores malgré une localisation au niveau du "core" centromère (Yokobayashi et al., 2003).

Chez *S. pombe*, l'orientation bipolaire des kinétochores en méiose I chez un mutant *Sprec8* n'est pas due à une perte de la monopoline au centromère car SpMOA1 est toujours présente aux centromères dans un mutant *Sprec8*. A l'inverse, on observe une suraccumulation de SpREC8 au "core" centromère chez un mutant *Spmoa1* probablement à

cause d'une désorganisation du centromère (Yokobayashi and Watanabe, 2005). En observant la région centromérique des chromosomes méiotiques, cette équipe propose un modèle (Figure B.IV.4) selon lequel la cohésion au "core" centromère est dépendante de REC8 et MOA1 et permettrait de rapprocher les centromères et ainsi de positionner côte à côte des kinétochores sœurs pour la ségrégation des chromosomes homologues. Cette cohésion du "core" centromère est éliminée, probablement par la séparase car les cohésines du "core" centromère ne sont pas protégées par SGO (Watanabe, 2012), permettant ainsi l'orientation bipolaire des kinétochores en méiose II (Sakuno and Watanabe, 2009).

En méiose, comme en mitose, la cohésion est mise en place lors de la phase S grâce à l'acétylation de SMC3 par ECO1 (voir B.III.2.3). Une étude récente suggère que chez *S. pombe*, ECO1 est nécessaire à la mise en place de la cohésion au "core" centromère en phase S préméiotique et que MOA1 est indispensable à son maintien. De plus, un mutant *Spclr6* (protéine impliquée, en autre, dans la déacétylation de SMC3) est capable de supprimer le défaut de d'orientation des kinétochores du mutant *Spmoa1*, suggérant que l'acétylation est essentielle à la mise en place et au maintien de la cohésion au "core" centromère et donc à l'orientation monopolaire des kinétochores en méiose I (Kagami et al., 2011).

Chez *S. cerevisiae*, ScREC8 n'est pas essentielle à l'orientation monopolaire des kinétochores en méiose I (Toth et al., 2000). Cette différence est peut-être due à la structure "ponctuel" du centromère chez *S. cerevisiae* et à la répartition des complexes de cohésines au niveau du centromère, car chez *S. cerevisiae*, le patron de localisation des cohésines REC8 et SCC1 semble identique (Glynn et al., 2004).

2.2.1. Protection de la cohésion centromérique et orientation monopolaire des kinétochores

En méiose I, dans un contexte mutant où les kinétochores sont bi-orientés, la protection centromérique empêche la séparation des chromatides sœurs. Ainsi chez un double mutant *Spmoa1/Spspo11*, on observe fréquemment des chromosomes bloqués au niveau de la plaque métaphasique alors que la méiose I est équationnelle chez un triple mutant *Spmoa1/Spspo11/Spsgo1* (Yokobayashi and Watanabe, 2005). L'analyse du mutant *Spsgo1* en contexte haploïde montre que la méiose I est équationnelle. De même, un mutant achiasmatisque couplé à la mutation *Spsgo1* en contexte diploïde réalise une méiose I équationnelle (Dudas et al., 2011; Hirose et al., 2011). Les résultats sont identiques si on remplace la mutation *sgo1* par une mutation *pp2a*, suggérant que la protection de la cohésion centromérique est nécessaire à la co-ségrégation des chromatides sœurs lors d'une méiose I achiasmatisque. Ainsi SGO1 est impliquée dans la mono-orientation des kinétochores en absence de crossing-over bien qu'on n'observe aucun défaut de ségrégation des homologues en méiose I dans un contexte sauvage. L'hypothèse la plus convaincante serait que les kinétochores soient bi-orientés en absence de chiasmata, suggérant que la

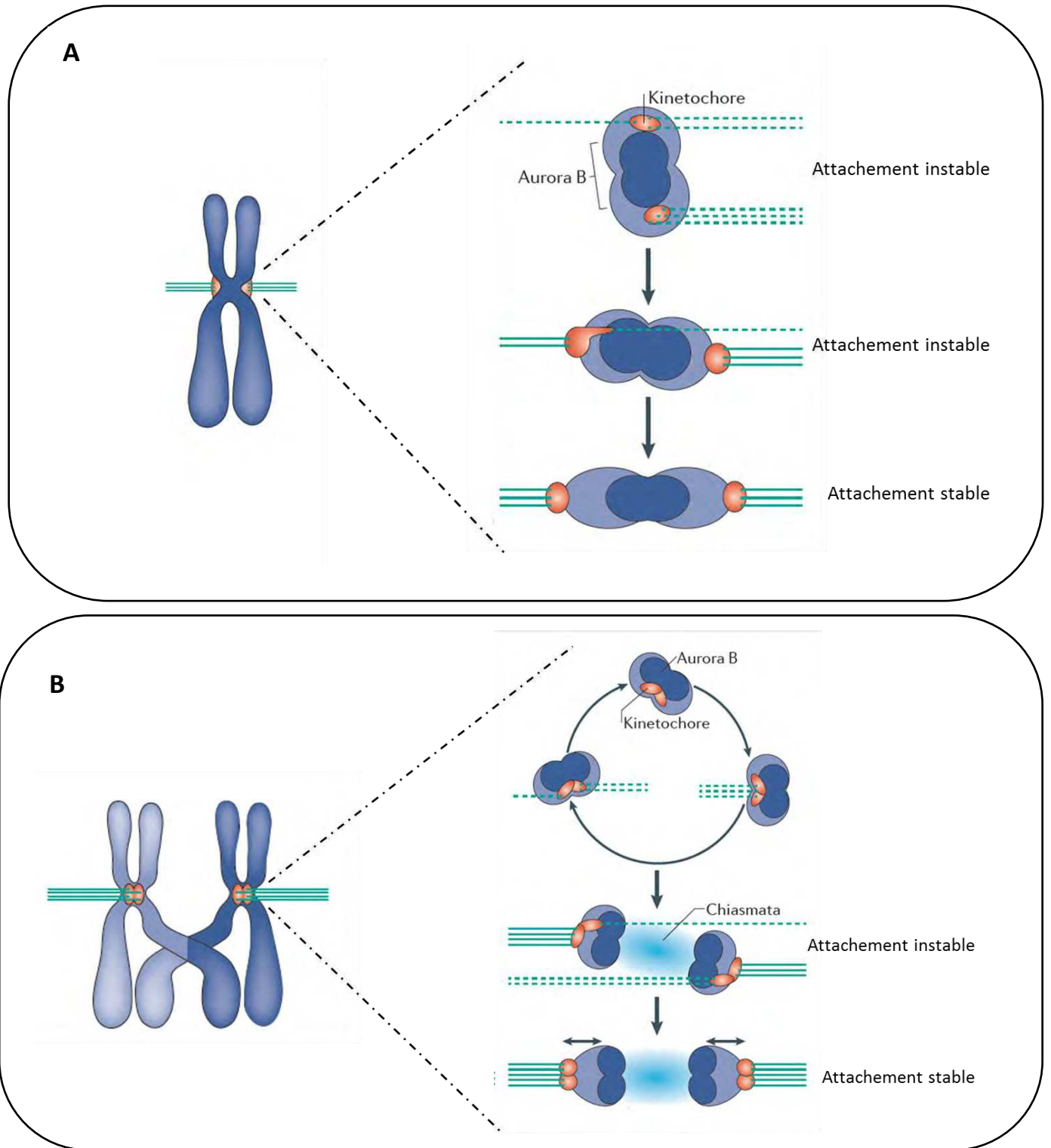


Figure B.IV.5 : Position d'Aurora B selon la tension aux kinétochores en mitose et en méiose. Aurora B est présente au niveau du core centromère. Les zones bleu clair et bleu foncé représentent le gradient de phosphorylation des protéines du kinétochore par Aurora B. (A) En mitose, les kinétochores sont capturés par les microtubules souvent de manière mérotélique entraînant un attachement instable car les chromosomes ne sont pas sous tension. Dans ce cas, Aurora B est proche des kinétochores et phosphoryle ses substrats, retardant ainsi la séparation des sœurs. Lorsque l'attachement est amphitélique, les chromosomes sont sous tension, éloignant ainsi Aurora B de ses cibles. L'attachement est alors stabilisé, le SAC est satisfait. L'anaphase débute et les chromatides sœurs sont séparées. (B) En méiose, les kinétochores sœurs sont fusionnés. Dans cette configuration, Aurora B est proche des kinétochores. L'attachement mérotélique des microtubules est instable car Aurora B peut encore phosphoryler ses cibles. La présence d'un chiasma permet de mettre sous tension des chromosomes attachés de manière syntélique. Dans ce cas, Aurora B s'éloigne des kinétochores, stabilisant l'attachement. Le SAC est satisfait, déclenchant l'anaphase I et la séparation des chromosomes homologues (Adapté de Watanabe *et al.* 2012).

présence de chiasmata influence l'orientation des kinétochores. Des observations réalisées dans des oocytes de souris nous montrent que des kinétochores sœurs "côte à côte" chez un mutant achiasmatique mais que l'attachement aux microtubules peut quand même être amphitélique (Kouznetsova et al., 2007)(Figure B.IV.2). Hirose *et al.* proposent un modèle basé sur l'attachement dynamique des kinétochores aux microtubules. Chez un sauvage, l'attachement syntélique génère une tension stable qui peut persister alors qu'un attachement incorrecte ne génère pas une tension suffisante et est déstabilisé. Chez un mutant achiasmatique, les attachements amphitéliques ne sont pas déstabilisés car ils génèrent une tension suffisante (Figure B.IV.2) (Hirose et al., 2011).

2.3. Rôle des kinases Aurora dans l'orientation monopolaire des kinétochores

Les erreurs d'attachement microtubules-kinétochores sont fréquentes et doivent être corrigées pour séparer correctement les chromosomes lors de l'anaphase. Les chromosomes se séparent uniquement lorsque la tension stabilise l'alignement des chromosomes. Ce mécanisme de contrôle est bien étudié en mitose. Le CPC (chromosomal passenger complex) est composé des protéines : Aurora B, Borealin, Survivin et INCENP. Le CPC se localise entre les 2 kinétochores sœurs jusqu'en métaphase, son rôle est de déstabiliser des erreurs d'attachement des microtubules aux kinétochores et d'activer le SAC afin de retarder la séparation des chromosomes (Vagnarelli and Earnshaw, 2004). Lorsque les chromosomes ne sont pas sous tension, Aurora B est située à proximité des centromères et déstabilise l'attachement en phosphorylant différents substrats au niveau du kinétochore (Figure B.IV.5). Lorsque l'attachement aux kinétochores est amphitélique, la tension écarte légèrement les kinétochores qui s'éloignent d'Aurora B, empêchant ainsi leur phosphorylation. On observe également un enrichissement en phosphatase PP1 et PP2A aux kinétochores lorsque les chromosomes sont sous tension (Watanabe, 2012).

Les homologues d'Aurora B chez les levures et chez la souris (SpARK1, SciPL1 et MmAuroraC) jouent un rôle essentiel dans l'orientation des chromosomes en méiose. La caractérisation précise de ces protéines en méiose a permis d'établir un modèle : lors de la métaphase I, les kinétochores sœurs sont fusionnés et très proches d'Aurora B (Figure B.IV.5). Aurora B ne s'éloigne des kinétochores que si les kinétochores sœurs d'un chromosome sont tirés dans la même direction et que les kinétochores sœurs de l'autre chromosome sont tirés dans la direction opposée (Figure B.IV.5)(Watanabe, 2012). Ainsi l'attachement monopolaire des kinétochores sœurs est stabilisé par l'attachement bipolaire du bivalent. Chez *S. pombe*, Aurora B est localisée au niveau du "core" centromère et cette localisation est dépendante de SpSGO2 et SpBUB1 (Hauf et al., 2007; Kawashima and Tsukahara, 2007). Aurora B et MOA1 ne semblent pas appartenir à la même voie de régulation de l'orientation des kinétochores car chez un mutant de la kinase Aurora, *Spark1*, on observe des attachements mérotéliques au niveau des kinétochores sœurs mais sans perturber la localisation de REC8 et MOA1 aux centromères (Hauf et al., 2007).

	Monopoline				Localisation du complexe monopoline			REC8	Kinase Aurora
<i>S.cerevisiae</i>	-	ScMAM1	ScCSM1	ScLRS4	ScHRR25	ScSPO13	ScCDC5 ScCDC7	Non essentielle	ScIPL1
<i>S.pombe</i>	SpMOA1	-	Non essentielle	Non essentielle	ND			Essentielle	SpARK1
<i>Mammifères</i>	ND				ND			Essentielle	MmAURORA C
<i>A.thaliana</i>	ND				ND			Essentielle	ND

Tableau B.IV.1 : Les protéines impliquées dans la mono-orientation des kinétochores en méiose I.

ND : non déterminé

Les protéines connues et impliquées dans l'orientation des kinétochores en méiose I sont regroupées dans le Tableau B.IV.1.

3. Orientation des kinétochores en méiose II

Lors de la méiose II, les chromatides sœurs se séparent pour former des spores haploïdes. Les kinétochores sœurs, qui étaient mono-orientés en méiose I doivent être bi-orientés en métaphase II.

Peu de données sont disponibles sur les mécanismes à l'origine du changement de position des kinétochores. On pourrait facilement imaginer que chez *S. pombe*, la disparition de SpMOA1 et des cohésines au "core" centromère en anaphase I, entraîne un repositionnement bi-orienté des kinétochores sœurs. Des études réalisées chez la sauterelle indiquent que les kinétochores sœurs sont toujours mono-orientés en prométaphase II mais sont séparés en métaphase II. C'est l'attachement du fuseau aux kinétochores qui entraîne le changement de position. Lorsqu'un chromosome en métaphase II est maintenu à l'écart du fuseau, ce dernier garde ses kinétochores mono-orientés alors que les kinétochores des chromosomes en contact avec le fuseau sont bi-orientés (Paliulis and Nicklas, 2005). On peut ainsi supposer que l'élimination des cohésines et des monopolines au "core" centromère en anaphase I n'entraîne pas directement une ré-orientation des kinétochores. Les kinétochores (libre de cohésines et de monopolines) restent disposés "côte à côte" jusqu'à l'attachement du fuseau en métaphase II où ils se repositionnent "dos à dos".

Les mécanismes de régulation de l'orientation des kinétochores en méiose I sont complexes. Chez *S. pombe*, l'orientation des kinétochores serait régulée par une voie majoritaire dépendante de REC8 et MOA1 et nécessaire à l'agencement des kinétochores et par une voie minoritaire comprenant Aurora B et qui influence l'attachement syntélique des microtubules. Ainsi l'orientation des chromosomes est déterminée par l'agencement des kinétochores et par la tension exercée par les microtubules. Chez *S. cerevisiae*, la présence d'un centromère ponctuel implique un mécanisme d'orientation des kinétochores différents. La présence de ScREC8 n'est pas indispensable à la mono-orientation. Plusieurs protéines ont été identifiées comme impliquées dans l'orientation des kinétochores mais leurs modes d'action n'ont pas été mis en évidence. Pour l'instant aucune protéine de type "monopoline" n'a été identifiée chez les mammifères et les plantes.



Figure C.I.1 : *Arabidopsis thaliana*

A gauche, la plante à l'état végétatif, avant l'apparition de la hampe florale (en bas à gauche). Au centre plante adulte au stade floraison/fructification. A droite, fleur, hampe florale et graines. Les barres blanches représentent 1 cm, sauf dans le cas de la fleur et des graines où elles représentent 1 mm (D.Bouchez).

C. LE MODELE D'ETUDE: *Arabidopsis thaliana*

L'arabette des dames (*Arabidopsis thaliana*) (Figure C.I.1) est considérée comme une plante modèle depuis plusieurs décennies. *Arabidopsis* appartient à la classe des dicotylédones et est un membre de la famille des *Brassicacées*, qui contient des espèces cultivées comme le chou ou le colza. Bien qu'elle ne présente pas de grands intérêts agronomiques, *Arabidopsis* s'est imposée comme un modèle de choix pour les études moléculaires et génétiques. Cet organisme photosynthétique nécessite uniquement de la lumière, de l'air, de l'eau et quelques minéraux pour accomplir son cycle de vie (six semaines de la germination à la graine mature) (Figure C.I.2). Le nombre de descendant est très important (10 000 graines par individus). *Arabidopsis* est une plante de petite taille (environ 30 cm de haut) (Figure C.I.1), nécessitant peu d'espace et qui peut être cultivée en serre, en chambre de culture ou en culture *in vitro*. Le génome d'*Arabidopsis* est de petite taille (environ 125Mb) et composé de cinq paires de chromosomes. Son séquençage, achevé en 2000, a permis de déterminer la séquence des 25 000 gènes que contient le génome d'*Arabidopsis thaliana*. Le séquençage du génome a montré que 60% du génome était dupliqué et que seulement 35 % des protéines sont uniques dans le génome, suggérant une importante redondance fonctionnelle.

1. Cycle de vie d'*Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana a un cycle de vie diplo-haplophasique (Figure C.I.2). La génération diploïde, ou sporophyte, alterne avec la génération haploïde, le gamétophyte. La phase haploïde est réduite à la formation du gamétophyte et c'est le sporophyte diploïde qui constitue la phase dominante du cycle de vie.

Les fleurs d'*Arabidopsis* porte à la fois des organes mâles (les anthères) et femelles (le pistil). Du côté mâle, la méiose produit quatre microspores haploïdes. Chacune des microspores va subir deux mitoses successives. Une première mitose produit un noyau végétatif et une cellule génératrice. Cette cellule génératrice va se diviser pour former deux noyaux spermatiques. Ainsi le gamétophyte mâle (ou grain de pollen) contient un noyau végétatif haploïde et deux noyaux spermatiques haploïdes qui constituent les gamètes mâles. Dans les ovules présents dans le pistil, un seul des quatre produits de méiose devient une macrospore fonctionnelle, les trois autres dégénèrent. Cette macrospore va subir trois mitoses successives produisant sept cellules : trois cellules antipodales, une oosphère encadrée par deux synergides et une cellule centrale contenant deux noyaux polaires.

La double fécondation est une caractéristique des plantes à fleurs. Le tube pollinique va progresser à travers le pistil. Le contenu du grain de pollen va alors se décharger dans le sac embryonnaire. L'un des gamètes mâles s'unit avec l'oosphère et donne le zygote (2n) à

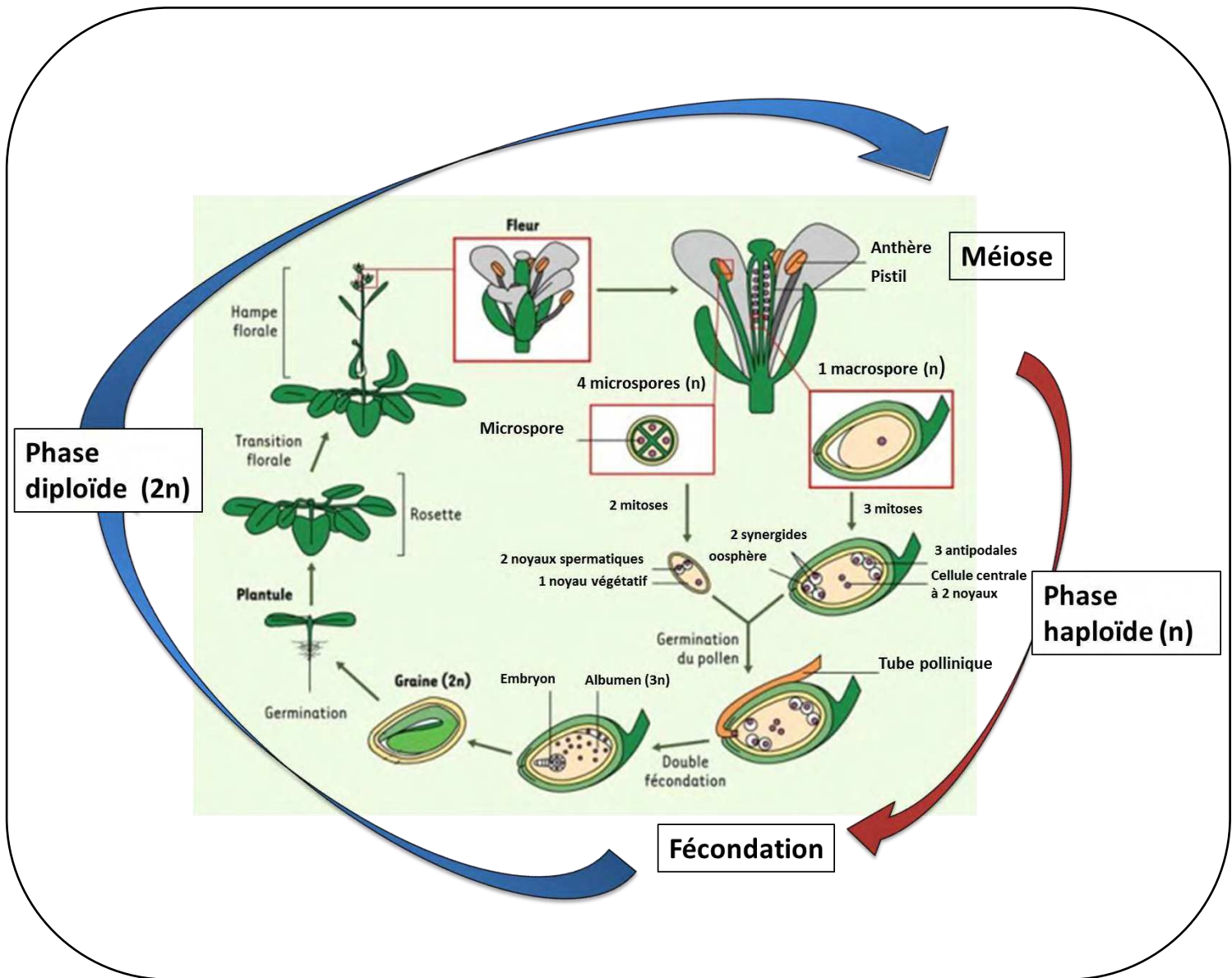


Figure C.1.2 : Cycle de vie chez *Arabidopsis thaliana*

(D'après Prouteau et Colot, 2005)

l'origine de la future plante. L'autre gamète mâle s'associe aux noyaux polaires de la cellule centrale pour former l'albumen triploïde qui fait partie de la graine et qui servira à nourrir l'embryon (Figure C.I.2). Les graines formées sont mûries dans une silique, le fruit caractéristique des *Brassicacées*. Après germination cette graine se développe en un nouvel individu.

Arabidopsis thaliana est une plante hermaphrodite qui se reproduit principalement par autofécondation (plante autogame), il est cependant aisé de réaliser des croisements entre différents individus.

2. Les mutants d'*Arabidopsis thaliana*

Chez les plantes à fleurs, l'inactivation ciblée de gènes par recombinaison homologue (qui permet de modifier les gènes de manière précise) est inefficace. Les techniques de mutagenèse au hasard, par EMS ou radiations, permettent d'inactiver efficacement les gènes mais les mutations sont difficiles à identifier.

Le développement d'une technique de transformation simple et efficace chez *Arabidopsis thaliana* a permis de produire des mutants par mutagenèse insertionnelle. Le gène muté étant étiqueté son identification est plus aisée. La technique est basée sur les propriétés naturelles d'*Agrobacterium tumefaciens*. Cette bactérie pathogène des plantes possède la capacité de transférer un fragment de plasmide (ADN-T), contenant des gènes utiles à l'infection, dans le génome de la plante hôte. Cette propriété a été détournée, ainsi les gènes d'*Agrobacterium* présents sur l'ADN-T peuvent être remplacés, par un marqueur de sélection par exemple, et intégrés dans le génome de la plante. La transformation *in planta* se fait en trempant les inflorescences d'une plante dans une solution d'*Agrobacterium*. Certaines graines issues de cette plante auront intégré l'ADN-T de façon hétérozygote (Bechtold and Pelletier, 1993; Clough and Bent, 1998). Ces insertions se font au hasard, elles sont stables et se maintiennent dans la descendance. Cette technique a permis la création de nombreuses collections de mutants d'insertion pour lesquelles les sites d'insertion ont été déterminés. Ainsi on peut obtenir des mutants d'insertion dans la plupart des gènes d'*Arabidopsis*. Cette technique peut également être utilisée pour introduire n'importe quelle séquence dans le génome d'*Arabidopsis thaliana*.

D. RESULTATS

I. Caractérisation fonctionnelle de protéines impliquées dans la progression du cycle méiotique

1. Préambule

Comme indiqué dans l'introduction, la méiose est une division spécialisée qui génère des cellules haploïdes essentielles à la reproduction sexuée. La particularité du cycle méiotique est l'enchaînement de deux divisions cellulaires précédées d'une unique phase de réplication. Actuellement, des mécanismes mis en jeu au cours du cycle méiotique ont été décrits chez les levures et les mammifères. L'étude du cycle méiotique chez *A. thaliana* peut permettre d'approfondir les connaissances sur ces mécanismes.

Lors de son post-doctorat, Isabelle d'Erfurth a caractérisé le mutant *osd1* (omission of second division) (d'Erfurth et al., 2009). Le mutant *osd1* produit des gamètes diploïdes viables (100% du côté mâle et 85% du côté femelle) et génère des descendants tétraploïdes et triploïdes par autofécondation. Les étalements de chromosomes méiotiques d'un mutant *osd1*, montrent une méiose I comparable au sauvage et une absence de seconde division. La production de gamètes diploïdes du côté mâle et femelle chez un mutant *osd1* est liée à l'absence de seconde division méiotique. Comme indiqué précédemment, chez *A. thaliana* la combinaison des mutations *Atrec8* et *Atspo11* conduit à une division de type mitotique en méiose I. Cependant les chromatides sœurs ségrégent de façon aléatoire en méiose II (Chelysheva et al., 2005) (voir B.IV.2.2). En combinant la mutation *osd1* avec les mutations *Atspo11* et *Atrec8*, les deux divisions méiotiques sont remplacées par une division mitotique. Ce phénotype est nommé *MiMe* pour *Mitosis instead of Meiosis*. Ainsi une plante *MiMe* produit des gamètes diploïdes mâles et femelles génétiquement identiques à elle-même (d'Erfurth et al., 2009). Il est intéressant de noter qu'*OSD1* possède un paralogue, *UVI4*, dans le génome d'*Arabidopsis*. *UVI4* avait été décrite il y a quelques années comme impliquée dans les mécanismes d'endoréduplication (Hase et al., 2006). Le mutant *uvi4* ne présente pas de défaut méiotique.

Puis Isabelle s'est intéressée à un autre mutant, *tam-1* pour *tardy asynchronous meiosis*. Ce mutant thermosensible, issu d'un crible EMS, possède une mutation ponctuelle dans le gène *TAM*. Il avait été précédemment décrit comme présentant un défaut en méiose mâle. Chez un mutant *tam-1*, les divisions méiotiques sont asynchrones au sein d'une anthère et la progression au cours de la méiose I et II est retardée. La cartographie de la mutation a permis d'identifier le gène *TAM*. *TAM/CYCA1;2* est une des 10 cyclines A d'*A. thaliana* (Magnard et al., 2001; Wang et al., 2004b). A mon arrivée au laboratoire, j'ai continué la caractérisation d'autres allèles du mutant *tam*. Ce travail a fait l'objet du premier article présenté ici et publié dans PLoS Genetics en 2010 où je suis co-premier auteur avec Isabelle.

Le second article présente une caractérisation fonctionnelle des protéines OSD1 et TAM et a été réalisé en collaboration avec d'autres équipes qui ont apporté leur savoir-faire dans l'étude des mécanismes du cycle cellulaire chez les plantes (Arp Schnittger – IBMP Strasbourg et Lieven De Veylder – VIB Ghent) et l'étude de la progression de la méiose femelle chez la souris (Katja Wassmann – UMPC Paris). Cet article a été publié dans PLoS Genetics en 2012.

2. Caractérisation du mutant *tam* et de son rôle dans la progression du cycle méiotique

2.1. Principaux Résultats

- TAM/CYCA1;2 est impliquée dans la transition méiose I – méiose II

Au cours de ce travail, nous avons étudié six mutants *tam* indépendants (3 T-DNA et 3 EMS). Ces six mutants sont des mutants nuls et présentent un défaut méiotique identique entre eux mais différent du défaut méiotique de *tam-1* (Magnard et al., 2001). Alors que chez une plante sauvage, la méiose mâle produit quatre spores qui se regroupent en tétrade, chez ces mutants *tam* on observe des diades. Ces diades vont devenir des grains de pollen viables. L'analyse du niveau de ploïdie des descendants de ces mutants montre que *tam* produit des gamètes diploïdes du côté mâle et femelle. Les rétrocroisements mâles et femelles ont permis de déterminer que *tam* produisait environ 90% de gamètes diploïdes du côté mâle et environ 30 % de gamètes diploïdes du côté femelle (les pourcentages varient légèrement en fonction des allèles). L'observation des chromosomes méiotiques chez *tam* a permis de mettre en évidence une méiose I comparable au sauvage. En revanche au cours de la méiose mâle, aucune seconde division n'a été observée. Ces résultats suggèrent que, comme chez un mutant *osd1*, l'absence de seconde division méiotique est à l'origine de la formation de gamètes mâles et femelles diploïdes chez un mutant *tam*. L'utilisation de marqueurs génétiques a permis de confirmer que chez les mutants *tam* la méiose se limite à une unique division réductionnelle.

TAM/CYCA1;2 est une protéine nécessaire à la transition méiose I –méiose II. Bien qu'on suppose une redondance fonctionnelle entre les 10 cyclines A d'*Arabidopsis* (Inzé and De Veylder, 2006), aucune n'est capable de compenser l'absence de TAM lors de la transition méiose I-méiose II.

- Comme *osd1*, *tam* permet de transformer la méiose en une division mitotique

Le phénotype du mutant *tam* étant très proche de celui du mutant *osd1*, nous avons reproduit le phénotype *MiMe* (*Mitosis instead of Meiosis* nommé ici *MiMe -2*). Ainsi en combinant les mutations *Atspo11*, *Atrec8* et *tam*, la méiose se déroule comme une mitose. Les 10 chromosomes d'*Arabidopsis* s'alignent sur la plaque métaphasique et les chromatides sœurs se séparent en anaphase, produisant ainsi deux gamètes diploïdes génétiquement identiques à la plante mère. Ce phénotype a été vérifié par cytologie et en utilisant le

système FTL. Le phénotype du mutant *tam* étant moins pénétrant que celui d'*osd1*, les plantes *MiMe-2* produisent légèrement plus de gamètes aneuploïdes que les plantes *MiMe*. Ainsi dans le cadre d'une application agronomique, l'utilisation de plantes *MiMe* serait plus intéressante que des plantes *MiMe-2*.

- **TAM et OSD1 ne sont pas redondants en méiose mâle**

Alors que les plantes *tam* et *osd1* sont fertiles, les plantes portant la double mutation produisent très peu de graines. L'analyse cytologique montre que le phénotype femelle du double mutant *osd1/tam* est identique au phénotype des simples mutants. Les étalements de chromosomes méiotiques montrent que chez un *osd1/tam*, la méiose mâle se limite à une prophase I. Les différents stades de la prophase ainsi que des chiasmata ont été observés, mais aucune méiose I ni méiose II.

En plus de leur rôle essentiel lors de la transition méiose I-méiose II, TAM et OSD1 sont donc impliquées dans la transition prophase I-méiose I. La méiose femelle est affectée différemment chez un mutant *tam* et chez un double mutant *osd1/tam*, suggérant un contrôle différent de la progression méiotique entre méiose mâle et méiose femelle.

2.2. Article 1 : " The CYCLIN-A CYCA1;2/TAM Is Required for the Meiosis I to Meiosis II Transition and Cooperates with OSD1 for the Prophase to First Meiotic Division Transition" PLoS Genetics 2010

The CYCLIN-A CYCA1;2/TAM is Required for the Meiosis I to Meiosis II Transition and Cooperates with OSD1 for the Prophase to First Meiotic Division Transition.

Isabelle d'Erfurth^{#,1}, Laurence Cromer^{#,1}, Sylvie Jolivet¹, Chloé Girard¹, Christine Horlow¹, Yujin Sun¹, Jennifer P.C. To², Luke E. Berchowitz², Gregory P. Copenhaver^{2,3} and Raphael Mercier^{1*}

These authors contributed equally to this work.

¹ Institut Jean-Pierre Bourgin, UMR1318 INRA-AgroParisTech, route de Saint-Cyr, 78026, Versailles. France

² Department of Biology and the Carolina Center for Genome Sciences, University of North Carolina at Chapel Hill, Chapel Hill, North Carolina 27599-3280, USA

³ Lineberger Comprehensive Cancer Center, University of North Carolina School of Medicine, Chapel Hill, North Carolina 27599-3280, USA

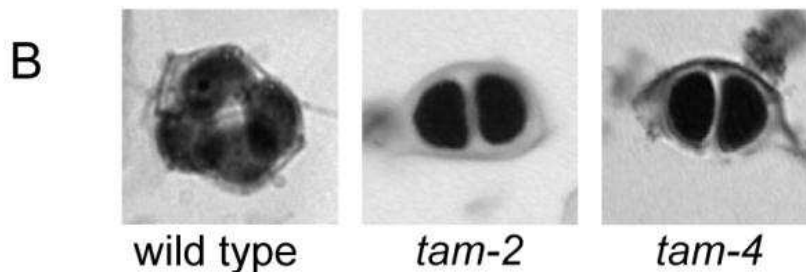
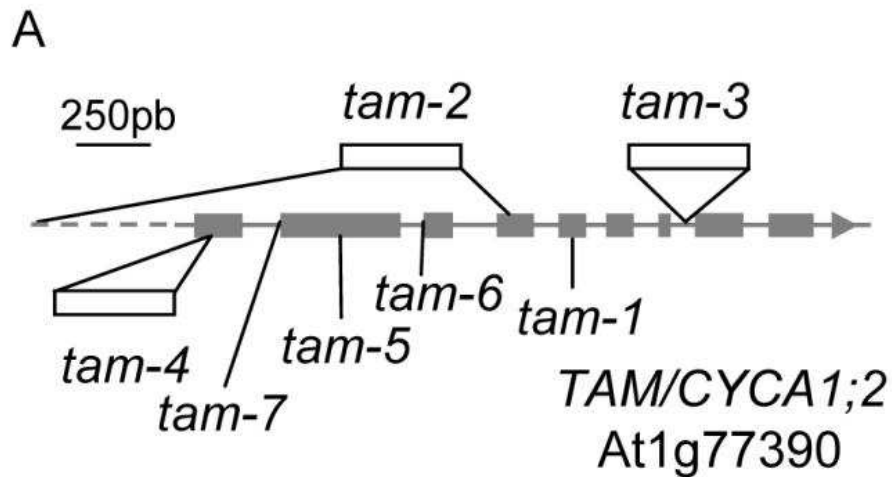
* Corresponding author: raphael.mercier@versailles.inra.fr

ABSTRACT

Meiosis halves the chromosome number because its two divisions follow a single round of DNA replication. This process involves two cell transitions, the transition from prophase to the first meiotic division (meiosis I) and the unique meiosis I to meiosis II transition. We show here that the A-type cyclin *CYCA1;2/TAM* plays a major role in both transitions in *Arabidopsis*. A series of *tam* mutants failed to enter meiosis II and thus produced diploid spores and functional diploid gametes. These diploid gametes had a recombined genotype produced through the single meiosis I division. In addition, by combining the *tam-2* mutation with *AtSpo11-1* and *Atrec8*, we obtained plants producing diploid gametes through a mitotic-like division that were genetically identical to their parents. Thus *tam* alleles displayed phenotypes very similar to that of the previously described *osd1* mutant. Combining *tam* and *osd1* mutations leads to a failure in the prophase to meiosis I transition during male meiosis and to the production of tetraploid spores and gametes. This suggests that TAM and OSD1 are involved in the control of both meiotic transitions.

AUTHOR SUMMARY

In the life cycle of sexual organisms, a specialized cell division—meiosis—reduces the number of chromosomes from two sets ($2n$, diploid) to one set (n , haploid), while fertilization restores the original chromosome number. Meiosis reduces ploidy because it consists of two divisions following a single DNA replication. In this study, we identified genes that control the entry into the first and the second meiotic division in the model plant *Arabidopsis thaliana*. Plants lacking the *CYCA1;2* gene execute a single division during meiosis producing functional diploid gametes and polyploid plants in the next generation. By combining this mutation with two others that affect key meiotic processes, we generated plants that produce diploid gametes through a mitotic-like division that are genetically identical to their parents. Furthermore, plants lacking *CYCA1;2* and another previously described gene (*OSD1*), undergo no divisions during male meiosis, producing tetraploid pollen grains.



Article 1-Figure 1 : The *tam* mutations

(A) The *CYCA1;2/TAM* gene contains nine exons. The positions of the three insertions in the *tam-2*, *tam-3* and *tam-4* mutants are indicated as are the three point mutations in *tam-5*, *tam-6* and *tam-7*. The *tam-2* insertion is accompanied by a deletion. (B) Male meiotic products stained with toluidine blue: a tetrad from the wild-type and dyads from the *tam-2* and *tam-4* mutants

INTRODUCTION

Meiosis is a central feature in the reproductive program of all sexually reproducing eukaryotes. The process of meiosis involves two rounds of chromosome segregation that follow a single round of chromosome duplication leading to the production of haploid gametes. Meiosis differs from mitosis, somatic cell division, in a number of ways. In meiosis:

- (i) Homologous chromosomes pair and closely associate along a proteinaceous structure called the synaptonemal complex (SC). This process culminates at a substage of prophase called pachytene.
- (ii) Crossovers occur between homologs during prophase.
- (iii) Homologous chromosomes separate at anaphase of the first division. To ensure accurate chromosome segregation at anaphase I each homolog must remain connected to the other through metaphase I. Since the SC disappears before the end of prophase, it cannot ensure linkage of homologs at metaphase I. This connection is maintained until anaphase I by chiasmata, the cytological manifestation of crossovers.
- (iv) Meiosis has a second division with no intervening DNA synthesis. Sister chromatids, resulting from the meiotic S phase, remain associated until metaphase II and are separated from each other at anaphase II, leading to the production of four haploid spores (Zickler and Kleckner, 1999; Gerton and Hawley, 2005).

To generate haploid spores the meiocyte must enter meiosis I, pass through the meiosis I to meiosis II transition and exit meiosis II. Errors in these transitions, are not uncommon and may lead to parthenogenesis or teratoma formation, or to the production of gametes with the somatic number of chromosomes ($2n$ gametes) (Hashimoto et al., 1994; Bretagnolle and Thompson, 1995). The formation of $2n$ gametes is thought to be an important mechanism for generating polyploids. Polyploidy has played a key role in the evolution of many fungal, plant, invertebrate and vertebrate lineages, and is particularly frequent in plants (Otto and Whitton, 2000; Otto, 2007). $2n$ gametes are also an important tool for plant breeding (Ramanna and Jacobsen, 2003).

Cyclins and cyclin-dependent kinases (Cdk) form complexes that are essential for progression through both the mitotic and meiotic cell cycles. The transition from meiosis I to meiosis II requires a fine balance in Cyclin–Cdk activity: it must be sufficiently low to exit meiosis I but must nonetheless be maintained at a level sufficiently high to suppress DNA replication and promote entry into meiosis II (Marston and Amon, 2004; Pesin and Orr-Weaver, 2008). Precisely how the mitotic machinery is modified for the purpose of meiosis is not fully understood. Most of the knowledge currently available originates from studies carried out in unicellular fungi, *Xenopus laevis* or mouse oocyte systems.

In oocytes, entry into both meiosis I and meiosis II is driven by Cdc2/Cyclin B complexes (the molecular components of the maturation promoting factor, MPF) (Jones, 2004). The rate of Cyclin B synthesis and degradation by the APC (anaphase promoting complex) determines

	<i>tam-2</i>	<i>tam-3</i>	<i>tam-4</i>	<i>tam-5</i>	<i>tam-6</i>	<i>tam-7</i>
frequency of dyads	89%	87%	84%	62%	70.1	82%
Tetrads	0.3%	0.4%	5%	1.1%	1.9	15%
Triads and unbalanced products	11%	13%	11%	26%	28%	3%
number of meiotic products	224	251	182	860	755	66

Article1 - Table 1 : Male meiotic products in *tam* mutants.

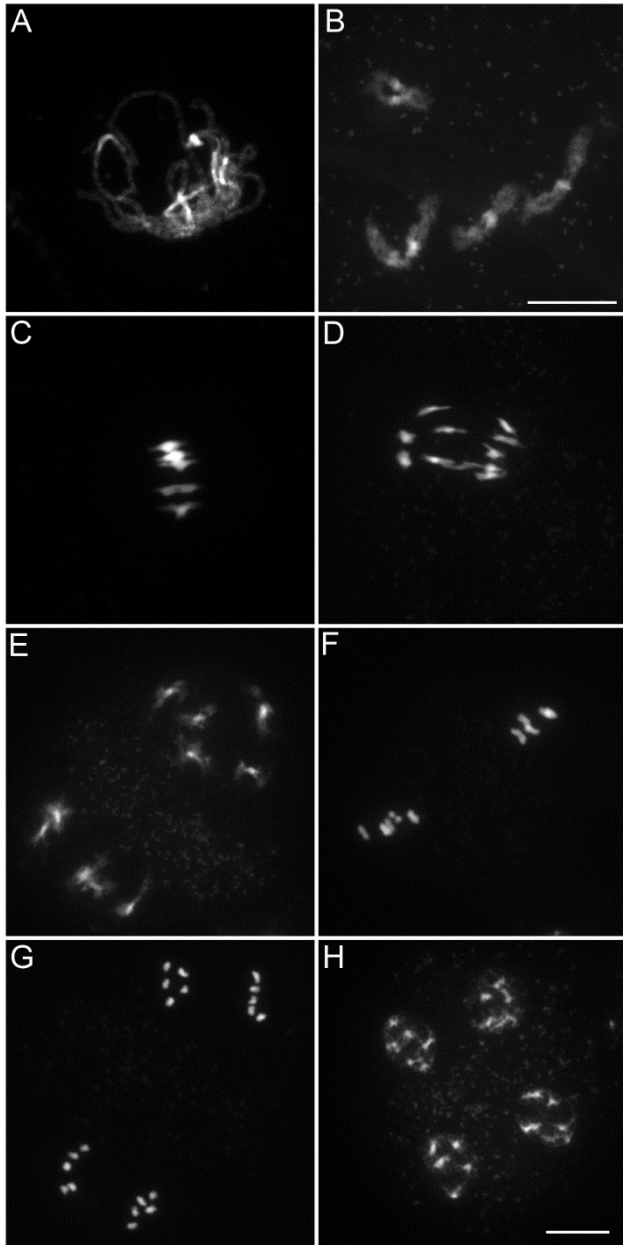
		<i>tam-2</i>	<i>tam-4</i>	<i>tam-2/</i> <i>osd1-1</i>	<i>MiMe-2</i>	
selfed progenies	2N	2%	7%			
	3N	58%	67%	8%		
	4N	40%	25%	60%	85%	
	6N frequency			32%		
aneuploid frequency					15%	
number of plants		64	27	132	20	
wt♀ x mutant ♂	2N frequency	5%	12%	-	10%	
	3N frequency	95%	88%	-	83%	
	aneuploid frequency				-	7%
	number of plants		85	25	-	45
mutant♀ x wt♂	2N frequency	61%	75%	1%	-	
	3N frequency	39%	25%	99%	89%	
	aneuploid frequency					11%
	number of plants		61	16	73	45

Article1 - Table 2 : Ploidy of *tam*, *tam/osd1*, and *MiMe-2* progenies.

the timing of the transitions occurring during meiosis (Ledan et al., 2001; Jones, 2004). At the end of meiosis I, Cyclin B is only partially degraded (Kobayashi et al., 1991) and the residual, low level of Cdc2/CyclinB activity is essential for entry into meiosis II (Iwabuchi et al., 2000). This partial Cyclin B degradation is fine-tuned by the Erp1/Emi2 APC inhibitor (Madgwick et al., 2006; Ohe et al., 2007; Tang et al., 2008a). In *Schizosaccharomyces pombe*, Mes1 is a key player in the meiosis I to meiosis II transition. Like Erp1/Emi2, the Mes1 protein partially inhibits cyclin degradation by the anaphase promoting complex (APC), thereby allowing entry into meiosis II (Izawa et al., 2005; Kimata et al., 2008). In *Saccharomyces cerevisiae*, the simultaneous deletion of two of the six B-type cyclins results in a single reductional division during meiosis, with the production of two-spored asci (dyads), suggesting that specialist cyclins may be responsible for mediating the meiosis I to meiosis II transition (Dahmann and Futcher, 1995; Carlile and Amon, 2008; Kiburz et al., 2008).

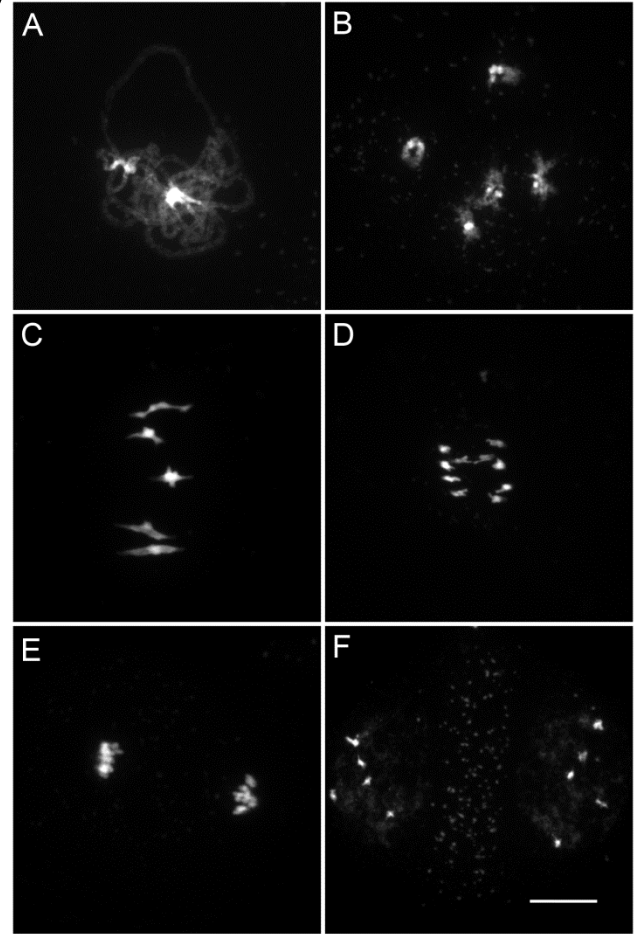
Very little is known about control of the meiotic cell cycle in plants. In maize, the *elongate* mutant produces diploid female gametes because it is unable to undergo female meiosis II, but the corresponding gene has not been identified (Barrell and Grossniklaus, 2005). The only gene involved in the meiosis I to meiosis II transition isolated to date is the *Arabidopsis OSD1 (OMISSION OF SECOND DIVISION)* gene, the molecular function of which remains unknown. As *osd1* mutants fail to enter the second division in both male and female meiosis, functional 2n gametes and tetraploid progeny are produced (d'Erfurth et al., 2009). To look for other regulators of meiotic progression, we focused our attention on cyclins. The *Arabidopsis thaliana* genome contains 10 A-type and 11 B-type cyclins but functions in the cell cycle have been identified for only a few of these molecules, probably because redundancy attenuates the effects of mutations in single cyclin genes (Wang et al., 2004a; Inzé and De Veylder, 2006). A noticeable exception to this rule is *CYCA1;2*, also known as *TAM (TARDY ASYNCHRONOUS MEIOSIS)*. In the *tam-1* mutant, a single substitution of an amino acid (Thr283-Ile) slows cell cycle progression during male meiosis (Magnard et al., 2001; Wang et al., 2004b). Here, we revisit the function of *CYCA1;2/TAM* by isolating a series of alleles, including null alleles, and show that *CYCA1;2/TAM* is crucial for the meiosis I to meiosis II transition. The *tam* mutants fail to enter meiosis II, leading to the production of dyads of spores and diploid gametes that have experienced genetic exchange. This demonstrates that the meiosis I to meiosis II transition in plants involves a non redundant Cyclin-cdk activity. Furthermore, combining *tam* and *osd1* mutations leads to a failure of the transition from prophase to the first meiotic division (meiosis I) during male meiosis and to the production of single-spore meiotic products and tetraploid pollen grains. This shows that *CYCA1;2/TAM* and *OSD1* are also involved in the prophase to meiosis I transition. The implications of these results for the control of meiotic transitions are discussed.

In addition, taking advantage of a genetic strategy we used previously to investigate *OSD1* function (d'Erfurth et al., 2009), we combined *tam* mutants with mutations that affect homologous recombination (*Atspo11-1*) and chromosome segregation (*Atrec8*), essentially converting meiosis into a mitotic-like division. The *tam/Atspo11-1/Atrec8* line, called *MiMe-*



Article1 - Figure 2: Male meiosis in wild type

Micrographs of *Arabidopsis* chromosome spreads stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at (A) Pachytene; (B) Diakinesis; (C) Metaphase I; (D) Anaphase I; (E) Telophase I; (F) Metaphase II; (G) Anaphase II; and (H) Telophase II. Scale bar= 10 μm



Article1 - Figure 3: Male meiosis in the *tam-2* mutant.

Micrographs of DAPI stained *Arabidopsis* chromosomes show that *tam-2* Meiosis I including (A) Pachytene; (B) Diakinesis; (C) Metaphase I; (D, E) Anaphase I; and (F) Telophase I is indistinguishable from the wild type but no figures characteristic of a second division were observed. I. Scale bar= 10 μm

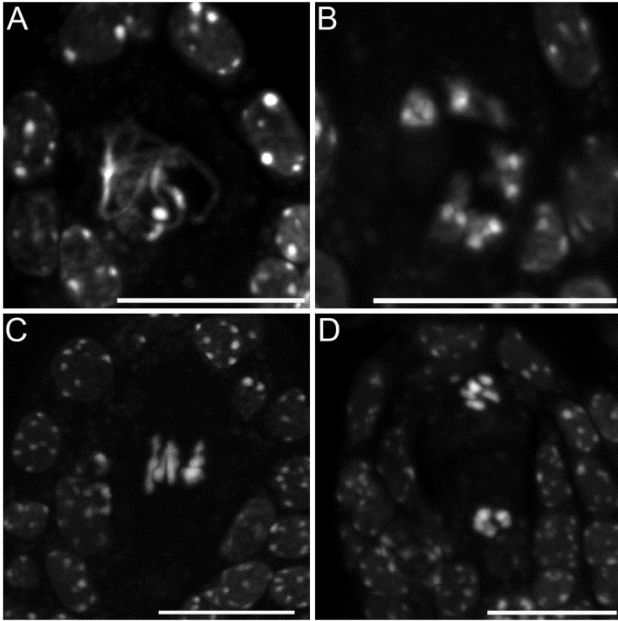
2, produces diploid gametes that are genetically identical to their parents, mimicking apomeiosis, a key element of apomixis or asexual reproduction through seeds. However, *MiMe-2* also resulted in the production of diploid and aneuploid gametes, probably due to the lower penetrance of *tam* mutations compared to *osd1* mutations

RESULTS

The *tam* Mutants Produce Diploid Gametes

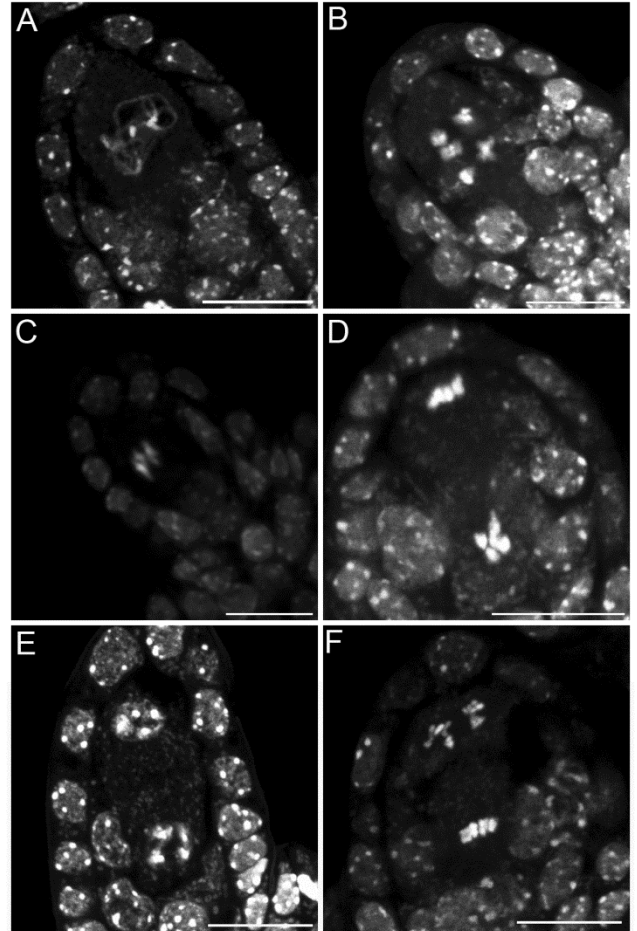
The *Arabidopsis* *TAM* (Tardy Asynchronous Meiosis) gene has been implicated in the control of meiotic progression (Magnard et al., 2001; Wang et al., 2004b). The *tam-1* mutant displays slower cell cycle progression during male meiosis, although it does eventually, like wild type, produce tetrads. However, previous to this study, only one mutant allele with a point mutation leading to a single amino-acid substitution in the protein had been studied. As this point mutation is temperature-sensitive and probably corresponds to a hypomorphic allele, we revisited the role of the *TAM* gene by isolating and characterizing three independent insertion mutants from public mutant collections and three additional point mutations (Figure 1A and FigureS1). The *tam-2* (sail_505_C06 (Scholl et al., 2000; Sessions et al., 2002)) T-DNA insertion is in the fourth exon (ATG + 1130pb) and is accompanied by a large deletion (corresponding to half of the *TAM* coding sequence, the entire *TAM* promoter region and the first 52 bp of the next gene, At1g77400), the *tam-3* (SALK_080686 (Alonso et al., 2003)) T-DNA insertion is in the seventh intron (ATG + 1690 bp) and the *tam-4* (CSHL_ET12273 (Sundaresan et al., 1995)) Ds insertion is in the first exon (ATG + 62 bp). The *tam-2* and *tam-3* mutations are in the *Columbia* (Col-0) background, whereas the *tam-4* mutation is in the *Landsberg erecta* (Ler) background (Figure 1A). Additionally, three point mutations were isolated in an ethyl methanesulfonate (EMS) chemical mutagenesis screen. The *tam-5* mutation is a G to A transition at nucleotide 378 in the coding sequence that creates a stop codon (TGG → TAG; Trp77 → stop). The *tam-6* mutation is also a G to A transition at the -1 position of the 3' splice site between intron 2 and exon 3. The *tam-5* and *tam-6* alleles are both recessive and do not complement one another. The *tam-7* mutation is a G to A transition at position -4 of the 3' splice site between intron 1 and exon 2. Similar splice site proximal mutations have been observed in other *Arabidopsis* mutants including *det1-1* and *det1-3* (Brown, 1996). The *tam-7* allele is dominant and thus could not be used for genetic complementation of the other *tam* alleles. All three EMS *tam* alleles are in the *Columbia* (Col-0) background. The T-DNA alleles were used preferentially for detailed analysis.

The *tam* mutants displayed no defects during somatic development. In *Arabidopsis*, male meiosis produces a group of four spores, organized in a tetrahedron, called a tetrad (Figure 1B). Each spore gives rise to a pollen grain. In these six independent *tam* mutants, the products of male meiosis were mostly dyads of spores instead of tetrads (Figure 1B and Table 1). In addition to balanced dyads the stronger mutants also produced triads and unbalanced products together with a very small number of tetrads. Complementation tests with *tam-2*,



Article 1 - Figure 4 : Female meiosis in wild type.

Micrographs of DAPI stained *Arabidopsis* chromosomes during (A) Pachytene; (B) Diakinesis; (C) Metaphase I; and (D) Anaphase I. Scale bar= 10 μ m



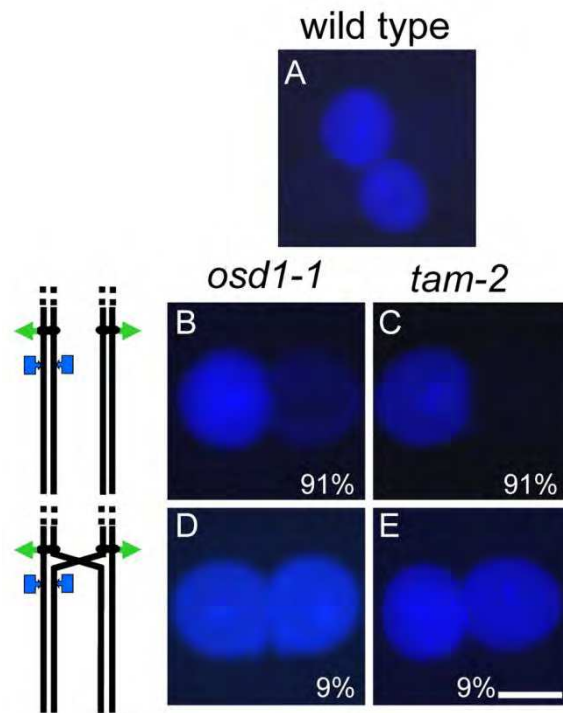
Article 1 - Figure 5 : Female meiosis in the *tam-2* mutant

Micrographs of DAPI stained *Arabidopsis* chromosomes in *tam-2* show that both meiosis I (A) Pachytene; (B) Diakinesis with five bivalents; (C) Metaphase I; (D) Anaphase I; (E) Telophase I and meiosis II (F) Metaphase II and anaphase II were indistinguishable from wild type. Scale bar= 10 μ m

tam-3 and *tam-4* mutants confirmed that these mutations were allelic. Unlike the previously described temperature sensitive *tam-1* mutant, these six mutants expressed the dyad phenotype at normal growing temperatures (20°C). Furthermore, the dyad stage in *tam-1* does not appear to be terminal, as meiosis always progresses to tetrad production [27], whereas the *tam-2*, *tam-3*, *tam-4*, *tam-5*, *tam-6* and *tam-7* systematically produced mostly dyads. This suggests that the *tam-1* mutant presents only a delay in the progression of meiosis, whereas the other mutants do not progress beyond the dyad stage (as confirmed by pollen analysis, see below). This phenotype is reminiscent of the phenotype of the *osd1* mutant, which produces spores directly after meiosis I. Its gametes are thus diploid and its offspring polyploid. Thus, we determined ploidy levels among the offspring of diploid *tam-2* and *tam-4* mutants. In the progeny of selfed homozygous mutants, we observed tetraploids, triploids, and occasionally diploid plants (Table 2). If pollen from *tam-2* or *tam-4* mutant plants was used to fertilize a wild-type plant, almost all the resulting progeny were triploid, with only a few diploid plants identified (Table 2). If *tam-2* or *tam-4* mutant ovules were fertilized with wild-type pollen grains we isolated diploid and triploid plants (Table 2). Thus, the frequency of diploid spores, resulting in functional gametes, was high in the *tam-2* and *tam-4* mutants, for both the male (~90%) and female (~30%) lineages. *Tam* mutants produced only slightly fewer seeds than the corresponding wild-type lines (36±4 seeds/silique in *tam-2*; 42±4 in wild type Col-0; 43±4 in *tam-4*; 52±3 in wild type Ler), but many (>50%) of the seeds produced by *tam-2* mutants and a few (<10%) of those produced by *tam-4* mutants were shriveled. This finding was not unexpected, because *tam* mutants produce triploid seeds with an excess of the paternal genome that is associated with the production of shriveled seed, particularly in the Col-0 background (Dilkes et al., 2008). The germination rate of seeds produced by *tam-2* was 63% (n= 264), suggesting that the proportion of triploid seeds may be underestimated in *tam-2* progeny.

The *tam* Mutants Skip the Second Division of Meiosis

We characterized the mechanisms underlying dyad production in *tam* mutants, by investigating chromosome behavior during male meiosis using a meiocyte spreading technique (Figure 2 and 3). In wild type, the ten chromosomes appeared as threads at leptotene, underwent synapsis at zygotene and were fully synapsed, along the SC at pachytene (Figure 2A). After the disappearance of the SC at diplotene the resulting five bivalents condensed, revealing the presence of chiasmata (Figure 2B). The bivalents organized on the metaphase I plate (Figure 2C) and homologs segregated to opposite poles at anaphase I (Figure 2D and 2E). The two sets of five homologs aligned on the two metaphase II plates (Figure 2F). The second round of segregation at anaphase II (Figure 2G) led to the formation of four sets of five chromosomes, that decondensed to form the spore nuclei (Figure 2H). Meiosis I in *tam* mutants was indistinguishable from that in the wild type. All stages of prophase were observed, including full synapsis at pachytene (Figure 3A) and chiasmata at diakinesis (Figure 3B). The bivalents observed at diakinesis, condensed and aligned on the metaphase plate (Figure 3C). We quantified the chiasma frequency by



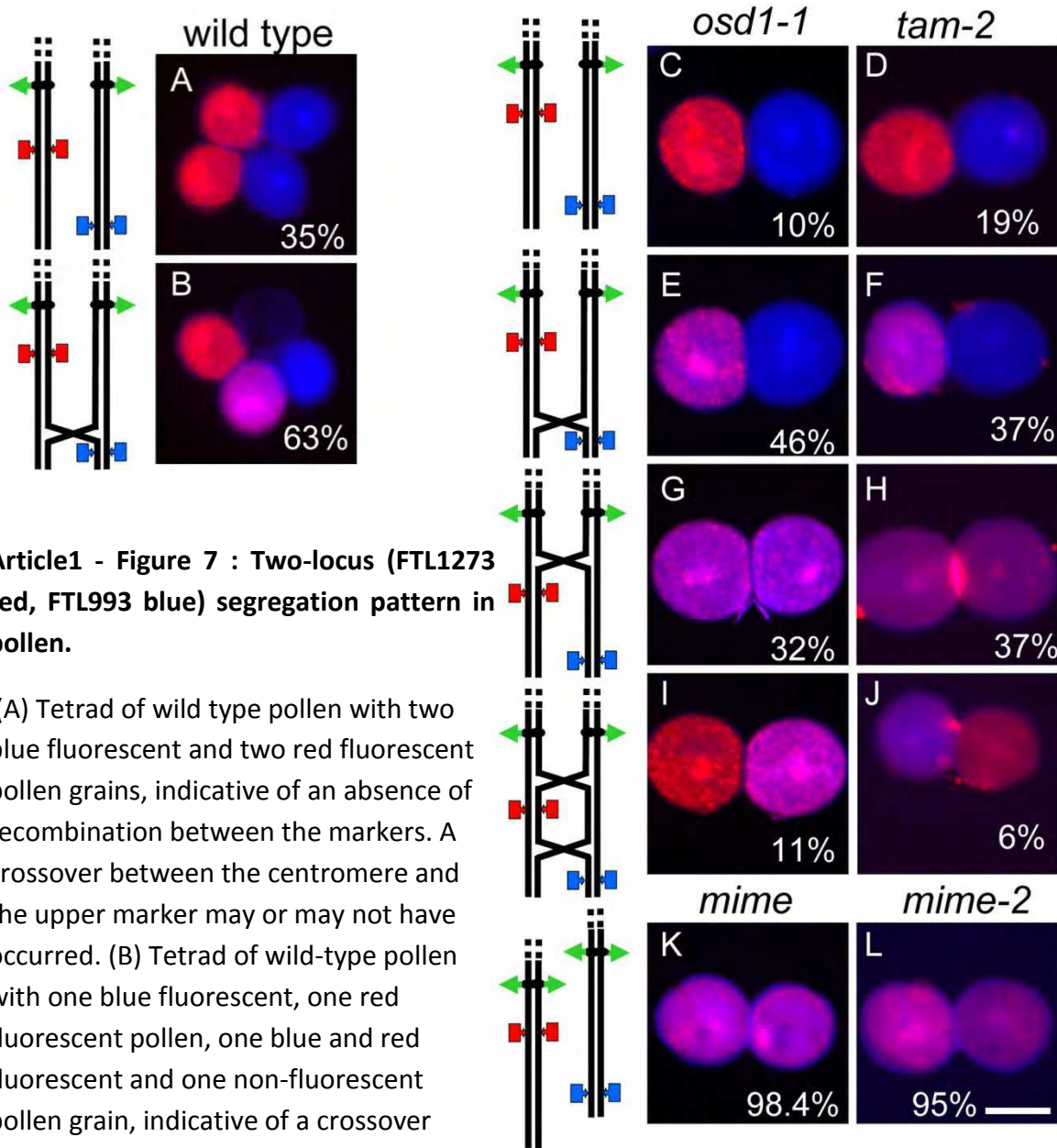
Article1 - Figure 6 : Single-locus (FTL3253) segregation patterns in pollen.

A tetrad of wild-type (*qrt1-2* background) pollen (A) from a plant that was hemizygous for a transgene encoding a cyan fluorescent protein has two fluorescent and two non-fluorescent pollen grains. Dyads of pollen (B and C) from the *osd1-1* and *tam-2* mutants, respectively, having one fluorescent and one non-fluorescent pollen grain in each case. Dyads (D and E) from the *osd1-1* and *tam-2* mutants, respectively, each showing two fluorescent pollen grains (*osd1* n=173, *tam* n=214). Interpretations, of chromosome segregation and crossover position, are shown on the left. Scale bar=20 μ m.

studying the shape of metaphase I bivalents, as described by (Sanchez Moran et al., 2001; Mercier et al., 2005), and found no difference between *tam-2* (9 ± 0.8 chiasmata per cell, $n=70$) and the wild type (9.1 ± 1 chiasmata per cell, $n=53$). The bivalents segregated at anaphase I and decondensed at telophase I (Figure 3D to 3F). However, we found no meiosis II figures (among >1000 male meiocytes for each *tam-2*, *tam-3* and *tam-4*, from prophase to spore formation), consistent with the dyad production in *tam* mutants resulting from the absence of a second meiotic division. Both typical meiosis I and meiosis II figures were observed during female meiosis (Compare Figure 4 and Figure 5), consistent with the observed production of $\sim 70\%$ haploid female gametes in *tam* mutants and the notion that female diploid megaspores are also produced by skipping the second meiotic division.

If diploid gametes are indeed generated by skipping the second meiotic division, any parental heterozygosity at centromeres should be lost in the *tam* diploid gametes, because sister centromeres cosegregate at division I. Conversely, we would also expect heterozygosity to increase towards telomeres, due to recombination between the locus concerned and the centromere. We tested this hypothesis in two ways, using the fluorescent tagged line (FTL) *Arabidopsis* tetrads system providing direct information about the genetic content of pollen grains (Figures 6 to 8) and by genotyping male and female *tam-2* triploid offspring for polymorphic molecular markers (Figure 8) (Berchowitz and Copenhaver, 2008; d'Erfurth et al., 2008, 2009).

The FTL system is a visual assay based on the use of reporter constructs encoding fluorescent proteins produced in the pollen of the *quartet* mutant (*qrt1-2*) (Preuss et al., 1994). In this mutant, the pollen grains from each meiosis remain physically attached. We carried out crosses to generate plants with both the *qrt1-2* and *tam-2* mutations, heterozygous for one or two reporter transgenes conferring pollen fluorescence. As controls, we used both wild type and *osd1* mutant plants. We first used an FTL transgene located close to the centromere on chromosome 5 (FTL3253 encoding AmCyan) (Francis et al., 2007). In wild-type (*qrt1-2* background) control plants, all tetrads consisted of two fluorescent and two non-fluorescent pollen grains (Figure 6A), reflecting the segregation of the four chromatids, two of which carried the transgene ($n=120$). In the *osd1-1* and *tam-2* mutants, we observed mostly dyads of pollen (Figure 6B to 6E). Furthermore, in both mutants, the vast majority of dyads (91%, $n=526$ and $n=738$, in *osd1-1* and *tam-2* respectively) consisted of one fluorescent pollen grain and one non-fluorescent pollen grain (Figure 6B and 6C). Thus, in these dyads, one of the pollen grains contained the two sister chromatids carrying the transgene, whereas the other pollen grain inherited the other two sister chromatids. This segregation pattern is fully consistent with the absence of a second meiotic division. In a small proportion of dyads (9% in both *osd1-1* and *tam-2* mutants) both pollen grains were fluorescent, indicating recombination between the transgene and the centromere (Figure 6D and 6E). We then carried out the same experiment with two linked FTL transgenes located at some distance from the centromere on chromosome 5 (FTL1273 DsRed2, FTL993 ECFP) (Francis et al., 2007). In the wild type (*qrt1-2* background), we observed tetrads without (Figure 7A) and with (Figure 7B) recombination of the markers as



Article1 - Figure 7 : Two-locus (FTL1273 red, FTL993 blue) segregation pattern in pollen.

(A) Tetrad of wild type pollen with two blue fluorescent and two red fluorescent pollen grains, indicative of an absence of recombination between the markers. A crossover between the centromere and the upper marker may or may not have occurred. (B) Tetrad of wild-type pollen with one blue fluorescent, one red fluorescent pollen, one blue and red fluorescent and one non-fluorescent pollen grain, indicative of a crossover between the two markers.

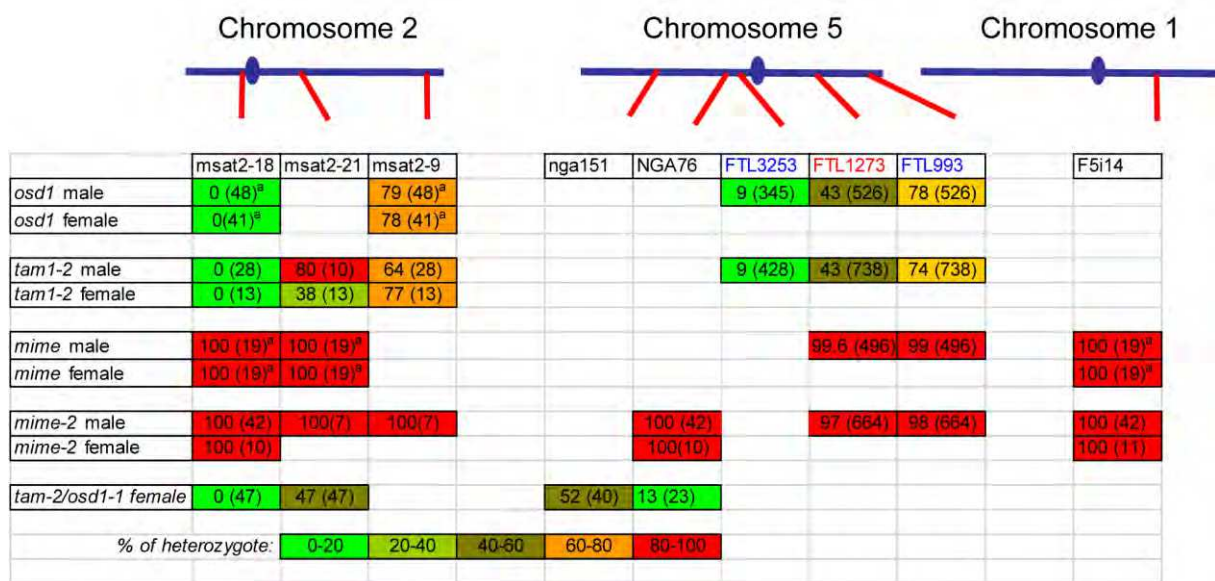
(C and D) Dyads of pollen from the *osd1-1* and *tam-2* mutants, respectively, each with one blue fluorescent and one red fluorescent pollen grain. (E and F) Dyads from *osd1-1* and *tam-2* mutants, respectively, each with one blue and red fluorescent pollen grain and one blue fluorescent pollen grains. (G and H) Dyads from *osd1-1* and *tam-2* mutants, respectively, each with two blue and red fluorescent pollen grain. (I and J) Dyad in *osd1-1* and *tam-2*, respectively, with one blue and red fluorescent pollen grain and one red fluorescent pollen grain. (K and L) Dyads from *MiMe-1* and *MiMe-2* plants, respectively, each with two blue and red fluorescent pollen grains. Interpretations of chromosome segregation and crossover position, are shown on the left. (wild type n=266, *osd1* n=263, *tam* n=369). Rare cases indicative of multiple crossovers are not shown. Scale bar=20 μ m.

described in a previous study (Berchowitz and Copenhaver, 2008). The frequency of recombination between the two markers, measured as the percentage of non-parental chromatids deduced from the fluorescence distribution, was 32%. In both the *osd1-1* and *tam-2* mutants, we observed segregation patterns in the dyads reflecting crossing over between the two markers (29% (n=262) and 22% (n=367), respectively) and between the markers and the centromere (22% and 22%, respectively) (Figure 7C to 7J). The frequency of heterozygosity at the FTL marker loci in diploid pollen grains was determined (Figure 8). The frequency of heterozygosity was low next to the centromere and increased with distance from the centromere. All these findings are consistent with the *tam* and *osd1* diploid pollen grains resulting from a single first division of meiosis that includes recombination, with no second division (d'Erfurth et al., 2009).

For confirmation of this genetic analysis, we genotyped triploid offspring generated from male and female gametes from the *tam-2* mutant. We first introduced genetic polymorphisms into *tam-2* (Col-0 background) by crossing this mutant to the No-0 accession. In the F2 generation, we used PCR to select plants homozygous for the *tam-2* mutation but heterozygous for a series of microsatellite markers. These plants were crossed, as male or female parents, with plants from a third genetic background (*Landsberg erecta*, Ler). Genotyping of the resultant triploid progeny for the trimorphic molecular markers revealed the genetic make-up of the 2n gametes produced by the mutant. The Ler allele was present in all the plants (brought by the wild type Ler haploid gamete), while the presence/absence of the Col-0/No-0 allele in the triploids corresponds to the genotype of the 2N mutant gametes. All the diploid gametes tested had the predicted genetic characteristics, similar to those of the diploid gametes produced by the *osd1* mutant (Figure 8). The markers were homozygous at the centromere, but displayed segregation at other loci, due to recombination. These results confirmed that the absence of a second meiotic division was indeed responsible for the production of both male and female 2n gametes in *tam-2*.

Turning Meiosis into Mitosis

Our *tam* alleles displayed phenotypes very similar to that of the *osd1* mutant, with no second meiotic division, leading to the production of viable diploid male and female gametes. Thus, *tam* diploid gametes differ from apomeiotic (mitosis-like) gametes in that they are genetically different from the mother plant (Bicknell and Koltunow, 2004; Spillane et al., 2004). We have previously shown that, by combining the *osd1* mutation with the *Atspo11-1* mutant, which eliminates recombination, and the *Atrec8* mutation, which modifies chromatid segregation, it is possible to convert meiosis into a mitosis-like division (apomeiosis). We called this triple mutant *MiMe* for "mitosis instead of meiosis" (d'Erfurth et al., 2009). We investigated whether *tam* mutation could replace the *osd1* mutation to convert meiosis into mitosis, by constructing the *tam-2/Atspo11-1/Atrec8* triple mutant, which we named *MiMe-2*. During male meiosis, *MiMe-2* plants mostly generated dyads (91.2% 446/489), with only a small number of unbalanced products. Observations of chromosome behavior during male and female meiosis showed that the division process



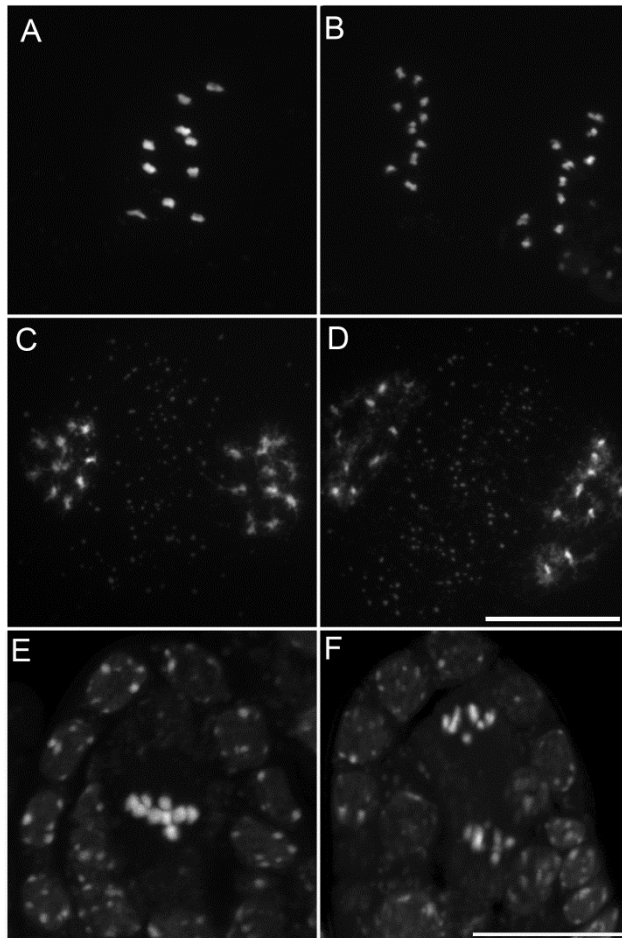
Article1 - Figure 8 : Genetic make-up of the *osd1*, *tam*, *tam/osd1*, *MiMe* and *MiMe-2* male and female diploid gametes.

Genotype of pollen grains, for the FTL loci (Figure 6 and 7). In addition triploid offspring from mutant x wild-type crosses were genotyped for several molecular markers. The percentage of heterozygous gametes was determined (n is indicated into brackets). The frequency of heterozygosity is indicated by a color code, from 0% (green) to 100% (red). The positions of each marker (red) and the centromeres (blue) are indicated on the chromosomes. ^a data from (d'Erfurth et al., 2009)

resembled mitosis: 10 univalents aligned on the metaphase plate, with the separation of sister chromatids at anaphase (Figure 9). The selfed progeny of *MiMe-2* plants was mostly tetraploid, with some aneuploids (Table 2). Backcrossing *MiMe-2* plants, as the female parent, onto wild-type plants resulted mostly in triploids with a few aneuploid plants (Table 2), whereas backcrossing *MiMe* plants, as the male parent, onto the wild type, generated a mixture of mostly triploid plants, diploid and aneuploid plants (Table 2). Thus, the mitosis-like division observed in *MiMe-2* plants gives rise to functional diploid gametes, together with small numbers of haploid and aneuploid gametes, in both the male and female lineages. *MiMe-2* plants also displayed lower levels of fertility than either the wild-type or the *tam-2* mutant (wild type: 42 ± 4 seeds/fruit; *tam-2*: 37 ± 4 , *MiMe2*: 20 ± 3). This finding was not unexpected, as the *tam* mutation does not display full penetrance. In meiocytes lacking *Atrec8* and *Atspo11* that undergo a second division, this division is unbalanced, probably leading to the production of aneuploid gametes in *MiMe-2* plants (Chelysheva et al., 2005). We analyzed the genetic content of the *MiMe-2* diploid gametes, using both the FTL lines and molecular markers (Figure 7K, 7L and 8). We introduced the same FTL transgenes as described above (FTL1273 DsRed2, FTL993 ECFP) into *MiMe* and *MiMe-2* plants. Almost all the pollen grains of both genotypes displayed both types of fluorescence (Figure 7K and 7L; 98% and 95%, respectively), indicating that they had inherited both transgenes, and confirming the occurrence of a mitosis-like division, rather than meiosis, in both lines. The few cases in which the two pollen grains were not expressing both fluorescent proteins may be explained by chromosome missegregation or occasional extinction of the transgenes. In addition, all the diploid *MiMe-2* gametes (male and female) systematically retained heterozygosity for each genetic marker tested (Figure 8). They were thus genetically identical to the mother plant. These results confirm that *MiMe-2* plants undergo a mitosis-like division instead of a normal meiotic division, generating gametes genetically identical to the parent plant, but at a lower regularity than *MiMe* plants (d'Erfurth et al., 2009).

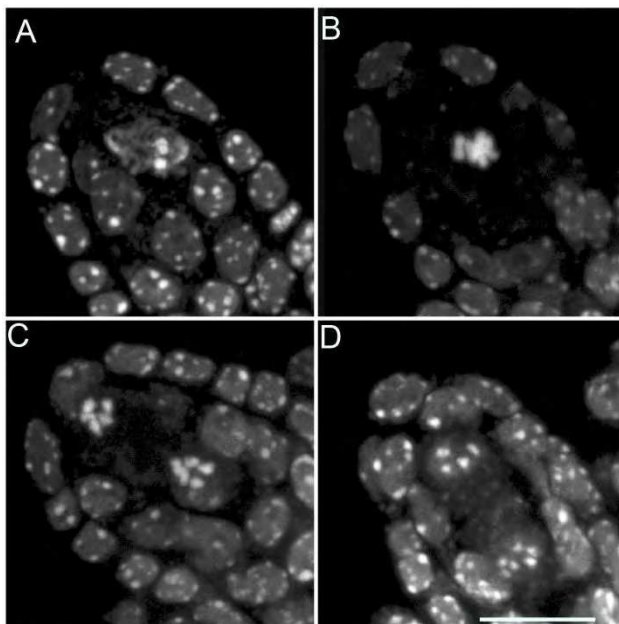
***tam/osd1* double mutant skip division II at female meiosis and skip both divisions at male meiosis**

Our *tam* alleles displayed phenotypes very similar to that of the *osd1* mutant, with no second meiotic division, leading to the production of viable diploid male and female gametes. We then combined *tam-2* and *osd1-1* mutations. The double mutant was almost sterile, producing very few seeds by selfing. Reciprocal crosses with wild type revealed that *tam-2/osd1-1* double mutant was female fertile but male sterile. If *tam-2/osd1-1* mutant ovules were fertilized with wild-type pollen grains we isolated almost exclusively triploid plants (Table 2). Observation of female meiosis in the double mutant revealed normal meiosis I but an absence of meiosis II (Figure 10). The genetic analysis of the female gametes, performed as above, showed that all the diploid ovules tested had the predicted genetic characteristics for an absence of second meiotic division (Figure 8). These results show that *tam-2/osd1-1* double mutants display the same female meiosis phenotype as



Article1 - Figure 9 : Mitosis-like division instead of meiosis, in *MiMe-2* plants.

(A to D) Male Meiosis. (A) Metaphase I. (B) Anaphase I. (C and D) Telophase I. (E to F) Female meiosis. (E) Metaphase I. (F) Anaphase I. Scale bar=10 μ m.



Article1 - Figure 10 : Female meiosis in the *tam-2/osd1-1* double mutant

Meiosis I is indistinguishable from the wild type but no figures characteristic of a second division were observed. (A) Pachytene. (B) Metaphase I. (C) Anaphase I. (D) Telophase I. Scale bar=10 μ m

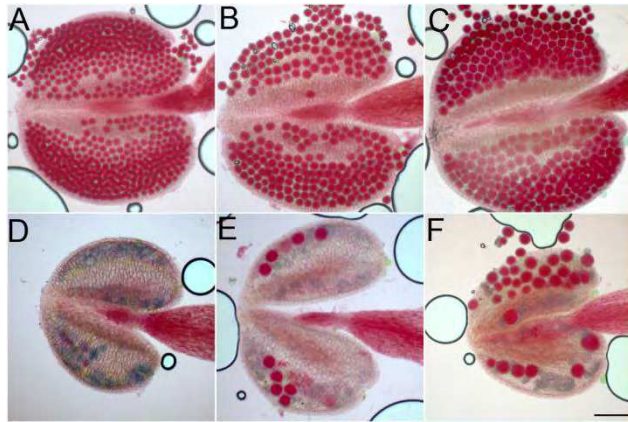
single mutants, with female meiocytes failing to enter meiosis II, leading to the production of 2n ovules.

We investigated the origin of the male sterility phenotype observed in *tam-2/osd1-1* double mutant plants, by assessing pollen viability (Alexander, 1969). Figure 11A shows a wild-type anther treated with Alexander stain which produces a red pigment in viable pollen. Anthers of *tam-2* and *osd1-1* single mutants contained viable pollen grains, although less numerous and slightly bigger than wild type (Figure 11B and 11C). In contrast, *tam-2/osd1-1* anther contained very few pollen grains (9 ± 11) with variable size (Figure 11D to 11F). In wild type, meiosis produces four spores (Figure 12A), whereas both *tam* and *osd1* mutants produce dyads of spores (Figure 12B and 12C). In contrast, observation of male meiotic products in *tam-2/osd1-1* revealed only “monads”, with a single-spore product (Figure 12D, n= 498). We then investigated the behavior of male meiotic chromosomes in *tam-2/osd1-1* mutants (Figure 13). Prophase was indistinguishable from wild type: the ten chromosomes appeared as threads at leptotene, underwent synapsis at zygotene and were fully synapsed at pachytene. After the disappearance of the SC at diplotene, the resulting five bivalents condensed, revealing the presence of chiasmata. However, we observed spores with a single nucleus (Figure 13 E and 13F), consistent with the observation of monads. Furthermore, only two figures typical of metaphase/anaphase I and no figures of telophase I or meiosis II were found among >1600 meiocytes. This suggests that most male meiocytes skip both meiosis I and II and produce spores directly after replication and prophase, without chromosome segregation. An expected consequence of such a defect is the production of 4n pollen grains. We did not succeed in crossing *tam-2/osd1-1* mutants as male but we determined ploidy levels among the seeds produced by selfing and found a large proportion of 6n plants in the progeny of 2n plants (Table 2). As crosses with wild type showed that *tam-2/osd1-1* produce 2n ovules, the occurrence of 6n plants strongly suggests that 4n pollen grains are produced, in accordance with the skipping of both rounds of segregation at male meiosis in *tam-2/osd1-1*. A large proportion of 4n plants is also found in the selfed progeny showing that *tam-2/osd1-1* also produces 2n pollen grains. These 2n pollen grains likely originate from the few meiocytes that enter meiosis I and produces 2n spores, that later outcompete 4n pollen.

DISCUSSION

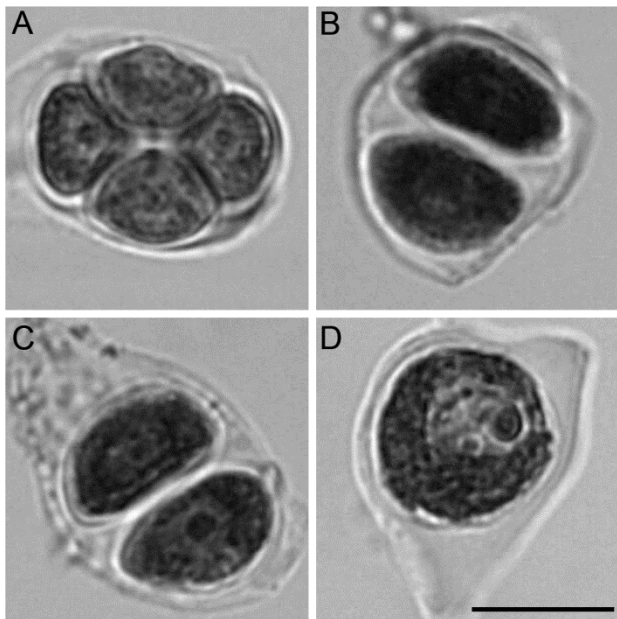
A Cyclin A Mediates the Meiosis I to Meiosis II Transition

We show here that one of the ten known type A cyclins in *Arabidopsis*, CYCA1;2/TAM, is required for the transition between meiosis I and meiosis II. No phenotype has been reported for mutants lacking any of the other CYCA, probably due to the high level of redundancy (Inzé and De Veylder, 2006). By contrast, none of the other cyclins were able to compensate for CYCA1;2 in the meiosis I to meiosis II transition. CYCA1;2 may have a specialist function or pattern of expression, required for this transition, that cannot be



Article1 - Figure 11 : Pollen grains in wild type, *osd1*, *tam* and *tam/osd1*.

Anthers were stained as described by Alexander (Alexander, 1969). (A) Wild type. (B) *tam-2* (C) *osd1-1*. (D to F) *tam-2/osd1*. Scale bar=100 μ m



Article1 - Figure 12 : Male meiotic products stained with toluidine blue.

(A) Wild type. (B) *tam-2*. (C) *osd1-2*. (D) *tam-2/osd1-1*. Scale bar=10 μ m

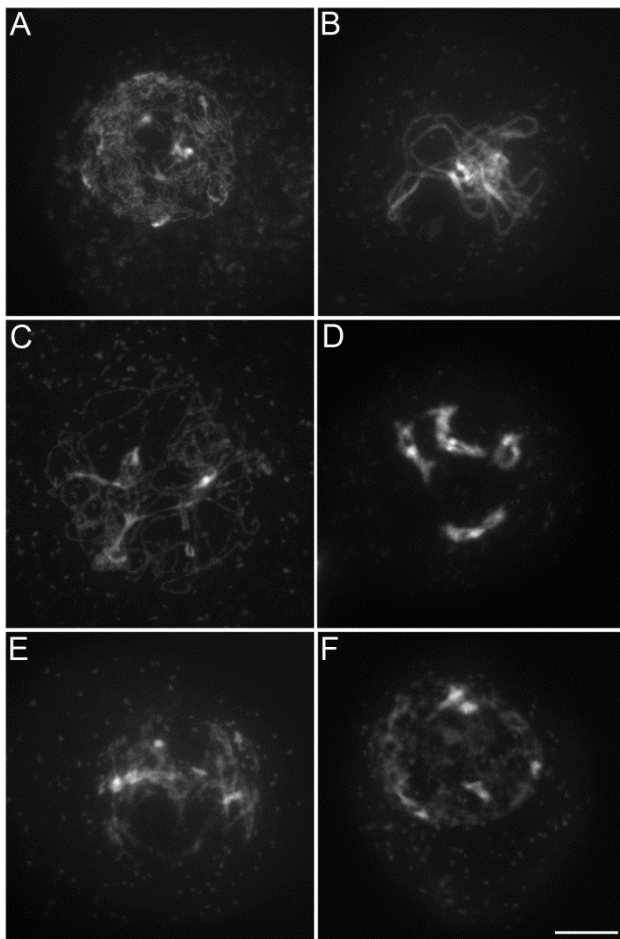
supplied by any of the other cyclins from *Arabidopsis*. Alternatively, the lack of CYCA1;2 may decrease generic cyclin/CDK complex activity, causing the meiosis I-meiosis II transition to fail.

CYCA1;2 and OSD1 are Involved in the Prophase to Meiosis I Transition at Male Meiosis

Both *cyca1;2/tam* and the previously described *osd1* mutants fail to enter meiosis II and produce spores after meiosis I. Remarkably, male meiocytes lacking both *OSD1* and *CYCA1;2/TAM* genes fail to enter meiotic division I, producing spores directly after prophase. This shows that in addition to their crucial function in driving meiosis I to meiosis II transition, these two genes are involved in the prophase to meiosis I transition. This suggests that they both contribute to an activity promoting entry into meiosis I and entry into meiosis II, most likely a CDK activity. The molecular function of *OSD1* is currently unknown, however, it has been proposed by analogy to *Erp1/Emi2* and *Mes1* that it may inhibit APC activity, thus promoting CDK activity (d'Erfurth et al., 2009). *TAM/CYCA1;2* being a cyclin, may directly promote CDK activity. We believe that the meiosis I to meiosis II transition is easily disturbed, because fine regulation of the levels of cyclin/CDK activity is required to ensure both exit from meiosis I and entry into meiosis II (Marston and Amon, 2004). Thus a moderate decrease of CDK activity in *osd1* and *cyca1;2/tam* single mutants may cause failure to enter meiosis II without impairing the prophase to meiosis I transition. In contrast the coincident depletion of *OSD1* and *CYCA1;2/TAM*, may further decrease CDK activity, impairing entry into meiosis I. Unfortunately the direct measurement of CDK activity during meiosis in *Arabidopsis* is currently not possible. The combination of *osd1* and/or *cyca1;2/tam* mutants with other mutants affecting CDK activity may help to test this model. In *S. cerevisiae*, the simultaneous deletion of two (out of six possible) B-type cyclins (*Clb1* and *Clb3* or *Clb1* and *Clb4*) leads to a failure to enter meiosis II (Dahmann and Futcher, 1995; Kiburz et al., 2008). However, although *Clb3* activity is specific to meiosis II, this is not the case for *Clb1* and *Clb4* (Carlile and Amon, 2008), and the *Clb1 Clb3 Clb4* triple mutant barely sporulates, suggesting that all three proteins have functions in meiosis progression other than the meiosis I-meiosis II transition, similar to *OSD1* and *CYCA1;2/TAM*.

Different Control of Male and Female Meiosis

In the *osd1/tam* double mutant, male meiocytes fail to enter meiosis I after prophase, whereas female meiocytes proceed to meiosis I and fail to enter meiosis II revealing a striking difference in the control of male and female meiosis progression. We suggest that other cyclins may partly compensate for the absence of *CYCA1;2*, during female meiosis, and that the meiosis I to meiosis II transition may be driven by different mixtures of cyclins in male and female meiosis. This possibility is supported by the *cyca1;2/tam* single mutants being weakly affected in the female lineage, compared to the male lineage and to *osd1* male and female lineage. An analysis of the effects on meiosis of the depletion of other cyclins, either alone or together with *TAM/CYCA1;2*, is required to test this hypothesis.



Article1 - Figure 13 : Male meiosis in *tam-2/osd1-1*

Prophase was indistinguishable from wild type. (A) Leptotene. (B) Pachytene. (C) Diplotene. (D) Diakinesis. (E) Spore formation. (F) Spore. Scale bar=10 μ m

Cyclin A proteins specific to male meiosis have already been described in mammals. The mouse and human genomes each contain two different A-type cyclins. One of these cyclins, Cyclin A1, is restricted to the germ line whereas Cyclin A2 is ubiquitously expressed (Ravnik and Wolgemuth, 1996, 1999; Sweeney et al., 1996; Yang et al., 1997). The loss of Cyclin A1 function has no effect on viability and results in male sterility, with male meiosis progressing to the late prophase and then leading to apoptosis; it has no effect on female fertility (Liu et al., 1998). Control of male and female meiosis by a different set of cyclins may thus be a general phenomenon.

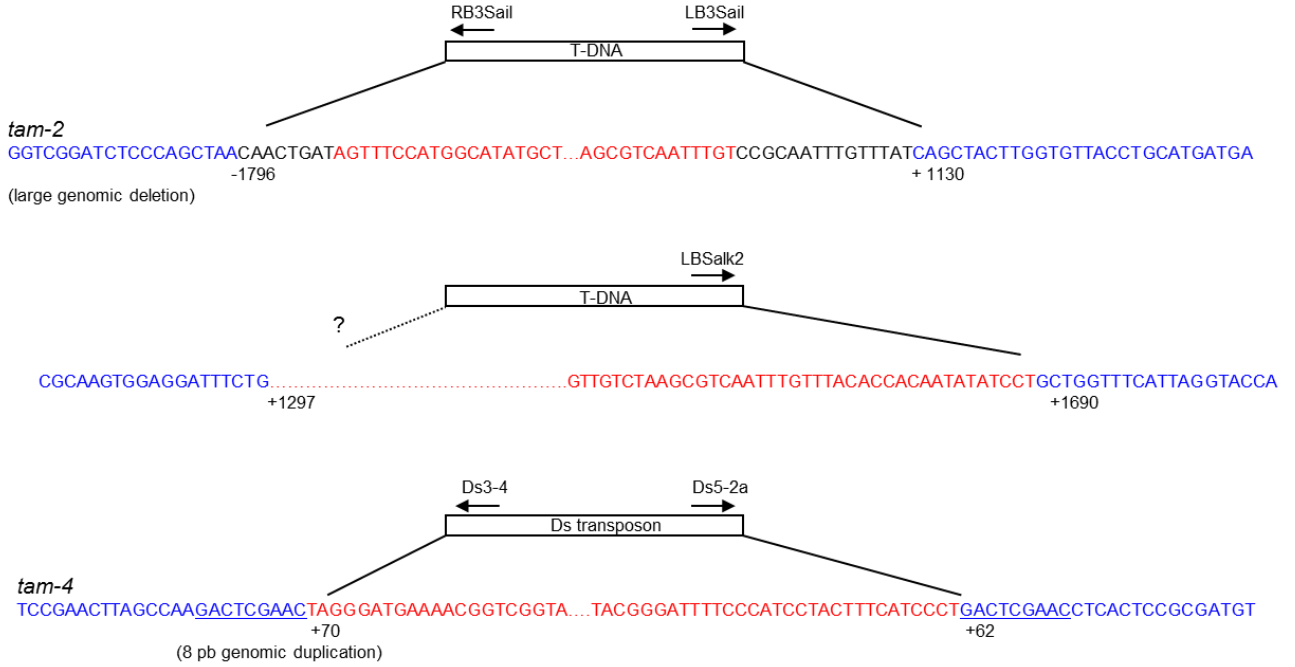
Plant Cyclins and Meiosis

The *Arabidopsis* genome encodes 50 cyclins or putative cyclins (Wang et al., 2004a). Two of these cyclins, SDS and CYCA1;2/TAM, have been directly implicated in meiosis. CYCA1;2/TAM is a type A cyclin involved in cell cycle progression ((Wang et al., 2004a, 2004b) and this study), whereas SDS forms an outgroup, and plays a specific role in recombination with no evidence for any role in cell cycle progression (Azumi et al., 2002; De Muyt et al., 2009). SDS is required to bias crossovers between homologous chromosome at meiosis rather than between sister chromatid, as in mitosis (De Muyt et al., 2009). A viable hypomorphic mutant of CDKA displays meiotic defects potentially corresponding to a combination of the *sds* and *tam* defects (Dissmeyer et al., 2007) (e.g. recombination and progression defects), consistent with both SDS and TAM/ CYCA1;2 being involved in CDKA activation. In wheat, *Cdc2/CDKA* genes are essential components of the *Ph1* locus, which is responsible for preventing recombination between homeologous chromosomes (Griffiths et al., 2006). This suggests that cyclin/CDK activity may finely regulate various meiotic events.

Relevance for Apomixis

Apomixis, or asexual clonal reproduction through seeds, has great potential for agricultural applications (Bicknell and Koltunow, 2004; Spillane et al., 2004). It can be separated into three developmental components: an absence or alteration of meiosis (apomeiosis), the fertilization-independent development of the embryo from the egg cell (parthenogenesis), and the initiation of endosperm development with or without fertilization (Koltunow and Grossniklaus, 2003; Bicknell and Koltunow, 2004; Spillane et al., 2004). We recently showed that fully penetrant apomeiosis can be induced in *Arabidopsis*, when meiosis is replaced by a mitosis-like division in the *MiMe* genotype, which combines mutations in three genes, *AtSPO11-1*, to eliminate recombination, *AtREC8*, to ensure the separation of sister chromatids rather than homologues and *OSD1* to abolish the second division (d'Erfurth et al., 2009). We have now identified a second gene, *CYCA1;2/TAM*, the mutation of which abolishes the second division of meiosis. The *MiMe-2* genotype, which combines the *Atspo11-1*, *AtRec8* and a newly described *tam* mutation, gives rise to the same phenotype as the *MiMe* genotype, with the conversion of meiosis into a mitosis-like division. Thus, apomeiosis can be engineered by combining various mutations. However, as *tam* mutations have a lower penetrance than *osd1* mutations, *MiMe-2* plants produce apomeiotic gametes

ATGC: Genomic sequence
 ATGC: T-DNA/Transposon sequence
 ± xxx distance from TAM ATG (bp).



Article1 - Figure S1 : The *tam-2*, *tam-3* and *tam-4* insertions.

less frequently than *MiMe* plants. Thus, *osd1* mutations may be more suitable than *tam* mutations for agricultural applications, if the results obtained in *Arabidopsis* can be extrapolated to crop plants. In addition to apomeiosis in *MiMe* or *MiMe-2* plants, apomixis will require the introduction of parthenogenesis and autonomous endosperm formation.

MATERIALS AND METHODS

Growth Conditions and Genotyping

Arabidopsis plants were cultivated as previously described (Vignard et al., 2007). For cytometry experiments, *Arabidopsis* plants were cultivated on *Arabidopsis* medium (Estelle and Somerville, 1987), at 21°C, under a 16-h to 18-h photoperiod and 70% relative humidity. The *tam-2* (Sail_505-C06 Columbia accession), *tam-3* (Salk_080686 Columbia accession), *tam-4* (CSHL_Et12273 Landsberg *erecta* accession), *tam-5*, *tam-6* and *tam-7* mutants were genotyped by PCR. For *tam-2*, *tam-3* and *tam-4* two primer pairs were used. The first pair is specific to the wild-type allele and the second pair is specific to the left border of the inserted sequence. *tam-2*: N874380U (5' GACTTGATGGATCCACAGC 3') & N874380L (5' CAGAAATCCTCCACTTGCG 3'); N874380L & LB3Sail (5' TAGCATCTGAATTCATAACCAATC TCGATACAC 3'). *tam-3*: N580686U (5' GAAGAGTATAGGCTTTCGCCC 3') & N580686L (5' TGCAACCACATCAGATGAGAG 3'); N580686L & LBSalk2 (5' GCTTTCTCCCTTCCTTTCTC 3'). *tam-4*: ET12273R (5' TAATGGGACCCACTGATGATC 3') & ET12273L (5' ACCTCAGATACACGCAAATGC 3'); ET12273L & Ds5-1 (5' GAAACGGTCGGGAACTAGCTCTAC 3'). *tam-5* F2P24.10_3 (5' CATCGCTTTGGAGCAATTCGGTGT) & F2P24.10_555 (ACCAAAACCTGCTTTATCTCGCAATT. *tam-6* F2P24.10_cf (CACCATGTCTTCTTCGTCGAGAAATCTATCTCA) & F2P24.10_572 (TGGCCGATCTTATTTGAACAATTCACCTC). *tam-7* F2P24.10_4 (AAGACACCGAATTGCTCCAAAGCG) & F2P24.10_yjd (ATGTAATCTAGAGCCGGTCTTTTGTTCAA). The PCR products for *tam-5*, *tam-6* and *tam-7* were designed as derived amplified polymorphic sequences (dCAPS) (Neff et al., 1998) using the Sainsbury atPRIMER webtool (<http://www.atprimer.tsl.ac.uk/cgi-bin/form1.cgi>). The dCAPS for *tam-5*, *tam-6* and *tam-7* are cleaved with Mfe I (125bp versus 103bp + 22bp), Xba I (316bp versus 136bp + 180bp) and Mfe I (396bp versus 365bp + 31bp) respectively. The cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) used to genotype *qrt1-2* were described by Francis *et al* (Francis et al., 2007). The primers used to genotype *osd1-1*, *Atspo11-1-3* and *Atrec8-3* were described in a previous study (d'Erfurth et al., 2009). The *tam-2* and *tam-4* T-DNA right border junction was analyzed by sequencing PCR products. For *tam-2*, the specific primers used were 77400F (5'TTGCGCAATCGTGGCGAGAA 3') and Rb3Sail (5'TAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGAC3'. For *tam-4*, the specific primers used were ET12273R and Ds3-4 (5' CCGTCCCGCAAGTTAAATATG3').

Fluorescent Tagged Lines

The seeds for FTL analysis were obtained from G.P. Copenhagen (Berchowitz et al., 2007; Berchowitz and Copenhagen, 2008). We obtained *tam-2/qrt1-2* and FTL3253 +/- plants by selfing double heterozygous *tam-2/qrt1-2*, FTL3253 +/- plants. We obtained *osd1-1/qrt1-2* and FTL3253 +/- plants by selfing a double heterozygote *osd1-1/qrt1-2* FTL3253 +/- plants. We obtained *tam-2/spo11-1-3/rec8-3/qrt1-2* and FTL993 +/- FTL1273 +/- plants by selfing a *qrt1-2* mutant, triple heterozygous *tam-2/spo11-1-3/rec8-3* and FTL993 +/- FTL1273 +/-

plant. We obtained *osd1-1/spo11-1-3 /rec8-3/qrt* and FTL993 +/- FTL1273 +/- plants by crossing a *qrt1-2* mutant, triple heterozygote *osd1-1/spo11-1-3 /rec8-3* FTL993 -/- FTL1273 +/- plant with a *qrt1-2* mutant, triple heterozygous *osd1-1/spo11-1-3 /rec8-3* FTL993 +/- FTL1273 -/- plant.

Plants of interest were selected by PCR genotyping. For each line, the first pair of primers is specific to the wild-type allele and the second pair is specific to the T-DNA insertion:

FTL3253 (AmCyan, nucleotide position 9304032 on chromosome 5): FTL3253U (5' AACTTAGATGCCGAAGAAATG 3') & FTL3253L (5' GAGATTCTATACAGATTGATCC 3');

FTL3253U & LB-TDNA_FTL (5' GGCATGCAAGCTGATAATTC3')

FTL993 (CFP, nucleotide position 25731311 on chromosome 5): FTL993U (5' AGTGACAAGAATCCTAGTCG 3') & FTL993L (5'GTCTCTACTAAGAGCTCCTC 3'); FTL993L & LB-TDNA_FTL

FTL1273 (DsRed2, nucleotide position 18164269 on chromosome 5): FTL1273U (5' TACTTAGTCTAGGGTATACAC3')& FTL1273L (5' TATAATCGTTCGTCACGAG 3'); FTL1273L & LB-TDNA_FTL. The I3 line (*qrt1-2* with two insertions on chromosome 3, FTL1500 CFP at nucleotide position 498916 and FTL1371 DsRed2 at nucleotide position 4319513) as described in Francis et al., (Francis et al., 2007) was used for EMS mutagenesis as described below.

Genetic Analysis

Genetic complementation is typically tested by crossing homozygous mutants, but with the *tam* mutants this would introduce a complicating variable since the progeny would be tetraploid. Instead we assessed complementation by crossing heterozygous *tam* plants, selecting double heterozygous progeny with PCR and scoring their phenotype.

A *tam-2* mutant with Col/No-0 polymorphisms was obtained by crossing a heterozygous *tam-2* mutant with a No-0 plant and selfing the F1 generation. We then selected *tam* mutants heterozygous for several Col/No-0 polymorphisms in the F2 generation and crossed them to wild-type Ler plants. The triploid plants obtained were genotyped to infer the genotype of the *tam* 2n gametes.

We obtained *tam-2/spo11-1-3 /rec8-3* mutants with Col-0/Ler polymorphisms by crossing a triple heterozygous *tam-2/spo11-1-3/rec8-3* mutant (Col-0) with a wild-type Ler and selfing the F1 progeny. Similarly, plants of interest in the F2 generation were crossed with wild-type No-0 and the triploid progeny were genotyped. The trimorphic (Col-0/Ler/No-0) microsatellite markers used to genotype the *tam-2* (Col-0 / No-0) x Ler population and the *tam-2/spo11-1-3/rec8-3* (Col-0/Ler) triple mutant x No-0 F1 population have been described previously [23]. Microsatellite The NGA76 microsatellite was amplified (Tm: 57°C) with the 5'GGAGAAAATGTCACTCTCCACC 3' and 5'AGGCATGGGAGACATTTACG 3' primers (35 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at Tm and 45 sec at 72°C).

Cytology and Flow Cytometry

Final meiotic products were observed, chromosome spreads generated, and genome sizes were determined as described previously (d'Erfurth et al., 2009). Pollen fluorescence was analysed as previously described (Berchowitz and Copenhaver, 2008). Images were acquired with a LEICA DM RXA2 epifluorescence microscope using eCFP and DSRed2 filters (Chroma Technologies) and processed with Photoshop 8 (Adobe Systems Inc.).

Mutagenesis

EMS alleles of the *TAM* locus were generated following the protocol of Weigel and Glazebrook (Weigel and Glazebrook, 2002). 0.5 grams of seed were imbibed in 30 ml of sterile water for 4 hrs. and then mutagenized with 0.2% ethyl methane sulfonate for 16 hrs. at room temperature with gentle agitation. Mutagenized seeds were rinsed with 30 ml of sterile water eight times and then dried before planting. Seeds were harvested from individually collected M1 plants. M2 plants were screened for a pollen dyad phenotype (background was *qrt1-2* which produces pollen tetrads).

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Mathilde Grelon, Christine Mezard and Wayne Crismani for useful comments on the manuscript. During the course of the review process an independent study of *TAM* was published (Wang et al., 2010).

Génotype	Phénotype	
WT	-	Article2 – Figure 5
<i>osd1-3</i>	Sortie après Méiose I	Article2 – Figure 5
<i>tam-2</i>	Sortie après Méiose I	Article2 – Figure 5
<i>tdm1-3</i>	3 ^{ème} division méiotique	Article2 – Figure 5
<i>osd1-3/tam-2</i>	Sortie après prophase I	Article2 – Figure 6
<i>tam-2/tdm1-3</i>	3 ^{ème} division méiotique	Article2 – Figure 6
<i>osd1-3/tdm1-3</i>	Sortie après Méiose I	Article2 – Figure 6
<i>osd1-3/tam-2/tdm1-3</i>	Arrêt en télophase I	Article2 – Figure 6
TAMΔD	3 ^{ème} division méiotique	Article2 – Figure 8
<i>tdm1-3 - TAMΔD</i>	3 ^{ème} division méiotique	
<i>osd1-3 - TAMΔD</i>	Arrêt en télophase I	Article2 – Figure 10

Tableau D.I.1 : Phénotype des mutants impliqués dans la progression du cycle méiotique.

Ce tableau regroupe les phénotypes des mutants étudiés dans les articles 1 et 2.

3. Etude de la progression méiotique chez *A. thaliana*

3.1. Principaux Résultats

- **OSD1 est un inhibiteur de l'APC/C en méiose**

L'analyse de la séquence d'OSD1, ainsi que l'alignement des homologues d'OSD1 (trouvés uniquement chez les plantes) nous ont permis d'identifier trois motifs conservés et caractéristiques des interactions à l'APC/C. OSD1 possède une D-Box, une GxEN-Box et une MR-Tail. On retrouve ces trois domaines chez SpMES1. SpMES1 est un inhibiteur de l'APC/C méiose-spécifique impliqué dans le maintien d'une activité CYC/CDK résiduelle lors de la transition méiose I-méiose II (voir B.II.2.4.2). Des expériences visant à identifier les interactions protéines-protéines, ont permis de mettre en évidence qu'OSD1 interagissait avec la plupart des activateurs de l'APC/C d'*A. thaliana*. Ces interactions sont dépendantes de la D-Box et de la MR-Tail d'OSD1. Afin de vérifier le rôle de ces domaines *in planta*, des versions mutées d'*OSD1* ont été introduites dans un mutant *osd1* afin de déterminer leurs capacités à compléter la mutation. Les versions ΔD , ΔMR et $\Delta D\Delta MR$ ne complètent pas la mutation *osd1*, confirmant le rôle de ces deux domaines pour la fonction d'OSD1.

En collaboration avec Katja Wassmann (UMPC –Paris), nous avons mis en évidence que l'expression d'OSD1 dans des oocytes de souris entraînait un arrêt en métaphase I. Sachant qu'aucun homologue d'OSD1 n'a été identifié chez les mammifères, ce résultat est concordant avec une inhibition "artificielle" de l'APC/C en métaphase I.

Ces résultats nous montrent qu'OSD1 est un inhibiteur de l'APC/C. OSD1 pourrait être un homologue fonctionnel de SpMES1 et permettrait de maintenir une activité CYC/CDK résiduelle lors de la transition méiose I-méiose II en inhibant l'APC/C.

- **Mise en évidence d'un réseau fonctionnel contenant OSD1, TAM et TDM**

OSD1 et TAM sont impliquées lors de la transition méiose I-méiose II, ainsi que lors de la transition prophase-méiose I. La protéine TDM est impliquée dans la sortie de méiose. En effet, chez un mutant *tdm* la méiose II est suivie d'une troisième division aberrante, où les chromatides essaient de ségréger, entraînant une stérilité mais uniquement du côté mâle. J'ai réalisé des tests d'épistasie entre ces différents mutants. Chez un double mutant *tam/tdm*, la méiose présente une troisième division montrant que la mutation *tdm* permet de s'affranchir de l'arrêt en fin de méiose I d'un mutant *tam*. De façon surprenante, le double mutant *osd1/tdm* montre une absence de seconde division méiotique comme le simple mutant *osd1*. Ainsi la mutation *tdm* permet de supprimer le défaut de *tam* mais pas celui d'*osd1*. De même, alors qu'un double mutant *osd1/tam* s'arrête en fin de prophase I, le triple mutant *tam/osd1/tdm* poursuit la méiose jusqu'à la télophase I (Tableau D.I.1).

Grâce à l'expression de protéines en système bactérien ainsi qu'à la purification de complexes CYC/CDK actifs, l'équipe de Arp Schnittger (IBMP – Strasbourg) a pu identifier une forte affinité entre TAM et CDKA;1. Ils ont également montré qu'OSD1 est une cible de l'activité kinase du complexe TAM/CDKA;1.

Comme toutes cyclines A et B, TAM/CYCA1;2 possède une D-box. L'expression d'une version non destructible de TAM (TAM Δ D) *in planta*, induit un phénotype uniquement méiotique. Les plantes exprimant TAM Δ D sont stériles du côté mâle et femelle. Chez ces plantes, j'ai pu observer une troisième division méiotique aberrante, se caractérisant par la formation de quatre fuseaux de microtubules après la méiose II. Ce phénotype est similaire à celui observé chez un mutant *tdm*. Lorsque la construction TAM Δ D est introduite dans un mutant *osd1*, la méiose s'arrête en télophase I (Tableau D.I.1).

Ces résultats suggèrent que TAM, OSD1 et TDM appartiennent à un même réseau fonctionnel qui permet la progression du cycle méiotique chez *A. thaliana*. Ces protéines sont impliquées dans trois transitions clés au cours de la méiose : la transition prophase I-méiose I, la transition méiose I-méiose II et la transition méiose II-sortie de méiose.

Avec ces résultats, nous avons établi deux modèles de ce réseau fonctionnel sans pouvoir favoriser l'un ou l'autre à ce jour. La première hypothèse suggère que : TDM étant impliquée dans la sortie de méiose (peut-être *via* l'APC/C), TAM pourrait être un régulateur négatif de TDM lors de la transition méiose I-méiose II. Parallèlement TAM activerait OSD1 (grâce à l'activité TAM/CDKA;1) pour permettre de maintenir une activité CYC/CDK résiduelle grâce à l'inhibition de l'APC/C. La deuxième hypothèse suggère que : Plusieurs cyclines (dont TAM) pourraient être impliquées dans la progression méiotique. Elles pourraient en se combinant avec CDKA ;1 activer OSD1 pour l'inhibition de l'APC/C. TDM pourrait réguler négativement ces cyclines en activant l'APC/C et ainsi détruire toutes ces cyclines en télophase II pour permettre la sortie de la méiose.

3.2. Article 2 : "OSD1 promotes meiotic progression *via* APC/C inhibition and forms a regulatory network with TDM and CYCA1;2/TAM" PLoS Genetics 2012

OSD1 promotes meiotic progression *via* APC/C inhibition and forms a regulatory network with TDM and CYCA1;2/TAM.

Laurence Cromer^{1,2}, Jefri Heyman^{3,4}, Sandra Touati^{5,6}, Hirofumi Harashima^{7,8}, Emilie Araou^{1,2}, Chloe Girard^{1,2}, Christine Horlow^{1,2}, Katja Wassmann^{5,6}, Arp Schnittger^{7,8}, Lieven De Veylder^{3,4}, Raphael Mercier^{1,2*}

¹ INRA, UMR1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

² AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

³ Department of Plant Systems Biology, VIB, B-9052 Gent, Belgium

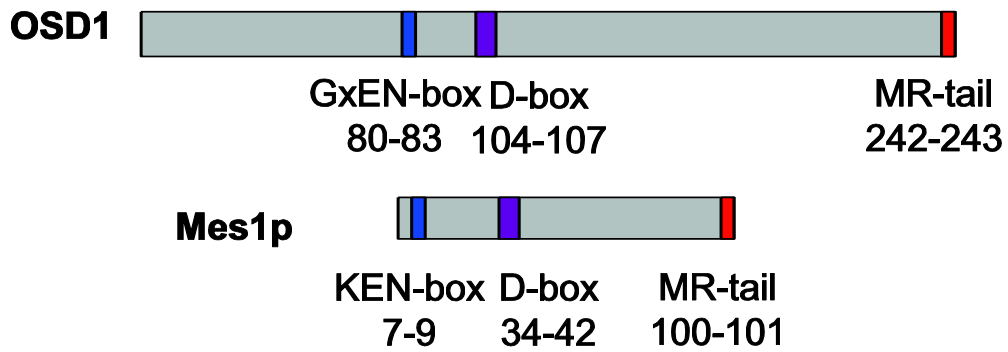
⁴ Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, B-9052 Gent, Belgium

⁵UMPC University of Paris 6, UMR7622 and ⁶CNRS, UMR7622, Laboratoire de Biologie du Développement, 9 quai St Bernard, 75005 Paris, France.

⁷ IBMP, UPR2357 du CNRS, 12, rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France.

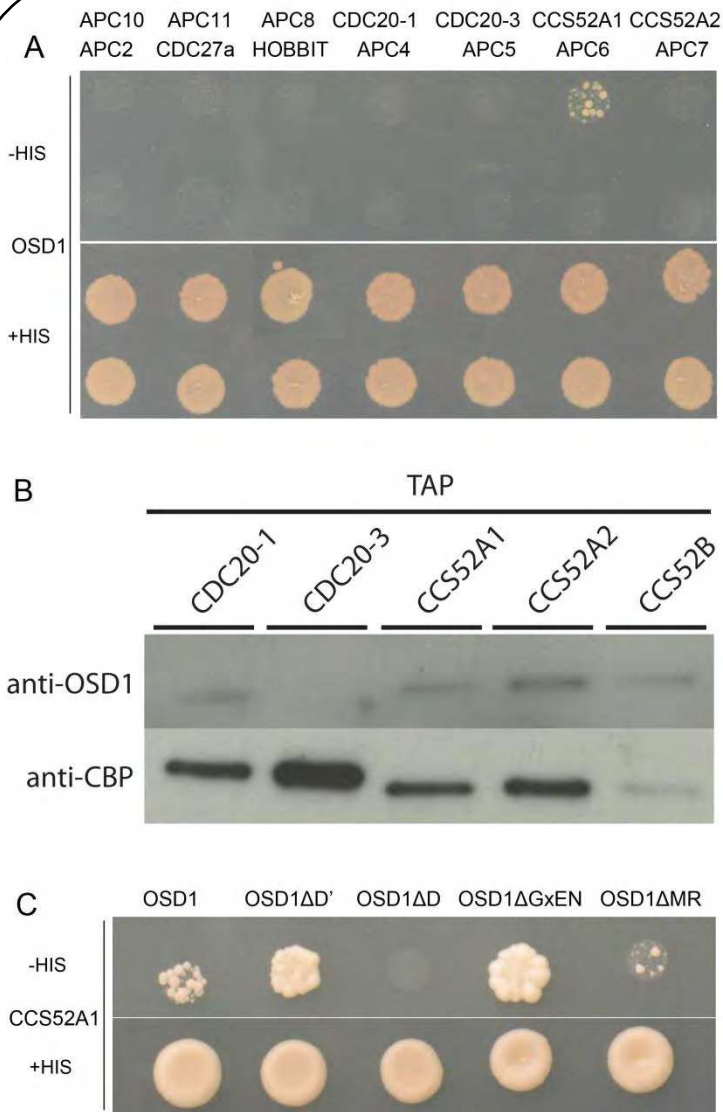
⁸ Trinationales Institut fuer Pflanzenforschung, 67084 Strasbourg, France

*corresponding author. raphael.mercier@versailles.inra.fr



Article2 - Figure 1 : Structural comparison of OSD1 and Mes1 proteins

OSD1 and Mes1 share co-aligned putative APC/C interacting domains.



Article2 - Figure 2 : OSD1 interacts with CCS52A1 through its D-BOX and MR-tail

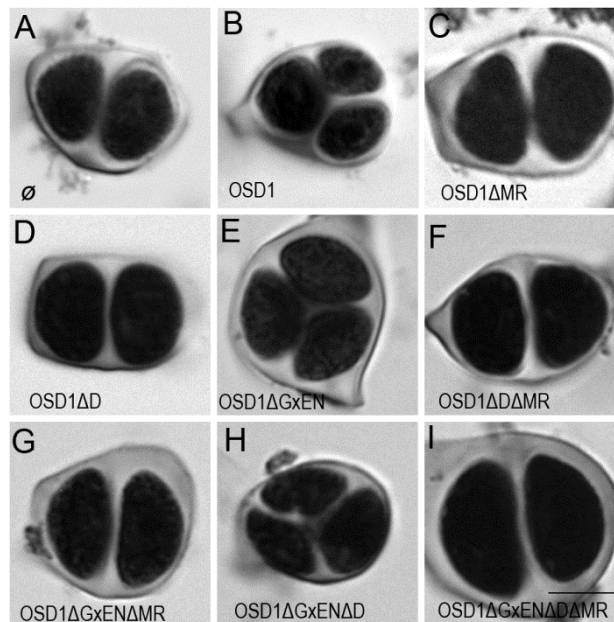
(A) Yeast 2-hybrid experiments showed that among the 14 APC/C subunits tested, OSD1 interacts only with CCS52A1. (B) CDC20s and CCS52s TAP elutions probed with anti-OSD1 antibody. OSD1 is detected in all elutions but CDC20.3. The anti-CBP recognizes the Calmodulin Binding Protein stretch in the TAP tag and served as loading control. (C) OSD1 with mutation of a putative non-conserved D-BOX (OSD1ΔD') or mutation of its GxEN-box (OSD1ΔGxEN) still interacts with CCS52A1. In contrast, this interaction is abolished by the mutation of the conserved D-box (OSD1ΔD) and reduced by the deletion of the MR-tail (OSD1ΔMR).

ABSTRACT

Cell cycle control is modified at meiosis compared to mitosis, because two divisions follow a single DNA replication event. Cyclin-dependent kinases (CDKs) promote progression through both meiosis and mitosis, and a central regulator of their activity is the APC/C (Anaphase Promoting Complex/Cyclosome) that is especially required for exit from mitosis. We have shown previously that OSD1 is involved in entry into both meiosis I and meiosis II in *Arabidopsis thaliana*; however the molecular mechanism by which OSD1 controls these transitions has remained unclear. Here we show that OSD1 promotes meiotic progression through APC/C inhibition. Next, we explored the functional relationships between OSD1 and the genes known to control meiotic cell cycle transitions in *Arabidopsis*. Like *osd1*, *cyca1;2/tam* mutation leads to a premature exit from meiosis after the first division, while *tdm* mutants perform an aberrant third meiotic division after normal meiosis I and II. Remarkably, while *tdm* is epistatic to *tam*, *osd1* is epistatic to *tdm*. We further show that the expression of a non-destructible *CYCA1;2/TAM* provokes, like *tdm*, the entry into a third meiotic division. Finally, we show that *CYCA1;2/TAM* forms an active complex with *CDKA;1* that can phosphorylate OSD1 *in vitro*. We thus propose that a functional network composed of OSD1, *CYCA1;2/TAM* and *TDM*, controls three key steps of meiotic progression, in which OSD1 is a meiotic APC/C inhibitor.

AUTHOR SUMMARY

In the life cycle of sexual organisms, a specialized cell division—meiosis—reduces the number of chromosomes from two sets (2n, diploid) to one set (n, haploid), while fertilization restores the original chromosome number. Meiosis reduces ploidy because it consists of two cellular divisions following a single DNA replication. In this study, we analyze the function of a group of genes that collectively control the entry into the first meiotic division, the entry into the second meiotic division, and exit from meiosis in the model plant *Arabidopsis thaliana*. We revealed a complex regulation network that controls these three key transitions.



Article2 - Figure 3 : Complementation test of *osd1-3* by wild-type and mutated versions of *OSD1*

Male meiotic products stained by toluidine blue: (A) a dyad of spores from the *osd1-3* mutant. (B) A tetrad of spores from *osd1* complemented by the wild type *OSD1* gene. Note that one of the spores is out of focus because they are organized in a tetrahedron. (C to I) Male meiotic products from *osd1-3* transformed by versions of the *OSD1* gene with a GxEN-box mutation (*OSD1ΔGxEN*), a D-box mutation (*OSD1ΔD*), a MR-tail mutation (*OSD1ΔMR*) or combination of these mutations. Some versions induced complementation, with a majority of tetrads (E, H), while others did not restore tetrad formation (C, D, F, G, I). Scale bar = 10μM

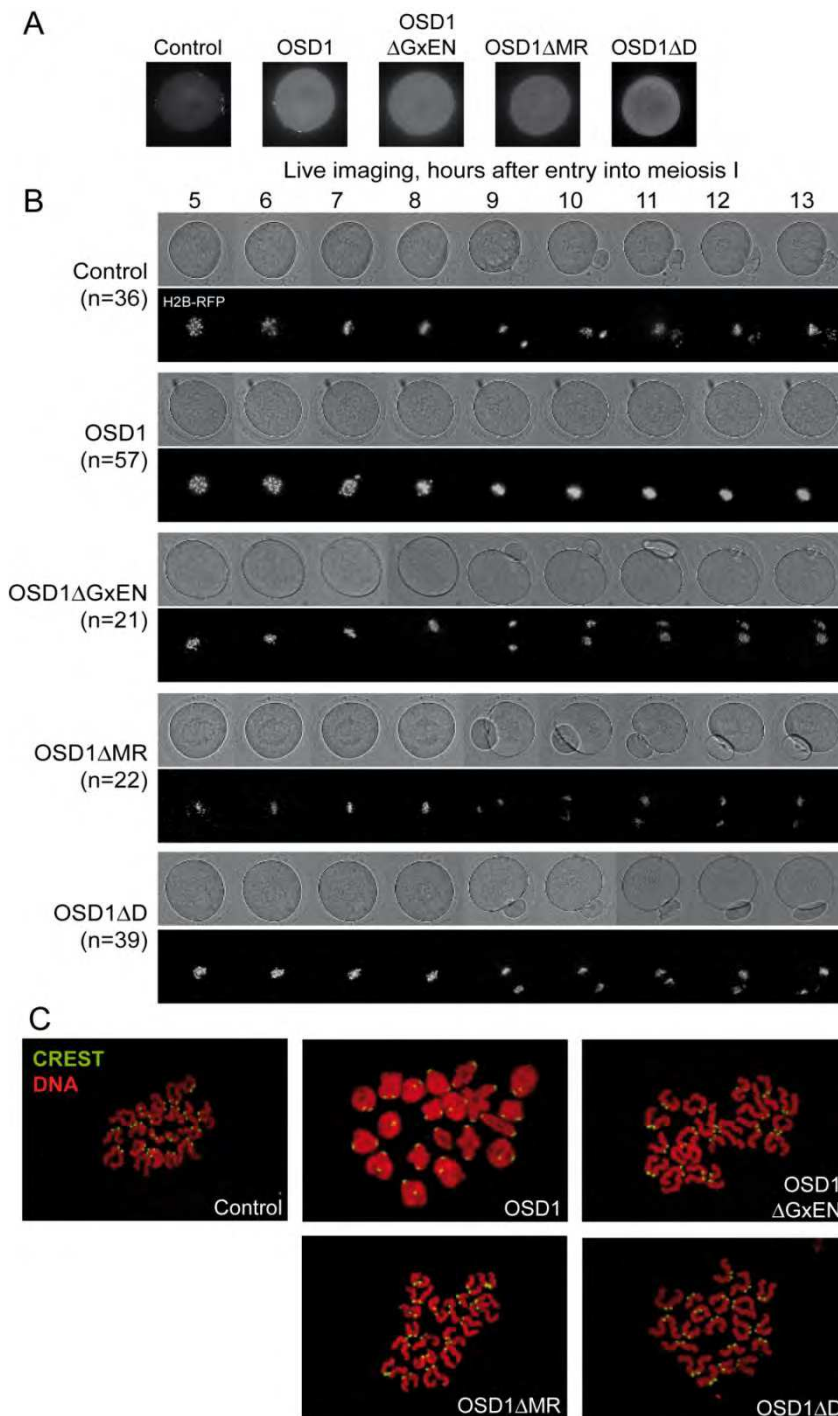
INTRODUCTION

Meiosis is a key step in the life cycle of sexually reproducing eukaryotes, such as the majority of flowering plants. At meiosis ploidy is reduced by two, leading to the production of typically haploid gametes whose fusion during fertilization restores diploidy of the next generation. This is achieved by the modification of the meiotic cell cycle, compared to mitosis, allowing two rounds of chromosome segregation – meiosis I and meiosis II - after a single DNA replication event. Thus, a central question when analyzing the meiotic cell cycle is how three key transitions are controlled, i.e. entry of the meiocytes into meiosis I after prophase, transition from meiosis I to meiosis II and exit from meiosis II.

The main driving force of cell-cycle progression, at both meiosis and mitosis, is the activity of cyclin-dependent kinases (CDKs), in association with their regulatory partners, the cyclins. Entry into division phase requires high CDK activity that peaks at metaphase. Anaphase progression is regulated by a gradual degradation of CDK activity and mitotic exit requires low CDK activity (De Gramont and Cohen-Fix, 2005; Pérez-Hidalgo et al., 2008). CDK activity is regulated by the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), a conserved multisubunit E3 ubiquitin ligase that triggers the degradation of multiple substrates, including cyclins, during mitosis and meiosis. The APC/C is activated by Cdc20/Fizzy and Cdh1/Fizzy-related proteins that also confer substrate specificity (the latter is known as CCS52s in plants) (Fülöp et al., 2005; Pesin and Orr-Weaver, 2008; Kevei et al., 2011). Precisely how the mitotic machinery is modified for the purpose of meiosis is unclear. The currently available knowledge that originates from studies carried out in unicellular fungi, *Xenopus laevis* and mouse oocyte systems, points towards a meiosis specific regulation of the APC/C as one of the key cell cycle modifications between meiosis and mitosis (Pesin and Orr-Weaver, 2008; Pérez-Hidalgo et al., 2008). In oocytes, meiosis is driven by Cdc2/Cyclin B complexes. At the end of meiosis I, Cyclin B is only partially degraded and the residual, low level of Cdc2/CyclinB activity is essential for entry into meiosis II (Furuno et al., 1994). Partial Cyclin B degradation is obtained through temporally controlled inhibition of the APC/C by the Erp1/Emi2 protein (Madgwick et al., 2006; Ohe et al., 2007). In *Schizosaccharomyces pombe*, the Mes1 protein also partially restrains cyclin degradation through inhibition of the APC/C, thereby allowing entry into meiosis II (Izawa et al., 2005; Kimata et al., 2008, 2011). In *Saccharomyces cerevisiae*, a meiosis specific APC/C activator (Ama1), and its inhibitor Mnd2, are both required for meiotic progression (Pesin and Orr-Weaver, 2008).

Very little is known about control of the meiotic cell cycle in plants. It is largely unknown which one(s) of the *Arabidopsis* cyclins (which include 10 A-type-cyclins and 11 B-type-cyclins) constitute, with CDKA;1 (Dissmeyer et al., 2007; Bulankova et al., 2010; Harashima and Schnittger, 2012) and possibly other CDKs, the core CDK complex that is necessary for meiosis. To date, only four genes involved in the three meiotic cell cycle transitions have been isolated in *Arabidopsis thaliana*. Two of them, *TAM* (*TARDY ASYNCHRONOUS MEIOSIS*,

**Article2 - Figure 4 :
Expression of OSD1 in
mouse oocytes provokes a
metaphase I arrest.**



Germinal Vesicle (GV) stage mouse oocytes were injected with mRNA encoding the indicated OSD1 constructs. (A) Immunofluorescence on fixed oocytes in prometaphase I showing equal expression of the different *OSD1* constructs with anti-*OSD1* antibody. (B) Histone H2B-RFP encoding mRNA was injected together with the indicated *OSD1* mRNA to follow chromosome movements. Oocytes were induced to enter the first meiotic division in a synchronized manner, and followed by live imaging. Shown are images from the DIC channel and collapsed images of 8 z-sections of 2 μ m to visualize H2B-RFP labelled chromosomes at selected time points. (C) Chromosome spreads at the end of the movie. Chromosomes were stained with propidium iodide (red), and kinetochores with CREST serum (green). Only in *OSD1* injected oocytes chromosomes have not been separated in meiosis I.

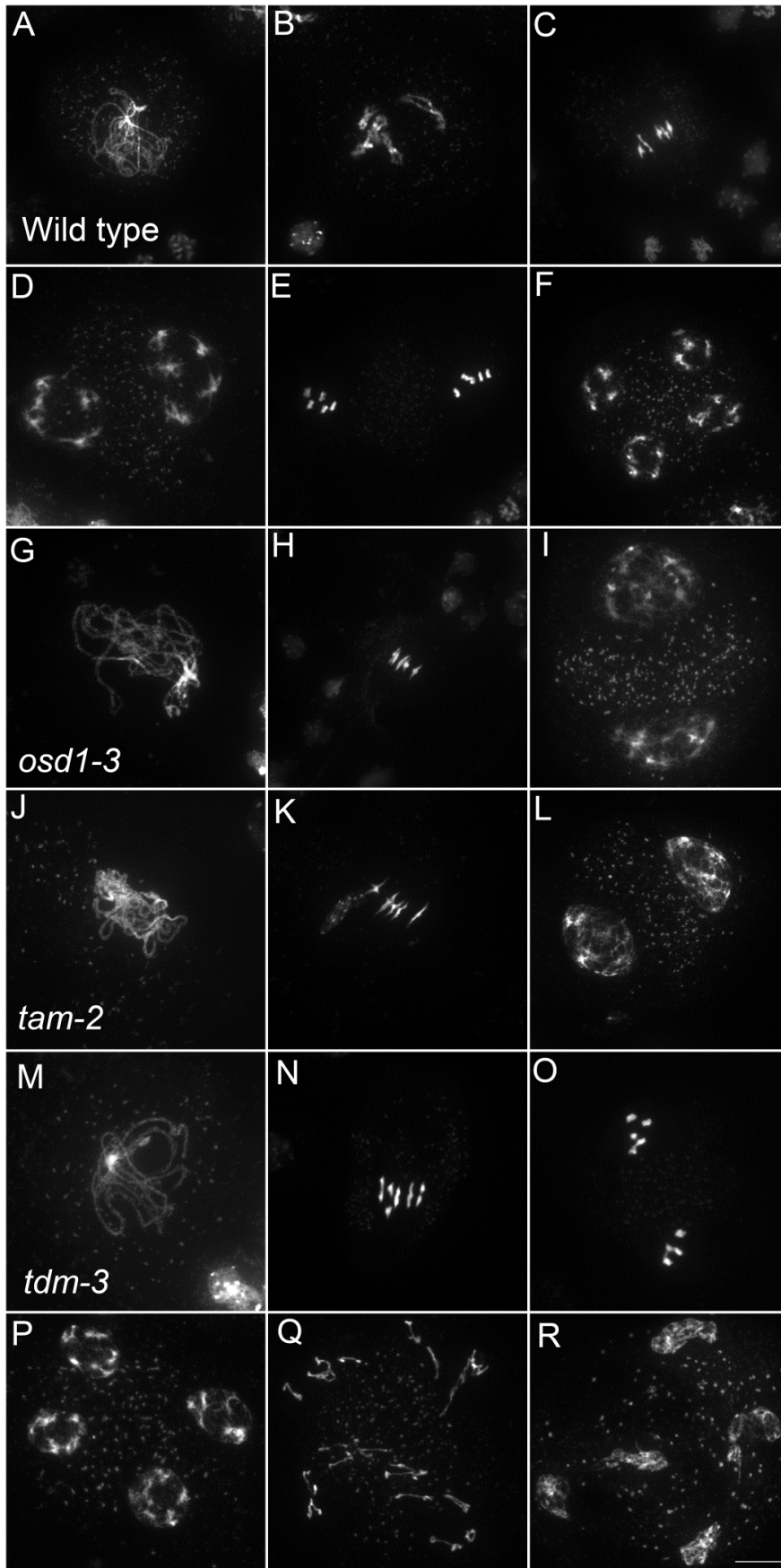
also known as *CYCA1;2*) and *OSD1* (*OMISSION OF SECOND DIVISION*) are essential for the meiosis I/meiosis II transition. The mutation of *CYCA1;2/TAM* or of *OSD1* leads to a premature exit from meiosis after meiosis I, and thus to the production of diploid spores and gametes (Wang et al., 2004b, 2010; d'Erfurth et al., 2009, 2010). These two genes are also involved in the prophase/meiosis I transition as their concomitant loss leads to a premature exit from meiosis after prophase I, before any division (d'Erfurth et al., 2010). *CYCA1;2/TAM* encodes one of the 10 *Arabidopsis* A-type cyclins (Wang et al., 2004b) and *OSD1* encodes a plant-specific protein, with additional functions in suppressing ectopic endomitosis *via* APC/C inhibition (d'Erfurth et al., 2009, 2010; Iwata et al., 2011). The third one, *TDM* (*THREE-DIVISION MUTANT*), is essential for meiotic exit, as its mutation leads to entry into an aberrant third division of meiosis after regular first and second divisions (Ross et al., 1997; Glover et al., 1998; Bulankova et al., 2010). Finally, *SMG7* (*SUPPRESSOR WITH MORPHOGENETIC EFFECTS ON GENITALIA 7*) is also required at the end of meiosis, as its mutation leads to cell cycle arrest at anaphase II (Riehs et al., 2008; Bulankova et al., 2010). Epistasis analysis suggest that *SMG7* and *TDM* act in the same pathway (Bulankova et al., 2010).

Here we explored the meiotic molecular function of *OSD1* and *CYCA1;2/TAM*, and the functional relationship between *OSD1*, the APC/C, *CYCA1;2/TAM* and *TDM* to control meiosis progression.

RESULTS

OSD1 shares structural similarities with other APC/C inhibitors

OSD1 depletion leads to a premature exit from meiosis at the end of meiosis I, a phenotype reminiscent of the vertebrate *Erp1/Emi2*-depleted oocytes and the *mes1* fission yeast mutant. While this work was in progress, evidence was found that *OSD1* (also named GIGAS CELL 1, *GIG1*) negatively regulates the APC/C to control mitotic progression (Iwata et al., 2011). Yet, while the *OSD1* protein has been shown to act as a mitotic APC/C inhibitor (Iwata et al., 2011) and is well conserved in all plants, it does not appear to be conserved over other eukaryotes and notably does not show global similarity with other known APC/C inhibitors (d'Erfurth et al., 2009), which conversely do not seem to have homologues in plants. However, closer examination of the *OSD1* sequence revealed that *OSD1* shares multiple features with *Mes1*: *OSD1* has the same three putative cell-cycle-related domains in the same order on the protein (Figure 1). These three domains are very well conserved over *OSD1* homologues (Figure S1) (d'Erfurth et al., 2009). Two of these domains are putative APC/C degradation motifs: a D-box (residues 104-110, RxxLxx[LIVM]) and a GxEN/KEN-box (residues 80-83, GxEN in eudicotyledon and KEN in monocotyledon *OSD1* homologues). The corresponding two motifs have been shown to be important for the *Mes1* function (Kimata et al., 2008). *OSD1* also has a C-terminal MR-tail in common with *Mes1* (the two last amino-acids of the protein are a methionine and an arginine). This MR-tail has not been functionally tested in *Mes1*. However the MR-tail of *Nek2a*, a kinase that is involved in mitotic regulation



**Article2 - Figure 5 :
Meiotic chromosome
spreads of wild type,
osd1-3, *tam-2* and *tdm-3*
single mutants**

(A to F) wild type. (A) pachytene, (B) diakinesis, (C) metaphase I, (D) telophase I, (E) metaphase II, (F) telophase II. (G to I) *osd1-3*. (G) Pachytene (H) metaphase I, (I) telophase I. (J to L) *tam-2*. (J) Pachytene, (K) Metaphase I, (L) telophase I. (M to R) *tdm-3*. (M) Pachytene (N) Metaphase I (O) metaphase II (P) telophase I (Q) aberrant third division (R) resulting telophase III. Scale bar = 10 μ M.

via APC/C inhibition, has been described as being a docking domain of Nek2a on the APC/C, being thus essential for its binding and inhibition activities (Hayes et al., 2006). Similarly, the C-terminal RL-tail of Emi2 is essential for inhibition of the APC/C at meiosis (Ohe et al., 2010). These observations prompted us to propose that OSD1 might also promote meiotic progression by regulating the APC/C activity through these three domains.

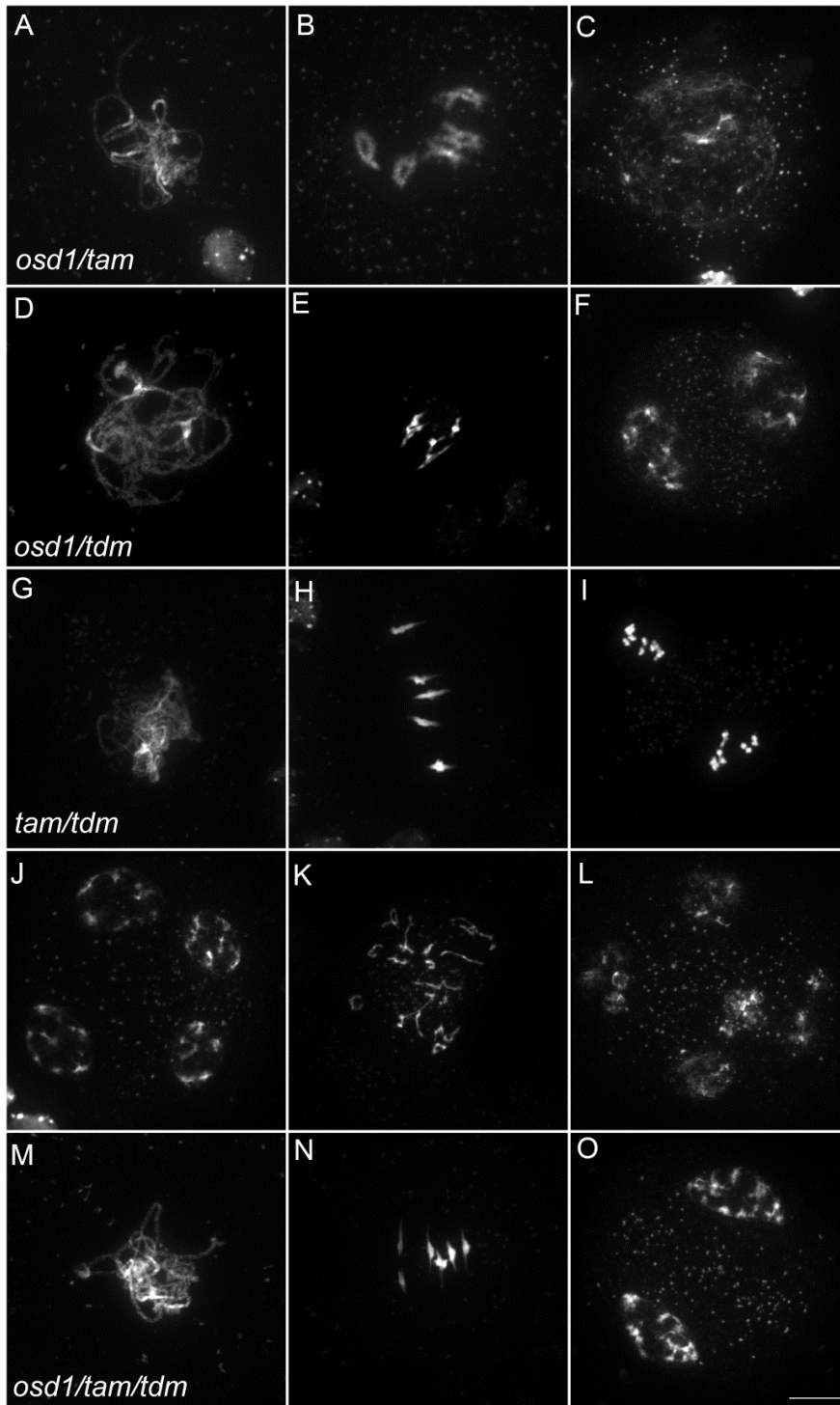
OSD1 interacts with activator subunits of the APC/C *via* its conserved domains

Using yeast 2-hybrid (Y2H) experiments Iwata et al (Iwata et al., 2011) recently showed that OSD1 (also called GIG1) interacts with the APC/C activator CDC20.1, CDC20.5, CCS52A1 and CCS52B, but not with the core APC/C components they tested (APC2, APC7, APC10, CDC27a, and HBT). We independently used Y2H experiments to test interaction of OSD1 with different APC/C subunits (Figure 2A). Corroborating and extending Iwata et al results, OSD1 did not interact with any of the APC/C core subunits tested (APC2, CDC27a, HBT, APC4, APC5, APC6, APC7, APC8, APC10, APC11). Concerning the activators, our result confirmed the interaction with CCS52A1 but did not reveal interaction with the other activators tested, including CDC20.1 that was scored positively by Iwata et al. As a negative result in Y2H experiments could be due to protocol and material variations, we used a complementary approach. Tandem affinity purification (TAP) experiments, using APC/C core components and the activators CCS52A2, CCS52B and CDC20.1 as baits, previously identified OSD1 by mass spectrometry (Van Leene et al., 2010). As mass spectrometry can fail to identify all proteins in a sample, we used an anti-OSD1 antibody (Figure S2) on TAP purified samples using CDC20.1, CDC20-3 and the three CDH1 homologues (CCS52A1, CCS52A2, CCS52B) as bait (Van Leene et al., 2010), to test to presence of OSD1. OSD1 was revealed in the CDC20.1 TAP (but not CDC20-3) and the three CCS52 TAPs (Figure 2B). Altogether our and Iwata *et al* results suggest that OSD1 can interact with a range of APC/C activators, including CDC20.1, CDC20.5, CCS52A1, CCS52A2 and CCS52B.

Next we asked whether the D-box, GxEN-box and MR tail represent true APC/C interaction motifs (Figure 2C). For both the D-box and GxEN-box, the amino acid residues essential for APC/C binding were substituted to alanine (ΔD , RxxL \rightarrow AxxA; G, GxEN \rightarrow AxAA) whereas the MR tail was deleted (ΔMR). We also mutated a putative second D-box motif ($\Delta D'$, RxxL Aa 34-37) in OSD1 that is not conserved among the different plant proteins (Figure S1). All the OSD1 proteins were stably expressed in yeast (Figure S3). Mutation of the conserved D-box completely abolished the Y2H interaction with CCS52A1. Deletion of the MR tail diminished, but not abolished the interaction with the APC/C activator. In contrast, mutation of D' or of the GxEN-box did not reduce the interaction with CCS52A1 (Figure 2C).

OSD1 function *in planta* is dependent on its D-box and MR-tail

To investigate the *in vivo* role of the APC/C interaction motifs revealed above, we created several versions of the genomic *OSD1* gene (including *OSD1* promoter and terminator) with a GxEN-box mutation (OSD1 Δ GxEN, GxEN \rightarrow AxAA), a D-box mutation (OSD1 Δ D, RxxL \rightarrow GxxV), a MR-tail mutation (OSD1 Δ MR, MR \rightarrow *) or combination of two or all of these mutations. None



Article2 - Figure 6 :
Epistasis analysis
between OSD1, TAM
and TDM

Meiotic spreads of (A to C) *osd1-3/tam-2* double mutant, (D to F) *osd1-3/tam-3* double mutant, (G to I) *tam-2/tam-3* double mutant and (M to O) *osd1-3/tam-2/tam-3* triple mutant. Scale bar = 10µM.

of these constructs modified the plant phenotype when introduced in wild type plants (data not shown). We then introduced them in the *osd1-3* mutant (figure 3). The wild type genomic clone was able to restore normal meiosis (i.e formation of tetrads) of the *osd1-3* mutant (number of independent transformants n=8, 8/8 100% tetrads). In contrast, OSD1ΔMR could not restore tetrad formation (n=6, 0% tetrad) whereas OSD1ΔD barely complemented (n= 6, 0 to 15% tetrads). Albeit we cannot exclude that the introduced mutations destabilize the protein *in planta* (though the modified OSD1 proteins accumulated at equal level when expressed in yeast and mouse oocytes (Figure S3, Figure 4A)), these results indicate that the OSD1 D-box and MR-tail are important for OSD1 function. Correspondingly, the OSD1ΔDΔMR allele could not restore tetrad formation in *osd1-3* (n=5, 0% tetrads). In contrast, OSD1ΔGxEN almost completely reverted the *osd1-3* mutant phenotype (n=3, 82 to 93% tetrads), suggesting that the GxEN-box is not essential for the OSD1 function in *planta*. Strikingly, the OSD1ΔGxENΔD allele could complement *osd1* mutants (n=4, 83 to 94% tetrads), showing that deleting the GxEN-box in OSD1ΔD restored OSD1 function. OSD1ΔGxENΔMR and OSD1ΔDΔGxENΔMR did not complement *osd1-3* (n=2 and n=4), showing that the MR tail is required in all situations (Figure 3).

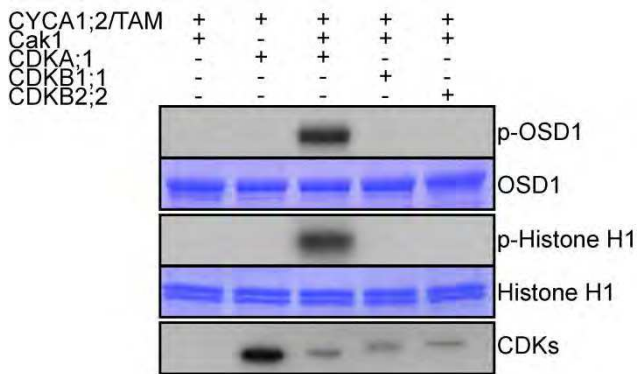
Expression of OSD1 in mouse oocytes provokes a metaphase I arrest.

To further confirm that OSD1 is an APC/C inhibitor, we took advantage of the fact that - while OSD1 is not conserved in mammals - the APC/C and its activators are extremely well conserved. Thus, expression of OSD1 in a mammalian system - such as mouse oocytes - should equally interfere with APC/C activity and thereby disturb meiotic progression. OSD1 was stably expressed in mouse oocytes (Figure 4A). Oocytes injected with mRNAs encoding OSD1, but not control-injected oocytes, arrested at metaphase I with aligned chromosomes (visualized through simultaneous injection of H2B-RFP) (Figure 4B). Chromosome spreads reveal the presence of bivalents indicative of a metaphase I arrest (Figure 4C). This shows that OSD1 can inhibit the APC/C and prevent progression through meiosis I. Expression of OSD1ΔMR, OSD1ΔGxEN or OSD1ΔD (Figure 4A) did not provoke the metaphase arrest, showing that these three motifs are required for the APC/C inhibition by OSD1 in mouse oocytes (Figure 4B and C).

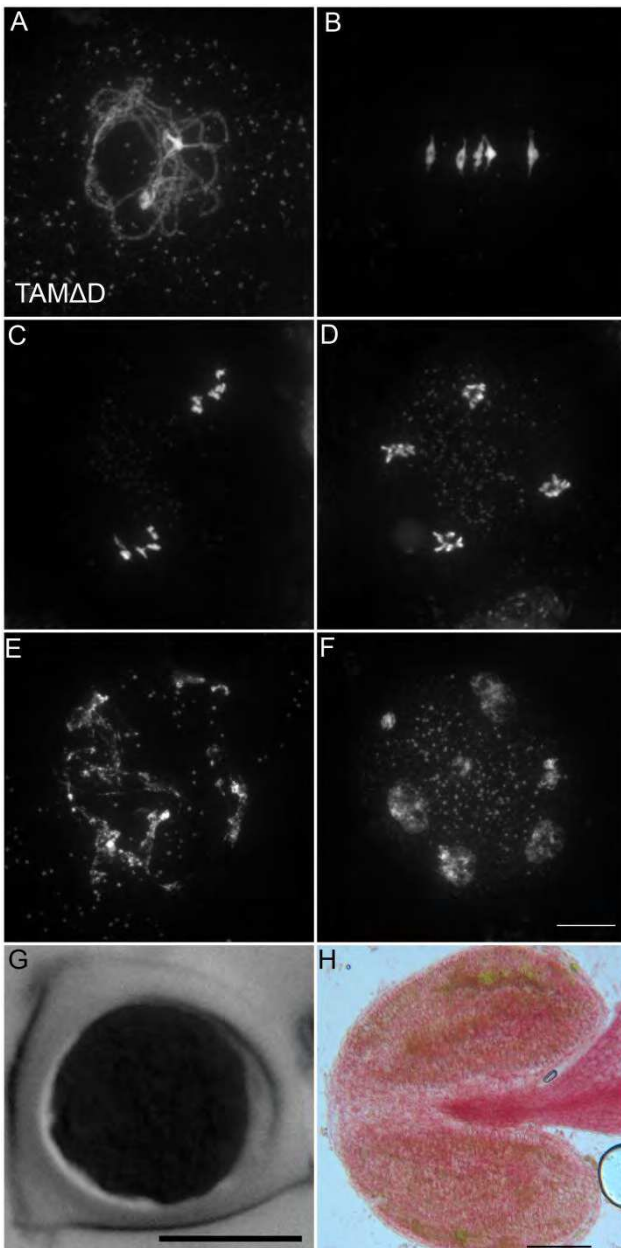
Epistasis analysis between OSD1, CYCA1;2/TAM and TDM

Only a few genes involved in control of the male meiotic cell cycle have been described in plants. Two mutants provoke premature exit before meiosis II – *osd1* and *cyca1;2/tam* (d'Erfurth et al., 2009, 2010; Wang et al., 2010). In contrast, *tdm* mutation prevents exit from meiosis and provokes entry into a third round of division (meiosis III) after meiosis II (Ross et al., 1997; Glover et al., 1998; Bulankova et al., 2010) (Figure 5). The *tdm-3* mutant is a newly described T-DNA allele which has the same phenotype as previously described *tdm* mutants (Ross et al., 1997; Glover et al., 1998). We studied the epistatic relationship between *osd1-3*, *tam-2* and *tdm-3* during male meiosis (Figure 6, S4 and S5), completing prior work (Bulankova et al., 2010; d'Erfurth et al., 2010). As previously described with different alleles

Article2 - Figure 7 : CDKA;1 is activated by CYCA1;2/TAM and phosphorylates OSD1 *in vitro*.



HisMBP-CYCA1;2/TAM was co-expressed with StrepIII-CDKA;1 and GST-Cak1 in *E. coli*. HisMBP-CYCA1;2/TAM proteins were purified by means of a Ni-NTA column. HisMBP-OSD1 (Top) or Histone H1 (middle) were used as substrates in the kinase reaction. Coomassie blue staining of the gel shows equal loading of the respective substrate. StrepIII-CDKs co-purified with HisMBP-CYCA1;2/TAM were detected with strep-tactin HRP, showing identical amount of the kinases in each reaction (bottom).



Article2 - Figure 8 : TAM Δ D provokes the entry into a third meiotic division

(A to F) Meiotic spreads of wild type plants transformed by TAM Δ D. (A) Pachytene. (B) Metaphase I. (C) Metaphase II. (D) late anaphase II (E) Aberrant third division (F) Resulting telophase III with seven nuclei. (G) Meiotic product stained by toluidine blue. Scale bar = 10 μ M. (H) Alexander staining of an anther, showing the complete absence of pollen grains (Compare to figure S5A). Scale bar = 100 μ M

(Bulankova et al., 2010), the *tam-2/tdm-3* double mutant had the same phenotype as *tdm-3*, with a third division of meiosis (Figure 6 and S4) and complete male sterility (Figure S4). In clear contrast, the double mutant *osd1-3/tdm-3* was male fertile (Figure S5) and meiocytes exited meiosis before meiosis II, like in the single *osd1-3* mutant (Figure 6 and S4). Thus, depletion of TDM enables entry into meiosis II in *tam* but not *osd1* mutants. SMG7, which controls meiosis II exit through TDM (Bulankova et al., 2010), exhibits the same epistatic relationship with CYCA1;2/TAM and OSD1 as TDM (i.e. *osd1-3* is epistatic to *smg7-1*; which is epistatic to *tam-2* (Bulankova et al., 2010), data not shown).

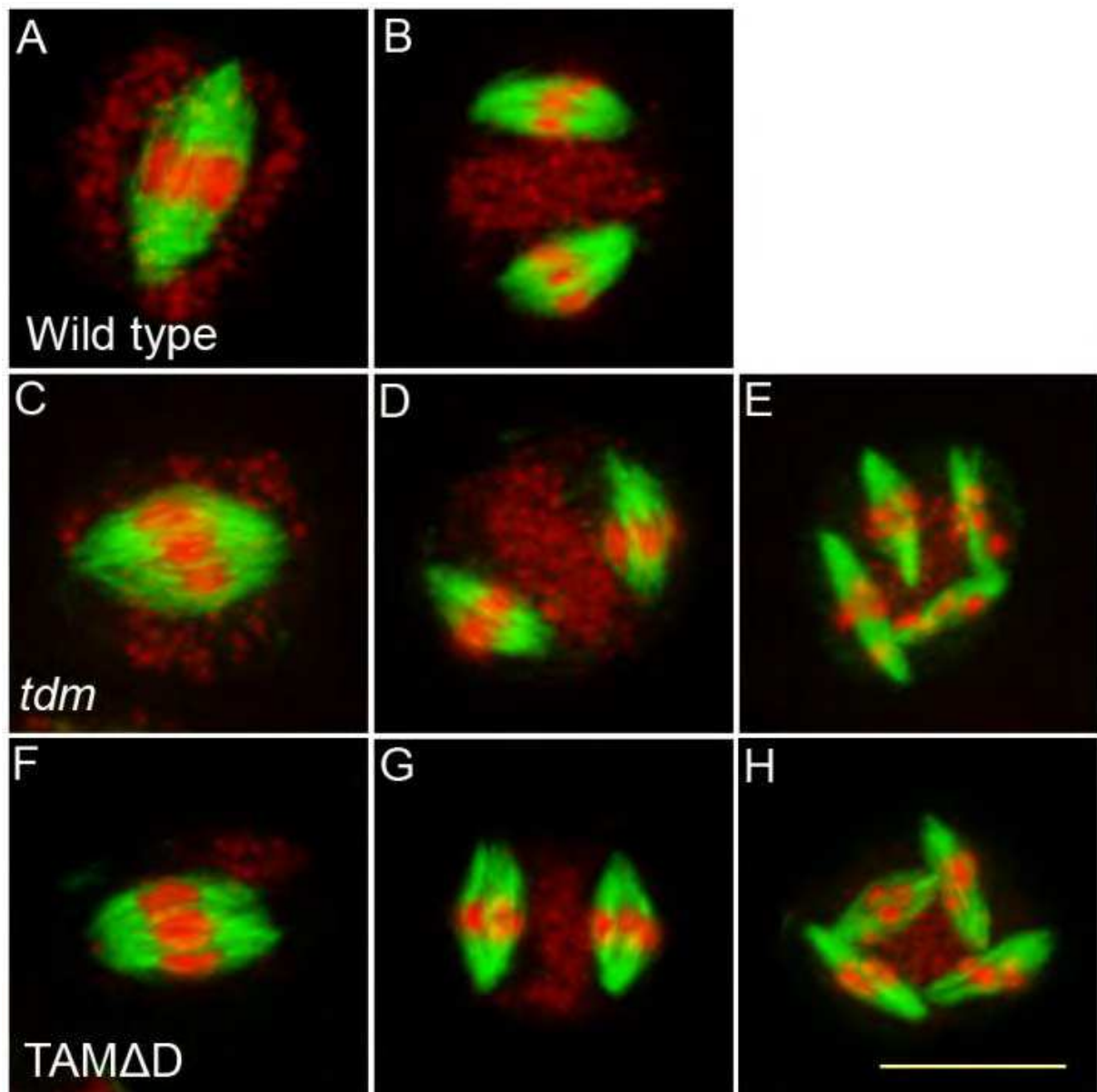
As we described previously with different alleles (d'Erfurth et al., 2010), meiocytes in the *osd1-3/tam-2* double mutant exit meiosis after a normal prophase I, without entering the first division (Figure 6 and S4). In the triple mutant *osd1-3/tam-2/tdm-3* all male meiocytes progressed through meiosis I but arrested at telophase I, before cytokinesis (Figure 6, and S4) leading to male sterility (Figure S5). Thus, mutating *TDM* allows *osd1-3/tam-2* to enter and progress into meiosis I. Notably, in contrast to the situation for the single *tam-2* mutant, mutating *TDM* in the *osd1-3/tam-2* double mutant does not completely suppress the *tam-2* defect, as the triple mutants are sterile and arrest at telophase I (no cytokinesis) whilst *osd1-3* plants are fertile and exit from meiosis after telophase I.

CYCA1;2/TAM-CDKA;1 phosphorylates OSD1 *in vitro*

OSD1 contains 7 predicted CDK phosphorylation sites (4 [S/T]P and 3 [S/T]Px[R/K]), five of them being well conserved (Figure S1), suggesting that it could be the target of a CDK. Co-precipitation assays from *E. coli* expressed proteins showed that CYCA1;2/TAM binds to all three kinases: CDKA;1, CDKB1;1 and CDKB2;2, although CDKA;1 appears to have a higher affinity to CYCA1;2/TAM than the others (Figure 7). However, a subsequently performed kinase assay revealed that only CYCA1;2/TAM-CDKA;1 but not CYCA1;2/TAM-CDKB1;1 or CYCA1;2/TAM-CDKB2;2 is active against both OSD1 and the generic substrate histone H1. These results suggest a regulatory interaction between CYCA1;2/TAM-CDKA;1 and OSD1 in meiosis.

CYCA1;1 has no apparent meiotic function

CYCA1;2/TAM is likely not the sole cyclin promoting meiosis progression because male meiosis continues until the end of the first division in *tam-2* mutants. Female meiosis is less affected than male meiosis, as 60% of the female gametes are haploid, produced by a complete meiosis (d'Erfurth et al., 2010). Among the 10 *Arabidopsis* A-type cyclins, CYCA1;1 is the most similar to CYCA1;2/TAM (Wang et al., 2004a) and therefore a good candidate to have similar, possibly redundant, functions to those of CYCA1;2/TAM. We thus characterized an *Arabidopsis* line carrying a T-DNA insertion in *CYCA1;1* (*cyca1;1-1*, see M and M) which displayed no defects during meiosis and produced normal diploid progeny. Further, the double mutant *cyca1;1-1/tam-2* exhibited the same meiotic phenotype and produced similar frequencies of haploid/diploid gametes as *tam-2* (70% triploids and 30% tetraploids among



Article2 - Figure 9 : Four spindles form at meiosis III in TAM Δ D plants

Immunolocalization of tubulin during meiosis. DNA appears in red and tubulin in green. (A and B) Wild type. One spindle is visible at metaphase I (C) and two at metaphase II (B). (A to C) *tdm*. After regular meiosis I (C) and meiosis II (D), *tdm* meiocytes enter a third division of meiosis with the formation of four spindles (E) (Bulankova et al., 2010). (F to H) Wild type transformed by TAM Δ D. Like in *tdm*, TAM Δ D meiocytes perform a third meiotic division with the formation of four spindles (H).

the progeny of selfed double mutant). Hence, *CYCA1;1* does not appear to have a meiotic function.

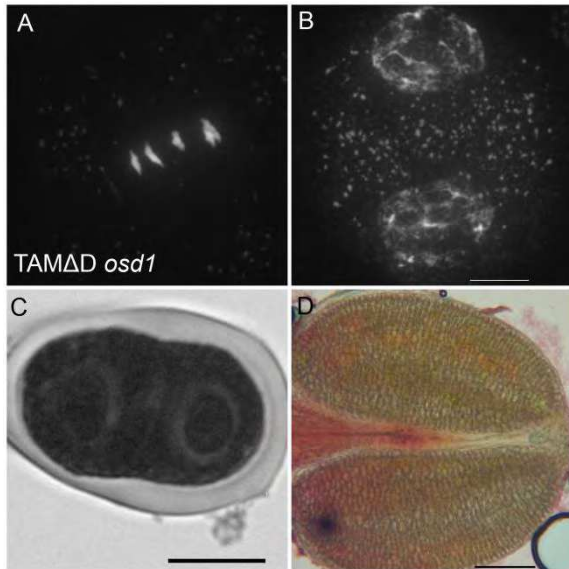
Expression of a non-destructible *CYCA1;2/TAM* provokes the entry into an aberrant third meiotic division, mimicking the *tdm* phenotype

Like many cyclins, *CYCA1;2/TAM* possesses a D-box (Wang et al., 2004b), a domain essential for cyclin destruction by the APC/C. We thus created a genomic version of the *CYCA1;2/TAM* gene, including endogenous promoter and terminator, with a D-box mutation (*TAMΔD*, RxxL→GxxV). The corresponding wild type construct rescued the *tam-2* meiotic defect (n=5, 100% tetrads). In contrast, the introduction of *TAMΔD* in either wild type or *tam-2* mutant (n=8), generated a dominant effect on male and female meiosis. Plants containing the *TAMΔD* transgene produced only monads and were completely male and female sterile (Figure 8). No somatic phenotype was observed, strongly suggesting that *CYCA1;2/TAM* functions specifically at meiosis. Meiotic chromosome spreads showed that meiosis in *TAMΔD* plants progressed through meiosis I and meiosis II, up to telophase II ((Figure 8 A-D). But then, meiosis entered into an aberrant third division of meiosis, with stretched chromosomes dispersed throughout the cell, and no cytokinesis (Figure 8 E-F). Immunolocalization of tubulin, confirmed that meiocytes expressing *TAMΔD* entered a third meiotic division, with the formation of four spindles (Figure 9), like previously shown for the *tdm* mutant (Bulankova et al., 2010). When *TAMΔD* was introduced in *tdm-3* (n=5), meiosis progressed through meiosis I and meiosis II, and entered into the third division of meiosis typical of *tdm* or *TAMΔD* (not shown). In contrast, when *TAMΔD* was introduced into *osd1-3* (n=5), meiosis progressed through meiosis I and arrested at telophase I, without entering meiosis II (Figure 10). Unlike single *osd1-3*, cytokinesis did not occur (Figure 10C), the meiotic product did not develop into pollen grains, and the plants were sterile (Figure 10D).

OSD1 and UVI4 are synthetically essential for female gametogenesis and somatic growth.

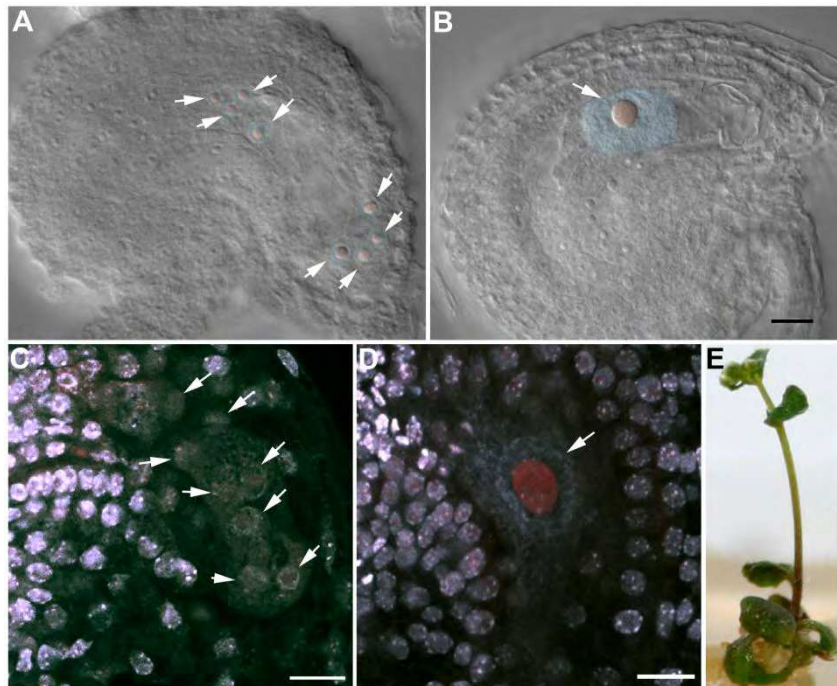
When *UVI4*, the *OSD1* paralogue, is mutated, an increase of somatic endoreduplication and no meiotic phenotype is observed (Hase et al., 2006). It has also been recently shown that mutation of *OSD1*, in addition to its meiotic consequences, triggers ectopic endomitosis (Iwata et al., 2011). To determine the interaction between *OSD1* and *UVI4*, we aimed to produce a double *osd1/uvi4* mutant. However no double mutant was recovered from self-pollinating populations of *osd1-1+/- uvi4+/-*, *osd1-2+/- uvi4+/-*, or *osd1-2 +/- uvi4-/-* (92 double mutants expected in total, table S1). This distortion indicates that the mutation of both *OSD1* and *UVI4* leads to gametophyte and/or embryo lethality. Reciprocal crosses between *osd1-2+/- uvi4+/-* or *osd1-2+/- uvi4-/-* plants and wild-type plants showed that transmission of *osd1* and *uvi4* through male gametophyte is regular but that the transmission of the double *osd1/uvi4* mutant allele through female gametophyte is reduced by 80% (Table S1).

We observed female gametophyte development in *osd1-2+/- uvi4-/-* plants, in which 50% of the gametophytes are expected to inherit the double *osd1/uvi4* mutation. Wild type female



Article2 - Figure 10 : TAMΔD in *osd1*

(A and B) Meiotic spreads of *osd1-3* transformed by TAMΔD. (A) Metaphase I. (B) Telophase I. (C) Meiotic product stained by toluidine blue. Scale bar = 10μM. (D) Alexander staining of an anther, showing the complete absence of pollen grains. Scale bar = 100μM



Article2 - Figure 11 : OSD1 and UVI4 are synthetically essential for female gametogenesis and somatic growth.

(A and B) Cleared female gametophyte. Nuclei and nucleoli have been artificially highlighted in blue and red, respectively. (A) Wild type at the 8 nuclei stage. A nucleolus is visible in the center of each nucleus (arrows) (B) A female gametophyte in the *uvi4 +/- osd1-2 +/-* plant at a comparable stage, showing a single giant nucleus with a massive nucleolus. (C to D) Double staining of female gametophytes with DAPI and propidium iodide. The DNA is stained in blue and the nucleoli appear in red. (C) Wild type at the 8 nuclei stage (arrows) (D) One female gametophyte in *uvi4 +/- osd1-2 +/-* containing a single large nucleus with a great amount of DNA, and a large nucleolus. Scale bar = 10μM. (E) A 5 weeks old *osd1/uvi4* double mutant. Scale bar=5mm.

gametophyte development includes three haploid mitotic events, leading to the formation of eight nuclei (Figure 11A and 11C). In *osd1-2+/- uvi4-/-*, 58% (n=371) of the gametophytes showed wild type-like development, the others being blocked at a 1 cell (37%) or 2 cell stage (5%) (Figure 11B). These arrested cells had a very large nucleus, with an increased DNA content (compare figure 11C and 11D), suggesting a defect in mitotic cell cycle. Both genetic and cytological data suggested that some *osd1/uvi4* female gametophytes may be viable, prompting us to look further for double mutant plants. Among approximately 13,000 seeds of an *osd1-2+/- uvi4-/-* plant sown *in vitro*, 25 very abnormal plants were identified and confirmed by genotyping to be *osd1-2-/- uvi4-/-*. These plants, due to strongly affected growth, measured at most 2 cm after 5 weeks (Figure 11E), while wild type plants of the same age were fully developed and about 30 cm high. Altogether, these results show that OSD1, beyond its meiotic function has an essential function, redundantly with UVI4, in gametophyte and somatic growth.

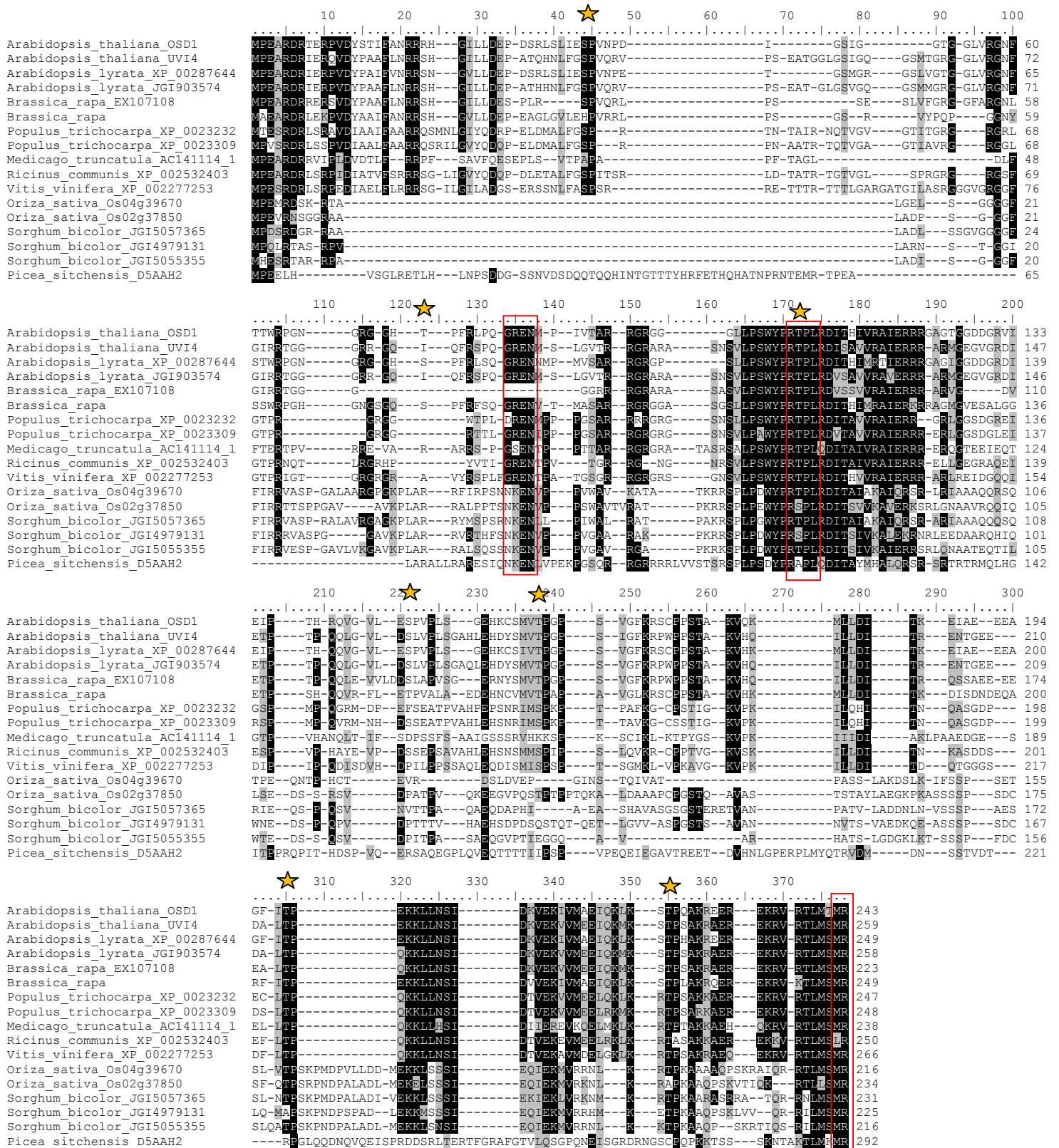
DISCUSSION

OSD1, CYCA1;2/TAM and TDM form a regulatory network that control the key transitions of meiosis.

Our and previously published data suggest that a functional network between OSD1, CYCA1;2/TAM and TDM controls three key transitions of meiosis (prophase-meiosis I, meiosis I-meiosis II and meiosis II-exit) : (i) OSD1 and CYCA1;2/TAM act in a synergetic manner to promote the transition from prophase to meiosis I, as the double mutant fails to enter meiosis I. TDM, appears to repress this transition as its mutation restores the entry into meiosis I of the *osd1-3/tam-2* double mutant. (ii) OSD1 and CYCA1;2/TAM are crucial for the meiosis I-meiosis II transition as both single mutant exit meiosis before meiosis II. TDM also appears to repress this transition as its mutation allows the *tam-2* mutant to enter meiosis II. Interestingly, OSD1 appears to be absolutely essential for the entry into meiosis II as *osd1* mutants never entered this phase in all the backgrounds we tested. (iii) TDM and CYCA1;2/TAM are also involved in the exit from meiosis II, to prevent entry into a third meiotic division. Indeed, the mutation of TDM or the expression of a non-destructible version of CYCA1;2/TAM provokes the entry into a third division of meiosis. It is unclear if OSD1 could also be involved in this transition, as *osd1* mutants never reach this stage. Further investigation is required to understand how this network is fine tuned to allow entry into a division after prophase and after meiosis I but to allow exit after meiosis II.

OSD1 is a meiotic APC/C inhibitor

Control of APC/C activity is fundamental for regulation of cell cycle progression. The APC/C is an E3 ubiquitin ligase that triggers the degradation of multiple proteins, including cyclins, at meiosis and mitosis (Pesin and Orr-Weaver, 2008). Several APC/C inhibitors with crucial functions at mitosis or meiosis have been identified in various eukaryotes (e.g. EMI1 and EMI2/ERP in vertebrates, Mes1 in *S. pombe*, Mnd2 and Acm1 in *S. cerevisiae*), but these



Article2 - Figure S1 : T-Coffee alignment of OSD1 and UVI4 plant proteins

Identical or similar residues conserved in more than 50% of the proteins are shaded in black and grey, respectively. Red rectangles indicate the GxEN/KEN-box, D-box and MR-tail. Stars point to putative phosphorylation sites.

proteins are not conserved between kingdoms. An independent study recently showed that OSD1 negatively regulates the APC/C to prevent endo-mitosis during somatic development (Iwata et al., 2011). Here we propose that OSD1, similar to Mes1 in *S. pombe* and Emi2 in vertebrates, promotes meiotic progression through APC/C inhibition. Indeed, OSD1 interacts directly with activator subunits of the APC/C, as shown by both TAP and Y2H experiments (ours and Iwata et al results (Iwata et al., 2011)). In addition, expression of OSD1 in mouse oocytes provokes meiotic arrest at metaphase I, consistent with APC/C inhibition.

Similar to Mes1, OSD1 contains three APC/C interaction domains, a D-box, a GxEN/KEN-box and a MR-tail. Both the interaction with the APC/C and the *in planta* meiotic function of OSD1 are dependent on its D-Box domain and its MR tail, suggesting that OSD1 inhibits the APC/C through direct binding with its active site or by sequestering its activators. Remarkably, the OSD1 GxEN-box is not required for OSD1 function, but its mutation allows the OSD1 protein mutated in its D-Box to fulfill its function. However, the three domains (D-box, GxEN/KEN-box and a MR-tail) are required to provoke meiotic arrest when OSD1 is overexpressed in mouse oocytes.

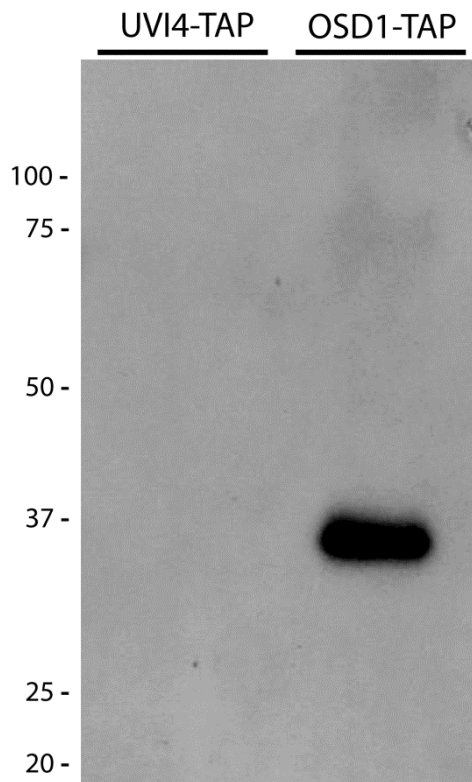
The modulation of the cell cycle machinery that permits the entry into a second division without an intervening replication at meiosis seems to be fulfilled in various eukaryotes thanks to apparently evolutionary unrelated APC/C inhibitors, Mes1 in *S. pombe*, Emi2 in vertebrates and OSD1 in plants. Interestingly, OSD1 and Emi2 both have a paralogue in their respective genomes, UVI4 and Emi1 respectively, that play roles in the mitotic cell cycle through APC/C regulation (Pesin and Orr-Weaver, 2008; Heyman et al., 2011). However, contrary to Mes1, OSD1 has also a somatic function as revealed by the mitotic phenotype of the single *osd1* mutants (Iwata et al., 2011) and the strong gametophytic and somatic defects of the *osd1/uvi4* double mutant.

What could be the function of TDM?

The molecular function of TDM is unknown. However, four TPR domains (AA 61-191) were predicted with high probability in TDM ($P= 8.0E-12$) (Biegert et al., 2006). Further, using remote similarity searches *via* HHpred (Söding et al., 2005), we found that CUT9 (a TPR-containing APC/C component, appeared as the first hit (Protein Data Bank entry 2xpi_A, $E = 0.00095$). APC16, another TPR-containing APC/C component also appeared among the first hits (3hym_B, $E = 0,0022$). This raised the possibility that TDM may interact with or may be a component of the APC/C, and thus promotes meiotic exit *via* APC/C-mediated cyclin destruction.

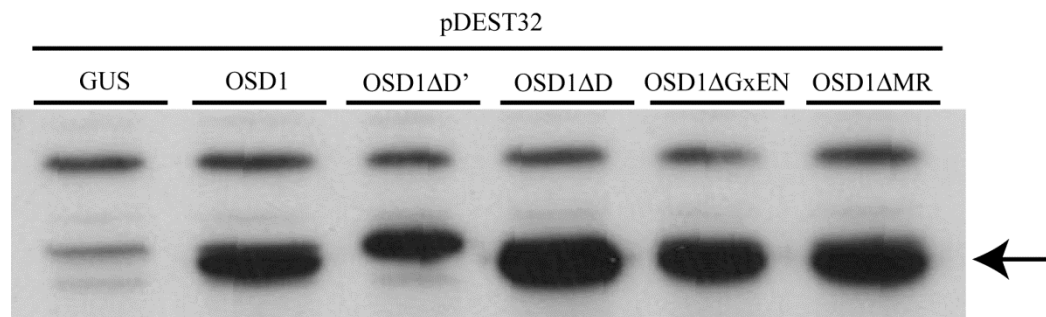
What could be the function of CYCA1;2/TAM?

CDKA;1 appears to be a major cyclin-dependent kinase that drives meiotic progression in plants (Dissmeyer et al., 2007; Bulankova et al., 2010). However, the cyclin(s) forming (with CDKA;1) the predicted core cyclin/CDK meiotic oscillator has/have not been identified yet. Two cyclins have been shown to have an essential role at meiosis, CYCA1;2/TAM and SDS. However, SDS has been shown not to affect meiotic progression, but to regulate the choice



Article2 - Figure S2 : The anti-OSD1 antibody is specific

Probing of UVI4 and OSD1 TAP elutions with anti-OSD1 antibody shows it recognizes specifically OSD1.



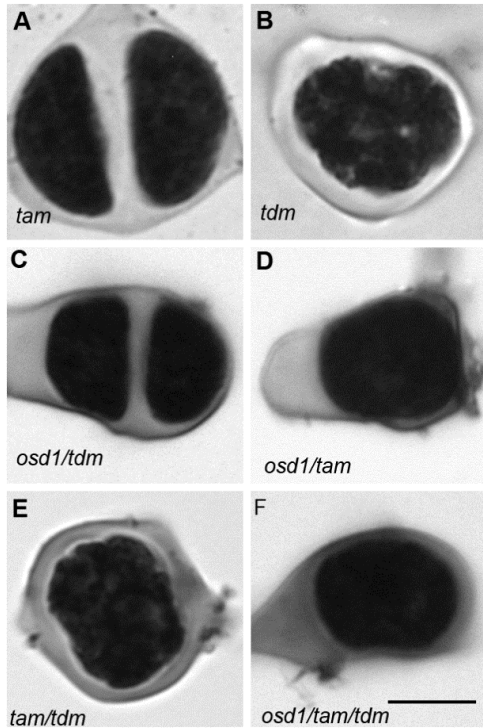
Article2 - Figure S3 : Mutated version of OSD1 are stably expressed in yeast

Protein extracts (Horvath et al., 1994) of yeasts transformed with wild type or mutated version of *OSD1* were probed with anti-OSD1 antibody. Wild type or mutated version of *OSD1* showed similar expression levels.

of the partner of homologous recombination (Azumi et al., 2002; De Muyt et al., 2009). CYCA1;2/TAM being the sole known cyclin whose mutation affects meiotic progression, appeared to be a good candidate to fulfill part of this function. Indeed the fact that *tam* null mutants exit prematurely from meiosis supports this hypothesis. We also showed here that TAM is an active cyclin as it can form an active complex with CDKA;1. However, prior evidence suggests that CYCA1;2/TAM may not be the core CDK oscillator that drives meiotic divisions (Bulankova et al., 2010). Correspondingly, we showed here that the expression of a non-destructible CYCA1;2/TAM does not provoke a meiotic arrest at metaphase/anaphase I as may be expected for the core CDK oscillator, but induces entry into a third division. Strikingly, the phenotypes induced by the *tdm* mutation or the expression of non-destructible CYCA1;2/TAM appear identical, suggesting that TDM and TAM act in an antagonist manner to promote and prevent exit from meiosis, respectively. In addition, *tdm* is epistatic to *tam-2*. Two hypotheses may account for these results (Figure S6). (i) CYCA1;2/TAM could be a negative regulator of TDM, which itself promotes meiotic exit, maybe through APC/C activation. (ii) Alternatively, another cyclin(s) (distinct from CYCA1;1 as shown here) might, together with CYCA1;2, promote directly meiosis progression in a dose-dependent manner. The function of TDM could be to negatively regulate these cyclins, possibly through activation of the APC/C that would clear the cell from the remaining cyclins at the end of the meiotic program. Further work is required to discriminate between these hypotheses (Figure S6).

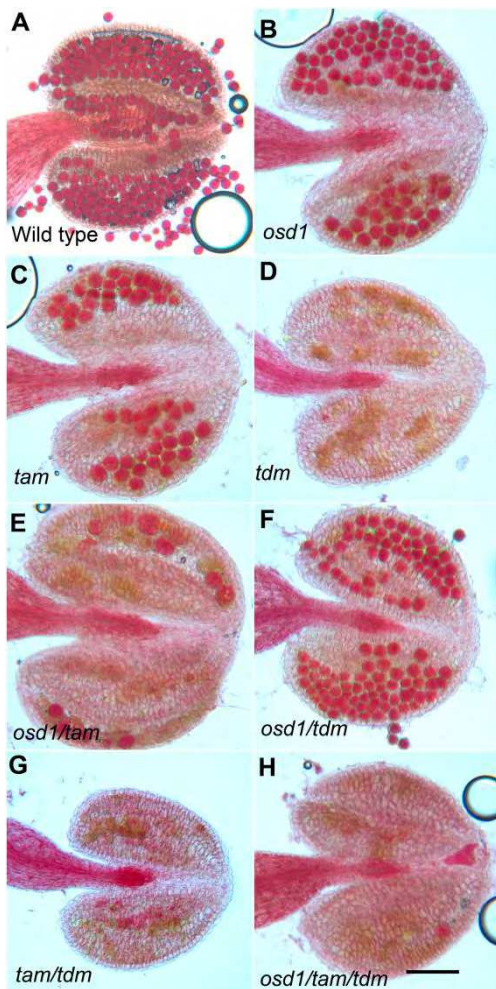
We also showed that the CYCA1;2/TAM-CDKA;1 complex phosphorylates OSD1, at least *in vitro*. This suggests that TAM could regulate OSD1 to prevent precocious meiotic exit. Alternatively, phosphorylation by TAM could inactivate OSD1 and thus allow exit from meiosis I. Interestingly, the activity and stability of Emi2/Erp1 - the vertebrate meiotic APC/C inhibitor - is regulated by phosphorylation (Tang et al., 2008b; Isoda et al., 2011). Further functional analysis of the OSD1 putative phosphorylation sites is required to establish the role of this CYCA1;2/TAM-CDKA;1-mediated phosphorylation in meiotic cell cycle progression.

These are the early days of meiotic cell cycle studies in plants, and already a complex regulatory network has emerged. Further studies are required to understand the control of meiotic progression in plants, and notably one of the next important goals is to establish which cyclin(s) constitutes the core meiotic progression oscillator and which activators of the APC/C (among the five putative CDC20 and three CDH1) are involved in this complex variation of the cell cycle.



Article2 - Figure S4 : Meiotic product stained by toluidine blue

(A) *tam-2*. (B) *tdm-3*. (C) *osd1-3/tdm-3*. (D) *osd1-3/tam-2*. (E) *tam-2/tdm-3*. (F) *osd1-3/tam-2/tdm-3*. Scale bar = 10 μ M



Article2 - Figure S5 : Alexander staining of anthers.

Viable pollen grains are stained in red. (A) Wild type. (B) *osd1-3* (C) *tam-2*. (D) *tdm-3*. (E) *osd1-3/tam-2*. (F) *osd1-3/tdm-3*. (G) *tam-2/tdm-3*. (H) *osd1-3/tam-2/tdm-3*. Scale bar = 100 μ M

MATERIALS AND METHODS

Growth Conditions and Genotyping

Arabidopsis plants were cultivated in greenhouse as previously described (Vignard et al., 2007) or *in vitro* on *Arabidopsis* medium (Estelle and Somerville, 1987) at 21°C, under a 16-h to 18-h photoperiod and 70% relative humidity.

For epistasis studies, we used *osd1-3*, *tam-2* and *tdm-3*, alleles that are all in the same genetic background (Col-0), to prevent any genetic complication. The T-DNA of the *tdm-3* mutant (SALK_034202) is inserted in the second exon (ATG+609pb). In the *cyca1;1-1* (pst18025), the T-DNA insertion is in the fifth exon (ATG+1415pb). The *tdm-3* and *cyca1;1-1* mutants were genotyped by PCR by two primer pairs. The first pair is specific to the wild type allele and the second to the left border of the inserted sequence. *tdm-3*: N534202U (5'-GGAGATCGAGTTGATAGTGC-3') & N534202L (5'-ATACTAGGGAAGCTGGGCT-3') ; N534202U & LbB1 (5'-GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT-3'); *cyca1;1-1* : pst18025U (5'-TTGATTGCTTGGTATTGCAG-3') & pst18025L (5'-TGGTCGTCTTGTTGGGTCTAG-3') ; pst18025L & Ds5-2a (5'-TCCGTTCCGTTTTTCGTTTTTTAC-3'). The primers used to genotype *tam-2*, *osd1-1*, *osd1-2* and *osd1-3* were previously described (d'Erfurth et al., 2009, 2010; Heyman et al., 2011). The *uvi4* mutant (*pym*) (Hase et al., 2006) was genotyped by CAPS using the primers: *pymU* (5'-GGAGTGCTCTTCATTTTCTG-3'), *pymL* (5'-TCTCATTTTGGATTTGTCTG-3') and the restriction enzyme *BsuRI* (419pb + 158pb for the mutant versus 286pb + 133pb + 158pb for the wild type allele).

Sequence analysis

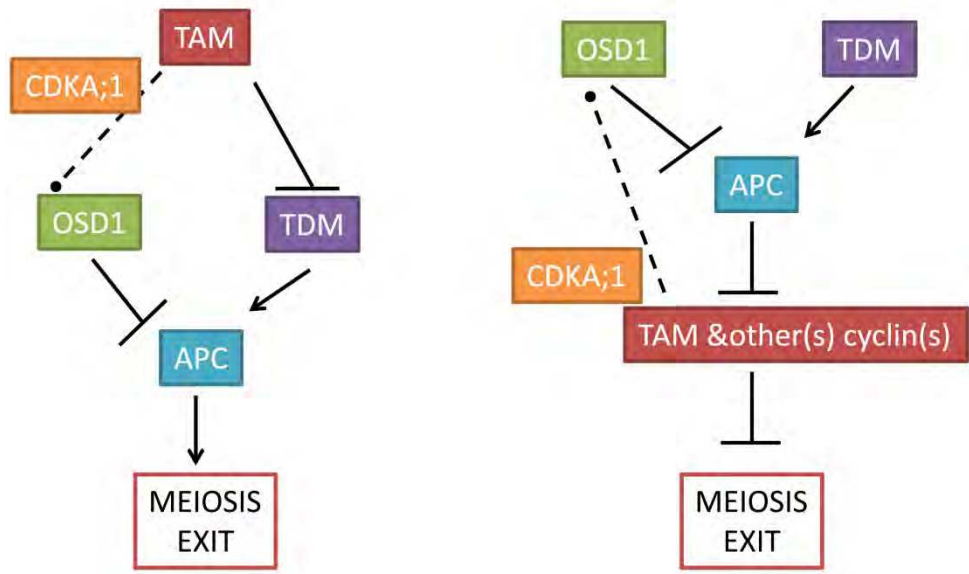
HHpred searches were performed on user defined query alignment, without automatic PSI-BLAST enrichment of the query set and by using otherwise default settings (Söding et al., 2005; Biegert et al., 2006). The alignment of OSD1 proteins was performed with T-Coffee using default settings (Notredame et al., 2000; Biegert et al., 2006).

Tap-Tag/ Y2H

Tandem affinity purification constructs were generated and purified as described previously (Van Leene et al., 2007). UVI4, OSD1, CDC20.1, CDC20.3, CCS52A1, CCS52A2 and CCS52B tandem purified baits were separated by SDS-PAGE and probed with an anti-OSD1 antibody after western blotting. Yeast 2-hybrid interaction testing using OSD1 as bait (pDEST32) with different APC/C subunits as prey (pDEST22) was performed by mating, as described previously (Heyman et al., 2011). For mutant allele interaction screening, *OSD1* mutant alleles were tested as bait (pDEST32) against CCS52A1 as prey (pDEST22) and introduced in the yeast PJ69-4a strain by cotransformation.

Mouse Oocytes

GV stage oocytes were harvested from 9-16 weeks old CD-1 (Swiss) mice (Janvier), injected and analyzed by live imaging essentially as described in (Hached et al., 2011). H2B-RFP (gift from Z. Polanski, Cracow, Poland) mRNA was synthesized with the T3 mMessage Machine kit



—| Inhibition/destruction
 —> Stimulation
 - - - • Phosphorylation

Article2 - Figure S6 : Two alternative models for the OSD1, CYCA1;2/TAM and TDM functional network.

(Ambion) according to the manufacturer's instructions. For live imaging, a motorized inverted Nikon TE2000E microscope (Plan APO 20x/0,75NA objective) with PrecisExite High Power LED Fluorescence (LAM 1: 400/465, LAM2: 585), equipped with a temperature chamber (Life Imaging Services), Märzhäuser Scanning Stage, CoolSNAP HQ2 camera, and controlled by Metamorph software was used. Timepoints were taken every 20 minutes. Images were treated with ImageJ software. Immunofluorescence studies on formaldehyde fixed prometaphase I oocytes with anti-Osd1 antibody (1:150), and chromosome spreads of metaphase II oocytes were performed as described in (Hached et al., 2011).

Phosphorylation

OSD1 cDNA was amplified by sequential PCR first using attB1Ad-OSD1_s (5'-AAAAAGCAGGCTTCATGCCAGAAGCAAGAGATCG-3'), attB2Ad-OSD1_as (5'-AGAAAGCTGGGTCTCATCGCATAGTCATTAAGTCCG-3') followed by attB1 adapter primer (5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'), attB2 adapter primer (5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'). The PCR product was cloned, by Gateway (Invitrogen), into the pDONR223 vector (Invitrogen). A recombination reaction was performed between the resulting entry clone and a destination vector pHMGWA (Busso et al., 2005). *E. coli* SoluBL21 cells (AMS Biotechnology) were transformed with the resulting destination clone, and grown in LB medium containing 100 µg/ml ampicillin until OD₆₀₀=0.6 at 37°C. The culture was transferred to 18°C and grown for 30 min. The production of the fusion protein was induced by adding 0.3 mM IPTG (isopropyl-β-d-thiogalactopyranoside, Thermo scientific) overnight at 18°C. Cells were harvested by centrifugation and re-suspended in Ni-NTA binding buffer (50 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 10%(v/v) glycerol, 25 mM imidazole, pH 8.0), and lysed by sonication. After addition of Triton X-100 to 0.2%(w/v), the cell slurry was incubated at 4°C then clarified by centrifugation. The supernatant was passed through a column packed with Ni-NTA resin (Qiagen), which was washed sequentially with Ni-NTA binding buffer followed by kinase buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA) containing 150 mM NaCl, and eluted with kinase buffer containing 150 mM NaCl and 200 mM imidazole. CYCA1;2/TAM cDNA was cloned into pHMGWA as described above by using primers attB1Ad-TAM_s (5'-AAAAAGCAGGCTTCATGTCTTCTTCGTCGAGAAATCTATC-3') and attB2Ad-TAM_as (5'-AGAAAGCTGGGTCTCAGAGGAAAAGCTCTTGCG-3') followed by attB1 adapter primer and attB2 adapter primer. CYCA1;2/TAM-CDK complexes were prepared from *E. coli* as described (Harashima and Schnittger, 2012). Kinase reactions were performed as described in (Harashima and Schnittger, 2012) using kinase buffer. In the case of OSD1, kinase buffer containing 150 mM NaCl was used.

Cytology

Observation of final male meiotic products and chromosomes spreads were carried out as previously described (Ross et al., 1996; Azumi et al., 2002) and observed with a ZEISS AxioObserver microscope. Observation of developing ovule by DIC and confocal microscopy

		offspring genotype									
		<i>osd</i> -/ <i>uvi4</i> -/	<i>osd</i> +/ <i>uvi4</i> +/	<i>osd</i> +/ <i>uvi4</i> +/	<i>osd</i> -/ <i>uvi4</i> +/	<i>osd</i> -/ <i>uvi4</i> +/-	<i>osd</i> +/ <i>uvi4</i> +/-	<i>osd</i> +/ <i>uvi4</i> +/-	<i>osd</i> +/ <i>uvi4</i> -/	<i>osd</i> +/ <i>uvi4</i> -/	
Selfing	Parental genotype										
	Expected	6,25%	6,25%	12,50%	6,25%	12,50%	12,50%	25,00%	6,25%	12,50%	
	observed <i>osd1-1 +/- uvi4 +/-</i> (n=169)	0,00%	6,50%	28,40%	4,14%	4,73%	15,90%	24,85%	10,65%	4,73%	
	observed <i>osd1-2 +/- uvi4 +/-</i> (n=224)	0,00%	7,14%	13,83%	8,49%	5,80%	23,21%	22,76%	4,91%	13,83%	
Selfing	Expected	25,00%							25,00%	50,00%	
	observed <i>osd1-2 +/- uvi4 -/</i> (n=272)	0,00%							45,00%	55,00%	
Backcrosses	Expected		25,00%	25,00%		25,00%	25,00%				
	observed WT♀ x <i>osd1-2 +/- uvi4 +/-</i> ♂ (n=76)		30,30%	19,70%		30,30%	19,70%				
	observed <i>osd1-2 +/- uvi4 +/-</i> ♀ x WT ♂ (n=53)		35,80%	30,20%		32,10%	1,90%				
Backcrosses	Expected					50,00%	50,00%				
	observed WT♀ x <i>osd1-2 +/- uvi4 -/</i> ♂ (n=68)					55,90%	44,10%				
	observed <i>osd1-2 +/- uvi4 -/</i> ♀ x WT ♂ (n=44)					91,00%	9,00%				

Article2 - Table S1 : Genetic analysis of *osd1/uvi4* transmission.

was performed as described by Motamayor et al (Motamayor et al., 2000). Alexander staining was performed according to (Alexander, 1969).

Immuno-localization of tubulin

Inflorescence were fixed in ethanol:acetic acid (3:1) and digested for 1h as described in (Ross et al., 1996). Meiocytes were squashed and immobilized on polysin slides as described in (Mercier et al., 2001b), digested again for 30 min at 37°C in the digestion medium described in (Ross et al., 1996) and subsequently incubated one hour in PBS 1% Triton at room temperature. After 2 rinses with PBS 0.1% Triton, slides were incubated overnight at 4 ° C in primary antibodies (mouse anti-tubulin (Sigma T5168) diluted at 1/300 in PBS, 1% BSA, then washed in PBS, 0.1% Triton 5 times for 10 min. After 2h of incubation at 37 ° C with the secondary antibodies in PBS 1% BSA, slides were washed in PBS 0.1% Triton 5 times for 10 min and mounted in Vectashield antifade medium (Vector Laboratories) with 80µg/ml propidium iodide. Images were acquired with Zeiss Apotome.

OSD1 antibody

An anti-OSD1 antibody was raised against a full-length recombinant protein as described in (Vignard et al., 2007).

Directed Mutagenesis constructs and Plant transformation

OSD1 and CYCA1;2/TAM genomic fragment were amplified by PCR using OSD1 U (5'-CATATAAGCCTTGACCCTCTTTC-3'), OSD1 L (5'-AGAAACCACCGAACTTGTGAAGA-3') and TAM U (5'-CCAGTCACCACAATACACAC-3'), TAM L (5'-GCGGTTTGGGTTGGTTTTTGT-3'). The amplification for OSD1 covered 1603 nucleotides before the ATG and 170 nucleotides after the stop codon. The amplification for CYCA1;2/TAM covered 1495 nucleotides before the ATG and 493 nucleotides after stop codon. The PCR product was cloned, by Gateway (Invitrogen), into the pENTR vector (Invitrogen), to create pENTR-OSD1 and pENTR-TAM, respectively, on which directed mutagenesis was performed using the Stratagene Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit. The mutagenic primers used to generate the OSD1ΔD, OSD1ΔGXEN and OSD1ΔMR mutations were (5'-GCCTTCTTGGTATCCAGGAACACCTGTACGCGACATAAC-3'), (5'-GATTGCCACAGGCAAGAGCGGCTATGCCCATAG-3') and (5'-GGTGCGGACTTTAATGACTTAGCGATGATCTTTACTTAGG-3') respectively. The mutagenic primers used to generate the TAMΔD were (5'-GTTGGAAACCGTGGTGCTCCCCTCGGCGACATCACAATC-3'). To generate binary vectors for plant transformation, an LR reaction was performed with the binary vector for the Gateway system, pGWB1(Nakagawa et al., 2007). The resulting binary vectors, pOSD1, pOSD1ΔD, pOSD1ΔGXEN, pOSD1ΔMR, pOSD1ΔDΔGXEN, pOSD1ΔDΔMR, pOSD1ΔDΔGXENΔMR and pTAM, pTAMΔD, were transformed using the Agrobacterium-mediated floral dip method (Clough and Bent, 1998), on plant populations segregating for the *osd1-3*, *tam-2* or *tdm-3*

mutation. Transformed plants were selected on agar plates containing 50 mg/L kanamycin for OSD1 constructs and 20 mg/L hygromycin for CYCA1;2/TAM constructs, respectively.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Nathalie Vrielynck and Daniel Vezon for technical help. Wayne Crismani and Andrew Lloyd improved the English of the manuscript.

4. Données supplémentaires

Nous avons mis en évidence qu'OSD1 interagit avec les activateurs de l'APC/C. Comme indiqué précédemment, un mutant *Spcdc20* supprime le phénotype d'absence de seconde division méiotique d'un mutant *Spmes1* (Izawa et al., 2005). De la même façon, un mutant *ccs52a1* atténue le phénotype d'endoréduplication du mutant *uvi4* (Heyman et al., 2011). J'ai entrepris d'analyser le phénotype méiotique d'OSD1 en combinant la mutation *osd1* avec des mutants des activateurs de l'APC/C.

Arabidopsis possède trois homologues de CDH1 : CCS52A1, CCS52A2 et CCS52B. Les mutants *ccs52a1* et *ccs52a2* montrent une diminution du niveau de ploïdie au niveau somatique liée à un défaut de régulation de l'endoréduplication (Lammens et al., 2008; Larson-Rabin et al., 2009; Kasili et al., 2010). J'ai pu montrer qu'aucun des trois simples mutants ne présente de défaut méiotique. De même, les doubles mutants *osd1/ccs52a1*, *osd1/ccs52a2* et *osd1/ccs52b* ne présentent pas de diminution du nombre de gamètes diploïdes par rapport à un simple mutant *osd1*. Ces résultats suggèrent qu'OSD1 n'inhibe pas les APC/C^{CCS52A1}, APC/C^{CCS52A2} et APC/C^{CCS52B} au cours de la méiose. Cependant on ne peut exclure une redondance fonctionnelle en méiose entre les différents homologues de CDH1 chez *A. thaliana*. La construction de triples mutants *osd1/ccs52a1/ccs52a2*, *osd1/ccs52a1/ccs52b* et *osd1/ccs52a2/ccs52b* ou d'un quadruple mutant *osd1/ccs52a1/ccs52a2/ccs52b* pourrait permettre de déterminer si OSD1 inhibe l'APC/C^{CCS52} en méiose.

A. thaliana possède cinq gènes *CDC20* dont uniquement deux, *CDC20-1* et *CDC20-2*, sont exprimés (Kevei et al., 2011). Les mutants d'insertion dans chacun des gènes ne présentent pas de phénotype végétatif, suggérant une redondance fonctionnelle entre ces deux gènes. Comme *CDC20-1* et *CDC20-2* sont des gènes en tandem, la construction d'un double mutant est quasiment impossible. Une plante exprimant un RNAi dirigé contre les deux gènes *CDC20-1* et *CDC20-2* présente un phénotype de plantes naines et une stérilité mâle (Kevei et al., 2011). J'ai également construit un RNAi dirigé contre ces deux mêmes gènes afin d'étudier ce phénotype méiotique (voir F. Matériels et Méthodes). J'ai pu mettre en évidence que ce mutant présente des défauts méiotiques dès la métaphase I mais une caractérisation plus approfondie du phénotype est nécessaire. Un mutant RNAi de *séparase* exprimé uniquement en méiose (Liu and Makaroff, 2006) présente également des défauts en métaphase I. Une étude plus poussée de la méiose chez ces deux mutants est nécessaire pour déterminer si les défauts observés sont identiques. Cependant on peut imaginer qu'une plante exprimant un RNAi dirigé contre *CDC20* pourrait cumuler le défaut lié à l'absence de dégradation de la sécurine et des cyclines B. Dans le cas d'un mutant achiasmatique, la sécurine n'est plus requise pour séparer les homologues en première division méiotique. Ainsi la combinaison RNAi-*CDC20/spo11* devrait me permettre de m'affranchir du défaut lié à l'absence de dégradation de la sécurine. Nous avons également pu déterminer que l'absence de phénotype du côté femelle est lié à la construction RNAi. En effet l'"hairpin" dirigé contre *CDC20* est placé sous le contrôle du promoteur constitutif 35S. Des études

menées au sein de l'équipe ont montré que les constructions 35S-hairpin n'affectent pas la méiose femelle (Marta Cifuentes, données non publiées).

Au cours de ces travaux, j'ai cherché à localiser les protéines OSD1 et TAM au cours de la méiose. Des anticorps polyclonaux ont été produits. Ces anticorps reconnaissent les protéines recombinantes produites par des bactéries et l'anticorps anti-OSD1 a été utilisé pour vérifier l'expression d'OSD1 dans les oocytes de souris. Cependant l'immunolocalisation de ces protéines dans des méiocytes mâles n'a pas fonctionné. Les immunolocalisations ont été réalisées sur des étalements de chromosomes méiotiques ("spread") (Chelysheva et al., 2010) et des méiocytes entiers écrasés ("squash") (Mercier et al., 2001a; Cromer et al., 2012) sans succès. On peut facilement imaginer que ces protéines ont des durées de vie courtes au cours de la méiose dues à la présence de motifs de destruction (D-box et GxEN-box pour OSD1 et D-box pour TAM) et/ou qu'elles sont présentes en faible quantité dans des méiocytes. J'ai également observé les méiocytes de plantes contenant la construction TAM::GFP (Wang et al., 2004b). Les anthères d'*A. thaliana* sont naturellement fluorescentes à la longueur d'onde d'excitation de la GFP et je n'ai pas observé de différence de fluorescence entre des méiocytes sauvages et des méiocytes exprimant la fusion TAM::GFP.

5. Discussions et perspectives

OSD1 est un inhibiteur de l'APC/C nécessaire à la transition méiose I – méiose II. Les études réalisées sur OSD1 et UVI4 au niveau somatique ainsi que les travaux présentés ici nous indiquent qu'OSD1 et UVI4 pourraient agir comme des pseudosubstrats pour inhiber l'APC/C. OSD1 et UVI4 interagissent directement avec les activateurs de l'APC/C *via* leurs domaines D-Box et MR-Tail, ils pourraient ainsi se substituer aux cibles de l'APC/C pour inhiber leurs destructions (Heyman et al., 2011; Iwata et al., 2011). Ce mode d'inhibition de l'APC/C ressemble à celui de SpMES1 (voir Figure B.II.9). En effet, SpMES1 interagit avec CDC20 *via* ses domaines D-box et KEN-box (le rôle de la MR-tail de SpMES1 n'a pas été déterminé) et l'interaction entre SpMES1 et CDC20 est indispensable à la fonction inhibitrice de SpMES1 (Izawa et al., 2005; Kimata et al., 2008). EMI2, l'inhibiteur de l'APC/C impliqué dans la transition méiose I-méiose II chez les mammifères, agirait comme un substrat compétitif de l'APC/C (voir B.II.2.4.2). La RL-Tail d'EMI2 est indispensable à la fixation de l'inhibiteur au cœur de l'APC/C alors que la MR-Tail d'OSD1 et d'UVI4 est nécessaire à l'interaction avec les activateurs de l'APC/C. De plus, OSD1 et UVI4 ne possèdent pas de domaine ZBR comme EMI2, suggérant que ces protéines ont des rôles "apparentés" mais que les mécanismes d'inhibition de l'APC/C sont différents. Des études plus précises sont nécessaires pour déterminer le mécanisme selon lequel OSD1 et UVI4 inhibe l'APC/C.

Comme nous le montrent les études réalisées sur leur rôle somatique, OSD1 et UVI4 n'inhibent pas les mêmes formes d'APC/C, bien que OSD1 et UVI4 interagissent tous les deux avec des activateurs de type CDC20 et de type CCS52. La surexpression de *CDC20-1* aggrave le phénotype somatique d'*osd1* alors que la surexpression de *CCS52B* augmente celui d'*uvi4* (Iwata et al., 2011). De plus, le mutant *osd1* présente un phénotype de polyploïdisation de ses cellules liés à une augmentation de l'endomitose, alors que *uvi4* présente un phénotype

de polyploïdisation de ses cellules liés à une augmentation de l'endoréduplication (Iwata et al., 2011). Au niveau méiotique, d'autres études sont nécessaires pour déterminer si OSD1 inhibe spécifiquement APC/C^{CDC20} ou l'APC/C^{CCS52} ou peut-être les deux. De manière générale, les activateurs de l'APC/C pourraient faire l'objet d'analyses plus approfondies par l'étude des mutants (multi-mutants *ccs52* et une caractérisation fine du RNAi CDC20 en méiose), des surexpressions de ces gènes ou encore étude de leur localisation au cours de la méiose.

Bien que les fonctions somatiques d'OSD1 et UVI4 soient partiellement redondantes lors du développement de la plante, OSD1 et UVI4 sont impliquées dans des mécanismes différents de régulation du cycle (Heyman et al., 2011; Iwata et al., 2011). On peut alors se demander quelles sont les différences entre OSD1 et UVI4, notamment au niveau méiotique. Le mutant *uvi4* ne présente pas de défaut méiotique, suggérant qu'UVI4 n'est pas impliquée en méiose. Cependant, des différences entre ces deux gènes doivent exister pour expliquer leur spécificité. L'analyse des promoteurs d'*OSD1* et d'*UVI4* pourrait nous permettre de déterminer si l'un ou l'autre ou les deux gènes sont exprimés en méiose. Ainsi il pourrait être intéressant d'étudier le déroulement d'une méiose si *UVI4* est exprimé à la place d'*OSD1*.

Nous disposons actuellement de peu de données sur la fonction de TDM. Les travaux précédents et ceux présentés ici, nous indiquent que TDM est requis lors de transitions clés au cours de la méiose. TDM appartient à une famille de protéines à domaine TPR-like contenant 5 membres. Trois de ces protéines n'ont pas été caractérisées, la quatrième serait impliquée dans le métabolisme du soufre (Howarth et al., 2009). Il pourrait être intéressant d'observer le comportement méiotique des mutants de ces gènes. De plus, les alignements des protéines apparentées à TDM chez les plantes ont permis de mettre en évidence des domaines très conservés et notamment des sites de phosphorylation qu'il pourrait être intéressant d'étudier.

D'une manière générale, la recherche de nouvelles protéines impliquées en méiose chez *Arabidopsis* pourrait s'avérer importante pour la compréhension des mécanismes de régulation de la progression méiotique. *Arabidopsis* est un modèle de choix pour des cribles génétiques. Pour l'instant, les cribles basés sur la formation de gamètes diploïdes n'ont pas permis d'identifier de nouvelles protéines impliquées dans la transition méiose I-méiose II (d'Erfurth et al., 2010; De Storme and Geelen, 2011). Nous avons également cherché à mettre au point des cribles suppresseurs. Malheureusement, des cribles suppresseurs d'OSD1 et TAM ne peuvent être réalisés sur un critère de fertilité, comme cela a été utilisé pour d'autres cribles au sein de l'équipe (Crismani et al., 2012), car les mutants *osd1* et *tam* sont fertiles. De plus, la ploïdie des descendants de *tam* et *osd1* augmente à chaque génération. Dans le cas de TDM, le mutant *tdm* ne produit aucune graine rendant impossible la production d'une population mutagénisée. L'approche utilisée actuellement dans l'équipe est basée sur la fertilité du triple mutant *Atspo11/Atrec8/osd1* (ou *Atspo11/Atrec8/tam*) et la stérilité (partielle) du double mutant *Atspo11/Atrec8*. Des graines *Atspo11/Atrec8* ont été mutagénisées à l'EMS. Les plantes M2 ont été criblées sur la restauration de la fertilité. Ce crible a permis d'identifier deux nouveaux allèles de *tam*

capable de supprimer la stérilité d'*Atspo11/Atrec8*. Un autre suppresseur a été mis en évidence, la mutation causale est en cours d'identification (Marta Cifuentes, données non publiées). Ce résultat ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude du cycle méiotique chez *A. thaliana*.

6. Conclusion

Le contrôle de la progression du cycle méiotique est un mécanisme complexe qui demande une régulation fine. OSD1, TAM et TDM font partie d'un réseau fonctionnel impliqué dans la progression méiotique spécifique d'*Arabidopsis*. Bien que la méiose soit un mécanisme conservé chez les organismes à reproduction sexuée, les protéines OSD1 et TDM ne sont présentes qu'au sein du règne végétal. Un projet auquel j'ai participé a permis de mettre en évidence qu'un des deux gènes homologues à *OSD1* présent chez le riz code une protéine de fonction identique à OSD1 en méiose (données non publiées). Bien que des protéines qui peuvent être considérées comme des homologues fonctionnels d'OSD1 aient été mis en évidence chez *S. pombe* et les vertébrés (SpMES1 et EMI2), il semblerait que les protéines impliquées dans la progression du cycle méiotique soient très peu conservées entre les différentes espèces à reproduction sexuée. Il semblerait que les mécanismes de sortie de méiose soient également peu conservés. Un défaut méiotique similaire à *tdm* a été observé chez des mutants de drosophile et de souris. Au cours de la spermatogenèse d'un mutant *Dmroughex*, on observe un réassemblage d'un fuseau de microtubules monopolaire après la méiose II (Gönczy et al., 1994). Dans des oocytes de souris *mos*^{-/-}, on observe également des métaphases III, où les chromosomes sont attachés à des fuseaux de microtubules monopolaires (Verlhac et al., 1996). Cependant ces trois protéines ne présentent aucune homologie de séquence mais des analyses plus approfondies pourraient nous renseigner sur une éventuelle homologie fonctionnelle.

La méiose est un mécanisme très bien conservé chez les eucaryotes à reproduction sexuée. La plupart des protéines impliquées dans les mécanismes de la recombinaison méiotique sont assez bien conservées entre les différentes espèces (Ramesh et al., 2005), contrairement à ce qui a été mis en évidence pour les protéines impliquées dans la progression du cycle méiotique. Il semblerait que les mécanismes de recombinaison aient été conservés alors que les mécanismes liés à la progression méiotique aient évolués différemment au cours de l'évolution des eucaryotes.

La régulation de la progression méiotique chez *Arabidopsis* semble faire intervenir des mécanismes de régulation différents entre méiose mâle et méiose femelle. Les mutations *osd1*, *tam* et *tdm* affectent différemment la méiose mâle et la méiose femelle. Les défauts méiotiques femelles des mutants *osd1* et *tam* sont identiques aux défauts mâles mais sont moins pénétrants. Dans le cas du mutant *tdm*, le défaut méiotique est spécifique du côté mâle. Cependant Bulankova et al. ont montré que TDM est également impliquée en méiose femelle car la mutation *tdm* permet de supprimer le défaut de stérilité femelle du mutant

smg7 du côté femelle (Bulankova et al., 2010). Contrairement aux mutants de recombinaison méiotique d'*Arabidopsis*, qui à ma connaissance ont des défauts méiotiques identiques du côté mâle et femelle, les mutants du cycle méiotique sont affectés différemment. Il semblerait que les mécanismes de régulation du cycle ont évolué différemment entre méiose mâle et méiose femelle. Le déroulement de la méiose est légèrement différent selon le sexe. Du côté femelle, trois des spores vont dégénérer pour favoriser la formation d'un gamète femelle volumineux et riche en réserves. Ainsi le nombre de gamètes femelles est limitant en comparaison avec les gamètes mâles. On peut imaginer que des mécanismes supplémentaires ont été développés au cours de l'évolution de la méiose femelle pour contrôler de façon plus rigoureuse la progression méiotique et assurer sa descendance.

1. Préambule

La seconde partie des résultats concerne la caractérisation de mutants présentant des défauts dans la protection de la cohésion centromérique méiotique chez *A. thaliana*. Les résultats sont présentés sous la forme d'un projet d'article scientifique en anglais, cependant des analyses complémentaires sont encore nécessaires avant soumission. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Christine Horlow pour la caractérisation des mutants *shugoshin* et avec l'aide de Sylvie Jolivet pour les aspects techniques.

2. La protection de la cohésion centromérique en méiose chez *A. thaliana*

2.1. Principaux résultats

- **Patronus est nécessaire à la protection de la cohésion centromérique en interkinèse de méiose**

Au cours de ce travail, nous avons identifié deux mutants d'insertion dans le gène *Patronus* (*PANS1*). Ces mutants présentent un défaut de fertilité. L'observation des chromosomes méiotiques chez le mutant *pans1* a permis de mettre en évidence la présence de chromatides libres en métaphase II. Chez un sauvage, après la séparation des chromosomes homologues en anaphase I, les chromatides sœurs restent maintenues ensemble jusqu'en métaphase II par la cohésion centromérique. Chez *pans1*, les chromatides sœurs sont libres en métaphase II et ségrégent de façon aléatoire en anaphase II, entraînant la formation de spores déséquilibrées, parfois non viables. Nous avons ainsi pu montrer que Patronus est indispensable au maintien de la cohésion centromérique en interkinèse, qui correspond au stade entre la méiose I et la méiose II. Ces résultats montrent que PANS1 agit comme un protecteur de la cohésion centromérique en interkinèse de méiose.

- **AtSGO1 et AtSGO2 sont tous les deux nécessaires à la protection de la cohésion centromérique en méiose**

Des protéines Shugoshin ont été mises en évidence, chez différents organismes, pour leur rôle dans la protection de la cohésion centromérique en méiose (Gutiérrez-Caballero et al., 2012). *A. thaliana* possède deux gènes codant des protéines Shugoshin. Ces gènes n'avaient pas été caractérisés jusqu'à maintenant. Nous avons identifié un mutant dans le gène *AtSGO2*. Le mutant *Atsgo2* ne présente aucun défaut somatique et méiotique. Nous avons identifié deux allèles *Atsgo1*. Les plantes *Atsgo1* ne montrent aucun défaut somatique mais nous avons pu mettre en évidence une perte de cohésion centromérique en méiose dans plus de 50% des cellules observées. La combinaison des deux mutations *Atsgo1/Atsgo2* entraîne une perte quasi totale de cohésion centromérique en méiose. Les étalements de

chromosomes méiotiques ont montré que chez *Atsgo1* ou *Atsgo1/Atsgo2*, la cohésion centromérique est perdue dès l'anaphase I. AtSGO1 et AtSGO2 donc sont nécessaires à la protection de la cohésion centromérique lors de la transition métaphase I - anaphase I. De façon surprenante et contrairement à ce qui a été observé chez d'autres organismes, la fonction de protection de la cohésion en méiose est partagée par AtSGO1 et AtSGO2 chez *A. thaliana*.

- **Patronus a une fonction méiotique et somatique**

Le gène *PANS1* possède un paralogue dans le génome d'*Arabidopsis*, nommé *PANS2*. Le mutant *pans2* que nous avons étudié, ne présente ni défaut somatique ni méiotique. Nous avons cherché à produire un double mutant *pans1/pans2*. Nous n'avons jamais obtenu de plantes portant les deux mutations. Nous avons pu montrer un défaut de transmission des gamètes mâles et femelles portant la double mutation. Ces résultats suggèrent que PANS1 et PANS2 ont une fonction redondante en mitose. Nous avons également pu mettre en évidence que la croissance racinaire de *pans1* est sensible aux conditions de stress. Ainsi PANS1 a une fonction méiotique et somatique.

- **Patronus pourrait être un régulateur de l'APC/C**

Grâce à la plateforme de TAP (Tandem Affinity Purification) du VIB à Gent, nous avons pu mettre en évidence que PANS1 interagissait avec les composants de l'APC/C. L'analyse précise de ces interactions par double hybride nous a permis de montrer une interaction directe de PANS1 avec CDC27B, une des sous-unités à TPR du cœur de l'APC/C. Nous avons également pu montrer que les domaines de destruction de PANS1 (D-box et DEN-box) ne sont pas nécessaires à cette interaction. L'introduction de versions mutées pour les domaines de destruction de PANS1 *in planta* semble être néfaste pour le développement de la plante. Ces résultats suggèrent que PANS1 pourrait être à la fois un régulateur de l'APC/C *via* son interaction avec CDC27B et également une cible de l'APC/C.

2.2. Article 3 : " Centromeric cohesion is protected twice at meiosis, by SHUGOSHINS at anaphase I and by PATRONUS, a putative APC/C regulator, at meiosis interkinesis" (en préparation)

Centromeric cohesion is protected twice at meiosis, by SHUGOSHINS at anaphase I and by PATRONUS, a putative APC/C regulator, at meiosis interkinesis

Laurence Cromer^{1,2}, Sylvie Jolivet^{1,2}, Christine Horlow^{1,2}, Liudmilla Chelysheva^{1,2}, Jefri Heyman^{3,4}, Geert De Jaeger^{3,4}, Csaba Koncz^{5,6}, Lieven de Veylder^{3,4}, Raphael Mercier^{1,2}

¹ INRA, UMR1318, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

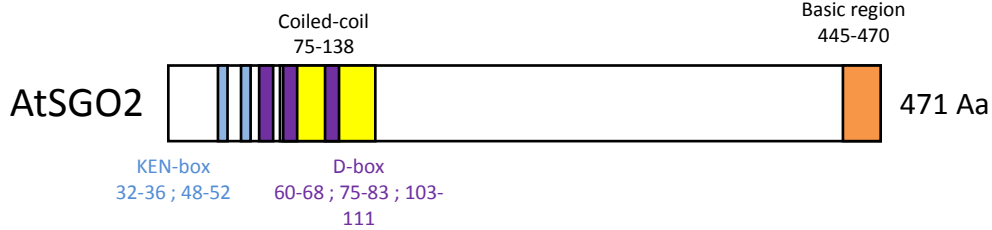
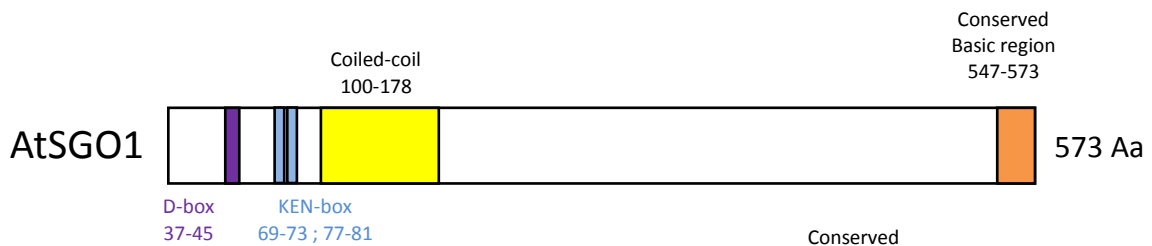
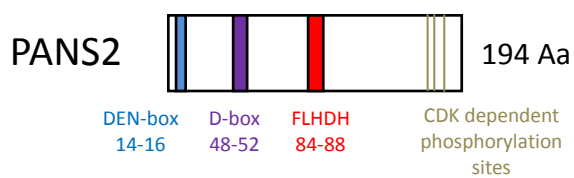
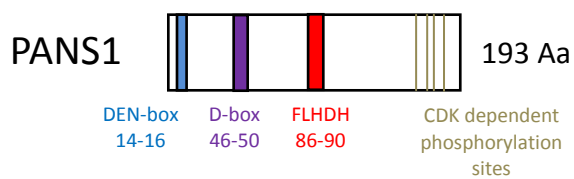
² AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin, RD10, F-78000 Versailles, France

³Department of Plant Systems Biology, VIB, B-9052 Gent, Belgium

⁴Department of Plant Biotechnology and Bioinformatics, Ghent University, B-9052 Gent, Belgium

⁵Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, D-50829 Cologne, Germany

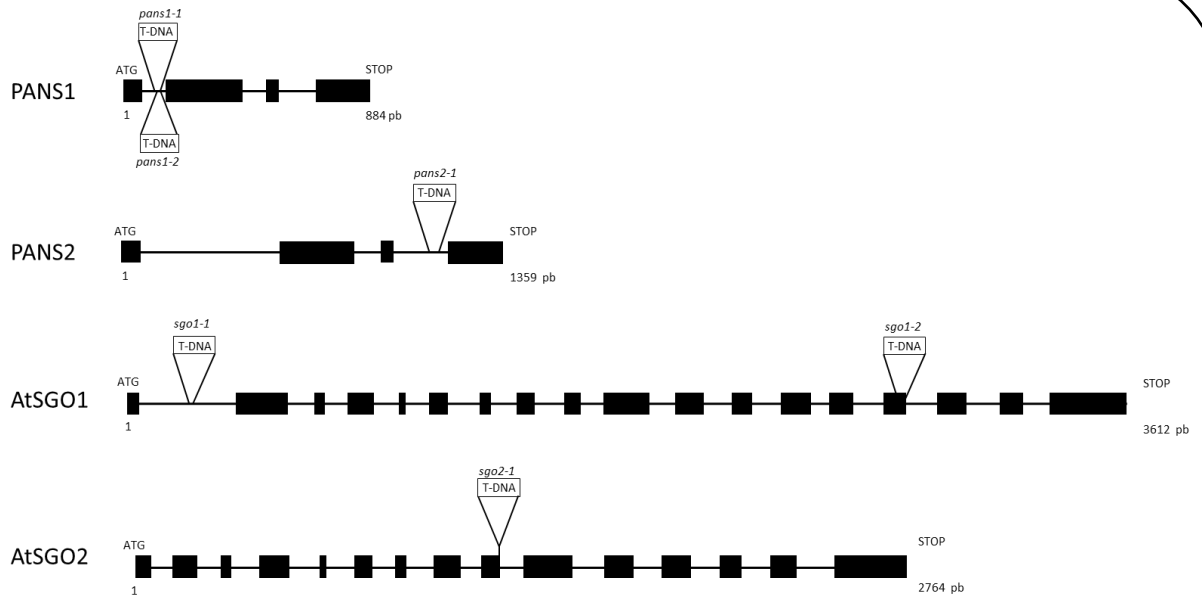
⁶Institute of Plant Biology, Biological Research Center of Hungarian Academy of Sciences, H-6723 Szeged, Hungary



Article3 - Figure 1 : Schematic representation of PANS1, PANS2, AtSGO1 and AtSGO2 proteins.

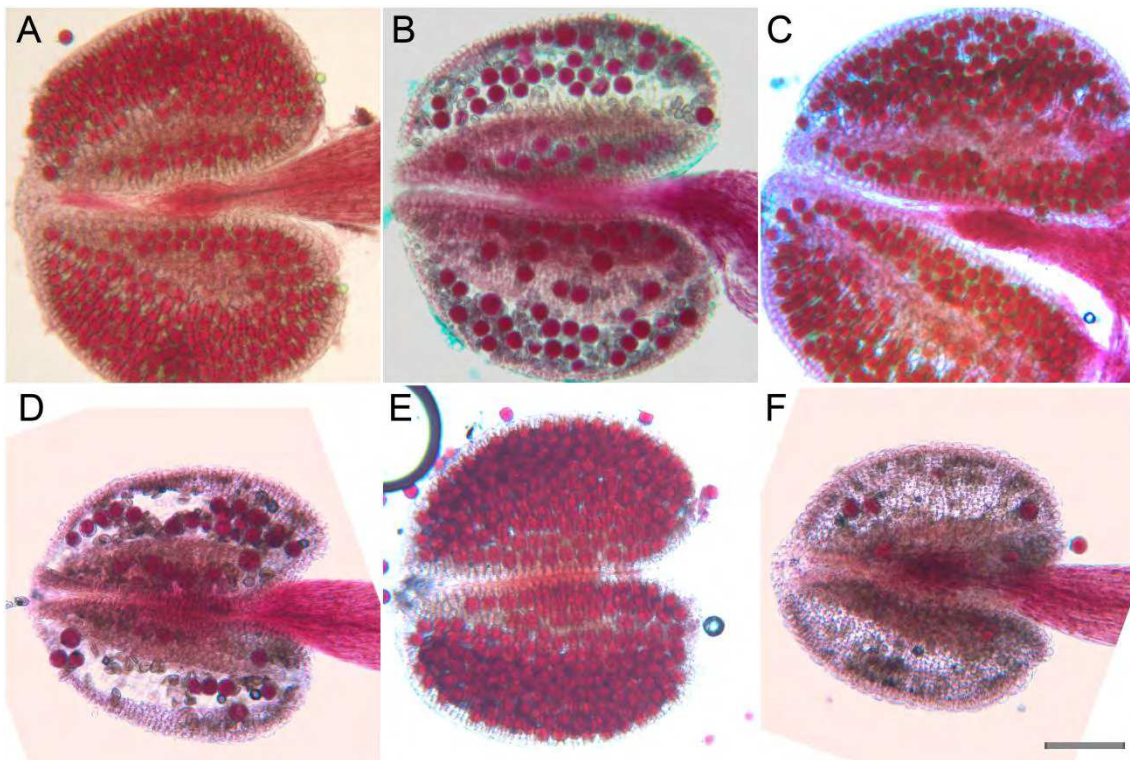
ABSTRACT

At meiosis, two successive rounds of chromosome segregation lead to ploidy halving. This is achieved through a stepwise release of sister chromatid cohesion, along chromosome arms to allow homolog segregation at anaphase I and at centromeres to allow sister chromatid segregation at anaphase II. Cohesins, the protein complex which ensures cohesion, must then be protected at centromeres throughout meiosis, until the onset of anaphase II. Members of the Shugoshin protein family have been shown to protect centromeric cohesins at anaphase I. Mammals and fission yeast possess two Shugoshin paralogs, only one being involved in cohesion protection at meiosis. Here we (i) characterized the two *Arabidopsis thaliana* Shugoshin paralogs and (ii) identified Patronus (PANS1), a novel protector of meiotic centromeric cohesion. Both *AtSGO* genes are required for complete protection of centromeric cohesins during meiosis I. Moreover, while *AtSGOs* protect centromeric cohesion during anaphase I, PANS1 protects cohesion at a later stage, during the meiosis I-meiosis II interkinesis. Additionally, we identified PANS2, a paralog of PAN1, whose mutation is synthetically lethal with *pans1* suggesting that PANS genes are also essential for mitosis. We further found that PANS1 interacts directly with the CDC27b subunit of the Anaphase Promoting Complex (APC/C), suggesting that PANS1 regulates the APC/C. This study reveals the need to protect centromeric cohesion at two different stages of meiosis, by Shugoshins at anaphase I and by Patronus at interkinesis.



Article3 -Figure 2 : Position of the mutations used in this study.

Exons are represented as black boxes and T-DNA insertions by white triangles.



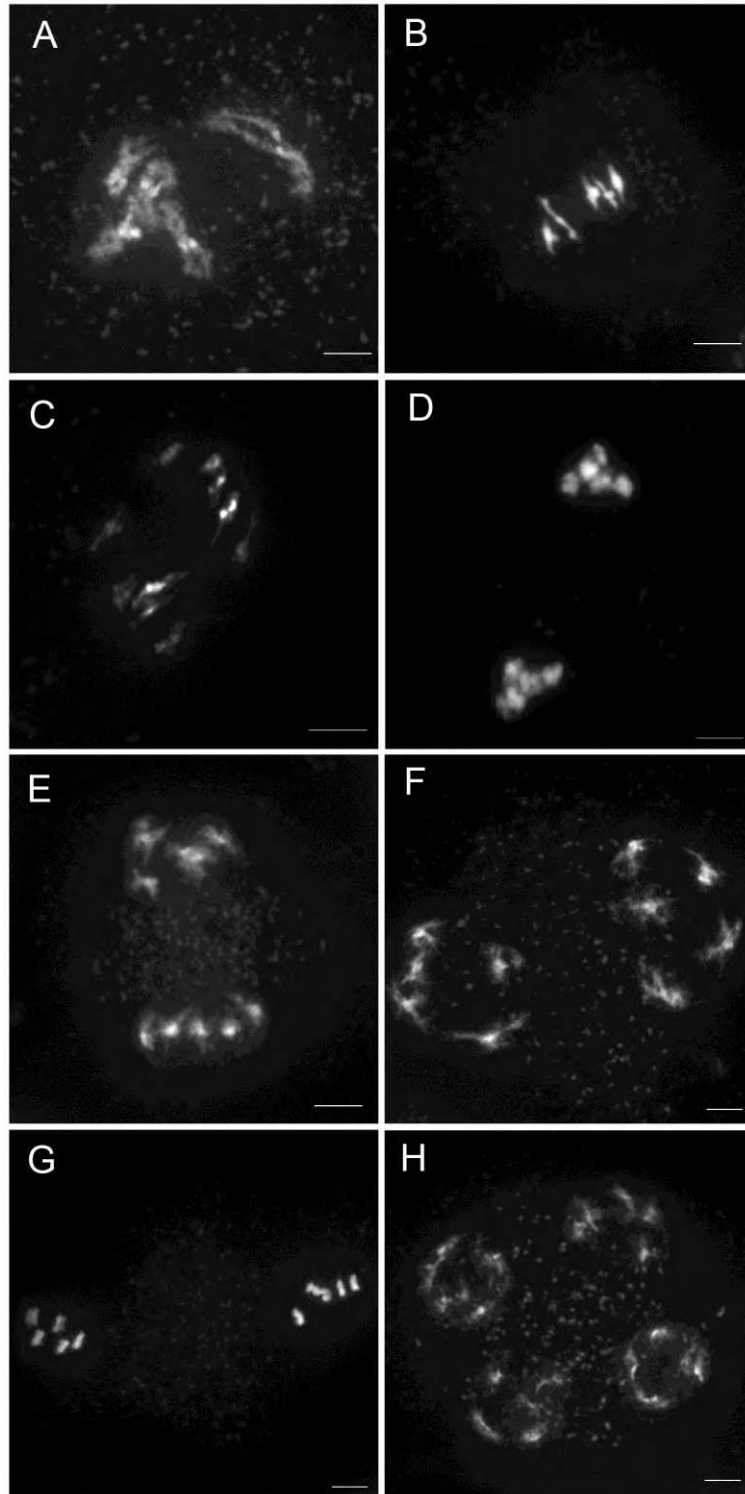
Article3 - Figure 3 : Pollen grains viability in wild-type and mutants

Viable pollen grains are stained in red while dead pollen grains appear deflated and grey/green. (A) Wild type. All pollen grains are viable; (B) *pans1-1*; A significant proportion of pollen grains are non-viable. (C) *pans2-1*; Pollen grains are viable. (D) *Atsgo1-2*; A significant proportion of pollen grains are non-viable (E) *Atsgo2-1*. Pollen grains are viable; and (F) *Atsgo1-2 Atsgo2-1*. Very few pollen grains are viable. Scale bar = 100µM

INTRODUCTION

Cohesion between sister chromatids ensures proper chromosome segregation during mitosis and meiosis. At metaphase, cohesion holds sister chromatids together and create an opposing force to the spindle that pulls kinetochores to opposite pole of the cell. The release of cohesion at the onset of anaphase triggers chromosome segregation. Sister chromatid cohesion is ensured by a protein complex called the cohesin. This complex has a ring shape that is thought to embrace the two chromatids, and is composed of four conserved subunits (Nasmyth and Haering, 2009). One of these subunits, the Kleisin is the target of the Separase endopeptidase at the onset of anaphase (Uhlmann et al., 2000; Hauf et al., 2001). Cohesins are loaded on chromosomes at telophase or early G1 and cohesion is established during the S phase (Peters et al., 2008). In yeasts, mitotic cohesins are present all along the chromosomes until their release at anaphase. In vertebrate mitotic cells, most cohesins are released from chromosomes during prophase (Waizenegger et al., 2000). This activity, called “prophase pathway”, depends on cohesin phosphorylation by polo and additional factors such as WAPL (Sumara et al., 2002; Hauf et al., 2005; Kueng et al., 2006). However centromeric cohesins, which ensure sister chromatid cohesion at metaphase, are protected from prophase release. This protection involves Shugoshin1 (SGOL1, which stands for the Japanese ‘guardian spirit’) which recruits the protein phosphatase 2A (PP2A) to centromeres to prevent cohesin phosphorylation (Kitajima et al., 2005; McGuinness et al., 2005; Tang et al., 2006). At the onset of anaphase cleavage of the Kleisin by the Separase allows the release of the remaining cohesins and sister chromatid separation.

Meiosis is a specialized cell division in which a single replication is followed by two rounds of chromosome segregation, leading to ploidy halving. The homologous chromosomes segregate at meiosis I, whereas the sister chromatids segregate at meiosis II (Zickler and Kleckner, 1999). Thus a specific control of cohesion dynamics is required at meiosis. Indeed, sister chromatid cohesion along the arm in combination with crossovers (exchanges of continuity between homologous chromatids) create a physical link between the homologous chromosomes at metaphase I. Arm cohesion is released at the onset of anaphase I to allow segregation of homologous chromosomes. However, centromeric cohesion must be protected during meiosis I to ensure cohesion between sisters at metaphase II. At anaphase II, centromeric cohesion release allows segregation of sister chromatids. Thus a stepwise cohesin release occurs during meiosis to allow the two successive balanced rounds of chromosome segregation. REC8, a meiotic specific Kleisin (Klein et al., 1999; Watanabe and Nurse, 1999) and Shugoshin are key actors of this stepwise release (Kitajima et al., 2004; Rabitsch et al., 2004; Hamant et al., 2005; Lee et al., 2008; Llano and Gómez, 2008; Wang et al., 2011). During meiosis I, SGO (SGO1 in yeasts, maize and rice, and SGO2 in vertebrates) recruits PP2A at centromeres to dephosphorylate REC8, making it resistant to Separase cleavage (Ishiguro et al., 2010; Katis et al., 2010). REC8 will be then cleaved by the Separase at the onset of anaphase II, to liberate the sister chromatids. In absence of this SGO activity,



Article3 -Figure 4 : Male meiosis in wild type

Chromosome spreads stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) at (A) Diakinesis; (B) Metaphase I; (C) Early Anaphase I; (D) Late Anaphase I; (E, F) Telophase I; (G) Metaphase II and (H) Telophase II. Scale bar= 5 μ m

centromeric sister chromatid cohesion is prematurely released at anaphase I, and sister chromatids fail to segregate properly at meiosis II (Kitajima et al., 2004).

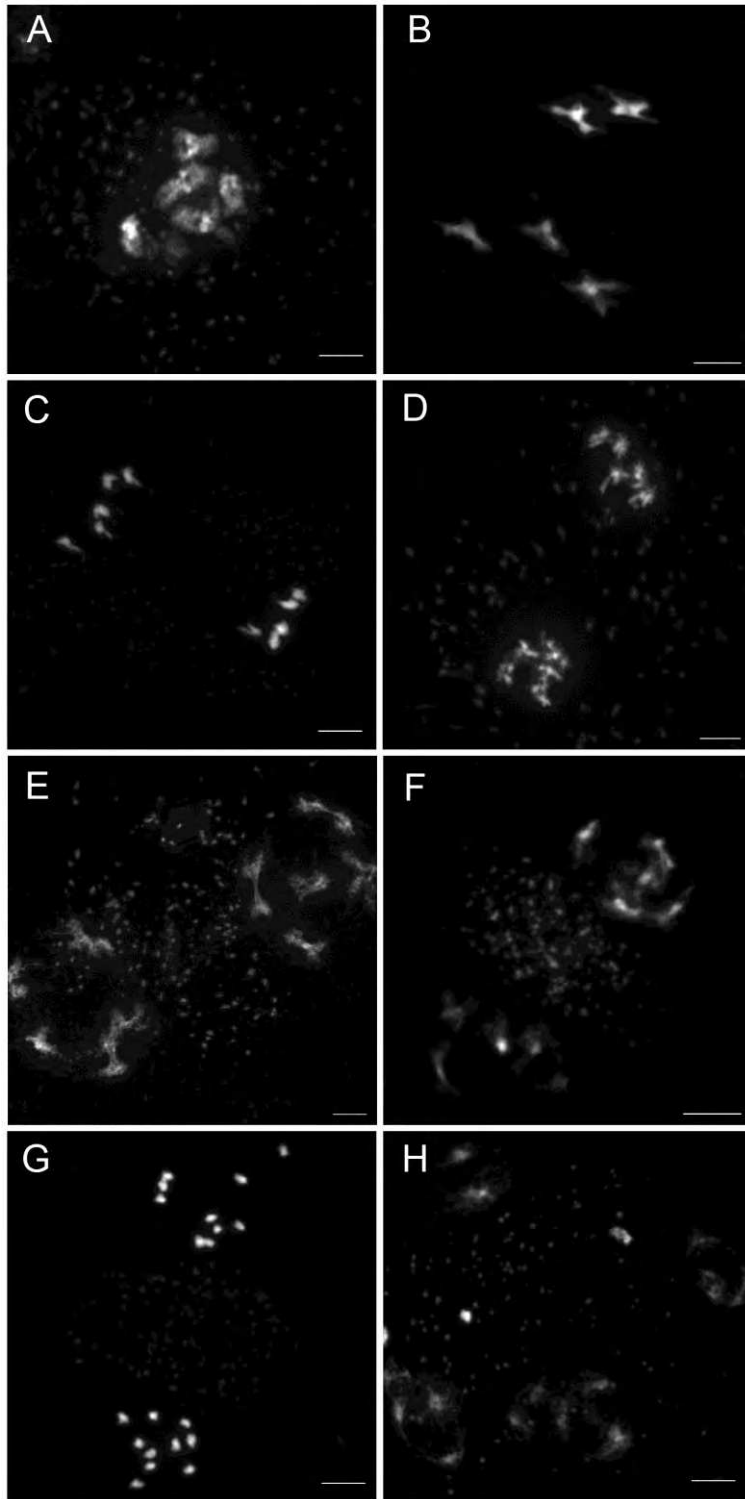
Shugoshin is thus a key component of the conserved pathway that protects sister cohesion during anaphase I. Depending on the model species considered, there is one (*S. cerevisiae*, *D. melanogaster*) or two SGO paralogs (*S. pombe*; vertebrates, plants) in the genome (Kitajima et al., 2004). In addition to their function in protecting meiotic cohesion and to protect centromeric cohesion during mitotic prophase in vertebrates, SGO representatives have been shown to be involved in correct kinetochore orientation at mitosis and meiosis (Gutiérrez-Caballero et al., 2012). Consequently, mouse *sgo1* mutants are non-viable (Lee et al., 2008) and also *S. cerevisiae sgo1* and *S. pombe sgo2* have somatic defects (Kitajima et al., 2004).

Here we characterize the two *Arabidopsis thaliana* Shugoshins and showed that they are both required for full protection of centromeric cohesion at meiosis. Further, we describe a novel protein, Patronus (for protector in Latin) which is essential for the protection of centromeric sister chromatid cohesion at meiotic interkinesis.

RESULTS

***Patronus* encodes a protein of unknown function with D- and DEN- boxes**

As a part of an expression profiling screen, 138 genes were selected as candidates for having a meiotic function because of their co-regulation with known meiotic genes (d'Erfurth et al., 2008). Among them, three were identified as being essential for normal meiosis: *PS1* (*PARALLE SPINDLES*) (d'Erfurth et al., 2008), *OSD1* (*OMISSION OF SECOND DIVISION*) (d'Erfurth et al., 2009) and finally *At3g14190*. Due to its role at meiosis (see below) we named this latter gene *Patronus* (*PANS1*). *PANS1* gene contains 4 exons and encodes a protein of 193 amino acids (Figure 1). The *PANS1* transcript has been shown to be cell cycle regulated and to peak at late M / early G1 phase of mitosis (Menges et al., 2003; Gauthier et al., 2010). The *Arabidopsis* genome contains a *PANS1* paralog that we named *PANS2* (*At5g12360*). The *PANS2* gene contains 4 exons and encodes a protein of 194 amino acids (Figure 1). *PANS1* and *PANS2* share more than 42% protein identity. Similarity searches identified *PANS1/2* homologs in all Eudicots tested. Phylogeny analysis of the *PANS1/2* homologs suggested a dynamic gain and loss of *PANS* gene copies in the evolution of Eudicots (Figure S1). No sequence with overall similarity with *PANS* was detected outside of dicots, and notably in monocots, the other large group of flowering plants. However, *PANS* proteins do share limited similarity with *RSS1* (*RICE SALT SENSITIVE 1*), a protein that regulates cell cycle under stress condition in rice (Ogawa et al., 2011). The *PANS/RSS1* sequence similarity is limited to the first third of the proteins, and it has been suggested that



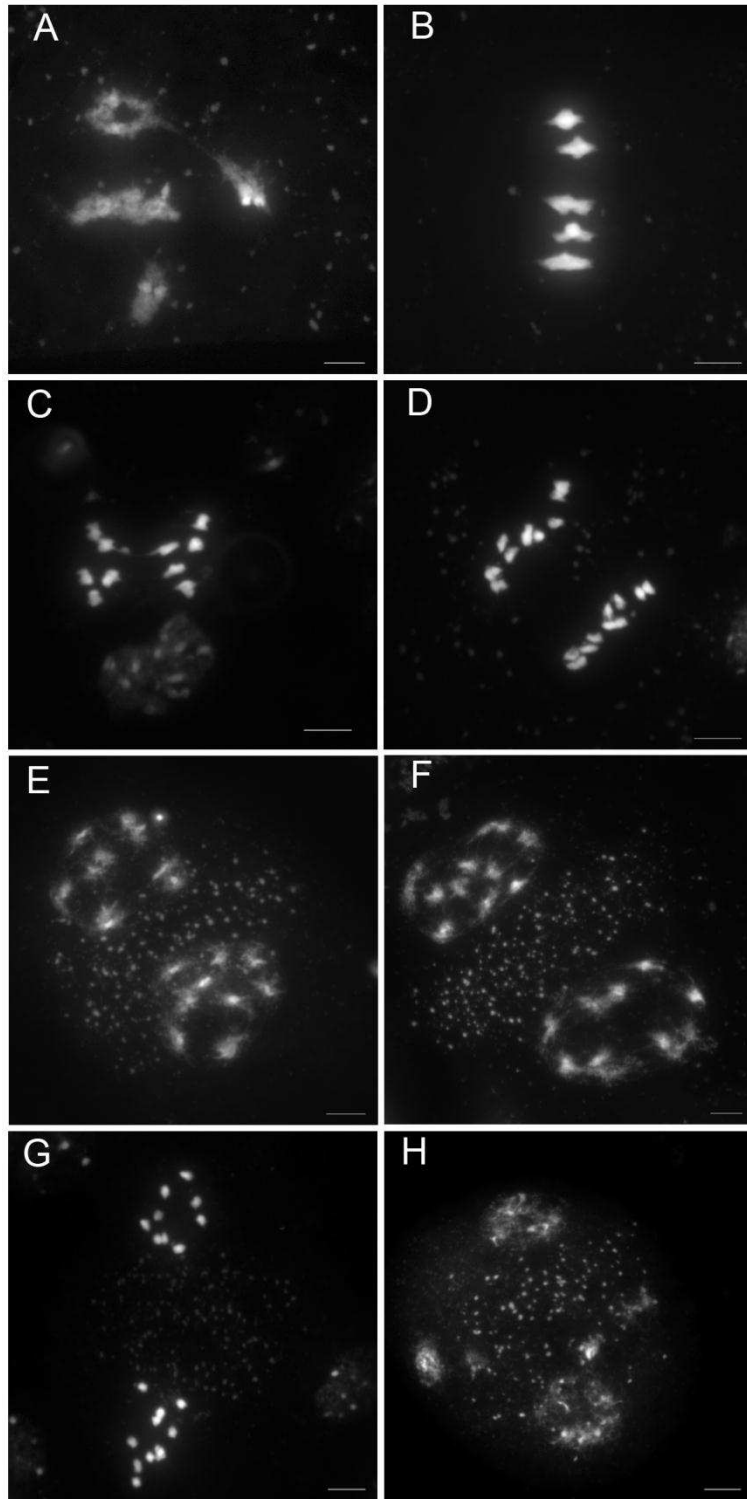
Article3 - Figure 5 : Male meiosis in *pans1-1*

(A) Diakinesis; (B) Metaphase I; (C) Early Anaphase I; (D) Late Anaphase I; (E, F) Telophase I; (G) Metaphase II and (H) Telophase II. Scale bar= 5 μ m

RSS1 has been specifically lost in Eudicots (Ogawa et al., 2011). No protein sharing similarity to PANS has been found in eukaryotes other than land plants. Three domains appeared to be well conserved in PANS1/2 homologues (Figure S1b). The first one is a DEN-box (DEN Aa 14-16 in PANS1), and the second a D-Box (destruction box, RxxLxxxN, Aa 46-54). Both domains are Anaphase Promoting Complex (APC/C) recognition domains that are often associated. The third conserved domain (Aa 81 to 97, around FLHDH) appears to be specific to the PANS proteins and is thus of unknown function. In addition, a subgroup of PANS homologs contain an additional D-Box between the conserved DEN and KEN boxes. Finally a cluster of putative CDK phosphorylation sites ([S/T-P-x[K/R]]) is found close to the C-terminal end of the protein (Figure 1).

Patronus is required for centromeric cohesion protection at meiosis

In the reverse genetic screen based on expression profiling (d'Erfurth et al., 2008), two mutant alleles of PANS1 were identified as they provoke reduced fertility when homozygous. Both mutants, *pans1-1* (Salk_070337) and *pans1-2* (Salk_035661) (Figure 2), are issued from the T-DNA insertion collection of the Salk institute (Alonso et al., 2003). Sequencing the T-DNA border junctions indicated that *pans1-1* and *pans1-2* contained an insertion accompanied by a small deletion in the first intron at genomic position ATG+113 to ATG+132 and ATG+122 to ATG+140, respectively. Homozygous *pans1-1* and *pans1-2* plants showed no obvious growth or developmental defects in standard growing conditions, but showed reduced fertility. No defects were observed in the heterozygotes. Examination of pollen viability by Alexander staining (Alexander, 1969) revealed a large proportion of non-viable pollen grains in both *pans1* mutants (Figure 3). We then investigated chromosome behavior during male meiosis in *pans1* mutants. The *Arabidopsis* wild type meiotic stages are shown in Figure 4. During meiotic prophase, chromosomes synapsed and recombined leading to the formation of 5 bivalents each one composed of two homologous chromosomes connected by chiasmata (Figure 4A and 4B). Cohesion release along chromosomes arms allows the balanced segregation of homologous chromosomes at anaphase I (Figure 4C and 4D). At telophase I, chromosomes decondense and show a typical X-shape reflecting the residual cohesion at centromeric regions (Figure 4 E and 4F). During metaphase II, the two groups of five condensed chromosomes (pairs of chromatids) align on two metaphase II plates (Figure 4G). Centromeric cohesion release at anaphase II allows balanced segregation of sister chromatids leading to the formation of four groups of 5 chromatids (Figure 4H). Meiotic chromosomes in *pans1-1* and *pans1-2* mutants behaved similarly to the wild type until the end of telophase I. Synapsis, chiasmata formation (Figure 5A), bivalent alignment at metaphase I (Figure 5B) and segregation of homologous chromosome at anaphase I (Figure 5C and 5D) were indistinguishable from wild type. Consequently, five decondensed chromosomes were observed at each pole of meiocytes at telophase I, which were, like in wild type, composed of two chromatids linked at their centromeres (Figure 5E and 5F). However meiosis II differed markedly from wild type in both *pans1* mutants. At metaphase II, rather than two groups of five chromosomes (pairs of chromatids) aligned on the two



Article3 - Figure 6 : Male meiosis in *Atsgo1-2 Atsgo2-1*

(A) Diakinesis; (B) Metaphase I; (C) Early Anaphase I; (D) Late Anaphase I; (E, F) Telophase I; (G) Metaphase II and (H) Telophase II. Scale bar= 5 μ m

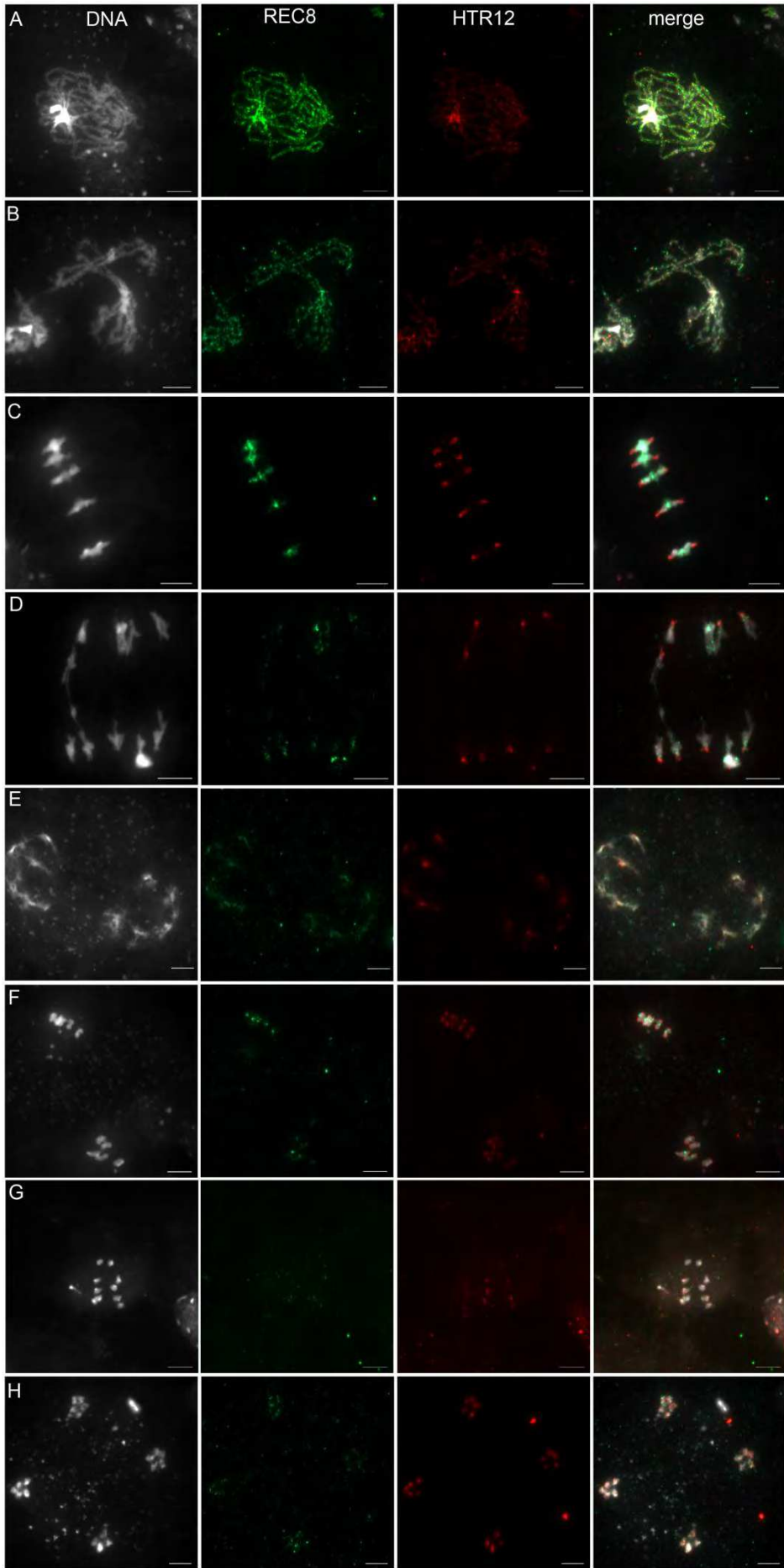
metaphase plates, we observed almost systematically two groups of ten single chromatids that did not align properly (Figure 5G and Table 1). Then at anaphase II, the single chromatids segregated erratically leading to the production of unbalanced tetrads (Figure 5H). Complementation tests with *pans1-1* and *pans1-2* mutants showed that these mutations were allelic. Transformation of *pans1-1* with a genomic fragment containing the *PANS1* gene restored normal meiosis, confirming that the observed meiotic defect is due to the mutations in the *PANS1* gene. Thus *PANS1* is required for the maintenance of centromeric sister chromatid cohesion during meiotic interkinesis.

Identification of *shugoshin* mutants in *Arabidopsis thaliana*

The premature loss of sister chromatid cohesion in a *pans1* mutant is reminiscent of the phenotype of *shugoshin* mutants described in several eukaryotes. However the *Shugoshin* genes were not characterized in *Arabidopsis*. Sequence similarity searches (Kitajima et al., 2004) detected two putative *Shugoshin* genes in the *Arabidopsis* genome, *At3g10440* (*AtSGO1*) and *At5g04320* (*AtSGO2*) (Figure 1). *AtSGO1* and *AtSGO2* encode proteins of 573 and 471 Aa, respectively, which share 30% identity. In eukaryotes which contain two *SGO* genes, only one is involved in protection of centromeric cohesion during meiosis (Gutiérrez-Caballero et al., 2012). To investigate which *AtSGO* gene(s) is involved in meiotic centromeric cohesion, we analyzed insertion mutants of both *AtSGO1* and *AtSGO2* genes. Two mutants in *AtSGO1* were available in the T-DNA SK collection (Robinson et al., 2009), *Atsgo1-1* (SK35523) and *Atsgo1-2* (SK2556). Sequencing T-DNA border junctions showed that the *Atsgo1-1* insertion is accompanied by a small deletion in the first intron at genomic position ATG+226 to ATG+236, while the *Atsgo1-2* insertion is in the 15th exon among 18 and also accompanied by a small deletion at genomic position ATG+2781 to ATG+2785 (Figure 2). As no *Atsgo2* mutant was available from public collections, we performed a screen of the Koncz collection (Ríos et al., 2002) and identified one insertion (Line 34303, *Atsgo2-1*) in the 9th exon among 15 at genomic position ATG+1318 (Figure2).

***AtSGO1* and *AtSGO2* are both required for full protection of centromeric cohesion protection at meiosis**

Plants homozygous for *Atsgo1-1* or *Atsgo1-2* mutations did not show any growth or developmental defects in standard growing conditions, but had reduced fertility. In both mutants a large proportion of pollen grains and female gametophytes were unviable (Figure 3). In contrast with *Atsgo1* mutants, *Atsgo2-1* mutants did not show any defect in fertility and was neither affected in growth nor development (Figure 3). However, the double homozygous mutant *Atsgo1-2 Atsgo2-1* was less fertile (shorter fruit) and showed a higher male (pollen grain) and female gametophyte lethality than *Atsgo1* single mutants (Figure 3), suggesting that *AtSGO1* and *AtSGO2* have partially redundant function in gametogenesis. Remarkably, the *Atsgo1-2 Atsgo2-1* double mutant did not show growth or development defect, suggesting that *AtSGO1* and *AtSGO2* have no critical role at mitosis. We thus investigated chromosome behavior during male meiosis in *Atsgo* single and double mutants.



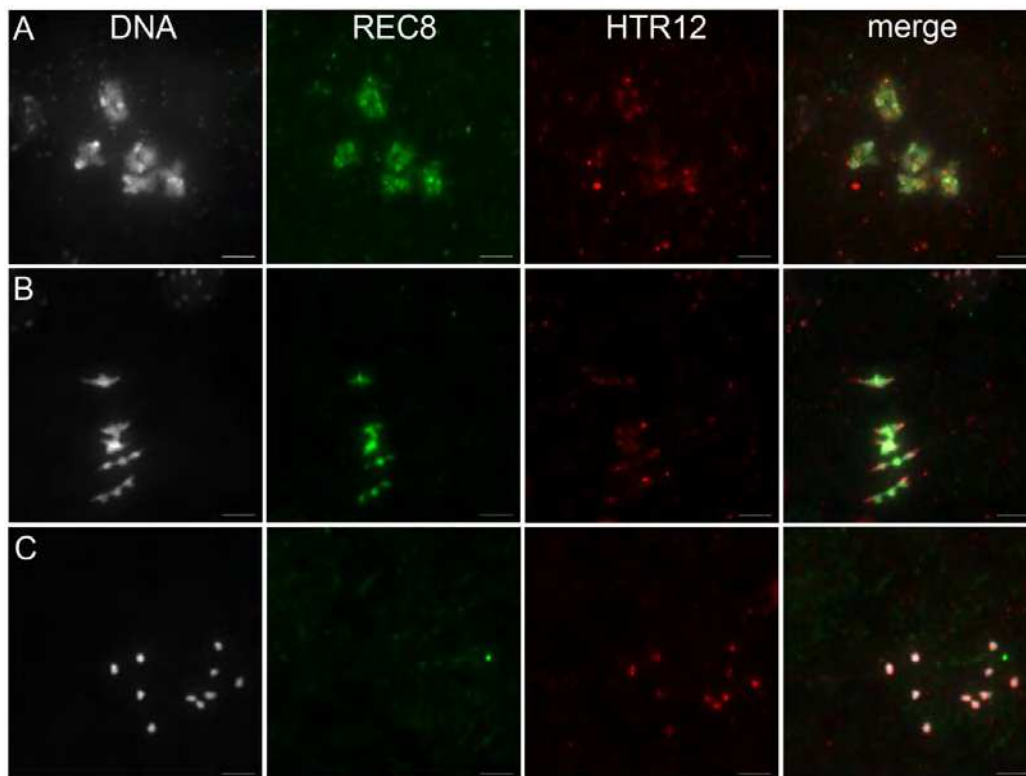
**Article3 - Figure 7 :
Immunolocalisation of
HTR12 and AtREC8 in
wild-type**

DNA is stained by DAPI (grey). Localization of AtREC8 (green) and HTR12 (red). (A) Pachytene; (B) Diakinesis; (C) Metaphase I; (D) Anaphase I; (E) Telophase I; (F) Metaphase II; (G) Anaphase II; (H) Telophase II. Scale bar = 5µm

Consistent with its complete fertility, the *Atsgo2-1* mutant did not show any meiotic defects. In contrast, both *Atsgo1* mutant alleles exhibited a meiotic defect (Table 1), which was amplified in the *Atsgo1-2 Atsgo2-1* double mutant (Figure 6 and Table 1). Meiotic chromosome behavior in these mutants was indistinguishable from wild-type during prophase and metaphase I (Figure 6A and 6B). In contrast in *Atsgo1-1* and *Atsgo1-2*, a mixture of pairs of chromatids and single chromatids were observed at metaphase II. The defect had a variable intensity, ranging from 5 pairs of chromatids normally aligned to 10 single chromatids erratically distributed (Table 1). In the *Atsgo1-2 Atsgo2-1* double mutant, cohesion was almost completely lost, almost all metaphase II exhibiting 10 single chromatids (Figure 6G and Table 1). Therefore two batches of ten free chromatids segregated randomly in anaphase II producing aberrant spores (Figure 6H). Thus *AtSGO1* and *AtSGO2* are both required for full protection of centromeric cohesion protection at meiosis, without any obvious function at mitosis. Plants lacking *PANS1* or *AtSGOs* exhibited similar defects at metaphase II. However, while no defect was detected in meiosis I in *pans1*, precocious split of chromatids were detected in *Atsgo1-2 Atsgo2-1* as early as anaphase I (compare Figure 5D & 6D). Accordingly, ten decondensed chromosomes were observed at telophase I at each pole of the cell in *Atsgo1-2 Atsgo2-1* but not in *pans1* in which chromosome have the typical X shape reflecting sister chromatid cohesion around centromere (compare Figure 5E and 5F to 6E and 6F). Thus like in other organisms, SGOs in *Arabidopsis* appear to protect centromeric cohesion during anaphase I. The difference of centromeric cohesion loss timing between *pans1-1* and *Atsgo1-2 Atsgo2-1* strongly suggests that *AtSGOs* and *PANS1* protect centromeric cohesion at distinct stages of meiosis, anaphase I and interkinesis respectively.

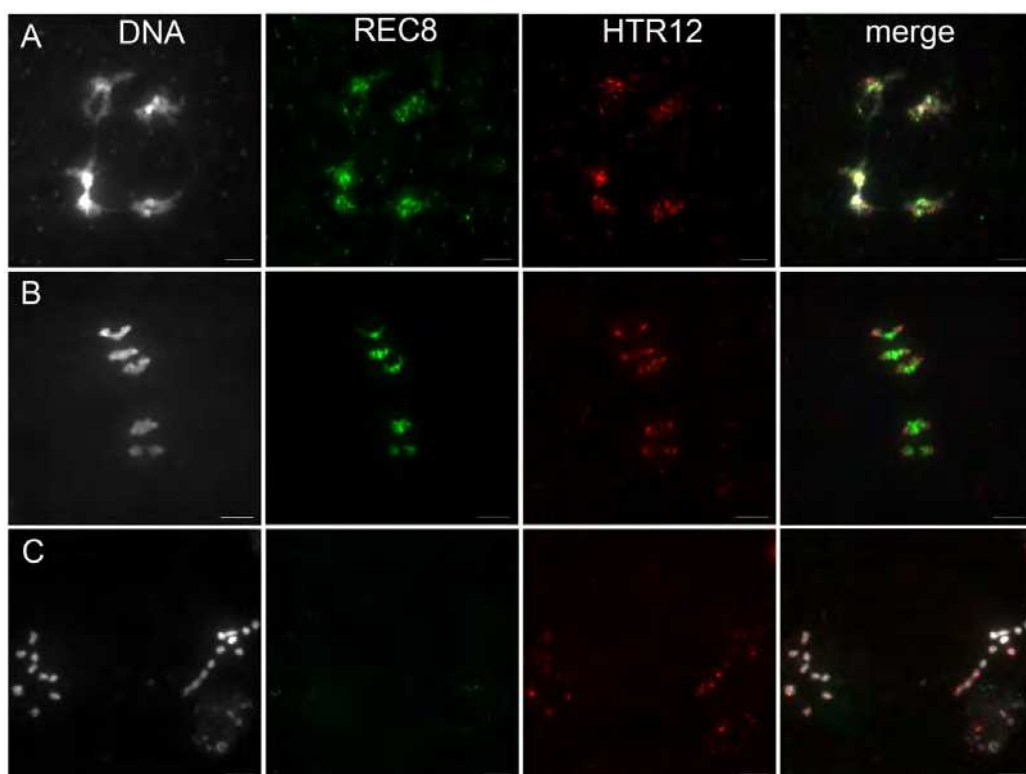
AtREC8 behavior in *pans1* and *sgo1/sgo2* mutants

We then immuno-localized the meiotic cohesin subunit *AtREC8*, in combination with the centromeric histone HTR12/CENH3 as a centromeric marker (Talbert et al., 2002). As previously shown, in wild-type meiocytes, *AtREC8* is present on chromosomes during prophase I (Figure 7A and 7B) (Cai et al., 2003; Chelysheva et al., 2005). Notably, a strong signal was detected at diakinesis all along the chromosomes (Figure 7B). At metaphase I, REC8 was detected on the entire bivalent with the exception of core centromeric region where HTR12 and REC8 signal do not overlapped (Figure 7C). During anaphase I, REC8 signal drastically decreased likely reflecting the cohesins release from chromosomes arms. Accordingly, the REC8 signal was restrained to a region adjacent to the HTR12 localization, presumably corresponding to the peri-centromeric heterochromatin (Figure 7D). At telophase I, the REC8 signal was also present (Figure 7E). At metaphase II, a REC8 signal was detected between the two HTR12 signals oriented to opposite poles (Figure 7F). When sister chromatids segregated in anaphase II, no REC8 signal was detected on separated chromatids (Figure 7G). At the end of meiosis, REC8 seems to be reloaded on chromosomes (Figure 7H). We observed that REC8 and HTR12 signals in the single *pans1-1* mutant and the *Atsgo1-2 Atsgo2-1* double mutants were the same as in wild type at prophase and metaphase I (Figure 8A, 8B, 9A and 9B). However, at metaphase II no signal was detected on the single



Article3 - Figure 8 : Immunolocalisation of HTR12 and AtREC8 in *pans1-1*

DNA is stained by DAPI (grey). Localization of AtREC8 (green) and HTR12 (red). (A) Diakinesis; (B) Metaphase I. (C) one plate of Metaphase II with ten single chromatids. Scale bar = 5um



Article3 - Figure 9 : Immunolocalisation of HTR12 and AtREC8 in *Atsgo1-2 Atsgo2-1*

DNA is stained by DAPI (grey). Localization of AtREC8 (green) and HTR12 (red) at (A) Diakinesis; (B) Metaphase I and (C) Metaphase II with two sets of ten single chromatids.

chromatids (Figure 8C and 9C), showing that both SGOs and PANS1 are required to prevent precocious release of peri-centromeric cohesins.

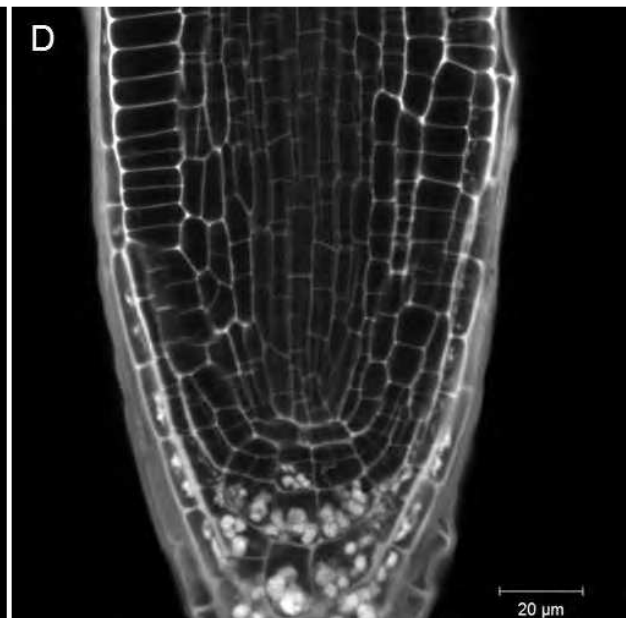
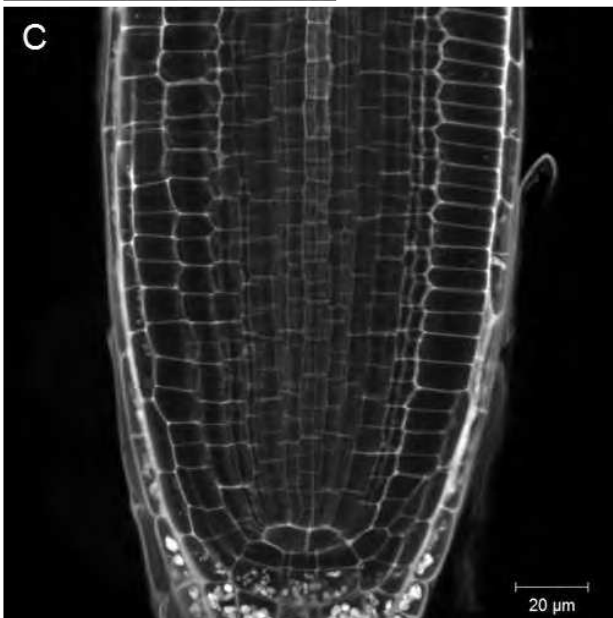
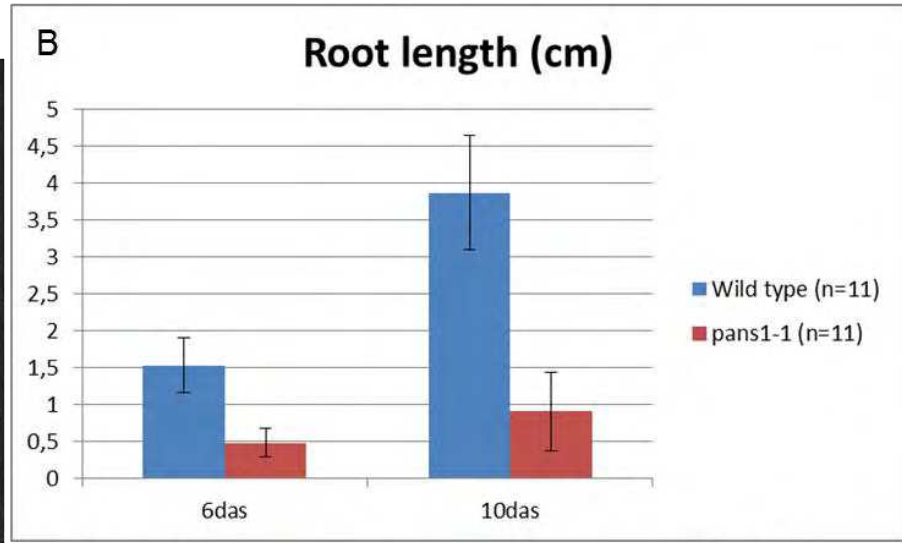
PANS1 and PANS2 are synthetically essential for gametophyte development

To investigate the function of PANS2, we analyzed a T-DNA insertion *pans2-1* (Sail_305_G04) (Figure 2) (Sessions et al., 2002). Sequencing the insertion junctions showed that the T-DNA is in the third intron and is accompanied by a small deletion (ATG +1103 to ATG+1135 on the genomic sequence). Plants homozygous for the *pans2-1* mutation did not show any growth or developmental defects in standard growing conditions. Further, unlike *pans1* mutants, *pans2-1* presented no meiotic defects (not shown). With the intention of producing a double mutant, crosses between homozygous *pans1-1* and *pans2-1* plants were performed and the F2 progeny was genotyped. However, neither double homozygous *pans1-1*^{-/-} *pans2-1*^{-/-} plants (0/412, versus 26 expected) nor *pans1-1*^{-/-} *pans2-1*^{+/-} (0/412, versus 52 expected) were recovered. Very few *pans1-1*^{+/-} *pans2-1*^{-/-} were obtained (2/412 versus 52 expected). Similarly using the *pans1-2* allele and *pans2-1*, no double homozygote plants or homozygote for one mutation and heterozygote for the other one were obtained (0/47 versus 3 and 12 expected). These results strongly suggest deep transmission defects of gametes harboring the two mutations. To verify this transmission defects, we performed reciprocal crosses between *pans1-1*^{+/-} *pans2-1*^{+/-} plants and wild-type plants. When wild-type pollen was used to fertilize *pans1-1*^{+/-} *pans2-1*^{+/-} ovaries, only one double heterozygote was recovered (1/94, 23 expected). Similarly, when *pans1-1*^{+/-} *pans2-1*^{+/-} pollen was used to fertilize wild-type ovaries, only one double heterozygote plant out of 94 progeny was recovered (23 expected). This confirmed a strong defect in the simultaneous transmission of both *pans1-1* and *pans2-1* alleles through the male and the female gametes, showing that almost all of double mutant gametophytes are defective. Consistently, 27% of the *pans1-1*^{+/-} *pans2-1*^{+/-} female gametophyte had development defects (n=67). However, no defect was detected in pollen grains (male gametophytes) development. Altogether, these results suggest that PANS1 and PANS2 have a redundant essential role at mitosis.

Somatic role of Patronus under stress conditions

Although *pans1* single mutants showed no obvious growth or developmental defects in standard growing conditions, they showed growth defects when accidentally grown under sub-optimal conditions, prompting us to investigate somatic phenotype of *pans* mutants under stress conditions. Seeds were sown on *Arabidopsis* medium supplemented with 80mM NaCl. Consistent with their normal growth in standard greenhouse condition, all the mutants grew normally on control medium. But on medium supplemented with 80mM NaCl, *pans1-1* and *pans1-2* mutants exhibited substantial reduction of primary root growth compared to wild-type (Figure 10). In contrast the *pans2-1* mutant was not affected by NaCl. To investigate why *pans1-1* roots were shorter on NaCl medium, *pans1-1* root tip has been counterstained with propidium iodide to label the cell walls. Plants homozygous for *pans1-1*

Wild type *pans1-1*



Article3 - Figure 10 : Roots growth under stress conditions

Root growth in the *pans1-1* mutants. (A) At 10 days after sowing (das) on NaCl medium, root growth is strongly reduced in *pans1-1* seedlings. (B) Root length measures at 6 das and 10 das on NaCl medium. (C) Longitudinal view of the root meristem in wild-type and (D) *pans1-1* seedlings grown on NaCl medium. Root cell walls were stained with propidium iodide. Scale bar =20μm.

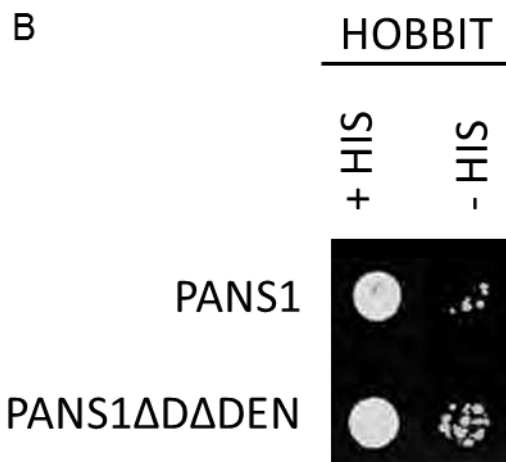
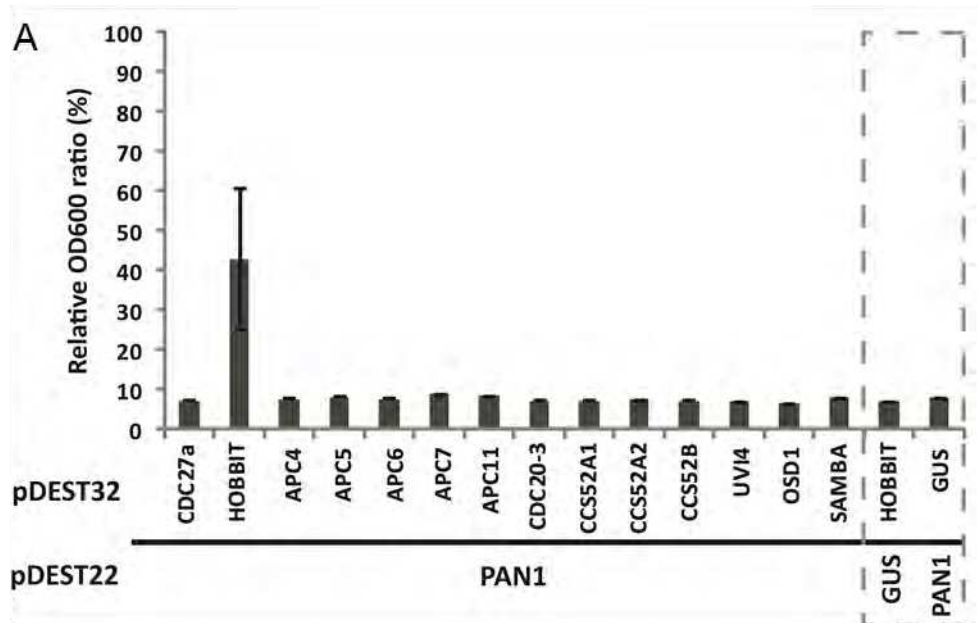
mutation appeared morphologically normal but exhibited some cell-pattern defects in root, indicative of aberrant cell divisions (Figure 10).

Patronus interacts with APC/C core components

Looking for PANS1 interactors, tandem affinity purification (TAP) experiments were performed on cell culture using PANS1 as baits (Van Leene et al., 2007). Several APC/C subunits were co-purified with PANS1 and identified by mass spectrometry: HOBBIT (*AtCDC27b*), *AtAPC6*, *AtAPC7* and *AtAPC8*. This showed that PANS1 interacts with the APC/C but, as TAP purifies protein complexes as a whole, these results do not permit determination of which APC/C subunit PANS1 directly interacts with. Therefore, to study the interaction of PANS1 with the different APC/C subunits in more detail, we used yeast two-hybrid (Y2H) interaction matrix, testing all possible interactions with 18 different APC/C subunits (Heyman et al 2011). Only the test with the APC/C component HOBBIT (*AtCDC27b*) turned to be positive (Figure 11). We further tested in Y2H the interaction of PANS1 or PANS2 with HOBBIT (*AtCDC27b*), *AtAPC6* and *AtAPC7*. Again, only the PANS1-HOBBIT interaction test was positive. Thus PANS1 interacts directly with the APC/C through the HOBBIT subunit (Figure 11).

PANS1 mutated for its destruction domains interacts with CDC27b and is lethal *in vivo*

PANS1 possess two putative APC/C targeting signals, a Destruction BOX and a DEN-box. For both the D-box and DEN-box, essential amino acid residues were substituted (RxxL -> LxxV and DEN-> AAA). Mutating both domains did not affect the Y2H PANS1 – HOBBIT interaction (Figure 11). To investigate whether these domains are needed for PANS1 function *in vivo*, we created version of the genomic PANS1 gene with one or both mutations (PANS1 Δ D, PANS1 Δ DEN and PANS1 Δ D Δ DEN) and tested their capacity to complement the *pans1-1* mutant phenotype. The wild type genomic and PANS1 Δ DEN clones were able to restore the pollen viability and normal meiosis of the *pans1-1* mutant (number of independent transformants n=11 and n=8 respectively), showing that the DEN box is not essential for the PANS1 meiotic function. When PANS1 Δ D was expressed either in wild type or *pans1-1* mutant, a dominant defect in growth and fertility was observed (n= 10 and 2) (to be continued). While numerous transformed plants were obtained for each of the three other constructions at each transformation experiment, no plant were obtained when PANS1 Δ D Δ DEN was used (four transformation experiments). This strongly suggests that the Δ D Δ DEN version of the PANS1 protein is lethal.



Article3 - Figure 11: PANS1 interacts with HOBBITS through its D-Box

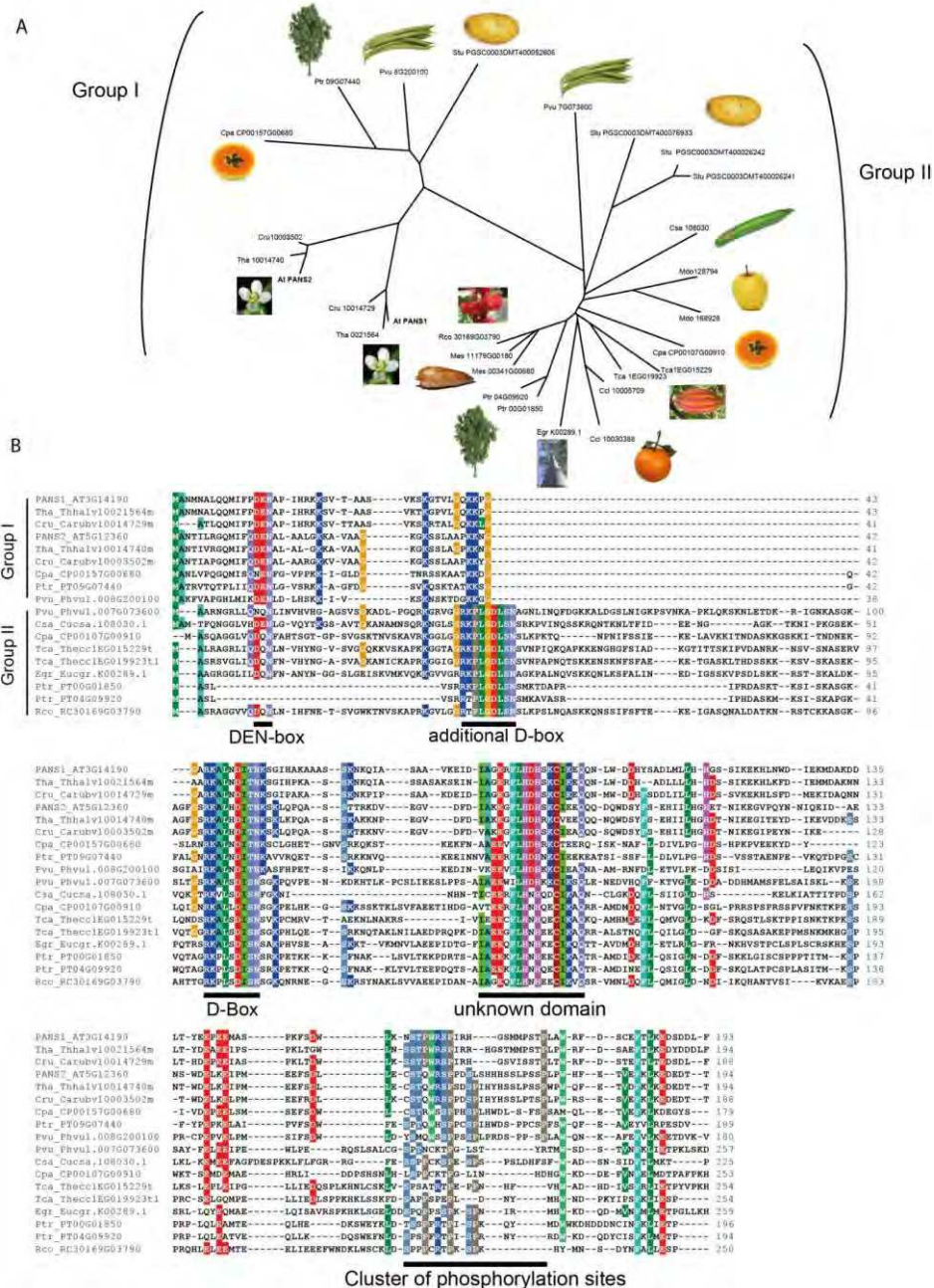
(A) OD plot of Y2H interaction via mating using testing PANS1 against various APC/C subunits (ref). Only the interaction with HOBBIT scored positive. (B) PANS1 interacts with HOBBIT in Y2H. PANS1 with mutation of its DEN-Box and D-Box still interacts with HOBBIT.

DISCUSSION

At meiosis centromeric cohesion must be protected through meiosis I, until anaphase onset of the second division, to ensure balance segregation of sister chromatids. Here we show in *Arabidopsis* that sister chromatid cohesion is in fact protected twice at meiosis, during anaphase I by two Shugoshin proteins and during interkinesis by Patronus, an APC/C putative regulator.

We functionally characterized the two SGO paralogues in *A. thaliana*. The mutation of *SGO1* led to a partial loss of centromeric cohesion during meiosis I, leading to a mixture of single and cohesive chromatids at metaphase II. In contrast, *SGO2* single mutation appeared to have no effect on meiosis. Further, a *Atsgo1 Atsgo2* double mutant showed an almost complete loss of sister chromatid cohesion during anaphase I, resulting in single chromatids at meiosis II that segregated erratically at anaphase II. At meiosis I bivalents aligned normally, and the homologous chromosomes segregated evenly showing that the two *AtSGO* genes are not required for sister chromatid cohesion establishment or monopolar kinetochore orientation. In wild type, the REC8 cohesin is detectable on bivalent at metaphase I, and with a lower intensity on sister chromatid pairs at metaphase II. In the *Atsgo1 Atsgo2* double mutant, the REC8 signal is indistinguishable from wild type at metaphase I, but is no longer detectable on the single chromatids at metaphase II. Altogether, this shows that the two *Arabidopsis* SGO paralogs act redundantly to protect REC8 at centromeres during meiosis I. Thus the *Arabidopsis* SGO genes appear to ensure the conserved role of REC8 protection during anaphase I, the only difference with other organisms tested so far being that both genes are involved in this function. The two *Arabidopsis* SGO genes appear to be issued from a recent duplication that is shared only with brassicae, which may explain their functional redundancy. Interestingly neither single nor *Atsgo1 Atsgo2* double mutants have detectable growth or development defect suggesting that, in contrast to the situation in mammals and yeasts, none of the Shugoshins have role at mitosis in *Arabidopsis*. Concerning plants, only one of the two SGO genes has been characterized in rice and maize (Hamant et al., 2005; Wang et al., 2011). In both species, this gene is involved only in meiosis ensuring the canonical role of centromeric cohesion protection. It would be interesting to analyze the function of the other paralogs to test the putative meiotic function of the second gene and if the absence of requirement of SGOs at mitosis is shared in the plant clade.

Further, using a genetic screen, we identified a novel actor of meiotic cohesion protection, and named it Patronus (*PANS1*) for protector in Latin language. In *pans1* mutant, meiosis I occurred normally with bivalent alignment and regular homologous chromosome segregation. In contrast, single chromatids were observed at metaphase II, leading to random segregation. The REC8 cohesin was normally present on metaphase I bivalents but was not detected on single chromatids at metaphase II. This defect is reminiscent of the



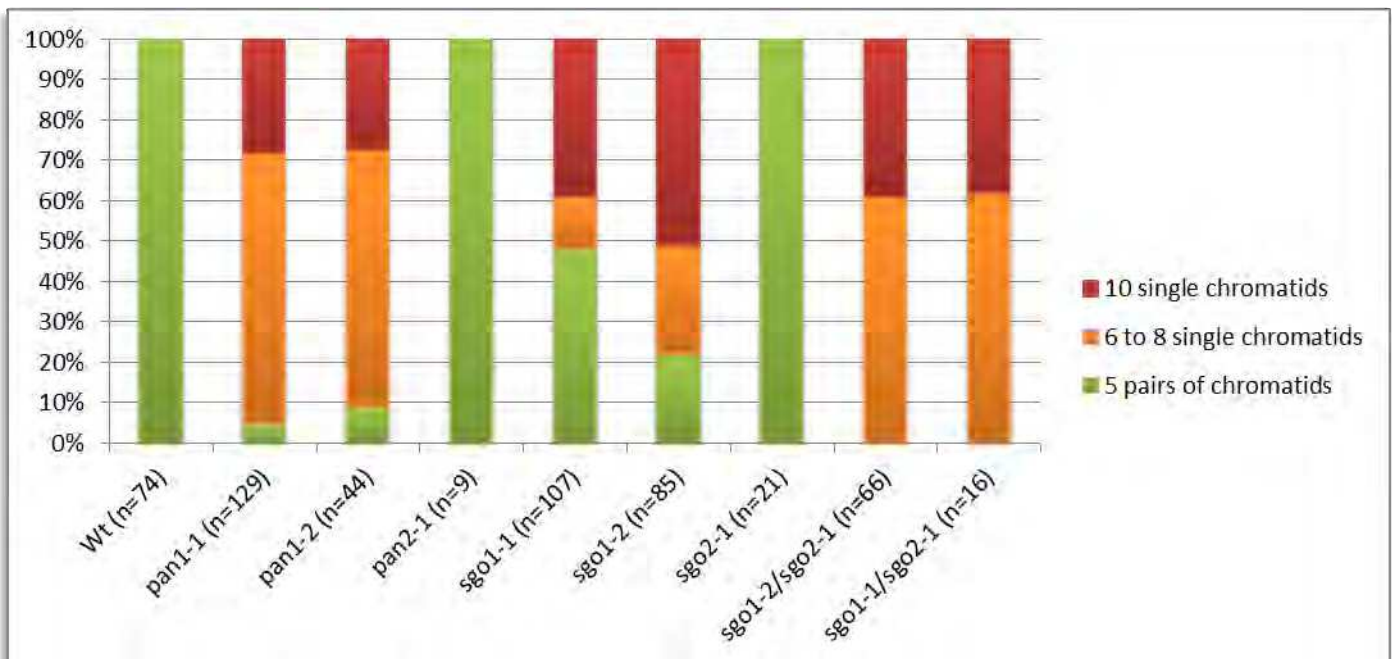
Article3 - Figure S1 :

(A) Unrooted phylogenetic tree of the dicots PANS protein family inferred from a T-coffee multiple alignment using neighbor joining algorithm. PANS1 homologs can be distinguished from PANS2 homologues only in species closely related to *Arabidopsis* (belonging to the Brassicaceae order), suggesting that these two genes are issued from a relatively recent duplication. PANS representatives cluster in two groups. Some species have a representative in both groups, while some have a representative only in group II. Brassicaceae have two representatives in group I (PAN1 and PANS2) but none in group II. This suggests recurrent dynamic losses and gains of PANS genes in the evolution of dicots. (B) A T-Coffee multiple alignment of a representative subset of dicots PANS family members. Amino acids identical in at least 50% of the proteins are shaded with a color code. Three domains are well conserved. The first one is a DEN-box (DEN Aa 14-16 in PANS1), and the second a D-Box (destruction box, RxxLxxN, Aa 46-54). The third conserved domain (Aa 81 to 97, around FLHDH) appears to be specific to PANS protein. Members of the group II of PANS homologous contain an additional D-Box between the conserved DEN and KEN boxes. Finally a cluster of putative CDK dependent phosphorylation sites ([S/T-P-x[K/R]) is found close to the C-terminal end of the proteins. All available homologs are included for the selected range of species, with the species of origin being indicated by a four letter code preceding each protein identifier. Sequences were retrieved from Phytosome v6.0 and Plazza 2.5. Analyses were performed using the MPI toolkit and formatted with Bioedit.

Atsgo1 Atsgo2 defect and shows that PANS1 is required for sister chromatid cohesion protection at meiosis. However, the *pans1* defect differs from the *Atsgo1Atsgo2* defect. Indeed, even if the defect is similar in both mutants at metaphase II, the single chromatids are visible as soon as late anaphase I/telophase I in *Atsgo1 Atsgo2*, while sister chromatids are still attached by their centromere at telophase I/interkinesis in *pans1*. This shows that, while AtSGOs protect sister chromatid cohesion during anaphase I, PANS1 protects centromeric cohesion during interkinesis. Such a function of centromeric cohesion protection during meiotic interkinesis has not been described so far.

Beyond the crucial role of PANS1 at meiosis, the PANS family protein appears to have an important somatic function. Indeed, *pans1* mutant exhibited growth defect under stress conditions. Further PANS1 and its paralog PANS2 are synthetically lethal for gametophyte development and transmission. This strongly suggests that these genes play a redundant essential role at mitosis. At least one PANS homolog is present in all dicot species. However phylogeny analysis strongly suggests that PANS1 and PANS2 separation of function appeared in the Brassicaceae clade (Figure S1). In monocots, no clear homolog is found, but only a protein family that shows limited similarity. One of two representative of this family in rice, RSS1, has been shown to regulate somatic cell cycle under stress condition but do not appear to have a meiotic function (Ogawa et al., 2011). We did not find PANS relatives beyond the plant kingdom.

We further showed that PANS1 interacts with the APC/C through a direct interaction with the AtCDC27b subunit. PANS1 possess two APC/C degradation motifs, which are not required for its interaction with AtCDC27b. When trying to express a PANS1 protein mutated for both degradation domains, no transformed plants could be obtained, strongly suggesting that this expression is lethal. This advocates that PANS1 is targeted by the APC/C through its DEN and D-box domains and that a non-degradable version perturbs mitosis. Altogether, this suggests that PANS1 may be both a regulator and a target of the APC/C. PANS1 may positively or negatively regulate the APC/C or conferring its target specificity. At least three hypotheses can be advanced on how an APC/C regulator could be involved in cohesion protection during meiotic interkinesis. First, the Separase that cleaves cohesins along chromosomes may be prevented by PANS1 from cleaving centromeric cohesion at interkinesis. One possibility would be that PANS1 protects SGO from APC/C destruction, as SGO proteins have predicted APC/C degradation motifs. Second, PANS may protect centromeric cohesion from Separase independently of Shugoshin if this one does not protect any longer centromeric cohesion during interkinesis. Shugoshin cytological dynamics has not been established so far in *Arabidopsis*, but in *S.pombe*, rice and maize SGO is no longer detectable after anaphase I. Under this second hypothesis, Patronus may prevent Separase activity either by stimulating its targeting by APC/C or conversely by preventing the destruction by APC/C of a Separase inhibitor (i.e the Securin which has not been identified yet in plants). Third, PANS1 may inhibit the other known pathway of cohesin release that is normally active at the end of mitosis (telophase/G1 of the next round of mitosis). This



Article 3- Table 1 : Quantification of sister chromatid cohesion at metaphase II.

Metaphase plates were sorted into three categories according to the number of single and pairs of chromatids. The proportion of each category is shown for wild type and a series of mutants. The number of plates observed is indicated in brackets.

pathway allow dynamic renewal of cohesins at G1, through cohesin loading catalyzed by SCC2/SCC4 and cohesin release by catalyzed by WAPL (Nasmyth, 2011). Such WAPL activity must be prevented at meiotic interkinesis which somehow resembles mitotic telophase/G1. This could be the function of PANS1 to inactivate WAPL activity via APC/C regulation. *Arabidopsis* possess two WAPL homologs that have not been yet characterized. It would be of particular interest to address the functional relationship of PANS1 with the WAPL genes on one hand and with the Separase on the other hand, to understand the molecular bases of this novel mechanism of cohesion protection ensured by PANS1.

MATERIEL & METHODS

Growth conditions and genotyping

Arabidopsis plants were cultivated in greenhouse as previously described (Vignard et al., 2007). *Arabidopsis* root growth measurements was done on *Arabidopsis* medium (Estelle and Somerville, 1987) or on *Arabidopsis* medium supplemented with 80mM NaCl at 21°C, under a 16-h to 18-h photoperiod and 70% relative humidity. The *pans1-1* (Salk_070337), *pans1-2* (Salk_035661), *pans2-1* (Sail_305_G04), *sgo1-1* (SK35523), *sgo1-2* (SK2556) and *sgo2-1* (Line 34303) were genotyped by PCR with two primers. The first pair is specific to the wild-type allele and the second pair is specific to the left border of the inserted sequence. *pans1-1 and pans1-2*: N570337U (5' CCGTTAAACACTCTAAGCGC 3') & N570337L (5' ATGCTTCTCCTTGATGCTGG 3'); N570337L & LBSalk2. *pans2-1*: N814152 U (5' GAGGTAGAGCTCCTGGCAAC 3') & N814152 L (5' ACCCCCTAGAAACAATGCTG 3'); N814152 L & Lb3Sail. *sgo1-1* : SK35523U (5' ATTCAAATTCGATCCTGTTA 3') & SK35523L (5' ACCGCCAAGATACGAGTGTT 3'); SK35523U & pSKTail1. *sgo1-2*: SK2556U (5' GAGGTCGGCAATAAGGTTAG 3') & SK2556L (5' CCCGATAGACTGTTCACCTG 3'); SK2556U & pSKTail1. *sgo2-1*: SGO2U (5' TAAGTTATCCGTTGGCCTAC 3') & SGO2L (5' GATTGCCTTCGTGTACATTGC 3'); SGO2U & GABI (5' ATATTGACCATCATACTCATTGC3')

Cytology

Chromosomes spreads were done as previously described (Azumi et al., 2002). Alexander staining was performed according to (Alexander, 1969). Immunolocalization were performed according to published methods (Chelysheva et al., 2010). The anti-HTR12 antibody was described by (Talbert et al., 2002). It was used at a dilution of 1:400. The anti-REC8 antibody was raised against a partial recombinant protein of 174 Aa and produced as described in (Vignard et al., 2007). It was used at a dilution of 1:250. Propidium iodide roots staining were performed as described (Truernit et al., 2008). Observations were made using a ZEISS AxioObserver microscope.

Roots growth measure

Arabidopsis seeds were sterilized as previously described. Seven seeds were sown on square petri dishes filled with *Arabidopsis* medium (with or without NaCl). Petri dishes were placed vertically in a growth chamber and scanned at 6 and 10 days after sowing. Root length was measured using ImageJ software.

TAP-TAG/Y2H

PAN1 and PAN2 cDNA was amplified by PCR using: (5' ATGGCGAACATGAACGCTCT 3') & (5' TCAGAAGAGGTCGTCAGAGTC 3') and (5' ATGGCCAACACAATTCTTCG3') & (5' TCAAGTGGTGTCTTCATCCT 3') respectively. PCR products were cloned by Gateway (Invitrogen) into the pDONR221 vector (Invitrogen) to create pENTR-cPAN1 and pENTR-cPAN2. LR reactions were done into the pDEST32 (bait) and pDEST22 (prey) vector (Invitrogen). Other tandem affinity purification constructs were generated and purified as previously described (ref). Y2H interaction matrix was performed as described in (Heyman et al., 2011). Y2H interaction testing using PAN1 mutant allele as prey (pDEST22) with APC/C subunits as bait (pDEST32) was performed by mating, as described previously (Heyman et al., 2011) into the yeast strain AH109 and Y187 (Clontech).

Directed mutagenesis constructs, plant transformation and plasmid constructs

PAN1 genomic fragment was amplified by PCR using PAN1U (5' CACCATCAACTTCCGGTTGG 3') and PAN1L (5' GCAGCAAGTTATGAAAAGGTGG 3'). The amplification covered 964 nucleotides before the ATG and 477 after the stop codon. The PCR product was cloned, by Gateway (Invitrogen) into the pDONR207 (Invitrogen) to create pENTR-PAN1, on which directed mutagenesis was performed using the Stratagene Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit. The primers used to create the PAN1 Δ DEN and PAN1 Δ D mutations were (5' GATCTTCCCAGCCGCGCCGCTCCAATTCATC 3') and (5' CCTGGAGGAGCTCTTAAGGCTGTGAATGATATTAC 3') respectively. For plant transformation, LR reaction was performed with the binary vector pGWB1 (ref). The resulting binary vectors, pPAN1, pPAN1 Δ DEN, pPAN1 Δ D and pPAN1 Δ DEN Δ D were transformed using the *Agrobacterium*-mediated floral dip method (Clough and Bent, 1998) on plant population segregating for the *pan1-1* mutation. Transformed plants were selected on agar plates containing 20mg/L hygromycin. For Y2H experiments with mutant alleles, same primers were used and mutagenesis was performed on pENTR-PAN1 vector. Partial REC8 cDNA was amplified by (5' GCTGATGCCGAGAATATCA CAC 3') and (5' AGAACTGTCCTTTTCAAA GAG 3') and cloned into a pDES17 (Invitrogen) for bacterial protein production.

3. Données supplémentaires

Les études menées chez *S. pombe* nous indiquent que SpSGO1 a un rôle sur la mono-orientation des kinétochores en méiose I chez un mutant achiasmatique (voir B.IV.2.2.1). Nous nous sommes intéressés au rôle d'AtSGO et PANS1 dans l'orientation des kinétochores en méiose. Ainsi j'ai introduit la mutation *pans1* dans un mutant achiasmatique. L'observation d'étalement de chromosomes méiotiques mâles a permis de mettre en évidence une séparation des chromatides sœurs en méiose I chez un double mutant *pans1/Atspo11*. Cependant ce phénotype ne semble pas être complètement pénétrant car j'observe fréquemment des chromosomes qui ne semblent pas ségréger. Chez *A. thaliana*, le double mutant *Atspo11/Atrec8* réalise une division équationnelle en méiose I (Chelysheva et al., 2005), produisant deux lots de 10 chromatides libres en fin de méiose I (noté 10:10). Chez un triple mutant *pans1/Atspo11/Atrec8*, j'ai observé des ségrégations déséquilibrées des chromatides sœurs en méiose I de type 12:8 ou 13:7 mais également des ségrégations 10:10. Ces résultats sont préliminaires et doivent être confirmés. L'observation d'un nombre plus important de cellules devrait permettre de décrire plus précisément ces phénotypes. Cependant ces résultats suggèrent un rôle (direct ou indirect) de PANS1 en méiose I dans l'orientation des kinétochores. L'analyse des multi-mutants *Atsgo/Atrec8/Atspo11* n'a pas encore été réalisée.

4. Discussions et perspectives

Tout d'abord, certaines données restent à compléter afin de pouvoir soumettre l'article 3.

Afin de caractériser finement la répartition des cohésines dans les différents mutants, il paraît nécessaire d'ajouter les stades anaphase I et télophase I aux figures 5 et 6. En effet, la perte de cohésion centromérique apparaît, au DAPI, en anaphase I tardive chez le double mutant *Atsgo1-2/Atsgo2-1* et en métaphase II chez *pans1-1*. Il paraît essentiel de montrer la localisation de REC8 à ces stades chez ces deux mutants. Les premières images montrent que REC8 est absente en anaphase I tardive chez *Atsgo1-2/Atsgo2-1*. Cependant ces résultats doivent être confirmés. De même, on pourrait imaginer observer une différence, peut-être quantitative de la quantité de REC8 en interkinèse chez *pans1-1*, qui pourrait nous aider à comprendre la fonction de PANS1.

Nous avons pu mettre en évidence que PANS1 interagit avec CDC27b par une approche double hybride. Les domaines D-box et DEN-box de PANS1 ne sont pas essentiels à cette interaction. Il semblerait que l'interaction PANS1-CDC27b soit plus forte lorsque les domaines de destruction de PANS1 sont supprimés. On peut ainsi imaginer que la protéine PANS1 Δ D Δ DEN est plus stable que PANS1 dans la levure, suggérant que PANS1 peut être une cible de l'APC/C de *S. cerevisiae*. Ainsi la quantité de protéines présente dans les levures pourrait être quantifiée par Western blot. De plus, les interactions PANS1 Δ D-CDC27b et

PANS1 Δ DEN-CDC27b sont à reproduire car pour l'instant les résultats obtenus pour ces interactions ne sont pas reproductibles.

Comme indiqué dans l'article, la construction PANS1 Δ D a été introduite dans des plantes sauvages. Cette construction induit un défaut somatique et un défaut de fertilité. Une caractérisation plus précise de ce mutant est nécessaire. Il serait également intéressant de reproduire ces constructions en remplaçant le promoteur de *PANS1* par un promoteur méiose-spécifique. Ceci nous permettrait d'étudier uniquement le défaut méiotique de PANS1 Δ D mais également celui de PANS1 Δ D Δ DEN qui ne peut être observé pour l'instant car cette construction semble létale pour la plante.

D'autre part pour comprendre la fonction de Patronus, nous sommes actuellement en train de produire des multi-mutants entre *pans1*, *Atsgo1* et *Atsgo2* afin de déterminer s'il existe des relations d'épistasie entre ces différents gènes. Il paraît également intéressant de déterminer si un mutant de l'APC/C peut supprimer (au moins partiellement) le défaut méiotique de *pans1*. De telles expériences pourraient nous permettre de déterminer si PANS1 est un inhibiteur de l'APC/C (comme OSD1) nécessaire à la protection de la cohésion centromérique en méiose.

L'étude de la localisation de PANS1 et d'AtSGO1 et/ou AtSGO2 est également une perspective importante. Nous avons produit des anticorps polyclonaux dirigés contre chacune de ces trois protéines. Malheureusement ces derniers ne semblent pas fonctionner en immunolocalisation. SGO a été localisée chez la plupart des organismes dont le riz et le maïs où le signal SGO est présent aux centromères des chromosomes de la prophase I à la métaphase I (Hamant et al., 2005; Wang et al., 2011). Localiser AtSGO1 et/ou AtSGO2 nous permettrait de déterminer si PANS1 est impliquée dans la localisation ou le maintien de SGO au cours de la méiose.

Afin de vérifier les hypothèses proposées dans la discussion de l'article 3, nous allons tester plusieurs combinaisons de mutants. *A. thaliana* possède deux gènes codant des protéines homologues à WAPL mais qui n'ont pas été caractérisés jusqu'à maintenant. La combinaison de *pans1* avec ces mutants pourrait nous renseigner sur un rôle éventuel de PANS1 sur les événements de chargement/déchargement des cohésines. De la même manière, on pourrait imaginer que la combinaison de *pans1* avec un mutant faible de séparase (Yang et al., 2011) pourrait entraîner une diminution partielle du défaut de perte de cohésion centromérique en méiose. On pourrait également imaginer localiser la séparase dans des méiocytes afin de déterminer s'il existe des différences entre un sauvage et un mutant *pans1*.

Au sein de l'équipe, un crible suppresseur basé sur le défaut de fertilité de *pans1* avait été entrepris il y a quelques années. Malheureusement, la fertilité de *pans1* est variable et cette variabilité semble être dépendante de paramètres que nous ne maîtrisons pas. Ceci rend, un tel crible, impossible à l'heure actuelle. Nous envisageons désormais de réaliser un autre crible suppresseur basé sur le défaut de croissance racinaire de *pans1* en conditions de stress.

Ces résultats ont permis de mettre en évidence un nouveau niveau de régulation de la protection de la cohésion centromérique en méiose. Ainsi chez *A. thaliana*, la cohésion centromérique est protégée par Shugoshin en méiose I et par Patronus en interkinèse. A ma connaissance, à part la protéine ScSPO13 dont la fonction précise n'a pas été déterminée, aucune autre voie, que celle de Shugoshin, n'a été mise en évidence dans la protection de la cohésion centromérique. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de protéines homologues à Patronus en dehors du règne végétal. Ceci suggère que ce mécanisme est peut être légèrement différent ou que des protéines non conservées et non identifiées sont requises chez les autres organismes, comme cela est le cas pour OSD1 et les protéines nécessaires à l'activité CYC/CDK résiduelle lors de la transition méiose I-méiose II.

E. DISCUSSION GENERALE

Au cours de ce travail de thèse, j'ai pu mettre en évidence l'importance de la régulation de l'APC/C au cours de la méiose. J'ai pu montrer que dans au moins deux processus clés de la méiose (la régulation du cycle et la protection de la cohésion centromérique), un contrôle de l'APC/C est nécessaire pour permettre la formation de spores équilibrés et haploïdes. Cette étude a permis d'identifier un réseau fonctionnel de protéines impliquées dans la progression méiotique où la régulation de l'APC/C joue un rôle essentiel. Ce travail a également permis de mettre en évidence pour la première fois, la nécessité de protéger la cohésion centromérique lors de l'interkinèse de méiose et cela *via* l'analyse d'une protéine dont une des fonctions pourrait être de réguler l'APC/C. De plus, des études réalisées chez les plantes nous indiquent qu'un lien existe entre des protéines du "cycle cellulaire" et les événements de recombinaison. SDS est une cycline spécifique de la méiose chez *A. thaliana* (Azumi et al., 2002). L'analyse du mutant *sds* nous montre que SDS est nécessaire à la réparation des cassures double brin sur le chromosome homologue au cours de la recombinaison (De Muyt et al., 2009). Chez le blé, le locus *Ph1* a été mis en évidence comme impliqué dans l'appariement des chromosomes homologues chez les polyploïdes. La localisation de ce locus a montré que *Ph1* correspondait à un groupe de 7 gènes apparentés à des CDK (Griffiths et al., 2006). Toutes ces données nous montrent l'importance des mécanismes de "cycle cellulaire" au cours de la méiose et l'intérêt de les étudier.

Dans les années à venir, l'identification de nouvelles protéines ainsi que leur caractérisation chez les différentes espèces modèles devraient nous permettre une meilleure compréhension des mécanismes méiotiques. Il serait également intéressant d'étudier les connexions entre la régulation du cycle, la protection de la cohésion et l'orientation des kinétochores. Comme on peut le voir par exemple, chez *S. cerevisiae*, où l'expression en méiose I d'une cycline spécifique de méiose II entraîne la bi-orientation des kinétochores sœurs en première division, suggérant fortement que ces différents mécanismes sont coordonnés les uns avec les autres (Carlile and Amon, 2008).

Les résultats présentés ici ainsi que d'autres suggèrent que ces mécanismes, de cycle, de cohésion et d'orientation des kinétochores diffèrent entre les organismes plus que les mécanismes liés à la recombinaison. C'est, par exemple, le cas des protéines impliquées dans la mono-orientation des kinétochores qui ne sont pas conservées entre les espèces et qui pour l'instant ont été identifiées uniquement chez les levures. Chaque organisme montre des particularités au cours de son programme méiotique mais tous ont le même but. Ainsi il semblerait que pour chaque espèce, les mécanismes méiotiques aient évolué différemment pour former des gamètes haploïdes équilibrés et cela en fonction de divers facteurs, tels que la structure des chromosomes, les conditions de vie ou encore le dimorphisme sexuel.

F. MATERIELS & METHODES

La plupart des protocoles sont décrits dans les parties " MATERIALS AND METHODS" des articles 1, 2 et 3. Ici sont regroupés les protocoles des expériences présentées dans les données supplémentaires.

- Amorces utilisées pour génotypage des mutants T-DNA

Pour chaque mutant T-DNA, la mutation est génotypée avec deux paires d'amorces. La première amplifie spécifiquement l'allèle sauvage et la seconde est spécifique de l'insertion du T-DNA.

ccs52a1 (SALK_083656): N663146U (5' CGTGGACTGTAGGATTCTTGC 3') et N663146L (5' CGGTACACATACCGAGTCTT 3'); N663146 L et LbSalk2

ccs52a2 (SALK_001978): N501978U (5' GACTTCTTGCTTCTGGTGGTG 3') et N501978L (5' CCTTTTCACTCTGGGTCAAGG 3'); N501978L et LbBalk2

ccs52-b (SALK_098269): N598269U (5' TGTTTCAATCTCCGACCAAAC 3') et N598269L (5' CTCCTGATGATAAGATCC 3'); N598269L et LbSalk2

spo11-2 (GABI_749C12): 749C12U (5' GAGCGAGAATTTTTGGTTGG 3') et 749C12L (5' CCACAAGGTCAATTCTCAAC 3'); 749C12L et LbGABI

- Construction de RNAi CDC20

Un fragment d'ADN de 279pb commun aux gènes AtCDC20-1 et AtCDC20-2 a été amplifié avec les amorces suivantes contenant les sites de recombinaison Gateway (Invitrogen): HpCDC20UGTW (5' CTGGACAGGTCATACCGA 3') et HpCDC20LGTW (5' CTGAGGAATGTATCGACGAG 3'). Le fragment de PCR a été cloné dans le vecteur pDONOR207 (Invitrogen) par une réaction BP (Invitrogen) puis séquencé. La construction pENTRHpCDC20 a été utilisée dans la réaction LR avec le vecteur de destination pFGC5941/pFRB18 (Rosnoblet et al., 2007). Ce plasmide binaire contient un promoteur 35S et deux cassettes Gateway, une sens et une antisens séparées par l'intron de la chalcone synthase A (ChsA). Après séquençage, ce plasmide a été transformé dans une souche *A. tumefaciens* EHA105 et introduit dans des *Arabidopsis* Col-0 par "floral dip" (Clough and Bent, 1998). Les plantes transformées sont ensuite sélectionnées sur BASTA (5-10 mg/l phosphinothricin).

- Production de l'anticorps anti-TAM

Un fragment d'ADN de 330pb a été amplifié avec les amorces suivantes contenant les sites de recombinaison Gateway (Invitrogen): TAMACGTWU (5' ATCGGCCAATCTAAGAAAGC 3') et TAMACGTWL (5' ATCCATCAAGTCACTATCAA 3'). Le fragment de PCR a été cloné dans le

vecteur pDONOR207 (Invitrogen) par une réaction BP (Invitrogen) puis séquencé. Cette construction a été utilisée dans la réaction LR avec le vecteur de destination pDEST17 (Invitrogen). Ensuite, l'anticorps anti-TAM a été produit contre une protéine recombinante de 110 Aa selon la méthode décrite dans (Vignard et al., 2007).

G. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agashe, B., Prasad, C.K., and Siddiqi, I. (2002). Identification and analysis of DYAD: a gene required for meiotic chromosome organisation and female meiotic progression in Arabidopsis. *Development* 129, 3935–3943.
- Alexander, M. (1969). Differential staining of aborted and nonaborted pollen. *Biotechnic & Histochemistry* 44, 117–122.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* 301, 653–657.
- Azumi, Y., Liu, D., Zhao, D., Li, W., Wang, G., Hu, Y., and Ma, H. (2002). Homolog interaction during meiotic prophase I in Arabidopsis requires the SOLO DANCERS gene encoding a novel cyclin-like protein. *The EMBO Journal* 21, 3081–3095.
- Bardhan, A. (2010a). Complex regulation of sister kinetochore orientation in meiosis-I. *Journal of Biosciences* 35, 485–495.
- Bardhan, A. (2010b). Many functions of the meiotic cohesin. *Chromosome Research* 18, 909–924.
- Barrell, P.J., and Grossniklaus, U. (2005). Confocal microscopy of whole ovules for analysis of reproductive development: the elongate1 mutant affects meiosis II. *The Plant Journal* 43, 309–320.
- Bechtold, N., and Pelletier, G. (1993). In Planta Agrobacterium Mediated Transformation of Adult Arabidopsis thaliana Plants by Vacuum Infiltration. *Methods in Molecular Biology* 82, 259–266.
- Beckouët, F., Hu, B., Roig, M.B., Sutani, T., Komata, M., Uluocak, P., Katis, V.L., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2010). An Smc3 acetylation cycle is essential for establishment of sister chromatid cohesion. *Molecular Cell* 39, 689–699.
- Ben-Shahar, T.R., Heeger, S., Lehane, C., East, P., Flynn, H., Skehel, M., and Uhlmann, F. (2008). Eco1-dependent cohesin acetylation during establishment of sister chromatid cohesion. *Science* 321, 563–566.
- Berchowitz, L.E., and Copenhaver, G.P. (2008). Fluorescent Arabidopsis tetrads: a visual assay for quickly developing large crossover and crossover interference data sets. *Nature Protocols* 3, 41–50.
- Berchowitz, L.E., Francis, K.E., Bey, A.L., and Copenhaver, G.P. (2007). The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in A. thaliana. *PLoS Genetics* 3, e132.
- Bernard, P., Maure, J.F., and Javerzat, J.P. (2001a). Fission yeast Bub1 is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nature Cell Biology* 3, 522–526.
- Bernard, P., Maure, J.F., Partridge, J.F., Genier, S., Javerzat, J.P., and Allshire, R.C. (2001b). Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. *Science* 294, 2539–2542.

- Bernard, P., Schmidt, C.K., Vaur, S., Dheur, S., Drogat, J., Genier, S., Ekwall, K., Uhlmann, F., and Javerzat, J.-P. (2008). Cell-cycle regulation of cohesin stability along fission yeast chromosomes. *The EMBO Journal* *27*, 111–121.
- Bicknell, R.A., and Koltunow, A.M. (2004). Understanding Apomixis : Recent Advances and Remaining Conundrums. *The Plant Cell* *16*, 228–246.
- Biegert, A., Mayer, C., Remmert, M., Söding, J., and Lupas, A.N. (2006). The MPI Bioinformatics Toolkit for protein sequence analysis. *Nucleic Acids Research* *34*, W335–9.
- Birchler, J. a, Gao, Z., Sharma, A., Presting, G.G., and Han, F. (2011). Epigenetic aspects of centromere function in plants. *Current Opinion in Plant Biology* *14*, 217–222.
- Blanco, M. a, Pelloquin, L., and Moreno, S. (2001). Fission yeast *mfr1* activates APC and coordinates meiotic nuclear division with sporulation. *Journal of Cell Science* *114*, 2135–2143.
- Boateng, K. a, Yang, X., Dong, F., Owen, H. a, and Makaroff, C. a (2008). SWI1 is required for meiotic chromosome remodeling events. *Molecular Plant* *1*, 620–633.
- Borges, V., Lehane, C., Lopez-Serra, L., Flynn, H., Skehel, M., Rolef Ben-Shahar, T., and Uhlmann, F. (2010). Hos1 deacetylates Smc3 to close the cohesin acetylation cycle. *Molecular Cell* *39*, 677–688.
- Borgne, A., Murakami, H., and Nurse, P. (2002). The G1 / S Cyclin *Cig2p* during Meiosis in Fission Yeast. *Molecular Biology of the Cell* *13*, 2080–2090.
- Brar, G. a, Kiburz, B.M., Zhang, Y., Kim, J.-E., White, F., and Amon, A. (2006). Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. *Nature* *441*, 532–536.
- Bretagnolle, F., and Thompson, J.D. (1995). Gametes with the somatic chromosome number : mechanisms of their formation and role in the evolution of autopolyploid plants. *New Phytol.* 1–22.
- Brown, J. (1996). Arabidopsis intron mutation and pre-mRNA splicing. *The Plant Journal* *10*, 771–780.
- Bulankova, P., Riehs-Kearnan, N., Nowack, M.K., Schnittger, A., and Riha, K. (2010). Meiotic progression in Arabidopsis is governed by complex regulatory interactions between SMG7, TDM1, and the meiosis I-specific cyclin TAM. *The Plant Cell* *22*, 3791–3803.
- Buonomo, S.B., Clyne, R.K., Fuchs, J., Loidl, J., Uhlmann, F., and Nasmyth, K. (2000). Disjunction of homologous chromosomes in meiosis I depends on proteolytic cleavage of the meiotic cohesin Rec8 by separin. *Cell* *103*, 387–398.
- Buonomo, S.B.C., Rabitsch, K.P., Fuchs, J., Gruber, S., Sullivan, M., Uhlmann, F., Petronczki, M., Tóth, A., and Nasmyth, K. (2003). Division of the nucleolus and its release of CDC14 during anaphase of meiosis I depends on separase, SPO12, and SLK19. *Developmental Cell* *4*, 727–739.
- Burrack, L.S., and Berman, J. (2012). Flexibility of centromere and kinetochore structures. *Trends in Genetics* *28*, 204–212.
- Busso, D., Delagoutte-Busso, B., and Moras, D. (2005). Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in Escherichia coli. *Analytical Biochemistry* *343*, 313–321.
- Cai, X., Dong, F., Edelmann, R.E., and Makaroff, C. (2003). The Arabidopsis SYN1 cohesin protein is required for sister chromatid arm cohesion and homologous chromosome pairing. *Journal of Cell Science* *116*, 2999–3007.

- Caillaud, M.-C., Paganelli, L., Lecomte, P., Deslandes, L., Quentin, M., Pecrix, Y., Le Bris, M., Marfaing, N., Abad, P., and Favery, B. (2009). Spindle assembly checkpoint protein dynamics reveal conserved and unsuspected roles in plant cell division. *PLoS One* *4*, e6757.
- Calvente, a, Viera, a, Parra, M.T., De la Fuente, R., Suja, J. a, Page, J., Santos, J.L., De la Vega, C.G., Barbero, J.L., and Rufas, J.S. (2013). Dynamics of cohesin subunits in grasshopper meiotic divisions. *Chromosoma* *3*,
- Capron, A., Okr sz, L., and Genschik, P. (2003a). First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends in Plant Science* *8*, 83–89.
- Capron, A., Serralbo, O., and F l p, K. (2003b). The Arabidopsis anaphase-promoting complex or cyclosome: molecular and genetic characterization of the APC2 subunit. *The Plant Cell* *15*, 2370–2382.
- Carlile, T.M., and Amon, A. (2008). Meiosis I is established through division-specific translational control of a cyclin. *Cell* *133*, 280–291.
- Carvalho, C. De, Zaaijer, S., Smolikov, S., Yanjie, G., Schumacher, J.M., and Colai covo, M.P. (2008). LAB-1 antagonizes the Aurora B kinase in *C. elegans*. *Genes & Development* *22*, 2869–2885.
- Castro, A., and Vigneron, S. (2003). Xkid is degraded in a D-box, KEN-box, and A-box-independent pathway. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 4126–4138.
- Chelysheva, L., Diallo, S., Vezon, D., Gendrot, G., Vrielynck, N., Belcram, K., Rocques, N., Márquez-Lema, A., Bhatt, A.M., Horlow, C., et al. (2005). AtREC8 and AtSCC3 are essential to the monopolar orientation of the kinetochores during meiosis. *Journal of Cell Science* *118*, 4621–4632.
- Chelysheva, L., Grandont, L., Vrielynck, N., Le Guin, S., Mercier, R., and Grelon, M. (2010). An easy protocol for studying chromatin and recombination protein dynamics during Arabidopsis thaliana meiosis: immunodetection of cohesins, histones and MLH1. *Cytogenetic and Genome Research* *129*, 143–153.
- Chen, C.-B., Xu, Y.-Y., Ma, H., and Chong, K. (2005). Cell Biological Characterization of Male Meiosis and Pollen Development in Rice. *Journal of Integrative Plant Biology* *47*, 734–744.
- Chu, S., and Herskowitz, I. (1998). Gametogenesis in yeast is regulated by a transcriptional cascade dependent on Ndt80. *Molecular Cell* *1*, 685–696.
- Clarke, A.S., Tang, T.T.-L., Ooi, D.L.-Y., and Orr-Weaver, T.L. (2005). POLO kinase regulates the Drosophila centromere cohesion protein MEI-S332. *Developmental Cell* *8*, 53–64.
- Clift, D., and Marston, A. (2011). The role of shugoshin in meiotic chromosome segregation. *Cytogenetic and Genome Research* *133*, 234–242.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* *16*, 735–743.
- Clute, P., and Pines, J. (1999). Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. *Nature Cell Biology* *1*, 82–87.
- Cooper, K.F., Mallory, M.J., Egeland, D.B., Jarnik, M., and Strich, R. (2000). Ama1p is a meiosis-specific regulator of the anaphase promoting complex/cyclosome in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 14548–14553.
- Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J.L., Chelysheva, L., Copenhaver, G.P., Horlow, C., and Mercier, R. (2012). FANCM limits meiotic crossovers. *Science* *336*, 1588–1590.

Cromer, L., Heyman, J., Touati, S., Harashima, H., Araou, E., Girard, C., Horlow, C., Wassmann, K., Schnittger, A., De Veylder, L., et al. (2012). OSD1 Promotes Meiotic Progression via APC/C Inhibition and Forms a Regulatory Network with TDM and CYCA1;2/TAM. *PLoS Genetics* 8, e1002865.

Dahmann, C., and Futcher, B. (1995). Specialization of B-type cyclins for mitosis or meiosis in *S. cerevisiae*. *Genetics* 140, 957–963.

Davis, B.K. (1971). Genetic analysis of a meiotic mutant resulting in precocious sister-centromere separation in *Drosophila melanogaster*. *Molecular & General Genetics* 113, 251–272.

DeCesare, J.M., and Stuart, D.T. (2012). Among B-type cyclins only CLB5 and CLB6 promote premeiotic S phase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 190, 1001–1016.

Diamond, A.E., Park, J., Inoue, I., Tachikawa, H., and Neiman, A.M. (2009). The Anaphase Promoting Complex Targeting Subunit Ama1 Links Meiotic Exit to Cytokinesis during Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* 20, 134–145.

Dilkes, B.P., Spielman, M., Weizbauer, R., Watson, B., Burkart-Waco, D., Scott, R.J., and Comai, L. (2008). The maternally expressed WRKY transcription factor TTG2 controls lethality in interploidy crosses of *Arabidopsis*. *PLoS Biology* 6, 2707–2720.

Ding, D., Muthuswamy, S., and Meier, I. (2012). Functional interaction between the *Arabidopsis* orthologs of spindle assembly checkpoint proteins MAD1 and MAD2 and the nucleoporin NUA. *Plant Molecular Biology* 79, 203–216.

Dissmeyer, N., Nowack, M.K., Pusch, S., Stals, H., Inzé, D., Grini, P.E., and Schnittger, A. (2007). T-loop phosphorylation of *Arabidopsis* CDKA;1 is required for its function and can be partially substituted by an aspartate residue. *The Plant Cell* 19, 972–985.

Dobles, M., Liberal, V., Scott, M.L., Benezra, R., and Sorger, P.K. (2000). Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell* 101, 635–645.

Dudas, A., Ahmad, S., and Gregan, J. (2011). Sgo1 is required for co-segregation of sister chromatids during achiasmatic meiosis I. *Cell Cycle* 10, 1–5.

d'Erfurth, I., Cromer, L., Jolivet, S., Girard, C., Horlow, C., Sun, Y., To, J.P.C., Berchowitz, L.E., Copenhaver, G.P., and Mercier, R. (2010). The cyclin-A CYCA1;2/TAM is required for the meiosis I to meiosis II transition and cooperates with OSD1 for the prophase to first meiotic division transition. *PLoS Genetics* 6, e1000989.

d'Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N., Catrice, O., Novatchkova, M., and Mercier, R. (2009). Turning meiosis into mitosis. *PLoS Biology* 7, e1000124.

d'Erfurth, I., Jolivet, S., Froger, N., Catrice, O., Novatchkova, M., Simon, M., Jenczewski, E., and Mercier, R. (2008). Mutations in AtPS1 (*Arabidopsis thaliana* parallel spindle 1) lead to the production of diploid pollen grains. *PLoS Genetics* 4, e1000274.

Edgar, B. a, and Orr-Weaver, T.L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105, 297–306.

Eloy, N.B., De Freitas Lima, M., Van Damme, D., Vanhaeren, H., Gonzalez, N., De Milde, L., Hemerly, A.S., Beemster, G.T.S., Inzé, D., and Ferreira, P.C.G. (2011). The APC/C subunit 10 plays an essential role in cell proliferation during leaf development. *The Plant Journal* 68, 351–363.

Eloy, N.B., Gonzalez, N., Van Leene, J., Maleux, K., Vanhaeren, H., De Milde, L., Dhondt, S., Vercruyse, L., Witters, E., Mercier, R., et al. (2012). SAMBA, a plant-specific anaphase-promoting complex/cyclosome

regulator is involved in early development and A-type cyclin stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 13853–13858.

Enquist-Newman, M., Sullivan, M., and Morgan, D. (2008). Modulation of the mitotic regulatory network by APC-dependent destruction of the Cdh1 inhibitor Acm1. *Molecular Cell* 30, 437–446.

Errico, A., Deshmukh, K., Tanaka, Y., Pozniakovsky, A., and Hunt, T. (2010). Identification of substrates for cyclin dependent kinases. *Advances in Enzyme Regulation* 50, 375–399.

Estelle, M.A., and Somerville, C. (1987). Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *MGG Molecular & General Genetics* 206, 200–206.

Ferreira, P.C.G., Hemerly, A.S., Villarroel, R., Montagu, V., Genetica, L., Gent, R., and Ledeganckstraat, K.L. (1991). The *Arabidopsis* Functional Homolog of the p34 cdc2 Protein Kinase. *The Plant Cell* 3, 531–540.

Di Fiore, B., and Pines, J. (2008). Defining the role of Emi1 in the DNA replication-segregation cycle. *Chromosoma* 117, 333–338.

Di Fiore, B., and Pines, J. (2010). How cyclin A destruction escapes the spindle assembly checkpoint. *The Journal of Cell Biology* 190, 501–509.

Foe, I., and Toczyski, D.P. (2011). A new look for the APC. *Nature* 470, 7–8.

Da Fonseca, P.C. a, Kong, E.H., Zhang, Z., Schreiber, A., Williams, M. a, Morris, E.P., and Barford, D. (2011). Structures of APC/C(Cdh1) with substrates identify Cdh1 and Apc10 as the D-box co-receptor. *Nature* 470, 274–278.

Francis, D. (2007). The plant cell cycle--15 years on. *The New Phytologist* 174, 261–278.

Francis, K.E., Lam, S.Y., Harrison, B.D., Bey, A.L., Berchowitz, L.E., and Copenhaver, G.P. (2007). Pollen tetrad-based visual assay for meiotic recombination in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 3913–3918.

Fu, G., Hua, S., Ward, T., Ding, X., Yang, Y., Guo, Z., and Yao, X. (2007). D-box is required for the degradation of human Shugoshin and chromosome alignment. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357, 672–678.

Furuno, N., Nishizawa, M., Okazaki, K., Tanaka, H., Iwashita, J., Nakajo, N., Ogawa, Y., and Sagata, N. (1994). Suppression of DNA replication via Mos function during meiotic divisions in *Xenopus* oocytes. *The EMBO Journal* 13, 2399–2410.

Fülöp, K., Tarayre, S., Kelemen, Z., Horváth, G., Kevei, Z., Nikovics, K., Bakó, L., Brown, S., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2005). *Arabidopsis* anaphase-promoting complexes: multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle* 4, 1084–1092.

Gauthier, N.P., Jensen, L.J., Wernersson, R., Brunak, S., and Jensen, T.S. (2010). Cyclebase.org: version 2.0, an updated comprehensive, multi-species repository of cell cycle experiments and derived analysis results. *Nucleic Acids Research* 38, D699–702.

Gerton, J.L., and Hawley, R.S. (2005). Homologous chromosome interactions in meiosis: diversity amidst conservation. *Nature Reviews. Genetics* 6, 477–487.

Glutzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M. (1991). Cyclins degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* 349, 132–138.

- Glover, J., Grelon, M., Craig, S., Chaudhury, A., and Dennis, E. (1998). Cloning and characterization of MS5 from Arabidopsis: a gene critical in male meiosis. *The Plant Journal* *15*, 345–356.
- Glynn, E.F., Megee, P.C., Yu, H.-G., Mistrot, C., Unal, E., Koshland, D.E., DeRisi, J.L., and Gerton, J.L. (2004). Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS Biology* *2*, E259.
- Goldstein, L.S. (1981). Kinetochore structure and its role in chromosome orientation during the first meiotic division in male *D. melanogaster*. *Cell* *25*, 591–602.
- Grallert, B., and Sipiczki, M. (1991). Common genes and pathways in the regulation of the mitotic and meiotic cell cycles of *Schizosaccharomyces pombe*. *Current Genetics* *20*, 199–204.
- De Gramont, A., and Cohen-Fix, O. (2005). The many phases of anaphase. *Trends in Biochemical Sciences* *30*, 559–568.
- Grelon, M., Vezon, D., Gendrot, G., and Pelletier, G. (2001). AtSPO11-1 is necessary for efficient meiotic recombination in plants. *The EMBO Journal* *20*, 589–600.
- Griffiths, S., Sharp, R., Foote, T.N., Bertin, I., Wanous, M., Reader, S., Colas, I., and Moore, G. (2006). Molecular characterization of Ph1 as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature* *439*, 749–752.
- Gross, S.D., Schwab, M.S., Taieb, F.E., Lewellyn, a L., Qian, Y.W., and Maller, J.L. (2000). The critical role of the MAP kinase pathway in meiosis II in *Xenopus* oocytes is mediated by p90(Rsk). *Current Biology* *10*, 430–438.
- Grosskortenhaus, R., and Sprenger, F. (2002). Rca1 inhibits APC-Cdh1(Fzr) and is required to prevent cyclin degradation in G2. *Developmental Cell* *2*, 29–40.
- Gruber, S., Arumugam, P., Katou, Y., Kuglitsch, D., Helmhart, W., Shirahige, K., and Nasmyth, K. (2006). Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC hinge. *Cell* *127*, 523–537.
- Gruber, S., Haering, C.H., and Nasmyth, K. (2003). Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* *112*, 765–777.
- Gutiérrez-Caballero, C., Cebollero, L.R., and Pendás, A.M. (2012). Shugoshins: from protectors of cohesion to versatile adaptors at the centromere. *Trends in Genetics* *28*, 351–360.
- Gómez, R., Valdeolmillos, A., Parra, M.T., Viera, A., Carreiro, C., Roncal, F., Rufas, J.S., Barbero, J.L., and Suja, J. a (2007). Mammalian SGO2 appears at the inner centromere domain and redistributes depending on tension across centromeres during meiosis II and mitosis. *EMBO Reports* *8*, 173–180.
- Gönczy, P., Thomas, B.J., and DiNardo, S. (1994). roughex is a dose-dependent regulator of the second meiotic division during *Drosophila* spermatogenesis. *Cell* *77*, 1015–1025.
- Hached, K., Xie, S.Z., Buffin, E., Cladière, D., Rachez, C., Sacras, M., Sorger, P.K., and Wassmann, K. (2011). Mps1 at kinetochores is essential for female mouse meiosis I. *Development* *138*, 2261–2271.
- Haering, C.H., Farcas, A.-M., Arumugam, P., Metson, J., and Nasmyth, K. (2008). The cohesin ring concatenates sister DNA molecules. *Nature* *454*, 297–301.
- Haering, C.H., Löwe, J., Hochwagen, A., and Nasmyth, K. (2002). Molecular architecture of SMC proteins and the yeast cohesin complex. *Molecular Cell* *9*, 773–788.
- Hamant, O., Golubovskaya, I., Meeley, R., Fiume, E., Timofejeva, L., Schleiffer, A., Nasmyth, K., and Cande, W.Z. (2005). A REC8-dependent plant Shugoshin is required for maintenance of centromeric cohesion during meiosis and has no mitotic functions. *Current Biology* *15*, 948–954.

- Hamant, O., Ma, H., and Cande, W.Z. (2006). Genetics of meiotic prophase I in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57, 267–302.
- Harashima, H., and Schnittger, A. (2012). Robust reconstitution of active cell-cycle control complexes from co-expressed proteins in bacteria. *Plant Methods* 8,.
- Hase, Y., Trung, K.H., Matsunaga, T., and Tanaka, A. (2006). A mutation in the *uvi4* gene promotes progression of endo-reduplication and confers increased tolerance towards ultraviolet B light. *The Plant Journal* 46, 317–326.
- Hashimoto, N., Watanabe, N., Furuta, Y., Tamemoto, H., Sagata, N., Yokoyama, M., Okazaki, K., Nagayoshi, M., Takeda, N., Ikawatll, Y., et al. (1994). Parthenogenetic activation of oocytes in *c-mos*-deficient mice. *Nature* 370, 68–71.
- Hassold, T., Hall, H., and Hunt, P. (2007). The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. *Human Molecular Genetics* 16, R203–8.
- Hauf, S., Biswas, A., Langegger, M., Kawashima, S. a, Tsukahara, T., and Watanabe, Y. (2007). Aurora controls sister kinetochore mono-orientation and homolog bi-orientation in meiosis-I. *The EMBO Journal* 26, 4475–4486.
- Hauf, S., Roitinger, E., Koch, B., Dittrich, C.M., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2005). Dissociation of cohesin from chromosome arms and loss of arm cohesion during early mitosis depends on phosphorylation of SA2. *PLoS Biology* 3, e69.
- Hauf, S., Waizenegger, I.C., and Peters, J.M. (2001). Cohesin cleavage by separase required for anaphase and cytokinesis in human cells. *Science* 293, 1320–1323.
- Hayes, M.J., Kimata, Y., Wattam, S.L., Lindon, C., Mao, G., Yamano, H., and Fry, A.M. (2006). Early mitotic degradation of Nek2A depends on Cdc20-independent interaction with the APC/C. *Nature Cell Biology* 8, 607–614.
- Herbert, M., Levasseur, M., Homer, H., Yallop, K., Murdoch, A., and McDougall, A. (2003). Homologue disjunction in mouse oocytes requires proteolysis of securin and cyclin B1. *Nature Cell Biology* 5, 1023–1025.
- Heyman, J., Van den Daele, H., De Wit, K., Boudolf, V., Berckmans, B., Verkest, A., Alvim Kamei, C.L., De Jaeger, G., Koncz, C., and De Veylder, L. (2011). Arabidopsis ULTRAVIOLET-B-INSENSITIVE4 maintains cell division activity by temporal inhibition of the anaphase-promoting complex/cyclosome. *The Plant Cell* 23, 4394–4410.
- Heyman, J., and De Veylder, L. (2012). The Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome in Control of Plant Development. *Molecular Plant* 5, 1182–1194.
- Hirose, Y., Suzuki, R., Ohba, T., Hinohara, Y., Matsuhara, H., Yoshida, M., Itabashi, Y., Murakami, H., and Yamamoto, A. (2011). Chiasmata promote monopolar attachment of sister chromatids and their co-segregation toward the proper pole during meiosis I. *PLoS Genetics* 7, e1001329.
- Hohegger, H., Klotzbücher, A., Kirk, J., Howell, M., Le Guellec, K., Fletcher, K., Duncan, T., Sohail, M., and Hunt, T. (2001). New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation. *Development* 128, 3795–3807.
- Hohegger, H., Takeda, S., and Hunt, T. (2008). Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions : does one fit all ? *Nature* 9,.
- Hochwagen, A., and Amon, A. (2006). Checking your breaks: surveillance mechanisms of meiotic recombination. *Current Biology* 16, R217–28.

- Holt, L.L.J., Krutchinsky, A.N., and Morgan, D.O. (2008). Positive feedback sharpens the anaphase switch. *Nature* *454*, 353–357.
- Homer, H., Gui, L., and Carroll, J. (2009). A spindle assembly checkpoint protein functions in prophase I arrest and prometaphase progression. *Science* *326*, 991–994.
- Howarth, J.R., Parmar, S., Barraclough, P.B., and Hawkesford, M.J. (2009). A sulphur deficiency-induced gene, *sdi1*, involved in the utilization of stored sulphate pools under sulphur-limiting conditions has potential as a diagnostic indicator of sulphur nutritional status. *Plant Biotechnology Journal* *7*, 200–209.
- Hsu, J.Y., Reimann, J.D.R., Sørensen, C.S., Lukas, J., and Jackson, P.K. (2002). E2F-dependent accumulation of hEmi1 regulates S phase entry by inhibiting APC(Cdh1). *Nature Cell Biology* *4*, 358–366.
- Huang, H., Feng, J., Famulski, J., Rattner, J.B., Liu, S.T., Kao, G.D., Muschel, R., Chan, G.K.T., and Yen, T.J. (2007). Tripin/hSgo2 recruits MCAK to the inner centromere to correct defective kinetochore attachments. *The Journal of Cell Biology* *177*, 413–424.
- Iino, Y., Hiramane, Y., and Yamamoto, M. (1995). The Role of *cdc2* and Other Genes in Meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* *140*, 1235–1245.
- Indjeian, V.B., Stern, B.M., and Murray, A.W. (2005). The centromeric protein Sgo1 is required to sense lack of tension on mitotic chromosomes. *Science* *307*, 130–133.
- Inzé, D., and De Veylder, L. (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics* *40*, 77–105.
- Ishiguro, T., Tanaka, K., Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2010). Shugoshin-PP2A counteracts casein-kinase-1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nature Cell Biology* *12*, 500–506.
- Isoda, M., Sako, K., Suzuki, K., Nishino, K., Nakajo, N., Ohe, M., Ezaki, T., Kanemori, Y., Inoue, D., Ueno, H., et al. (2011). Dynamic regulation of Emi2 by Emi2-bound Cdk1/Plk1/CK1 and PP2A-B56 in meiotic arrest of *Xenopus* eggs. *Developmental Cell* *21*, 506–519.
- Iwabuchi, M., Ohsumi, K., Yamamoto, T.M., Sawada, W., and Kishimoto, T. (2000). Residual Cdc2 activity remaining at meiosis I exit is essential for meiotic M-M transition in *Xenopus* oocyte extracts. *The EMBO Journal* *19*, 4513–4523.
- Iwata, E., Ikeda, S., Matsunaga, S., Kurata, M., Yoshioka, Y., Criqui, M.-C., Genschik, P., and Ito, M. (2011). GIGAS CELL1, a novel negative regulator of the anaphase-promoting complex/cyclosome, is required for proper mitotic progression and cell fate determination in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* *23*, 4382–4393.
- Izawa, D., Goto, M., Yamashita, A., Yamano, H., and Yamamoto, M. (2005). Fission yeast Mes1p ensures the onset of meiosis II by blocking degradation of cyclin Cdc13p. *Nature* *434*, 529–533.
- Janssens, V., and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochemical Journal* *353*, 417–439.
- Jaspersen, S.L., Charles, J.F., and Morgan, D.O. (1999). Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Current Biology* *9*, 227–236.
- Johnson, D.G., and Walker, C.L. (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* *39*, 295–312.
- Jones, K.T. (2004). Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. *Molecular Human Reproduction* *10*, 1–5.

- Kagami, A., Sakuno, T., Yamagishi, Y., Ishiguro, T., Tsukahara, T., Shirahige, K., Tanaka, K., and Watanabe, Y. (2011). Acetylation regulates monopolar attachment at multiple levels during meiosis I in fission yeast. *EMBO Reports* *12*, 1189–1195.
- Karamysheva, Z., Diaz-Martinez, L. a, Crow, S.E., Li, B., and Yu, H. (2009). Multiple anaphase-promoting complex/cyclosome degrons mediate the degradation of human Sgo1. *The Journal of Biological Chemistry* *284*, 1772–1780.
- Kasili, R., Walker, J.D., Simmons, L.A., Zhou, J., De Veylder, L., and Larkin, J.C. (2010). SIAMESE cooperates with the CDH1-like protein CCS52A1 to establish endoreplication in *Arabidopsis thaliana* trichomes. *Genetics* *185*, 257–268.
- Katis, V., Galova, M., and Rabitsch, K. (2004a). Maintenance of cohesin at centromeres after meiosis I in budding yeast requires a kinetochore-associated protein related to MEI-S332. *Current Biology* *14*, 560–572.
- Katis, V., Matos, J., Mori, S., and Shirahige, K. (2004b). Spo13 facilitates monopolin recruitment to kinetochores and regulates maintenance of centromeric cohesion during yeast meiosis. *Current Biology* *14*, 2183–2196.
- Katis, V.L., Lipp, J.J., Imre, R., Bogdanova, A., Okaz, E., Habermann, B., Mechtler, K., Nasmyth, K., and Zachariae, W. (2010). Rec8 phosphorylation by casein kinase 1 and Cdc7-Dbf4 kinase regulates cohesin cleavage by separase during meiosis. *Developmental Cell* *18*, 397–409.
- Kawashima, S., and Tsukahara, T. (2007). Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes & Development* *21*, 420–435.
- Kerrebrock, a W., Moore, D.P., Wu, J.S., and Orr-Weaver, T.L. (1995). Mei-S332, a *Drosophila* protein required for sister-chromatid cohesion, can localize to meiotic centromere regions. *Cell* *83*, 247–256.
- Kevei, Z., Baloban, M., Da Ines, O., Tiricz, H., Kroll, A., Regulski, K., Mergaert, P., and Kondorosi, E. (2011). Conserved CDC20 cell cycle functions are carried out by two of the five isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* *6*, e20618.
- Kiburz, B., Amon, A., and Marston, A. (2008). Shugoshin promotes sister kinetochore biorientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 1199–1209.
- Kimata, Y., Kitamura, K., Fenner, N., and Yamano, H. (2011). Mes1 controls the meiosis I to meiosis II transition by distinctly regulating the anaphase-promoting complex/cyclosome coactivators Fzr1/Mfr1 and Slp1 in fission yeast. *Molecular Biology of the Cell* *22*, 1486–1494.
- Kimata, Y., Trickey, M., Izawa, D., Gannon, J., Yamamoto, M., and Yamano, H. (2008). A mutual inhibition between APC/C and its substrate Mes1 required for meiotic progression in fission yeast. *Developmental Cell* *14*, 446–454.
- Kitajima, T., Hauf, S., and Ohsugi, M. (2005). Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Current Biology* *15*, 353–359.
- Kitajima, T.S., Kawashima, S. a, and Watanabe, Y. (2004). The conserved kinetochore protein shugoshin protects centromeric cohesion during meiosis. *Nature* *427*, 510–517.
- Kitajima, T.S., Sakuno, T., Ishiguro, K., Iemura, S., Natsume, T., Kawashima, S. a, and Watanabe, Y. (2006). Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* *441*, 46–52.
- Kitajima, T.S., Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Watanabe, Y. (2003). Distinct cohesin complexes organize meiotic chromosome domains. *Science* *300*, 1152–1155.

- Klapholz, S., and Esposito, R. (1980). Isolation of SPO12-1 and SPO13-1 from a natural variant of yeast that undergoes a single meiotic division. *Genetics* 567-588.
- Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B., Michaelis, C., Nairz, K., and Nasmyth, K. (1999). A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* 98, 91-103.
- Kobayashi, H., Minshull, J., Ford, C., Golsteyn, R., Poon, R., and Hunt, T. (1991). On the synthesis and destruction of A- and B-type cyclins during oogenesis and meiotic maturation in *Xenopus laevis*. *The Journal of Cell Biology* 114, 755-765.
- Koltunow, A.M., and Grossniklaus, U. (2003). Apomixis: a developmental perspective. *Annual Review of Plant Biology* 54, 547-574.
- Kouznetsova, A., Lister, L., Nordenskjöld, M., Herbert, M., and Höög, C. (2007). Bi-orientation of achiasmatic chromosomes in meiosis I oocytes contributes to aneuploidy in mice. *Nature Genetics* 39, 966-968.
- Kudo, N.R., Wassmann, K., Anger, M., Schuh, M., Wirth, K.G., Xu, H., Helmhart, W., Kudo, H., McKay, M., Maro, B., et al. (2006). Resolution of chiasmata in oocytes requires separase-mediated proteolysis. *Cell* 126, 135-146.
- Kueng, S., Hegemann, B., Peters, B.H., Lipp, J.J., Schleiffer, A., Mechtler, K., and Peters, J.-M. (2006). Wapl controls the dynamic association of cohesin with chromatin. *Cell* 127, 955-967.
- Kwee, H.-S., and Sundaresan, V. (2003). The NOMEGA gene required for female gametophyte development encodes the putative APC6/CDC16 component of the Anaphase Promoting Complex in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 36, 853-866.
- Lam, W.S., Yang, X., and Makaroff, C. a (2005). Characterization of *Arabidopsis thaliana* SMC1 and SMC3: evidence that AtSMC3 may function beyond chromosome cohesion. *Journal of Cell Science* 118, 3037-3048.
- Lammens, T., Boudolf, V., Kheibarshekan, L., Zalmas, L.P., Gaamourche, T., Maes, S., Vanstraelen, M., Kondorosi, E., La Thangue, N.B., Govaerts, W., et al. (2008). Atypical E2F activity restrains APC/CCCS52A2 function obligatory for endocycle onset. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 14721-14726.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The Spindle Assembly Checkpoint. *Current Biology* 22, R966-R980.
- Larson-Rabin, Z., Li, Z., Masson, P.H., and Day, C.D. (2009). FZR2/CCS52A1 mediated endoreduplication in *Arabidopsis* development. *Plant Signaling & Behavior* 4, 451-453.
- LeBlanc, H.N., Tang, T.T., Wu, J.S., and Orr-Weaver, T.L. (1999). The mitotic centromeric protein MEI-S332 and its role in sister-chromatid cohesion. *Chromosoma* 108, 401-411.
- Ledan, E., Polanski, Z., Terret, M.E., and Maro, B. (2001). Meiotic maturation of the mouse oocyte requires an equilibrium between cyclin B synthesis and degradation. *Developmental Biology* 232, 400-413.
- Lee, B., Kiburz, B., and Amon, A. (2004a). Spo13 maintains centromeric cohesion and kinetochore coorientation during meiosis I. *Current Biology* 14, 2168-2182.
- Lee, J., Dej, K., Lopez, J., and Orr-Weaver, T. (2004b). Control of centromere localization of the MEI-S332 cohesion protection protein. *Current Biology* 14, 1277-1283.
- Lee, J., and Hirano, T. (2011). RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *The Journal of Cell Biology* 192, 263-276.

- Lee, J., Iwai, T., Yokota, T., and Yamashita, M. (2003). Temporally and spatially selective loss of Rec8 protein from meiotic chromosomes during mammalian meiosis. *Journal of Cell Science* *116*, 2781–2790.
- Lee, J., Kitajima, T.S., Tanno, Y., Yoshida, K., Morita, T., Miyano, T., Miyake, M., and Watanabe, Y. (2008). Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nature Cell Biology* *10*, 42–52.
- Lee, J., Miyano, T., Dai, Y., Wooding, P., Yen, T.J., and Moor, R.M. (2000). Specific regulation of CENP-E and kinetochores during meiosis I/meiosis II transition in pig oocytes. *Molecular Reproduction and Development* *56*, 51–62.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryck, S., Buffel, Y., et al. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Systems Biology* *6*, 397.
- Van Leene, J., Stals, H., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van Isterdael, G., De Clercq, A., Bonnet, E., Laukens, K., Remmerie, N., et al. (2007). A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & Cellular Proteomics* *6*, 1226–1238.
- Leu, J.Y., and Roeder, G.S. (1999). The pachytene checkpoint in *S. cerevisiae* depends on Swe1-mediated phosphorylation of the cyclin-dependent kinase Cdc28. *Molecular Cell* *4*, 805–814.
- Li, X., and Dawe, R.K. (2009). Fused sister kinetochores initiate the reductional division in meiosis I. *Nature Cell Biology* *11*, 1103–1108.
- Liu, D., Matzuk, M.M., Sung, W.K., Guo, Q., Wang, P., and Wolgemuth, D.J. (1998). Cyclin A1 is required for meiosis in the male mouse. *Nature Genetics* *20*, 377–380.
- Liu, Z., and Makaroff, C. (2006). *Arabidopsis* separase AESP is essential for embryo development and the release of cohesin during meiosis. *The Plant Cell* *18*, 1213–1225.
- Llano, E., and Gómez, R. (2008). Shugoshin-2 is essential for the completion of meiosis but not for mitotic cell division in mice. *Genes & Development* *24*, 2400–2413.
- Madgwick, S., Hansen, D. V., Levasseur, M., Jackson, P.K., and Jones, K.T. (2006). Mouse Emi2 is required to enter meiosis II by reestablishing cyclin B1 during interkinesis. *The Journal of Cell Biology* *174*, 791–801.
- Madgwick, S., and Jones, K.T. (2007). How eggs arrest at metaphase II: MPF stabilisation plus APC/C inhibition equals Cytostatic Factor. *Cell Division* *2*, 4.
- Magnard, J., Yang, M., and Chen, Y. (2001). The *Arabidopsis* gene *tardy* asynchronous meiosis is required for the normal pace and synchrony of cell division during male meiosis. *Plant Physiology* *127*, 1157–1166.
- Mailhes, J.B., Hilliard, C., Fuseler, J.W., and London, S.N. (2003). Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A, induces premature separation of sister chromatids during meiosis I and aneuploidy in mouse oocytes in vitro. *Chromosome Research* *11*, 619–631.
- Malapeira, J., Moldo, A., Hidalgo, E., Smith, G.R., and Nurse, P. (2005). A Meiosis-Specific Cyclin Regulated by Splicing Is Required for Proper Progression through Meiosis. *Molecular and Cellular Biology* *25*, 6330–6337.
- Marangos, P., Verschuren, E.W., Chen, R., Jackson, P.K., and Carroll, J. (2007). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes are controlled by Emi1-dependent regulation of APC(Cdh1). *The Journal of Cell Biology* *176*, 65–75.

- Marrocco, K., Thomann, A., Parmentier, Y., Genschik, P., and Criqui, M.C. (2009). The APC/C E3 ligase remains active in most post-mitotic Arabidopsis cells and is required for proper vasculature development and organization. *Development* *136*, 1475–1485.
- Marston, A., Tham, W., Shah, H., and Amon, A. (2004). A genome-wide screen identifies genes required for centromeric cohesion. *Science* *306*, 115–119.
- Marston, A.L., and Amon, A. (2004). Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *5*, 983–997.
- Marston, A.L., Lee, B.H., and Amon, A. (2003). The Cdc14 phosphatase and the FEAR network control meiotic spindle disassembly and chromosome segregation. *Developmental Cell* *4*, 711–726.
- Matsunaga, S., Takata, H., Morimoto, A., Hayashihara, K., Higashi, T., Akatsuchi, K., Mizusawa, E., Yamakawa, M., Ashida, M., Matsunaga, T.M., et al. (2012). RBMX: a regulator for maintenance and centromeric protection of sister chromatid cohesion. *Cell Reports* *1*, 299–308.
- May, K.M., and Hardwick, K.G. (2006). The spindle checkpoint. *Journal of Cell Science* *119*, 4139–4142.
- Mccarroll, R.M., and Esposito, R.E. (1994). SP013 Negatively Regulates the Progression of Mitotic and Meiotic Nuclear Division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *138*, 47–60.
- McGuinness, B.E., Hirota, T., Kudo, N.R., Peters, J.-M., and Nasmyth, K. (2005). Shugoshin prevents dissociation of cohesin from centromeres during mitosis in vertebrate cells. *PLoS Biology* *3*, e86.
- Melby, T.E., Ciampaglio, C.N., Briscoe, G., and Erickson, H.P. (1998). The symmetrical structure of structural maintenance of chromosomes (SMC) and MukB proteins: long, antiparallel coiled coils, folded at a flexible hinge. *The Journal of Cell Biology* *142*, 1595–1604.
- Menges, M., Hennig, L., Grisse, W., and Murray, J. a H. (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Molecular Biology* *53*, 423–442.
- Menges, M., De Jager, S.M., Grisse, 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. *The Plant Journal* *41*, 546–566.
- Menges, M., and Murray, J. a H. (2002). Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *The Plant Journal* *30*, 203–212.
- Mercier, R., Armstrong, S.J., Horlow, C., Jackson, N., Makaroff, C., Vezon, D., Pelletier, G., Jones, G.H., and Franklin, F.C. (2003). The meiotic protein SWI1 is required for axial element formation and recombination initiation in Arabidopsis. *Development* *130*, 3309–3318.
- Mercier, R., Jolivet, S., Vezon, D., Huppe, E., Chelysheva, L., Giovanni, M., Nogué, F., Doutriaux, M.-P., Horlow, C., Grelon, M., et al. (2005). Two meiotic crossover classes cohabit in Arabidopsis: one is dependent on MER3, whereas the other one is not. *Current Biology* *15*, 692–701.
- Mercier, R., Vezon, D., Bullier, E., Motamayor, J.C., Sellier, A., Lefèvre, F., Pelletier, G., and Horlow, C. (2001a). SWITCH1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes & Development* *15*, 1859–1871.
- Mercier, R.R., Vezon, D., Bullier, E., Motamayor, J.C., Sellier, A., Lefèvre, F., Pelletier, G., and Horlow, C. (2001b). SWITCH1 (SWI1): a novel protein required for the establishment of sister chromatid cohesion and for bivalent formation at meiosis. *Genes & Development* *15*, 1859–1871.

Miller, J., and Summers, M. (2006). Emi1 stably binds and inhibits the anaphase-promoting complex/cyclosome as a pseudosubstrate inhibitor. *Genes & Development* 2410–2420.

Moore, D.P., Page, a W., Tang, T.T., Kerrebrock, a W., and Orr-Weaver, T.L. (1998). The cohesion protein MEI-S332 localizes to condensed meiotic and mitotic centromeres until sister chromatids separate. *The Journal of Cell Biology* 140, 1003–1012.

Motamayor, J.C., Vezon, D., Bajon, C., Sauvanet, A., Grandjean, O., Marchand, M., Bechtold, N., Pelletier, G., and Horlow, C. (2000). Switch (*swi1*), an Arabidopsis thaliana mutant affected in the female meiotic switch. *Sexual Plant Reproduction* 12, 209–218.

Murakami, H., and Nurse, P. (1999). Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast Meiotic DNA replication checkpoint control in fission yeast. *Genes & Development* 2581–2593.

Murray, A.W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* 116, 221–234.

De Muyt, A., Pereira, L., Vezon, D., Chelysheva, L., Gendrot, G., Chambon, A., Lainé-Choinard, S., Pelletier, G., Mercier, R., Nogué, F., et al. (2009). A high throughput genetic screen identifies new early meiotic recombination functions in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genetics* 5, e1000654.

Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T. (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104, 34–41.

Nasmyth, K. (2011). Cohesin: a catenase with separate entry and exit gates? *Nature Cell Biology* 13, 1170–1177.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2005). The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Annual Review of Biochemistry* 74, 595–648.

Nasmyth, K., and Haering, C.H. (2009). Cohesin: its roles and mechanisms. *Annual Review of Genetics* 43, 525–558.

Neff, M.M., Neff, J.D., Chory, J., and Pepper, a E. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: experimental applications in Arabidopsis thaliana genetics. *The Plant Journal* 14, 387–392.

Nishiyama, T., Ohsumi, K., and Kishimoto, T. (2007). Phosphorylation of Erp1 by p90rsk is required for cytostatic factor arrest in Xenopus laevis eggs. *Nature* 446, 1096–1099.

Nonaka, N., Kitajima, T., Yokobayashi, S., Xiao, G., Yamamoto, M., Grewal, S.I.S., and Watanabe, Y. (2002). Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by *Swi6*/HP1 in fission yeast. *Nature Cell Biology* 4, 89–93.

Notredame, C., Higgins, D.G., and Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *Journal of Molecular Biology* 302, 205–217.

Nurse, P. (1997). Review Regulation of the Eukaryotic Cell Cycle. *European Journal of Cancer* 33, 1002–1004.

Oelschlaegel, T., Schwickart, M., Matos, J., Bogdanova, A., Camasses, A., Havlis, J., Shevchenko, A., and Zachariae, W. (2005). The yeast APC/C subunit Mnd2 prevents premature sister chromatid separation triggered by the meiosis-specific APC/C-Ama1. *Cell* 120, 773–788.

Ogawa, D., Abe, K., Miyao, A., Kojima, M., Sakakibara, H., Mizutani, M., Morita, H., Toda, Y., Hobo, T., Sato, Y., et al. (2011). *RSS1* regulates the cell cycle and maintains meristematic activity under stress conditions in rice. *Nature Communications* 2, 278.

- Ohe, M., Inoue, D., Kanemori, Y., and Sagata, N. (2007). Erp1/Emi2 is essential for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus* oocytes. *Developmental Biology* 303, 157–164.
- Ohe, M., Kawamura, Y., Ueno, H., Inoue, D., Kanemori, Y., Senoo, C., Isoda, M., Nakajo, N., and Sagata, N. (2010). Emi2 inhibition of the anaphase-promoting complex/cyclosome absolutely requires Emi2 binding via the C-terminal RL tail. *Molecular Biology of the Cell* 21, 905–913.
- Okaz, E., Argüello-Miranda, O., Bogdanova, A., Vinod, P.K., Lipp, J.J., Markova, Z., Zagoriy, I., Novak, B., and Zachariae, W. (2012). Meiotic Prophase Requires Proteolysis of M Phase Regulators Mediated by the Meiosis-Specific APC/C^{Ama1}. *Cell* 151, 603–618.
- Orth, M., Mayer, B., Rehm, K., Rothweiler, U., Heidmann, D., Holak, T. a, and Stemmann, O. (2011). Shugoshin is a Mad1/Cdc20-like interactor of Mad2. *The EMBO Journal* 30, 2868–2880.
- Otto, S.P. (2007). The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell* 131, 452–462.
- Otto, S.P., and Whitton, J. (2000). POLYPLOID INCIDENCE AND EVOLUTION. *Annual Review of Genetics* 34, 401–437.
- Paliulis, L. V, and Nicklas, R.B. (2000). The reduction of chromosome number in meiosis is determined by properties built into the chromosomes. *The Journal of Cell Biology* 150, 1223–1232.
- Paliulis, L. V, and Nicklas, R.B. (2005). Kinetochores rearrangement in meiosis II requires attachment to the spindle. *Chromosoma* 113, 440–446.
- Parra, M.T., Viera, A., Gómez, R., Page, J., Benavente, R., Santos, J.L., Rufas, J.S., and Suja, J. a (2004). Involvement of the cohesin Rad21 and SCP3 in monopolar attachment of sister kinetochores during mouse meiosis I. *Journal of Cell Science* 117, 1221–1234.
- Pawlowski, W.P., and Cande, W.Z. (2005). Coordinating the events of the meiotic prophase. *Trends in Cell Biology* 15, 674–681.
- Pawlowski, W.P., Wang, C.-J.R., Golubovskaya, I.N., Szymaniak, J.M., Shi, L., Hamant, O., Zhu, T., Harper, L., Sheridan, W.F., and Cande, W.Z. (2009). Maize AME10TIC1 is essential for multiple early meiotic processes and likely required for the initiation of meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 3603–3608.
- Penkner, A.M., Prinz, S., Ferscha, S., and Klein, F. (2005). Mnd2, an essential antagonist of the anaphase-promoting complex during meiotic prophase. *Cell* 120, 789–801.
- Perry, A.C.F., and Verlhac, M.-H. (2008). Second meiotic arrest and exit in frogs and mice. *EMBO Reports* 9, 246–251.
- Perry, J. a, and Kornbluth, S. (2007). Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Division* 2, 12.
- Pesin, J. a, and Orr-Weaver, T.L. (2008). Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 24, 475–499.
- Peters, J.-M. (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 7, 644–656.
- Peters, J.-M., Tedeschi, A., and Schmitz, J. (2008). The cohesin complex and its roles in chromosome biology. *Genes & Development* 22, 3089–3114.

- Petronczki, M., Matos, J., Mori, S., Gregan, J., Bogdanova, A., Schwickart, M., Mechtler, K., Shirahige, K., Zachariae, W., and Nasmyth, K. (2006). Monopolar attachment of sister kinetochores at meiosis I requires casein kinase 1. *Cell* *126*, 1049–1064.
- Pfleger, C., and Kirschner, M. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes & Development* *655–665*.
- Preuss, D., Rhee, S.Y., and Davis, R.W. (1994). Tetrad analysis possible in Arabidopsis with mutation of the QUARTET (QRT) genes. *Science* *264*, 1458–1460.
- Prieto, I., Suja, J. a, Pezzi, N., Kremer, L., Martínez-A, C., Rufas, J.S., and Barbero, J.L. (2001). Mammalian STAG3 is a cohesin specific to sister chromatid arms in meiosis I. *Nature Cell Biology* *3*, 761–766.
- Pérez-Hidalgo, L., Moreno, S., and Martín-Castellanos, C. (2008). Modified cell cycle regulation in meiosis. *Genome Dyn Stab.*
- Pérez-Pérez, J.M., Serralbo, O., Vanstraelen, M., González, C., Criqui, M.-C., Genschik, P., Kondorosi, E., and Scheres, B. (2008). Specialization of CDC27 function in the Arabidopsis thaliana anaphase-promoting complex (APC/C). *The Plant Journal* *53*, 78–89.
- Rabitsch, K., Gregan, J., and Schleiffer, A. (2004). Two fission yeast homologs of Drosophila Mei-S332 are required for chromosome segregation during meiosis I and II. *Current Biology* *14*, 287–301.
- Rabitsch, K.P., Petronczki, M., Javerzat, J.P., Genier, S., Chwalla, B., Schleiffer, A., Tanaka, T.U., and Nasmyth, K. (2003). Kinetochore recruitment of two nucleolar proteins is required for homolog segregation in meiosis I. *Developmental Cell* *4*, 535–548.
- Rabitsch, K.P., Tóth, A., Gálová, M., Schleiffer, A., Schaffner, G., Aigner, E., Rupp, C., Penkner, a M., Moreno-Borchart, a C., Primig, M., et al. (2001). A screen for genes required for meiosis and spore formation based on whole-genome expression. *Current Biology* *11*, 1001–1009.
- Ramanna, M.S., and Jacobsen, E. (2003). Relevance of sexual polyploidization for crop improvement. *Euphytica* *133*, 3–18.
- Ramesh, M.A., Malik, S., and Logsdon, J.M. (2005). A Phylogenomic Inventory of Meiotic Genes : Evidence for Sex in Giardia and an Early Eukaryotic Origin of Meiosis. *Current Biology* *15*, 185–191.
- Rankin, S. (2005). Sororin, the cell cycle and sister chromatid cohesion. *Cell Cycle* *4:8*, 1039–1042.
- Rao, H., Uhlmann, F., Nasmyth, K., and Varshavsky, a (2001). Degradation of a cohesin subunit by the N-end rule pathway is essential for chromosome stability. *Nature* *410*, 955–959.
- Ravnik, S.E., and Wolgemuth, D.J. (1996). The developmentally restricted pattern of expression in the male germ line of a murine cyclin A, cyclin A2, suggests roles in both mitotic and meiotic cell cycles. *Developmental Biology* *173*, 69–78.
- Ravnik, S.E., and Wolgemuth, D.J. (1999). Regulation of meiosis during mammalian spermatogenesis: the A-type cyclins and their associated cyclin-dependent kinases are differentially expressed in the germ-cell lineage. *Developmental Biology* *207*, 408–418.
- Reis, A., Chang, H., Levasseur, M., and Jones, K.T. (2008). tivity in mouse oocytes prevents entry into the first meiotic division. *Nat Cell Biol.* *8*, 539–540.

- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inzé, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouzé, P., Sauter, M., et al. (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology* *32*, 1003–1018.
- Revenkova, E., Eijpe, M., and Heyting, C. (2004). Cohesin SMC1 is required for meiotic chromosome dynamics, sister chromatid cohesion and DNA recombination. *Nature Cell Biology* *6*,
- Revenkova, E., Eijpe, M., Heyting, C., and Gross, B. (2001). Novel Meiosis-Specific Isoform of Mammalian SMC1. *Molecular and Cellular Biology* *21*, 6984–6998.
- Riedel, C.G., Katis, V.L., Katou, Y., Mori, S., Itoh, T., Helmhart, W., Gálová, M., Petronczki, M., Gregan, J., Cetin, B., et al. (2006). Protein phosphatase 2A protects centromeric sister chromatid cohesion during meiosis I. *Nature* *441*, 53–61.
- Riehs, N., Akimcheva, S., Puizina, J., Bulankova, P., Idol, R. a, Siroky, J., Schleiffer, A., Schweizer, D., Shippen, D.E., and Riha, K. (2008). Arabidopsis SMG7 protein is required for exit from meiosis. *Journal of Cell Science* *121*, 2208–2216.
- Rivera, T., Ghenoiu, C., Rodríguez-Corsino, M., Mochida, S., Funabiki, H., and Losada, A. (2012). Xenopus Shugoshin 2 regulates the spindle assembly pathway mediated by the chromosomal passenger complex. *The EMBO Journal* *31*, 1467–1479.
- Rivera, T., and Losada, A. (2009). Shugoshin regulates cohesion by driving relocalization of PP2A in *Xenopus* extracts. *Chromosoma* *118*, 223–233.
- Robinson, S.J., Tang, L.H., Mooney, B.A., McKay, S.J., Clarke, W.E., Links, M.G., Karcz, S., Regan, S., Wu, Y.-Y., Gruber, M.Y., et al. (2009). An archived activation tagged population of *Arabidopsis thaliana* to facilitate forward genetics approaches. *BMC Plant Biology* *9*, 101.
- Rosnoblet, C., Aubry, C., Leprince, O., Vu, B.L., Rogniaux, H., and Buitink, J. (2007). The regulatory gamma subunit SNF4b of the sucrose non-fermenting-related kinase complex is involved in longevity and stachyose accumulation during maturation of *Medicago truncatula* seeds. *The Plant Journal* *51*, 47–59.
- Ross, K.J., Fransz, P., Armstrong, S.J., Vizir, I., Mulligan, B., Franklin, F.C.H., and Jones, G.H. (1997). Cytological characterization of four meiotic mutants of *Arabidopsis* isolated from T-DNA-transformed lines. *Chromosome Research* *5*, 551–559.
- Ross, K.J., Fransz, P., and Jones, G.H. (1996). A light microscopic atlas of meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Research* *4*, 507–516.
- Ríos, G., Lossow, A., Hertel, B., Breuer, F., Schaefer, S., Broich, M., Kleinow, T., Jásik, J., Winter, J., Ferrando, A., et al. (2002). Rapid identification of *Arabidopsis* insertion mutants by non-radioactive detection of T-DNA tagged genes. *The Plant Journal* *32*, 243–253.
- Sakuno, T., and Watanabe, Y. (2009). Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. *Chromosome Research* *17*, 239–249.
- Salah, S., and Nasmyth, K. (2000). Original articles Destruction of the securin Pds1p occurs at the onset of anaphase during both meiotic divisions in yeast. *Chromosoma* *27–34*.
- Salic, A., Waters, J.C., and Mitchison, T.J. (2004). Vertebrate shugoshin links sister centromere cohesion and kinetochore microtubule stability in mitosis. *Cell* *118*, 567–578.
- Sanchez Moran, E., Armstrong, S.J., Santos, J.L., Franklin, F.C., and Jones, G.H. (2001). Chiasma formation in *Arabidopsis thaliana* accession Wassilewskija and in two meiotic mutants. *Chromosome Research* *9*, 121–128.

- Sandler, L., Lindsley, D., Nicoletti, B., and Trippa, G. (1968). Mutants affecting meiosis in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 525–558.
- Saze, H., and Kakutani, T. (2007). Heritable epigenetic mutation of a transposon-flanked Arabidopsis gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1. *The EMBO Journal* 26, 3641–3652.
- Scholl, R.L., May, S.T., and Ware, D.H. (2000). Seed and Molecular Resources for Arabidopsis. *Plant Physiology* 124, 1477–1480.
- Schubert, V., Weissleder, A., Ali, H., Fuchs, J., Lermontova, I., Meister, A., and Schubert, I. (2009). Cohesin gene defects may impair sister chromatid alignment and genome stability in Arabidopsis thaliana. *Chromosoma* 118, 591–605.
- Searle, J.S., Schollaert, K.L., Wilkins, B.J., and Sanchez, Y. (2004). The DNA damage checkpoint and PKA pathways converge on APC substrates and Cdc20 to regulate mitotic progression. *Nature Cell Biology* 6, 138–145.
- Sessions, A., Burke, E., Presting, G., Aux, G., Mcelver, J., Patton, D., Dietrich, B., Ho, P., Bacwaden, J., Ko, C., et al. (2002). A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *The Plant Cell* 14, 2985–2994.
- Shao, T., Tang, D., Wang, K., Wang, M., Che, L., Qin, B., Yu, H., Li, M., Gu, M., and Cheng, Z. (2011). OsREC8 is essential for chromatid cohesion and metaphase I monopolar orientation in rice meiosis. *Plant Physiology* 156, 1386–1396.
- Shimoda, C., Hirata, A., Kishida, M., Hashida, T., and Tanaka, K. (1985). Characterization of meiosis-deficient mutants by electron microscopy and mapping of four essential genes in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 200, 252–257.
- Shonn, M. a. (2000). Requirement of the Spindle Checkpoint for Proper Chromosome Segregation in Budding Yeast Meiosis. *Science* 289, 300–303.
- Shonn, M., McCarroll, R., and Murray, A. (2002). Spo13 protects meiotic cohesin at centromeres in meiosis I. *Genes & Development* 1659–1671.
- Solc, P., Schultz, R.M., and Motlik, J. (2010). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Molecular Human Reproduction* 16, 654–664.
- Song, L., and Rape, M. (2011). Substrate-specific regulation of ubiquitination by the anaphase-promoting complex. *Cell Cycle* 10, 52–56.
- Spillane, C., Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2004). Apomixis technology development-virgin births in farmers' fields? *Nature Biotechnology* 22, 687–691.
- Von Stetina, J.R., and Orr-Weaver, T.L. (2011). Developmental control of oocyte maturation and egg activation in metazoan models. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a005553.
- De Storme, N., and Geelen, D. (2011). The Arabidopsis mutant jason produces unreduced first division restitution male gametes through a parallel/fused spindle mechanism in meiosis II. *Plant Physiology* 155, 1403–1415.
- Stuart, D., and Wittenberg, C. (1998). CLB5 and CLB6 are required for premeiotic DNA replication and activation of the meiotic S / M checkpoint. *Genes&development* 12, 2698–2710.

- Sullivan, M., and Morgan, D.O. (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *8*, 894–903.
- Sumara, I., Vorlaufer, E., Stukenberg, P.T., Kelm, O., Redemann, N., Nigg, E. a, and Peters, J.-M. (2002). The dissociation of cohesin from chromosomes in prophase is regulated by Polo-like kinase. *Molecular Cell* *9*, 515–525.
- Sundaresan, V., Springer, P., Volpe, T., Haward, S., Jones, J.D., Dean, C., Ma, H., and Martienssen, R. (1995). Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes & Development* *9*, 1797–1810.
- Sweeney, C., Murphy, M., Kubelka, M., Ravnik, S.E., Hawkins, C.F., Wolgemuth, D.J., and Carrington, M. (1996). A distinct cyclin A is expressed in germ cells in the mouse. *Development* *122*, 53–64.
- Söding, J., Biegert, A., and Lupas, A.N. (2005). The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. *Nucleic Acids Research* *33*, W244–8.
- Tachibana-Konwalski, K., Godwin, J., Weyden, L. Van Der, Champion, L., Kudo, N.R., Adams, D.J., and Nasmyth, K. (2010). Rec8-containing cohesin maintains bivalents without turnover during the growing phase of mouse oocytes. *Genes & Development* *25*, 2505–2516.
- Talbert, P.B., Masuelli, R., Tyagi, A.P., Comai, L., and Henikoff, S. (2002). Centromeric Localization and Adaptive Evolution of an Arabidopsis Histone H3 Variant. *The Plant Cell* *14*, 1053–1066.
- Tan, G.S., Magurno, J., and Cooper, K.F. (2011). Ama1p-activated anaphase-promoting complex regulates the destruction of Cdc20p during meiosis II. *Molecular Biology of the Cell* *22*, 315–326.
- Tang, W., Wu, J., and Chen, C. (2010). Emi2-mediated Inhibition of E2-substrate Ubiquitin Transfer by the Anaphase-promoting Complex/Cyclosome through a D-Box-independent Mechanism. *Molecular Biology of the Cell* *21*, 2589–2597.
- Tang, W., Wu, J., and Guo, Y. (2008a). Cdc2 and Mos Regulate Emi2 Stability to Promote the Meiosis I–Meiosis II Transition. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 3536–3543.
- Tang, W., Wu, J.Q., Guo, Y., Hansen, D. V, Perry, J.A., Freel, C.D., Nutt, L., Jackson, P.K., and Kornbluth, S. (2008b). Cdc2 and Mos regulate Emi2 stability to promote the meiosis I-meiosis II transition. *Molecular Biology of the Cell* *19*, 3536–3543.
- Tang, Z., Shu, H., Qi, W., Mahmood, N. a, Mumby, M.C., and Yu, H. (2006). PP2A is required for centromeric localization of Sgo1 and proper chromosome segregation. *Developmental Cell* *10*, 575–585.
- Tang, Z., Sun, Y., Harley, S.E., Zou, H., and Yu, H. (2004). Human Bub1 protects centromeric sister-chromatid cohesion through Shugoshin during mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 18012–18017.
- Tao, J., Zhang, L., Chong, K., and Wang, T. (2007). OsRAD21-3, an orthologue of yeast RAD21, is required for pollen development in *Oryza sativa*. *The Plant Journal* *51*, 919–930.
- Terret, M.E., Wassmann, K., Waizenegger, I., Maro, B., Peters, J.-M., and Verlhac, M.-H. (2003). The Meiosis I-to-Meiosis II Transition in Mouse Oocytes Requires Separase Activity. *Current Biology* *13*, 1797–1802.
- Toth, A., Ciosk, R., Uhlmann, F., Galova, M., Schleiffer, A., and Nasmyth, K. (1999). Yeast Cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p (Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes & Development* *13*, 320–333.

- Toth, A., Rabitsch, K.P., Ga, M., Schleiffer, A., Buonomo, S.B.C., and Nasmyth, K. (2000). Functional Genomics Identifies Monopolin : A Kinetochore Protein Required for Segregation of Homologs during Meiosis I. *Cell* *103*, 1155–1168.
- Touati, S. a, Cladière, D., Lister, L.M., Leontiou, I., Chambon, J.-P., Rattani, A., Böttger, F., Stemmann, O., Nasmyth, K., Herbert, M., et al. (2012). Cyclin A2 Is Required for Sister Chromatid Segregation, But Not Separase Control, in Mouse Oocyte Meiosis. *Cell Reports* 1–11.
- Truernit, E., Bauby, H., Dubreucq, B., Grandjean, O., Runions, J., Barthélémy, J., and Palauqui, J.-C. (2008). High-resolution whole-mount imaging of three-dimensional tissue organization and gene expression enables the study of Phloem development and structure in Arabidopsis. *The Plant Cell* *20*, 1494–1503.
- Tsuchiya, D., Gonzalez, C., and Lacefield, S. (2011). The spindle checkpoint protein Mad2 regulates APC/C activity during prometaphase and metaphase of meiosis I in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* *22*, 2848–2861.
- Tung, K.S., Hong, E.J., and Roeder, G.S. (2000). The pachytene checkpoint prevents accumulation and phosphorylation of the meiosis-specific transcription factor Ndt80. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *97*, 12187–12192.
- Uhlmann, F., Wernic, D., Poupard, M. a, Koonin, E. V, and Nasmyth, K. (2000). Cleavage of cohesin by the CD clan protease separin triggers anaphase in yeast. *Cell* *103*, 375–386.
- Vagnarelli, P., and Earnshaw, W.C. (2004). Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. *Chromosoma* *113*, 211–222.
- Vanoosthuyse, V. (2007). Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Molecular Biology of the Cell* *18*, 1657–1669.
- Varela, E., Schlecht, U., Moina, A., Fackenthal, J.D., Washburn, B.K., Niederhauser-Wiederkehr, C., Tsai-Pflugfelder, M., Primig, M., Gasser, S.M., and Esposito, R.E. (2010). Mitotic expression of Spo13 alters M-phase progression and nucleolar localization of Cdc14 in budding yeast. *Genetics* *185*, 841–854.
- Vaur, S., Cubizolles, F., Plane, G., Genier, S., Rabitsch, P.K., Gregan, J., Nasmyth, K., Vanoosthuyse, V., Hardwick, K.G., and Javerzat, J.-P. (2005). Control of Shugoshin function during fission-yeast meiosis. *Current Biology* *15*, 2263–2270.
- Vaur, S., Feytout, A., Vazquez, S., and Javerzat, J.-P. (2012). Pds5 promotes cohesin acetylation and stable cohesin-chromosome interaction. *EMBO Reports* *13*, 645–652.
- Verlhac, M.H., Kubiak, J.Z., Clarke, H.J., and Maro, B. (1994). Microtubule and chromatin behavior follow MAP kinase activity but not MPF activity during meiosis in mouse oocytes. *Development* *120*, 1017–1025.
- Verlhac, M.H., Kubiak, J.Z., Weber, M., Géraud, G., Colledge, W.H., Evans, M.J., and Maro, B. (1996). Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* *122*, 815–822.
- Vignard, J., Siwec, T., Chelysheva, L., Vrielynck, N., Gonord, F., Armstrong, S.J., Schlögelhofer, P., and Mercier, R. (2007). The interplay of RecA-related proteins and the MND1-HOP2 complex during meiosis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* *3*, 1894–1906.
- Visintin, R., Craig, K., Hwang, E.S., Prinz, S., Tyers, M., and Amon, a (1998). The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Molecular Cell* *2*, 709–718.

- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A., and Peters, J. (2000). Cohesin from Chromosome Arms in Prophase and from Centromeres in Anaphase. *Cell* *103*, 399–410.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., and Zhang, X. (2004a). Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiology* *135*, 1084–1099.
- Wang, M., Tang, D., Luo, Q., Jin, Y., Shen, Y., Wang, K., and Cheng, Z. (2012a). BRK1, a Bub1-Related Kinase, Is Essential for Generating Proper Tension between Homologous Kinetochores at Metaphase I of Rice Meiosis. *The Plant Cell* *1*–14.
- Wang, M., Tang, D., Wang, K., Shen, Y., Qin, B., Miao, C., Li, M., and Cheng, Z. (2011). OsSGO1 maintains synaptonemal complex stabilization in addition to protecting centromeric cohesion during rice meiosis. *The Plant Journal* *67*, 583–594.
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z., Liu, J., and Qu, L.-J. (2012b). The Arabidopsis APC4 subunit of the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) is critical for both female gametogenesis and embryogenesis. *The Plant Journal* *69*, 227–240.
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z.-L., Liu, J., and Qu, L.-J. (2012c). The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Subunit 1 (APC1) is Critical for Both Female Gametogenesis and Embryogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology* *1*,.
- Wang, Y., Jha, A.K., Chen, R., Doonan, J.H., and Yang, M. (2010). Polyploidy-associated genomic instability in Arabidopsis thaliana. *Genesis* *48*, 254–263.
- Wang, Y., Magnard, J., McCormick, S., and Yang, M. (2004b). Progression through meiosis I and meiosis II in Arabidopsis anthers is regulated by an A-type cyclin predominately expressed in prophase I. *Plant Physiology* *136*, 4127–4135.
- Wassmann, K., Maro, B., Cellulaire, L.D.B., Curie, M., and Bernard, S. (2003). Metaphase I Arrest upon Activation of the Mad2- Dependent Spindle Checkpoint in Mouse Oocytes. *13*, 1596–1608.
- Watanabe, Y. (2004). Modifying sister chromatid cohesion for meiosis. *Journal of Cell Science* *117*, 4017–4023.
- Watanabe, Y. (2005). Shugoshin: guardian spirit at the centromere. *Current Opinion in Cell Biology* *17*, 590–595.
- Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* *13*, 370–382.
- Watanabe, Y., and Nurse, P. (1999). Cohesin Rec8 is required for reductional chromosome segregation at meiosis. *Nature* *400*, 461–464.
- Watanabe, Y., Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Nurse, P. (2001). Pre-meiotic S phase is linked to reductional chromosome segregation and recombination. *Nature* *409*, 359–363.
- Weigel, D., and Glazebrook, J. (2002). *Arabidopsis : A laboratory Manual*.
- Whitaker, M. (1996). Control of meiotic arrest. *Reviews of Reproduction* *1*, 127–135.
- Wilkins, A.S., and Holliday, R. (2009). The evolution of meiosis from mitosis. *Genetics* *181*, 3–12.
- Willemsen, V., Wolkenfelt, H., De Vrieze, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1998). The HOBBIT gene is required for formation of the root meristem in the Arabidopsis embryo. *Development* *125*, 521–531.

- Winey, M., Morgan, G.P., Straight, P.D., Giddings, T.H., and Mastronarde, D.N. (2005). Three-dimensional Ultrastructure of *Saccharomyces cerevisiae* Meiotic Spindles. *Molecular Biology of the Cell* *16*, 1178–1188.
- Wolgemuth, D.J., and Roberts, S.S. (2010). Regulating mitosis and meiosis in the male germ line: critical functions for cyclins. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. *365*, 1653–1662.
- Wood, A.J., Severson, A.F., and Meyer, B.J. (2010). Condensin and cohesin complexity: the expanding repertoire of functions. *Nature Reviews. Genetics* *11*, 391–404.
- Wu, S., Scheible, W.-R., Schindelasch, D., Van Den Daele, H., De Veylder, L., and Baskin, T.I. (2010). A conditional mutation in *Arabidopsis thaliana* separase induces chromosome non-disjunction, aberrant morphogenesis and cyclin B1;1 stability. *Development* *137*, 953–961.
- Xie, Y. (2010). Structure, assembly and homeostatic regulation of the 26S proteasome. *Journal of Molecular Cell Biology* *2*, 308–317.
- Xiong, B., and Gerton, J.L. (2010). Regulators of the cohesin network. *Annual Review of Biochemistry* *79*, 131–153.
- Xiong, B., Lu, S., and Gerton, J.L. (2010). Hos1 is a lysine deacetylase for the Smc3 subunit of cohesin. *Current Biology* *20*, 1660–1665.
- Xu, H., Beasley, M., Verschoor, S., Inselman, A., Handel, M.A., and McKay, M.J. (2004). A new role for the mitotic RAD21/SCC1 cohesin in meiotic chromosome cohesion and segregation in the mouse. *EMBO Reports* *5*, 378–384.
- Xu, Z., Cetin, B., Anger, M., Cho, U.U.S., Helmhart, W., Nasmyth, K., and Xu, W. (2009). Structure and function of the PP2A-shugoshin interaction. *Molecular Cell* *35*, 426–441.
- Yamagishi, Y., Sakuno, T., Shimura, M., and Watanabe, Y. (2008). Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* *455*, 251–255.
- Yamamoto, A., Kitamura, K., Hihara, D., Hirose, Y., Katsuyama, S., and Hiraoka, Y. (2008). Spindle checkpoint activation at meiosis I advances anaphase II onset via meiosis-specific APC/C regulation. *The Journal of Cell Biology* *182*, 277–288.
- Yang, R., Morosetti, R., Koeffler, H.P., and Koeffler, H.P. (1997). Characterization of a Second Human Cyclin A That Is Highly Expressed in Testis and in Several Leukemic Cell Lines. *Cancer Research* *57*, 913–920.
- Yang, X., Boateng, K. a, Strittmatter, L., Burgess, R., and Makaroff, C. a (2009). *Arabidopsis* separase functions beyond the removal of sister chromatid cohesion during meiosis. *Plant Physiology* *151*, 323–333.
- Yang, X., Boateng, K. a, Yuan, L., Wu, S., Baskin, T.I., and Makaroff, C. a (2011). The radially swollen 4 separase mutation of *Arabidopsis thaliana* blocks chromosome disjunction and disrupts the radial microtubule system in meiocytes. *PLoS One* *6*, e19459.
- Yao, Y., and Dai, W. (2012). Shugoshins function as a guardian for chromosomal stability in nuclear division. *Cell Cycle* *1–12*.
- Yin, S., Ai, J.-S., Shi, L.-H., Wei, L., Yuan, J., Ouyang, Y.-C., Hou, Y., Chen, D.-Y., Schatten, H., and Sun, Q.-Y. (2008). Shugoshin1 may play important roles in separation of homologous chromosomes and sister chromatids during mouse oocyte meiosis. *PLoS One* *3*, e3516.
- Yokobayashi, S., and Watanabe, Y. (2005). The kinetochore protein Moa1 enables cohesion-mediated monopolar attachment at meiosis I. *Cell* *123*, 803–817.

Yokobayashi, S., Yamamoto, M., and Watanabe, Y. (2003). Cohesins determine the attachment manner of kinetochores to spindle microtubules at meiosis I in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology* 23, 3965–3973.

Yu, H., Muszynski, M.G., and Dawe, R.K. (1999). The Maize Homologue of the Cell Cycle Checkpoint Protein MAD2 Localization Patterns. *The Journal of Cell Biology* 145, 425–435.

Yuan, L., Yang, X., Ellis, J.L., Fisher, N.M., and Makaroff, C. a (2012). The Arabidopsis SYN3 cohesin protein is important for early meiotic events. *The Plant Journal* 71, 147–160.

Zheng, B., Chen, X., and McCormick, S. (2011). The anaphase-promoting complex is a dual integrator that regulates both MicroRNA-mediated transcriptional regulation of cyclin B1 and degradation of Cyclin B1 during Arabidopsis male gametophyte development. *The Plant Cell* 23, 1033–1046.

Zickler, D., and Kleckner, N. (1999). Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Annual Review of Genetics* 33, 603–754.

Zou, H. (1999). Identification of a Vertebrate Sister-Chromatid Separation Inhibitor Involved in Transformation and Tumorigenesis. *Science* 285, 418–422.