



HAL
open science

Étude de partenaires protéiques d'une protéine associée aux microtubules, MAP65-3, indispensable à la formation des cellules géantes induites par le nématode à galles *Meloidogyne incognita* : caractérisation du complexe de surveillance de la mitose chez *Arabidopsis*

Laëtitia Paganelli

► **To cite this version:**

Laëtitia Paganelli. Étude de partenaires protéiques d'une protéine associée aux microtubules, MAP65-3, indispensable à la formation des cellules géantes induites par le nématode à galles *Meloidogyne incognita* : caractérisation du complexe de surveillance de la mitose chez *Arabidopsis*. Sciences agricoles. Université Nice Sophia Antipolis, 2013. Français. NNT : 2013NICE4028 . tel-00998300

HAL Id: tel-00998300

<https://theses.hal.science/tel-00998300>

Submitted on 1 Jun 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 DE NICE-SOPHIA ANTIPOLIS - UFR Sciences
Ecole Doctorale de Sciences de la Vie et de la Santé

T H E S E

pour obtenir le titre de

Docteur ès Sciences

de l'UNIVERSITE de Nice-Sophia Antipolis

Spécialité : Biologie moléculaire et Cellulaire

présentée et soutenue par

Laëtitia Paganelli

**Etude de partenaires protéiques d'une protéine associée
aux microtubules (MAP65-3) indispensable à la
formation des cellules géantes induites par le nématode
à galles *Meloidogyne incognita*: caractérisation du
complexe de surveillance de la mitose chez *Arabidopsis***

Thèse dirigée par le ***Dr Bruno FAVERY***

Recherches effectuées au sein de l'UMR IBSV INRA 1301-UNS-CNRS 6243

Soutenance le **11 Juin 2013** devant la commission d'examen

Composition du jury :

Pr. Pierre FREUDO	Professeur de l'UNS	Président du jury
Dr. Marie-Edith CHABOUTE	Chargé de Recherche CNRS	Rapporteur
Dr. Yves MARCO	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
Dr. Ariane ABRIEU	Directeur de Recherche CNRS	Examineur
Dr. Bruno FAVERY	Directeur de Recherche INRA	Directeur de thèse

RESUME

Les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* sont des parasites obligatoires des plantes. Lors de l'interaction compatible, ils induisent la formation de cellules nourricières hypertrophiées et plurinucléées leur permettant d'assurer croissance et reproduction. Cette interaction plante-nématode est un modèle particulièrement intéressant pour aborder des aspects fondamentaux du contrôle de la division et de la différenciation cellulaire chez les végétaux. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation de ces cellules géantes a permis d'identifier une protéine associée aux microtubules, MAP65-3, essentielle à la formation de ces cellules géantes et au développement du nématode. Afin de préciser la fonction de cette protéine, les protéines régulatrices et/ou interagissant avec MAP65-3 ont été recherchées par une stratégie de double hybride en levure. Un des partenaires protéiques de MAP65-3 est un homologue de BUB3, membre du « Mitotic Checkpoint Complex » (MCC). Le MCC est un complexe protéique qui est un point de contrôle de la mitose assurant la fidélité de la ségrégation des chromosomes. Au cours de ma thèse, j'ai caractérisé les homologues du MCC chez *Arabidopsis thaliana*: BUB3.1, MAD2 et la famille multigénique composée de BUBR1, BUB1 related kinase BRK1 et BUB1.2. J'ai démontré les interactions *in planta* entre les membres du complexe, certaines interactions ayant lieu au niveau des noyaux, voire au niveau des centromères. J'ai réalisé l'analyse fonctionnelle de ces gènes et montré qu'ils étaient exprimés dans les tissus enrichis en cellules en division comme *MAP65-3*. L'étude de la localisation subcellulaire des protéines a révélé une localisation cytoplasmique pour BUB3.1, BUB1.2 et MAD2, nucléaire pour BUBR1, et centromérique pour BRK1. Nous avons pu également montrer que lorsque des défauts d'attachement des microtubules du fuseau mitotique sont provoqués (par l'ajout de drogues déstabilisant les microtubules), BUB3.1, BUBR1 et MAD2 se relocalisent au niveau des kinétochores. L'étude des mutants de la famille multigénique BUB1/BUBR1 a révélé que les mutants *bubr1* et *bub1.2* ainsi que les doubles et triple mutants correspondant présentent une sensibilité accrue à un traitement chimique déstabilisant les réseaux de microtubules. L'étude de la mitose chez ces mutants a révélé que *BUBR1* est essentiel à la réalisation d'une mitose sans erreur chez *Arabidopsis*. Les mutants *bubr1* présentent ainsi des anomalies lors de la ségrégation des chromosomes. Ce travail a ainsi permis de caractériser pour la première fois le MCC chez *A. thaliana*.



Except where otherwise noted, this work is licensed under

http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/deed.fr_CA

REMERCIEMENTS

Le présent travail a été effectué au sein de l'Unité Mixte de Recherche INRA-UNSA-CNRS "Interactions Biotiques et Santé Végétale" du Centre de Sophia-Antipolis.

Je tiens à remercier le Dr Pierre ABAD, qui m'a permis d'effectuer ma thèse au sein de son unité de recherche.

Je remercie Bruno FAVERY, de m'avoir accueilli et permis de travailler sur ce projet dans son laboratoire. Bruno, je te remercie sincèrement pour cette aventure. Tu m'as laissé une grande autonomie tout au long de ma thèse et ainsi permis d'envisager à quoi ressemble réellement ce métier de chercheur. Cette thèse a été pour moi une grande étape dans ma vie et tu en as fait partie.

Je tiens particulièrement à remercier les membres de mon jury de thèse : le Dr Yves Marco, le Dr Marie-Edith Chabouté, le Dr Arianne Abrieu et le Pr Pierre Frenço pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail.

Pr Pierre Frenço, c'est un honneur et une joie de te voir présider mon jury de thèse. Toute l'histoire a commencé avec toi, lorsque j'ai fait mes premiers pas dans la recherche lors de mon petit stage de licence. J'ai par la suite réalisé mon stage de master avec toi; tu m'as beaucoup appris par ta rigueur et transmis ton engouement pour la science. Aujourd'hui tu présides ma soutenance de thèse, la boucle est bouclée...

Dr Chabouté, je vous suis sincèrement reconnaissante pour la joie que vous m'avez apporté ces derniers mois, en découvrant ces phénotypes mutants, rien ne pouvait me faire plus plaisir, et je finis cette thèse comblée et heureuse.

Un grand merci au Dr Abrieu pour sa participation dans mon travail. L'idée d'une complémentation chez le xénope était excitante...Merci pour le temps et le travail que vous y avez consacré.

Je tiens également à remercier le Dr Anna Castro, pour son implication lors de mon comité de thèse ainsi qu'au cours de mon projet.

Je remercie avec une émotion toute particulière Philippe Lecomte, mon « papa » de thèse... il est difficile pour moi de savoir pour quoi je te remercie car je te remercie pour tout. Sans toi, je ne sais pas si je serais maintenant devant mon clavier d'ordinateur à écrire ces remerciements. Tu es parti trop vite, j'avais encore tellement de choses à apprendre de toi et j'aurais aimé continuer à travailler avec toi encore et encore...

Dr Mickaël Quentin, enfin Mika, un énorme merci, déjà de ta participation dans ce travail mais également de m'avoir suivi, soutenu et d'avoir partagé mes joies et mes peines au laboratoire tout au long de ces années... merci.

Je n'oublie certainement pas Marie-Cécile Caillaud, d'avoir initié ce sujet passionnant et je la remercie pour son énergie et son enthousiasme qui m'ont donné l'envie de poursuivre.

Les Ziza D et B, nommée « l'otre et l'ôte »... vous resterez à jamais dans mon cœur. Merci d'avoir été mes compagnons de paillasses, de m'avoir toujours écouté et conseillé au labo... mais pas que... merci aussi pour ces soirées « cheese&wine » et pour tous ces fous rires partagés tout au long de ces années.

Merci à Catherine Mura. Toutes ces manips sur tabac ont été faites grâce à tes fabuleuses petites mains vertes, merci également d'avoir partagé ton espace de travail et de m'avoir initié aux joies du wertern-blot... Ma Catcat, tu as été là pour moi quand il le fallait, je ne sais comment te remercier.

Merci également à Benoît Industri pour... sa « multifonctionnalité » !! Benoît, mon sauveur pour tout, roi de la bioch' et dieu de l'ordi mais aussi mon ami. Merci pour ton oreille, ton humour et ta bonne humeur quotidienne.

Un grand merci à Nathalie Marteu, la «dealeuse» de nématodes. On a eu beau râler toutes ces années et se disputer comme des chiffonniers pour obtenir un nombre toujours insuffisant de nématodes... on aurait rien pu faire sans toi. Merci pour ton dynamisme olympique et ce sourire perpétuel sur tes lèvres.

Je pense également à toutes les personnes qui ont gravité dans mon univers au cours de ces années et que je tiens également à remercier, car vous avez tous beaucoup compté pour moi : Karine, la reine du karaoké; Harald, merci de ta bonne humeur quotidienne; Franck le dieu de la Science&Blues; Chantal, la «mado nicoise» qui me fait toujours rire. Je tiens également à remercier tous les membres de ma fabuleuse équipe «Némato».

Marc, ces quelques mots seront insuffisants pour décrire ce que je ressens. Je suis ravie d'avoir fait ce bout de chemin avec toi. J'ai rencontré un ami, et je pars le cœur gros.

Paolo, mon ex coloc-collègue-voleur de confocal, merci pour ton expérience de nématologiste et surtout pour nos discussions microscopiques.

Etienne, roi du Kung Fu et du «cracher de noyaux de cerises », merci de ces moments à discuter sur l'aérodynamisme du noyau de cerise... un jour, je te promets, l'élève dépassera le maître.

Une petite pensée pour Nicolas Marfaing, dit « papa », qui reste « tous les jours émerveillé par la diversité du monde des plantes ».

Mon couple de docteurs favoris, Fab avec qui on ne s'est pas lâché depuis notre première année de fac, et Nath. Vous m'avez recueillie comme un zozio blessé, je n'oublierai jamais. Longue vie à vous et vive la science !

Je tiens à remercier mes ex-professeurs devenus collègues : Laurence Dupond, Isabelle Garcia, Nico Pauly et Eric Boncompagni. Si j'ai réalisé ma thèse à l'INRA, c'est aussi en grande partie grâce à vous. Vous avez su aiguïser ma curiosité du monde végétal dès mes premières années de fac. Un merci tout particulier à Eric, mon « tuteur » pour m'avoir suivi dans mon expérience en tant qu'enseignante, de m'avoir prodigué tous ces conseils et de me faire toujours autant rire.

Enfin, je n'oublie pas tous mes amis qui m'ont accompagné et soutenu depuis de longues années. Je ne m'étalerai pas ici, vous savez très bien ce que je ressens pour vous.

Marie et Alex, j'ai de la chance de vous avoir, merci de votre amitié.

Anto, merci d'être ce que tu es et merci pour toutes nos chamailleries récurrentes. Merci à tous les occupants de la maison du bonheur pour votre gentillesse et votre naturel.

Simon... merci.

Mes amis, Maeva, Yasmine, Steph et Tom : merci pour tous ces vendredi soir « décompression, bière et science » ; merci pour votre amitié.

Maëlle, ma consoeur de thèse, enfin plutôt ma sœur de labo... Ces dernières années ont été cruciales et riches en émotion pour toutes les deux, ce qui je pense, a approfondi notre amitié. Je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté, ton soutien, tes conseils, ton amitié et les ragots ;-)

Mon chouhou, la plus forte et la plus belle chose sur terre, l'amitié frère-sœur.

Enfin, un remerciement tout particulier à mes parents. De par votre soutien sans faille et de l'amour infini que vous me donnez tous les jours, c'est vraiment grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Je pense avoir hérité de vos défauts et qualités notamment la curiosité, qui font ce que je suis aujourd'hui. Vous m'avez toujours poussé à faire ce que j'aimais... J'ai réalisé un rêve grâce à vous.

A tous merci !!!

« BUB, you made me MAD »

(Adapté de Murray, 2012)

PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	1
PREAMBULE.....	2
INTRODUCTION.....	4
Chapitre 1. L'INTERACTION PLANTE-NEMATODE.	4
I. Les nématodes à galles.	4
A Les nématodes phytoparasites.....	5
B Le cycle biologique des nématodes à galles.....	6
C La spécialisation parasitaire des nématodes à galles.....	8
II. Le site nourricier.	14
A Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des cellules géantes.....	14
B L'étude moléculaire de la réponse de la plante à l'infection.....	15
Chapitre 2. MAP65-3, UNE PROTEINE ESSENTIELLE A LA FORMATION DES CELLULES GEANTES.	23
I. L'organisation du cytosquelette de microtubules au cours du cycle cellulaire de la cellule végétale.	23
II. Analyse fonctionnelle de MAP65-3.	29
A MAP65-3 au cours du développement de la plante.....	30
B MAP65-3 dans l'interaction plante-nématode.....	32
C Recherche de partenaires protéiques de MAP65-3.....	33
Chapitre 3. LE POINT DE SURVEILLANCE DE LA MITOSE	34
I. L'attachement des chromosomes au fuseau mitotique.	34
A La capture des kinétochores par les fibres du fuseau mitotique.....	34
B Les erreurs d'attachement.....	40
II. Le Point de Contrôle du fuseau mitotique ou « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC).	40
A Présentation générale du SAC.....	40
B Les facteurs déclenchant l'activation du SAC.....	44
C L'assemblage et la fonction du « Mitotic Checkpoint Complex » ou MCC.....	49
D L'inactivation du point de contrôle.....	56
E Le MCC chez les Végétaux.....	60
OBJECTIFS DE LA THESE.....	62
RESULTATS.....	63
Chapitre 1. La caractérisation du « Spindle Assembly Checkpoint » chez Arabidopsis.	63
Chapitre 2. Rôle du « Mitotic Checkpoint Complex » dans la division cellulaire et lors de l'interaction avec le nématode.	65
DISCUSSION.....	74
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	96
REFERENCES.....	99
POSTERS.....	132

PRINCIPALES ABREVIATIONS

+TIPs	complexe associé à l'extrémité plus des microtubules
aa	acide aminé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ADN-T	ADN de transfert
APC/C	« Anaphase Promoting Complex/Cyclosome »
ARN	acide ribonucléique
ARNi	ARN interference
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BiFC	« Bimolecular Fluorescence Complementation »
BUB	« Budding Uninhibited by Benzimidazol »
BY-2	Bright Yellow-2 (cellule de culture de tabac)
CDC20	« Cell Division Cycle »20
CDK	kinase dépendante des cyclines
Col0	Colombia-0 écotype d' <i>A.thaliana</i>
CUb	partie C-terminale de l'ubiquitine
CYC	cycline
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimethyl Sulfoxide
dNTP	désoxyribonucléotide triphosphate
FH	« Formin Homology »
FOA	« Fluoro-Oratic Acid »
GFP	« Green Fluorescent Protein »
GUS	β-glucuronidase
h	heure
H2B	histone 2 B
J2	second stage juvénile de <i>Meloidogyne incognita</i>
kb	kilobases ou 1000 paires de bases
kDa	kilo dalton
KO	« Knock-Out »
LB	Luria Broth
MAD	« Mitotic Arrested Deficient »
MAP	protéine associée aux microtubules
MBD	domaine de liaison aux microtubules de MAP4
MCC	« Mitotic Checkpoint Complex »
min	minute
MTOC	centre organisateur des microtubules
MT	microtubule
Nub	partie N-terminale de l'ubiquitine
P35S	promoteur de l'ARN 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur
pb	paire de bases
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
Q-RT-PCR	RT-PCR quantitative
RT	transcription inverse
SAC	« Spindle Assembly Checkpoint »
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i> ADN polymérase
WS	écotype Wassilevskija d' <i>A. thaliana</i>
YFP	« Yellow Fluorescent Protein »

PREAMBULE

Les nématodes phytoparasites sont des vers microscopiques, présents dans la grande majorité des sols, depuis la zone équatoriale jusqu'aux régions tempérées froides. Ces nématodes parasites de plantes sont responsables d'un tiers des pertes agronomiques mondiales attribuées aux bio-agresseurs. Parmi eux, les nématodes à galles, nématodes du genre *Meloidogyne sp.*, appelés ainsi à cause des galles qu'ils induisent sur les racines des plantes qu'ils parasitent, peuvent infester plus de 5500 espèces botaniques (Blok et al., 2008). Ils constituent de graves ravageurs des cultures, induisant de profondes altérations de l'anatomie des racines. Ainsi, ils provoquent des retards de croissance, des flétrissements et une sensibilité accrue aux autres agents pathogènes. *M. incognita* est l'une des espèces les plus couramment rencontrées en région méditerranéenne où l'on estime à 40% le nombre d'exploitations touchées par ce ravageur (Djian-Caporalino, 2010). Compte tenu de leur dissémination dans le sol et de leur résistance aux contraintes abiotiques, l'éradication totale des nématodes ne peut être envisagée.

La lutte chimique, longtemps utilisée, présente de nombreux inconvénients. Les nématicides chimiques sont très toxiques, délicats d'application et souvent d'une efficacité insuffisante. L'utilisation de ces dangereux polluants, sévèrement réglementée, est en cours d'interdiction dans de nombreux pays. Ainsi le bromure de méthyle, l'aldicarbe et le 1,3-dichloropropène (DCP) ont été interdits par la Communauté Européenne entre 2004 et 2007. La lutte biologique, malgré quelques succès encourageants, n'a connu jusqu'à présent que peu d'applications dans la pratique agronomique. Elle se heurte aux difficultés d'utilisation de matériel vivant comme biopesticide. Les auxiliaires envisagés (champignons nématophages, bactéries antagonistes) ont des exigences écologiques strictes qui rendent leur utilisation systématique au champ délicate (Djian-Caporalino and Panchaud-Mattei, 1998).

L'utilisation de cultivars résistants associée à la mise en œuvre de pratiques culturales adéquates (rotations de cultures, gestion des réservoirs potentiels) constitue un moyen de lutte efficace et respectueux de l'environnement. Actuellement, une trentaine de gènes dominants de résistance aux nématodes à galles a été identifiée et cartographiée chez sept familles botaniques, notamment chez les Solanacées maraîchères (gènes *Mi* chez la tomate, *Me* chez le piment) et les Rosacées (Djian-Caporalino et al., 2007; Williamson and Kumar, 2006). La résistance se caractérise généralement par une nécrose localisée des tissus végétaux (ou réponse hypersensible) qui conduit à la mort du nématode. Cette réponse, comparable à celle décrite pour d'autres gènes de résistance aux agents pathogènes peut avoir lieu au point d'infection (gènes *Mi* et *Me3* en réponse à *M. incognita*) ou plus tardivement, durant la migration du nématode ou lors de l'induction des sites nourriciers (gène *Me1* en

réponse à *M. incognita*) (Pegard et al., 2005). Une des limites à l'utilisation des gènes de résistance naturels est l'apparition de souches virulentes de nématodes, c'est à dire capables de contourner les gènes de résistance. L'échantillonnage de populations naturelles de *Meloidogyne* spp. a ainsi permis de mettre en évidence l'existence d'isolats virulents vis-à-vis du gène *Mi* de la tomate à travers le monde (Jarquin-Barberena et al., 1991). Des lignées virulentes de *M. incognita* ont également pu être sélectionnées expérimentalement vis à vis des gènes *Mi* et *Me3* (Castagnone-Sereno et al., 1994). L'étude de la gestion durable de ces gènes de résistance (dont le nombre est limité) constitue dès lors un enjeu important. Elle implique notamment l'étude de l'évolution des populations de nématodes sous pression de sélection et la caractérisation des mécanismes impliqués dans le contournement des gènes de résistance. Du fait des interdictions de l'emploi des nématicides chimiques et des limites des autres méthodes de lutte, le problème se révèle de plus en plus préoccupant. La compréhension de l'interaction plante-nématode est donc un enjeu majeur pour l'élaboration de nouvelles méthodes de lutte respectueuses de la qualité de l'eau et de la biodiversité des sols.

Les nématodes à galles ont élaboré des mécanismes de parasitisme originaux et complexes. Après une migration dans les racines végétales, ils se sédentarisent en induisant la redifférenciation de cellules végétales en cellules géantes hypertrophiées et polynucléées qui constituent leur site nourricier indispensable à leur développement (Caillaud et al., 2008a). La compréhension du dialogue moléculaire qui s'établit au cours de l'interaction compatible a pour but d'identifier les mécanismes impliqués dans l'ontogenèse des cellules géantes induites par les nématodes à galles et de jeter les bases pour le développement de nouvelles stratégies de résistance spécifiques. La formation et le maintien des cellules géantes représentent également une question particulièrement intéressante pour aborder des aspects fondamentaux de la différenciation et du contrôle de la division cellulaire chez les végétaux.

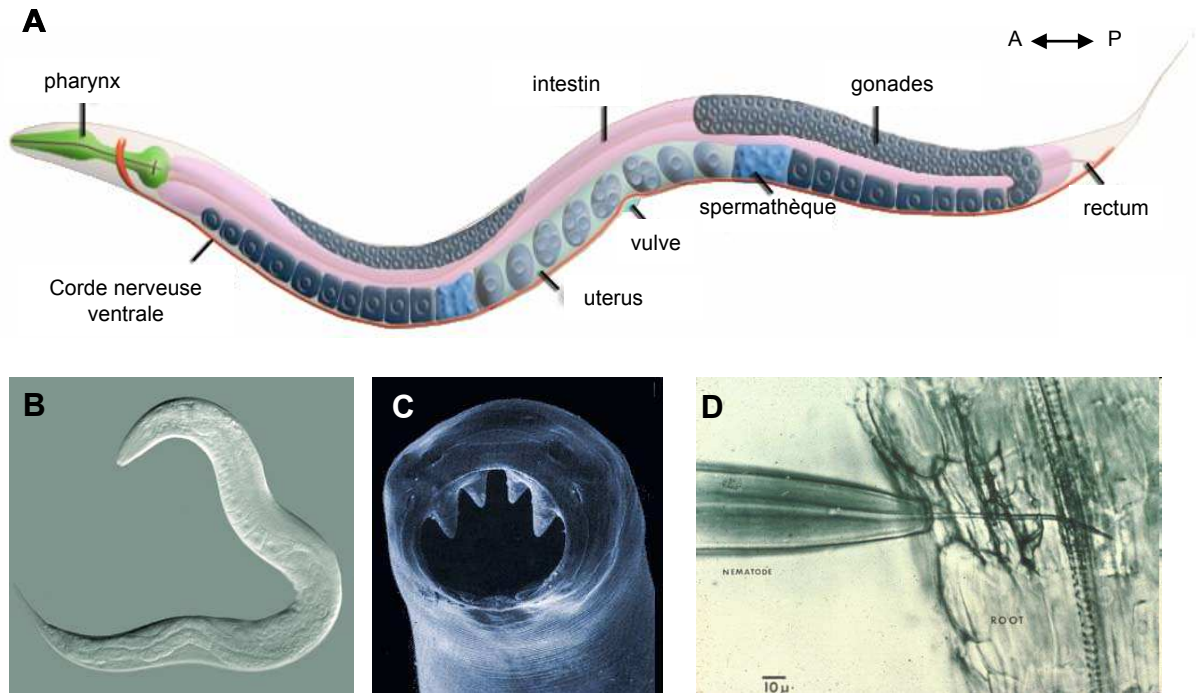


Figure 1: Présentation des Nématodes.

A: Structure morphologique générale. Section longitudinale d'un nématode. A: antérieur, P: postérieur. (Atlas de *C. elegans* anatomy, <http://www.wormatlas.org/ver1/handbook/bodyshape.htm>)

B, C et D: La diversité du mode de vie des nématodes. D'après Jaouannet (2011)

A: Un nématode à vie libre du sol: l'organisme modèle *C. elegans*.

B: Un nématode parasite d'animaux: à l'aide de lames et de crochets buccaux *Ancylostoma duodenale* s'accroche à la muqueuse intestinale.

C: Un nématode phytoparasite: *Xiphinema index* possède un stylet lui permettant de prélever le contenu cytoplasmique des cellules végétales.

INTRODUCTION

Dans cette introduction, je débiterai par une présentation du modèle pathogène plante / nématodes à galles, détaillant le processus infectieux lors d'une interaction compatible. Je décrirai ensuite les études développées afin d'identifier les déterminants du succès de l'interaction compatible, du point de vue du nématode avec la recherche d'effecteurs ou de la réponse de la plante en détaillant les différentes approches développées pour étudier ces mécanismes au niveau moléculaire. Une des stratégies développée par le laboratoire a permis de mettre en évidence un gène végétal essentiel à la formation des cellules géantes et au développement du nématode : *MAP65-3*. Je détaillerai l'étude fonctionnelle réalisée sur *MAP65-3* tout en faisant un point sur les données moléculaires et cellulaires relatives au cycle cellulaire et au cytosquelette de la cellule végétale, données importantes pour comprendre le rôle essentiel de *MAP65-3* au cours de la mitose. La recherche des protéines régulatrices et/ou interagissant avec *MAP65-3* ont conduit à l'identification de protéines impliquées dans le point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique ou « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC). Je détaillerai donc ensuite les connaissances acquises sur ce processus ainsi que le mécanisme de transition métaphase-anaphase dans lequel ce SAC est impliqué.

Chapitre 1. L'INTERACTION PLANTE-NEMATODE.

I. Les nématodes à galles.

Les nématodes ou « vers ronds » non segmentés forment un groupe zoologique caractérisé par sa richesse en espèces (plus de 25000 sont actuellement décrites), et possèdent une structure corporelle simple et une organisation uniforme (Figure 1). Leur corps présente une symétrie bilatérale et radiale. Dépourvus de système respiratoire et circulatoire, ils possèdent un tube digestif complet. Les nématodes sont recouverts d'une cuticule épaisse et rigide, élaborée par l'épiderme. Indépendamment du mode de vie, tous les nématodes ont un cycle de vie invariable de quatre stades larvaires suivis du stade adulte. Le passage d'un stade au suivant est marqué par une mue au cours de laquelle la cuticule est remplacée. Présent dans presque tous les milieux naturels, ce groupe comprend (1) des espèces bactériophages-saprophages libres dans le sol ou dans les eaux douces ou salées, (tel l'organisme modèle *Caenorhabditis elegans*), (2) des espèces prédatrices, (3) des espèces parasites. Les nématodes peuvent ainsi être parasites de vertébrés (par exemple les genres *Ascaris*, *Brugia*, *Trichinella*),

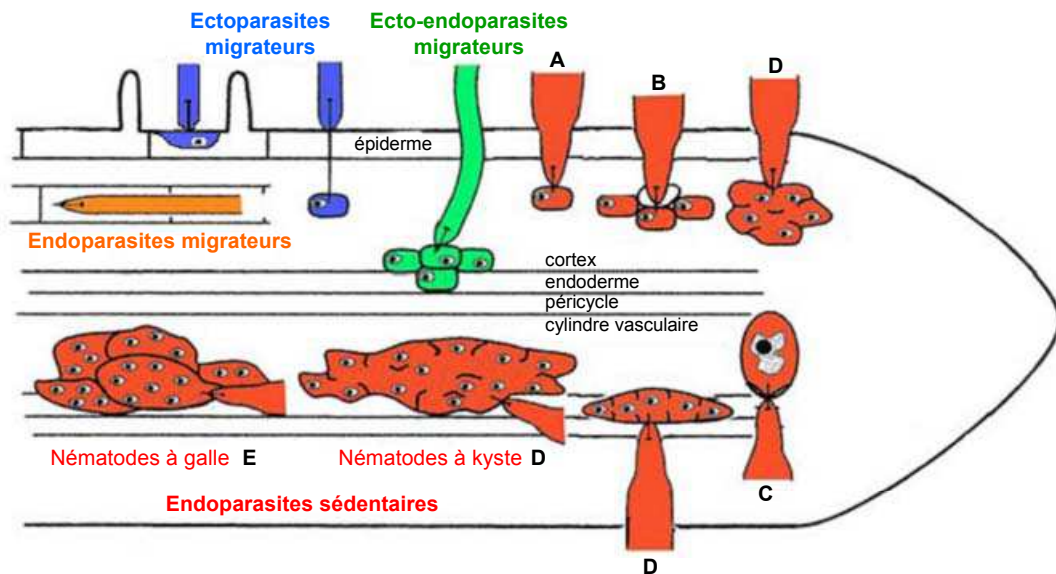


Figure 2: Trois catégories de nématodes phytoparasites en fonction de leur comportement au cours du parasitisme: les ecto-, les ecto-endo- et les endo-parasites.

Les ectoparasites migrateurs (en bleu), comme les endoparasites migrateurs (en orange) s'alimentent à partir de cellules qui ne subissent pas de transformations majeures. Les ecto-endoparasites migrateurs (en vert) peuvent induire la formation d'une structure nourricière constituée de la cellule nourricière entourée de quelques cellules présentant un cytoplasme dense et une hyperactivité métabolique. Les endo- et ecto-endo-parasites sédentaires (en rouge) développent une interaction étroite avec la plante hôte en initiant la formation de sites nourriciers complexes présentant une hyperactivité métabolique, un cytoplasme dense, une fragmentation de la vacuole centrale et un grossissement du ou des noyau(x). On distingue 4 groupes de sites nourriciers :

- une cellule non hypertrophiée (A) ou un groupe de cellules non hypertrophiées (B) dans la zone corticale racinaire (*Tylenchulinae*)
- une cellule mononucléée hypertrophiée (C) possédant un noyau considérablement agrandi et invaginé et une paroi épaisse (*Heteroderinae*)
- le syncytium (D) résulte de la dissolution des parois et de la fusion des cytoplasmes des cellules adjacentes ainsi que des processus d'endoréduplication. Cette structure présente une polypléidie avec une taille des noyaux et des nucléoles accrue. Les syncytia sont induits dans différentes zones de la racine selon le type de nématode les initiant (cortex : *Verutus volvigentis*; péricycle *Rotylenchulinae*; cylindre vasculaire : nématodes à kyste)
- les cellules géantes multinucléées (E) formées par une succession de mitoses sans cytokinèse associée à un processus d'endoréduplication (nématodes à galle *Meloidogyne*). D'après Jaouannet (2011)

d'insectes (genres *Heterorhabditis*, *Steinernema* utilisés en lutte biologique) ou de plantes (genres *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera* et *Xiphinema*).

A Les nématodes phytoparasites.

Les nématodes phytoparasites sont des parasites **obligatoires biotrophes**, qui se nourrissent uniquement du cytoplasme des cellules vivantes. Ils possèdent tous un stylet buccal qui leur permet de perforer la paroi des cellules végétales, d'injecter des sécrétions salivaires dans ces cellules et d'en ingérer le contenu. Actuellement, environ 3000 espèces phytophages sont décrites. Elles appartiennent à deux ordres, les *Tylenchida* et les *Dorylaimida*, le second comprenant les nématodes vecteurs de virus végétaux (tobra- et népovirus) (Maggenti, 1991). Malgré la structure uniforme de leur appareil de nutrition, les nématodes ont développé différentes stratégies parasitaires pour utiliser la plante en tant que source de nourriture. En effet, si certaines espèces n'exercent sur le système racinaire qu'un parasitisme externe, d'autres présentent un véritable cycle parasitaire au sein des tissus végétaux. Trois catégories de nématodes phytophages sont ainsi décrites (Figure 2), chacune d'entre elles subdivisée en sédentaire quand l'animal se fixe et s'alimente d'un site nourricier permanent ou en migrateur quand il se déplace pour s'alimenter. Ces catégories sont les suivantes :

- **Les ectoparasites** : les nématodes ectoparasites migrateurs présentent le mode de parasitisme le plus primitif. Les larves libres dans le sol, utilisent leur stylet pour se nourrir de cellules épidermiques ou corticales tout le long de la racine (*Trichodorus* spp.). Les ectoparasites sédentaires, comme *Longidorus* spp. se nourrissent au niveau de sites spécifiques de la racine pendant des périodes plus longues allant de quelques heures à quelques jours. Si ces nématodes sont généralement responsables de dommages limités, certains sont économiquement importants en tant que vecteurs de virus, comme le nématode *Xiphinema index* vecteur du virus du court noué de la vigne (Brown et al., 1995; Villate et al., 2008).
- **Les semi-endoparasites** : les larves ne sont que partiellement engagées dans les tissus et pondent à l'extérieur de la plante. Les cellules entourant la tête du nématode se transforment en site nourricier. Citons par exemple *Tylenchulus semi-penetrans* sur les racines du citronnier et *Rotylenchulus reniformis* sur les racines du cotonnier.
- **Les endoparasites** : Les nématodes endoparasites migrateurs circulent dans la racine (*Pratylenchus* spp.) ou sur tiges (*Ditylenchus dipsaci*). Ils sont très polyphages et provoquent des nécroses tissulaires massives (Wyss, 1997). Cependant, ce sont les nématodes endoparasites sédentaires appartenant à la famille des *Heteroderidae* qui sont responsables des dommages les plus importants au niveau mondial (Sasser and Freckman, 1987). Ces nématodes établissent une interaction complexe avec la plante hôte, qui conduit à la formation de sites nourriciers indispensables à leur développement.

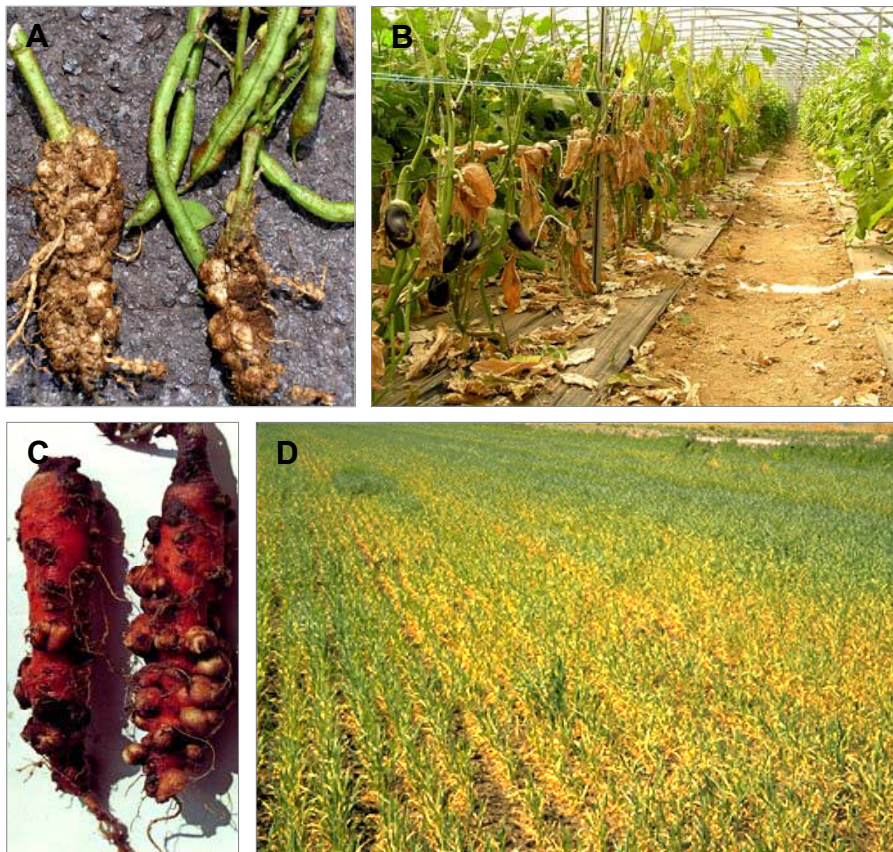


Figure 3: Symptômes sur les racines infestées par les nématodes à galles.

A: Galles sur racines de haricots infestées par *M. incognita*.

B: Dégâts sur une culture en serre d'aubergines infectées par *M. incognita*.

C: Galles sur carottes infestées par *M. incognita*.

D: Dégâts sur un champs de céréales infecté par *M. naasi*. D'après Caillaud (2009).

La famille des *Heteroderidae* comprend deux groupes, les nématodes à galles du genre *Meloidogyne* et les nématodes à kystes des genres *Heterodera* et *Globodera*. Les nématodes à kystes sont des parasites qui n'attaquent généralement qu'un petit nombre d'espèces végétales de la même famille, mais leurs dégâts peuvent être très importants. *Heterodera glycines* est ainsi considéré comme le pathogène majeur du soja aux Etats-Unis. *Globodera pallida* et *G. rostochiensis* provoquent, quant à eux, des dommages importants dans toutes les zones de culture de la pomme de terre. Parmi les espèces de nématodes à galles recensées, la plupart (32 sur 54 espèces testées) se développent, comme les nématodes à kystes, sur une plante hôte spécifique (Blok et al., 2008). Ces espèces de *Meloidogyne* à « hôte spécifique » sont toutes diploïdes et ont une reproduction de type sexuée (amphimictie). Cependant, un groupe de nématodes à galles ont une très large gamme d'hôtes, comprenant plus de 5500 espèces incluant la quasi-totalité des espèces cultivées dont les cultures maraîchères et fruitières (Blok et al., 2008). Ces espèces « majeures » *M. incognita* (la plus répandue), *M. javanica* et *M. arenaria* sont, à elles seules, responsables de 90% des dégâts causés au niveau mondial (Triantaphyllou, 1985) (Figure 3). Ces espèces de *Meloidogyne* sont polyploïdes et se reproduisent par parthénogenèse mitotique stricte : la reproduction consiste en une seule division cellulaire non réductionnelle avec maintien du nombre de chromosomes jusqu'à maturation des ovocytes. Les mâles ne participent donc pas à la reproduction. D'autres espèces de *Meloidogyne* présentent une reproduction parthénogénétique méiotique facultative (*M. hapla*, *M. chitwoodi*) et ont conservé la possibilité de se reproduire de façon sexuée (Blok et al., 2008; Triantaphyllou, 1985).

B Le cycle biologique des nématodes à galles.

Le cycle biologique des nématodes à galles se décompose en deux phases : la **phase exophyte** (à l'extérieur de la plante) qui débute lors de la ponte des œufs et se termine par la pénétration des larves de second stade (L2) dans la racine et une **phase endophyte** qui constitue la phase parasitaire et correspond à l'établissement du nématode dans la racine, son développement et sa reproduction (Figure 4). La phase parasitaire comporte deux étapes : une étape d'invasion des tissus, pendant laquelle la L2 pénètre dans la racine et migre dans les tissus racinaires, suivie d'une étape de sédentarisation au cours de laquelle le nématode initie la formation de son site nourricier, s'alimente, se développe en adulte et se reproduit. Les tissus végétaux environnant le nématode et son site nourricier subissent une hypertrophie et une hyperplasie cellulaire qui conduisent à la formation des galles racinaires caractéristiques de l'infestation par les *Meloidogyne* spp.

o L'invasion et la migration du nématode dans les tissus racinaires.

Les deux premiers stades larvaires (L1 et L2) sont formés dans l'œuf à l'extérieur des racines. Après éclosion, la L2 constitue la forme infestante. Elle se déplace dans le sol jusqu'à atteindre le système

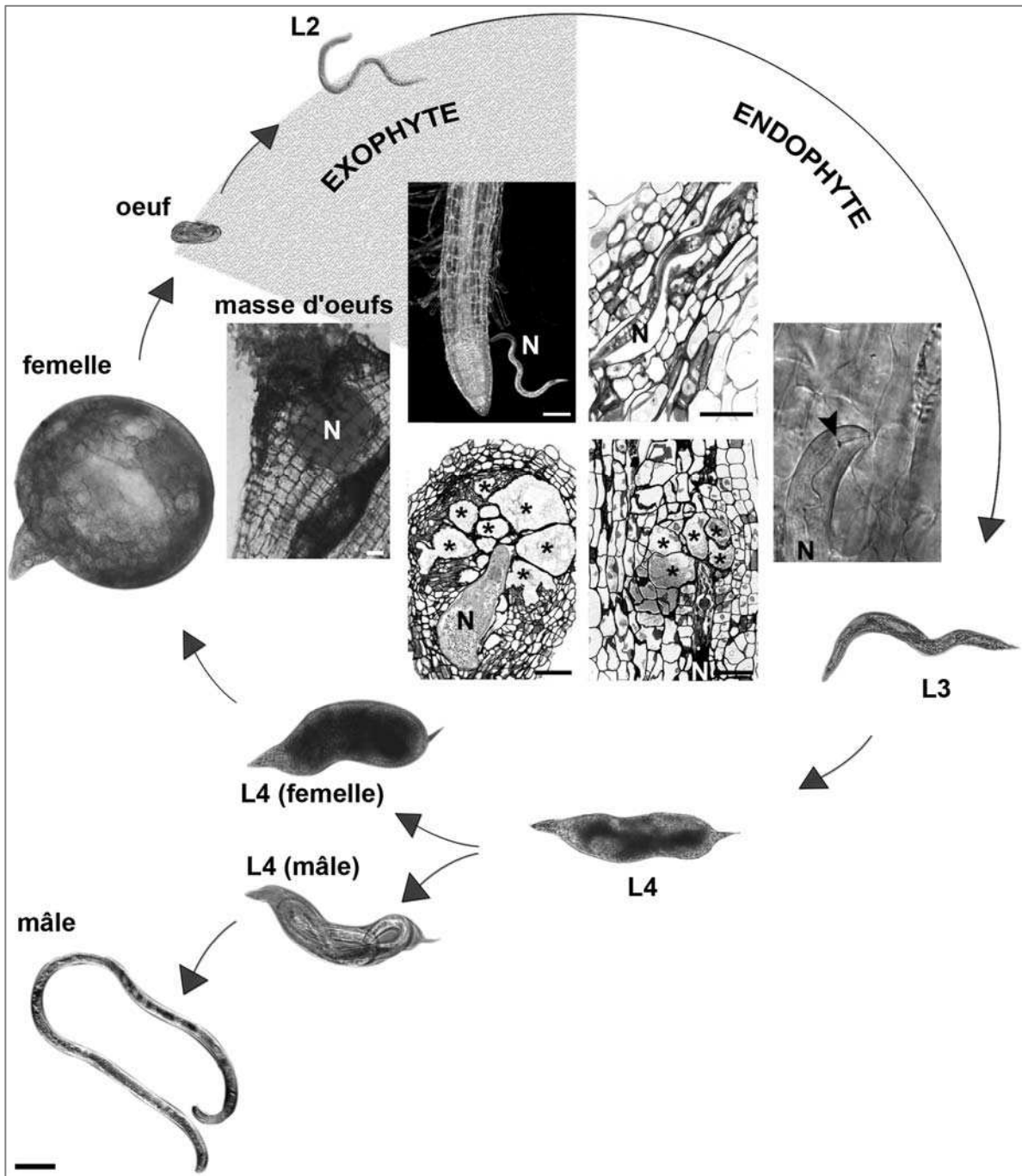


Figure 4: Cycle biologique des nématodes à galles.

Le second stade larvaire (L2) de *M. incognita* (N), seul stade libre, est le stade infestant. Les larves L2 libres pénètrent dans les racines au niveau de la zone d'élongation, migrent de façon intercellulaire jusqu'au méristème racinaire, puis remontent dans le cylindre vasculaire où elles initient un site nourricier. Ce site nourricier est composé de 5 à 7 cellules géantes (*), obtenues par piqûre de cellules du parenchyme. A ce stade, la larve est sédentarisée dans la racine et effectue des mues successives en stades L3 et L4 puis en adulte. Occasionnellement, des mâles se développent et migrent en dehors de la racine. A la fin d'un cycle de vie de deux mois, la femelle libère de 300 à 1000 œufs dans une gangue gélatineuse à l'extérieur de la racine, desquels sortiront des larves L2 qui iront infester d'autres plantes. Barre = 50 µm. D'après Abad *et al.*(2008).

racinaire d'une plante hôte. Après une phase d'exploration de la surface racinaire, les L2 envahissent les racines préférentiellement au niveau de la zone d'élongation proche de l'apex racinaire. Si les premières pénétrations sont observables une à deux heures après le début de l'exploration, la majorité des larves ont pénétré après 48 heures (von Mende, 1997). Le comportement parasitaire à l'intérieur de la racine a pu être déterminé par l'observation des racines fines et translucides de la plante modèle *A. thaliana* (Wyss et al., 1992). L'organisation simple de sa racine constituée d'une assise externe de cellules épidermiques et corticales entourant le cylindre central vasculaire a permis de compléter ces études au niveau cellulaire (Nobre et al., 1995). *A. thaliana* est ainsi devenue une plante modèle pour l'analyse de l'interaction plante-nématode à galle.

Après la **pénétration** de l'épiderme racinaire, la L2 amorce une **migration de type intercellulaire** en direction de l'apex racinaire. Lorsqu'elle atteint la zone méristématique, la L2 effectue un retournement (huit à dix heures après la pénétration chez *A. thaliana*) provoquant la destruction de cellules méristématiques et poursuit sa migration dans le cylindre central de la racine. Cette migration dans l'apex racinaire pourrait être expliquée par l'impossibilité pour la L2 de traverser la barrière constituée des cellules de l'endoderme dont les parois radiales sont renforcées par des ligno-subérines imperméables (cadres de Caspary) (Wyss et al., 1992).

o ***L'induction du site nourricier et la sédentarisation du nématode.***

Dans le cylindre vasculaire, la L2 sélectionne et piéque à l'aide de son stylet cinq à sept cellules du parenchyme proche du protoxylème pour initier la formation du site nourricier. Les cellules végétales sélectionnées se transforment en cellules hypertrophiées et multinucléées appelées **cellules géantes**. Ces cellules forment le site nourricier permanent à partir duquel le nématode s'alimente (Figures 4 et 5). De même que la présence du site nourricier est essentielle pour la survie du nématode, la présence du nématode est indispensable au maintien du site nourricier. La formation des cellules géantes s'accompagne de l'hypertrophie puis de l'hyperplasie des cellules vasculaires environnantes, qui conduit à la formation d'une **galle** entourant les cellules géantes et le nématode (Nobre et al., 1995). Ces galles sont généralement visibles, chez *A. thaliana*, deux à trois jours après la pénétration des larves. Cette réaction secondaire constitue le symptôme le plus caractéristique de l'attaque des *Meloidogyne* spp.

Après avoir initié la formation du site nourricier, la L2 se sédentarise et commence à s'alimenter. Une accumulation de callose est observée autour du stylet, entre la paroi et la membrane plasmique (Hussey et al., 1992). Ce phénomène, dont l'origine serait attribuée à une réaction de défense de la plante, ne semble pas gêner la nutrition du nématode. Le nématode se nourrit en insérant son stylet dans les différentes cellules géantes du site nourricier à tour de rôle. Le stylet atteint l'apoplasme de

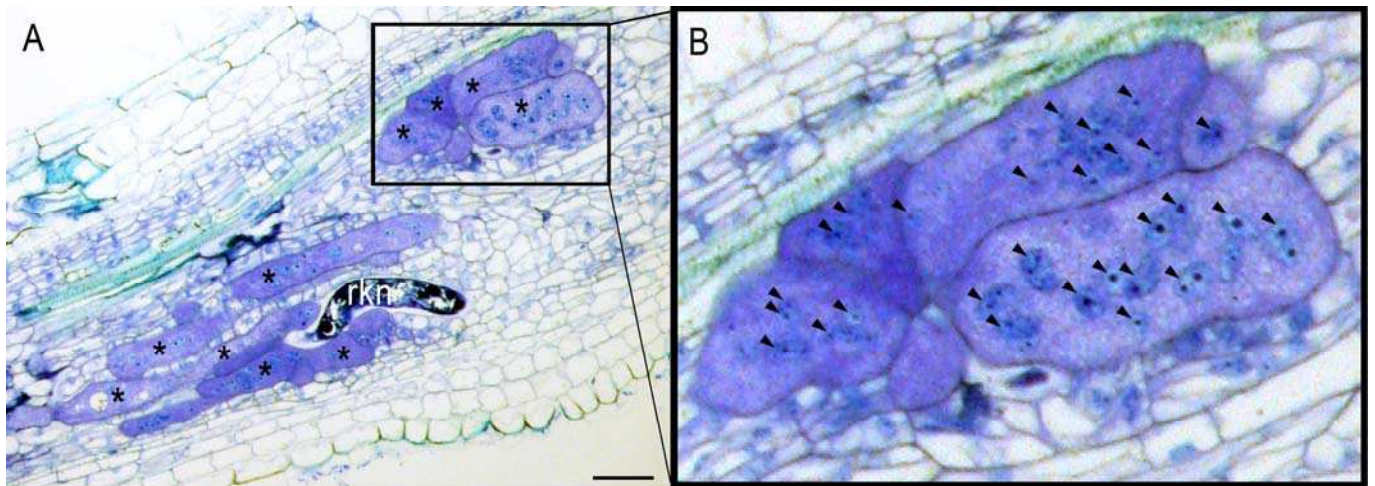


Figure 5: Le site nourricier du nématode à galle.

A: Le nématode à galle *Meloidogyne chitwoodi* (rkn pour Root-Knot Nematode) induit la formation d'un site nourricier constitué de 5 à 7 cellules hypertrophiées et polynucléées (*) lui permettant d'accomplir son cycle de développement (barre = 50 μm) chez le piment.

B: Grossissement sur un site nourricier: les flèches indiquent les noyaux des cellules géantes. D'après Quentin et al.(2013).

chaque cellule sans toutefois perforer la membrane plasmique qui s'invagine autour du stylet. Une fois sédentarisée la L2 perd ses muscles locomoteurs et se développe en larve de troisième puis de quatrième stade (L3 et L4), puis enfin en adulte mâle ou femelle. Chez les espèces parthénogénétiques, le mâle n'a pas de fonction reproductrice. Il reprend un aspect filiforme ainsi qu'une activité motrice puis quitte la racine (Figure 4). La femelle en revanche reste sédentaire, s'arrondit et devient piriforme. Les femelles adultes continuent de s'alimenter pendant plusieurs semaines et pondent, à maturité sexuelle plusieurs milliers d'œufs qu'elles rejettent à l'extérieur de la racine dans une matrice mucilagineuse protectrice. Après avoir réalisé leur cycle de développement, les femelles meurent et les cellules géantes et les tissus de la galle dégénèrent.

C *La spécialisation parasitaire des nématodes à galles.*

a *Les organes sécréteurs.*

Les nématodes parasites de plantes possèdent des structures spécialisées : le stylet et les glandes salivaires œsophagiennes, essentielles aux différentes étapes du processus parasitaire (Hussey, 1989; Hussey and Mims, 1991) (Figure 6A). Au cours du parasitisme, les molécules sécrétées par ces différents organes sont en contact direct avec les tissus végétaux. C'est pourquoi un rôle important est attribué à ces sécrétions dans le dialogue moléculaire se déroulant entre la plante et le nématode au cours du parasitisme. Les nématodes possèdent également des amphides, qui constituent les organes chimio-sensoriels majeurs. Elles pourraient être impliquées dans les mécanismes complexes de reconnaissance permettant aux larves de s'orienter, tant dans le sol que dans la racine chez les nématodes parasites des plantes (Piotte et al., 1999; Stewart et al., 1993).

Le stylet est une aiguille creuse protractile localisée à l'extrémité antérieure du nématode qui lui permet de perforer la paroi des cellules végétales (Figures 6A et B). Le stylet présente un canal central par lequel des sécrétions salivaires sont libérées. Pour s'alimenter, le nématode insère son stylet dans la paroi des cellules sans perforer la membrane plasmique, qui s'invagine autour du stylet. Le nématode absorbe les éléments nutritifs des cellules parasitées grâce à un minuscule orifice dans la membrane plasmique localisé au niveau du lumen du stylet. Le diamètre de l'orifice du stylet n'excéderait pas 0,1 μm . Ainsi, les organites cellulaires tels que les mitochondries et les plastides ne peuvent être ingérés.

Au cours de la nutrition du nématode, des structures appelées « tubes nourriciers » se forment à l'intérieur du cytosol des cellules nourricières (Hussey and Mims, 1991) (Figure 6B). La présence de nombreux tubes nourriciers isolés dans le cytoplasme des cellules nourricières suggère qu'un nouveau tube serait formé à chaque réinsertion du stylet dans la cellule. L'étude ultrastructurale des tubes nourriciers formés par les femelles de *M. incognita* dans les cellules géantes montre que ceux-ci, de nature cristalline, sont entourés d'un système complexe de membranes composé de réticulum

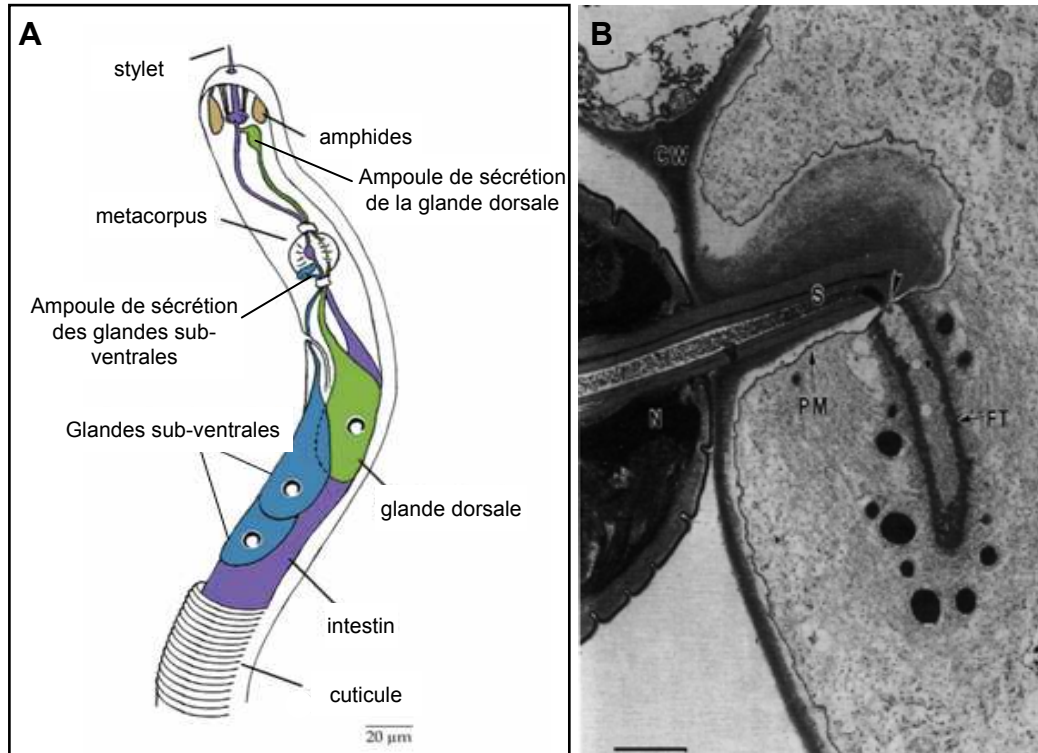


Figure 6: Spécialisation parasitaire des nématodes.

A: Schéma anatomique de la partie antérieure d'une L2 de *Meloidogyne sp.*. D'après Vanholme *et al.* (2004).

B: Coupe longitudinale d'un stylet de *Rotylenchulus reniformis* pénétrant la paroi cellulaire. La membrane plasmique (PM) est invaginée autour de l'extrémité du stylet (S). Une petite ouverture dans la membrane plasmique (flèche) est observable entre l'orifice du stylet et la lumière du tube nourricier (FT). Barre = 1 µm. D'après Rebois *et al.* (1980).

endoplasmique lisse au contact du tube et granulaire à sa périphérie (Hussey and Mims, 1991). Ces tubes nourriciers intracellulaires pourraient jouer un rôle important dans l'absorption de nourriture, fonctionnant comme des filtres pour l'ingestion sélective de substrats, évitant ainsi l'obstruction de l'orifice du stylet.

Les sécrétions du stylet sont produites dans trois glandes œsophagiennes, une dorsale et deux subventrales et sont sécrétées *via* le stylet dans les tissus racinaires au cours du parasitisme. Ces glandes sont hypertrophiées, unicellulaires et sont prolongées par des extensions cytoplasmiques qui se terminent par une ampoule de sécrétion connectée à l'œsophage par une valve élaborée. Le contenu des vésicules de sécrétion produites par la glande dorsale est excrété dans l'œsophage à proximité de la base du stylet alors que les deux glandes subventrales vident leurs vésicules de sécrétion immédiatement en arrière du métacorpus. Les différents modes d'action potentiels des sécrétions salivaires et amphidiales dans la formation des sites nourriciers sont schématisés dans la figure 7. Les sécrétions peuvent être soit directement injectées dans le cytoplasme *via* le stylet soit injectées dans l'apoplasme et interagir avec des récepteurs membranaires présents au niveau la membrane plasmique, entraînant l'activation de cascades de signalisation. De plus certaines protéines sécrétées sont détectées au niveau des noyaux des cellules géantes suggérant une activité directe sur la machinerie transcriptionnelle de la plante hôte (Jaouannet et al., 2012; Lin et al., 2013).

b Les effecteurs du pouvoir pathogène.

Les signaux moléculaires émis par le nématode, responsables de l'induction et du maintien des cellules géantes sont encore mal connus. Il est cependant admis que des effecteurs sécrétés dans le site nourricier sont à l'origine de la re-différenciation des cellules végétales (Gheysen and Mitchum, 2011). Plusieurs stratégies ont été utilisées pour identifier les effecteurs du pouvoir pathogène: soit par approches de protéomique, soit par des approches de transcriptomiques. Les approches de protéomique ont permis, en purifiant les sécrétions de *M. incognita* d'identifier environ 486 protéines sécrétées (Bellafiore et al., 2008; Jaubert et al., 2002a). Les approches de transcriptomiques ont été réalisées soit par analyse différentielle des transcrits des stades larvaires exophytes/endophytes par la technique d'hybridation suppressive soustractive (SSH) (Dubreuil et al., 2007); soit à partir « d'Expressed Sequence Tag » générés à partir de différents stades larvaires de *Meloidogyne spp.* (Haegeman et al., 2012a; Jaouannet et al., 2012; Roze et al., 2008), de plantes infectées (Haegeman et al., 2012a) ou de microaspirations du contenu cytoplasmique des glandes oesophagiennes (Huang et al., 2004).

Deux génomes de nématodes à galles sont maintenant disponibles : *M. incognita* (Abad et al., 2008) et *M. hapla* (Opperman et al., 2008). Des analyses comparatives de ces génomes ont permis une avancée majeure dans l'identification d'effecteurs. Les différentes approches et analyses des

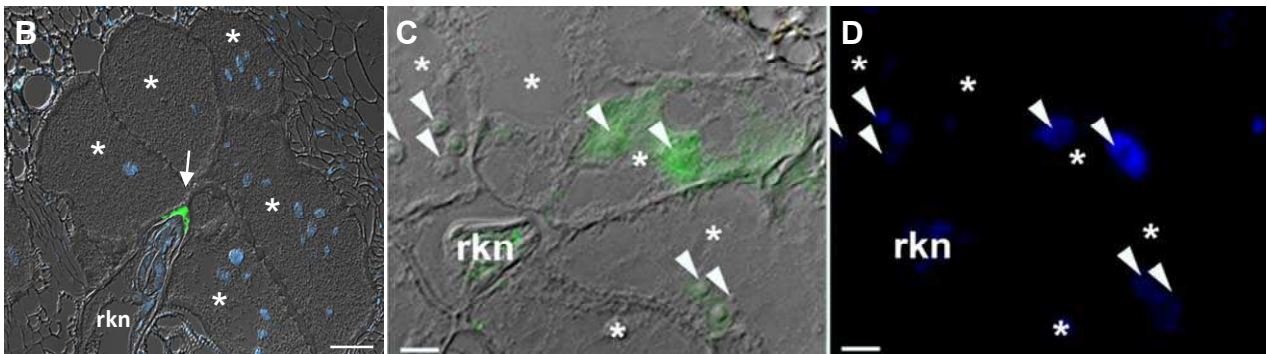
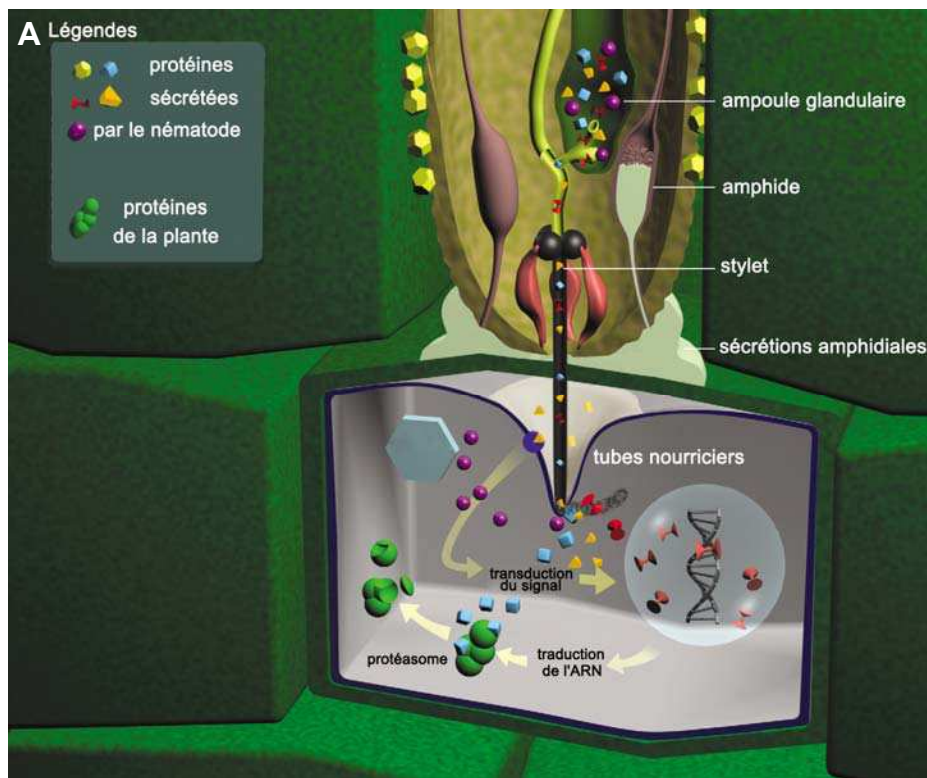


Figure 7: Modèle des interactions potentielles entre les sécrétions du nématode et la cellule nourricière de la plante hôte.

A: Les sécrétions salivaires du nématode peuvent être injectées dans l'apoplasme et interagir avec un récepteur membranaire présent sur la membrane plasmique ou être directement injectées *via* le stylet dans le cytoplasme de la cellule hôte via un pore dans la membrane plasmique au niveau de l'orifice du stylet. Les sécrétions des amphides présentes à la surface de la paroi peuvent également jouer un rôle dans l'interaction. Les enzymes pectino-cellulolytiques sécrétées (en jaune) dégradent la paroi cellulaire des cellules végétales afin de faciliter la pénétration et la migration des L2 dans les tissus racinaires. Dans la cellule végétale, des sécrétions (en bleu) pourraient interagir avec la machinerie cellulaire tel que le protéasome. Des sécrétions possédant des signaux de localisation nucléaire (en rouge) pourraient exercer leur activité au niveau du noyau de la cellule géante. D'après Davis et al.(2004).

B: Immunolocalisation d'une protéine sécrétée dans l'apoplasme et s'accumulant le long de la paroi cellulaire (flèche) de cellules géantes de tomate. Barre: 10µM. D'après Rosso et al.(2011)

C: Immunolocalisation de l'effecteur MIEFF1 dans un site nourricier de tomate à 14 jours après inoculation (jai): les sécrétions du nématode (signal vert) sont observées à l'extrémité du stylet du parasite sédentaire et dans les noyaux (flèches) des cellules géantes (*). **D:** Localisation des noyaux au DAPI (bleu) de la section présentée en C. Barre: 50µM. D'après Quentin et al.(2013).

sécrétomes ont permis d'identifier de nombreux gènes de *M. incognita* codant pour des effecteurs candidats, protéines possédant des peptides signaux de sécrétion prédits (Bellafiore et al., 2008; Dubreuil et al., 2007; Huang et al., 2003; Jaouannet et al., 2012; Jaubert et al., 2002a). Récemment, une nouvelle étude transcriptomique a ainsi permis d'identifier 256 ESTs spécifiques du stade juvénile parasitique du nématode (Jaouannet et al., 2012). Parmi ces 256 séquences, 28 coderaient des protéines potentiellement sécrétées. Les analyses fonctionnelles des effecteurs putatifs identifiés sont initiées par une première étape de validation de leurs expressions spécifiques dans les glandes oesophagiennes (pour revue, Haegeman et al., 2012b; Hewezi and Baum, 2013). Parmi ces 28 ESTs, 13 seraient codées par des gènes pionniers. Ces gènes pionniers ne présentent aucune homologie dans les bases de données disponibles, suggérant que ces effecteurs candidats pourraient être spécifiques de l'interaction plante-nématode. 11 des 28 gènes codant pour des protéines potentiellement sécrétées ont été validés pour leurs expressions dans les larves juvéniles parasitiques par hybridation *in situ* et 3 de ces gènes sont exprimés spécifiquement dans les glandes oesophagiennes, indiquant leurs potentielles sécrétions. Ces effecteurs peuvent être classés en fonction de leur rôle au cours de l'infection comme décrit ci-dessous.

- ***Enzymes favorisant la migration du nématode.***

La paroi est la première barrière rencontrée par les organismes phytoparasites. Sa dégradation est donc nécessaire pour la mise en place du parasitisme. *M. incognita* présente une diversité spectaculaire d'enzymes de dégradation de paroi qui n'a pas d'équivalent à ce jour dans le règne animal. Plus de 60 gènes codant des enzymes de dégradation et de modification de paroi capables d'agir sur les composés majeurs de la paroi et regroupés en familles multigéniques ont été identifiés (Abad et al., 2008). Parmi les enzymes identifiées, on retrouve : des β -1,4-endoglucanases (Ledger et al., 2006; Rosso et al., 1999), une endo-1,4- β -xylanase (Mitreva-Dautova et al., 2006), des pectate-lyases (PL3) et des polygalacturonases (GH28) (Huang et al., 2005a; Jaubert et al., 2002b), des arabinanases (GH43) et des protéines homologues à des expansines (Danchin et al., 2010; Roze et al., 2008). Ces cellulases pourraient être impliquées dans le relâchement de la paroi des cellules végétales afin de faciliter la migration des larves dans la racine au cours de l'infection. Les enzymes de dégradation des parois sont synthétisées dans les glandes œsophagiennes et sécrétées par le stylet au cours de la migration dans les tissus de la plante (Vieira et al., 2011). Des nématodes dont l'expression de gènes codant des enzymes de dégradation de la cellulose, de l'hémicellulose ou de la pectine est inhibée par RNAi ont un pouvoir infectieux réduit (Rosso et al., 2009). Les enzymes de dégradation et de modification des parois tiennent donc un rôle primordial dans la migration du nématode dans la plante. Des expériences d'immunolocalisation *in planta* n'ont pas permis de révéler la sécrétion de cellulases et pectate lyases du nématode lors des phases d'induction et de maturation des cellules géantes. Il semblerait donc que ce soit les enzymes de la plante qui interviendraient dans l'élargissement des cellules géantes et l'épaississement de leur paroi (Caillaud et al., 2008a). D'autre part, des protéines portant un motif de

liaison à la cellulose sont produites et sécrétées dans les gonades de femelles de *M. incognita* et pourraient participer à la dissolution des tissus végétaux pour l'extrusion des œufs à la surface de la racine (Vieira et al., 2011).

Cette richesse en enzymes de dégradation et de modification des parois fait des nématodes une exception au sein des métazoaires. La similarité entre les gènes des nématodes à galles et ceux des bactéries ont rapidement suggéré que certains de ces gènes pourraient avoir été acquis par transfert horizontal à partir de bactéries (Davis et al., 2000; Jaubert et al., 2004). Récemment, une analyse détaillée des enzymes de dégradation et de modification de paroi de *M. incognita* a mis en évidence de multiples transferts latéraux de gènes au sein du phylum, liés probablement au fait que ces bactéries et les nématodes partagent les mêmes niches écologiques (Danchin and Rosso, 2012; Danchin et al., 2010).

Des protéases pourraient favoriser la migration en digérant des protéines de paroi ou participer à la pré-digestion des nutriments. Une protéine « aspartyl protease-like », Mi-ASP2, est abondamment sécrétée au cours de la migration. Sa sécrétion est plus faible une fois que le nématode est sédentaire (Vieira et al., 2011). Bien que son rôle ne soit pas encore connu, Mi-ASP2 constitue la première protéase sécrétée *in planta* identifiée. Le sécrétome de *M. incognita* présente plusieurs peptidases (metalloprotéases, aminoprotéases et aspartyl protéases) (Bellafiore et al., 2008; Huang et al., 2003). Nous pouvons aussi imaginer que des protéases sécrétées par le nématode pourraient également avoir un rôle dans la répression des défenses.

○ ***Effecteurs impliqués dans la modulation des défenses de la plante.***

De nombreux effecteurs d'agents pathogènes microbiens agissent sur la répression des défenses de la plante en ciblant divers mécanismes incluant la réponse hypersensible (nécrose localisée des tissus végétaux), la défense pariétale ou la signalisation hormonale (Abramovitch and Martin, 2004; Gohre and Robatzek, 2008). Les connaissances concernant les stratégies de modulation des défenses de la plante par les nématodes sont très parcellaires.

Une glutathion-S-transférase (Mi-GST) synthétisée dans les glandes œsophagiennes des larves infestantes préparasitaires J2 de *M. incognita* est présente dans les sécrétions du stylet des larves infestantes et son gène est fortement induit dans les stades parasitaires (Bellafiore et al., 2008; Dubreuil et al., 2007; Jaubert et al., 2002a). La répression de *Mi-GST* par RNAi sur des J2 infestantes préparasitaires entraîne une diminution du pouvoir infectieux de ces larves. Mi-GST participerait donc au succès du parasitisme. Elle pourrait intervenir soit dans la dégradation des hydroperoxydes produits par la plante soit dans la modulation des défenses de la plante.

Des chorismates mutases synthétisées dans les glandes œsophagiennes ont aussi été identifiées (Doyle and Lambert, 2003; Huang et al., 2005b). La sécrétion d'une chorismate mutase *in planta* a été démontrée au cours de la migration dans la racine de larves de *M. javanica* (Doyle and Lambert,

2003). Injectées dans le cytoplasme des cellules végétales, ces chorismates mutases pourraient être impliquées dans une diminution du chorismate disponible dans les plastides et ainsi réduire la synthèse d'auxine, de flavonoïdes, d'acide salicylique ou de phytoalexines ayant en conséquence un rôle important dans la suppression des défenses de la plante.

Une calréticuline, Mi-CRT, sécrétée par les nématodes sédentarisés dans la racine, s'accumule dans l'apoplasme au niveau des cellules géantes (Jaouannet et al., 2013; Jaubert et al., 2005). Son inactivation affecte la capacité d'infection des nématodes et sa surexpression supprime l'induction de marqueurs de défense et de déposition de callose suite à un traitement par un PAMP (« Pathogen-Associated Molecular Patterns »). La Mi-CRT joue donc un rôle important dans le succès du parasitisme en supprimant les défenses basales de la plante lors de l'infection (Jaouannet et al., 2013). Une des actions envisagées de Mi-CRT serait de « chélater » le calcium dans l'apoplasme et ainsi diminuer l'influx de calcium associé à l'activation de la PTI (« PAMP -Triggered Immunity » : première barrière de défense induite suite à la perception des PAMPs. Mi-CRT pourrait également agir en tant que molécule « chaperonne » d'autres sécrétions du nématode. Enfin, il est possible que Mi-CRT interagisse avec des récepteurs membranaires des cellules végétales, comme cela a été montré dans des modèles animaux. Mi-CRT est pour l'instant le seul effecteur de *M. incognita* connu ayant la capacité de supprimer la PTI.

Enfin, une protéine FAR (fatty acid and retinol binding protein) exprimée dans les glandes sub-ventrales de larves infestantes de *M. incognita* a été identifiée (Bellafiore et al., 2008). Un rôle dans la répression des défenses est évoqué car cette FAR a la capacité de se lier aux acides gras et précurseurs du rétinol du métabolisme de composés de défense.

○ ***Effecteurs impliqués dans la formation et le maintien des cellules géantes.***

Une glycoprotéine, 6D4, a été identifiée comme exprimée dans les glandes subventrales et dorsale de larves infestantes J2 ainsi que dans la glande dorsale et les sécrétions du stylet des stades sédentaires établis au niveau du site nourricier (Davis et al., 1994). *In planta*, la protéine 6D4 est abondamment sécrétée au moment de l'initiation du site nourricier et accumulée au niveau de la paroi des cellules géantes (Vieira et al., 2012). Cette protéine n'est pas sécrétée au cours de la migration, ce qui suggère qu'elle pourrait être impliquée dans la formation et la maintenance des cellules géantes. Cependant, on ne connaît pas encore la séquence peptidique de cette protéine ni sa fonction dans l'interaction.

Récemment, un autre effecteur identifié présente une interaction avec une protéine végétale. L'effecteur Mi8D05 sécrété par les glandes oesophagiennes a été montré comme essentiel au parasitisme (Xue et al., 2013). En effet, des expériences d'ARNi dirigés contre Mi8D05 montrent une réduction de 90% de l'infection par le nématode. Cet effecteur interagit avec une aquaporine végétale du tonoplaste (TIP2) suggérant un rôle dans le transport de l'eau et la régulation de solutés dans les cellules géantes, favorisant l'élargissement des cellules géantes et la nutrition du nématode.

Un peptide 16D10 ne présentant aucune homologie dans les bases de données, a été identifié comme étant exprimé dans les glandes subventrales des larves infestantes J2 et des larves parasitaires (Huang et al., 2006). La surexpression de ce peptide en plante stimule la croissance racinaire. Ce peptide interagit directement avec deux facteurs de transcription de type SCARECROW de la plante. Le rôle et le mode d'action du peptide 16D10 reste inconnus. Ces travaux constituent la première identification d'une cible végétale pour un effecteur de nématode à galles et surtout la mise en évidence que des sécrétions du nématode pourraient agir dans le noyau des cellules géantes.

D'après les prédictions *in silico*, certains effecteurs candidats de nématodes à galles présentent un site d'adressage au noyau (NLS, nuclear localization signal) (Bellafiore et al., 2008; Huang et al., 2003; Jaouannet et al., 2012; Roze et al., 2008). Une récente étude a démontré qu'un nouvel effecteur, Mi-EFF1 est spécifiquement exprimé dans les glandes oesophagiennes de larves en interaction : il est sécrété lors de la phase sédentaire, spécifiquement dans les cellules géantes (Jaouannet et al., 2012). Mi-EFF1 est le premier effecteur de *M. incognita* observé comme étant sécrété *in planta*, lors de l'interaction, se localisant dans les noyaux des cellules géantes (Figure 7C-D). Mi-EFF1 est un gène pionnier, de fonction encore inconnue, sans aucun domaine fonctionnel connu. Il est ainsi difficile de prédire sa fonction moléculaire au sein des noyaux végétaux. Très récemment, un nouvel effecteur nucléaire a été identifié chez *M. javanica* (Lin et al., 2013). L'immunolocalisation de MjNULG1 révèle sa sécrétion dans le noyau des cellules végétales. Le gène *MjNULG1* est aussi un gène pionnier, sans aucune homologie avec des séquences/domaines connus. Des expériences de RNAi et de surexpression révèlent son rôle important dans le succès du parasitisme. La recherche de cibles végétales de ces effecteurs pourrait permettre d'identifier leurs fonctions et de comprendre comment le nématode manipule les mécanismes végétaux.

Le nombre de protéines sécrétées par les nématodes à galles ainsi que les fonctions prédites de ces sécrétions salivaires indiquent que plusieurs processus clés sont utilisés par le nématode pour manipuler avec succès les réponses de la plante. Parmi eux, les effecteurs pionniers sont peut être la clé de la compréhension du succès parasitaire de *M. incognita* et de sa particularité d'induire la formation de cellule géantes et de maintenir une interaction durable pendant plusieurs semaines. Les nématodes sont capable d'infecter une grande diversité d'espèces végétales, suggérant qu'ils peuvent interférer avec des mécanismes fondamentaux du développement et de la différenciation cellulaire conservés chez l'ensemble des végétaux.

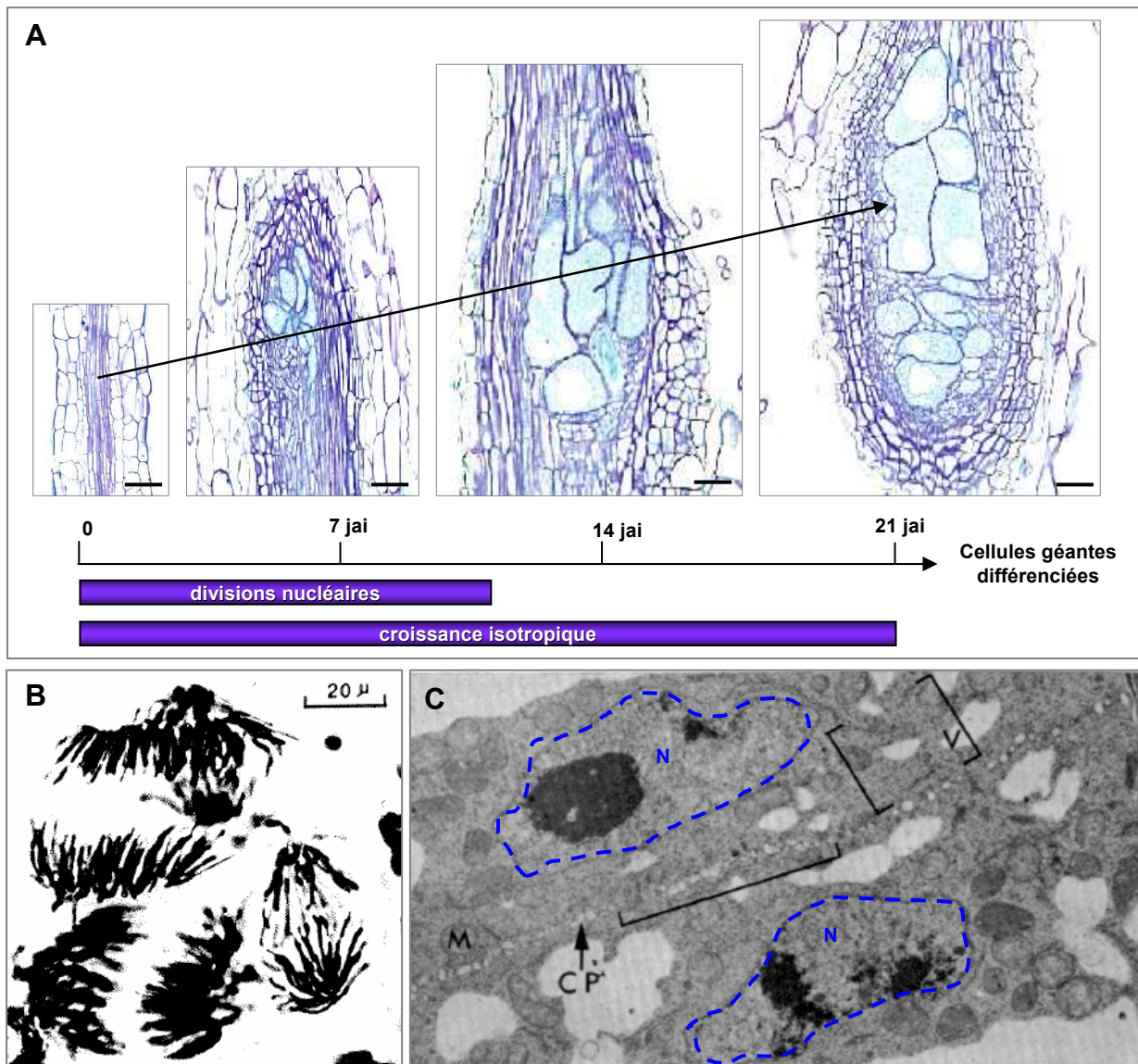


Figure 8: Ontogénèse des cellules géantes.

A: Formation des cellules géantes chez *Arabidopsis*. Coupes longitudinales de racines non infectées et galles 7, 14 et 21 jours après infection (jai) par *M. incognita*. D'après Jammes *et al.* (2005). Barres = 100.

B: Cellules géantes présentant des divisions nucléaires synchrones (en anaphase) dans une racine de *Vicia faba* infectée par *M. javanica*. L'ADN est coloré au Feulgen. D'après Huang (1985).

C: Jeunes cellules géantes en fin de mitose, induites par *M. javanica* chez *Impatiens balsamina*. Noter la présence de vésicules (V) initiant la plaque cellulaire (CP) entre deux noyaux fils (N, en bleu) M: mitochondrie. Cliché de microscopie électronique à transmission d'après Jones et Payne (1978).

II. Le site nourricier.

A *Les caractéristiques structurales et fonctionnelles des cellules géantes.*

Les cellules géantes résultent d'un processus de redifférenciation cellulaire où des divisions nucléaires synchrones répétées de cellules du cylindre central proches du protoxylème se produisent sans division cellulaire (Huang, 1985; Jones and Payne, 1978). Ces cellules peuvent contenir, selon les espèces végétales, jusqu'à 150 noyaux (Figure 5B). Cette augmentation du nombre de noyaux survient principalement durant les sept premiers jours après l'infection (Starr, 1993). Lors du développement ultérieur des cellules géantes (à partir de 14 jours après infection), la quantité d'ADN peut encore augmenter, ce qui suggère que les noyaux subissent également une endoreduplication (de Almeida Engler and Gheysen, 2013; Gheysen et al., 1997; Wiggers et al., 1990). Les noyaux présentent alors une quantité d'ADN de 14 à 16 fois supérieure aux noyaux des cellules méristématiques de racines non infectées. Les cellules géantes matures atteignent par croissance isotropique, 21 jours après infection, une taille 400 fois supérieure à celle des cellules initiales (Figure 8A).

Métaboliquement très actives, elles présentent un accroissement de la taille des noyaux et des nucléoles et un cytoplasme dense riche en organites cellulaires (mitochondries, plastes). Le système de Golgi et du réticulum est très développé. La vacuole centrale est remplacée par de nombreuses petites vacuoles secondaires. Des invaginations de la paroi et du plasmalemme sont observées au niveau des tissus conducteurs du xylème. Ces modifications, caractéristiques des cellules de transfert, augmentent la surface d'échange entre l'apoplasme et le symplasme facilitant ainsi l'importation d'eau et de minéraux (Jones, 1981). Des apports spécifiques du phloème ont été montrés grâce à l'utilisation d'un colorant fluorescent, la carboxyfluoresceine (Dorhout et al., 1993). Ces cellules nourricières, isolées symplastiquement des cellules adjacentes, constituent des puits métaboliques pour les assimilats qui sont ensuite absorbés par le nématode (Hoth et al., 2008). L'augmentation de la capacité de synthèse et de transfert des cellules géantes va permettre de subvenir aux besoins nutritionnels du nématode. C'est donc grâce à ces structures que les nématodes se nourrissent et réalisent leur cycle de développement. Cependant les connaissances sur le déterminisme moléculaire de l'induction et du maintien des cellules géantes restent très fragmentaires.

o *L'ontogénèse des cellules géantes: reprise de l'activité mitotique.*

Lors des étapes précoces de la formation du site nourricier de *M. hapla* chez l'hôte *Impatiens balsamina*, des divisions nucléaires sont détectées dans les cellules du parenchyme en contact avec la tête du nématode (Huang, 1985). Ces divisions nucléaires sont considérées comme le premier signe détectable de l'initiation des cellules géantes. La première étape de formation d'une cellule géante est

une karyokinèse sans cytokinèse résultant en une binucléation de la cellule (Jones and Payne, 1978). Les cinq à sept jeunes cellules géantes binucléées subissent de nouveaux événements de **divisions nucléaires synchrones sans division cellulaire**. Ainsi, 48 heures après l'infection par les nématodes, les cellules géantes en formation présentent quatre à huit noyaux. Une augmentation du nombre de noyaux par des divisions synchrones est observée durant les sept premiers jours après l'infection (Huang, 1985; Starr, 1993) (Figure 8B). Malgré la présence dans la cellule géante de fuseaux mitotiques, aucune bande préprophasique n'a pu être observée (de Almeida Engler et al., 2004). L'observation en microscopie électronique de jeunes cellules géantes en mitose a permis de montrer la présence de **vésicules initiant la plaque cellulaire** entre deux noyaux fils (Jones and Payne, 1978) (Figure 8C). Une étude récente a permis de montrer qu'une « mini plaque cellulaire » se formait entre les noyaux fils mais que la croissance de cette plaque cellulaire serait très vite bloquée ne permettant pas une cytokinèse complète (Caillaud et al., 2008b). L'initiation de la cytokinèse permettrait donc de créer une barrière physique entre les deux noyaux fils permettant ainsi d'enchaîner les mitoses suivantes et ainsi former la cellule géante polynucléée (Caillaud et al., 2008b). Aucune activité mitotique n'est ensuite observée au sein des cellules géantes matures, lorsque le nématode est adulte.

B *L'étude moléculaire de la réponse de la plante à l'infection.*

L'étude de l'interaction plante-nématode a beaucoup progressé au cours des dernières années, passant d'une démarche essentiellement descriptive à une approche plus analytique. L'utilisation d'*A. thaliana* comme modèle d'étude, le développement des techniques d'analyses de transcriptomiques différentielles et d'analyses fonctionnelles, permettent à présent d'étudier la formation des cellules géantes lors du dialogue moléculaire entre le parasite et la plante hôte. La particularité d'induire la différenciation de cellules racinaires en cellules géantes est un modèle particulièrement intéressant pour aborder des aspects fondamentaux de la différenciation et du contrôle de la division cellulaire chez les végétaux.

a *La dérégulation des grandes fonctions végétales dans les cellules géantes.*

La plupart des données moléculaires concernant la formation du site nourricier proviennent de différentes méthodologies : construction de banques d'ADNc construites à partir de cellules géantes individualisées (Fosu-Nyarko et al., 2009; Wilson et al., 1994), stratégies de piégeage de promoteurs (Barthels et al., 1997; Favery et al., 2004), hybridation *in situ* (de Almeida Engler et al., 1999; Gal et al., 2006; Lohar et al., 2004), immunocytochimie et analyse fonctionnelle (de Almeida Engler et al., 2004; Banora et al., 2011; Caillaud et al., 2008b; Clément et al., 2009; Favery et al., 2004). Le

développement de microarrays, ou puces à ADN, a rendu possible des analyses à grande échelle de l'expression des gènes de la plante *A. thaliana* au cours de l'interaction avec le nématode (Fuller et al., 2007; Hammes et al., 2005; Jammes et al., 2005; Bar-Or et al., 2005). Dans une approche ciblée basée sur la dissection des tissus infectés, les galles racinaires, un grand nombre de nouveaux gènes régulés en réponse à l'infection par le nématode à galles ont été identifiés. Un total de 3373 gènes sur 22000 gènes observés d'*A. thaliana* a ainsi été montré comme différentiellement exprimés entre les galles 7, 14 et 21 jours après infection par *M. incognita* et les racines non infectées (Jammes et al., 2005). Cette analyse globale a permis d'obtenir un panorama des processus biologiques activés ou réprimés lors de la formation des galles. Ces analyses différentielles ont été aussi réalisées chez d'autres plantes hôtes lors d'une interaction avec les nématodes à galles, telles que la tomate *Solanum lycopersicum* (Bhattarai et al., 2008), le soja *Glycine max* (Ibrahim et al., 2011), le riz *Oryza sativa* (Kyndt et al., 2012) et la luzerne *Medicago truncatula* (Damiani et al., 2012). Deux récentes analyses, basées sur la microdissection des cellules géantes au laser d'*A. thaliana* et de la luzerne ont permis de différencier les processus biologiques impliqués dans la formation des cellules géantes spécifiquement (Barcala et al., 2010; Damiani et al., 2012).

Ces différentes études, associées à des analyses fonctionnelles dans certains cas, ont permis de montrer que les gènes de la plante dérégulés lors de l'interaction avec le nématode peuvent être classés en grandes familles fonctionnelles, comme les gènes impliqués dans le transport (aquaporines; Hammes et al., 2005), du métabolisme (ribulose phosphate épimérase, DAP décarboxylase, γ -glutamylcystéine synthetase; Baldacci-Cresp et al., 2012; Favery et al., 1998; Vercauteren et al., 2001), de modifications de la paroi cellulaire (expansines, pectinacétyl estérases; Gal et al., 2006), de la maintenance de l'ADN (maintenance de la structure de la chromatine comme les histones H3 et H4), dans les voies de défense (chalcone synthase, peroxydase) mais également gènes dérégulés par l'auxine et les cytokinines (Hutangura et al.; Lohar et al., 2004; Vercauteren et al., 2001; Wuyts et al., 2006), du cycle cellulaire et de l'organisation du cytosquelette (cyclines, protéines kinases cycline-dépendantes, formines, actine et tubuline; Banora et al., 2011; Caillaud et al., 2008b; Clément et al., 2009; Favery et al., 2004; Niebel et al., 1996).

L'analyse transcriptomique différentielle entre les cellules géantes vs cellules vasculaires de la racine, a montré que 3 jours après inoculation, la majeure partie des gènes sont réprimés dans la plupart des grandes familles fonctionnelles (Barcala et al., 2010). Seules les catégories impliquées dans la maintenance de l'ADN (histones) et de la cellule (associés au cytosquelette et MAP : « Microtubule Associated Protein ») présentent une plus grande proportion de gènes surexprimés. Alors que certains gènes présentent le même type de profil d'expression dans les cellules géantes et les galles, la plupart sont régulés différemment, confirmant la différence entre ces deux types de tissus. La plupart des gènes régulés différemment entre cellules géantes et cellules avoisinantes ne présentent pas de fonction connue. La comparaison de ces données avec d'autres analyses transcriptomiques

montrent que les cellules géantes en formation présentent un profil d'expression de gènes se rapprochant de celui de suspensions de cellules se différenciant avec des cellules de xylème. Ce résultat suggère un lien entre cellules géantes et cellules vasculaires en cours de développement (Barcala et al., 2010).

○ ***Répression des voies de défense dans les cellules géantes.***

Un pic d'expression des gènes de défense *PR-1*, *PR-2*, *PR-3* et *PR-5* a été observé dans les racines d'*A. thaliana* 7 à 9 jours après infestation (Hamamouch et al., 2011). *PR-1*, *PR-2* et *PR-5* sont liés à la voie de l'acide salicylique et *PR-3* à la voie de l'acide jasmonique (van Loon et al., 2006). Cependant ces défenses sont modulées au cours de l'interaction. Les données de puces à ADN ont montré que la majorité des gènes des familles fonctionnelles « Métabolisme secondaire » et « Stress » sont réprimés dans les cellules géantes. Ainsi le succès du parasitisme est associé à la suppression de défenses de l'hôte, 70% des gènes impliqués dans les mécanismes de défense sont réprimés chez *A. thaliana*. Les puces à ADN réalisées par microdissection ont mis en évidence que les gènes de défenses directement ou indirectement régulés par la voie de l'acide jasmonique ou de l'acide salicylique, ne montrent aucune induction dans les cellules géantes 3 jours après infection (Barcala et al., 2010). *CYP81F2* est réprimé dans les galles 14 et 21 jours après infestation (Jammes et al., 2005; Barcala et al., 2010). La plupart des membres de familles de facteurs de transcription comme *WRKY*, *MYB*, *AP2/EREBP* et *bZIP* qui sont généralement induits lors de stress biotiques ou abiotiques (Eulgem, 2005) sont réprimés spécifiquement dans les cellules géantes mais pas dans les galles (Grunewald et al., 2008). La plupart des gènes impliqués dans la voie des phénylpropanoïdes (comme *PAL1/2*, *4CL3* et *CAD*), typiquement associés aux mécanismes de défense suite à une attaque pathogène (Dixon et al., 2002) sont réprimés dans les cellules géantes. Ces résultats mettent en évidence l'induction précoce de défenses de la plante en réponse à l'infection par *M. incognita* et qui sont réprimées par le parasite spécifiquement dans les cellules géantes permettant ainsi le succès de l'infection.

○ ***Modulation des voies des phytohormones dans les cellules géantes.***

La formation des cellules géantes s'accompagne de modifications du transport de phytohormones, de leur concentration et/ou de leur voie de signalisation. Différentes approches expérimentales ont montré que la formation des cellules géantes s'accompagne d'une augmentation de taux d'auxine (Wang et al., 2007). Au cours de la formation de la cellule géante, il y a induction d'un gène codant pour un transporteur d'influx d'auxine (Mazarei et al., 2003). Peu de gènes impliqués dans la voie de signalisation de l'éthylène sont activés lors de l'infection, et les gènes impliqués dans sa voie de biosynthèse sont réprimés dans les cellules géantes. L'éthylène n'est pas détecté dans les galles (Giazar et al., 1983) ce qui est en corrélation avec une étude récente montrant que les nématodes seraient plus attirés par les plantes produisant peu d'éthylène (Fudali et al., 2013). A l'heure actuelle,

les effecteurs et les mécanismes induisant ces changements hormonaux restent inconnus. Concernant la dérégulation d'autres phytohormones nous n'avons également que peu d'informations. Les cytokinines, hormones activant la division cellulaire, seraient impliquées dans la formation des cellules géantes puisqu'une augmentation du niveau des cytokinines a été observée dans les jeunes galles et une diminution du nombre de galles a été notée sur les plantes sur-exprimant une cytokinine oxydase (Lohar et al., 2004).

b Le cytosquelette et le cycle cellulaire dans les cellules géantes.

o Reprise du cycle cellulaire dans les cellules géantes.

Deux des événements les plus précoces lors du développement des cellules géantes est l'augmentation du nombre de noyaux et l'activation de plusieurs gènes du cycle cellulaire (de Almeida Engler and Gheysen, 2013; Gheysen and Fenoll, 2002; Goverse et al., 2000). L'analyse des profils d'expression spatio-temporel de gènes pouvant être impliqués dans la formation des cellules géantes, déjà caractérisés dans des processus cellulaires, a permis de mettre en évidence une réactivation du cycle cellulaire induite par le nématode. En effet, certains marqueurs de l'entrée en mitose, c'est-à-dire la transition G2/M, tels que des cyclines mitotiques sont activés au cours des stades précoces de la formation des cellules géantes (de Almeida Engler et al., 1999). Les gènes codant pour les cyclines spécifiques des phases G1 (croissance, préparation de la réplication) et S (réplication de l'ADN) tels que *CYCA1-1*, *CYCA 3-2* et *CYCD3-3* sont induits dès le 3^{ème} jour après inoculation (Barcala et al., 2010). Ces résultats indiquent que les cellules ne sont plus en phase G0 (hors du cycle cellulaire) comme le montre l'induction du gène *E2Fb*, responsable des transitions de phase G1-S et G2-M (Magyar et al., 2005). Les facteurs E2F prépare les cellules à la réplication de l'ADN en induisant la transcription de gènes codant pour les composants du complexe de pré-réplication, comme les facteurs MCMs (« MiniChromosome Maintenance »). *PROLIFERA*, un gène de la famille des MCM est aussi induit lors de l'induction des cellules géantes, comme certains autres gènes de la phase S codant pour des hélicases et des histones. Les gènes codant pour les histones H3 et H4, associés à la prolifération en suspension cellulaire (Menges and Murray, 2002) ou la réplication, sont aussi induits tout comme les transcrits de H2A comme *HTA11* (Yi et al., 2006). D'autres marqueurs de la transition G2/M, tels que les gènes de deux kinases Cycline-Dépendante (*CDKA-1* et *CDKB1-1*) et deux cyclines mitotiques (*CYCA2-1* et *CYCB1-1*) sont exprimés dès l'induction de la formation des cellules géantes (de Almeida Engler et al., 1999; Van de Cappelle et al., 2008; Niebel et al., 1996). Ces différents résultats montrent que l'activation des gènes du cycle cellulaire de l'hôte est une étape clef dans l'établissement des sites nourriciers. De plus, des expériences de traitement de racines infectées avec des inhibiteurs chimiques spécifiques des phases S

et M (l'hydroxyurée et l'oryzaline, respectivement) entraînent une perturbation lors de l'ontogénèse des sites nourriciers et une altération du développement des nématodes (de Almeida Engler et al., 1999). L'expression des gènes du cycle cellulaire diminue 14 jours après infection, dans les galles matures, montrant un contrôle strict de la machinerie du cycle cellulaire de l'hôte.

Bien que les études transcriptomiques montrent une induction de plusieurs gènes impliqués dans la régulation et la division cellulaire, et que cette activation des mécanismes du cycle cellulaire de l'hôte soit essentielle à l'ontogénèse des cellules géantes, très peu d'analyses fonctionnelles ont été réalisées. En effet, l'étude de gènes associés à des mécanismes aussi ubiquitaires et essentiels, avec des phénotypes d'inactivation souvent létaux, est difficile et nécessite souvent l'utilisation de lignées comportant des promoteurs inductibles. En 2008, Van de Cappelle *et al.* ont inactivé le gène de la kinase Cycline-Dependante, *AtCDKA-1*, par stratégie d'ARN interférence induit précocement dans les galles. Ils ont montré que l'inactivation d'*AtCDKA-1* interfère avec l'ontogénèse des sites nourriciers résultant sur un développement et une reproduction altérée des nématodes.

Une des conséquences proposées de la polynucléisation des cellules géantes seraient l'augmentation de la taille de ces cellules ainsi que leurs hyperactivité métaboliques, source principale de nutriments du nématode (pour revue, de Almeida Engler and Gheysen, 2013). Mais ces multiples cycles cellulaires sont coûteux en temps et en énergie, et après 14 jai, les divisions cellulaires cessent laissant place à l'endoréduplication. L'endoréduplication et la polyploïdisation sont deux formes de cycles cellulaires incomplets résultant en une augmentation d'ADN par noyau mais se différencient par leurs mécanismes. La polyploïdisation résulte d'un blocage au cours de la mitose : les chromatides se séparent mais ne ségrègent pas. Il en résulte des noyaux présentant un grand nombre de chromosomes. L'endoréduplication (ou endocycle) résulte d'un blocage du cycle juste après la phase S, les chromatides ne se séparent pas, générant des chromocentres élargis. L'hypothèse selon laquelle les cellules géantes subissent de l'endoréduplication avait déjà été avancée (de Almeida Engler et al., 1999) mais ce n'est que récemment qu'une étude fonctionnelle s'intéresse aux gènes impliqués (de Almeida Engler et al., 2012). Le processus d'endoréduplication requiert la surexpression des gènes E2Fa et Dpa qui induisent des gènes clés de la phase S tels que *ORC*, *CDC6*, *CDT1* et *MCM* (Kondorosi and Kondorosi, 2004), gènes retrouvés exprimés dans les galles (de Almeida Engler and Gheysen, 2013). Le passage du cycle mitotique au cycle d'endoréduplication est contrôlé par *CCS52A*, dont le gène a été retrouvé induit dans les galles (de Almeida Engler et al., 2012; Favery et al., 2002). Une récente étude montre que l'inactivation et la surexpression des gènes *CCS52A* et *DELI* (un répresseur de l'endocycle) respectivement affecte radicalement la croissance des cellules géantes et altère le développement des nématodes (de Almeida Engler et al., 2012; Vieira et al., 2013). Ainsi, la reprise du cycle cellulaire et la succession de divisions nucléaires sans cytokinèse permettent la polynucléisation et l'élargissement, essentielle à la formation des cellules géantes dans un premier temps. Lorsque l'activité mitotique cesse à 14 jai, les cellules géantes continuent leurs maturations

avec le processus d'endoréduplication permettant l'expansion du site nourricier et son hyperactivité métabolique.

○ ***Le cytosquelette, un marqueur de la reprise du cycle cellulaire dans les cellules géantes.***

L'étude de l'organisation du cytosquelette à l'intérieur des cellules géantes a été réalisée en couplant des analyses de profil d'expression de gènes, de localisation des protéines au sein des cellules géantes ainsi que par des approches pharmacologiques. Elle a permis de démontrer un rôle majeur des constituants du cytosquelette: actine et tubuline. Ce rôle important du cytosquelette n'est cependant pas limité à l'interaction plantes-nématodes. En effet, plusieurs études ont ainsi montré que l'organisation du cytosquelette est fortement perturbée lors des premières étapes de l'interaction entre la cellule végétale et d'autres microorganismes pathogènes ou symbiotiques incluant les champignons, les oomycètes, les bactéries et les virus (Hardham, 2013).

De Almeida Engler *et al.* (2004) ont analysé l'activité des promoteurs des gènes codant les actines ACT2 et ACT7 par des fusions au gène *GUS* et l'expression des gènes codant les α -, β -, γ -tubulines par hybridation *in situ*. Des molécules inhibitrices du cytosquelette telle que l'oryzaline (qui déstabilise les microtubules) ont été testées lors de l'interaction. Ainsi, de Almeida Engler *et al.* (1999) ont observé qu'une simple exposition à cet agent trois jours après inoculation réduisait le nombre de noyaux par cellules géantes et inhibait le développement du nématode. De plus, Wiggers *et al.* (2002) ont quantifié l'effet de la dépolymérisation des microtubules (MT) par application de colchicine dans les cellules géantes et l'effet de cette drogue sur le développement du nématode. Cette étude démontre qu'un nombre minimum de noyaux par cellule géante est nécessaire pour le développement complet du nématode et le maintien du site nourricier.

Le gène *AtFH6* qui code une protéine FH (« Formin Homology ») ou formine, impliquée dans l'organisation du cytosquelette d'actine a été identifié comme étant activé de façon précoce dans les cellules géantes (Favery *et al.*, 2004). L'expression du gène *AtFH6* est activée uniquement durant la formation des cellules géantes. Au cours du développement de la plante l'expression de ce gène n'est observée que dans la zone de différenciation des tissus vasculaires des racines principales et secondaires. De plus, la localisation membranaire uniforme de la protéine observée dans les cellules géantes indique qu'*AtFH6* pourrait réguler la croissance isotropique des cellules géantes *via* la réorganisation du cytosquelette d'actine. Les câbles d'actine guideraient le trafic des vésicules nécessaires à la formation de la membrane et de la paroi des cellules géantes en formation (Favery *et al.*, 2004). L'absence de phénotype mutant lors de l'inactivation du gène *AtFH6*, semble expliquée par une redondance fonctionnelle. En effet, l'analyse de l'expression des 21 gènes *AtFH* identifiés chez *A. thaliana* a montré que l'expression de deux autres gènes codant des formines, *AtFH1* et *AtFH10*,

étaient également induite lors de la formation des cellules géantes, suggérant un rôle des formines dans la participation au processus de formation du site nourricier.

En réponse à de multiples activités cellulaires, le cytosquelette d'actine est dynamiquement réorganisé et remodelé par une grande variété de protéines, appelées « Actin Binding Proteins ». La famille des facteurs dépolymérisants l'actine ou ADF (Actin-Depolymerizing Factor) ou la famille des cofilines sont des régulateurs clés du renouvellement des filaments d'actine (Maciver and Hussey, 2002). Parmi les 11 gènes de la famille *ADF*, *ADF2* est surexprimé dans les cellules géantes de 14 à 21 jai, soit au cours de la maturation et de la croissance isotropique des cellules géantes (Clément et al., 2009). Son inactivation a permis de démontrer l'importance de cette protéine au cours du développement de la plante mais aussi lors de l'interaction : en effet, un niveau réduit d'*ADF2* affecte le remodelage de l'actine et bloque la maturation du site nourricier, affectant donc le développement et la reproduction des nématodes. La surexpression d'*ADF2* serait donc un composant essentiel pour les mécanismes cellulaires de formation et de maturation des cellules géantes conduisant au succès de l'infection par les nématodes (Clément et al., 2009).

Récemment une étude fonctionnelle démontre l'importance de la réorganisation du cytosquelette de microtubules (MT) au sein des cellules géantes. Ce travail s'intéresse au complexe « γ -Tubulin ring complex » ou γ -TuRC (Banora et al., 2011). Le γ -TuRC est composé de 6 protéines, les « γ -tubuline complex proteins » ou GCPs. La GCP1 est la γ -tubuline elle-même (codée par deux gènes chez *Arabidopsis* *TUBG1* et *TUBG2*), elle est localisée au niveau des sites de nucléations des MT lors de l'interphase et de la mitose et semblerait jouer un rôle de centre organisateur de microtubules (MTOCs) chez les plantes (Binarová et al., 2006; Pastuglia et al., 2006). Les GCP2 à 6 permettraient l'interaction entre 13 molécules de γ -tubuline et l'extrémité (-) des MT (Seltzer et al., 2007). La γ -tubuline au niveau des réseaux de MT corticaux et mitotiques dans les cellules géantes. Les gènes *TUBG1*, *TUBG2*, *GCP3* et *GCP4* sont surexprimés dans les sites nourriciers. Leur inactivation conduit à une altération de la formation des cellules géantes aboutissant un échec du développement des nématodes. Le γ -TuRC est donc essentiel pour le contrôle et la réorganisation des MT lors de l'initiation et du développement des cellules géantes, réorganisation nécessaire au succès du parasitisme.

Relativement peu d'analyses fonctionnelles ont permis de confirmer l'expression, la localisation et le rôle de protéines associées au cytosquelette dans les galle et dans les cellules géantes *sensus stricto*. Mais l'utilisation de molécules inhibitrices du cytosquelette, de marqueurs fluorescents se liant au cytosquelette, ainsi que les quelques caractérisations fonctionnelles de protéines régulatrices et organisatrices des cytosquelettes d'actine et de MT ont permis de démontrer le rôle essentiel du cytosquelette lors de l'ontogénèse des cellules géantes (de Almeida Engler et al., 2004). Ainsi, parmi les 80 gènes de plantes les mieux caractérisés au cours de l'interaction plante-nématode, l'étude de mutants « Knock-out » (KO) ou de lignées surexprimant des gènes d'intérêt a permis de mettre en

évidence un phénotype mutant en réponse à l'infection pour une quinzaine de gènes. Les deux premiers gènes indispensables au développement du nématode : le gène *RPE* et le gène *MAP65-3*, ont été identifiés par la stratégie de piégeage de promoteur (Caillaud et al., 2008b; Favery et al., 1998).

c *Le piégeage de promoteurs : une approche développée au laboratoire.*

Cette stratégie permet d'identifier des gènes sur la base de leur profil d'expression et de pouvoir ensuite analyser l'effet de leur inactivation sur le développement de la plante ou ici, sur le développement des nématodes. Cette approche est basée sur l'insertion, au hasard dans le génome d'*A. thaliana*, d'un gène rapporteur sans promoteur, tel le gène *GUS*. L'insertion du gène rapporteur peut se faire *via* deux types d'éléments utilisés pour la mutagenèse insertionnelle : les éléments transposables et l'ADN-T (pour ADN transféré). A l'heure actuelle, la majorité des collections de mutants d'*A. thaliana* ont été générées à partir de vecteurs ADN-T. Lors de son intégration dans le génome, le gène rapporteur, s'il possède son propre codon d'initiation, est capable de produire deux types de fusions de gènes *in vivo*. Lorsque la construction s'insère dans un promoteur ou dans la partie 5' non traduite d'un gène, le promoteur endogène peut induire la transcription du gène rapporteur (fusion transcriptionnelle). Une fusion traductionnelle (le gène rapporteur est placé en phase avec la séquence codante du gène interrompu) peut conduire à une protéine chimérique constituée d'un fragment de la protéine d'intérêt et de la protéine du gène rapporteur. Dans ces deux types de fusions, l'expression du gène rapporteur est le reflet de l'expression du gène interrompu. De plus, l'insertion du fragment d'ADN-T à l'intérieur du gène peut conduire à son inactivation. La séquence de l'ADN-T étant connue, il est par la suite relativement aisé d'identifier le gène étiqueté.

Le criblage de 20 000 lignées d'insertion d'ADN-T de la collection générée à l'INRA de Versailles (Bouchez et al., 1993) a permis d'identifier environ 200 lignées qui présentent une expression du gène *GUS* au niveau des galles induites par *M. incognita* (Favery et al., 2004). L'analyse génétique et moléculaire de ces lignées a permis de caractériser deux gènes de la plante, le gène *RPE* et le gène *MAP65-3*, exprimés dans les cellules géantes et essentiels à la formation des cellules géantes et donc au développement du nématode (Caillaud et al., 2008b; Favery et al., 1998).

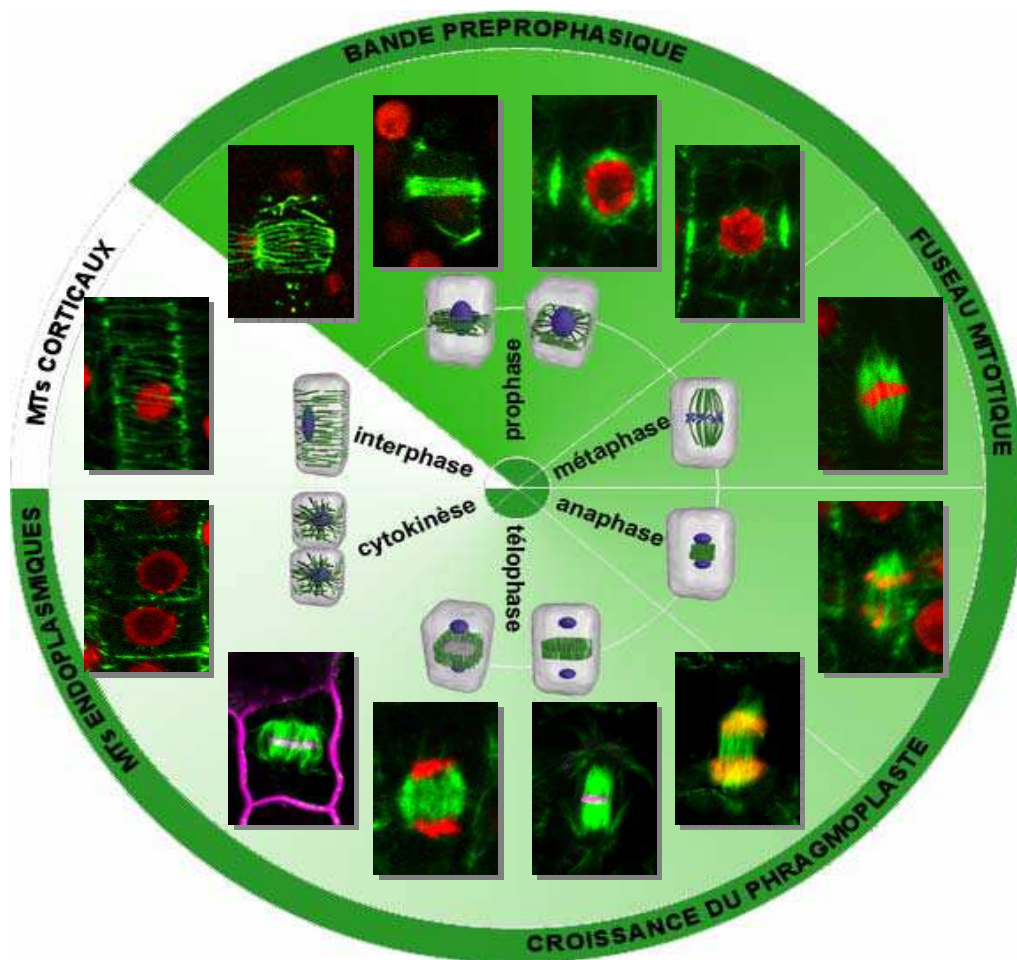


Figure 9: Organisation du cytosquelette de microtubules au cours du cycle cellulaire de la cellule végétale.

Les différents réseaux de microtubules (cercle extérieur) et les étapes du cycle cellulaire (intérieur du cercle) sont indiqués. Les photos ont été obtenues par observation au microscope confocal d'apex racinaire d'*Arabidopsis* exprimant les constructions MBD-GFP (marquage des microtubules; en vert) et H2B:YFP (marquage de l'ADN; en rouge) après coloration au FM4-64 (marquage de la plaque cellulaire; en rose). D'après Caillaud (2009). Les pictogrammes représentant les réseaux de microtubules au cours du cycle cellulaire sont issus de Wasteneys (2002).

Chapitre 2. MAP65-3, UNE PROTEINE ESSENTIELLE A LA FORMATION DES CELLULES GEANTES.

Dans cette partie, je présenterai les travaux réalisés par mon laboratoire sur la protéine MAP65-3, protéine mise en évidence pour son rôle essentiel dans la formation des cellules géantes et pour le développement du nématode. Je ferai d'abord un point sur les données moléculaires et cellulaires relatives au cytosquelette de la cellule végétale au cours du cycle cellulaire, données importantes pour comprendre le rôle essentiel de MAP65-3 au cours de la mitose. Je détaillerai ensuite l'étude fonctionnelle réalisée sur MAP65-3 tant au niveau développemental pour son implication dans l'organisation des réseaux de MT au cours de la mitose, que lors de l'interaction avec le nématode.

I. L'organisation du cytosquelette de microtubules au cours du cycle cellulaire de la cellule végétale.

Les MT jouent un rôle prépondérant dans l'architecture de la cellule végétale somatique en interphase, mais également au cours de la mitose, formant des structures particulières telles que la bande préprophasique, le fuseau mitotique et le phragmoplaste (Figure 9). Des protéines associées aux MT (MAP) ont un rôle essentiel sur la dynamique des MT en (i) ayant des activités motrices (ii) participant à l'organisation des différents réseaux. Chez les plantes, où la morphogenèse est intimement liée à l'organisation du cytosquelette, les MAP non motrices ont une fonction particulièrement importante. Les premières MAP non motrices végétales ont été caractérisées chez la carotte par leur propriété d'association aux MT (Chan et al., 1999b). Ces protéines de 65kDa ont ainsi été appelées MAP65 et sont capables de former des câbles de MT. Dans cette partie, les différents réseaux de MT au cours du cycle cellulaire (Figure 9) ainsi que les principales données sur les MAP des plantes sont présentés.

o L'interphase.

L'**interphase** est la période du cycle cellulaire qui est caractérisée par un accroissement du volume cellulaire, la cellule transcrit ses gènes et les chromosomes sont dupliqués.

L'interphase peut être subdivisée en plusieurs phases :

- la **phase G1** (de l'anglais Gap 1 ; gap = espace, pour l'espace entre la mitose et la phase S) au cours de laquelle la cellule croît et effectue les fonctions pour lesquelles elle est programmée

génétiqnement. Durant cette phase, les cellules filles issues de la mitose précédente prennent leur taille finale.

- la **phase S** (pour Synthèse de nouvelle molécule d'ADN) au cours de laquelle le matériel chromosomique est doublé par réplication de chacun des chromosomes.
- la **phase G2** (Gap 2) où la cellule se comporte comme lors de la phase G1. À l'issue de cette phase, chaque chromosome est parfaitement identique (morphologie et génétique) à son homologue.

Dans les cellules de plantes en interphase, les MT sont principalement localisés dans le cortex cellulaire où ils sont organisés en faisceaux ordonnés en association avec la membrane plasmique (Figure 9) (Wasteneys, 2002) Ainsi, les MT corticaux forment des réseaux utilisés pour le transport d'organelles ou de métabolites et participent à l'expansion anisotrope de la cellule, en dirigeant les dépôts de cellulose pour la formation de la paroi végétale (Lloyd and Hussey, 2001). Ces MT jouent donc un rôle essentiel dans la morphogénèse cellulaire. L'étude de mutants d'*A. thaliana* présentant une croissance hélicoïdale (*spiral*, *lefty/lefty*, *wave-dampened-2*), ou une expansion radiale (*radial swollen*), provenant de défauts dans l'organisation des réseaux de MT corticaux, a permis d'identifier des MAP impliquées dans l'architecture cellulaire.

○ **La mitose.**

La transition « G2/M ».

Lors de la transition entre la phase G2 et la mitose (G2/M), une activation de marqueurs du cycle cellulaire tels que les cyclines (CYC) et les kinases cyclines-dépendantes (CDK) est observée. Les CDK de type B, spécifiques au règne végétal, régulent cette transition G2/M (Bryant and Francis, 2011). Chez *A. thaliana*, une analyse globale de l'expression des gènes lors de l'entrée en mitose a permis d'identifier 82 gènes présentant un profil d'expression spécifique de la transition G2/M (Menges et al., 2005). Parmi ces gènes marqueurs de l'entrée en mitose, Menges *et al.* (2005) ont identifiés les gènes codant des cyclines (CYC) et kinases cyclines-dépendantes (CDK), ainsi que des MAP telles que EB1 (« End Binding protein 1 »), MAP65-3 et MAP65-4.

La prophase.

Dans la cellule végétale, le futur plan de division est déterminé en **préprophase**, par la formation d'une structure de MT particulière, la **bande préprophasique (PPB)** (Van Damme and Geelen, 2008). La bande préprophasique est constituée des MT corticaux présents en interphase, qui se réorganisent en un anneau cortical positionné au centre de la cellule (Figure 10B).

La bande préprophasique, un analogue des centrosomes ?

Une des hypothèses émises serait que la PPB définirait la bipolarité du fuseau mitotique. En effet, elle marquerait avant l'entrée en mitose le plan perpendiculaire à l'axe de symétrie (Müller et al., 2009) et définirait ainsi l'axe de division. La PPB radie vers l'intérieur pour générer des contacts avec

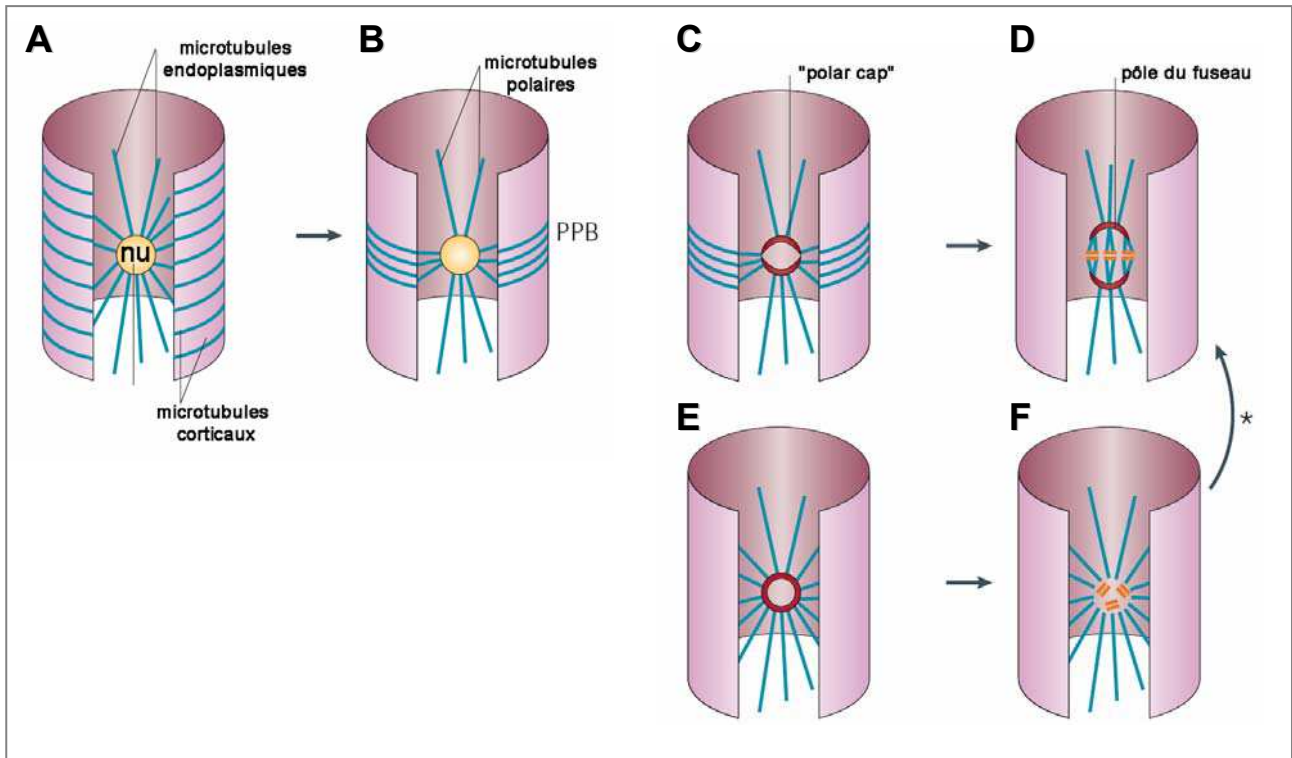


Figure 10: Formation du fuseau de prophase chez les plantes.

A: En entrée en mitose, les microtubules corticaux et les microtubules endoplasmiques qui irradient à partir du noyau (nu) sont observés.

B: Les microtubules corticaux se réorganisent en un anneau cortical positionné au centre de la cellule. En plus de cet anneau cortical, des microtubules endoplasmiques radient du noyau, donnant les microtubules polaires. L'ensemble de ces microtubules forment la bande préprophasique.

C: Progressivement, les microtubules polaires forment deux zones de polarités opposées.

D: Les deux coiffes constituent les pôles du fuseau de prophase.

E: En absence de bande préprophasique, les microtubules endoplasmiques qui radient autour du noyau ne se différencient pas en deux zones de polarités opposées.

F: Le fuseau bipolaire se développe alors à proximité des chromosomes. D'après Lloyd et Chan (2006).

le noyau par l'intermédiaire de « bridging microtubules » (pour revue, Ambrose and Cyr, 2008) évènement qui coïncide avec la prophase tardive où les contours du futur fuseau mitotique apparaissent. De plus, lorsque la PPB subit des perturbations et se dédouble, un fuseau multipolaire est généralement observé (Yoneda et al., 2005). Mais certaines cellules méiotiques végétales (Bannigan et al., 2008) ainsi qu'une petite portion de cellules somatiques (Chan et al., 2005) ne présentent naturellement aucune PPB tout en possédant un fuseau bipolaire. Ces données suggèrent que la PPB n'est pas indispensable pour l'assemblage du fuseau mais permettrait d'en augmenter la fidélité en donnant un signal « spatial ».

Simultanément à la formation de la PPB, des MT endoplasmiques irradient à partir de l'enveloppe nucléaire et va permettre la génération du **pro-fuseau** mitotique (Dhonukshe et al., 2006). La localisation subcellulaire de la protéine de fusion GFP-EB1 en culture de cellules d'*A. thaliana* a permis de démontrer qu'en prophase, la mise en place du fuseau bipolaire s'effectue avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (Chan et al., 2005). Les MT périnucléaires vont former deux coiffes opposées l'une à l'autre autour du noyau, qui définiront le futur plan du fuseau mitotique (Figure 10). De plus, le noyau peut s'allonger selon l'axe de ces coiffes, perpendiculairement à la PPB, ajoutant un indicateur supplémentaire de la bipolarisation avant même la dissolution du noyau (Granger and Cyr, 2001). La nucléation des MT périnucléaires est un facteur essentiel dans ce modèle de pro fuseau. Cette nucléation dépend principalement des complexes γ -TuRCs (Kollman et al., 2011). Un second mécanisme permet la nucléation des MT à partir de la membrane nucléaire. Il s'agit du complexe Histone H1/tubuline localisé sur la surface externe du noyau (Hotta et al., 2007). Ce complexe forme une structure en anneau et permet l'incorporation de dimères de tubuline côté membrane nucléaire en permanence, et grâce à une activité motrice, repousse ces MT de la surface nucléaire, permettant ainsi de conserver l'extrémité (+) près du noyau. Ces deux complexes, les γ -TuRCs et l'Histone H1/tubuline, sont indépendants et permettent la présence de MT périnucléaires de polarités opposées.

Ces MT périnucléaires radient du noyau vers le cytoplasme et vont progressivement former de petits asters près des noyaux (les coiffes) qui convergeront vers les deux pôles opposés du noyau. Plusieurs protéines participent à ce mécanisme. On retrouve notamment les γ -TuRCs (GCP2 et 3) et des protéines associées aux γ -TuRCs tel que NEDD1 et les GIP (Janski et al., 2012; Zeng et al., 2009) qui ont un rôle dans le maintien des structures en aster et du pro-fuseau (Chan et al., 2005). Une kinésine 14, la KCBP (« Kinesin-like Calmodulin-binding Protein ») favorise le câblage et la dynamique entre les MT, conduisant à une augmentation de pression sur l'enveloppe nucléaire qui aboutira à une dissolution de l'enveloppe nucléaire (Vos et al., 2000). Juste avant la dissolution de la membrane nucléaire et la formation du fuseau à proprement parler, les deux coiffes vont se séparer. La division végétale utiliserait ainsi une variante du mécanisme animal, basée sur la bipolarité initiée en dehors de l'enveloppe nucléaire démontrant ainsi que les centrosomes ne sont pas essentiels pour la bipolarité. Cependant, dans certains types cellulaires végétaux où il n'y a pas de PPB, ce mécanisme de coiffe n'est pas observé (Chan et al., 2005) (Figure 10E,F). La bipolarité serait alors assurée par un

mécanisme basé sur les chromosomes et une réorganisation cytoplasmique prémitotique (Lloyd and Chan, 2006). Certaines études avancent le rôle du phragmosome, assemblage de plusieurs filaments d'actine au centre de la cellule permettant notamment la migration du noyau (Lloyd, 1991), ou le répositionnement des noyaux dans certaines cellules multinucléées (endosperme) (Brown and Lemmon, 1997; Lammeren, 1988) mais aucune étude n'a été approfondie à ce sujet.

La prométaphase.

Au cours de la **prométaphase**, l'enveloppe nucléaire se désagrège. Des complexes protéiques nommés « **kinétochores** » se forment au niveau des centromères des chromosomes (Cheeseman and Desai, 2008) et le fuseau mitotique se met en place. Il est constitué de MT ancrés aux niveaux des pôles opposés de la cellule dont les extrémités (+)radient activement vers l'extérieur. Il existe trois types de MT: les MT interpolaire, astraux et kinétochoriens. Les **MT interpolaire** viennent des pôles opposés et interagissent entre eux dans la partie médiane du fuseau pour assurer la bipolarité. Les **MT astraux** rayonnent autour des pôles et ancrent le fuseau au cortex cellulaire, permettant de déterminer l'axe de la division cellulaire. Les **MT kinétochoriens**radient activement vers la plaque métaphasique à la recherche de kinétochore. Plusieurs modèles décrivent les mécanismes de formation du fuseau. Le mécanisme basé sur la formation du fuseau à partir des centrosomes est appelé le modèle « **Recherche et capture** ». Mais ce modèle ne peut être appliqué à tous les types cellulaires. Certains types cellulaires animaux et les cellules végétales ne présentent pas de centrosomes (ou structure analogue) bien que présentant des fuseaux mitotiques parfaitement fonctionnels. Un autre concept, le modèle d' « **auto-assemblage** » propose que les MT puissent être générés à partir de polymérisation issue des kinétochores et proposerait une alternative à la voie des centrosomes (pour revue, Nédélec et al., 2003; Rieder, 2005). Ces MT kinétochoriens se regroupent par 20-25 (chez les vertébrés) pour former des câbles nommés fibres kinétochoriennes ou fibres-k. Ce mécanisme permettrait d'accélérer l'accrochage des chromosomes en début de mitose (Goshima and Kimura, 2010; Tulu et al., 2006). Ces deux modèles seront discutés plus précisément dans le chapitre 3 (capture des kinétochores par les fibres du fuseau mitotiques).

Les cellules végétales utiliseraient aussi un mécanisme commun avec les animaux connu sous le nom de l'assemblage du fuseau dépendant de Ran (« Ran regulated spindle self organization ») (Meunier and Vernos, 2011; Torosantucci et al., 2008). Ce mécanisme implique la Ran GTP (Guanosine Triphosphatase Ran) qui est un régulateur de la nucléation des MT à proximité des chromosomes et donc à l'origine des fibres kinétochoriennes. Lors de la prophase, lorsque l'enveloppe nucléaire se dissout, un gradient de Ran est formé avec la forme RanGTP à proximité des chromosomes, gradient essentiel à l'assemblage du fuseau autour des chromosomes (Caudron et al., 2005; Kaláb et al., 2006). Ran active la formation du fuseau en relarguant les facteurs d'assemblage du fuseau de leurs récepteurs de transport nucléaires.

La métaphase.

Les chromosomes condensés se rassemblent à l'équateur de la cellule pour former la plaque équatoriale et les protéines cytoplasmiques vont pouvoir accéder à la chromatine. Les nucléations dépendant de l'Histone H1 et des γ -TuRCs vont donc pouvoir participer à la formation du fuseau mitotique à proximité des chromosomes et à partir de MT déjà existants. Suite à la dissolution de l'enveloppe nucléaire, l'assemblage du fuseau va nécessiter des changements d'organisation des MT. Les kinésines motrices vont jouer un rôle dans l'établissement du fuseau bipolaire orienté avec des protéines motrices d'extrémités (-) concentrées aux pôles et des protéines motrices d'extrémités (+) radiant vers le cytoplasme (Hamada, 2007). Certaines comme la AtKRP125c de la famille des kinésines 5 vont stabiliser le fuseau en créant des ponts au centre de la cellule entre les MT interpolaires antiparallèles (Bannigan et al., 2007).

D'autres acteurs tels que les MAPs motrices ou non, jouent un rôle structurel dans l'organisation du fuseau en stabilisant/déstabilisant les polymères de tubuline. Parmi les MAP non motrices, la famille des MAP65 est très impliquée dans la maintenance de la bipolarité du fuseau mitotique (pour revue, Walczak and Shaw, 2010). Chez Arabidopsis, il existe neuf membres de la famille des MAP65. Comme chez les animaux, avec PRC1 chez l'humain (Jiang et al., 1998) et Ase1p chez les champignons (Schuyler et al., 2003), les MAP65 sont presque toutes associées au fuseau mitotique (sauf AtMAP65-6, 7 et 9) (Walczak and Shaw, 2010). Jusqu'à présent, la seule protéine montrée comme associée aux fibres kinétochoriennes *sensu stricto* est MAP65-4 (Fache et al., 2010). Elle induit le câblage entre MT adjacents en orientations polaires ou antipolaires, même pendant leurs élongations et module la dynamique des MT en les stabilisant. De part ses propriétés d'association avec le fuseau en formation dès la prophase et avec les MT kinétochoriens pendant la prométaphase et l'anaphase, MAP65-4 est un candidat clef de la régulation de la formation et de l'organisation du fuseau mitotique (Fache et al., 2010).

L'analyse phénotypique, à température restrictive, de mutants d'insertion d'*A. thaliana* dans les gènes codant la kinésine KRP125c (Bannigan et al., 2007) et la MAP non motrice MOR1 (Kawamura et al., 2006), ainsi que l'étude du mutant *clasp-1* (Ambrose et al., 2007) ont permis de mettre en évidence des défauts dans l'organisation du fuseau mitotique en absence de ces protéines associées aux MT. Par exemple, le mutant *Mor1* d'Arabidopsis présente des défauts dans la formation du fuseau (Kawamura et al., 2006) et la déplétion de son homologue chez le tabac cause des défauts sévères dans la formation du fuseau bipolaire et engendre des cellules multinucléées à noyaux de taille variable (Yasuhara and Oe, 2011).

Les protéines de capture à extrémités (+) ou « +TIPs » désignent les MAPs qui s'accumulent aux extrémités (+) des MT. Elles sont capables de modifier les propriétés dynamiques des MT. On distingue notamment EB1 (Komaki et al., 2010), CLIP-170 (Cytoplasmic Linker Proteins), CLASP

(CLIP-associated Protein) (Ambrose et al., 2007) et LIS1 (Lissencephaly1) (Gao et al., 2012). Elles peuvent être présentes sous forme de complexes qui sont impliqués dans le transport intracellulaire et l'attachement des MT à d'autres structures telle que le kinétochore.

La transition métaphase - anaphase.

L'**anaphase** est une phase très rapide de la mitose où les chromatides se séparent et migrent vers les pôles opposés de la cellule. La séparation des chromatides-sœurs, qui marque le début de l'anaphase, est la conséquence d'une succession d'événements moléculaires faisant intervenir un complexe enzymatique, l'« Anaphase Promoting Complex / Cyclosome » (APC/C) (Capron et al., 2003). L'**APC/C** est un complexe enzymatique E3 ubiquitine-ligase qui permet la destruction de plusieurs protéines régulatrices de la mitose, en particulier de la sécurine. La destruction de la sécurine permet de lever son inhibition sur la séparase. La séparase devenue active, clive une sous-unité du complexe cohésine permettant la séparation des chromatides-sœurs, qui peuvent alors migrer vers les pôles opposés du fuseau. La séparation des chromatides-sœurs, à la transition entre la métaphase et l'anaphase, est une étape particulièrement contrôlée, son bon fonctionnement détermine en effet la bonne répartition des chromosomes-fils dans les cellules-filles. Un mécanisme de surveillance de l'assemblage du fuseau nommé « **Spindle Assembly Checkpoint** » (SAC) assure l'accrochage de tous les chromosomes au fuseau et assure ainsi la fidélité de la ségrégation de ces chromosomes (Musacchio and Salmon, 2007). Ce mécanisme est présenté dans le troisième chapitre.

La télophase.

Durant la **télophase**, les 2 lots de chromatides, qui ont gagné les pôles du fuseau mitotique, commencent à se décondenser. L'enveloppe nucléaire ainsi que les nucléoles commencent à se reformer. Chez les plantes, la construction d'une nouvelle paroi intermédiaire entre les deux cellules filles fait intervenir un réseau de MT spécifique aux plantes, le **phragmoplaste** (Wasteneys, 2002). Le phragmoplaste est composé de deux jeux de MT de polarité opposée, de filaments d'actine ainsi que d'une « matrice d'assemblage de la plaque cellulaire » (Seguí-Simarro et al., 2004). Grâce à un transport le long des MT du phragmoplaste, des vésicules Golgiennes contenant de la pro-pectine s'accumulent au centre de la cellule, formant la plaque cellulaire. L'expansion progressive du phragmoplaste permet sa croissance vers la périphérie de la cellule mère. Lorsque le phragmoplaste atteint son expansion maximum, la plaque cellulaire néoformée se raccorde à la paroi primaire de la cellule mère, provoquant sa division en deux cellules filles. La formation d'une nouvelle paroi entre deux cellules filles est un processus en plusieurs étapes, définies en fonction de l'évolution architecturale du phragmoplaste (Seguí-Simarro et al., 2004). Ces principales étapes sont :

- **Assemblage du phragmoplaste** : pendant cette phase, le phragmoplaste est composé de deux jeux de MT de polarité opposée, qui s'élargissent par une expansion latérale. Ce stade

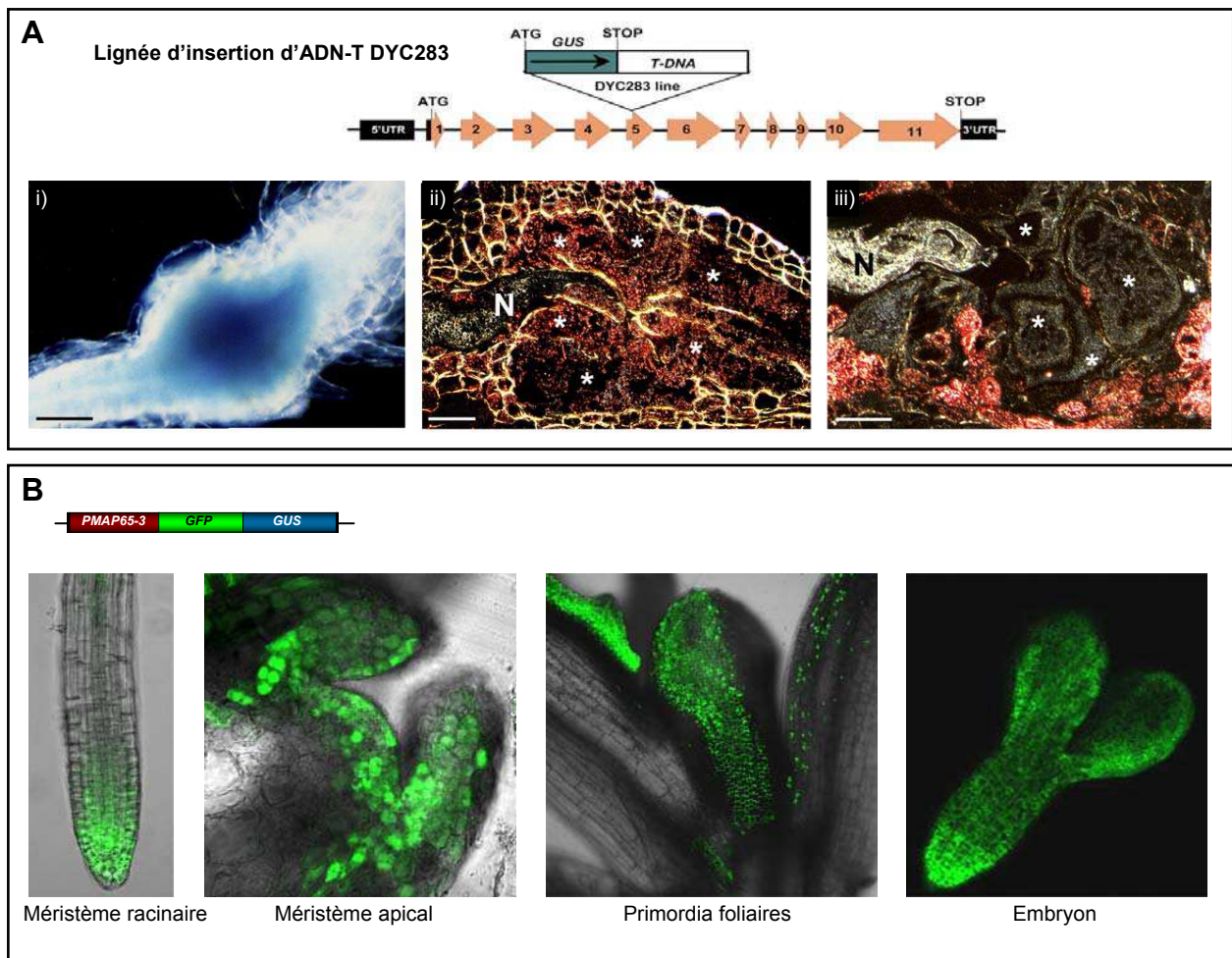


Figure 11: Profil d'expression du gène *MAP65-3*.

A: Présentation de la lignée **DYC283** comportant l'insertion d'un ADN-T dans le 5^{ème} exon du gène *MAP65-3*. Les flèches oranges correspondent aux exons. Le gène **GUS** correspond à la région codante du gène de la β -Glucuronidase. Expression du gène rapporteur **GUS** de la lignée **DYC283** dans les galls entières (i) ou sectionnées (ii) à 7jai puis à 21jai (iii). La coloration typique bleue du gène rapporteur **GUS** apparait rouge sur fond noir. Les cellules géantes sont désignées par *, et le nématode: N. Barre = 100 μ m in (i), 25 μ m in (ii) and (iii).

B: Profil d'expression de *MAP65-3* observé sur des plantes transformées avec la fusion *PMP65-3::GFP* dans les cellules en division des méristèmes racinaires et apicaux, des primordia foliaires et de l'embryon. D'après Caillaud et al.(2008b)

implique également le transport de matrice d'assemblage de la plaque cellulaire par l'intermédiaire des MT jusqu'au futur plan de division de la cellule.

- **Le phragmoplaste transitoire :** pendant cette étape, la matrice d'assemblage de la plaque cellulaire et les MT sont désassemblés au centre du phragmoplaste solide alors que de nouveaux MT apparaissent au bord du phragmoplaste en expansion, créant ainsi le phragmoplaste en forme d'anneau ou « phragmoplast ring ».
- **Le phragmoplaste en forme d'anneau :** Ce stade est défini par un anneau de MT associés à la matrice d'assemblage de la plaque cellulaire. Ces MT situés à la périphérie du phragmoplaste en expansion sont responsables de la croissance de la plaque cellulaire néoformée. Ainsi, la croissance de la plaque cellulaire se poursuit jusqu'à ce qu'elle se raccorde à la paroi primaire de la cellule mère, provoquant sa division en deux cellules filles.

L'implication des MAP dans l'organisation des MT du phragmoplaste a été déterminée principalement par l'analyse phénotypique de mutants présentant des parois avortées tels que les mutants *ple* (Müller et al., 2002, 2004) et *mor1-1* (Twell et al., 2002). Certaines MAP telles que MOR1 (Kawamura et al., 2006) et TKRP125 (Asada et al., 1997) ont été décrites comme colocalisant avec la totalité du phragmoplaste, c'est-à-dire colocalisant à la fois avec les MT et le centre du phragmoplaste. D'autres MAP, telles que AtMAP65-1 (Van Damme et al., 2004; Sasabe et al., 2011), ATMAP65-5 (Smertenko et al., 2008) et CLASP (Ambrose et al., 2007), ont été décrites comme colocalisant uniquement avec les MT du phragmoplaste, mais étant exclus du centre du phragmoplaste. Une seule MAP a été décrite comme localisant uniquement au centre du phragmoplaste, la MAP non motrice AtMAP65-3 (Caillaud et al., 2008b; Ho et al., 2011; Müller et al., 2004).

II. Analyse fonctionnelle de MAP65-3.

Le criblage de 20 000 lignées de la collection de l'INRA de Versailles a permis d'identifier environ 200 lignées qui présentent une expression du gène GUS au niveau des galles induites par *M. incognita*. Parmi les lignées identifiées, la lignée DYC283 (Figure 11A) présente, après infection par *M. incognita*, une induction GUS au niveau des galles de façon précoce et durant toute la phase d'ontogénèse des cellules géantes. L'analyse génétique et moléculaire réalisée a permis de montrer que cette lignée présentait une insertion d'un ADN-T dans le 5^{ème} exon du gène *MAP65-3*, qui code pour une protéine associée aux MT de la famille des MAP65 (Caillaud et al., 2008b).

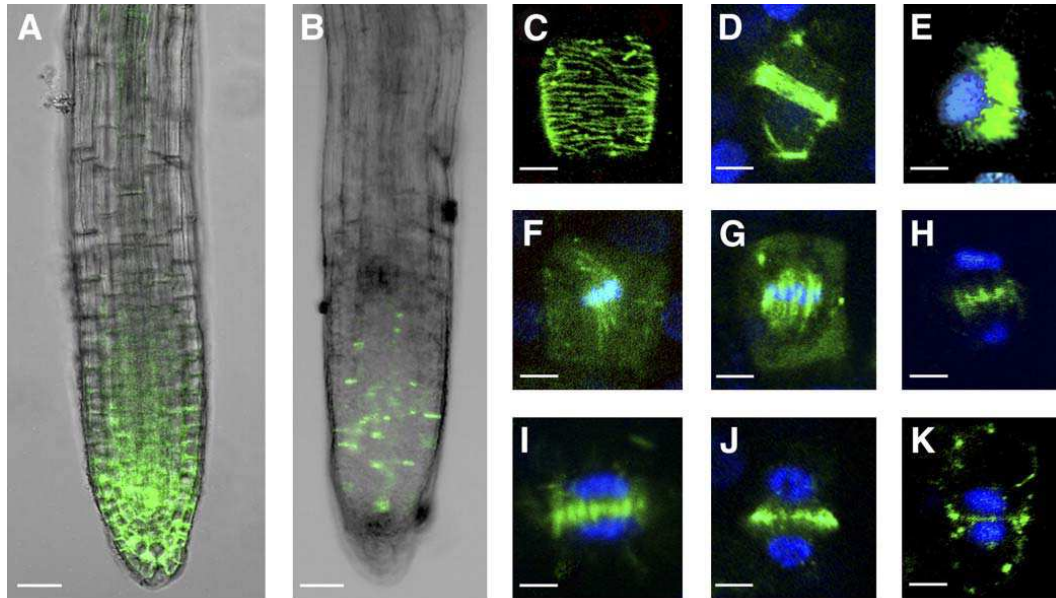


Figure 12: Localisation subcellulaire de la protéine MAP65-3.

A: Profil d'expression de *MAP65-3* observé sur des plantes transformées avec la fusion *P_{MAP65-3}:GFP* dans les cellules en division des méristèmes racinaires. Barres: 20 μ m

B: Localisation de *MAP65-3* (sur des plantes transformées avec la construction *P_{MAP65-3}:MAP65-3:GFP*)

C à K: Localisation de *MAP65-3* avec tous les réseaux de microtubules au cours de la mitose (*GFP:MAP65-3* en vert et *H2B:YFP* en bleu). *MAP65-3* localise avec les microtubules corticaux en G2 (**C**), avec la PPB (**D** et **E**), le fuseau mitotique en métaphase (**F**), le fuseau mitotique en anaphase (**H**) et le phragmoplaste (**I** à **K**). Barres: 5 μ m. D'après Caillaud et al.(2008b).

A *MAP65-3 au cours du développement de la plante.*

La famille de MAP65 végétales correspond à l'homologue de ASE1p (« Anaphase Spindle Elongation Factor1 ») chez la levure (Schuyler et al., 2003) et PRC1 (« Protein Regulation Cytokinesis 1 ») chez les mammifères (Mollinari et al., 2002), qui sont impliquées dans la formation du fuseau mitotique et la cytokinèse. Après l'identification de 9 membres de la famille des MAP65s chez *Arabidopsis* (Hussey et al., 2002), plusieurs équipes de recherche ont étudiés les propriétés moléculaires et fonctionnelles de certains de ces membres. Des études biochimiques ont montrés que les MAP65 se lient aux MT *in vitro* grâce à un domaine conservé en C-terminal (Smertenko et al., 2004) et induisent la formation de faisceaux de MT *in vitro* (Chang-Jie and Sonobe, 1993; Wicker-Planquart et al., 2004). Les MAP65s diffèrent de part leurs activités, fonctions et liaisons aux MT. Ce sont des MAP non motrices, qui participent à l'organisation des réseaux de MT et la plupart des membres de cette famille se localise sur les réseaux de MT au cours de la mitose comme la PPB, le fuseau et le phragmoplaste (Van Damme et al., 2004; Hamada, 2007). MAP65-3/PLE a été isolée lors d'un criblage génétique de mutants de morphogénèse de la racine chez *Arabidopsis* (Müller et al., 2002). Le mutant *map65-3/ple* présentait des défauts de cytokinèse au niveau du méristème racinaire, probablement dû à une désorganisation du phragmoplaste (Müller et al., 2004).

o *AtMAP65-3 est exprimée dans les tissus en division.*

Au cours du développement de la plante, *MAP65-3* est exprimé dans tous les tissus riches en cellules en division tel que les méristèmes caulinaires et racinaires, les primordia foliaires et racinaires, les jeunes feuilles et durant tous les stades de développement de l'embryon (Figure 11B). Ces résultats sont en accord avec les données d'analyse du profil d'expression de gènes lors du cycle cellulaire montrant que *MAP65-3* présente un pic d'expression lors de la transition G2/M (Menges et al., 2005). De plus, après infection par *M. incognita*, le gène *MAP65-3* présente une induction au niveau des galles (Figure 11A) de façon précoce et durant toute la phase d'ontogénèse des cellules géantes (i.e. de 48h à 3 semaines après inoculation). Cette période correspond à la phase où les cellules géantes subissent des divisions nucléaires. Lors de la phase de maturation des cellules géantes où il n'y a plus que de la croissance isotropique, *MAP65-3* n'est plus exprimée dans les cellules géantes. Le gène reste cependant exprimé dans les cellules avoisinantes qui continuent à se diviser.

o *MAP65-3 localise avec les réseaux de MT spécifiquement au cours de la division.*

La localisation subcellulaire de la protéine MAP65-3 a été réalisée sur des plantes mutantes KO, ici la lignée DYC283 homozygote) complémentées avec la fusion de MAP65-3 avec la GFP, sous le contrôle de son propre promoteur (*P_{MAP65-3}:MAP65-3:GFP*). Alors que le profil d'expression montrait une induction du promoteur dans toutes les cellules méristématiques, la protéine n'est

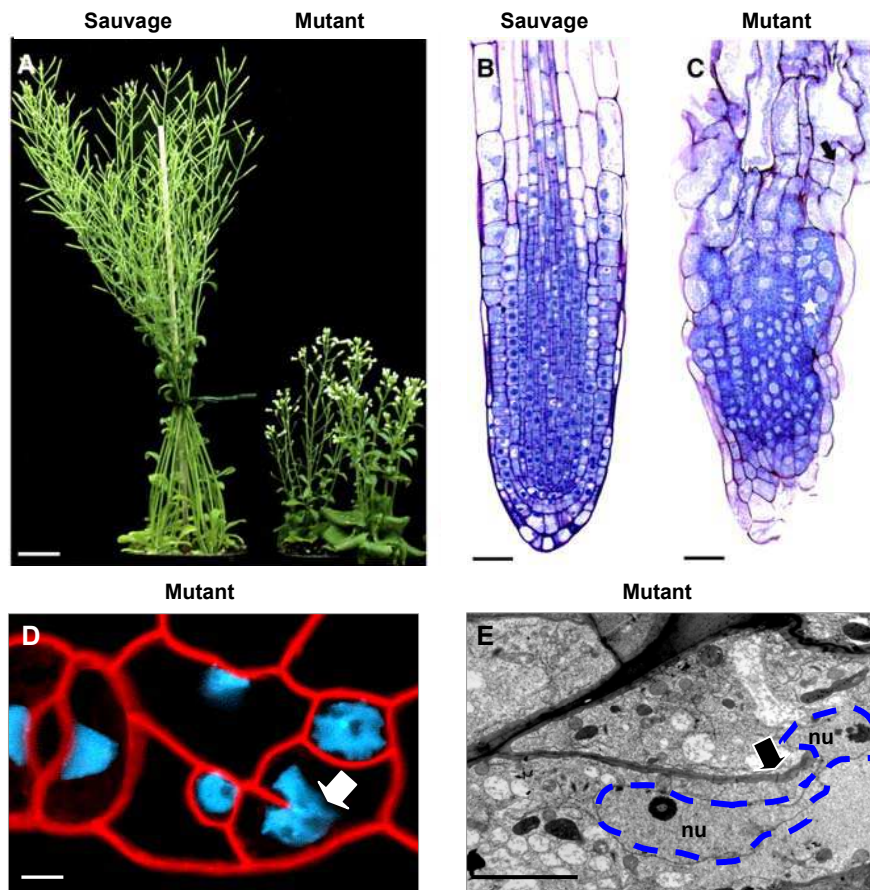


Figure 13: Phénotype du mutant KO *map65-3* au cours du développement de la plante.

A: Phénotypes nains de la lignée mutant *map65-3*, plantes âgées de 7 semaines (barre: 2cm).

B: Coupe longitudinale de racines d'une plante sauvage.

C: Coupe longitudinale de racines de la lignée mutant *map65-3* qui présente des cellules polynucléées et hypertrophiées (étoile) et des parois avortées (flèche). (barre: 50 μ m).

D: Une plante mutante *map65-3* exprimant H2B:YFP (en bleu) et marquée à la sonde membranaire FM4-64 (en rouge) présente un noyau aberrant, non divisé, s'enroulant autour d'une paroi avortée (flèche). (barre: 5 μ m).

E: Image de microscopie électronique confirmant la présence d'un noyau non divisé (entouré de bleu) s'enroulant autour d'une paroi avortée (flèche). (barre: 1 μ m). D'après Caillaud et al.(2008b).

détectée que dans les cellules en cours de division (Figure 12A et B). L'étude de la localisation de la protéine a permis de caractériser une distribution cellulaire spécifique et de mettre en évidence une régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Un marquage des MT a permis de montrer que MAP65-3 colocalise avec tous les réseaux de MT au cours de la mitose tels que la bande préprophasique, le fuseau mitotique et le phragmoplaste (12C à K). Au cours de la cytokinèse, MAP65-3 est localisée au centre du phragmoplaste puis au niveau de la plaque cellulaire en expansion (Caillaud et al., 2008b; Ho et al., 2011; Müller et al., 2004). La localisation de MAP65-3 suggère donc un rôle dans la division cellulaire et la cytokinèse.

○ ***Le rôle de MAP65-3 au cours de la mitose.***

Les plantes *map65-3* homozygotes mutées pour ce gène présentent un phénotype mutant nain au niveau racinaire et aérien (Figure 13A), et présente des cellules plurinucléées avec des parois incomplètes. Le mutant KO *map65-3* présente un phénotype caractéristique de défauts lors de la division cellulaire. En effet, ce mutant présente des cellules polynucléées et hypertrophiées (Figure 13C). Certaines cellules présentent des noyaux anormaux, plus volumineux et non divisés (Figure 13D et E). Ces défauts pourraient résulter d'aberrations lors de la ségrégation des chromosomes en anaphase et de malformations du phragmoplaste. Ces anomalies résultent de défauts de l'organisation des différents réseaux de MT au cours de la mitose visualisés à l'aide du marqueur MAP4-GFP (Caillaud et al., 2008b). Les études conjointes du phénotype cellulaire en absence de MAP65-3 ainsi que de localisation subcellulaire indiquent que cette MAP est impliquée dans l'organisation du fuseau mitotique dans la cellule végétale (Figure 14A). Cependant, en absence de MAP65-3, les défauts lors de la formation du fuseau mitotique ne sont pas observés systématiquement dans les cellules en division. Une des hypothèses pourrait être que MAP65-3 ne serait indispensable à l'organisation du fuseau mitotique qu'en cas de perturbations lors de la séparation des chromosomes.

L'analyse en temps réel du processus de cytokinèse en absence de MAP65-3 a permis de démontrer que les parois avortées résultent de défauts lors de l'expansion du phragmoplaste (Figure 14B) (Caillaud et al., 2008b; Ho et al., 2011; Müller et al., 2004). Chez le mutant *map65-3*, le phragmoplaste présente fréquemment une mauvaise localisation et lors de son expansion, dès qu'il touche un côté de la cellule, la formation de la plaque cellulaire s'arrête : il en résulte une cytokinèse incomplète formant ces parois avortées. Cette anomalie des MT du phragmoplaste serait donc à l'origine de l'échec de la cytokinèse et la présence de cellules multinucléées chez le mutant KO *map65-3*. Normalement, pour conserver l'intégrité du phragmoplaste au cours de son expansion, la cellule doit disposer de protéines associées aux extrémités (+) des MT. Chez les métazoaires, les +TIPs régulent la dynamique à l'extrémité (+) des MT, jouant un rôle clé dans l'architecture cellulaire. Chez les plantes, à l'heure actuelle, seule une protéine a été décrite comme interagissant avec les extrémités (+) des MT. Il s'agit de l'homologue chez *A. thaliana* de la « End Binding protein-1 »

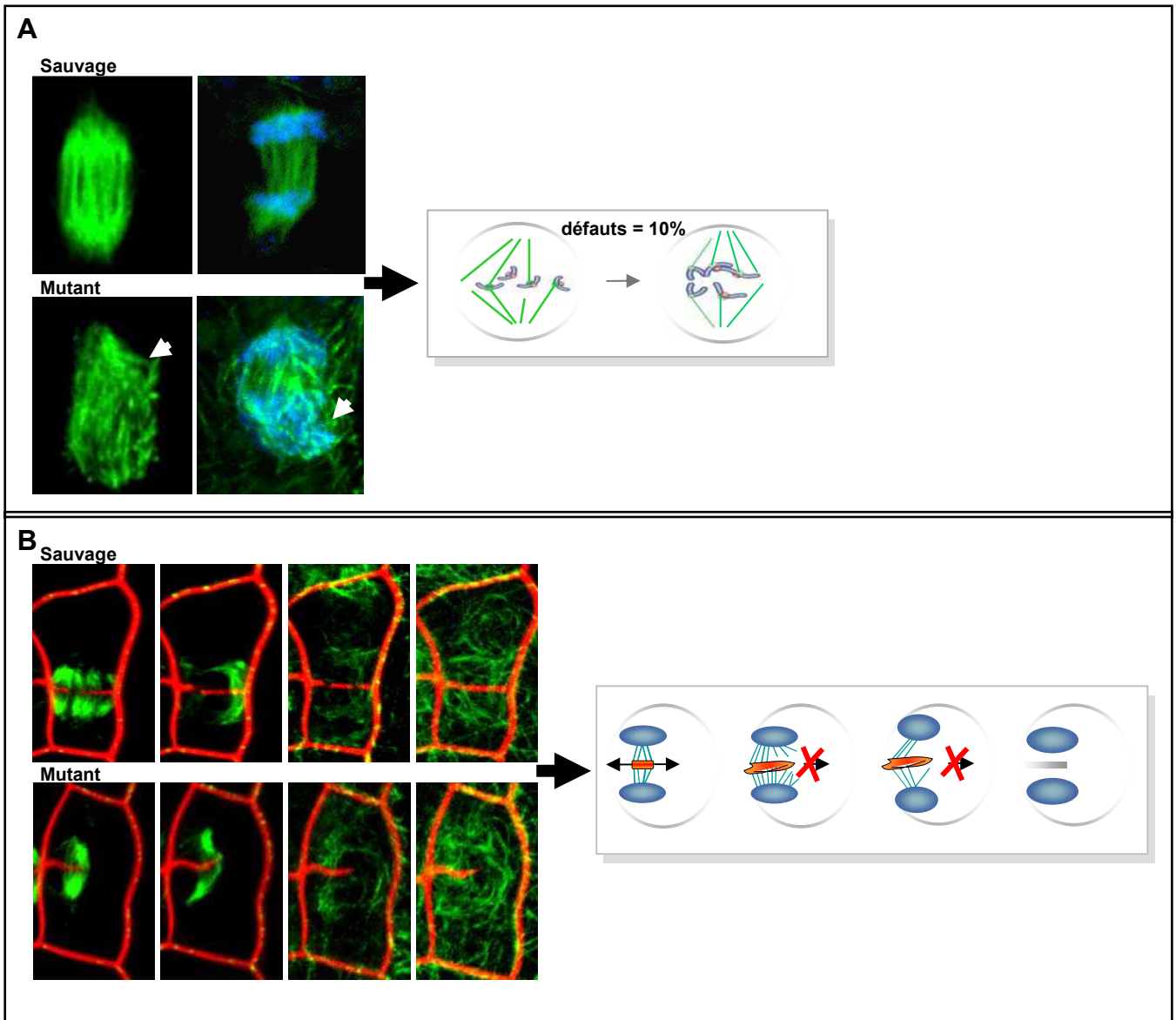


Figure 14: Phénotype du mutant KO *map65-3* au cours du développement de la plante.

A: Fuseaux mitotiques observés dans des cellules en division de plantes âgées de 7 jours sauvages et mutantes KO *map65-3*. Le fuseau mitotique chez *map65-3* présente des défauts d'organisation (10% des cas) résultant en une ségrégation anormale des chromosomes (flèche). Modèle proposé pour l'observation du phénotype du mutant *map65-3*.

B: Phragmoplastes observés dans des cellules en division de plantes âgées de 7 jours sauvages et mutantes KO *map65-3*. Le phragmoplaste chez *map65-3* présente des défauts lors de son expansion résultant en la formation de parois avortées. Modèle proposé pour l'observation du phénotype du mutant *map65-3* (barre: 5µm). Observation *in vivo*: les microtubules sont en vert (MBD-GFP) et les chromosomes en bleu (H2B:YFP) et les membranes plasmiques en rouge (marquées au FM4-64). barre: 5µm. D'après Caillaud et al.(2008b).

(EB1) humaine (Chan et al., 2005). La localisation particulière de MAP65-3, concentrée au centre du phragmoplaste au cours de la cytokinèse en fait un très bon candidat pour être membre du complexe « +TIPs » chez *A. thaliana*.

MAP65-3 joue donc un rôle clef dans l'organisation des réseaux de MT au cours de la mitose (morphogénèse du fuseau) et au cours de la cytokinèse (expansion du phragmoplaste) (Caillaud et al., 2008b ; Ho et al., 2011, 2012).

B MAP65-3 dans l'interaction plante-nématode

o MAP65-3 est essentielle à l'ontogénèse des cellules géantes.

Un test d'infection par *M. incognita* réalisé sur les mutants KO *map65-3* a permis de montrer que le nématode est capable de pénétrer et de migrer à l'intérieur de la racine puis d'initier la redifférenciation des cellules végétales en cellules géantes (Figure 15 B et D). Cependant chez ce mutant les cellules géantes n'arrivent pas à maturation et dégèrent (Figure 15 F), empêchant ainsi le développement du nématode qui meurt à un stade larvaire précoce (stade L3). L'absence de la protéine MAP65-3 conduirait à une accumulation d'anomalies au cours des mitoses successives, défauts qui conduisent à une dégénérescence du site nourricier. Les expériences de complémentations réalisées avec le gène *MAP65-3* ont confirmé que MAP65-3 est indispensable au développement de la cellule géante et du nématode (Caillaud et al., 2008b).

L'utilisation d'une lignée d'*A. thaliana* exprimant MBD-GFP, a permis de confirmer la présence de « mini » phragmoplastes synchrones dans les cellules géantes en formation (Figure 16B). La localisation subcellulaire de MAP65-3 *in vivo* dans les cellules géantes a montré que cette protéine est associée aux « mini » plaques cellulaires qui séparent, à la fin de la mitose, les noyaux dans les cellules géantes (Figure 16C et D).

o Modèle de formation des cellules géantes.

Dans les mutants *map65-3*, la cytokinèse est donc aussi initiée, mais l'accumulation de défauts (parois avortées, noyaux connectés) résultant d'anomalies de l'expansion du phragmoplaste, au cours des mitoses successives, conduirait à une dégénérescence du site nourricier et à la mort du nématode (Figure 17). Dans les cellules géantes, MAP65-3 est associée et régule les « mini » plaques cellulaires qui séparent les noyaux fils. Ainsi, bien que les cellules géantes résultent de divisions nucléaires successives sans division cellulaire, Caillaud et al. (2008) ont pu démontrer que la cytokinèse y est initiée et indispensable à la formation de ces cellules géantes.

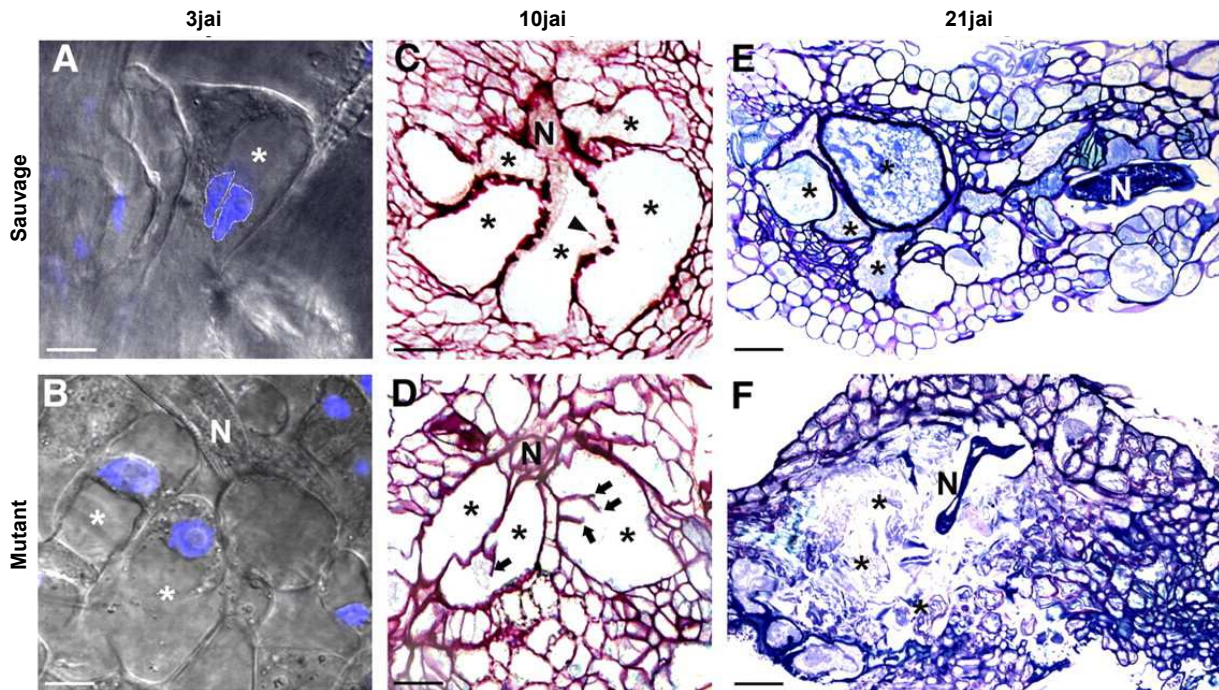


Figure 15: Phénotype du mutant KO *map65-3* lors de l'interaction avec le nématode.

A et B: Noyaux (bleu) dans de jeunes cellules géantes (3jai, i.e. jours après inoculation) induites par *M. incognita*. Chez le sauvage, la cellule géante (*) est binucléée (A). Chez le mutant *map65-3* un seul noyau est observé.

C et D: Coupes de galls à 10 jai. La cellule géante chez le sauvage (C) présente des structures ressemblant à des fragments de parois, les minis plaques cellulaires (flèche). Des parois avortées inhabituelles sont observées chez le mutant *map65-3* (D).

E et F: Coupes de galls à 21jai. La cellule géante chez le sauvage (C) est mature, et le nématode (N) a effectué ses mues jusqu'au stade J4 (E). Chez le mutant *map65-3*, la cellule géante dégénère et le nématode meurt à un stade larvaire précoce J3 (F). Les coupes sont colorées au rouge de ruthénium (C et D) ou au bleu de toluidine (E et F), barre: 20µm (A à D) et 40µm (E et F). D'après Caillaud et al. (2008b).

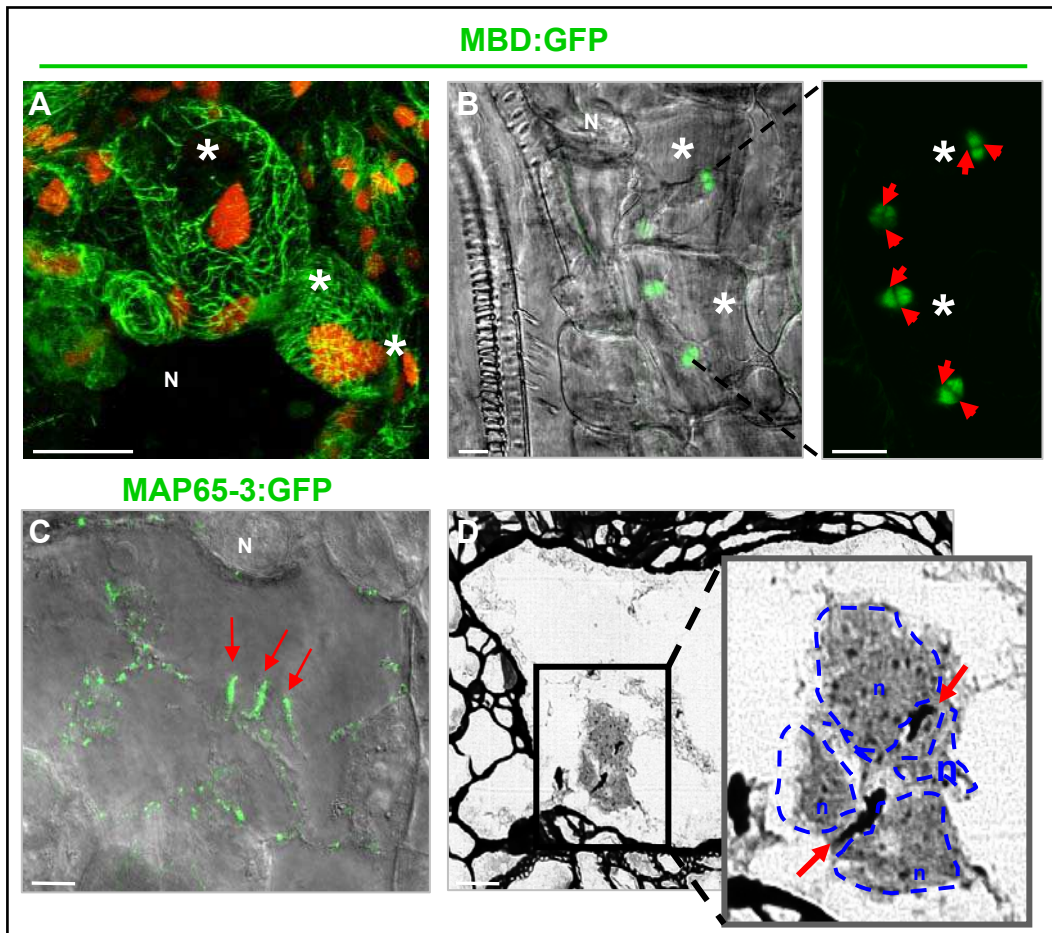


Figure 16: Cellules géantes en formation.

A: Observation *in vivo* au microscope confocal de cellules géantes (*) co-exprimant MBD-GFP (en vert) et H2B-YFP (en rouge). Sept jours après infection les cellules géantes polynucléées présentent de larges faisceaux de microtubules corticaux. barre: 20 μ m

B: Observation de « mini » phragmoplastes synchrones dans les cellules géantes en formation *in vivo* exprimant MBD-GFP (en vert) . barre: 10 μ m

C: Localisation de MAP65-3:GFP (vert) au niveau de « mini » plaques cellulaires (flèche rouge) dans les cellules géantes à 14jai. barre: 20 μ m

D: Coupes de cellules géantes en formation à 10jai montrant les « mini » plaques cellulaires séparant les noyaux fils barre: 10 μ m. D'après Caillaud et al.(2008b).

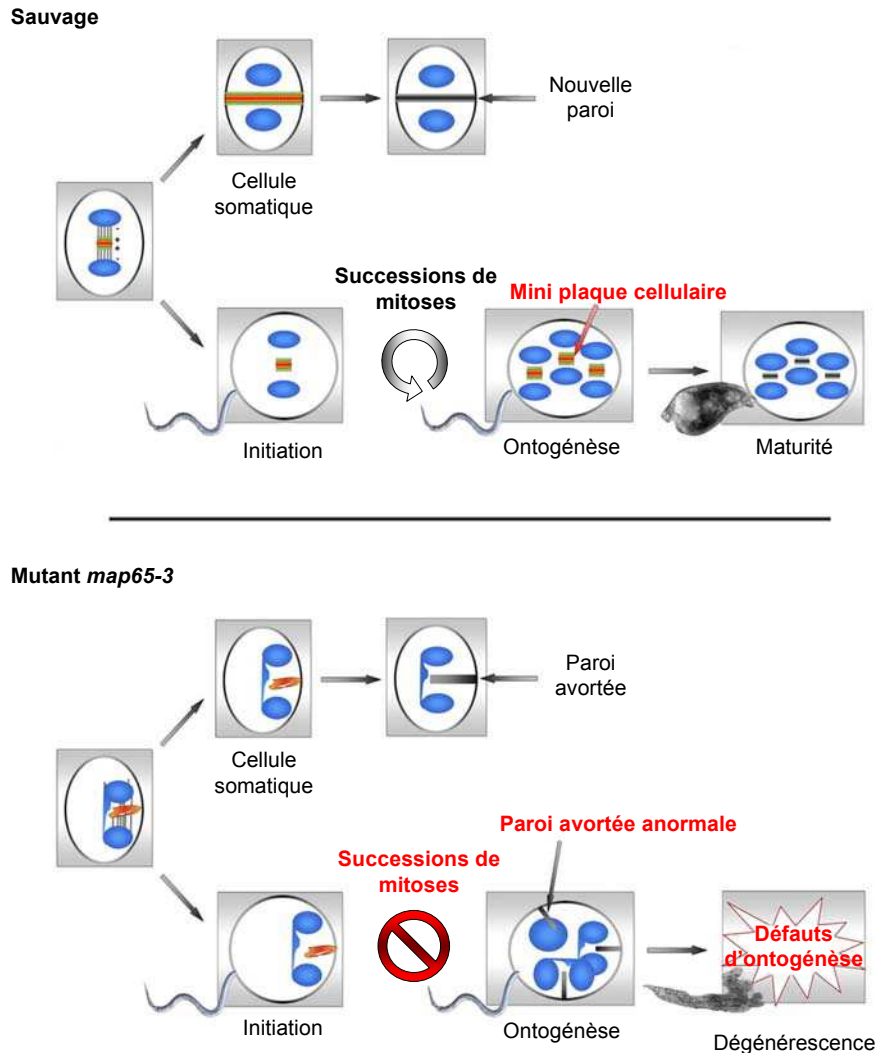


Figure 17: Rôle de MAP65-3 durant l'ontogénèse des cellules géantes.

Chez le sauvage, dans les cellules géantes, la cytokinèse est initiée afin de permettre une barrière physique entre les deux noyaux fils. Mais la croissance de la plaque cellulaire est très vite bloquée permettant ainsi d'enchaîner les mitoses suivantes et ainsi former la cellule géante polynucléée mature.

Dans les mutants *map65-3*, la cytokinèse est aussi initiée, mais l'accumulation de défauts (parois avortées, noyaux connectés) au cours des mitoses successives, conduit à une dégénérescence du site nourricier et à la mort du nématode. D'après Caillaud et al.(2008b).

C Recherche de partenaires protéiques de MAP65-3.

Au vu du rôle clef de MAP65-3 au cours de la mitose et de la cytokinèse et le rôle essentiel qu'elle joue dans l'ontogenèse des cellules géantes, mon laboratoire s'est intéressé à ses potentiels interactants, dans le but de préciser son rôle et / ou sa régulation.

Afin d'identifier des partenaires protéiques de MAP65-3, une approche de double hybride en levure a été initiée au laboratoire. L'utilisation de cette protéine comme appât et une banque d'ADNc de méristèmes d'*A. thaliana* comme proie a permis d'identifier un premier interactant de MAP65-3. Cette protéine d'*A. thaliana* (At3g19590) présente une forte homologie avec les protéines BUB3 de la levure et de l'homme. Chez les animaux, la protéine BUB3 fait partie d'un complexe de surveillance de la mitose: le « Mitotic Checkpoint Complex » (MCC), impliqué dans la surveillance de l'assemblage du fuseau : le « Spindle Assembly Checkpoint » ou SAC.

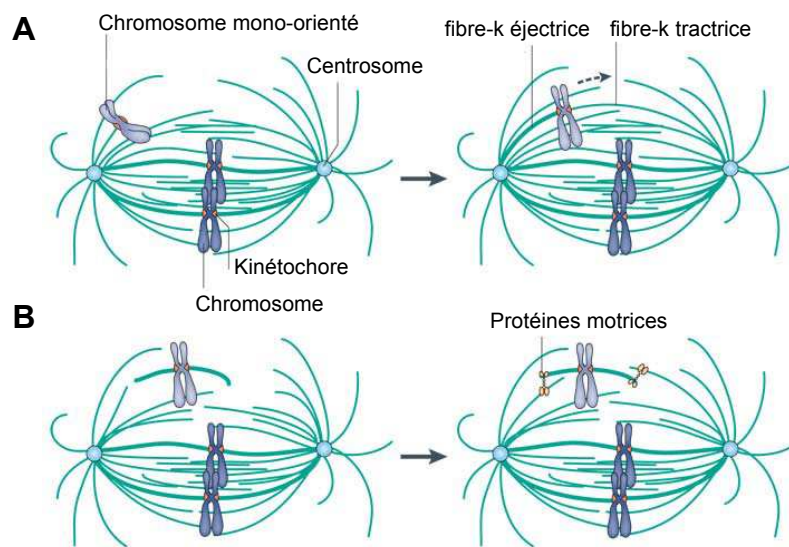


Figure 18: Les différents modèles d'attachements kinétochores / fuseau mitotique.

A: Le traditionnel modèle de « **Recherche et capture** »: un chromosome mono-orienté près d'un pôle attendant d'être capturé par un microtubule émanant du pôle opposé. Le chromosome commence sa congression vers la plaque métaphasique (flèche unilatérale) grâce aux forces éjectrices de la fibre kinétochorienne (fibre-k) initiale et aux forces tractrices de la nouvelle fibre-k plus fine.

B: Le modèle « **d'auto-assemblage** » où les fibres kinétochoriennes peuvent être nucléées à proximité des kinétochores. Ces fibres kinétochoriennes sont prises en charge par des protéines motrices (vers les extrémités -) permettant leurs incorporations dans le fuseau, et dirigeant leurs croissances vers les pôles. D'après Walczak et al.(2010).

Chapitre 3. LE POINT DE SURVEILLANCE DE LA MITOSE

Un des événements clés de la mitose est la transition métaphase-anaphase où le matériel génétique doit être correctement partagé entre les deux cellules filles. Ce partage de l'ADN est assuré d'une part, par l'attachement des kinétochores aux fibres du fuseau et d'autre part, par un mécanisme de surveillance qui va s'assurer que cet attachement est correct. Ce mécanisme de surveillance est nommé le « **Spindle Assembly Checkpoint** » ou SAC.

I. L'attachement des chromosomes au fuseau mitotique.

A La capture des kinétochores par les fibres du fuseau mitotique.

a Les mécanismes de congression des chromosomes.

Lors de la prométaphase, les chromosomes présentent des trajectoires complexes dont l'objectif final est leurs congressions, i.e. leurs alignements sur la plaque métaphasique ainsi que leurs bi-orientations (attachements des deux kinétochores frères par des microtubules émanant des deux pôles opposés). Deux modèles différents expliquant les mécanismes de capture des kinétochores par les fibres du fuseau mitotique ont été décrits : le modèle de recherche et capture ainsi que le modèle d'auto-assemblage.

Le modèle de « **recherche et capture** » est le premier modèle décrit, obtenu sur des cellules de poumons de triton (Waters et al., 1996). Ce modèle propose que la nucléation des microtubules ait lieu au niveau des centrosomes (Figure 18A). Les microtubules sont continuellement soumis à l'instabilité dynamique et leur extrémité (+) s'allongent dans des directions aléatoires de l'espace cellulaire à la recherche de kinétochores. Lorsqu'un kinétochore est attaché à un microtubule, le chromosome mono-orienté est alors souvent redirigé près du pôle correspondant. Son kinétochore non attaché fait face, attendant sa capture par un microtubule émanant du pôle opposé. Quand le kinétochore est capturé par un microtubule du pôle opposé, le chromosome est alors bi-orienté et commence sa congression au centre du fuseau (pour revue, Biggins and Walczak, 2003; Maiato and Sunkel, 2004).

Plus récemment un autre modèle a été décrit et s'appuie sur la capacité «**d'auto-assemblage**» du fuseau mitotique (Figure 18B). Différentes observations ne pouvaient pas être expliquées par le modèle précédemment décrit : en effet, la formation de fuseaux bipolaires était observée même en

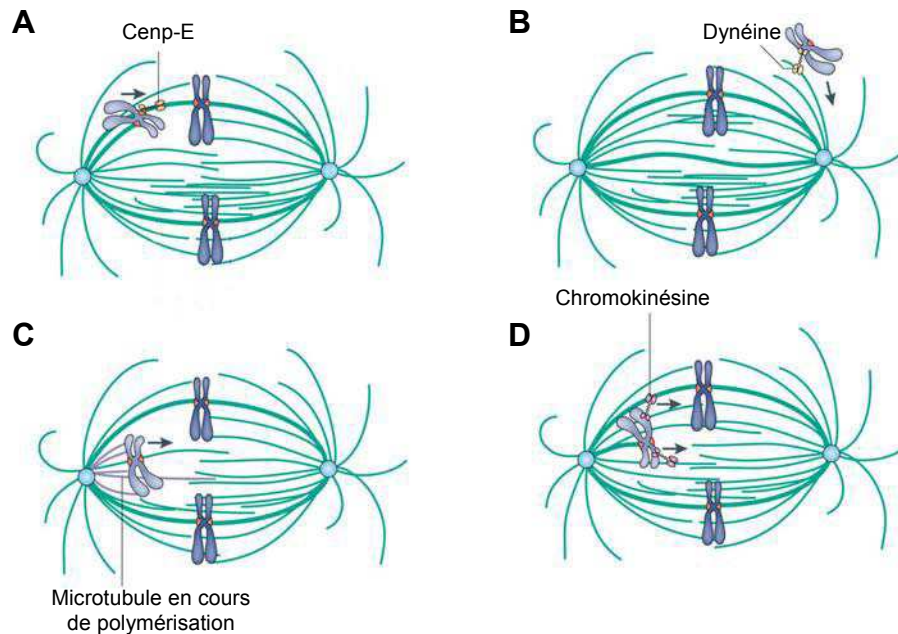


Figure 19: Modèle de congrégation et congrégation assistée .

A: Un chromosome mono-orienté peut être transporté le long d'un microtubule kinétochorien d'un chromosome déjà bi-orienté et aligné à l'aide de la protéine motrice (vers extrémités +): la kinésine CENPE.

B: La dynéine cytoplasmique, protéine motrice (vers extrémités -), contribue au mouvement des chromosomes vers les pôles, avec des kinétochores associés latéralement (représenté ici) ou non.

C: Un chromosome mono-attaché peut être repoussé vers le centre de la cellule par les forces d'éjection appliquées par la polymérisation des microtubules du fuseau.

D: Les chromokinésines, protéines motrices, sont capables de lier les bras des chromosomes et de les transporter vers la plaque métaphasique. D'après Walczak et al.(2010).

absence de centrosome (Karsenti et al., 1984). La toute première expérience chez les animaux a montré que le fuseau mitotique s'organisait de façon autonome autour de billes d'ADN dans des extraits d'œufs de xénope privés de centrosomes (Heald et al., 1996). Depuis ce concept est de plus en plus étudié et validé (Khodjakov et al., 2003; Maiato et al., 2004; O'Connell et al., 2009). Ce mécanisme d'assemblage du fuseau intervient de manière physiologique dans le système méiotique où il n'y a pas de centrosomes (Matthies et al., 1996; Tournebize et al., 1997). Dans ce modèle, les fibres kinétochoriennes nucléées à proximité des chromosomes peuvent être capturées par les kinétochores, et lier les microtubules du fuseau grâce à des protéines motrices de type dynéine (vers les extrémités (-)), dirigeant ainsi leurs croissances vers les pôles opposés (Khodjakov et al., 2003; Walczak et al., 1998). Cette voie n'est pas limitée aux cellules dépourvues de centrosomes. En effet dans des cellules somatiques de vertébrés (Bonaccorsi et al., 1998; Megraw et al., 2001), le fuseau mitotique est capable de s'assembler correctement après ablation des centrosomes (Khodjakov and Rieder, 2001; Khodjakov et al., 2000). Il semble donc que ces deux voies d'assemblage du fuseau puissent coexister dans une même cellule. A la confluence de ces deux mécanismes, une étude chez *S. cerevisiae* montre que les kinétochores sont capables de générer des microtubules d'une durée de vie très courte et dont le but est d'accélérer leur capture par les microtubules émanant des « spindle pole body » localisés aux pôles. Ainsi, une MAP, STU2, l'orthologue de XMAP215 est responsable de la nucléation et de l'allongement de ces courts microtubules kinétochoriens. Ce mécanisme est notamment décrit lorsque les kinétochores sont très éloignés des pôles (Kitamura et al., 2010).

o ***Congression et congression assistée.***

Un chromosome bi-orienté mais non aligné sur la plaque métaphasique va subir des forces émanant des fibres kinétochoriennes. La fibre kinétochorienne (fibre-k) éjectrice (qui est épaisse) va repousser le chromosome vers le centre de la cellule et la fibre-k tractrice (plus fine) va tirer le chromosome (Figure 18A). Les différentes forces s'équilibreront lorsque le chromosome sera au centre de la cellule. Le modèle de congression assistée explique comment un chromosome mono-orienté peut être transporté le long d'un microtubule kinétochorien d'un chromosome déjà bi-orienté et aligné à l'aide de la kinésine **CENP-E**. CENP-E est associée au kinétochore et se déplace le long du microtubule vers l'extrémité (+) de celui-ci, facilitant ainsi la capture du deuxième kinétochore du chromosome mono-orienté (Kapoor et al., 2006) (Figure 19A). Une autre protéine motrice peut être impliquée dans ce mécanisme, il s'agit de la dynéine cytoplasmique qui permet un transport rétrograde vers les pôles d'un chromosomes mono-attaché, ou non (Figure 19B). D'autre part, un chromosome mono-orienté peut être repoussé vers le centre de la cellule par les forces d'éjection appliquées par la polymérisation des microtubules du fuseau (Figure 19C). Le chromosome se retrouve donc au niveau de la plaque équatoriale, son kinétochore non attaché faisant face aux microtubules émanant du pôle opposé, facilitant ainsi un second attachement (Kops et al., 2010). D'autres protéines motrices, comme les KID qui sont des chromokinésines, peuvent lier les bras des chromosomes aux microtubules et les tirer vers

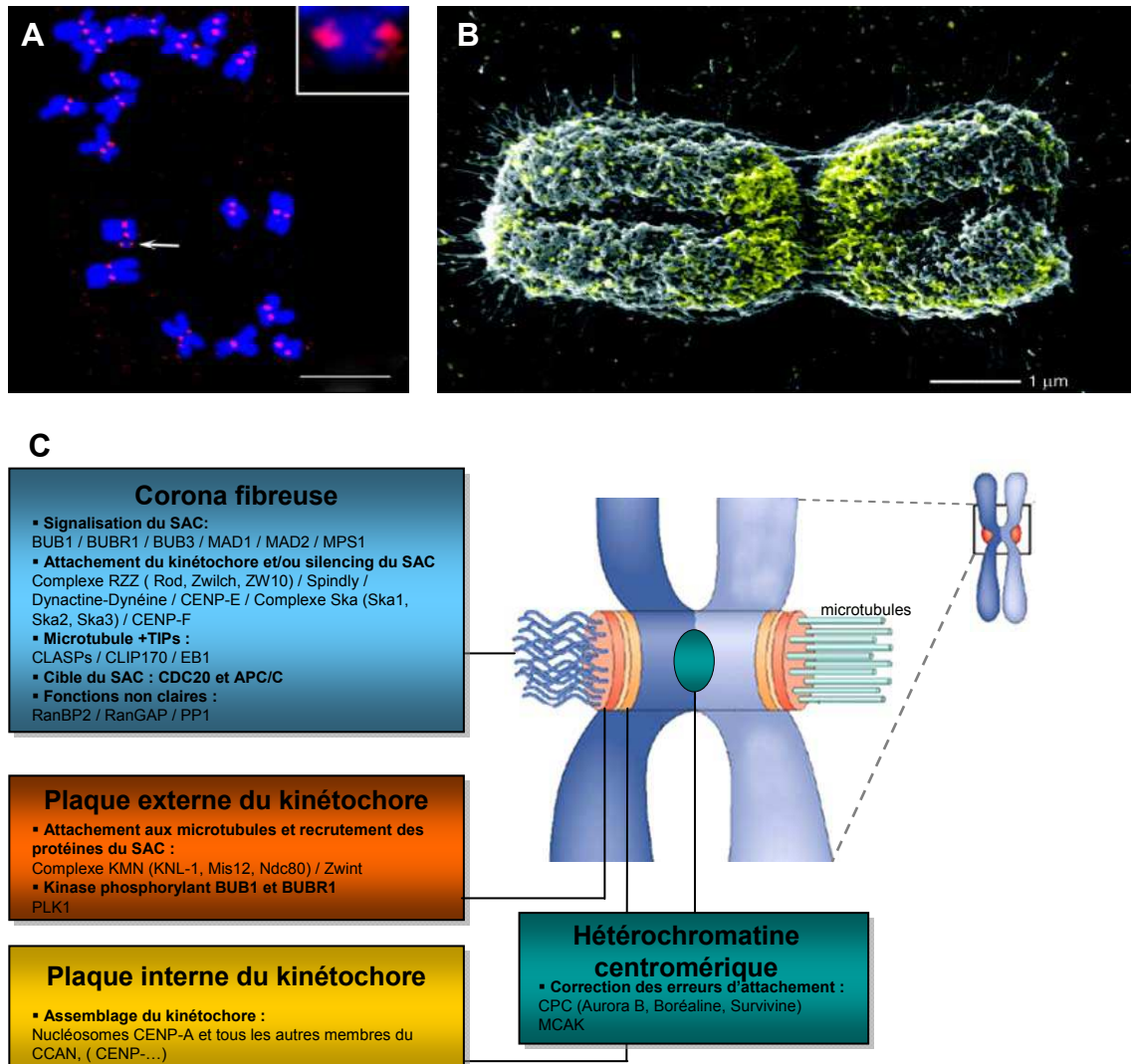


Figure 20: Organisation structurale des kinétochores.

A: Immunolocalisation de CENH3 (en rouge) sur des chromosomes (marqué au DAPI, bleu) de maïs, confirmant la présence d'un centromère fonctionnel. D'après Fu et al. (2013). Barre: 5µm.

B: Microscopie électronique indiquant une phosphorylation de l'Histone H3 s'accumulant au niveau de la chromatine péricentromérique (signal jaune). D'après Houben and Schubert (2003). Barre: 1µm

C: Représentation schématique d'un chromosome mitotique avec sa paire de chromatides sœurs. Le kinétochore de droite est attaché aux microtubules, celui de gauche n'est pas attaché. En encadré: vue d'ensemble des principaux complexes protéiques en fonction de leurs localisations au niveau des kinétochores. Modifiés d'après Silva et al.(2011).

la plaque métaphasique (Figure 19D). Tous ces mécanismes permettent ensemble de faciliter et d'accélérer les processus de congression des chromosomes lors de la prométaphase (pour revue, Walczak et al., 2010).

b Les acteurs majeurs de l'attachement des microtubules.

Le **kinétochore** est une structure multiprotéique se formant au niveau des centromères de chaque chromatide sœur (pour revue, Cheeseman and Desai, 2008; Santaguida and Musacchio, 2009) (Figure 20A,B). Cette structure se met en place durant la mitose, participe à l'attachement des MT. Elle est de plus le point d'assemblage des protéines impliquées dans le **point de contrôle du fuseau mitotique** ou **SAC**. Le kinétochore est une structure indispensable à la ségrégation des chromosomes chez les eucaryotes, que ce soit chez les unicellulaires comme *S. cerevisiae* (Wigge and Kilmartin, 2001) ou les métazoaires dont *H. sapiens* (DeLuca et al., 2005), comme chez les végétaux dont *Z. maïs* (Dawe and Cande, 1996).

Chez les végétaux, les kinétochores apparaissent plutôt comme une structure arrondie, désorganisée (Jensen, 1982; Yu et al., 1999). En revanche chez les animaux, le kinétochore dévoile une structure trilamellaire organisée, formée d'une plaque interne, d'une plaque externe et d'un matériel fibrillaire, appelé corona qui s'étend sur toute la surface de la plaque externe et qui correspond au site majeur de capture des microtubules par le kinétochore (Figure 20C) (Choo, 1997). La plaque interne accolée à l'ADN centromérique permet l'organisation spécialisée de la chromatine centromérique. L'ADN centromérique correspond à une succession d'éléments répétés non codants extrêmement variable entre les espèces et est entouré de part et d'autre par de l'hétérochromatine péricentromérique (Henikoff and Furuyama, 2010). Les centromères d'*Arabidopsis* sont composés d'éléments répétés de 178 pb sur plusieurs mégabases (Zhang et al., 2008) (pour revue chez les plantes, Birchler et al., 2011; Houben and Schubert, 2003). Il est aujourd'hui admis que l'identité et la fonction du centromère sont définies épigénétiquement et dépendent d'une structure chromatiniennne spécialisée plutôt que de la séquence d'ADN sous-jacente. Contrairement à la séquence d'ADN, la chromatine associée aux centromères présente des caractéristiques relativement bien conservées à travers les eucaryotes. La caractéristique sans doute la plus importante, conservée à travers tous les eucaryotes étudiés, est la présence de la protéine **CENP-A** (« Centromeric Protein A ») nommée aussi **CENH3** (« Centromeric Histone3 »), qui est spécifiquement et exclusivement localisée dans la chromatine centromérique (Lermontova et al., 2011) (Figure 20B).

Les protéines CENP-A s'organisent en octamères autour desquelles s'enroulent les molécules d'ADN, constituant ainsi des nucléosomes (Allshire and Karpen, 2008). CENP-A permet le recrutement de protéines centromériques : le réseau de protéines constitutives des centromères ou **CCAN** (« Constitutive Centromere Associated Network ») composé d'au moins 16 protéines (pour revue, McAinsh and Meraldi, 2011). Le kinétochore comprend au moins 80 protéines, regroupées en

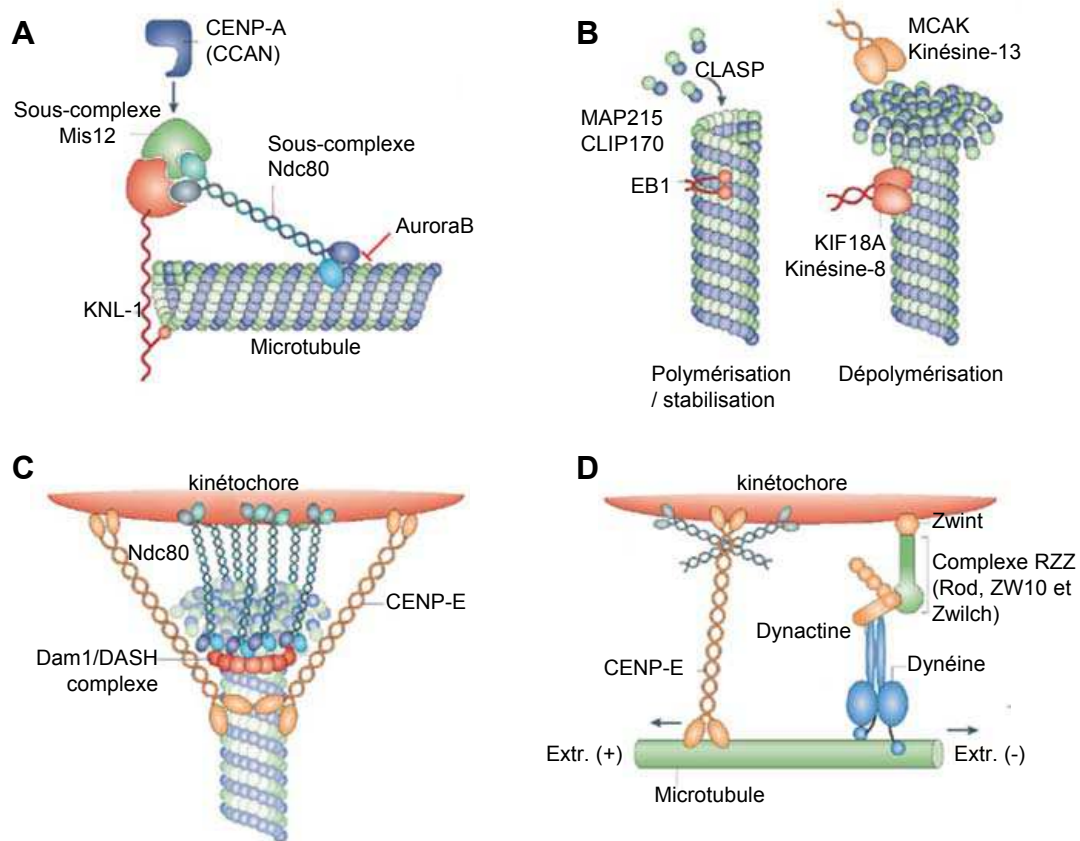


Figure 21: Représentation schématique de la liaison kinétochores / microtubules.

A: Schématisation du complexe KMN. Les composants du KMN: KNL-1, le sous-complexe MIS12 et le sous-complexe Ndc80 permettent la liaison des microtubules aux centromères via CENP-A du réseau de protéines constitutives des centromères ou CCNA. L'association de KNL1 et Mis12 génère un site de liaison pour le sous-complexe Ndc80.

B: Les protéines impliquées dans le contrôle de la dynamique des microtubules. CLIP, CLASP, MAP215 sont les MAPs majeures impliquées dans la favorisation de la polymérisation des microtubules aux niveaux des kinétochores. EB1 lie et stabilise les microtubules. Les activités majeures de dépolymérisation sont réalisées par la kinésine-13 et KIF18-A, une kinésine-8 qui possède en plus de l'activité dépolymérase une activité motrice.

C: Le dynamisme liaison Kinétochoire / microtubule. Chaque microtubule serait lié par de multiples sous-complexes Ndc80. Chez les champignons, la liaison avec les microtubules est assurée en plus par le complexe Dam1/DASH, structure en anneau autour du microtubule. La kinésine CENP-E lie les microtubules en aval de Ndc80, permettant ainsi un mouvement des chromosomes tout en conservant la liaison.

D: Les protéines motrices. Les deux protéines motrices localisées au niveau des kinétochores sont CENP-E (vers extrémités +) et la Dynéine (vers extrémités -). Le complexe Dynéine/Dynactine est recruté par le complexe RZZ (Rod, Zw10 et Zwilch) qui est lié au kinétochoire via Zwint et le complexe KMN. D'après Cheeseman and Desai (2008)

sous complexes, qui seront discutées dans les différentes parties de cette introduction en fonction de leurs rôles (Figure 20C) (Silva et al., 2011). Lors de l'anaphase, les kinétochores sont les seuls moteurs essentiels à la ségrégation des chromosomes. Les kinétochores doivent maintenir un attachement stable aux extrémités des microtubules tout en leur laissant une grande liberté de dynamique (polymérisation/dépolymérisation). Chez la plante, très peu d'études révèlent le nombre de MT/kinétochore : de 70 à 100 MT/kinétochore chez *Haemanthus katherinae* (Jensen, 1982), un seul MT chez *S. cerevisiae*, 2 à 4 chez *S. pombe* et chez l'humain entre 25 à 40 MT par kinétochore (Wendell et al., 1993). Plus de 40 protéines sont nécessaires à la formation des fibres kinétochoriennes ainsi qu'à leurs attachements permanents (Santaguida and Musacchio, 2009).

Quand les cellules rentrent en mitose, le CCAN du kinétochore crée une plateforme recrutant les différents acteurs de l'interaction kinétochore/microtubules. Le CCAN va ainsi assembler le complexe **KMN** (composé des sous complexes KNL-1/BLINKIN, MIS12 et NDC80/HEC1), considéré comme l'acteur le plus important de l'interaction kinétochore/microtubules en plus de son rôle clé dans l'organisation du SAC, car il possède des sites de liaisons aux microtubules et au kinétochore (Figure 21A). Ce complexe KMN est composé de **KNL1** (« Kinetochore NuL1 family member »), du sous-complexe **MIS12** (« Minichromosome Instability ») et du sous-complexe **NDC80-NUF2** (« Nuclear Division Cycle 80 et Nuclear Filament-containing protein 2 ») (pour revue, Foley and Kapoor, 2012; Takeuchi and Fukagawa, 2012). Côté plaque externe et corona, le complexe NDC80-NUF2 permet la liaison directe aux monomères de tubuline via des interactions électrostatiques (Ciferri et al., 2008). De plus, chez les vertébrés, cet attachement NDC80/microtubules serait stabilisé par un complexe de 3 protéines, SKA1, SKA2 et SKA3 (Spindle and Kinetochore Associated 1) (Jeyaprakash et al., 2012). Des études récentes montrent que le complexe NDC80 serait capable de se mouvoir le long des microtubules (Alushin et al., 2012) ce qui expliquerait comment l'extrémité (+) des microtubules peut se lier aux kinétochores et en même temps conserver leur dynamique (gain et perte des sous unités de tubuline). De l'autre côté du sous-complexe NDC80-NUF2, ses sous unités SPC24 et SPC25 (Spindle Pole body Component) permettent de lier ce complexe NDC80-NUF2 à la plaque interne du kinétochore via MIS12 (pour revue, Petrovic et al., 2010). MIS12 est associé à KNL1 et au complexe NDC80-NUF2 mais contrairement à KNL1 et NDC80-NUF2, MIS12 ne lie pas directement les microtubules aux kinétochores. C'est une des protéines constitutives des centromères, CENP-A qui permet le recrutement des complexes KNL1 et MIS12 sur la plaque interne des kinétochores (Figure 21A) et c'est l'association de KNL1 et MIS12 qui génère le site de liaison du complexe NDC80-NUF2 sur la plaque externe. La protéine KNL1 est quant à elle aussi capable d'interagir avec le microtubule et serait aussi importante pour l'attachement kinétochore/microtubule (Cheeseman et al., 2006). Chez les champignons, le complexe NDC80 n'est pas essentiel pour l'interaction avec les microtubules (Kemmler et al., 2009). Chez la levure bourgeonnante, l'interaction est médiée via une structure en anneau autour du microtubule, le complexe Dam1/DASH (Figure 21C), associé avec l'extrémité

dynamique des microtubules et essentiel à l'attachement ainsi qu'à la stabilité du fuseau (Cheeseman et al., 2001).

Chez les animaux, le recrutement des microtubules aux kinétochores est aussi facilité par un complexe de protéines de la plaque interne, le **CPC** (« Chromosomal Passenger Complex ») qui favorise l'assemblage des microtubules même en absence de Ran GTP (Maresca et al., 2009). Le CPC, comprenant **Aurora B kinase**, **INCENP**, la **Survivine** et la **Borealine**, participe à la régulation du Point de surveillance de la mitose en déstabilisant les attachements incorrects du fuseau (van der Waal et al., 2012). La liaison aux microtubules est régulée via la phosphorylation de NDC80 (et du complexe Dam1/DASH) par la kinase Aurora B. Une étude suggère que les kinétochores seuls, suffiraient à initier et maintenir l'attachement des microtubules de part la stabilité que leurs liaisons impliquent (Akiyoshi et al., 2010).

Ensemble ces complexes CPC et KMN permettent la régulation et l'attachement des microtubules aux kinétochores (Foley and Kapoor, 2012; McEwen and Dong, 2010). De plus, le complexe KMN pourra recruter la protéine Zwint et le complexe **RZZ** (composé de Rod/Rough deal, Zw10 et Zwilch) qui engagera à son tour le complexe de la **dynéine/dynactine**, protéine motrice d'extrémité (-) permettant le mouvement des chromosomes attachés le long des microtubules (Karess, 2005) *via* une autre protéine : Spindly (Figure 21D). D'autres composants moteurs se trouvent aux kinétochores tels que la kinésine **CENP-E** impliquée dans l'attachement aux microtubules et le mouvement des chromosomes. Certaines protéines sont impliquées dans le contrôle de la dynamique des microtubules. CLIP170 (« Cytoplasmic Linker Protein 170 »), CLASP (« Cytoplasmic Linker Associated Protein »), MAP215 (« Microtubule Associated Protein215 ») sont les MAPs majeures impliquées dans la favorisation de la polymérisation des microtubules au niveau des kinétochores (Cheeseman and Desai, 2008) (Figure 21C). D'autres +TIP, telle qu'EB1 (« End Binding1 ») lie et stabilise les microtubules. En anaphase, lors de la ségrégation des chromosomes, les protéines de type dépolymérase permettent d'induire la catastrophe directement ou indirectement sur l'extrémité (+) des microtubules, et contribuent au mouvement des chromatides sœurs tout en conservant la liaison kinétochore / microtubules. Les activités majeures de dépolymérisation sont réalisées par la kinésine-13 (MCAK) et KIF18-A, une kinésine-8 qui possède en plus de l'activité dépolymérase une activité motrice. Le recrutement des MCAK aux centromères augmente la vitesse des chromosomes, l'amplitude des oscillations sur la plaque métaphasique et la coordination entre les kinétochores frères (Joglekar et al., 2010).

○ *Les homologues chez les végétaux*

Chez les végétaux, seul un membre du CCAN a été identifié : il s'agit de l'homologue de CENP-A appelé **CENH3** ou **HTR12** (« Histone H3-like centromeric protein ») (Talbert et al., 2002). Son inactivation chez *Arabidopsis* conduit à la stérilité des plantes due à une ségrégation aléatoire des chromosomes lors de la méiose (Ravi et al., 2011). Ce phénotype est dû à une absence de recrutement

par CENH3 de la protéine MIS12 du complexe KMN. Parmi le complexe KMN, les homologues de NDC80 et MIS12 ont été identifiés chez le maïs (Du and Dawe, 2007; Li and Dawe, 2009) et présentent une localisation kinétochorienne. Certains composants du complexe NDC80 ont aussi été identifiés chez les plantes *in silico* (Meraldi et al., 2006) mais n'ont pas encore été caractérisés tant en terme de localisation subcellulaire ou de leur interaction avec NDC80. La protéine MIS12 a aussi été identifiée et caractérisée chez les végétaux (Nagaki et al., 2009; Sato et al., 2005). Le maïs possède ainsi deux copies du gène *MIS12* (Nagaki et al., 2009). Les gènes codant pour MIS12-1 et MIS12-2 sont tous les deux exprimés et leur immunolocalisation révèle que les deux protéines sont localisées aux kinétochores tout au long du cycle cellulaire tout comme les homologues de CENH3, CENP-C et NDC80 du maïs. L'inactivation totale des gènes conduit à une aneuploidie tellement sévère que les plantes sont stériles (Li and Dawe, 2009). L'inactivation partielle des gènes montrent une séparation prématurée des chromatides sœurs lors de la méiose, conduisant à des défauts de ségrégation des chromosomes. La présence d'homologues des protéines des complexes CCAN et KMN indique que les premières étapes de l'échafaudage du kinétochore sont identiques chez les végétaux.

Chez les végétaux, la famille des kinases Aurora B est dupliquée en trois exemplaires *AtAurora1*, *AtAurora2* et *AtAurora3* chez *Arabidopsis* (Van Damme et al., 2004). Ces 3 kinases phosphorylent CENH3 (Demidov et al., 2009) et l'inhibition de leurs activités montrent un rôle dans la transition métaphase/anaphase et dans la ségrégation des chromosomes en cellules BY2 du tabac (Kurihara et al., 2006). *AtAurora1* et *AtAurora2* localisent au niveau des noyaux pendant l'interphase et sur le fuseau mitotique dans les cellules en division ainsi qu'avec la nouvelle plaque cellulaire émergente dans des cellules de tabac BY-2 (Van Damme et al., 2011). *AtAurora1* aurait aussi un rôle dans la nucléation acentrosomale des microtubules à partir des noyaux et de microtubules déjà existants (Binarová et al., 2000; Murata et al., 2005). Leurs inactivations révèlent un rôle supplémentaire par rapport aux animaux dans la cytokinèse. Il semblerait que ce soit *AtAurora3* qui ait un rôle similaire à la Kinase Aurora B animale du CPC de part sa localisation sur les kinétochores lors de la mitose (Kawabe et al., 2005) et sa surexpression entraînerait un désassemblage du fuseau mitotique et une altération de l'orientation de la division cellulaire. Les mécanismes moléculaires associés aux Kinases Aurora ne sont pas encore bien identifiés chez les plantes. Les autres homologues des protéines du CPC : INCENP, Survivine et Boréoline n'ont pas encore été identifiées (Petrovská et al., 2012). Cependant, une étude s'intéresse à un orthologue putatif d'INCENP chez *Arabidopsis*, nommé WYR (Kirioukhova et al., 2011). Les mutants *wyr* présentent des défauts lors de division cellulaire dans le gamétophyte mâle et dans l'endosperme et un défaut de cytokinèse lors de l'embryogénèse suggérant un rôle conservé chez les végétaux. WYR serait donc la seconde sous unité du complexe CPC découverte chez les plantes après les Aurora Kinases. Cependant, comme les homologues du CPC n'ont pas été retrouvés chez les végétaux, il semblerait que ce soit les Kinases Aurora qui coordonneraient les événements spatiotemporels de la mitose et de la cytokinèse et possèderaient des fonctions supplémentaires par rapport aux animaux (Kirioukhova et al., 2011).

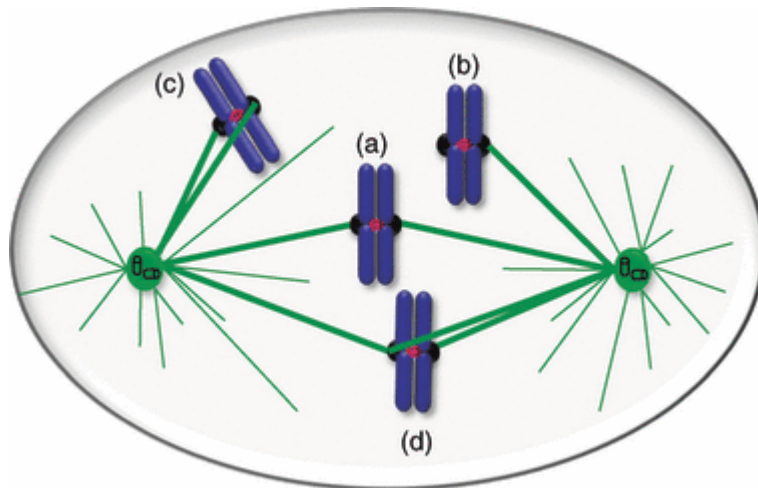


Figure 22: La bi-orientation et les erreurs d'attachements aux kinétochores.

(a) Attachement amphitélisque: les deux kinétochores frères sont correctement liés aux microtubules du fuseau mitotique émanant des pôles opposés. **(b) Attachement monotélique:** un seul des kinétochores est attaché, conduisant à un chromosome mono-orienté. **(c) Attachement syntélique:** le chromosome est mono-orienté mais dans ce cas, les deux kinétochores sont liés aux microtubules émanant du même pôle. **(d) Attachement mérotélique:** les deux kinétochores sont liés mais un kinétochore est lié aux microtubules émanant des deux pôles. Le chromosome n'est donc pas correctement bi-orienté et si l'erreur n'est pas corrigée, peut conduire à des défauts de ségrégation. D'après Silva et al., (2011).

B Les erreurs d'attachement

Du fait de la nature stochastique de la rencontre microtubules / kinétochores, les erreurs d'attachements sont fréquentes (Cimini et al., 2003). Pour que chaque cellule fille possède un même patrimoine génétique, la cellule doit assurer une ségrégation correcte des chromatides sœurs. Pour cela, les chromosomes doivent établir un attachement **amphitélisque** (Figure 22a), c'est-à-dire que chaque kinétochore frère est relié à un centrosome opposé. Cependant, la cellule effectue parfois des erreurs d'attachement des kinétochores que l'on nomme **monotélisque** (Figure 22b), lorsque seulement un kinétochore est attaché; **syntéliques** lorsque les deux kinétochores sont attachés au même pôle (Figure 22c) et enfin **mérotélisque** lorsque le même kinétochore est attaché aux deux pôles opposés (Figure 22d). Les défauts d'attachement sont souvent corrigés avant l'anaphase grâce au « Chromosomal Passenger Complex » (van der Waal et al., 2012). Ce complexe localisé au niveau des centromères surveille la tension exercée sur les kinétochores et permet la déstabilisation des attachements incorrects dans le but d'obtenir un attachement amphitélisque des chromosomes (Lampson et al., 2004; Tanaka et al., 2002).

II. Le Point de Contrôle du fuseau mitotique ou « Spindle Assembly Checkpoint » (SAC).

A Présentation générale du SAC.

La capture des kinétochores par les microtubules est un processus aléatoire, de ce fait tous les chromosomes n'achèvent pas leur bi-orientation et n'atteignent pas la plaque métaphasique simultanément. Pourtant, la séparation des chromatides sœurs de tous les chromosomes se fait de manière synchrone au moment de l'entrée en anaphase permettant la ségrégation équitable des chromosomes sans induire une perte ou un gain d'un ou plusieurs chromosomes dans les cellules filles (aneuploïdie). Cet événement indique que la cellule possède un mécanisme lui permettant de retarder le déclenchement de l'anaphase jusqu'à ce que tous les chromosomes soient alignés sur la plaque métaphasique. Ce mécanisme est le **point de contrôle du fuseau mitotique** ou « **Spindle Assembly Checkpoint** » (SAC) (Figure 23).

o L'APC/C.

Le SAC empêche l'entrée prématurée en anaphase en générant un signal qui va inhiber l'**E3 ubiquitine ligase APC/C** (« Anaphase-Promoting Complex / Cyclosome ») (Pines, 2011; pour revue chez les plantes, Heyman and De Veylder, 2012). Ce complexe E3 ubiquitine un certain nombre de

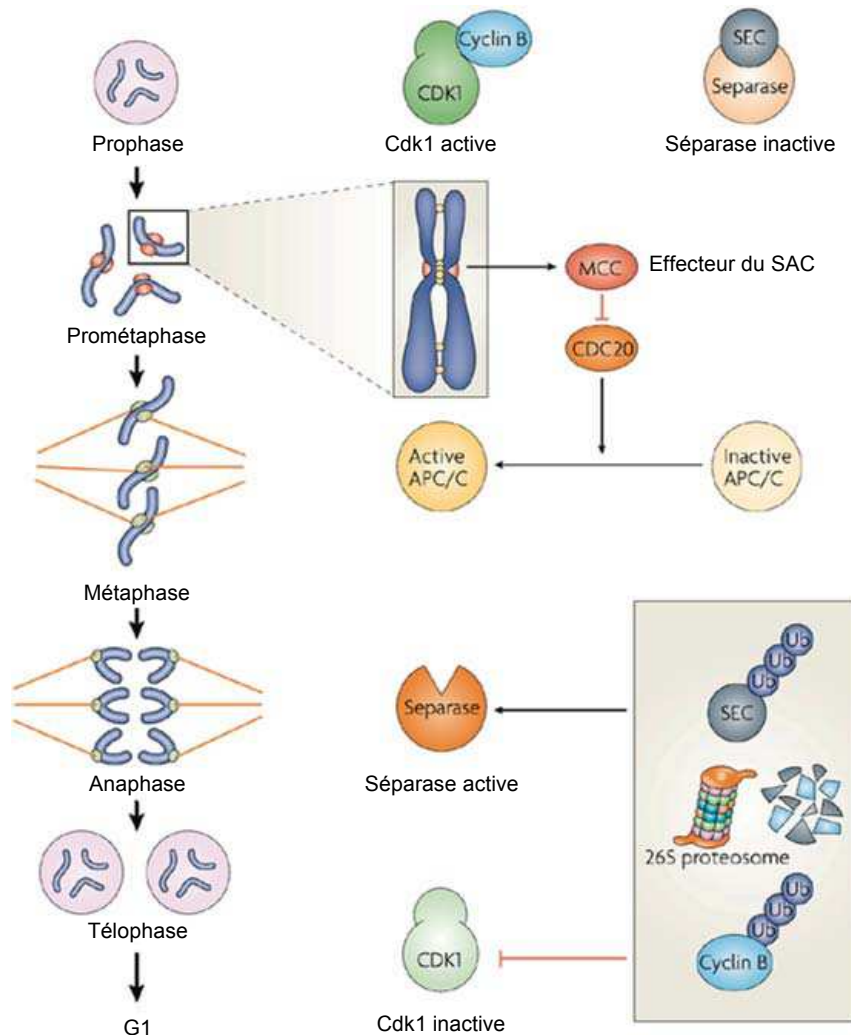


Figure 23: Le point de contrôle du fuseau mitotique.

La mitose est traditionnellement divisée en 5 phases consécutives: de la prophase à la téléphase. Pour entrer en mitose, les cellules ont besoin de l'activité du complexe Cdk1-CyclineB. La séparase est une protéase, elle est requise pour la dégradation des cohésines (cercles jaunes entre les chromatides), et agit lors de la transition métaphase / anaphase engendre la perte de cohésion entre les chromatides sœurs. Avant l'anaphase, la séparase est inactivée par sa liaison avec la Sécurité (SEC). En prométaphase, les kinétochores non attachés (en rouge) active le point de contrôle du fuseau mitotique (SAC) dont l'effecteur principal est le « Mitotic Checkpoint Complex ». Le MCC séquestre Cdc20, l'empêchant ainsi d'activer l'Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome (APC/C). Lorsque tous les kinétochores sont attachés (en vert) et les chromosomes bi-orientés, provoquant ainsi leurs congressions sur la plaque métaphasique, le signal généré par le SAC est inactivé. Cdc20 est alors relargué et active l'APC/C. Il en résulte une polyubiquitylation de la Cycline B et de la Sécurité, engendrant leurs destructions par le protéasome 26S. La séparase devient donc active et peut ainsi dégrader les cohésines, permettant la séparation des chromatides sœurs. La dégradation de la CyclineB inactive le complexe Cdk1-CyclineB, initiant la cytokinèse et la sortie de mitose. D'après Musacchio and Salmon (2007)

protéines cibles, les marquant ainsi d'une étiquette Ubiquitine conduisant à leurs destructions par le complexe protéolytique du **Protéasome 26S** (Fraschini et al., 2001; Hardwick et al., 2000; Millband and Hardwick, 2002; Sudakin et al., 2001). L'APC est inactif au cours des phases S et G2, il acquiert son activité au moment de l'entrée en mitose, notamment par la phosphorylation de plusieurs de ses sous unités par le MPF (« M-Phase-promoting Factor ») et par son interaction avec ses coactivateurs CDC20 (Cell division Cycle20) ou CDH1 (CCS52 chez les plantes) (pour revue Min and Lindon, 2012). Ses coactivateurs, **CDH1** et **CDC20** sont essentiels pour la reconnaissance et la spécificité de ces substrats. Les substrats de l'APC/C présentent des motifs de reconnaissance : la D-Box (Destruction-Box) et la KEN-Box (motif consensus KEN). Ces coactivateurs CDC20 et CDH1 présentent un domaine C-terminal WD40, permettant le recrutement et la liaison de la D-Box des substrats (Kraft et al., 2005). Une sous unité de l'APC/C, l'Apc10 est aussi essentielle pour la reconnaissance des substrats : elle permet le recrutement de substrats à motifs KEN-Box. Ensemble, la sous unité Apc10 et les cofacteurs forment un récepteur bipartite fonctionnel qui permettra la reconnaissance et l'ubiquitylation des substrats (Chao et al., 2012). Les substrats les plus importants de l'APC/C sont la **Cycline B**, une Cycline mitotique et la **Sécurine** et sont ubiquitylés par APC/C^{CDH1} et l'APC/C^{CDC20}, respectivement. La protéolyse de la Cycline B inactivera la CDK1 (Cycline Dependante Kinase 1) et permettra la sortie de mitose. La Sécurine est une protéine qui protège la protéase **Séparase**. Donc sa présence (non-dégradation) empêche l'activation de la Séparase responsable du clivage des **Cohésines**, complexes protéiques qui maintiennent ensemble les chromatides sœurs et empêche leurs migrations (pour revue, Oliveira and Nasmyth, 2010).

Chez les végétaux, l'APC/C a été identifié récemment (Capron et al., 2003; Lima et al., 2010). Les différentes sous unités sont conservées, mais ont été peu étudiées et les fonctions physiologiques sont encore mal connues. Chez *Arabidopsis*, l'APC/C est assez bien conservé et présente quelques particularités telles que la duplication de certains gènes et surtout des profils d'expression différents entre les sous unités (Eloy et al., 2006). Ces observations suggèrent qu'il pourrait y avoir plusieurs formes d'APC/C en fonction des sous unités engagées et permettre ainsi des fonctions différentes au cours du développement de la plante. En effet, les phénotypes associés à la perte de certaines sous unités révèlent des défauts lors de la gamétogenèse et l'embryogenèse (Capron et al., 2003; Eloy et al., 2011; Pérez-Pérez et al., 2008; Wang et al., 2012, 2013) ainsi que des défauts post-embryogenèse (Serralbo et al., 2006; Zheng et al., 2011). En plus de ces fonctions dans la régulation du cycle cellulaire, l'APC/C serait également requis dans le développement et l'organisation vasculaire (Marrocco et al., 2009) ainsi que dans l'homéostasie de la phytohormone auxine (Wang et al., 2012).

L'activation du SAC, inhibant l'APC/C, permet donc de prévenir la séparation des chromatides sœurs tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement attachés et alignés sur la plaque métaphasique. Ce point de contrôle permet de bloquer la progression mitotique pour corriger les erreurs d'attachements et permettre la bi-orientation des chromosomes (pour revue, Chan and Yen,

2003; Cleveland et al., 2003; Musacchio and Hardwick, 2002). Ce mécanisme de surveillance est fondamental pour la cellule car son absence conduit à des défauts de ploïdie tel que l'aneuploïdie des cellules. L'instabilité génomique, qui inclue des anomalies structurales et numériques de chromosomes, est une caractéristique du cancer. Les principales causes d'instabilité génomique sont des défauts du nombre de centrosomes, de l'attachement kinétochore/microtubule, du SAC et de la cohésion des chromosomes (Gordon et al., 2012). Une revue (Thompson et al., 2010) présentant les mécanismes d'instabilité chromosomique, recense la plupart des protéines du kinétochore et du SAC associées à leurs phénotypes mutants, étant pour la plupart impliqués dans la formation de cancers. Un exemple vient d'une maladie extrêmement rare, le Syndrome d'Aneuploïdie en Mosaïque (SAM) qui est caractérisée par des aneuploïdies entraînant des anomalies phénotypiques et une prédisposition élevée au cancer. Cette maladie est liée à des mutations sur un gène du SAC : *BUBR1* (Matsuura et al., 2006). Des lignées de cellules tumorales sont souvent associées à des taux inférieurs à la normale des protéines du SAC, exemple pour *MAD2* (Furlong et al., 2012) et réciproquement, des individus présentant une diminution de protéines du SAC développe plus facilement des tumeurs, exemple pour *MAD1* (Iwanaga et al., 2007) ou *CDC20* (Li et al., 2009). De façon plus générale, des mutations des gènes *BUB1* et/ou *BUBR1* sont identifiées dans certains cancers gastro-intestinaux, du colon et du sein (Greene et al., 2008).

○ *L'effecteur du SAC : le « Mitotic Checkpoint Complex » ou MCC.*

Les kinétochores non attachés et qui ne sont pas sous tension induisent le recrutement des protéines du SAC. La localisation de ces protéines sur les kinétochores permet la formation d'un signal inhibiteur de l'APC/C et par conséquent l'entrée en anaphase. Les premières protéines impliquées dans le SAC ont été identifiées chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* grâce à des cribles génétiques qui ont permis la caractérisation de mutants. Ces mutants n'activaient pas de signal « d'arrêt en métaphase » en présence de défauts du fuseau mitotique induits par des drogues dépolymérisant les microtubules et donc étaient capables de séparer leurs chromatides sœurs et de finaliser une mitose imparfaite. Les mutations dans l'un des membres SAC se traduisaient par une perte rapide de chromosomes, altérant la croissance de l'individu puis sa mort sur un milieu contenant des drogues dépolymérisant les microtubules (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Ces cribles ont permis d'identifier les gènes *MAD1*, *MAD2* (Mitotic Arrest Deficient) et *MAD3* (*BUBR1*, BUB1-related Kinase chez l'humain) ainsi que *BUB1* et *BUB3* (Budding Unihibited by Benzimidazole) (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Les protéines **MAD2**, **BUBR1** (*MAD3*) et **BUB3** sont considérées comme appartenant *sensu stricto* au complexe de surveillance de la mitose **MCC** (**Mitotic Checkpoint Complex**) car elles lient directement le coactivateur de l'APC/C : *CDC20*. De plus, on y associe souvent deux protéines kinases **BUB1**, **MPS1** (« Monopolar Spindle 1 ») et la protéine **MAD1** pour leurs effets directs (phosphorylation par *BUB1*) ou indirects (stimulation de l'assemblage du

MCC pour MPS1 et MAD1) (Musacchio and Salmon, 2007). Les homologues de ces protéines ont été identifiés chez les métazoaires, dont les mammifères et présentent de fortes homologies. Les études fonctionnelles par immunodéplétion, RNA interférence, mutants KO de ces protéines montrent une altération de l'activité du point de surveillance, entraînant des erreurs de ségrégation de chromosomes, de l'aneuploïdie, et une sortie de mitose précoce lors d'altérations du fuseau en présence de drogues déstabilisants les microtubules (Bharadwaj and Yu, 2004). Les gènes du MCC ne sont pas essentiels chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* (i.e. leurs inactivations n'est pas létales) et sont requis seulement pour bloquer la mitose en cas de défauts du fuseau (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Lors d'une mitose normale, l'inactivation de *BUB1* chez *S.c.* n'entraîne aucune anomalie, alors que chez *S.p.* l'absence de *BUB1* conduit à des défauts de ségrégations de chromosomes (Bernard et al., 1998). Chez la drosophile, une inactivation de *BUB1* est létale (Basu et al., 1999) alors que celle de *MAD2* ne l'est pas (Buffin et al., 2007). En revanche, chez *C. elegans* l'inactivation des gènes du SAC sont létales (Hajeri et al., 2008; Kitagawa and Rose, 1999). Chez la souris, les délétions homozygotes des gènes *MAD2*, *MAD1*, *BUB1*, *BUBR1* et *BUB3* conduisent à une létalité très précoce, dès l'embryogenèse (Dobles et al., 2000; Iwanaga et al., 2007; Jeganathan et al., 2007; Kalitsis et al., 2000; Wang et al., 2004). Une réduction de *MAD2* dans des cellules humaines conduit à un échec de la mitose conduisant à de nombreuses morts cellulaires, dues à des défauts de formation du fuseau mitotique, une condensation incomplète des chromosomes et une sortie de mitose précoce induisant une multinucléation (Michel et al., 2004, 2001).

Le MCC est l'effecteur du SAC, complexe qui comprend plus largement toutes les protéines impliquées dans l'attachement des microtubules, la régulation de l'APC/C, la correction et l'inactivation du mécanisme (Khodjakov and Rieder, 2009). Les gènes impliqués dans le SAC sont fortement conservés chez les eucaryotes supérieurs. Cependant, le SAC apparaît plus complexe chez les vertébrés, car il fait intervenir des protéines qui ne sont pas retrouvées chez la levure. Parmi ces composants, **CENP-E** (Abrieu et al., 2000; Putkey et al., 2002), **Rod** (« Rough Deal »), **Zw10** (« Zeste white 10 ») et **Zwilch** qui forment le complexe **RZZ**. Bien que CENP-E soit retrouvée chez les végétaux (ten Hoopen et al., 2002), le complexe RZZ n'a pas encore été identifié (pour revue, Lu et al., 2009).

Le complexe MCC a été isolé biochimiquement et est considéré comme l'inhibiteur prédominant de l'APC/C généré par le SAC (pour revue, Musacchio, 2011). Le MCC inhibe la reconnaissance de l'APC/C de ses substrats en repositionnant CDC20 (son cofacteur) et le séparant de la sous unité catalytique Apc10. Ce repositionnement de CDC20 va bloquer le site de liaison des motifs KEN-Box de l'Apc10 et partiellement bloquer le site de liaison de motif D-Box de CDC20 (Chao et al., 2012; Herzog et al., 2009). Ce mécanisme est médié par MAD2 et BUBR1. MAD2 interagit directement avec CDC20 *via* un motif permettant le recrutement et la liaison de la D-Box des substrats (Chao et al., 2012). La liaison de MAD2 à CDC20 interfère avec la liaison de CDC20 à l'APC/C (Yu, 2007) et permet surtout la liaison de BUBR1 à CDC20 (Kulukian et al., 2009). BUBR1 occuperait le site de

liaison KEN-Box de CDC20 en tant que pseudo substrat (Sczaniecka et al., 2008). Des interactions supplémentaires entre BUBR1 et CDC20 gênent par encombrement stérique l'accès des substrats au motif de liaison à D-Box sur CDC20 (Chao et al., 2012). Il a aussi été proposé que BUBR1 engage directement l'APC/C et contribuerait à l'activité inhibitrice du MCC (Lara-Gonzalez et al., 2011). Avant l'entrée en mitose, il existe déjà probablement un MCC interphasique résiduel (Sudakin et al., 2001) mais qui aurait un potentiel restreint et permettrait d'inhiber l'APC/C-CDC20 en G2, permettant l'accumulation de la cycline B et l'entrée en mitose. Dès l'entrée en mitose, le MCC interphasique permettrait l'inactivation rapide de l'APC/C mais ce signal serait amplifié au niveau des kinétochores non attachés, plateforme essentielle de catalyse de formation du MCC.

B *Les facteurs déclenchant l'activation du SAC.*

a *La formation du MCC dépend des kinétochores?*

Lorsque le SAC est activé, le recrutement de ses protéines aux kinétochores permet aux protéines BUBR1, MAD2 et BUB3 de s'associer à CDC20 pour inhiber son action d'effecteur de l'APC (Sudakin et al., 2001). Les différentes protéines du SAC sont recrutées et activées aux kinétochores, ce qui laisse penser que le signal inhibiteur du SAC est aussi activé au niveau de cette structure cellulaire. En effet, lorsque le recrutement aux kinétochores de certaines protéines du SAC ne s'effectue pas correctement, le MCC n'est pas actif (Meraldi et al., 2004; Vigneron et al., 2004). Cependant, bien que les kinétochores aient été montrés comme indispensables à la signalisation du SAC, leur implication dans la formation du MCC est très controversée puisqu'il a été montré qu'ils pouvaient se former indépendamment des kinétochores dans les cellules humaines (Meraldi et al., 2004).

Ainsi chez *S. cerevisiae*, un KO de NDC10, protéine essentielle à la fonction des kinétochores, permet quand même un assemblage du MCC pendant la mitose (Poddar et al., 2005). Chez *S. pombe*, BUB3 n'est pas requis pour l'activation du SAC alors qu'il est essentiel à la localisation kinétochorienne de BUB1, MAD3, MAD1 et MAD2 (Windecker et al., 2009) indiquant que les protéines du MCC n'ont pas besoin d'être enrichies sur les kinétochores pour leurs fonctionnements. Ce concept est aussi discuté chez les mammifères. Dans les cellules humaines, il a été suggéré que le MCC pouvait aussi s'assembler en absence de kinétochore (Meraldi et al., 2004; Sudakin et al., 2001). En effet, MAD2 et BUBR1 peuvent inhiber l'APC/C indépendamment de leur recrutement aux kinétochores et de leur fonction dans le SAC.

Une autre étude démontre que BUB3 n'est pas nécessaire pour la liaison de BUBR1 à MAD2-CDC20, alors que BUBR1 est lié à BUB3 tout au long du cycle cellulaire (Fang, 2002). Effectivement, BUB3 n'est pas nécessaire pour l'inhibition de l'APC/C-CDC20 par BUBR1 et MAD2 *in vitro*

(Kulukian et al., 2009). Mais le site de liaison de BUBR1 sur BUB3 est indispensable pour sa liaison au kinétochore, il semblerait donc que la localisation de BUBR1 aux kinétochores n'est pas requise pour ses fonctions du MCC (Malureanu et al., 2009). Alors que BUB3 n'est pas requis pour la liaison *in vitro* de BUBR1 à MAD2-CDC20 ou l'inhibition de l'APC/C, il semble par contre que dans un contexte cellulaire, la capacité de liaison de BUBR1 à BUB3 soit requise pour une réponse efficace du SAC (Elowe et al., 2010). Par contre, même si BUBR1 ne peut pas interagir avec BUB3, il peut encore lier MAD2-CDC20 et l'APC/C, mais avec une efficacité très réduite (Lara-Gonzalez et al., 2011) et par conséquent n'active pas de façon très efficace les fonctions du MCC. Une explication émerge de ces résultats : c'est grâce à la liaison avec BUB3 que BUBR1 peut se concentrer sur les kinétochores non attachés, i.e. où sont générés les complexes MAD2-CDC20, et ainsi favoriser l'assemblage du MCC. Du coup, les mutants BUBR1 incapable de se lier aux kinétochores peuvent quand même « capturer » des complexes MAD2-CDC20 dans le cytosol, mais de manière beaucoup moins efficace. Donc, le MCC peut s'assembler *in vitro* sans kinétochore (bien que très lentement) car BUBR1 peut se lier à MAD2-CDC20 dans les cellules indépendamment des kinétochores. Mais il en résulte un niveau extrêmement faible en MCC, qui selon les expériences et/ou les organismes, pourrait être suffisant ou non.

Donc, bien que le MCC puisse s'assembler en absence de kinétochores, il semble quand même que l'assemblage du MCC soit grandement facilité par les kinétochores et que la localisation des protéines aux kinétochores soit essentielle à leur fonction dans le SAC.

Par contraste, une étude a révélé que la localisation kinétochorienne des protéines BUBR1 et MAD2 n'était pas essentielle pour leurs fonctions dans le contrôle du « timing » de la mitose (Meraldi et al., 2004). En effet, deux membres du SAC, MAD2 et BUBR1, présentent des rôles supplémentaires en plus de leurs fonctions dans le SAC. Ces protéines déterminent le laps de temps minimal de durée de la mitose (i.e. temps minimum entre la dissolution de la membrane nucléaire et l'entrée en anaphase) même en absence de kinétochores non attachés (Meraldi et al., 2004). La déplétion de MAD2 et/ou BUBR1 entraîne prématurément une entrée en anaphase lors d'une mitose normale (indépendamment de l'état des kinétochores) et la double déplétion accélère encore plus le processus (Gorbsky et al., 1998; Canman et al., 2002; Shannon et al., 2002; Taylor and McKeon, 1997; Meraldi et al., 2004). Ces deux phénotypes (« timing » de la mitose et SAC) peuvent être découplés. Lorsque le recrutement de MAD2 et BUBR1 aux kinétochores est bloqué et que ces protéines sont présentes dans le cytoplasme, seul le SAC est altéré. Dans ces conditions, les protéines MAD2 et BUBR1 contrôlent correctement la durée de la mitose. Ces résultats suggèrent que le rôle de MAD2 et BUBR1 dans la fonctionnalité du SAC est dépendante des kinétochores et ces deux protéines régulent également la durée de la mitose de manière indépendante des kinétochores. Étant donné la synergie de MAD2 et BUBR1 il semble qu'elles puissent agir dans un complexe cytoplasmique qui pourrait être le MCC (Kulukian et al., 2009; Meraldi et al., 2004). Cependant, BUB3 qui fait partie du MCC n'agit pas sur la durée de la mitose. Une des hypothèses avancée serait que la différence entre les activités « timer »

et « checkpoint » de MAD2 et BUBR1 serait quantitative (Rahmani et al., 2009) : le SAC aurait besoin d'un niveau élevé d'inhibiteur, la fonction « horloge » moins.

b Les événements surveillés par le SAC : tension et attachement.

Le non attachement des kinétochores fut rapidement proposé comme source du signal inhibiteur de l'entrée en anaphase induit par le point de contrôle du fuseau mitotique (Zirkle, 1970). Cependant, certains travaux montrent que le SAC est également sensible à la tension exercée sur les kinétochores par les microtubules. Ainsi, le mode d'activation de ce point de contrôle par l'attachement ou la tension demeure controversé (Maresca and Salmon, 2010; Musacchio and Salmon, 2007; Pinsky and Biggins, 2005). La controverse est alimentée par le fait que tension et attachement sont des événements difficilement séparables du fait de leur interdépendance. En effet, les kinétochores non attachés ne sont pas sous tension et la tension affecte les attachements en stabilisant et en augmentant le nombre de microtubules attachés aux kinétochores (King and Nicklas, 2000). L'absence de tension pourrait donc activer le SAC directement par un mécanisme détectant la tension ou indirectement en altérant les attachements et en créant des kinétochores occupés partiellement par les microtubules.

Pour étudier ces mécanismes, des drogues affectant la polymérisation des microtubules sont utilisées pour manipuler l'attachement et la tension et ainsi activer le SAC. Le nocodazole, le benomyl et la colchicine (et les herbicides propyzamide et oryzaline utilisés chez les végétaux) dépolymérisent les microtubules et sont donc utilisés pour créer des kinétochores non attachés. Le taxol et la vinblastine stabilisent les microtubules, créant ainsi des kinétochores attachés mais qui ne sont pas sous tension. Les travaux qui suggèrent que l'activation du SAC se fait par l'attachement ont été réalisés dans les cellules PtK (« *Potorous tridactylus* Kidney », cellules de rein de kangourou). L'observation de cellules PtK en mitose montre que la présence d'un kinétochore non attaché retarde l'entrée en anaphase (Rieder et al., 1994). De plus, la destruction au laser du dernier kinétochore non attaché induit l'entrée en anaphase dans un délai similaire à celui d'une cellule dont tous les chromosomes sont bi-orientés (Rieder et al., 1995). Or le dernier chromosome mono-orienté a son kinétochore restant qui n'est pas sous tension et pourtant le SAC est satisfait et permet l'entrée en anaphase. Il se peut tout de même que ce kinétochore soit sous tension grâce à des facteurs comme les chromokinésines liant les microtubules aux bras des chromosomes.

Ces résultats ont été étayés par une étude réalisée dans des cellules HeLa MUG. Les cellules MUG sont des cellules qui ne possèdent qu'un centromère car la réplication n'a pas eu lieu. Elles ne peuvent donc réaliser que des attachements monotéliques ou mérotéliques. Malgré cela, ces cellules présentent un SAC satisfait qui permet l'entrée en anaphase (O'Connell et al., 2008). Plus récemment, des

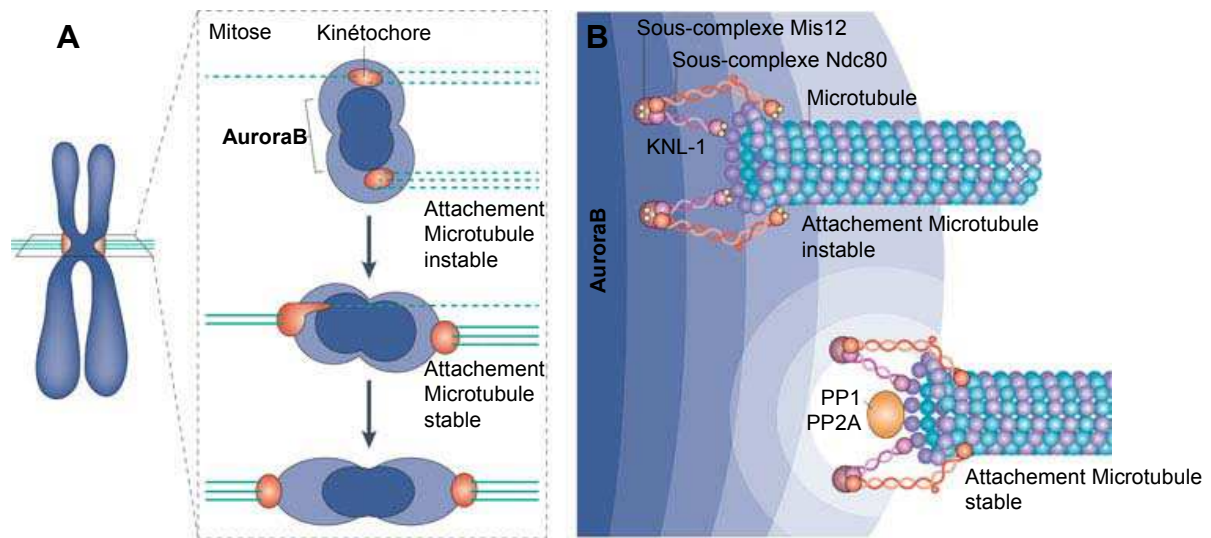


Figure 24: Aurora B: le « senseur » de la tension.

Aurora B localise au niveau de la plaque interne des centromères et produit un gradient de phosphorylation (bleu foncé à bleu clair) phosphorylant ainsi les protéines du kinétochore.

A: Lors de la prométaphase, il existe souvent des erreurs d'attachements. Dans ces cas, les sites de liaison aux microtubules sont à proximité de l'activité d'Aurora B, ce qui a pour conséquence leur déstabilisation. Lorsque les chromosomes sont bi-orientés, la tension exercée sur les kinétochores éloigne les sites de liaisons aux microtubules d'Aurora B, permettant leurs stabilisations.

B: La liaison kinétochore / microtubule se fait par l'intermédiaire du complexe KMN. Le gradient de phosphorylation d'Aurora B qui émane de la plaque interne vers la plaque externe du kinétochore phosphoryle le complexe KMN, déstabilisant ainsi l'attachement. Lorsque les kinétochores sont sous tension, le complexe KMN s'éloigne d'Aurora B, facilitant l'association de la PP1 avec KNL-1. La protéine phosphatase PP2A est aussi relocalisée vers la plaque externe. L'éloignement par rapport à la kinase Aurora B et l'enrichissement en phosphatase permet donc de déphosphoryler le complexe KMN et donc de stabiliser l'attachement aux microtubules. D'après Watanabe (2012)

protéines de différentes régions du kinétochores fusionnées à des marqueurs fluorescents ont été utilisées pour étudier le rôle de la tension dans la satisfaction du SAC (McEwen and Dong, 2009). Ces marqueurs permettent de distinguer l'étirement entre les deux paires de kinétochores (inter-kinétochores) ou l'espace au sein même du kinétochoire (intra-kinétochoriens). L'utilisation de différentes concentrations en taxol, permettant de faire varier soit la tension intra-kinétochorienne soit la tension inter-kinétochorienne, a permis de montrer que la tension intra-kinétochorienne est suffisante pour satisfaire le SAC, alors que la tension inter-kinétochorienne n'est pas nécessaire (Maresca and Salmon, 2009; Uchida et al., 2009).

La question de qui, l'attachement et/ou de la tension, active(nt) le checkpoint reste à résoudre. Chez le xénope, il n'existe qu'une voie de signalisation du checkpoint activée par les défauts d'attachement. En effet, l'ajout de taxol dans des extraits d'oeufs de xénope n'active pas le SAC (Minshull et al., 1994). Alors que dans les cellules humaines, il pourrait y avoir deux voies de signalisation, l'une déclenchée par les défauts de tension et l'autre par les défauts d'attachement des kinétochores. Une revue (Kops and Shah, 2012) résume la composition et les localisations des protéines du kinétochoire en fonction des différents états d'attachement (non-attachés, attachements mono- ou amphitéliques).

Il est maintenant largement accepté que c'est la kinase **Aurora B** qui est le « senseur » de la tension et qui corrige les mauvais attachements en les déstabilisant, phénomène appelé « correction des erreurs », qui réactiverait le SAC (Kelly and Funabiki, 2009). Aurora B se localise dans la plaque interne du kinétochoire et régule les interactions entre kinétochores et microtubules en phosphorylant le complexe **NDC80** (du complexe KMN) et les **MCAK** (« Mitotic Centromere-Associated Kinesin »), qui peuvent dépolymériser les microtubules (Ruchaud et al., 2007). Un modèle spatial a émergé: une faible tension exercée sur les kinétochores (dû à un attachement syntélique) rapprocherait la plaque externe des kinétochores près du pic de phosphorylation d'Aurora B (Figure 24A), ce qui inactiverait NDC80 et les MCAK, conduisant ainsi à un décrochement des microtubules (Figure 24B). La déphosphorylation de NDC80 diminue son affinité pour les microtubules et la déphosphorylation des MCAK catalyserait la dépolymérisation des extrémités de microtubules (Cheeseman et al., 2006; Lan et al., 2004). Aurora B phosphoryle aussi d'autres substrats du SAC qui seront discutés plus loin (Lampson and Cheeseman, 2011). Lors d'un attachement bipolaire, la distance intra-kinétochorienne augmente, dû aux forces opposées des fibres du fuseau. Par conséquence, le degré de phosphorylation des substrats d'Aurora B est inversement corrélé à la distance qui les sépare. Plus Aurora B est éloignée et donc inactive vis-à-vis de ses substrats, plus les attachements des microtubules se stabilisent, désactivant ainsi le point de contrôle du fuseau mitotique. En plus de la diminution de phosphorylation des substrats par Aurora B, deux Protéines Phosphatases PP1 et PP2A sont relocalisées sur la plaque externe et déphosphorylent les substrats d'Aurora B. De façon intéressante, les attachements mérotéliques ne sont pas détectés par le SAC. Et lors d'un attachement syntélique, Aurora B corrige cette erreur en désactivant l'attachement des microtubules, créant ainsi un

kinétochore libre, qui active le SAC. Ces deux modèles nécessitent donc la présence de kinétochores non attachés pour activer le SAC et empêcher l'anaphase. Dans ce contexte, les tensions intra/inter kinétochoriennes ne seraient pas le déclenchement du SAC mais feraient plutôt partie du mécanisme de correction en régulant la distance physique entre Aurora B et ses substrats. D'autre part, plusieurs études montrent une incapacité à abolir le SAC en absence d'Aurora B lorsque les microtubules sont déstabilisés (Kops and Shah, 2012). Ce qui signifie qu'Aurora B serait plutôt perçue comme un amplificateur de l'activité du SAC plutôt qu'un élément essentiel.

○ ***Le MCC dans les voies de la tension et de l'attachement.***

Dans les extraits d'ovocytes de xénope, les observations faites par les expériences d'immunodéplétion de protéines du MCC ont mis en évidence qu'il n'existait qu'une seule voie de signalisation du SAC. En effet, l'immunodéplétion d'Aurora B induit la délocalisation de toutes les protéines du SAC (Vigneron et al., 2004). Chez l'homme, certaines études suggèrent que les deux voies d'activation du SAC existent, cependant la différence entre ces deux voies n'est pas si évidente et certaines protéines participeraient à ces deux voies de signalisation (pour revue, Pinsky and Biggins, 2005).

Dans les cellules humaines, des études ont montré que **MAD2** localise aux niveaux des kinétochores non attachés en prométaphase et disparaît des kinétochores en métaphase lorsque les kinétochores sont attachés aux pôles du fuseau (Chen et al., 1996). MAD2 a été proposée comme marqueur des kinétochores non attachés. En effet, il a été mis en évidence que MAD2 est recrutée aux kinétochores non attachés via son interaction avec MAD1, alors que MAD2 ne semble pas être recruté aux kinétochores en absence de tension (Logarinho et al., 2004; Skoufias et al., 2001; Waters et al., 1998). Le traitement des cellules de mammifère aux drogues induisant la perte de tension des kinétochores, conduit à l'accumulation de **BUBR1**, **BUB1** et **BUB3** aux kinétochores (Logarinho et al., 2004; Shannon et al., 2002; Skoufias et al., 2001; Taylor et al., 2001). Ces protéines ainsi que MPS1 et le complexe RZZ (Kops and Shah, 2012), ne se dissocient des kinétochores que lorsqu'ils sont correctement biorientés (i.e. lorsqu'ils sont sous tension physique). Cette délocalisation de protéines requiert un mécanisme plus complexe qu'un simple attachement de microtubules car il fait intervenir la relation entre les chromatides sœurs (i.e. la tension intrakinétochorienne), communication médiée par Aurora B.

D'après les expériences décrites précédemment, il semble que MAD2 intervienne au niveau de la voie de l'attachement et BUBR1, BUB1 et BUB3 au niveau de la voie de la tension *via* Aurora B. Cependant d'autres études présentent des résultats discordants avec ces observations. En effet, des cellules traitées au monastrol, qui induit la formation d'attachements syntéliques, montrent une accumulation de MAD2 sur les kinétochores attachés qui ne sont pas sous tension (Kapoor et al., 2000; Kops and Shah, 2012). Une autre étude sur des cellules Ptk1 indique que MAD2 participerait avec BUBR1 dans la voie de la tension (Shannon et al., 2002). Ainsi, MAD2 ne localiserait pas

exclusivement sur les kinétochores non attachés. D'autre part, BUB1 semblerait aussi jouer un rôle dans la voie de l'attachement en plus de son implication dans la voie de la tension (Logarinho et al., 2004; Taylor et al., 2001).

Il est intéressant de noter que l'inhibition d'Aurora-B par siRNA conduit à un phénotype plus sévère qu'avec l'utilisation des drogues. En effet, l'inhibition d'Aurora-B par siRNA induit une délocalisation de BUBR1, CENP-E et MAD2 des kinétochores et un arrêt en métaphase en présence de nocodazole et taxol (Ditchfield et al., 2003). Ce qui indique qu'Aurora-B pourrait jouer sur les voies de l'attachement et de la tension et que l'utilisation de drogues ou de siRNA affecterait de différentes manières ces deux voies.

C L'assemblage et la fonction du « Mitotic Checkpoint Complex » ou MCC.

Les protéines du SAC interagissent avec la plaque externe des kinétochores non attachés. Le kinétochore est une structure solide non soluble ce qui rend l'étude biochimique des interactions entre les protéines difficiles. D'autre part, la nature transitoire et instable des différents complexes et l'interdépendance vis-à-vis de leur recrutement rendent leur hiérarchisation difficile. Les protéines du SAC ont été étudiées dans plusieurs modèles, par immunodéplétion, siRNA ou mutation, afin d'observer la conséquence de leur absence notamment sur la localisation des autres protéines du SAC. Les résultats obtenus ne sont pas toujours transposables d'un système à l'autre. Des études dans des cellules humaines et de xénope sur l'inhibition de BUBR1 par immunodéplétion ou par siRNA, en présence de drogues dépolymérisant les microtubules, abolit l'arrêt en métaphase et la délocalisation de BUB1, BUB3, MAD1, MAD2, et CENP-E aux kinétochores (Chan et al., 1999a; Chen, 2002) indiquant ainsi le rôle essentiel de BUBR1 en amont de BUB1 (Meraldi et al., 2004). Paradoxalement, d'autres travaux sur des cellules humaines révèlent que BUB1 est la protéine kinase qui joue un rôle clef lors des premières étapes de l'assemblage du MCC, dès le début de la prophase car elle est essentielle au recrutement de BUBR1, BUB3, MAD1 et MAD2 (Howell et al., 2004; Johnson et al., 2004; Vigneron et al., 2004). BUB1 est recrutée au kinétochore via la protéine KNL1 du complexe KMN, recrutement dépendant de la phosphorylation de KNL1 par la kinase MPS1 (London et al., 2012; Yamagishi et al., 2012) (Figure 10). KNL1 recrute aussi BUBR1 (Kiyomitsu et al., 2007). Une variante de ce mécanisme existe chez *S. pombe*, où KNL1 recruterait BUB1 uniquement lorsqu'il est engagé en sous complexe BUB1-BUB3 (Shepperd et al., 2012). Chez *S. pombe*, BUB3 est essentielle à la localisation kinétochorienne de BUB1, MAD3 (BUBR1), MAD1 et MAD2 (Windecker et al., 2009). En conclusion, la protéine clef permettant le recrutement des autres membres du MCC aux kinétochores n'est pas encore clairement définie.

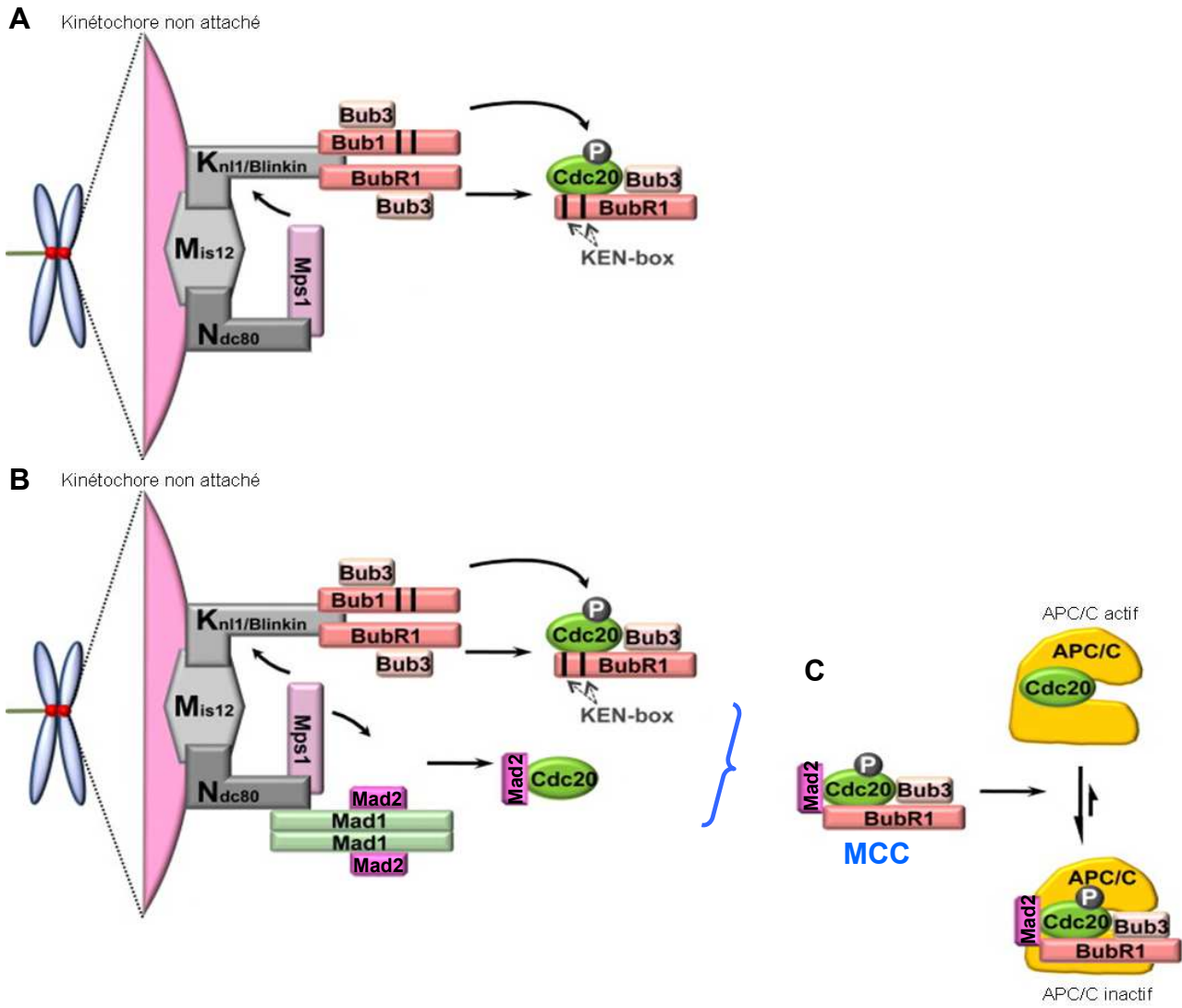


Figure 25: Assemblage du MCC par des kinétochores non attachés.

A: Le complexe KMN (KNL-1/Mis12/Ndc80) constitue la plateforme principale de recrutement des protéines du MCC. La protéine KNL-1 permet le recrutement de BUB1 et BUBR1, recrutement modulé par la kinase MPS1. BUB1 et BUBR1 recrutent à leur tour BUB3 et sont toutes les deux capables de lier CDC20 *via* leurs motifs de liaison KEN box (barres noires). Les sous-complexe BUBR1-BUB3-CDC20 est formé et BUB1 contribue à l'inhibition de l'APC/C en phosphorylant CDC20.

B: En parallèle, les kinétochores non attachés recrutent et activent le sous complexe MAD1-MAD2 *via* Ndc80, interaction dépendante aussi de la phosphorylation par la kinase MPS1. Le sous-complexe MAD1-MAD2 lié aux kinétochores catalyse l'activation conformationnelle de MAD2, lui permettant ainsi de se lier à CDC20.

C: MAD2 et BUBR1 lient donc directement CDC20 et ces deux sous-complexes s'assemblent pour former le MCC: BUBR1-BUB3-CDC20-MAD2, Le MCC est l'effecteur inhibiteur de l'APC/C, en bloquant la reconnaissance de ses substrats. D'après Kim and Yu (2011).

Le MCC est assemblé à partir de 2 sous complexes : MAD2-CDC20 et BUBR1-BUB3 (Musacchio and Salmon, 2007) (Figure 25). Néanmoins, certains complexes ont été identifiés comme MAD1-MAD2, BUB3-BUB1, BUB3-BUBR1, BUBR1-CENP-E et RZZ (pour revue, Shah et al., 2004). Enfin, BUB3 forme un complexe avec BUB1 et BUBR1 et est requise pour leur recrutement aux kinétochores (Campbell and Hardwick, 2003; Taylor et al., 1998). Alors que la formation de MAD2-CDC20 est catalysée par des kinétochores non attachés (discuté plus loin dans *Le modèle MAD2*) le sous-complexe BUBR1-BUB3 existe tout au long du cycle cellulaire (Hardwick et al., 2000).

a *Caractéristiques et rôles des protéines du MCC.*

Malgré une organisation similaire au niveau protéique, BUB1 et BUBR1 (BUB-Related1) sont des paralogues et ont des rôles distincts dans le SAC. La kinase BUB1 est requise pour la congression des chromosomes, la localisation kinétochorienne de MAD2, BUBR1 et CENP-E lors de l'activation du SAC et pour l'établissement et/ou la maintenance d'un attachement bipolaire au fuseau (Johnson et al., 2004; McGuinness et al., 2009; Meraldi and Sorger, 2005). BUBR1 (MAD3) est associée aux kinétochores non attachés et joue un rôle dans la stabilité de l'attachement au fuseau et dans l'alignement des chromosomes (Meraldi and Sorger, 2005). De plus BUBR1 est considérée comme un membre du MCC de part sa liaison directe avec CDC20 et pour son rôle de pseudo-substrat inhibiteur de l'APC/C (pour revue, Bolanos-Garcia and Blundell, 2011). Ces deux protéines présentent une région conservée en N-terminal, présentant un motif TPR (Tetratricopeptide motif Repeat) permettant la localisation sur le kinétochore (pour l'interaction via KNL1) et essentiel pour leurs fonctions dans le SAC (Bolanos-Garcia et al., 2005; Kiyomitsu et al., 2007) (Figure 26). Les séquences protéiques présentent deux motifs KEN-Box (KEN1 et KEN2), nécessaires pour la reconnaissance des substrats (CDC20), discuté plus loin. Le motif GLEBS (GLE2-Binding-Sequence) permet la liaison de BUB1 et BUBR1 à BUB3 (Larsen et al., 2007). Son altération abolit l'interaction de ces 2 protéines avec BUB3, interaction essentielle pour la localisation kinétochorienne de BUBR1 (Elowe et al., 2010). La région C-terminale présente un domaine Sérine/Thréonine Kinase (non fonctionnel chez BUBR1).

o *La kinase BUB1.*

Le rôle de l'activité kinase de BUB1 est encore source de questions : certaines études proposent un rôle marginal dans l'arrêt de la mitose (Warren et al., 2002; Yamaguchi et al., 2003) et proposerait plutôt une importance dans l'alignement des chromosomes (Klebig et al., 2009) et dans la localisation d'une protéine impliquée dans la cohésion des chromatides (SGO1) (Perera and Taylor, 2010). En effet, une déplétion de BUB1 chez *S. pombe* augmente le taux de misségrégation chromosomique (Bernard et al., 1998) et une déplétion chez *S. cerevisiae* entraîne un ralentissement de la croissance et une perte élevée de chromosomes (Warren et al., 2002).

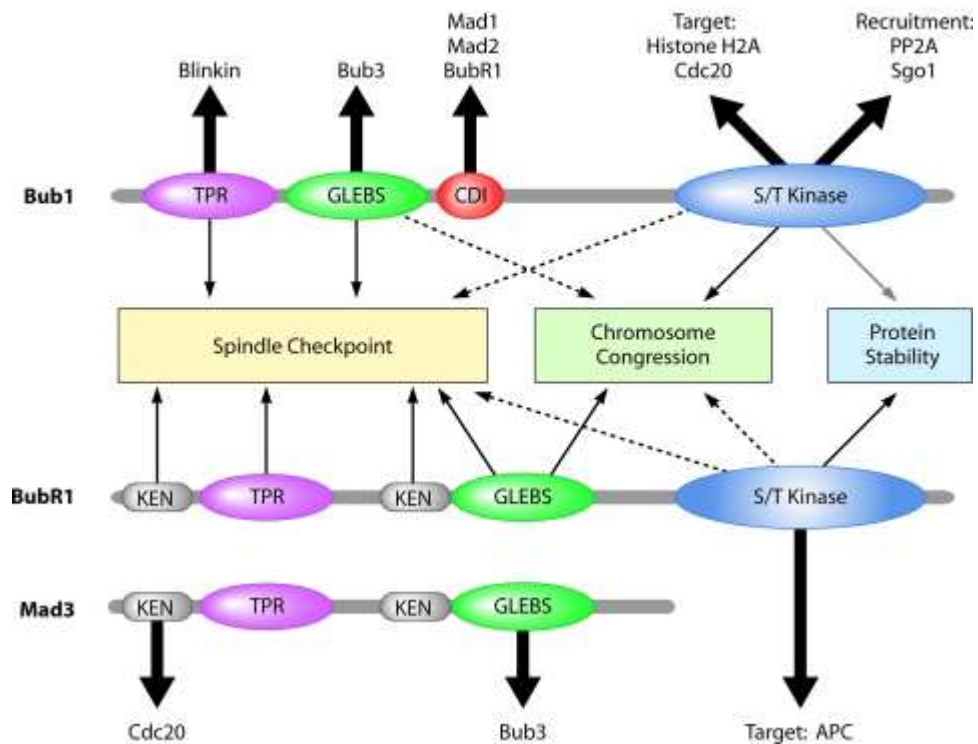


Figure 26: Organisation des protéines BUB1 et BUBR1.

L'organisation des domaines de BUB1, BUBR1 et son orthologue MAD3 est illustrée. Le rôle de chaque motif est indiqué: contribution dans la fonction SAC, ou requis pour la congession des chromosomes ou la stabilité de la protéine (une flèche pleine indique une fonction conservée à travers l'évolution, une flèche en pointillé indique une fonction controversée en fonction des organismes). Les flèches épaisses indiquent les domaines requis pour les interactions avec les différents partenaires identifiés. D'après Elowe (2011).

Comme BUBR1, BUB1 peut recruter directement CDC20, le phosphoryler et ainsi inhiber l'activité de l'APC/C (Tang et al., 2004). Le processus par lequel CDC20 phosphorylé inhibe l'APC/C^{CDC20} n'a pas encore été clairement expliqué ni comment cette phosphorylation de CDC20 régule la formation du MCC. Mais elle est essentielle pour l'activité SAC : une protéine BUB1 présentant une kinase inactive abolit la phosphorylation de CDC20 et supprime le signal du SAC (Tang et al., 2004). D'autre part, BUB1 est phosphorylé pendant la mitose et hyperphosphorylé lorsqu'il est recruté sur un kinétochore non attaché, suggérant que l'activité kinase de BUB1 soit augmentée lors d'une activation du SAC (Chen, 2004).

- ***BUBR1, le pseudo-substrat inhibiteur de l'APC/C.***

BUBR1 est un composant capital du MCC (car, comme MAD2, il lie directement CDC20), il est également impliqué dans la détermination du timing de la mitose (avec MAD2) et joue également un rôle essentiel dans l'établissement de l'attachement kinétochore/microtubule. De part ses 3 fonctions interdépendantes, les phénotypes dus à l'inactivation de BUBR1 (altération du fuseau mitotique ; inactivation du SAC donc par conséquent, misségrégation des chromosomes et accélération de la durée de mitose) sont difficiles à interpréter (Rahmani et al., 2009). BUBR1 peut s'auto-phosphoryler lorsque le SAC est satisfait, et il est un substrat d'autres kinases telles que Polo-Like Kinase1 et CDK1 (Huang and Yen, 2009) : il est hyperphosphorylé lors de la mitose, stimulant ainsi ses fonctions dans l'attachement du fuseau et dans le SAC.

BUBR1 (contrairement à MAD3) possède un domaine kinase en C-terminal dont la fonction a souvent été source de questions (Bolanos-Garcia and Blundell, 2011). Une étude récente chez l'humain démontre que hBUBR1 n'est pas une kinase active, dû à des accumulations de mutations au cours de l'évolution (Suijkerbuijk et al., 2012). Une étude permet de comprendre pourquoi cette partie N-terminale de BUBR1 est suffisante pour sa fonction dans le SAC et l'inhibition de l'APC/C *in vitro* (Lara-Gonzalez et al., 2011; Malureanu et al., 2009): le pseudo domaine kinase serait quand même essentiel à la stabilité conformationnelle de BUBR1. Chez la drosophile, le domaine Kinase serait requis pour la modulation de l'activité de BUBR1 dans la capture et/ou dynamique des microtubules (Rahmani et al., 2009). En effet, des mutants « Kinase Dead » de BUBR1 présentent des fuseaux mitotiques anormaux, avec des fibres kinétochoriennes très fines, mais ne présentent pas d'altération dans leur fonction SAC.

Le MCC inhibe l'APC/C en empêchant sa capacité de recrutement de la Cycline B1 et de la sécurine. BUBR1 bloque l'interaction avec les substrats en induisant un changement conformationnel de l'APC/C et en occupant le site catalytique en tant que « pseudo-substrat ». Le modèle du « pseudo-substrat » avait été proposé initialement car MAD3 (BUBR1) se lie à MAD2-CDC20 *via* sa première KEN-Box (KEN1) de l'extrémité N-terminale (Burton and Solomon, 2007). La structure cristallisée du MCC révèle que ces KEN box adopteraient une structure en « helix-loop-helix » qui lieraient

directement MAD2 et CDC20 (Chao et al., 2012). La structure du MCC chez *S. pombe* montre que lorsque le motif KEN1 de BUBR1 est liée à CDC20, elle occupe le site de liaison KEN de CDC20 (Chao et al., 2012). Par conséquent, BUBR1 est en compétition avec les substrats à D-box (Destruction-Box) de CDC20, tel que la Sécurine et la Cycline B au niveau de KEN1. En d'autres termes, BUBR1 agit comme un pseudo-substrat pour les potentiels substrats à D-box au niveau de la KEN box. De façon intéressante, MAD3 possède un second motif KEN box (KEN2) (King et al., 2007a). Même si ce motif n'est pas requis pour la liaison de BUBR1 avec CDC20, MAD2 ou l'APC/C, il reste néanmoins essentiel à la fonction du SAC (Lara-Gonzalez et al., 2011). Donc, alors que KEN1 bloque les liaisons de substrats de motif KEN (comme CDC20), KEN2 occuperait le récepteur des substrats bipartites et agirait donc aussi comme un pseudosubstrat (Chao et al., 2012). De récentes études de la structure du MCC supportent ces observations. BUBR1 induit un changement positionnel de CDC20, empêchant ces protéines de former le récepteur bipartite (Buschhorn et al., 2011; Chao et al., 2012). Donc MAD3/BUBR1 inhiberait de manière indirecte l'APC/C, en empêchant la formation du site de liaison de ses substrats, la Sécurine et la CyclineB.

- ***BUB3.***

Le rôle majeur de BUB3 est sa liaison à BUB1 et BUBR1, liaisons indispensables à leurs localisations au niveau du kinétochore et leurs rôles dans le SAC (Taylor et al., 1998). Il serait un régulateur de la réponse du SAC en contrôlant la liaison entre BUBR1 et MAD2 (Fraschini et al., 2001). BUB3 serait aussi requis pour l'établissement de l'attachement kinétochore/MT dans des cellules HeLa (Logarinho et al., 2008). BUB3 est une protéine globulaire organisée en 7 feuilletts β présentant une répétition de domaines WD40 (Taylor et al., 1998) connus pour leur implication dans les interactions protéines/protéines (Smith, 2008). Des mutations sur ces motifs altèrent la capacité de liaison de BUB3 avec MAD2, BUBR1 et CDC20 et l'activation du SAC. Il est suggéré que BUB3 pourrait servir de plateforme pour les interactions entre les membres du SAC et contribuerait à l'activation du SAC (Fraschini et al., 2001).

- ***Le modèle MAD2 (le MAD2 Template Model)***

MAD2 est proposé comme un marqueur des kinétochores non attachés en prométaphase. En effet, il a été mis en évidence que MAD2 est recrutée aux kinétochores non attachés via son interaction avec MAD1 (Logarinho et al., 2004). MAD2 est la première protéine du SAC identifiée comme étant conservée chez les vertébrés (Chen et al., 1996; Li and Benezra, 1996) et chez les plantes (Yu et al., 1999). MAD2 existe sous deux formes : la forme libre, nommée O-MAD2 (open) et la forme liée, nommée C-MAD2 (closed) (Luo et al., 2004). MAD2 est capable de se lier à MAD1 ou à CDC20. En effet, il a été montré que MAD1 et CDC20 possédaient le même motif de liaison à MAD2. Ce motif interagit avec le domaine HORMA situé en queue C-terminale de MAD2 et induit le même changement conformationnel de MAD2 (Luo et al., 2002). En plus de son domaine de liaison à MAD1

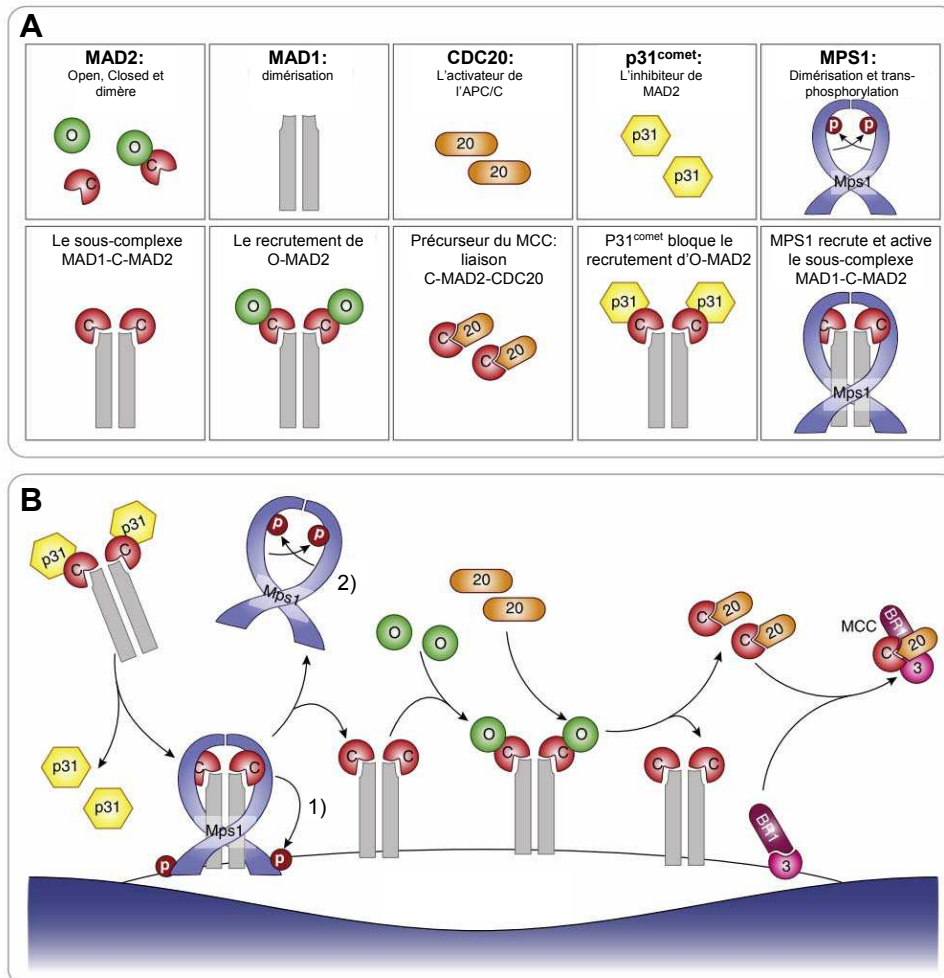


Figure 27: Le modèle MAD2.

A: Les composants clés, avec les conformations différentes de MAD2: O-MAD2 et C-MAD2 (Open et Closed) qui peuvent se dimériser. MAD1, le récepteur de MAD2 au niveau des kinétochores, ligand de C-MAD2 lui permettant de pouvoir recruter O-MAD2. CDC20, activateur de l'APC/C, aussi un ligand de C-MAD2. p31^{Comet} se lie à C-MAD2 sur sa surface de dimérisation. MPS1 une kinase pui peut se dimériser et se trans-phosphoryler.

B: MAD2 se lie à MAD1 pour former le sous-complexe MAD1-C-MAD2. En interphase, lorsque ce sous-complexe n'est pas lié au kinétochoire, il est coiffé de l'inhibiteur p31^{Comet}. Lorsque MAD1-C-MAD2 est recruté aux kinétochores, p31^{Comet} est relargué, permettant le recrutement d'O-MAD2 *via* la dimérisation de MAD2. MAD2 se lie à CDC20, créant le sous-complexe C-MAD2-CDC20 qui se liera à BUBR1-BUB3, formant ainsi le MCC. MPS1 joue plusieurs rôles: 1) lors de l'entrée en mitose, cette kinase permet le recrutement MAD1-C-MAD2 aux kinétochores, 2) l'activité de MPS1 est requise tout au long de la mitose pour son propre relarguage *via* sa trans-phosphorylation afin de laisser le récepteur MAD1-C-MAD2 libre de recruter O-MAD2. d'après Lara-Gonzalez et al., (2012)

et CDC20, MAD2 possède un domaine d'oligomérisation. Cependant deux molécules de la même conformation ne sont pas capables de dimériser (Mapelli et al., 2007).

Dès l'entrée en mitose, le sous complexe MAD1-C-MAD2 est recruté aux kinétochores *via* le complexe RZZ, recrutement régulé par la kinase MPS1 (Karess, 2005) (Figure 27). MAD1-C-MAD2 permet le recrutement d'un second O-MAD2, permettant sa transition en C-MAD2 lui permettant ainsi de se lier à CDC20, créant ainsi le complexe C-MAD2-CDC20, libéré dans le cytoplasme (De Antoni et al., 2005). Ce modèle permet d'expliquer pourquoi il existe deux populations de MAD2 : une stable aux kinétochores associée à MAD1 et une dynamique dans le cytoplasme associée à CDC20 (Fava et al., 2011). En théorie, le complexe C-MAD2-CDC20 peut à son tour recruter des O-MAD2 et catalyser la formation de sous complexes C-MAD2-CDC20, même dans le cytosol (De Antoni et al., 2005). Ce modèle pourrait expliquer l'amplification du signal inhibiteur de l'APC/C, même en présence d'un seul kinétochore non attaché et même en aval des kinétochores (Simonetta et al., 2009). Ce dernier concept est encore discuté, car une étude récente chez la levure bourgeonnante montre que ce mécanisme de recrutement serait ainsi inhibé en dehors des kinétochores, probablement par un blocage du recrutement de O-MAD2 via BUBR1 (Mariani et al., 2012). D'autre part, MAD1-C-MAD2 est présent dès la préprophase au niveau de pores nucléaires mais est incapable de recruter O-MAD2 car il est coiffé de l'inhibiteur p31^{Comet} (Hewitt et al., 2010). De plus, seule la conformation C-MAD2 est compatible pour une liaison avec BUBR1 et C-MAD2-CDC20 interagit avec BUBR1 au niveau des domaines de liaison avec O-MAD2 (Chao et al., 2012). Donc lorsque MAD2 prend part au MCC, elle ne peut pas lier O-MAD2 et ne peut donc pas catalyser la formation de sous complexes C-MAD2-CDC20 supplémentaires.

Un des régulateurs essentiels de ce modèle MAD2 est la Sérine/Thréonine kinase **MPS1** (Abrieu et al., 2001) initialement découverte chez la levure bourgeonnante (Weiss and Winey, 1996). MPS1 est impliquée dans le recrutement de MAD1 aux kinétochores non attachés ainsi que dans la dimérisation de MAD2. Lors de la pré-prophase, de façon concomitante avec l'assemblage du kinétochore, MPS1 va recruter RZZ, qui recrutera quant à lui MAD1-C-MAD2. Lors de la mitose, MPS1 n'est plus requise pour maintenir RZZ et MAD1-C-MAD2 aux kinétochores mais son activité reste indispensable pour le recrutement d'O-MAD2 (Hewitt et al., 2010). Ce mécanisme n'est pas encore totalement explicite : MPS1 peut phosphoryler MAD1 et MAD2 (Zich et al., 2012) et cette phosphorylation régulerait l'association de MAD2 avec ses partenaires protéiques (Kim et al., 2010). Une des hypothèses émises serait que MPS1 inhiberait un régulateur négatif du modèle de MAD2, i.e. la protéine p31^{Comet}. MPS1 phosphorylerait p31^{Comet}, ce qui la relarguerait et permettrait la liaison avec O-MAD2 (Musacchio and Salmon, 2007). MPS1 peut se dimériser et se transphosphoryler ce qui stimulerait son propre relarguage des kinétochores ainsi que le recrutement d'O-MAD2 (Hewitt et al., 2010) (Figure 27). D'autre part, le recrutement et l'activité checkpoint de MAD1 serait aussi dépendante de la kinase BUB1 (Johnson et al., 2004; Meraldi and Sorger, 2005). Mais l'activité catalytique de BUB1 ne serait pas forcément indispensable pour ces fonctions (Perera and Taylor,

2010). En amont de ces interactions, il semblerait que la kinase Aurora B ait un rôle pour le recrutement de MPS1, RZZ, BUB1 et MAD1/MAD2 (Santaguida et al., 2011; Saurin et al., 2011). MPS1 a été récemment identifiée chez les plantes et AtMPS1 interagit avec des protéines du cycle cellulaire: elle semblerait donc conserver son rôle essentiel dans la division cellulaire (de Oliveira et al., 2012).

Le principal antagoniste du SAC est la protéine **p31^{comet}**. Cette protéine a été initialement identifiée comme interagissant de MAD2 chez la levure (Habu et al., 2002). Des études montrent que p31^{comet} lie C-MAD2 (associée à MAD1 ou CDC20) sur sa surface de dimérisation et interfère donc avec le recrutement d'O-MAD2 et son activation (Yang et al., 2007). L'hypothèse proposée serait que p31^{comet} coifferait MAD1-C-MAD2 empêchant ainsi la production de C-Mad-CDC20 (Vink et al., 2006). Cette hypothèse est très discutée et n'est pas forcément validée dans toutes les études (Hagan et al., 2011; Westhorpe et al., 2011). Un modèle propose que l'association via p31^{comet} puisse impliquer la poly-ubiquitinylation de CDC20 de manière APC/C dépendante. Dans ce modèle, l'ubiquitinylation de CDC20 pourrait permettre le changement de conformation de C-MAD2 (liée) en O-MAD2 (libre). p31^{comet} activerait aussi la dissociation de CDC20-BUBR1 en stimulant la phosphorylation des sites de CDC20 par le complexe CDK1-Cycline B. Il est suggéré que la liaison de p31^{comet} à MAD2 causerait un changement de conformation de CDC20 qui faciliterait sa phosphorylation par les CDK, et aurait pour conséquence sa dissociation d'avec BUBR1 (Miniowitz-Shemtov et al., 2012; Teichner et al., 2011). Néanmoins, l'hypothèse la plus cohérente serait que p31^{comet}, en se liant avec MAD2, l'« extrait » du MCC laissant ainsi le sous complexe BUBR1-BUB3-CDC20 (Westhorpe et al., 2011).

La présence de MAD1-C-MAD2 aux kinétochores est donc une étape cruciale indiquant que le kinétochore n'est pas attaché (Howell et al., 2000). Lorsque les kinétochores seront liés aux microtubules, le sous complexe MAD1-C-MAD2 sera éjecté via un mécanisme de dissociation et O-MAD2 ne sera plus recrutée (DeLuca et al., 2003).

b *L'inhibition de l'anaphase par le MCC*

Il est suggéré qu'au cours d'une mitose normale, la nature des inhibiteurs devraient évoluer en fonction du nombre de kinétochores non attachés, avec un MCC complet en premier lieu puis un sous complexe BUBR1-BUB3-CDC20 plus tard. Certains résultats suggèrent que MAD2 ne serait pas un inhibiteur en soi, mais aurait plutôt un rôle dans la favorisation de l'interaction entre BUBR1 et CDC20 pour créer l'inhibiteur final et que donc les kinétochores faciliteraient la liaison de MAD2-BUBR1-BUB3 à l'APC/C (Kulukian et al., 2009; Nilsson et al., 2008; Westhorpe et al., 2011). BUBR1 a donc un rôle essentiel dans l'inhibition de l'APC/C et la finalité du SAC.

L'inhibition de CDC20, coactivateur de l'APC/C est due soit à sa phosphorylation soit à sa séquestration. CDC20 peut être phosphorylé par BUB1 (déjà discuté), MAPK et CDK1 (Chung and Chen, 2003; D'Angiolella et al., 2003; Tang et al., 2004). CDC20 est aussi séquestré par sa liaison

avec MAD2 et BUBR1. Alors que la génération du complexe C-MAD2-CDC20 est suffisante pour alerter la cellule de la présence de kinétochores non attachés, ce signal n'est pas suffisant pour bloquer l'entrée en anaphase. Lorsque BUBR1 est déplété, les kinétochores non attachés produisent quand même C-MAD2-CDC20, mais les fonctions du SAC sont abolies. Il semblerait donc que BUBR1 agit en aval de C-MAD2-CDC20 pour le blocage de l'anaphase (Hardwick et al., 2000). Il apparaît donc que la génération de C-MAD2-CDC20 est une étape initiale dans l'assemblage de l'inhibiteur cytosolique de l'APC/C, i.e. le MCC. Notons que lorsque le SAC est activé, le MCC est lié à l'APC/C, suggérant que le signal « on » du SAC n'est pas simplement la séquestration de CDC20.

Les premières observations montraient la forme activée de MAD2 par les kinétochores non attachés (i.e. C-MAD2) comme l'inhibiteur le plus important de part son interaction directe avec CDC20, le cofacteur de l'APC/C (Li et al., 1997). En effet, on observe dans plusieurs systèmes qu'une surexpression de MAD2 active le SAC (He et al., 1997). Malgré la découverte de BUBR1 et de sa fonction essentielle dans l'inhibition de l'APC/C par MAD2 *in vitro* (Fang, 2002), MAD2 semblait toujours reconnue comme étant l'inhibiteur ultime en aval. Mais de plus en plus d'études indiquent que ce serait BUBR1, et non MAD2, l'inhibiteur clef de l'APC/C. En effet, différentes études ont montré que l'inhibition de l'APC/C^{CDC20} est régulé par la liaison de MAD2 et BUBR1 à CDC20 (Fang et al., 1998; Kim et al., 1998). D'autre part, il a été mis en évidence la présence de complexe BUBR1-BUB3-CDC20, BUBR1-BUB3-MAD2-CDC20-APC en plus de MAD2-CDC20 *in vivo* dans des cellules dont le SAC était activé (Sudakin et al., 2001; Tang et al., 2001). MAD2 seule nécessite d'être en très grande quantité par rapport à CDC20 pour inhiber l'APC/C *in vitro* (Fang, 2002; Fang et al., 1998; Kulukian et al., 2009). D'autre part, MAD2 inhiberait par séquestration de CDC20 *in vitro*, ce qui est en contradiction avec le fait que MAD2 soit liée à l'APC/C lors d'une activation du SAC (Li et al., 1997). De plus, MAD2 peut lier l'APC/C^{CDC20} *in vitro* sans affecter significativement son activité (Lara-Gonzalez et al., 2011). Finalement, MAD2 n'est pas souvent dans les mêmes quantités stœchiométriques que les autres composants du MCC pendant la mitose (Nilsson et al., 2008). Effectivement, la quantité de MAD2 liées à BUBR1-BUB3-CDC20 devrait refléter le nombre de kinétochores non attachés. Dans des cellules traitées au nocodazole, quand de nombreux kinétochores ne sont pas attachés, MAD2 est facilement détectable, liée à BUBR1-CDC20 (Westhorpe et al., 2011). Cependant, dans des cellules traitées au taxol, quand peu de kinétochores ne sont pas attachés, il y a beaucoup moins de MAD2 liée à BUBR1-CDC20. Ce phénomène implique que comme le MCC, le sous complexe BUBR1-BUB3-CDC20 est aussi un inhibiteur de l'APC/C.

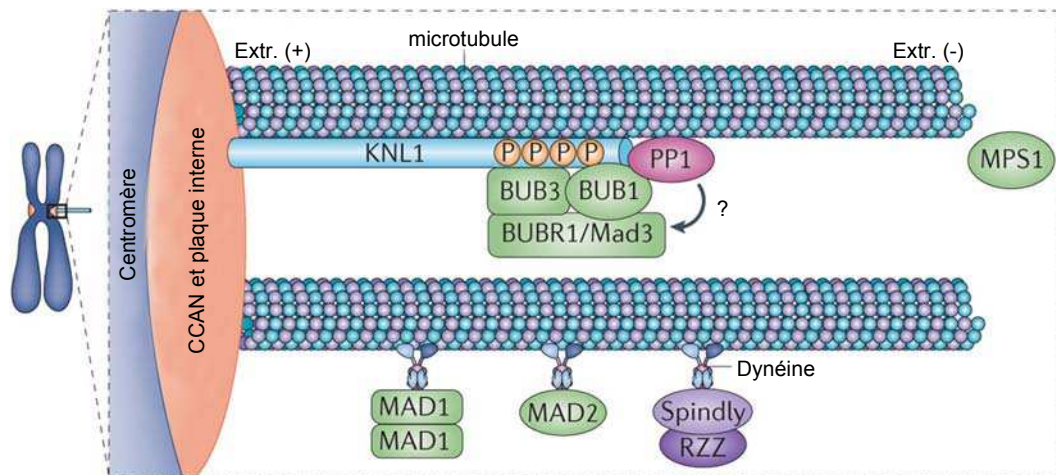


Figure 28: L'extinction du signal du SAC.

Le mécanisme de relargage des protéines du checkpoint dépendant de la dynéine permet la dissociation du kinétochore de MAD1, MAD2, et Spindly, lié au complexe RZZ (Rod, Zwilch et ZW10). D'autre part, la protéine Phosphatase 1 (PP1) est recrutée sur la protéine KNL-1 du complexe KMN. Les substrats de la PP1 au niveau du kinétochore sont encore inconnus mais un candidat possible serait le domaine de KNL-1 phosphorylé par MPS1. Ensemble ces mécanismes permettent le relargage des régulateurs du SAC tel que BUB1, BUB3 et BUBR1 des kinétochores attachés. d'après Foley and Kapoor, (2012)

D *L'inactivation du point de contrôle*

Le point de contrôle du fuseau mitotique est actif jusqu'à ce que tous les chromosomes soient capturés correctement par les microtubules et alignés sur la plaque métaphasique. L'inactivation du point de contrôle se déroule en deux étapes : l'arrêt de production locale de MCC et la réversion de l'inhibition sur l'APC/C. L'inactivation du SAC est associée à un **décrochage du sous complexe MAD1-C-MAD2** des kinétochores attachés (connus sous le nom de « stripping ou streaming ») (Shah et al., 2004), une compensation des kinases par des **phosphatases** (pour revue, Lesage et al., 2011) et la **dissociation du MCC** enlevant l'inhibition sur l'APC/C. Il en résulte l'activation de l'APC/C, la dégradation de la Sécurine et la séparation des chromatides sœurs.

La forme et la composition des kinétochores change radicalement dès l'attachement des microtubules (Howell et al., 2001). Les forces de tension induisent un changement de forme et plusieurs composants du kinétochore vont être délocalisés. Un des mécanismes proposé pour l'inactivation du SAC concerne les protéines CENP-E, BUBR1 et MAD2. En effet, lorsque CENP-E est attachée à un microtubule sous tension, elle n'est plus capable d'activer BUBR1 (Guo et al., 2012; Mao et al., 2005). D'autre part, il a été montré qu'après satisfaction du SAC, MAD2 est phosphorylée. Cette phosphorylation conduirait à sa dissociation de MAD1 et empêche son association avec l'APC/C^{CDC20} (Wassmann et al., 2003).

a *L'inactivation du SAC.*

Un des éléments essentiel reste la délocalisation de MAD1-C-MAD2 (Maldonado and Kapoor, 2011). Des études sur la drosophile et chez les vertébrés indiquent que la protéine motrice dynéine contribue au silencing du SAC en relarguant les protéines du MCC des kinétochores (Howell et al., 2001; Wojcik et al., 2001). La dynéine permet un transport rétrograde vers les pôles du fuseau et un relargage dans le cytoplasme des composants du MCC (Figure 28) (Howell et al., 2001). En effet, il a été mis en évidence que la dynéine transporte, en plus de MAD1-C-MAD2, les protéines BUBR1, MPS1 et même Rod du complexe RZZ (Howell et al., 2001; Wojcik et al., 2001). La dynéine phosphorylée est recrutée par la kinase PLK1 (« Polo-Like Kinase ») au niveau des kinétochores (Bader et al., 2011), et nécessiterait d'être déphosphorylée par la phosphatase PP1 pour pouvoir transporter les composants du SAC (Whyte et al., 2008). Le recrutement et la prise en charge du décrochage par la dynéine serait aussi médié par le complexe RZZ et Spindly, recrutée aussi aux kinétochores via RZZ (Karess, 2005). Précisément, le rôle de Spindly n'est pas très clair et les phénotypes dus à son inactivation peuvent varier en fonction des espèces (Chan et al., 2009; Gassmann et al., 2008). Spindly serait l'élément intermédiaire dans l'interaction entre RZZ et la dynéine (Figure 28).

Cependant certains résultats suggèrent une autre voie indépendante de la dynéine en parallèle. En effet, les champignons et les plantes ne possèdent pas de dynéine centromérique, et l'analyse de leurs génomes révèlent l'absence d'homologue de Spindly (Vleugel et al., 2012). Une des hypothèses serait l'activation ou la relocalisation d'une phosphatase qui déphosphorylerait MAD1, la relarguant ainsi des kinétochores attachés (Kops and Shah, 2012). Une autre possibilité serait que les microtubules élimineraient directement un régulateur ou récepteur de MAD1, soit par compétition, soit par encombrement stérique ou répulsion électrostatique, comme pourrait être le cas pour **KNL1** (Espeut et al., 2012). KNL1 pourrait donc être le principal suspect dans cette autre voie indépendante de la dynéine.

Des études chez l'homme suggère que KNL1 serait également impliquée dans une autre voie d'inactivation du SAC indépendante de la voie de la dynéine (Barisic et al., 2010; Chan et al., 2009; Gassmann et al., 2010). KNL1 est qualifiée de « senseur » de la présence des microtubules au niveau des kinétochores et relaierait donc le signal « off » du SAC. Cette nouvelle voie d'activation n'est pas encore identifiée, et l'entourage de KNL1 au niveau du kinétochore (BUB1, le complexe NDC80 et RZZ) est suspecté. La famille de protéines de KNL1 est conservée tout au long de l'évolution même chez les espèces ne possédant pas de dynéine kinétochorienne (sauf chez les végétaux). L'inactivation du MCC médiée par KNL1 pourrait être un ancien mécanisme évolutif amélioré par le mécanisme de la dynéine dans les cellules animales.

Si la présence de microtubules aux kinétochores est suffisante pour délocaliser le sous complexe MAD1-C-MAD2, il est en revanche essentiel d'avoir une tension pour relarguer tous les autres composants du SAC (Howell et al., 2004). La différence clef entre les états de kinétochores attachés ou bi-orientés est le changement de phosphorylation des substrats d'**Aurora B** (Lampson and Cheeseman, 2011). Son rôle et sa fonction en tant que protéine « senseur » a précédemment été expliqué (voir *Evènements surveillés par le SAC : tension et attachement*). Des études montrent que le niveau de MPS1 diminue suite à un attachement des microtubules mais nécessite une tension pour être complètement délocalisé des kinétochores et ainsi abolir la présence de MAD1-C-MAD2 (Howell et al., 2004). Aurora B aurait donc un rôle dans l'inactivation du SAC suite à une tension intra kinétochorienne en empêchant la phosphorylation et donc l'activation et la localisation de ses substrats tels que RZZ, MPS1, MAD2 et BUBR1/MAD3 (King et al., 2007b).

En plus de l'inactivité de la kinase Aurora B, il s'agit en parallèle de déphosphoryler ces substrats précédemment phosphorylés. La **PP1** chez les levures et **PP1 γ** / **PP2A** (chez les vertébrés sont essentielles pour la sortie de la mitose (Liu et al., 2010). En effet, les PPs s'opposent à l'activité d'Aurora B en déphosphorylant les protéines du SAC et stabiliseraient aussi les attachements des microtubules (Emanuele et al., 2008; Liu et al., 2010). La PP1 serait recrutée par KNL-1, recrutement dépendant de la phosphorylation de KNL1 par Aurora B. Le niveau de PP recruté aux kinétochores est donc régulé et inversement proportionnel à l'activité d'Aurora B. Il y aurait donc un mécanisme de feedback positif où Aurora B cible directement ses substrats et contrôle aussi la présence de son

antagoniste, la phosphatase (Whyte et al., 2008). La phosphatase PP semblerait déphosphoryler tous les substrats d'Aurora B, notamment la dynéine, lui permettant ainsi de pouvoir transporter les composants du SAC (Whyte et al., 2008). Il a été proposé que chez les vertébrés, l'activité de la phosphatase soit essentielle, en plus de l'inactivation d'Aurora B. Cependant, ce mécanisme n'a pas encore été identifié chez les mammifères et les substrats potentiels de PP sont encore mal connus.

D'autres alternatives permettent d'expliquer l'inactivation graduelle du SAC en fonction de la tension : il s'agit de l'inactivation des inhibiteurs de l'APC/C.

b L'inactivation des inhibiteurs de l'APC/C.

En plus d'empêcher l'assemblage de nouveaux complexes MCC, il s'agit d'éteindre le signal « ON » généré par le SAC afin de libérer CDC20. Il y a plusieurs mécanismes impliqués dans le désassemblage des différents MCC : les cytoplasmiques libres ainsi que ceux liés à l'APC/C.

Le changement de conformation de MAD2 (O en C-MAD2) est régulé par sa phosphorylation en C-terminal. Lorsque MAD2 est phosphorylée, elle ne peut adopter sa conformation C-MAD2, l'empêchant ainsi de lier ses substrats (Kim et al., 2010). Le mécanisme responsable de cette phosphorylation n'est pas encore identifié, mais il est évident que la phosphorylation de MAD2 inhibe ces fonctions de deux manières différentes. Premièrement, cette phosphorylation atténue la conversion des O-MAD2 en C-MAD2, empêchant ainsi d'autres activations conformationnelles de MAD2 dont sa liaison avec MAD1. Deuxièmement, la phosphorylation de MAD2 contribuerait à l'inactivation du SAC en "coiffant" le complexe MAD1-MAD2 et bloquant ainsi le mécanisme de liaison avec CDC20, laissant d'une part CDC20 libre et d'autre part empêchant le signal amplificateur en aval. Cette dernière fonction est analogue à celle de la protéine p31^{comet} (déjà discuté dans *Le modèle MAD2*).

p31^{comet} est aussi un régulateur négatif et agirait en aval du MCC, permettant la sortie de mitose en activant la dissociation de MAD2 et CDC20. Mais p31^{comet} ne serait capable d'extraire MAD2 que des complexes MCC libres, et non pas ceux liés à l'APC/C. Récemment une sous unité de l'APC/C, Apc15 a été identifiée comme favorisant le « turnover » des MCC liés à l'APC/C (Uzunova et al., 2012). Une nouvelle protéine a aussi été proposée dans ce mécanisme: CUEDC2, un inactivateur du SAC. CUEDC2, lorsqu'elle est phosphorylée par CDK1, se lie à CDC20 et favorise le relargage de MAD2, conduisant donc à une activation de l'APC/C-CDC20 (Gao et al., 2011). Les voies de p31^{comet}, de la sous unité Apc15 et CUEDC2 agiraient donc en synergie pour le désassemblage du MCC.

c L'ubiquitylation et la protéolyse.

Les mécanismes proposés pour le désassemblage du MCC et l'inactivation du SAC seraient l'ubiquitylation par l'APC/C et/ou la dégradation par le protéasome. L'ubiquitylation dépendante de l'APC/C est essentielle au désassemblage du MCC. De façon intéressante, l'APC/C est la cible

moléculaire du MCC lors de l'activation du SAC, et lors de son inactivation, l'APC/C cible plusieurs protéines du MCC à son tour pour leurs dégradations. Les substrats potentiels de l'ubiquitylation par l'APC/C seraient CDC20, BUB1, BUBR1 et MPS1 (Cui et al., 2010; Palframan et al., 2006; Qi and Yu, 2007). Des études suggèrent que l'activité du protéasome ne serait pas indispensable pour la dissociation du MCC de l'APC/C. En effet, lorsque le SAC est « satisfait » avec les inhibiteurs d'Aurora B par exemple, le MCC peut se désassembler même quand le protéasome est inhibé (Visconti et al., 2010).

Un important mécanisme de l'inactivation du MCC est l'auto-ubiquitylation de CDC20. Pendant la prométaphase, CDC20 est continuellement synthétisé, ubiquitylé et dégradé et son turnover dépend de sa capacité à lier le MCC (Foster and Morgan, 2012). Chez la levure, l'auto-ubiquitylation de CDC20, lorsqu'elle est liée à MAD2 et MAD3 (BUBR1), serait un mécanisme d'inhibition de l'APC/C^{CDC20} (Pan and Chen, 2004). Il est suggéré que lorsque CDC20 est associé en complexe avec les protéines MAD2 ou BUBR1, il lierait l'APC/C à différents sites que lorsqu'il est seul. Par conséquence, ce repositionnement de CDC20 sur l'APC/C lorsqu'il est lié, pourrait bloquer l'ubiquitylation de la Sécurine et la Cycline B et favoriser l'auto-ubiquitylation de CDC20. Cette auto-ubiquitylation de CDC20, conservée chez les mammifères, serait aussi favorisée par p31^{comet} (Reddy et al., 2007). Cette auto-ubiquitylation aurait pour conséquence la dissociation de MAD2-CDC20 et le désassemblage du MCC (Jia et al., 2011). D'autre part, l'APC/C lui-même, par sa sous unité APC15 serait aussi responsable de la poly-ubiquitylation de CDC20 (Mansfeld et al., 2011; Uzunova et al., 2012) et sa protéolyse par le protéasome. Mais ce mécanisme de l'inhibition du SAC par l'ubiquitylation de CDC20 reste très peu identifié.

Des études récentes suggèrent que BUBR1 est régulé par l'ubiquitylation et l'acétylation. L'acétylation de BUBR1 le protégerait de l'ubiquitylation de l'APC/C en prométaphase. Lors de la métaphase, BUBR1 serait désacétylé et donc convertit en substrat pour l'APC/C (Choi et al., 2009). Il y aurait donc un mécanisme de désacétylation active de BUBR1 en métaphase, le convertissant en substrat pour l'APC/C, et BUBR1 ubiquitylé inactiverait le SAC, probablement en désassemblant les sous complexes BUBR1-CDC20 du MCC.

La protéine cible de l'inactivation du SAC et de l'activation de l'APC/C est donc clairement CDC20, le coactivateur de l'APC/C. Il semblerait que le critère le plus important pour la sortie de mitose soit le « turnover » de CDC20 plus que sa quantité. La synthèse de CDC20 compense sa dégradation pendant la mitose. Et l'inactivation du SAC permet plutôt la disponibilité de cet activateur (Liang et al., 2012). En conclusion, il semble évident que les activités de l'APC/C favorisent le désassemblage du MCC et l'inactivation du SAC, mais les mécanismes sous-jacents sont encore très mal connus.

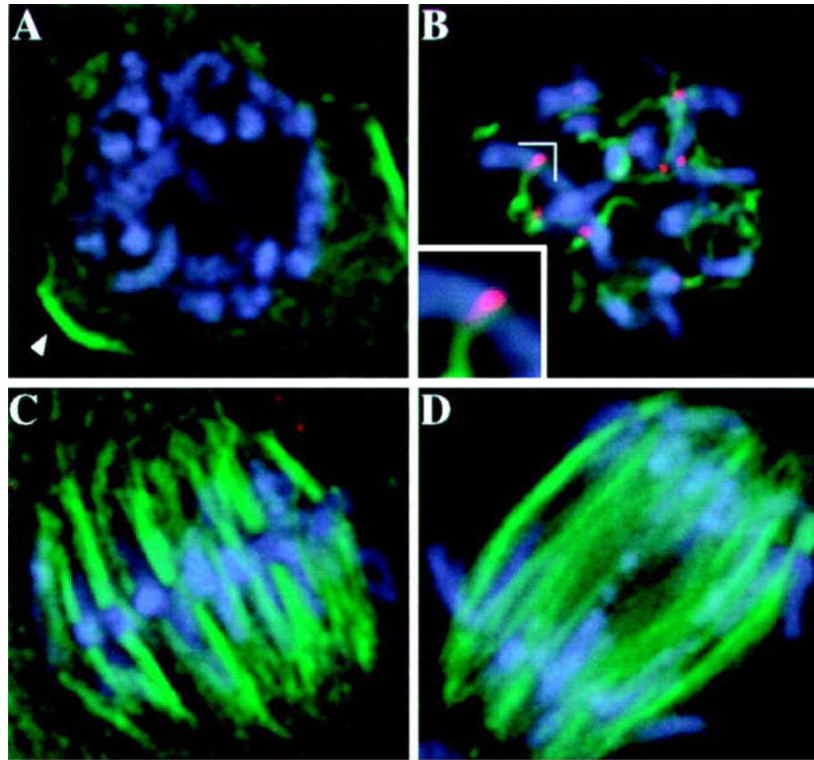


Figure 29: Localisation subcellulaire de MAD2 dans des cellules racinaires de maïs.

Immunolocalisation de MAD2 (en rouge), au cours d'une mitose. les microtubules sont en vert et les chromosomes en bleu.

A: Prophase: absence d'immunolocalisation MAD2, noter la présence de la bande préprophasique (flèche).

B: Prométaphase: des segments de fibres kinétochoriennes sont visibles, la présence de MAD2 est associée aux centromères. L'association d'une fibre kinétochorienne réduit l'intensité de marquage de MAD2 aux kinétochores

C et D: Métaphase et anaphase: MAD2 n'est plus détectable sur les chromosomes. D'après Yu et al. (1999).

E Le MCC chez les Végétaux.

Parmi les membres du MCC dont je viens de détailler le rôle dans le mécanisme du SAC chez les animaux, très peu de données chez les végétaux étaient disponibles au début de ma thèse.

Les coactivateurs de l'APC/C, CDH1 et CDC20 sont aussi retrouvés chez les plantes. Un homologue de CDC20 avait été identifié chez la carotte (Luo et al., 1997). Ce gène présente une expression dans les tissus enrichis en cellules en division et sa séquence protéique contient les domaines WD40 répétés, indiquant ainsi un potentiel homologue végétal de CDC20. Chez les plantes, il existe 2 isoformes de **CDH1**: *CCS52A* et *CCS52B*. Elles ont été identifiées chez *M. truncatula*. Elles sont impliquées dans la sortie de mitose et contrôlent les cycles d'endoréduplication (Cebolla et al., 1999; Tarayre et al., 2004; Vinardell et al., 2003). Chez *Arabidopsis*, le gène *AtCCS52A* est identifié et conserverait son implication dans les cycles d'endoréduplication (Lammens et al., 2008). Les protéines homologues des deux coactivateurs CDH1 et CDC20 présentent donc une conservation de leurs fonctions mitotiques dans le règne végétal. En 2003, Capron et al. s'intéresse à l'APC/C chez *Arabidopsis*. Ils identifient les homologues des sous unités de l'APC/C et recherchent en parallèle les activateurs et substrats de l'APC/C. Parmi les activateurs, 6 homologues de *CDC20* sont identifiés (dont 5 présentant des KEN Box). Aucun des substrats de l'APC/C impliqués dans le cycle cellulaire n'étaient jusqu'alors connus. Cependant, deux gènes homologues putatifs de *MAD2* ont été identifiés dans cette étude chez *Arabidopsis* mais n'ont pas été caractérisés (Capron et al., 2003).

MAD2 fut le premier gène identifié chez le maïs (Yu et al., 1999). *MAD2* présente 42% d'identité avec le gène *MAD2* de *S. cerevisiae* et 46% d'identité (70% de similarité) avec le gène *MAD2* du xénope. L'immunolocalisation de *MAD2* chez le maïs révèle que la protéine est associée à la plaque externe des kinétochores lors de la prométaphase et disparaît des chromosomes métaphasiques bi-orientés (Figure 29). Ces résultats corrélerent les autres études sur *MAD2* l'indiquant comme marqueur de kinétochores non attachés (Chen et al., 1996). Les auteurs visualisent une localisation supplémentaire de *MAD2* lors de la méiose sur des kinétochores attachés, lors d'une absence de tension, laissant supposer un rôle supplémentaire en tant que senseur de la tension. En 2004, trois copies homologues de *MAD2* sont identifiées chez le blé hexaploïde (Kimbara et al., 2004). Les trois gènes sont exprimés dans les racines et les jeunes épis. L'immunolocalisation des protéines révèle que *MAD2*, cytoplasmique en interphase, se reconcentre dans les noyaux en prophase et présente peu ou pas de localisation kinétochorienne en prométaphase lors d'une mitose normale. Suite à des défauts du fuseau (induits avec des drogues déstabilisants les microtubules), *MAD2* se relocalise sur tous les kinétochores (non attachés) de la prophase à la métaphase. Il semblerait donc que la protéine *MAD2* conserve son rôle dans le MCC chez les végétaux, rôle potentiellement nuancés entre les espèces végétales.

En 2005, Menges et al. réalisent une analyse globale des gènes d'Arabidopsis à partir de cultures cellulaires d'Arabidopsis afin d'identifier des gènes régulés au cours du cycle cellulaire. Dans cette étude, les homologues putatifs BUB3, BUB1 et MAD2 sont montrés comme régulés au cours du cycle cellulaire et induit lors de la transition G2/M (Menges et al., 2005).

OBJECTIFS DE LA THESE

Les profonds changements morphologiques et physiologiques observés durant la mise en place des cellules géantes sont le reflet d'une modulation de l'expression de nombreux gènes (Barcala et al., 2010). Cependant les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la formation des cellules géantes restent encore mal connus. Les études réalisées au laboratoire ont permis de montrer le rôle essentiel du cytosquelette lors de l'ontogénèse des cellules géantes et d'identifier et de caractériser une protéine associée aux microtubules, MAP65-3, essentielle à la formation des cellules géantes et au développement du nématode (Caillaud *et al.*, 2008). Un premier interactant de MAP65-3 a été identifié: il s'agit d'une protéine présentant des homologies avec BUB3 caractérisée chez les animaux (Mussachio and Salmon, 2007) et encore inconnue chez les végétaux. Cette protéine BUB3 appartient au « Mitotic Checkpoint Complex », mécanisme de surveillance qui assure la fidélité de la ségrégation des chromosomes lors de la mitose. Ce complexe n'a pas encore été caractérisé chez les végétaux.

L'objectif de cette thèse vise donc à caractériser les membres de ce complexe chez *Arabidopsis* et d'étudier leur rôle au cours du développement de la plante et lors d'une interaction compatible avec le nématode. Le premier objectif est d'identifier les protéines BUB3, BUB1 et MAD2 et d'étudier les interactions, d'une part entre MAP65-3 et les membres potentiels du MCC, et d'autre part entre les différents membres du MCC. Le second objectif est de réaliser l'analyse fonctionnelle de ces protéines en déterminant leurs profils d'expression spatio-temporelle lors du développement de la plante et au cours de l'interaction plante-nématode, plus particulièrement dans les cellules géantes. L'analyse de leurs localisations subcellulaires ainsi que l'effet de l'inactivation de ces gènes doit permettre finalement de mieux comprendre le rôle indispensable de MAP65-3 et de la dynamique du cytosquelette de microtubules dans le développement des sites nourriciers.

RESULTATS

Au cours de mon travail de thèse, j'ai réalisé l'analyse fonctionnelle des homologues des membres du « Mitotic Checkpoint Complex » chez *Arabidopsis*. Au vu du peu de données dans la littérature chez les plantes à ce sujet, il s'agissait dans un premier temps de valider ces potentiels homologues du complexe, essentiellement lors du développement de la plante. La première partie des résultats est consacrée à l'étude de BUB3, BUBR1 et MAD2, sans aborder l'étude de ces protéines au cours de la formation des cellules géantes. Ce travail a donné lieu à la publication d'un article au cours de ma première année de thèse. J'ai poursuivi par la suite l'analyse fonctionnelle des ces 3 protéines ainsi que de deux membres de la famille multigénique de BUB1 (BUB1.2 et BUB1.3), lors du développement de la plante et au cours de l'interaction avec le nématode. Cette deuxième partie des résultats est présentée sous forme d'article, en cours de soumission.

Chapitre 1. La caractérisation du « Spindle Assembly Checkpoint » chez les plantes.

Pour mieux comprendre le rôle de MAP65-3, ses partenaires protéiques ont été recherchés par une stratégie de double hybride nommée «split-ubiquitin ». Cette approche a permis d'identifier un partenaire protéique de MAP65-3 nommée BUB3.1. Le gène At3G19590 codant cette protéine est orthologue à la protéine BUB3 chez l'homme et la levure *S. cerevisiae*. L'interaction entre MAP65-3 et BUB3.1 a été validé in planta par une approche de «Bimolecular Fluorescent Complementation » (BiFc) en feuilles de tabac. Afin de mieux comprendre le rôle de BUB3.1, l'analyse fonctionnelle de cette protéine a été réalisée tout d'abord au cours du développement de la plante, sans aborder l'étude de cette protéine au cours de la formation des cellules géantes. Au cours de cette analyse fonctionnelle préliminaire, l'interaction entre BUB3.1 et MAP65.3 n'a pas été abordée. Cette étude a permis d'identifier un complexe protéique de surveillance de la mitose très bien caractérisé chez les métazoaires et la levure mais encore inconnu chez les plantes. Les travaux que nous avons réalisés afin d'étudier la fonction de protéines BUB3, BUBR1 et MAD2 d'*A. thaliana* dans le « Spindle Assembly

Checkpoint » est développée dans l'article présenté. Ce travail a été réalisé en collaboration avec L. Deslandes du « Laboratoire Interaction Plantes Microorganismes » de Castanet-Tolosan.

Article de recherche 1

Caillaud, M.C., Paganelli, L., Lecomte, P., Deslandes, L., Marfaing, Abad, P., and Favery, B. (2009). Spindle Assembly Checkpoint Protein Dynamics Reveal Conserved and Unsuspected Roles in Plant Cell Division. *PLoS One* 4, (8) : e6757.

Cette étude a débutée par une recherche de protéines orthologues des protéines du SAC de *H. sapiens* chez *A. thaliana*. Les membres potentiels du SAC, identifiés chez *A. thaliana*, incluent deux protéines BUB3 (BUB3.1 et BUB3.2), une protéine BUBR1 et une protéine MAD2. L'analyse des profils d'expression des gènes *BUB3.1*, *BUBR1* et *MAD2* chez *A. thaliana* a permis de montrer qu'ils étaient exprimés dans tous les tissus enrichis en cellules en division. *BUB3.2*, quant à lui ne présentait pas d'expression corrélée aux tissus en division, expliquant pourquoi nous sommes ensuite intéressés qu'à *BUB3.1*. Les études d'interactomiques par des approche de double hybride en levure ou *in planta* ont permis de montrer que BUBR1, BUB3.1 and MAD2 interagissent physiquement. Ces interactions ont été validées *in planta*, par la technique de BiFc, qui permet en plus de visualiser la localisation des interactions. Certaines interactions présentent une localisation intéressante: BUB3.1 interagit avec BUBR1 dans les noyaux, et BUBR1 et MAD2 interagissent ensemble exclusivement au niveau des centromères. La localisation subcellulaire de ces trois protéines a été étudiée dans des cellules de tabac: au cours d'une mitose normale, les protéines sont cytoplasmiques ne présentant donc pas de localisation spécifique sur les chromosomes. Lorsque le SAC est activé dans les cellules végétales, par blocage de l'assemblage du fuseau mitotique (utilisation de drogues déstabilisant les microtubules), ces trois protéines sont localisées au niveau des kinétochores des chromosomes. De plus, lorsque tous les kinétochores sont accrochés aux microtubules du fuseau bipolaire dans des cellules de tabac stoppées en métaphase, les protéines du SAC initialement localisées au niveau des kinétochores des chromosomes situés sur la plaque équatoriale vont progressivement diffuser le long des microtubules kinétochoriens. Ainsi, le SAC jouerait un rôle conservé chez les plantes, régulant la transition entre la métaphase et l'anaphase. L'étude de la dynamique de la localisation de ces trois protéines au cours d'une mitose « normale » a également été réalisée. Cette étude a permis de mettre en évidence une localisation subcellulaire particulière de BUB3.1, au niveau du centre du phragmoplaste en expansion, lors de la cytokinèse. Ainsi, chez les plantes, BUB3.1 pourrait être impliquée à la fois dans la régulation de la transition métaphase/anaphase mais également dans l'expansion du phragmoplaste, coordonnant ces deux étapes du cycle cellulaire.

Spindle Assembly Checkpoint Protein Dynamics Reveal Conserved and Unsuspected Roles in Plant Cell Division

Marie-Cécile Caillaud^{1,2,3}, Laetitia Paganelli^{1,2,3}, Philippe Lecomte^{1,2,3}, Laurent Deslandes⁴, Michaël Quentin^{1,2,3}, Yann Pecrix⁵, Manuel Le Bris⁵, Nicolas Marfaing^{1,2,3}, Pierre Abad^{1,2,3}, Bruno Favery^{1,2,3*}

1 Institut National de la Recherche Agronomique, Unité Mixte de Recherche 1301, Sophia-Antipolis, France, **2** Centre Nationale de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 6243, Sophia-Antipolis, France, **3** Université de Nice Sophia-Antipolis, Unité Mixte de Recherche 1301, Sophia-Antipolis, France, **4** Institut National de la Recherche Agronomique-Centre National de la Recherche Scientifique, Unité Mixte de Recherche 2594, Castanet-Tolosan, France, **5** Institut Méditerranéen d'Ecologie et de Paléoécologie IMEP, Unité Mixte de Recherche- Centre National de la Recherche Scientifique –Institut de Recherche pour le Développement 6116, Université Paul Cézanne, Marseille, France

Abstract

Background: In eukaryotes, the spindle assembly checkpoint (SAC) ensures that chromosomes undergoing mitosis do not segregate until they are properly attached to the microtubules of the spindle.

Methodology/Principal Findings: We investigated the mechanism underlying this surveillance mechanism in plants, by characterising the orthologous SAC proteins BUBR1, BUB3 and MAD2 from *Arabidopsis*. We showed that the cell cycle-regulated BUBR1, BUB3.1 and MAD2 proteins interacted physically with each other. Furthermore, BUBR1 and MAD2 interacted specifically at chromocenters. Following SAC activation by global defects in spindle assembly, these three interacting partners localised to unattached kinetochores. In addition, in cases of ‘wait anaphase’, plant SAC proteins were associated with both kinetochores and kinetochore microtubules. Unexpectedly, BUB3.1 was also found in the phragmoplast midline during the final step of cell division in plants.

Conclusions/Significance: We conclude that plant BUBR1, BUB3.1 and MAD2 proteins may have the SAC protein functions conserved from yeast to humans. The association of BUB3.1 with both unattached kinetochore and phragmoplast suggests that in plant, BUB3.1 may have other roles beyond the spindle assembly checkpoint itself. Finally, this study of the SAC dynamics pinpoints uncharacterised roles of this surveillance mechanism in plant cell division.

Citation: Caillaud M-C, Paganelli L, Lecomte P, Deslandes L, Quentin M, et al. (2009) Spindle Assembly Checkpoint Protein Dynamics Reveal Conserved and Unsuspected Roles in Plant Cell Division. PLoS ONE 4(8): e6757. doi:10.1371/journal.pone.0006757

Editor: Michael Freitag, Oregon State University, United States of America

Received: May 19, 2009; **Accepted:** July 27, 2009; **Published:** August 27, 2009

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

Funding: This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche ANR-08-GENM-014 SCRIPS grant. M.-C. C. and L.P. were supported by fellowships from the French Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

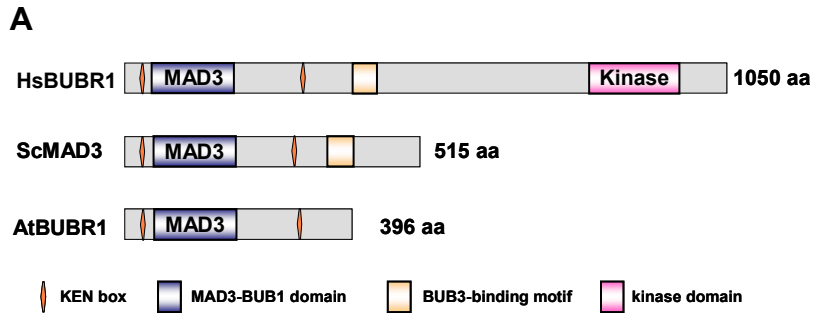
* E-mail: favery@sophia.inra.fr

Introduction

In eukaryotes, the spindle assembly checkpoint (SAC) is a sophisticated surveillance mechanism that ensures the fidelity of chromosome segregation during mitosis [1,2]. The SAC monitors the interaction between chromosomes and microtubules (MTs) at specialised chromosomal regions, the kinetochores. In response to unattached kinetochores and to kinetochores lacking tension, the SAC is activated and localised to unattached kinetochores. The SAC transmits a “wait anaphase” signal until all chromosomes achieve bipolar attachment. This signal is transmitted through the inhibition of anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C) activity by sequestration of the CDC20 cofactor. SAC components were first identified through genetic screens in budding yeast and include the MAD (mitotic arrest-deficient) and BUB (budding uninhibited by benzimidazol) proteins [3,4]. In metazoans and yeast, the mitotic checkpoint complex (MCC), which contains the three SAC proteins MAD2, MAD3 (equivalent of BUBR1, for BUB1-related, in higher eukaryotes) and BUB3 together

with CDC20, is regarded as the SAC effector [5–7]. In budding yeast, the SAC is a non-essential device and it only becomes essential in response to ‘damage’ that is perturbations in the kinetochore-MT attachment process [3,4]. On the other hand, in metazoans, the SAC is an essential pathway, the integrity of which is required to prevent chromosome mis-segregation and cell death [2]. In plants, SAC protein homologs have been identified *in silico* [8–10], but function has been investigated only for MAD2 for which localisation to unattached kinetochores has been demonstrated by immunolocalisation [11,12].

In this paper, we investigated how this surveillance mechanism operates in the green kingdom. We demonstrated physical interactions between *A. thaliana* BUBR1, BUB3.1 and MAD2 and their dynamics at unattached kinetochores. In cases of ‘wait anaphase’, plant BUBR1, BUB3.1 and MAD2 proteins were unexpectedly associated with both kinetochores and kinetochore microtubules. Our findings suggest that plant BUBR1, BUB3.1 and MAD2 have both the SAC protein functions conserved from yeast to humans and pinpoints uncharacterised roles in plant cell division.



B

		KEN
AtBUBR1	(1)	MAAETKVQVSDPEAEFLNSKQETGYEWBDFKENVKPKRNRNVGILNHALKSHSDHQLRK
HsBUBR1	(1)	-----MAAVKKEGGALSEAMSLBGEDEWBLSKENVQVPRQCRIMSTLQGLAQESACNNT-
XBUB1B	(1)	-----MAAQAGDEWBLSKENVQVPRQCRVMSTLQEVLSQESASHTA
ScMAD3	(1)	-MKAYAKKRISYMPSSPSQNVINFEIEFCKENILLPKCCRSAALSKAIHQPLVE----
SpMAD3	(1)	-----MEPLDAGKNVWHMDVIBOSKENIEERKACHSAAIAKSSSRNHTKEVA
		MAD3-BUB1 domain
AtBUBR1	(61)	NLIE-KRRNLIEAIDEYEGCDPLSPWIECLKRWQEAAPFSS--GCSGLLVIYBQCVKRFW
HsBUBR1	(56)	LQQQ--KRAFEYBIRFYTGNDPLDVVDRYIISWTEQNYBPG--GKESNMSTLLEBRAVEALQ
XBUB1B	(42)	VQQQ--KQAFELBLRFYAGDDPLDVVDRYIKWAEQAFPG--GKESNLCPLLERCKIPIH
ScMAD3	(60)	INQVKSSEFQRLIDELPALSDPITLYLEYIKWLNAYPQGGNSKQSMLLTLERCLSHLK
SpMAD3	(50)	GLQKERMGMHERKIETSESLDPLQVVIDYIKWTLDNFQCE-TKTSGLVTLLEKRCRETRV
		KEN
AtBUBR1	(118)	HSEKRYKDDRRLLKWLLEYAEHCA----DAEVIYKFLVNEKCKTHAVYVITAYALHIEFK
HsBUBR1	(111)	GEKRYYSDFRFLNLWLKLGRLCN----EPLDMYSYLHNQCIGVSLAQPFYISWAEYEFK
XBUB1B	(98)	EEQRYYDDRRFLNITCKKPFANFCS----EPLDLYSYLHSQCIGVSHSLYITWAEQFEAK
ScMAD3	(116)	DLEKRYRNDVRRFLKIWFYVIELFTRNSFMSRDIIFMYMLRNQIGSELASFYEEFTNLLIQK
SpMAD3	(109)	RNPLVYKDDRRRLIWMQVYNYID----EVELFESFLAHHHIGQESSIFVYEEYNYFEK
		KEN
AtBUBR1	(173)	NKVKTENEIENLQTSRDAKDEVEKLNDAKKEFVVRTMRRSNTADEPKENNDLPSRSFGTL
HsBUBR1	(166)	ENFRKADATFQESIQOKADELRLQSQHRQFQARVSRQTLLELEKE-----EEE
XBUB1B	(153)	GNFKKADSMFQCSMQCKADELRLQSQHRQFQARVSRQVLRQGISG-----PDV
ScMAD3	(176)	EKFOYAVKTLQLGHIKNAKAPNKVIEDRLNHLRLRELGENNIQLGNIEIS-----MDSL
SpMAD3	(164)	GLFQKADDEVYQCKKRMKADELPLRFQQKYQCFTHRWLEFAPQSFSSN-----TNS
		KEN
AtBUBR1	(233)	LSRGDNNARQALGSSNPQAKLKPNSKTPFAIYADAVSDTTSGNQESDKS-----
HsBUBR1	(215)	EVPFESSVPQSTLAEIKGKKTARAPIIRVGGALKAPSQNRGLQNPFFQMQNNSRITV
XBUB1B	(202)	EPELSEPPQSSSLADLKSRSKTKAKVPVNRVGDSTKSRPQGLQQAAPQQIPNRSRFSV
ScMAD3	(213)	VNPLQTTFESTNIQEIS---QSRTKISKPKFKFSVYSDADGSGKDGQ-----
SpMAD3	(227)	EStVLGKTRSEFVNRLELANQNGTSSDVNLTKNNVFVDGEESDVVELFETPN--R-----
		KEN
AtBUBR1	(287)	-----RPEFGSWMLGGRAEENKKNNSLPRKWASFKVPQK----PIVRTVAA
HsBUBR1	(275)	FDENADEASTAELSKPTVOPWIAPPMPKKNENLQAGPNTGRSLEHRPRGNTASLIAPV
XBUB1B	(262)	FDENAAMSAQELPSLTPOQWTAPPAPSKKNEQARPNNSGRPSRN---GHQAPVSELP
ScMAD3	(279)	-----GVYRDCWENFDLKAENKKNLRLISLLEANTNLGE-----LKQH
SpMAD3	(257)	-----P---GTWQTLGTVDRKKNNISATSWVGEKLPK-----SPRKL
		KEN
AtBUBR1	(330)	ASASTFEVFDVEECTEEEEKKKNDETISSSNVPLNGGREIKKETELLRONPLRHFP
HsBUBR1	(335)	AVLPSFTPYVEETARQPVMTPCKIEPSINHILSTRKKGKEBGPQQRVQSHQQAASEEKKK
XBUB1B	(319)	QSLPSFTPYVDEGAHQTVTPCKINBAVTSVLSRKGK-DEDPQQRVQNSQG---KKE
ScMAD3	(318)	EMLSQKRPYDEKLPFRDSTIGRSDVYQMINTKDQ-----KPE
SpMAD3	(294)	DPVGGKQVHCDEEVSKE-----
		BUB3 binding domain
AtBUBR1	(390)	PNSFLRR----- (396/396)
HsBUBR1	(395)	-----KMMYCKEKIYA-CVGEFSEETIRAEVFRKXKLEQREAEEL (433/1050)
XBUB1B	(375)	-----TVMYCKDKVYA-CVEEFSLEETIRAIYMAKVRKREDDLQ (413/1041)
ScMAD3	(357)	KIDCNFKLIYCEDEESKGRLEEFSLEVLATIS--RNVYKRVTRNRKH (401/515)
SpMAD3	(310)	----- (310/310)

Figure S1. Sequence comparison of BUBR1/MAD3-related proteins. (A) Domain organisation of *Arabidopsis thaliana* AtBUBR1, *Homo sapiens* HsBUBR1 and *Saccharomyces cerevisiae* ScMAD3. Proteins are drawn to scale. (B) Alignment of AtBUBR1 protein from *A. thaliana* (AtBUBR1, At2g33560) with MAD3 protein from *Schizosaccharomyces pombe* (SpMAD3, O59767) and the NH2-terminal domains of BUBR1/MAD3 proteins from human (HsBUBR1, O60566), *Xenopus laevis* (XBUB1B, Q8JGT8) and *S. cerevisiae* (ScMAD3, P47074). The MAD3-BUB1 domain (PF08311), KEN boxes and BUB3-binding domain of hBUB1B are indicated.

Results and Discussion

As a first attempt to study SAC during the plant cell cycle, candidate *A. thaliana* orthologs of the human essential mitotic checkpoint complex proteins BUBR1, BUB3 and MAD2 were identified by OrthoMCL [13] clustering of orthologous proteins from six model eukaryotic species. The six complete proteomes compared included those of plants (*A. thaliana* and *Oryza sativa*), human (*Homo sapiens*), insect (*Drosophila melanogaster*) and nematodes (*Caenorhabditis elegans* and *Meloidogyne incognita*). *A. thaliana* BUBR1 (AT2G33560) is a 46 kD protein containing an N-terminal MAD3-BUB1 conserved domain and two KEN boxes conferring substrate recognition by APC/C [14] (Fig. S1). These two KEN boxes are conserved from yeast MAD3 to human BUBR1 and are required for the concerted action of MAD3 and MAD2 in the checkpoint inhibition of CDC20-APC/C [15–17]. Like the MAD3 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, *A. thaliana* BUBR1 differs from human BUBR1 by the absence of a C-terminal kinase domain. However, the kinase activity of BUBR1 has been shown to be dispensable for spindle checkpoint function in *Xenopus laevis* [18]. Two *A. thaliana* BUB3 proteins (BUB3.1, AT3G19590; BUB3.2, AT1G49910) were identified. Both are 38 kD proteins containing WD40 repeats, which have been shown to be involved in the association of BUB3 with MAD2, MAD3 and CDC20 in yeast [19]. *A. thaliana* BUB3.1 and BUB3.2 are 88% identical. BUB3.1 is 52% and 22% identical to the human and *S. cerevisiae* BUB3 proteins [4,20], respectively, over its entire length (Fig. S2). *A. thaliana* MAD2 (AT3G25980) is a 24 kD protein containing a HORMA domain. It is 44% identical to the human MAD2 protein [21] and 81% identical to the maize MAD2 protein [11], over its entire length (Fig. S3).

Arabidopsis *BUBR*, *BUB3.1* and *MAD2* genes were expressed in tissues enriched in dividing cells

We investigated the pattern of expression of the *A. thaliana* *BUBR1*, *BUB3.1*, *BUB3.2* and *MAD2* genes during plant development, using *A. thaliana* transgenic lines transformed with the corresponding promoter-GUS reporter gene constructs. Similar patterns of GUS expression were observed for the *BUBR1*, *BUB3.1* and *MAD2* promoters, both of which directed expression in tissues with a high proportion of dividing cells, early in organ development, in young leaves (Fig. 1A), lateral root primordia (Fig. 1B), lateral root meristems (Fig. 1C) and root meristems (Fig. 1D). Individual cells with strong GUS activity were observed in root meristems. In contrast to the cell cycle regulated pattern observed for both *BUBR1*, *BUB3.1* and *MAD2* promoter, no GUS activity in dividing cells was observed for the *BUB3.2* promoter in young leaves (Fig. 1A), lateral root primordia (Fig. 1B), lateral root meristems (Fig. 1C) and root meristems (Fig. 1D). These results are consistent with global transcriptome and RT-PCR analysis showing that *BUB3.1*, *BUBR1* and *MAD2* presented a distinct expression peak at the G2/M boundary in synchronised *A. thaliana* cell cultures that was not observed for *BUB3.2* [9,10]. Because *BUB3.2* was not a cell cycle regulated gene, we next focused on *BUB3.1* candidate gene.

BUBR1 and MAD2 interact specifically at chromocenters

In yeast and humans, BUBR1, BUB3 and MAD2 may be found together in large complexes (mitotic checkpoint complex) [7,17,19]. To carry out possible interactions between the cell cycle-regulated *A. thaliana* BUBR1, BUB3.1 and MAD2, a yeast two-hybrid split-ubiquitin approach was used. It is based on the fusion of the prey and the bait to the N- and C-terminal halves of ubiquitin (Nub and Cub, respectively), which are then able to form

a native-like ubiquitin upon interaction [22]. Ubiquitin-specific proteases recognize the reconstituted ubiquitin and cleave off a reporter protein, URA3, linked to the C terminus of Cub and whose degradation results in uracil auxotrophy and 5-FOA resistance. Coexpression of BUBR1:Cub:URA3 with either Nub:BUB3.1 and Nub:MAD2 conferred resistance to 5-FOA, indicating that BUBR1 interacted with both BUB3.1 and MAD2. BUB3.1 and MAD2 also interacted (Fig. 2A). These interactions were confirmed in a reciprocal bait-prey experiment.

To better characterise the physical interactions between BUBR1, BUB3.1 and MAD2, we performed *in planta* localisation of these interactions. Following transient expression of the appropriate gene construct in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermis, BUBR1 fused to GFP (BUBR1:GFP) was specifically targeted to the nucleus ($n=30$; Fig. 2B), whereas BUB3.1:GFP and MAD2:GFP were detected in both the nucleus and the cytoplasm ($n=30$; Fig. 2B). Using bimolecular fluorescence complementation (BiFC; [23]), we demonstrated a close interaction between BUBR1, BUB3.1 and MAD2. Coexpression of the constructs encoding BUBR1:YC (BUBR1 fused to the C-terminal half of YFP) and BUB3.1:YN (BUB3 fused to the N-terminal half of YFP) resulted in the reconstituted YFP complexes only in the nuclei ($n=20$; Fig. 2C–D). In addition, BUB3.1 interacted with MAD2 in the nuclei and cytoplasm of epidermal cells ($n=20$; Fig. 2D). No YFP fluorescence was detected in negative control experiments in which BUBR1:YN, BUB3.1:YN, BUB3.1:YC or MAD2:YC was produced together with the corresponding vector control ($n=30$). Coexpression of the constructs encoding BUB3.1:YC, MAD2:YN, and BUBR1:GFP showed that BUB3.1 and MAD2 interact, and that they co-localise with BUBR1 in the nucleus ($n=20$; Fig. 2E). Interactions between BUBR1:YC and MAD2:YN were observed exclusively in the nucleus, as bright subnuclear foci ($n=40$; Fig. 2F). Within the nuclei, fluorescence signals were localised with the core of bright DAPI-stained condensed chromocenters (Fig. 2F). Using the centromeric Histone H3 variant from *A. thaliana* GFP:HTR12 (CENH3, AT1G01370) as *in vivo* marker for centromeres [24–26], we confirmed that BUBR1 and MAD2 interact at interphase centromeres ($n=10$; Fig. 2G) corresponding to the position on the chromosome at which kinetochore proteins associate.

BUBR1, BUB3.1 and MAD2 localised to the kinetochores following SAC activation

In metazoan cells, the BUBR1, BUB3 and MAD2 proteins are specifically localised to the kinetochores following the activation of the SAC by global defects in spindle assembly in cells treated with microtubule poisons [20,27–29]. The maize and wheat MAD2 proteins are the only plant SAC proteins for which localisation to unattached kinetochores has been demonstrated [11,12]. By combined direct immunofluorescence of maize MAD2 and CENPC, the identity of the MAD2-positive regions as kinetochores has been demonstrated [11].

To gain insight into the spindle checkpoint activation in plant, we profiled the spatial distribution of *A. thaliana* SAC proteins in tobacco cell cultures stably expressing the BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP and MAD2:GFP constructs. At a prometaphase-like stage, following treatment with the microtubule-destabilizing herbicide propyzamid, which prevents the formation of microtubule-kinetochore attachments, the MAD2 fusion protein was found to cluster strongly in bright spots on condensing chromosomes corresponding to unattached kinetochores ($n=20$; Fig. 3). Similar localisation was observed for the BUB3.1 and BUBR1 fusion proteins ($n=20$; Fig. 3). Thus, the plant BUBR1, BUB3.1 and MAD2 partners identified in this study are all in

A

HsBUB3

WD40	WD40	WD40	WD40	WD40	WD40	WD40
------	------	------	------	------	------	------

 328 aa

AtBUB3.1

WD40	WD40	WD40	WD40	WD40	WD40	WD40
------	------	------	------	------	------	------

 340 aa

B

```

                                WD-40 #1                **
AtBUB3.1 (1) MTTVTPSAGRELSNPPSDLSNLRFS-NNSDHLLVSWDKRVRL--YDVSTN--SLKGEFL
AtBUB3.2 (1) -MTLVPAIGRELSNPPSDLSNLRFS-NNSDHLLVSWDKSVRL--YDANGD--LMRGEFK
DmBUB3 (1) ---MRPPEFKLNNPPSDLSAVKFGEKSNQYMAASSWDDTLRF--YDVPAN--QLRQKFV
HsBUB3 (1) ---MTGSNEFKLNPPSDLSVKFSPNTSQFLVSWDTSVRL--YDVPAN--SMLKLYQ
mBUB3 (1) ---MTGSNEFKLNPPSDLSVKFSPNTSQFLVSWDTSVRL--YDVPAN--SMLKLYQ
XBUB3 (1) ---MTGSNEFKLNQAPPSDLSVKFSPNTSQFLVSWDTSVRL--YDVPAN--TMLKLYQ
ScBUB3 (1) -----MQIVQIEQAPRDIYSDIKIIFSKS-LLLITSWDCSLTVYKFDIQAKNVDLQSLR

                                WD-40 #2                **
AtBUB3.1 (57) HGGAVLDCFHD--FSGFSVGADYKVRRIVF-NVGKEDILGTHDKAVRCVEYSYAAG-OV
AtBUB3.2 (56) HGGAVLDCFHD--SSGFSVCADTKVRRIVF-NAGKEDVLGTHEKVRCVEYSYAAG-OV
DmBUB3 (54) QDAPLDCFHDI--VHVVSGLDNQLRLFV-NTQAESIIGAHEEPIRCVEHAEYN-GI
HsBUB3 (55) HTGAVLDCFAVDPP--THAWSGGLDHQLKMHDL-NTDOENLVGTHDAPIRCVEYCPEVN-VM
mBUB3 (55) HTGAVLDCFAVDPP--THAWSGGLDHQLKMHDL-NTDOENLVGTHDAPIRCVEYCPEVN-VM
XBUB3 (55) HAGPVLDCFAVDPP--THAWSGGLDHQLKMHDL-NTDGDTVVGSHDAPIRCVEYCPEVN-VI
ScBUB3 (55) YKHPLDCFAVDPP--NTDLQIYVGTVQGELLKVDLIGSPSFQALTNNEANLGICRICKYGDDL

                                WD-40 #3 **                WD-40 #4                **
AtBUB3.1 (114) ITGSWDQTVKLWDPR--GASGTERTQ--VGTYLOPE--RVSMSLVGHRLVWATAGRHNIYD
AtBUB3.2 (113) ITGSWDQTVKLWDPR--GASGTERTQ--IGTYMOPE--RVNSLSVGNRLVWATAGRHNIYD
DmBUB3 (111) LTGSWDQTVKLWDPR-----EKRC--VGTFEONNGKVYSMSVIDEKIVATSDRKLIWD
HsBUB3 (112) VTGSWDQTVKLWDPR-----TPCN--AGTFSOPE--KVYTLSVSGDRLIVTAGRRLVWD
mBUB3 (112) VTGSWDQTVKLWDPR-----TPCN--AGTFSOPE--KVYTLSVSGDRLIVTAGRRLVWD
XBUB3 (112) VTGSWDQTVKLWDPR-----TPCN--AGTFSOPE--KVYTLSVSGDRLIVTAGRRLVWD
ScBUB3 (116) IAASWDGLEIVDPRNYGDGVIAVKNLNSNTKVKNIFTMDTNSSLIVGMNSQYWFR

                                WD-40 #5                **
AtBUB3.1 (171) LRNMSQPE--ORRESSLKYOTRCVRCVE--NGTGYALSSVFGRVAMEFDLSEA--AQAKKYA
AtBUB3.2 (170) LRNMSQPE--ORRESSLKYOTRCVRCVE--NGTGYALSSVFGRVAMEFDLSEA--AQAKKYA
DmBUB3 (164) LRKMDSYI--MKRESSLKYOTRCIRLFE--NKEGYVMSSTRGRVAVEYLDHDPE--VORRKFA
HsBUB3 (164) LRNMGYVO--ORRESSLKYOTRCIRAFE--NKOGYVLSSTRGRVAVEYLDPSPE--VOKKKYA
mBUB3 (164) LRNMGYVO--ORRESSLKYOTRCIRAFE--NKOGYVLSSTRGRVAVEYLDPSPE--VOKKKYA
XBUB3 (164) LRNMGYVO--ORRESSLKYOTRCIRAFE--NKOGYVLSSTRGRVAVEYLDPSLE--VOKKKYA
ScBUB3 (177) PLCEDDNGTIESLKYOTRDVALIEKQBGYACSSIDGRVAVEYLDQGDDYNSSKRFA

                                WD-40 #6                **
AtBUB3.1 (228) EKCHRKSEAGRDIVYPVNSIAHPIYG-TFATGSDCGFVNIDGNNKRLIYSKYPT-SI
AtBUB3.2 (227) EKCHRKSEDGRDIVYPVNAIAHPIYG-TFATGSDCGFVNIDGNNKRLIYSKYPT-SI
DmBUB3 (221) EKCHRNRECNIEOIYPVNALSHNVYQ-TFATGSDCGFVNIDGFNKRLCOFHRYT-SI
HsBUB3 (221) EKCHRLKENNIEOIYPVNALSHNIHN-TFATGSDCGFVNIDDPFNKRLCOFHRYPT-SI
mBUB3 (221) EKCHRLKENNIEOIYPVNALSHNIHN-TFATGSDCGFVNIDDPFNKRLCOFHRYPT-SI
XBUB3 (221) EKCHRLKENNIEOIYPVNSHNLHN-TFATGSDCGFVNIDDPFNKRLCOFHRYPT-SI
ScBUB3 (238) EKCHRLNLKDTNLAYPVNSLESPRHK-FLYTASDCGILSCNLQTRKKIKNFAKFNEDSV

                                WD-40 #7                **
AtBUB3.1 (287) SALSFSRDGQLAVASSYTFEEGEK--SOPEAIFVRSVNEIVKPKPKVYPNPAA (340)
AtBUB3.2 (287) AALSFSRDGGLAVASSYTFEEGDK--PHEPDAIFVRSVNEIVKPKPKVYPNPPV (339)
DmBUB3 (280) STLNFSDGSALAGCSYLDQLPETPATVPHPAIYIRYPDOETKOK----- (326)
HsBUB3 (280) ASLAFSNDGTLAVASSYMEMDDT--EHPEDCLFIROVTDAETKPKSPCT----- (328)
mBUB3 (280) ASLAFSNDGTLAVASSYMEMDDT--EHPEDCLFIROVTDAETKPKST----- (326)
XBUB3 (280) ASLAFSNDGSTLAVASYMEMDDI--DHPEDAIYIROVTDAETKPK----- (324)
ScBUB3 (298) VKIACSDNILCATSDDTFKTNAAIDQTIELNASSIYIFDYEN----- (341)
```

Figure S2. Sequence comparison of BUB3-related proteins. (A) Domain organisation of *Arabidopsis thaliana* AtBUB3.1 and *Homo sapiens* HsBUB3. (B) Alignment of the BUB3-related proteins from *A. thaliana* (AtBUB3.1, At3g19590; AtBUB3.2, At1g49910), *Drosophila melanogaster* (DmBUB3, NP477381), *Homo sapiens* (HsBUB3, O43684), *Mus musculus* (mBUB3, Q9WVA3), *Xenopus laevis* (XBUB3, Q98UH2) and *Saccharomyces cerevisiae* (ScBUB3, P26449). The WD-40 repeats are underlined and the BUB3 WD signature sequence indicated by asterisks.

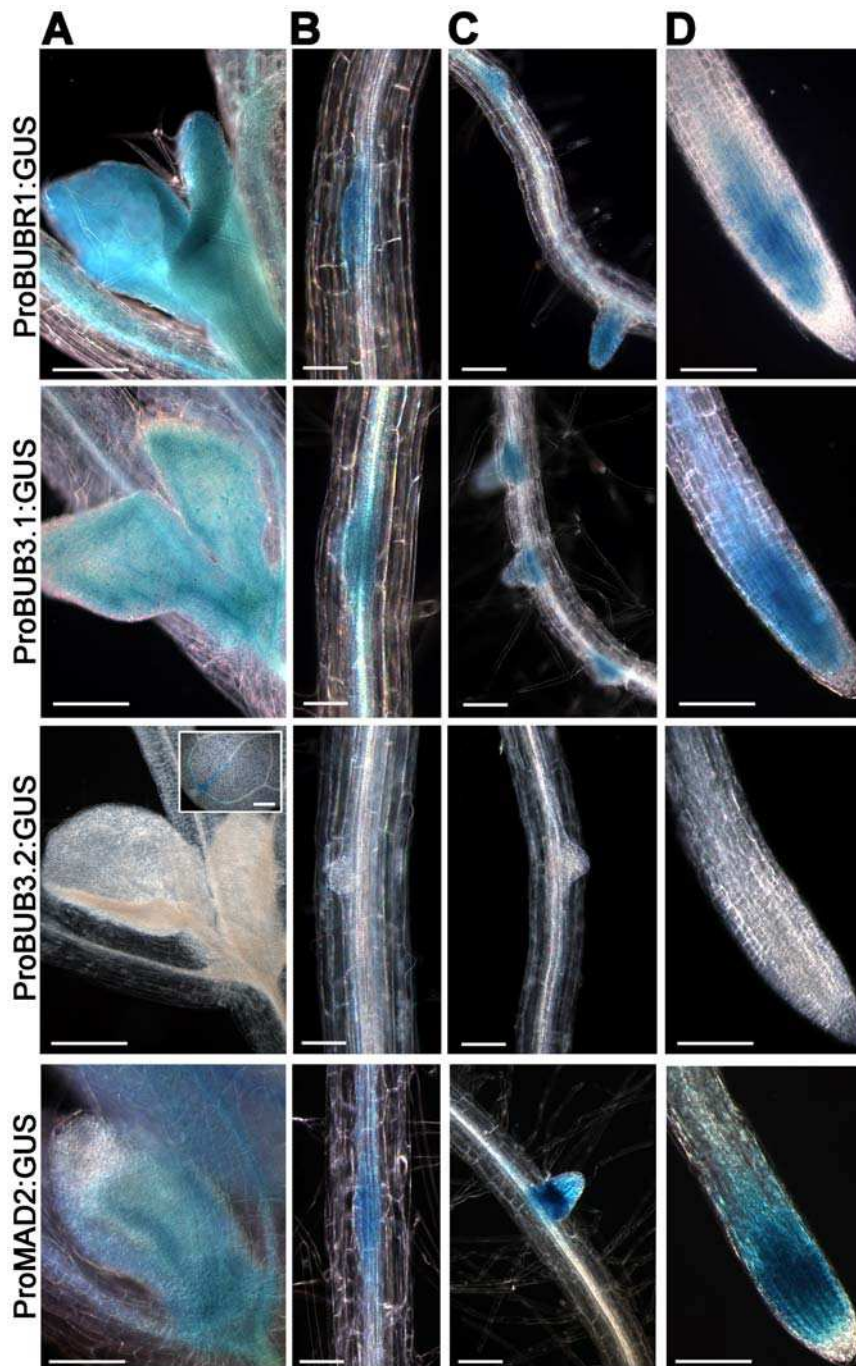


Figure 1. The pattern of expression of *BUBR1*, *BUB3.1*, *BUB3.2* and *MAD2* during *A. thaliana* development. Promoter:GUS fusions revealed *BUBR1*, *BUB3.1* and *MAD2* expression in the developing leaves of 7-day-old seedlings (A), in lateral root primordia (B), lateral root meristems (C) and root meristems (D). *BUB3.2* expression was only detected in cotyledons (insert). Bars, 200 μ m (A), 50 μ m (B), 100 μ m (C and D). doi:10.1371/journal.pone.0006757.g001

place at the unattached kinetochores and may therefore fulfil the evolutionarily conserved functions of SAC proteins, delaying anaphase until all the chromosomes are attached to both poles of the spindle.

We further analysed plant SAC protein distribution in living cells in cases of delayed anaphase onset. As anaphase initiation requires the ubiquitylation and degradation by the 26S proteasome of key mitotic regulators [2], such as the separase inhibitor securin and the Cdk1 subunit cyclin B, we studied cells that had

been treated with the proteasome inhibitor MG132. The MG132 tripeptide has been shown to be a very efficient proteasome inhibitor in mammalian and plant cell cultures. It preserves metaphase spindles and kinetochore-microtubule (kMT) attachments but inhibits the onset of anaphase [30]. As previously reported in plants [30,31], two hours after the addition of this molecule to a concentration of 100 μ M, tobacco cells arrested in metaphase were found to have highly condensed chromosomes ($n = 30$; Fig. 4A). At this time point, *A. thaliana* *BUBR1*, *BUB3.1*

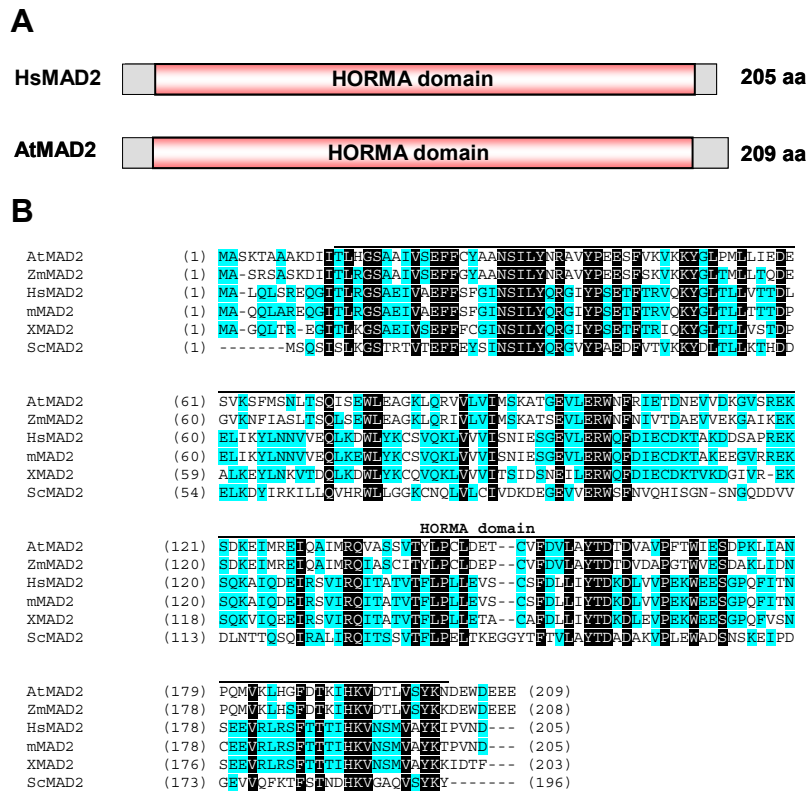


Figure S3. Sequence comparison of MAD2-related proteins. (A) Domain organisation of *Arabidopsis thaliana* AtMAD2 and human HsMAD2. (B) Alignment of the MAD2-related proteins from *A. thaliana* (AtMAD2, At3g25980), *Zea mays* (ZmMAD2, Q9XFH3), mouse (mMAD2, Q5HZH8), human (HsMAD2, AAC50781), *Xenopus larvei* (XMAD2, AAB41527) and *Saccharomyces cerevisiae* (ScMAD2, P40958). The HORMA domain (PF02301) is underlined. Identical amino acid residues are colored.

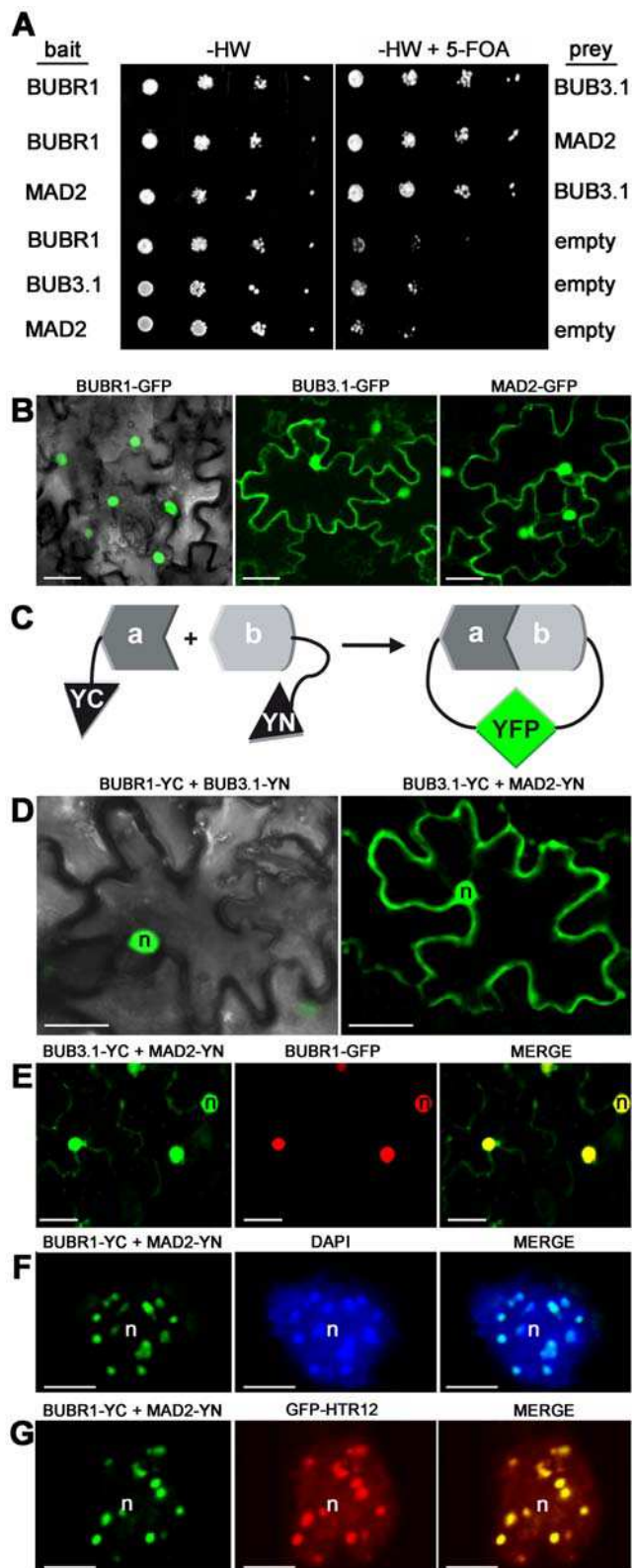


Figure 2. Interactions between *Arabidopsis* BUBR1, BUB3.1 and MAD2 in yeast and *in planta*. (A) Interactions in the yeast two-hybrid split-ubiquitin system. Dilution series of yeast JD53 cells expressing both bait fusions (BUBR1 or MAD2:Cub:URA3) and prey fusions (Nub:BUB3.1 or MAD2) were grown on yeast medium minus histidine and tryptophan (-HW) but containing 5-FOA, as indicated. Interaction resulted in uracil auxotrophy and 5-FOA resistance. (B) Single-plane

images of tobacco epidermal leaf cells infiltrated with *A. tumefaciens* expressing BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP or MAD2:GFP constructs. (C) Principle of *in vivo* bimolecular fluorescence complementation (BiFC). BiFC is based on the fusion of the prey (a) and bait (b) to the N- and C-terminal halves of the yellow fluorescent protein YFP (YN and YC, respectively), forming a functional YFP upon interaction [23]. (D–G) *In planta* BiFC assay. Single-plane confocal images of epidermal leaf cells infiltrated with *A. tumefaciens* co-expressing (D) BUBR1-YC and BUB3.1-YN or BUB3.1-YC and MAD2-YN, (E) BUB3.1-YC and MAD2-YN (green channel) and BUBR1-GFP (red channel), (F) BUBR1-YC and MAD2-YN, (G) BUBR1-YC and MAD2-YN (green channel) and GFP-HTR12 (red channel) fusion constructs. The merged images show (E) nuclear BUBR1, BUB3.1 and MAD2 colocalisation in yellow, (F–G) that BUBR1 and MAD2 interaction colocalised with (F) bright chromocenter spots stained with DAPI (blue channel) and with (G) the centromeric marker GFP-HTR12. n, nucleus. Bars, 25 μ m (B, D and E), 5 μ m (F and G). doi:10.1371/journal.pone.0006757.g002

and MAD2 were localised to the sister kinetochores of condensed chromosomes in metaphase arrested cells ($n = 20$; Fig. 4A). In cells in which chromosomes were aligned at the spindle equator, BUBR1, BUB3.1 and MAD2 were found to be present in all the kinetochores ($n = 15$; Fig. 4B). Progressively, much of the BUBR1, BUB3.1, MAD2:GFP-derived fluorescence took on a fibrillar appearance, probably as a result of association with the acentrosomal metaphase spindle apparatus ($n = 30$; Fig. 4B). Three hours after MG132 treatment, the initially diffuse spindle BUBR1, BUB3.1 and MAD2:GFP staining accumulated progressively onto MT-like structures within the spindle ($n = 25$; Fig. 4C). At this time point, bright spots corresponding to kinetochores were also detected for BUBR1, BUB3.1 and MAD2 ($n = 25$; Fig. 4C). To determine if the MT-like SAC fluorescence was in fact MT dependent, we treated BUBR1:GFP cells with the MT-stabilizing agents Paclitaxel. Three hours after MG132 treatment, the adjunction of Paclitaxel dramatically intensified the fibrillar nature of BUBR1:GFP ($n > 20$; Fig. S4). In addition, immunostaining of β -tubulin confirmed that BUBR1 colocalized with spindle MTs when proteolysis is blocked by MG132 ($n > 10$; Fig. S4). Previous reports have provided evidence for the motor-assisted transport of human MAD2 complexes from kinetochores to the spindle poles along MTs [32]. This mechanism may play an important role in removing checkpoint proteins from the kinetochores and turning off the checkpoint. Based on our observations, plant SAC proteins have an intriguing intracellular distribution, apparently accumulating onto both kinetochores and the spindle MTs in cell arrested in metaphase.

SAC inactivation in normal cell division

We then investigated the distribution of *A. thaliana* SAC proteins *in vivo* in normal mitosis conditions, when SAC is inactivated. This was made possible since the expression of the chimeric proteins did not prevent cell cycle progression. In the absence of SAC activation, BUBR1 was found exclusively in nuclei stained with SYTO 82 during interphase ($n = 30$; Fig. 5A). BUB3.1 and MAD2 proteins were localised to the nucleus and gave a weak cytoplasmic signal during interphase ($n = 30$; Fig. 5A). In early prophase, BUBR1, BUB3.1 and MAD2 became localised in the cytoplasm following nuclear envelope breakdown and remained there until the end of metaphase ($n = 10$; Fig. 5A). By telophase, when a new nuclear envelope forms around each set of separated sister chromosomes, *A. thaliana* BUBR1 and MAD2 were again concentrated in the nucleus ($n = 15$; Fig. 5A).

Overall, our data show that checkpoint proteins are only recruited at kinetochore in case of damage in spindle assembly. During normal mitosis, BUBR1, BUB3.1 and MAD2 staining at the kinetochore was not detected, inconsistent with reports for

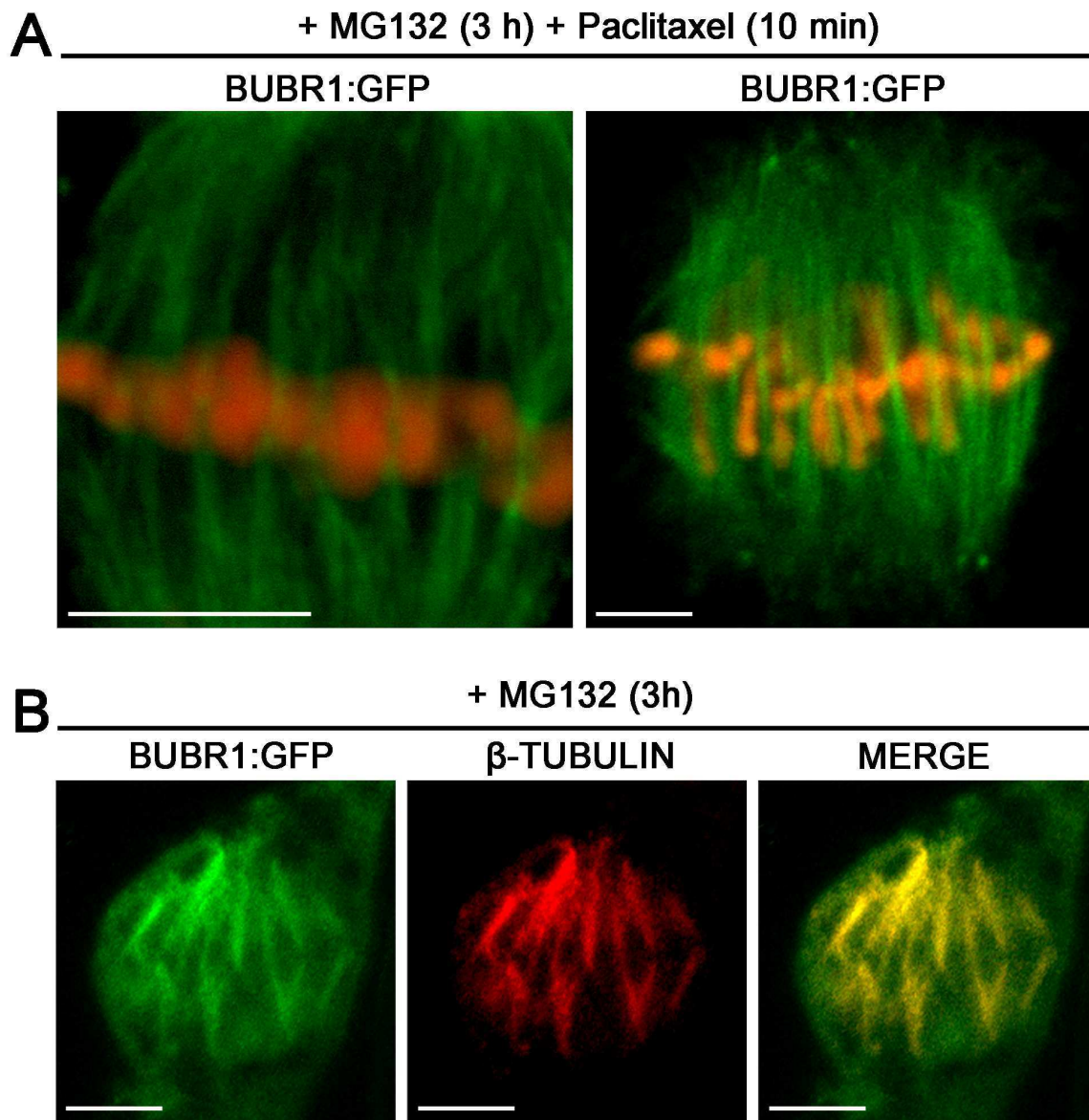


Figure S4. Subcellular localisation of BUBR1 in MG132-treated tobacco cells.

(A) Single optical images of cells expressing BUBR1:GFP fusion construct (green channel) treated with 100 μ M MG132 (3 h) and then with 50 μ M paclitaxel (10 min). Chromosomes in living cells were stained with SYTO 82 (red channel). The adjunction of Paclitaxel dramatically intensified the spindle MT-like structures of BUBR1:GFP. (B) Co-visualisation of MT spindle apparatus and BUBR1, three hours after 100 μ M MG132 treatments. In merged image, the yellow colour corresponds to BUBR1:GFP (green channel) colocalisation with β -tubulin immunostaining (red channel). Bars, 5 μ m.

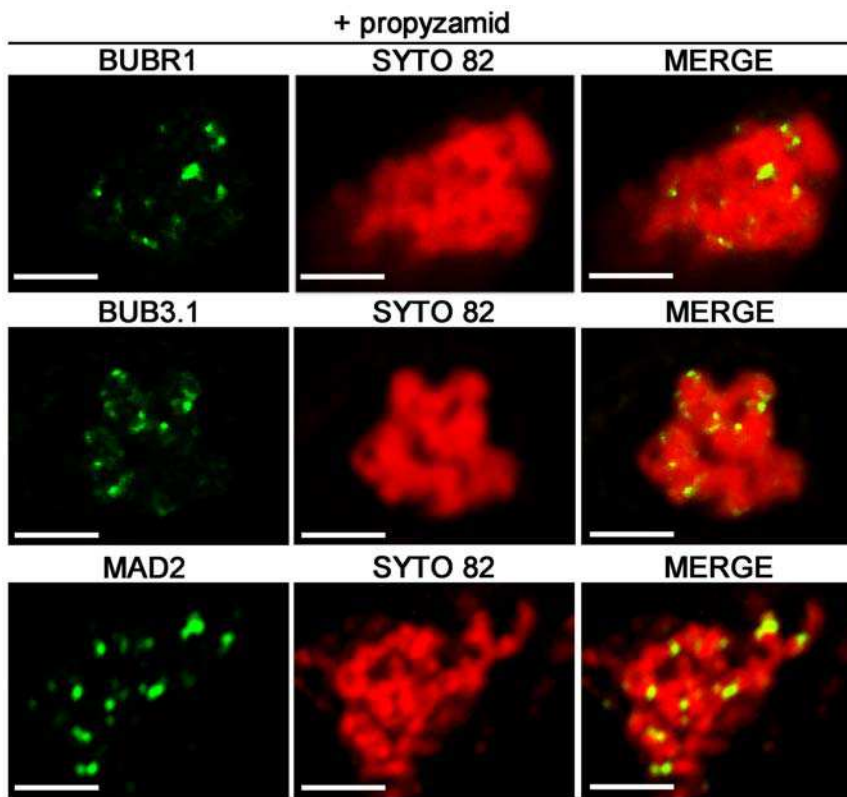


Figure 3. Subcellular distribution of BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP and MAD2:GFP fusion proteins in propyzamid-treated tobacco cells. Single optical section of prometaphase-like arrested cells expressing BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP and MAD2:GFP fusion constructs, 1 h after propyzamid treatment. In merged images, the yellow colour corresponds to BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP or MAD2:GFP (green channel) colocalisation with SYTO 82 (red channel). BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP and MAD2:GFP localise *in vivo* to the kinetochores of chromosomes stained with SYTO 82 orange-fluorescent nucleic acid stain. Bars, 5 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0006757.g003

metazoan cells [2,27,33]. We propose that organism-specific differences in the behaviour of SAC are likely to reflect evolutionary divergence in the mechanics of spindle assembly

rather than extensive differences in the pathways of checkpoint signalling. Animal cells undergo an open mitosis in which prometaphase chromosomes are initially free of spindle microtu-

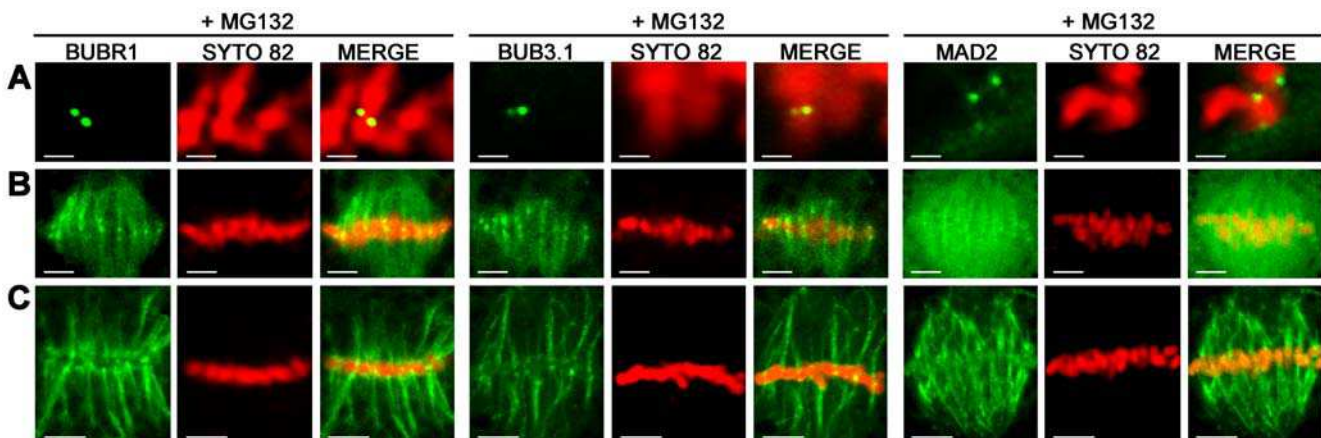


Figure 4. Subcellular localisation of BUBR1, BUB3.1 and MAD2 in MG132-treated tobacco cells. Single optical section of cells expressing BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP and MAD2:GFP fusion constructs (green channel) after treatment with 100 μ M MG132. Chromosomes in living cells were stained with SYTO 82 (red channel). In merged images, the yellow colour corresponds to the colocalisation of BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP or MAD2:GFP with SYTO 82. (A) Two hours after MG132 treatment, BUBR1, BUB3.1 and MAD2 were localised into two bright spots per condensed chromosome, corresponding to kinetochores. (B) When chromosomes were arrested in metaphase, BUBR1, BUB3.1 and MAD2 localised to all the kinetochores of chromosomes arrested in metaphase. A diffuse signal in the metaphase spindle apparatus was also observed for BUBR1, BUB3.1 and MAD2. (C) Three hours after MG132 treatment, BUBR1, BUB3.1 and MAD2 localised to bright spots corresponding to the kinetochores of chromosomes and staining accumulated onto MT-like structures within the spindle in metaphase arrested cells. Bars, 2 μ m (A), 5 μ m (B and C).
doi:10.1371/journal.pone.0006757.g004

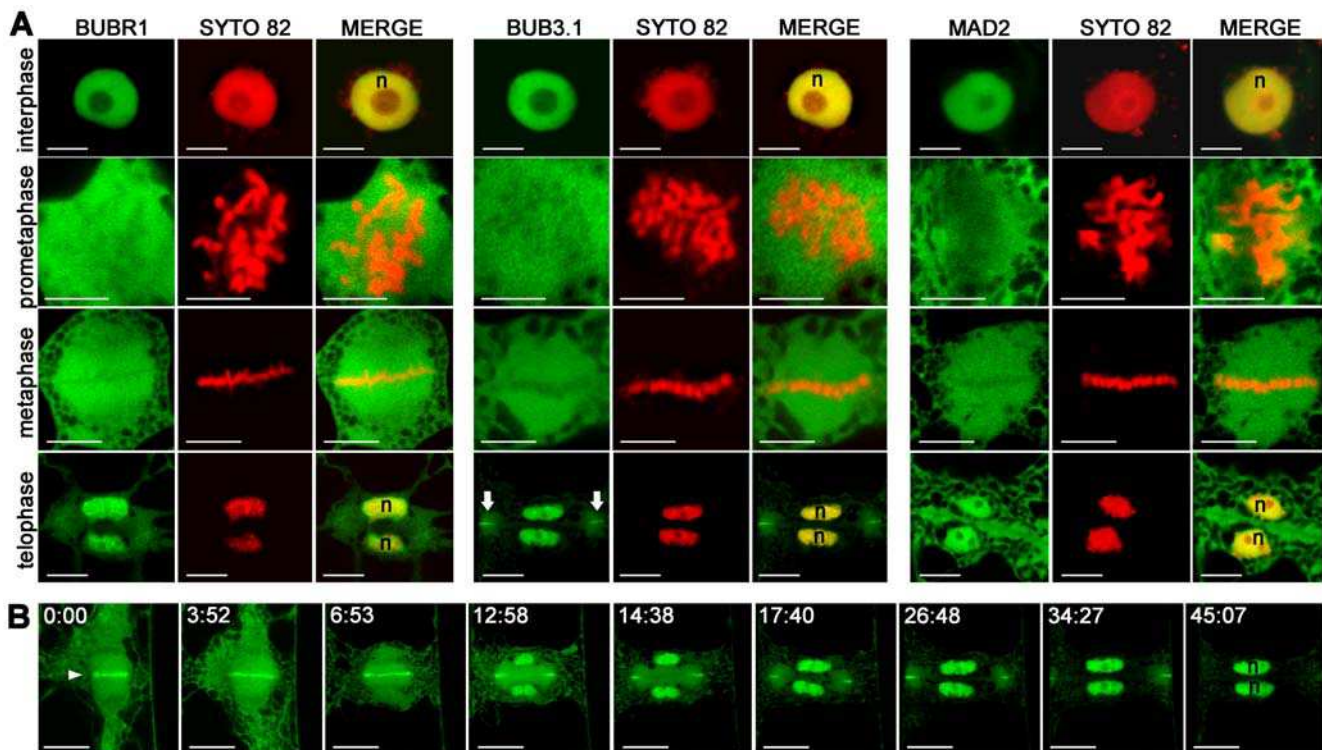


Figure 5. Subcellular localisation of BUBR1, BUB3.1 and MAD2 in tobacco cells undergoing normal mitosis. (A) Single optical section of cells expressing BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP and MAD2:GFP fusion constructs (green channel). Chromosomes in living cells were stained with SYTO 82 (red channel). In merged images, the yellow colour corresponds to the colocalisation of BUBR1:GFP, BUB3.1:GFP or MAD2:GFP with SYTO 82. By telophase, BUB3.1:GFP was detected in daughter nuclei (n) and in the midline at the cell periphery (arrow), forming a ring around the edge of the newly formed cell plate. (B) Selected frames from a fluorescence time-lapse analysis of the distribution of BUB3.1:GFP during cytokinesis. Single optical section of a cell expressing the BUB3.1:GFP fusion construct (green channel). After chromosome separation, BUB3.1 is localised along the midline of the anaphase spindle (arrowhead). During telophase, BUB3.1 is gradually transferred into the daughter nuclei. During phragmoplast extension from the centre to the periphery of the cell, BUB3.1 localises with the margin of the expanded phragmoplast. At the end of telophase, BUB3.1 is present at the cell periphery, forming a ring around the edge of the newly formed cell plate. This specific localisation at the phragmoplast midline disappeared when the newly formed cell plate completely separated the two daughter cells. At the end of cytokinesis, BUB3.1 was again concentrated in the nucleus. Time is in min:s. Bars, 10 μ m.
doi:10.1371/journal.pone.0006757.g005

bules after nuclear envelope breakdown. High levels of MAD and BUB proteins are present on these unattached kinetochores [2,27,33]. Plant cells undergo mitosis in which acentrosomal pro-spindle assembly is initiated before nuclear envelope breakdown [34]. Our data suggest that in plant, kinetochores do not recruit high level of these SAC proteins during normal mitosis which is consistent with the idea that plant chromosomes are continuously linked to MTs.

BUB3.1 localised to phragmoplast midline during plant cytokinesis

BUB3.1 displayed an unexpected distribution during cytokinesis in late anaphase to telophase in plant cells. It first appeared in the centre of the forming cell plate, and was subsequently redistributed to the growing margins of the cell plate as the cell plate grew outwards. Time-lapse analysis showed *A. thaliana* BUB3.1 was strongly localised to the anaphase spindle midline after chromosome separation in late anaphase ($n = 15$; Fig. 5B). During the final stages of cell division, a cytokinetic apparatus unique to plants, the phragmoplast, was generated. The phragmoplast directs Golgi-derived vesicles to the midline where they fuse to form a cell plate, permitting the separation of the daughter cells. During telophase, a strong BUB3.1:GFP signal was detected in the early phragmoplast midline and in the newly formed daughter nuclei ($n = 17$;

Fig. 5B). At the end of telophase, when the phragmoplast was fully expanded, BUB3.1 was observed at the cell periphery, forming a ring around the edge of the newly formed cell plate ($n = 20$; Fig. 5A–B). This signal disappeared when the fully expanded cell plate completely separated the two daughter cells ($n = 18$; Fig. 5B). This BUB3.1 subcellular localisation appeared intriguing since metazoan and yeast BUB3 has not been described to be involved in cytokinesis. In animal cells, after sister chromosomes have separated, the remaining non-kinetochore MTs form a structure called the spindle midzone. The spindle midzone was compressed by the ingressing cleavage furrow. This spindle remnant also persists during cytokinesis in plant cells, where it becomes the early phragmoplast. The difference is that, instead of being the focus of constriction, as in animals, the central spindle/early phragmoplast opens out as a ring that directs Golgi-derived vesicles to the midline where they fuse to form a cell plate.

We found that, during outward cytokinesis, BUB3.1 was specifically localised to the phragmoplast midline, at which the cell plate was held by phragmoplast MTs. The BUBR1 and MAD2 proteins did not follow this pattern. Thus, BUB3.1, in addition to its known role in the spindle assembly checkpoint itself, may have a plant-specific role in late mitosis coordinating phragmoplast expansion. The phragmoplast midline defines the interface between phragmoplast MT plus-ends and the newly

formed cell plate. Recent studies indicated that the phragmoplast midline could contain linker molecules that help to stabilize MT plus-ends and connect them to cell plate membranes. This results in optimally organized phragmoplast MTs that deliver the Golgi-derived vesicles to the growing cell plate [35].

We hypothesize, that BUB3.1 could be part of a MT plus-end capture complex associated with other “phragmoplast midline proteins” and then may regulate phragmoplast expansion, essential for cytokinesis. An analysis of the cell cycle regulators present in synchronised *A. thaliana* cell cultures showed that *BUB3.1* expression was coregulated with the expression of other cytokinesis-related genes [9]. In addition, the AURORA-like kinase 1 [36], the microtubule-associated protein MAP65-3 [37], the molecular motor kinesin PAKRP2 [38] and the CDC27/HOBBIT APC/C subunit [39] have phragmoplast midline distributions similar to that of BUB3.1 during cytokinesis. However, none of these proteins has been reported to be localised to both unattached kinetochores and the phragmoplast midline. The association of BUB3.1 with both these structures suggests that plants may coordinate spindle assembly and cytokinesis through shared machinery. This study provides clues to the possible functional links between the spindle and phragmoplast assembly checkpoints, ensuring failsafe mitosis.

Materials and Methods

Sequence identification and gene cloning

A. thaliana proteins orthologous to human BUB3, BUBR1 and MAD2 were identified by the OrthoMCL [13] clustering of six proteomes based on standard parameters. The six proteomes compared were those of *A. thaliana* (TAIR, <http://www.arabidopsis.org>), *Homo sapiens* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/CCDS/CcidsBrowse.cgi>), *Oryza sativa* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), *Drosophila melanogaster* (<http://flybase.org/>), *Caenorhabditis elegans* (<http://wormbase.org/>) and *Meloidogyne incognita* ([http://meloidogyne.toulouse.inra.fr/\[40\]](http://meloidogyne.toulouse.inra.fr/[40])). Interpro scans (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) were used to study domain organisation. The *A. thaliana* BUBR1, BUB3.1, MAD2 and *HTR12/CENP-A* coding sequences were amplified by PCR, using specific primers (Fig. S5). They were inserted into the pDON207 donor vector and then into the pK7FWG2, or pK7WGF2 for *HTR12*, plant expression vector and BiFC vectors (pAM-35SS-GWY-YFPc and pAM-35SS-GWY-YFPn), using Gateway Technology (Invitrogen).

Promoter analysis and histochemical localisation of GUS activity

For the promoter:GUS fusion, fragments of the 1365 bp, 1001 bp, 999 bp and 1000 bp immediately upstream from the start codon, for *BUB3.1*, *BUB3.2*, *MAD2* and *BUBR1*, respectively, were amplified by PCR (Fig. S5), inserted into the pDON207 donor vector and then into the pKGWFS7 plant vector, using Gateway Technology (Invitrogen). Wild-type (WS ecotype) *A. thaliana* plants were stably transformed and GUS activity was assayed histochemically, as previously described [37], on 10 independent transformed plants for each construct. Samples were observed with a Zeiss Axioplan 2 microscope and images analysed with AxioVision 4.7 (Zeiss).

Yeast two-hybrid split-ubiquitin assay

The split-ubiquitin assay was carried out in *S. cerevisiae* strain JD53, as previously described [41]. The *BUBR1*, *BUB3.1* and *MAD2* coding sequences were inserted into the GW:Cub:URA3 bait vector (pMKZ) and the NuI:GW prey vector, using the Gateway system. Standard procedures were used for yeast

growth and transformation. Transformants were selected on 5-fluoroorotic acid (5-FOA) plates containing minimal medium with yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and glucose, supplemented with lysine, leucine, uracil (M-HW), and 1 mg/ml 5-FOA.

N. benthamiana transformation and cell cultures

N. benthamiana plants were grown under continuous light for 1 month at 26°C. Infiltration of *Agrobacterium tumefaciens* into tobacco leaves was as described [42] and plants were analysed two days after infiltration. For tobacco cell culture establishment, *N. benthamiana* leaves were cocultured two days with *A. tumefaciens* in the dark at 26°C, rinsed in a liquid MS medium containing 3% sucrose and 150 mg/l cefotaxime (Sigma). The tissue was blotted dry and placed on regeneration medium (MS medium, 3% sucrose, 1.0 mg/l indole acetic acid, and 0.1 mg/l benzyladenine, Sigma, 0.8% agar), and supplemented with 150 mg/l cefotaxime and 50 mg/l kanamycin. Explants were incubated in a controlled growth chamber at 26°C. All explants were subcultured onto fresh regeneration/selection medium every 10 days. Two explants were used to generate suspension cultures: stably transformed explants were placed on MS medium supplemented with 0.5 mg/l 2,4D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and 40 mg/l kanamycin for the induction of callus, which was transferred into liquid MS medium supplemented with 1 mg/l 2,4D and 50 mg/l kanamycin. The cultures were incubated at 26°C in the dark with continuous shaking.

Drug treatments and microscopy

Optical sections of tobacco leaf epidermal cells or tobacco cell cultures were observed with a $\times 63$ water immersion apochromatic objective (numerical aperture 1.2, Zeiss) fitted to an inverted confocal microscope (Axiovert 200 M, LSM510 META; Zeiss) at 25°C. GFP and SYTO 82 (Molecular Probes) fluorescence were monitored in Channel mode with a BP 505–530, 488 beam splitters and LP 530 filters for GFP and 545 nm beam splitters for SYTO 82 (488 nm excitation line). For DAPI staining, cells were first fixed in 1 \times PBS+2% paraformaldehyde in PBS (1 \times) supplemented with 0.05% Triton X-100. DNA was stained *in vivo* with the orange fluorescent dye SYTO 82 (2 μ M final concentration). Propylzamid (Sigma), Paclitaxel (Sigma) and carbobenzoxy-leuciny-leuciny-leucinal (MG132; kindly provided by M. C. Criqui, IBMP, Strasbourg, France) were used at final concentrations of 50 μ M, 50 μ M and 100 μ M, respectively. These preparations were stored for no more than one month at -20°C . The samples treated with MG132 were collected at different time point to be observed during metaphase arrest by *in vivo* confocal microscopy. For Propylzamid and Paclitaxel treatments, samples were collected 10 min after drug adjunction and used immediately for observation. Digital images were analysed using LSM Image Browser (Zeiss), imported to Photoshop CS2 (Adobe) and contrast/brightness was uniformly changed. For immunolocalization of β -tubulin, samples were collected 3 hours after MG132 treatment. Cells were first fixed in 1 \times PBS+2% paraformaldehyde supplemented with 0.05% Triton X-100. Immunolabeling was performed according to Ritzenthaler et al.[43]. Cells were incubated overnight with the monoclonal anti- β -tubulin clone TUB 2.1 (Sigma-Aldrich). Two hours incubation at room temperature was performed with Alexa 596 goat antimouse IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). DNA was stained with 1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) in PBS 1 \times buffer. GFP and Alexa 596 (Molecular Probes) fluorescences were monitored in Channel mode with a BP 505–

530, HFT 488 beam splitters for GFP and LP 530 filters NFT, 545 nm beam splitters for Alexa Red (488 nm excitation line).

Supporting Information

Figure S1 Sequence comparison of BUBR1/MAD3-related proteins. (A) Domain organisation of *Arabidopsis thaliana* AtBUBR1, *Homo sapiens* HsBUBR1 and *Saccharomyces cerevisiae* ScMAD3. Proteins are drawn to scale. (B) Alignment of AtBUBR1 protein from *A. thaliana* (AtBUBR1, At2g33560) with MAD3 protein from *Schizosaccharomyces pombe* (SpMAD3, O59767) and the NH2-terminal domains of BUBR1/MAD3 proteins from human (HsBUBR1, O60566), *Xenopus laevis* (XBUB1B, Q8JGT8) and *S. cerevisiae* (ScMAD3, P47074). The MAD3-BUB1 domain (PF08311), KEN boxes and BUB3-binding domain of hBUB1B are indicated.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006757.s001 (0.04 MB PDF)

Figure S2 Sequence comparison of BUB3-related proteins. (A) Domain organisation of *Arabidopsis thaliana* AtBUB3.1 and *Homo sapiens* HsBUB3. (B) Alignment of the BUB3-related proteins from *A. thaliana* (AtBUB3.1, At3g19590; AtBUB3.2, At1g49910), *Drosophila melanogaster* (DmBUB3, NP477381), *Homo sapiens* (HsBUB3, O43684), *Mus musculus* (mBUB3, Q9WVA3), *Xenopus laevis* (XBUB3, Q98UH2) and *Saccharomyces cerevisiae* (ScBUB3, P26449). The WD-40 repeats are underlined and the BUB3 WD signature sequence indicated by asterisks.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006757.s002 (0.02 MB PDF)

Figure S3 Sequence comparison of MAD2-related proteins. (A) Domain organisation of *Arabidopsis thaliana* AtMAD2 and human HsMAD2. (B) Alignment of the MAD2-related proteins from *A. thaliana* (AtMAD2, At3g25980), *Zea mays* (ZmMAD2, Q9XFH3), mouse (mMAD2, Q5HZH8), human (HsMAD2, AAC50781), *Xenopus laevis* (XMAD2, AAB41527) and *Saccharomyces cerevisiae* (ScMAD2, P40958). The HORMA domain

(PF02301) is underlined. Identical amino acid residues are coloured.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006757.s003 (0.02 MB PDF)

Figure S4 Subcellular localisation of BUBR1 in MG132-treated tobacco cells. (A) Single optical images of cells expressing BUBR1:GFP fusion construct (green channel) treated with 100 μ M MG132 (3 h), and then with 50 μ M paclitaxel (10 min). Chromosomes in living cells were stained with SYTO 82 (red channel). The adjunction of Paclitaxel dramatically intensified the spindle MT-like structures of BUBR1:GFP. (B) Co-visualisation of MT spindle apparatus and BUBR1, three hours after 100 μ M MG132 treatments. In merged image, the yellow colour corresponds to BUBR1:GFP (green channel) colocalisation with β -tubulin immunostaining (red channel). Bars, 5 μ m.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006757.s004 (0.28 MB PDF)

Figure S5 Gateway primers used in this study.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0006757.s005 (0.01 MB PDF)

Acknowledgments

We thank Marylin Vantard (iRTSV, Grenoble, France), Pascal Genschik, Laurent Pieuchot, Anne Catherine Schmit (IBMP, Strasbourg, France), and Michel Ponchet (IBSV, France) for helpful discussions, Etienne G.J. Danchin for OrthoMCL clustering, Catherine Mura for growing tobacco plants, Mansour Karimi (VIB Ghent, Belgium) for the plant Gateway vectors, Imre E. Somssich (Max-Planck Institut, Köln, Germany) for the split-ubiquitin system, Marie-Claire Criqui (IBMP, France) for MG132 inhibitor and helpful discussions. This paper is dedicated to the just born Elyas Marfaing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MCC LP PL LD PA BF. Performed the experiments: MCC LP PL MQ YP. Analyzed the data: MCC LP PL MQ YP MLB PA BF. Contributed reagents/materials/analysis tools: LD NM. Wrote the paper: MCC BF.

References

- Musacchio A, Hardwick KG (2002) The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3: 731–741.
- Musacchio A, Salmon ED (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 379–393.
- Li R, Murray AW (1991) Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66: 519–531.
- Hoyt MA, Totis L, Roberts BT (1991) *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66: 507–517.
- Tang Z, Bharadwaj R, Li B, Yu H (2001) Mad2-Independent inhibition of APC Cdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev Cell* 1: 227–237.
- Fang G, Yu H, Kirschner MW (1998) The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev* 12: 1871–1883.
- Sudakin V, Chan GK, Yen TJ (2001) Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol* 154: 925–936.
- Houben A, Schubert I (2003) DNA and proteins of plant centromeres. *Curr Opin Plant Biol* 6: 554–560.
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA (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. *Plant J* 41: 546–566.
- Lermontova I, Fuchs J, Schubert I (2008) The *Arabidopsis* checkpoint protein Bub3.1 is essential for gametophyte development. *Front Biosci* 13: 5202–5211.
- Yu HG, Muszynski MG, Kelly Dawe R (1999) The maize homologue of the cell cycle checkpoint protein MAD2 reveals kinetochore substructure and contrasting mitotic and meiotic localization patterns. *J Cell Biol* 145: 425–435.
- Kimbara J, Endo TR, Nasuda S (2004) Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. *Chromosome Res* 12: 703–714.
- Li L, Stoekert CJ Jr, Roos DS (2003) OrthoMCL: identification of ortholog groups for eukaryotic genomes. *Genome Res* 13: 2178–2189.
- Pfleger CM, Kirschner MW (2000) The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev* 14: 655–665.
- Chan GK, Jablonski SA, Sudakin V, Hittle JC, Yen TJ (1999) Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol* 146: 941–954.
- Sczaniecka M, Feoktistova A, May KM, Chen JS, Blyth J, et al. (2008) The spindle checkpoint functions of Mad3 and Mad2 depend on a Mad3 KEN box-mediated interaction with Cdc20-anaphase-promoting complex (APC/C). *J Biol Chem* 283: 23039–23047.
- Hardwick KG, Johnston RC, Smith DL, Murray AW (2000) MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J Cell Biol* 148: 871–882.
- Chen RH (2002) BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J Cell Biol* 158: 487–496.
- Fraschini R, Beretta A, Sironi L, Musacchio A, Lucchini G, et al. (2001) Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *Embo J* 20: 6648–6659.
- Taylor SS, Ha E, McKeon F (1998) The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol* 142: 1–11.
- Li Y, Benezra R (1996) Identification of a human mitotic checkpoint gene: hMAD2. *Science* 274: 246–248.
- Staglar I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S (1998) A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5187–5192.
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9: 789–798.
- Fang Y, Spector DL (2005) Centromere positioning and dynamics in living *Arabidopsis* plants. *Mol Biol Cell* 16: 5710–5718.

Gene (AGI)	Primer name	Primer sequence (5'-3')
AtBUB3.1 (At3g19590)	AtBUB3.1_Promoter 5'	<u>AAAAAGCAGGCTTCGGCAGATGTGTTTTTAAGTCGG</u>
	AtBUB3.1_Promoter 3'	<u>AGAAAGCTGGGTGTTTTCCCGTTGAAGATCACA</u>
	AtBUB3.1_E1_ATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACC</u> ATG ACGACTGTGACTCCGTCC
	AtBUB3.1_E1_noATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACGACTGTGACTCCGTCC</u>
	AtBUB3.1_E9R_STOP	<u>AGAAAGCTGGGTG</u> TC ACGCCGCAGGATTCGGGTATA
	AtBUB3.1_E9R_noSTOP	<u>AGAAAGCTGGGTGTCCCGCCGCAGGATTCGGGTATA</u>
AtBUB3.2 (At1g49910)	AtBUB3.2_Promoter 5'	<u>AAAAAGCAGGCTTCGATGTGTGTTGTGTGAGTTACA</u>
	AtBUB3.2_Promoter 3'	<u>AGAAAGCTGGGTGCCTGAAAATACGAATTTTTAG</u>
AtBUBR1 (At2g33560)	AtBUBR1_Promoter 5'	<u>AAAAAGCAGGCTTCATGGAATTCTTAAACGTACGGC</u>
	AtBUBR1_Promoter 3'	<u>AGAAAGCTGGGTGCGTCGTTTCTTCGAGCAAAT</u>
	AtBUBR1_E1_ATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACC</u> ATG GCAGCCGAAACGAAGGT
	AtBUBR1_E1_noATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACCGCAGCCGAAACGAAGGT</u>
	AtBUBR1_E11R_STOP	<u>AGAAAGCTGGGTG</u> TC ATCGTAGGAAGCTGTTGGGTGGGAAA
	AtBUBR1_E11R_noSTOP	<u>AGAAAGCTGGGTGTCTTCGTAGGAAGCTGTTGGGTGGGAAA</u>
AtMAD2 (At3g25980)	AtMAD2_Promoter 5'	<u>AAAAAGCAGGCTTCTCTGTGTTTCATATGATGTCAAC</u>
	AtMAD2_Promoter 3'	<u>AGAAAGCTGGGTGGAGTCTAAGGATCGGTGATTT</u>
	AtMAD2_E1_ATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACC</u> ATG GCGTCCAAAACAGCGGCTGCTA
	AtMAD2_E1_noATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCGCGTCCAAAACAGCGGCTGCTA</u>
	AtMAD2_E7R_STOP	<u>AGAAAGCTGGGTG</u> TC ATTACTCTTCTTCATCCCCTCGTCC
	AtMAD2_E7R_noSTOP	<u>AGAAAGCTGGGTGTTACTCTTCTTCATCCCCTCGTCC</u>
AtHTR12 (AT1G01370)	AtHTR12_E1_ATG	<u>AAAAAGCAGGCTTC</u> ATG GCGAGAACCAAGCATCGC
	AtHTR12_E3_STOP	<u>AGAAAGCTGGGTG</u> TC ACCATGGTCTGCCTTTTCCTCC

Figure S5. Gateway primers used in this study.

25. Lermontova I, Schubert V, Fuchs J, Klatte S, Macas J, et al. (2006) Loading of Arabidopsis centromeric histone CENH3 occurs mainly during G2 and requires the presence of the histone fold domain. *Plant Cell* 18: 2443–2451.
26. Talbert PB, Masuelli R, Tyagi AP, Comai L, Henikoff S (2002) Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant. *Plant Cell* 14: 1053–1066.
27. Basu J, Logarinho E, Herrmann S, Bousbaa H, Li Z, et al. (1998) Localization of the Drosophila checkpoint control protein Bub3 to the kinetochore requires Bub1 but not Zw10 or Rod. *Chromosoma* 107: 376–385.
28. Chen RH, Waters JC, Salmon ED, Murray AW (1996) Association of spindle assembly checkpoint component XMad2 with unattached kinetochores. *Science* 274: 242–246.
29. Martínez-Exposito MJ, Kaplan KB, Copeland J, Sorger PK (1999) Retention of the BUB3 checkpoint protein on lagging chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8493–8498.
30. Genschik P, Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Fleck J (1998) Cell cycle - dependent proteolysis in plants. Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* 10: 2063–2076.
31. Criqui MC, Parmentier Y, Derevier A, Shen WH, Dong A, et al. (2000) Cell cycle-dependent proteolysis and ectopic overexpression of cyclin B1 in tobacco BY2 cells. *Plant J* 24: 763–773.
32. Howell BJ, Hoffman DB, Fang G, Murray AW, Salmon ED (2000) Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *J Cell Biol* 150: 1233–1250.
33. Howell BJ, Moree B, Farrar EM, Stewart S, Fang G, et al. (2004) Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr Biol* 14: 953–964.
34. Vos JW, Picuchot L, Evrard JL, Janski N, Bergdoll M, et al. (2008) The plant TPX2 protein regulates prospindle assembly before nuclear envelope breakdown. *Plant Cell* 20: 2783–2797.
35. Austin JR 2nd, Segui-Simarro JM, Stachelin LA (2005) Quantitative analysis of changes in spatial distribution and plus-end geometry of microtubules involved in plant-cell cytokinesis. *J Cell Sci* 118: 3895–3903.
36. Van Damme D, Bouget FY, Van Poucke K, Inze D, Geelen D (2004) Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J* 40: 386–398.
37. Caillaud MC, Lecomte P, Jammes F, Quentin M, Pagnotta S, et al. (2008) MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 20: 423–437.
38. Lee YR, Giang HM, Liu B (2001) A novel plant kinesin-related protein specifically associates with the phragmoplast organelles. *Plant Cell* 13: 2427–2439.
39. Perez-Perez JM, Serralbo O, Vanstraelen M, Gonzalez C, Criqui MC, et al. (2008) Specialization of CDC27 function in the Arabidopsis thaliana anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J* 53: 78–89.
40. Abad P, Gouzy J, Aury JM, Castagnone-Sereno P, Danchin EG, et al. (2008) Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat Biotechnol* 26: 909–915.
41. Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounloham M, et al. (2003) Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8024–8029.
42. Voynet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J* 33: 949–956.
43. Ritzenthaler C, Nebenfuhr A, Movafeghi A, Stussi-Garaud C, Behnia L, et al. (2002) Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgi-targeted green fluorescent protein and COPI antisera. *Plant Cell* 14: 237–261.

Chapitre 2. Rôle du « Mitotic Checkpoint Complex » dans la division cellulaire et lors de l'interaction avec le nématode.

Article de recherche 2

L. Paganelli, MC. Caillaud, M. Quentin, I. Damiani, B. Govetto, P. Lecomte, P. A. Karpov, P. Abad, and B. Favery. Role of the Mitotic Checkpoint MAD3/BUBR1 and BUB1 Gene Family in Normal and Nematode-Induced Nuclear Divisions in Arabidopsis.

Cette seconde partie correspond à la suite de l'étude du SAC chez *A. thaliana* et à son étude lors de l'interaction avec le nématode à galles *M. incognita*. Nous montrons dans un premier temps l'interaction entre BUB3.1 et MAP65-3 et validons la spécificité de cette interaction par la technique du double hybride en levure. En effet, BUB3.1 ne présente aucune interaction avec les autres MAP65 testées (MAP65-1, -4, -5, et-8). Deux nouveaux membres du SAC, identifiés chez *A. thaliana*, sont étudiés : les protéines BRK1 (BUB1-Related Kinase 1) et BRK2. Nous validons également par la technique du double hybride en levure l'interaction entre MAP65-3 et BUBR1, BUB1.2, BRK1 et MAD2. De plus, nous montrons que tous les membres potentiels du SAC interagissent ensemble et appartiennent à un même complexe. Ces interactions sont validées également *in planta* par la stratégie de BiFC. De façon intéressante, BUBR1 et BUB1.2 interagissent ensemble exclusivement au niveau des centromères.

L'analyse des profils d'expression de ces deux gènes chez *A. thaliana* a permis de montrer qu'ils étaient exprimés dans les tissus enrichis en cellules en division (avec une expression limitée aux parties aériennes pour *BRK1*). Tous les gènes étudiés (à l'exception de *BRK1*) présentent ainsi un profil d'expression similaire à celui de *MAP65-3*. Leur profil d'expression spatio-temporel a également été analysé au cours de l'interaction avec le nématode. BUB3.1, BUBR1, BUB1.2 et MAD2 sont exprimés dans les galles en formation dès l'infection par le nématode et jusqu'à un mois après l'infection. L'analyse histologique précise cette expression dans les cellules géantes en formation ainsi que dans les cellules avoisinantes en cours de division. *BRK1* ne présente pas d'induction particulière dans ces deux types de tissus.

La localisation subcellulaire de toutes les protéines a été étudiée dans des cellules méristématiques d'*Arabidopsis* présentant les différents ADNc fusionnés à la GFP sous le contrôle du promoteur de *MAP65-3*. Avant l'entrée en mitose, BUB1.2, MAD2 et BUB3.1 localisent dans le

noyau et le cytoplasme des cellules, BUBR1 est exclusivement nucléaire et BRK1 est associé aux centromères. Lors d'une mitose normale, aucune des protéines (à l'exception de BRK1 qui est toujours associé aux centromères) ne présente de relocalisation kinétochorienne. Les protéines présentent une localisation diffuse dans le cytoplasme. BUBR1 et BUB3.1 présentent une localisation beaucoup plus dense au niveau du fuseau mitotique. De plus, BUB3.1 se retrouve lors de la télophase associée au centre du phragmoplaste, autour de la nouvelle plaque cellulaire. Cette localisation confirme les précédentes observations en cellules BY-2. Ainsi, chez les plantes, BUB3.1 pourrait être impliquée à la fois dans la régulation de la transition métaphase/anaphase mais également dans l'expansion du phragmoplaste, coordonnant ces deux étapes du cycle cellulaire. Leur localisation subcellulaire a également été étudiée dans les cellules géantes en formation. La difficulté d'observation dans ces tissus n'a pas permis d'obtenir des informations judicieuses. Les observations ont permis d'observer des noyaux, dans des cellules multinucléées. Seule la localisation ectopique de BRK1 a confirmé, par sa localisation sur les centromères, de confirmer la présence d'endoréduplication au sein des noyaux des cellules géantes.

Nous avons également étudié l'effet de l'inactivation de ces gènes : nous avons obtenu des mutants KO de *bubr1*, *bubl.2* et *brk1* ainsi que des doubles mutants *bubr1-bubl.2*, *bubl.2-brk1* et *bubr1-brk1* ainsi que le triple mutant *bubr1-bubl.2-brk1*. L'analyse macroscopique de ces mutants n'a révélé aucun défaut visible que ce soit au niveau de leurs croissances végétatives (rosettes, hampes florales) que de leurs appareils reproducteurs (pistils, étamines, siliques et embryons). Nous avons analysé la croissance des racines des différents mutants sur un milieu contenant une drogue dépolymérisant les MT (l'oryzaline). Tous les mutants (sauf *brk1*) présentent une nette altération de la croissance en présence d'oryzaline, suggérant un rôle dans la surveillance de l'assemblage du fuseau mitotique. La dynamique de l'ADN et des réseaux de microtubules a été analysée au cours de la mitose chez ces mutants, grâce à des marqueurs MBD-GFP et H2B-YFP introgressés dans les différents géotypes. L'analyse des simples mutants *bubl.2* et *brk1* n'a révélé aucun phénotype : les chromosomes s'alignent correctement en métaphase et ségrègent correctement en anaphase. Cependant dans le fond mutant *bubr1*, les chromosomes présentent un mauvais alignement en métaphase, un retard de migration des chromosomes et dans certains cas, des « lagging » chromosomes. Ce phénotype a également été observé dans les doubles mutants *bubr1-bubl.2* ainsi que dans le triple mutant *bubr1-bubl.2-brk1*. De plus, les double-mutants présentent aussi très souvent des plaques métaphasiques bloquées, en attente et une altération de la morphologie des fuseaux mitotiques : présence récurrente de fuseaux mitotiques obliques ainsi que de fuseaux à polarité altérée (tripolaires). L'altération des fuseaux mitotiques associée aux perturbations d'attachement kinétochore/microtubule et de congressions des chromosomes, fait apparaître des figures mitotiques ressemblant fortement à des fuseaux tripolaires. En ajoutant l'absence de fonction dans le SAC, tous ces phénotypes confondus associés à BUBR1 expliquent les défauts observés dans nos mutants. AtBUBR1 présenterait ainsi une fonction conservée chez les végétaux.

Ainsi, le SAC jouerait un rôle conservé chez les plantes, régulant la transition entre la métaphase et l'anaphase. De plus, les localisations similaires de BUB3.1 et MAP65-3 au cours de la cytokinèse, ainsi que leurs interactions, permet d'émettre l'hypothèse que cette protéine du SAC, qui contrôle la transition entre la métaphase et l'anaphase, pourrait également contrôler l'expansion du phragmoplaste permettant ainsi la cytokinèse végétale.

Title

Role of the Mitotic Checkpoint MAD3/BUBR1 and BUB1 Gene Family in Normal and Nematode-Induced Nuclear Divisions in Arabidopsis

Authors and Affiliations

Laetitia Paganelli^{1,2,3}, Marie-Cécile Caillaud^{1,2,3}, Michaël Quentin^{1,2,3}, Isabelle Damiani^{1,2,3}, Benjamin Govetto^{1,2,3}, Philippe Lecomte^{1,2,3}, Pavel A. Karpov⁴, Pierre Abad^{1,2,3}, and Bruno Favery^{1,2,3*}

¹ INRA, UMR 1355, 400 route des Chappes, F-06903 Sophia-Antipolis, France

² CNRS, UMR 7254, 400 route des Chappes, F-06903 Sophia-Antipolis, France

³ Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR 1301, 400 route des Chappes, F-06903 Sophia-Antipolis, France

⁴ Institute of Food Biotechnology and Genomics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine.

* Corresponding author. Telephone +33(4)92386464; Fax +33(4) 92386587; E-mail: favery@sophia.inra.fr.

Running title: Plant spindle checkpoint in giant cells

Keywords: cell cycle, checkpoint, kinetochore, mitosis, giant cell, nematode

Abstract

The eukaryotic spindle assembly checkpoint (SAC) ensures that chromosomes undergoing mitosis do not segregate until they are properly attached to the microtubules of the spindle. We identified SAC proteins interacting with a Microtubule-associated protein MAP65-3 that played a critical role in organizing the mitotic microtubule arrays during both early and late mitosis in all plant organs and in feeding cells induced by root-knot nematodes (RKN). RKN are plant parasitic worms that establish and maintain an intimate relationship with their host plants. These feeding giant cells result from repeated synchronous karyokinesis without cell division.

We investigated the mechanism underlying this surveillance mechanism in plants, by characterising the orthologous SAC proteins BUBR1, BUB1, BUB3 and MAD2 from *Arabidopsis*. We showed that all these cell cycle-regulated proteins interacted physically with each other. Furthermore, BUB1.2 and BUBR1 interacted specifically at chromocenters. We show here that all the genes except *BRK1* are activated in developing giant cells, as well as *MAP65-3*. All the SAC proteins did not relocalize to the kinetochore during a normal mitosis. Some proteins exhibited interesting localization: BUBR1 and BUB3.1 were concentrated on the mitotic spindle and BUB3.1 was also found in the phragmoplast midline during the final step of cell division in plants. In the absence of functional BUBR1, plant cells developed but presented misaligned chromosome at the metaphase plate and anaphase lagging chromosome. Furthermore, these mutants showed MT misorganizations and abnormal spindles.

We conclude that despite minor role of MAD2, BUB1.2 and BRK1 in plant SAC mechanism, the plant BUBR1 protein may have the SAC protein functions conserved from yeast to humans. The association of BUB3.1 with both unattached kinetochore and phragmoplast suggests that in plant, BUB3.1 may have other roles beyond the spindle assembly checkpoint itself.

Introduction

Before cell division, the replicated genome is segregated such that the two daughter cells receive all the genetic information required for further growth and development. To maintain fidelity and thus ensure that both daughters receive one copy of each chromosome, eukaryotes have evolved a surveillance mechanism that coordinates spindle assembly with the initiation of anaphase. The Spindle Assembly Checkpoint (SAC) is a conserved monitoring system of the eukaryotic cell cycle that prevents chromosome missegregation by delaying the metaphase-to-anaphase transition until all chromosomes are properly bi-oriented on the mitotic spindle (Musacchio and Hardwick 2002; Khodjakov and Rieder, 2009; Musacchio and Salmon, 2007). As long as there are unattached kinetochores or improper attachment unable to produce enough tension between sister chromatids, the SAC pathway will be unsatisfied and the mitotic checkpoint complex (MCC) generated. The MCC is the main SAC effector, which acts to sequester and inhibit CDC20, an activator of the E3 ubiquitin ligase called anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C) that is responsible for the metaphase to anaphase transition (Pines, 2011; Sudakin et al., 2001). Key components of the SAC include BUB1 (BUDDING UNINHIBITED BY BENZYMIDAZOL), BUBR1 (BUB1-related), BUB3 and MAD2 (MITOSIS ARREST DEFECT) (Sudakin et al., 2001; Musacchio and Salmon, 2007). In higher organisms, all these SAC proteins localize to unattached kinetochores during early mitosis (Cleveland et al., 2003; Howell et al., 2004), which are specialized protein complexes that assemble on centromeric DNA and provide the site of chromosome binding to spindle microtubules. Once the checkpoint is satisfied by microtubule attachment and tension, the inhibition of the APC/C by the MCC is quickly released, a process known as checkpoint silencing (Musacchio, 2011). These SAC components have been extensively studied in all model organisms although a little is known in plants.

Plant SAC protein homologs have been first identified *in silico* (Caillaud et al., 2009; Houben and Schubert, 2003). The maize and wheat MAD2 homologs have been first shown to localize on chromosome kinetochore during early mitosis (Kimbara et al., 2004; Yu et al., 1999). In Arabidopsis, global transcriptome analysis showed that *BUB3.1*, *BUBR1* and *MAD2* present a distinct expression peak at the G2/M boundary in synchronised cell cultures (Menges et al., 2005). Logically, their expression *in planta* was observed in tissues with a high proportion of dividing cells (Caillaud et al., 2009). These three SAC proteins have been shown to interact physically with each other. Furthermore, as observed in metazoans, they localise to the unattached kinetochores following the unsatisfaction of the SAC by global defects in spindle assembly in cells treated with microtubule poisons (Caillaud et al., 2009; Chen et al., 1996; Taylor et al., 1998). In addition, in cases of ‘wait anaphase’, Arabidopsis BUBR1, BUB3.1 and MAD2 proteins were associated with both kinetochores and kinetochore microtubules in tobacco cell cultures. Unexpectedly, AtBUB3.1 was also found in the phragmoplast midline during the cytokinesis suggesting supplementary roles in plant cell division (Caillaud et al., 2009). Inactivation of BUB3.1 in Arabidopsis showed an embryo-lethal phenotype indicating a key role during gametophyte development or embryogenesis (Lermontova et al., 2008). Recently, the characterization of a completely sterile rice mutant identified a BUB1-related kinase1 (BRK1) as essential for generating proper tension between homologous kinetochores at metaphase I of meiosis (Wang et al., 2012). BRK1 is associated with the kinetochore from interphase until telophase and the *brk1* mutants are sterile due to the precocious separation of sister chromatids during anaphase I.

Root-knot nematodes (RKN) *Meloidogyne* spp. are obligate biotrophic pathogens that have evolved an ability to induce the redifferentiation of five to seven parenchymatic root cells into hypertrophied and multinucleate cells, named giant cells. This physiopathological situation provides interesting model systems for the identification and study of the role of genes

involved in cell cycle regulation and plant development (Abad et al., 2009). Giant cells result from synchronous repeated karyokinesis without cell division (Caillaud et al., 2008; Jones and Payne, 1978). During plant cell cycle progression, microtubules reorganize into an anastral bipolar spindle, ensuring the accurate segregation of chromosomes during anaphase (Wasteneys, 2002). Multiple spindles were observed in giant cells. Time-lapse *in vivo* revealed presence in mitotic giant cells of early synchronous phragmoplast arrays which do not further develop (Caillaud et al., 2008). In developing giant cells, phragmoplast restricted out-growth lead to the formation of a novel cell plate structure — the giant cell mini cell plate — that does not extend across adjacent faces of the cell. Fully differentiated giant cells reach a final size about four hundred times that of root vascular cells and contain more than a hundred polyploid nuclei, which have also undergone extensive endoreduplication (Wiggers et al., 1990). These "feeding" giant cells constitute the exclusive source of nutrients for the nematode until reproduction. Giant cell development is accompanied by division and hypertrophy of surrounding cells, leading to a typical root gall formation, the primary visible symptom of infection. Detailed functional analyses of the Arabidopsis microtubule-associated protein MAP65-3 showed that this protein plays a critical role in plant cell division and in giant cell development (Caillaud et al., 2008; Müller et al., 2004). MAP65-3 plays a key role in microtubule arrays organization during both mitosis (spindle morphogenesis) and cytokinesis (phragmoplast expansion) in all dividing plant cells. In the absence of functional MAP65-3, giant cells started to develop but did not complete their differentiation and were eventually destroyed (Caillaud et al., 2008).

In this paper, we set out to identify proteins that interact with MAP65-3 by using yeast two-hybrid (Y2H) screen. We demonstrated physical interactions of MAP65-3 with central components of the SAC and studied their functions in normal and nematode-induced cell division. Our results establish a minor role of the BUB1 homolog, BRK1 and BUB1.2 but

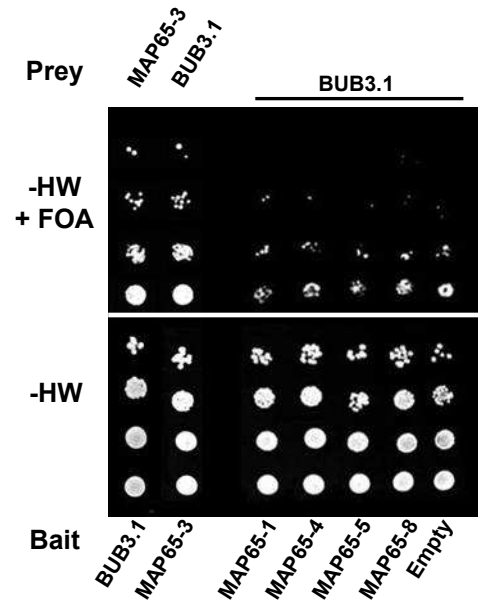


Figure 1. Specific interaction between MAP65-3 and BUB3.1 in Y2H split-ubiquitin system. Dilution series of yeast JD53 cells expressing both bait: Cub:URA3 fusions and Nub:prey fusions were grown on yeast medium minus histidine and tryptophan (-HW) but containing 5-FOA, as indicated. The specific interaction between MAP65-3 and BUB3.1 resulted in uracil auxotrophy and 5-FOA resistance. No interactions were detected with MAP65-1, -4, -5 or -8.

conserved BUBR1 functions in regulating the SAC mechanism, determining basal mitotic timing and promoting proper kinetochore-microtubule linkage to ensure the fidelity of chromosome segregation during mitosis in plant.

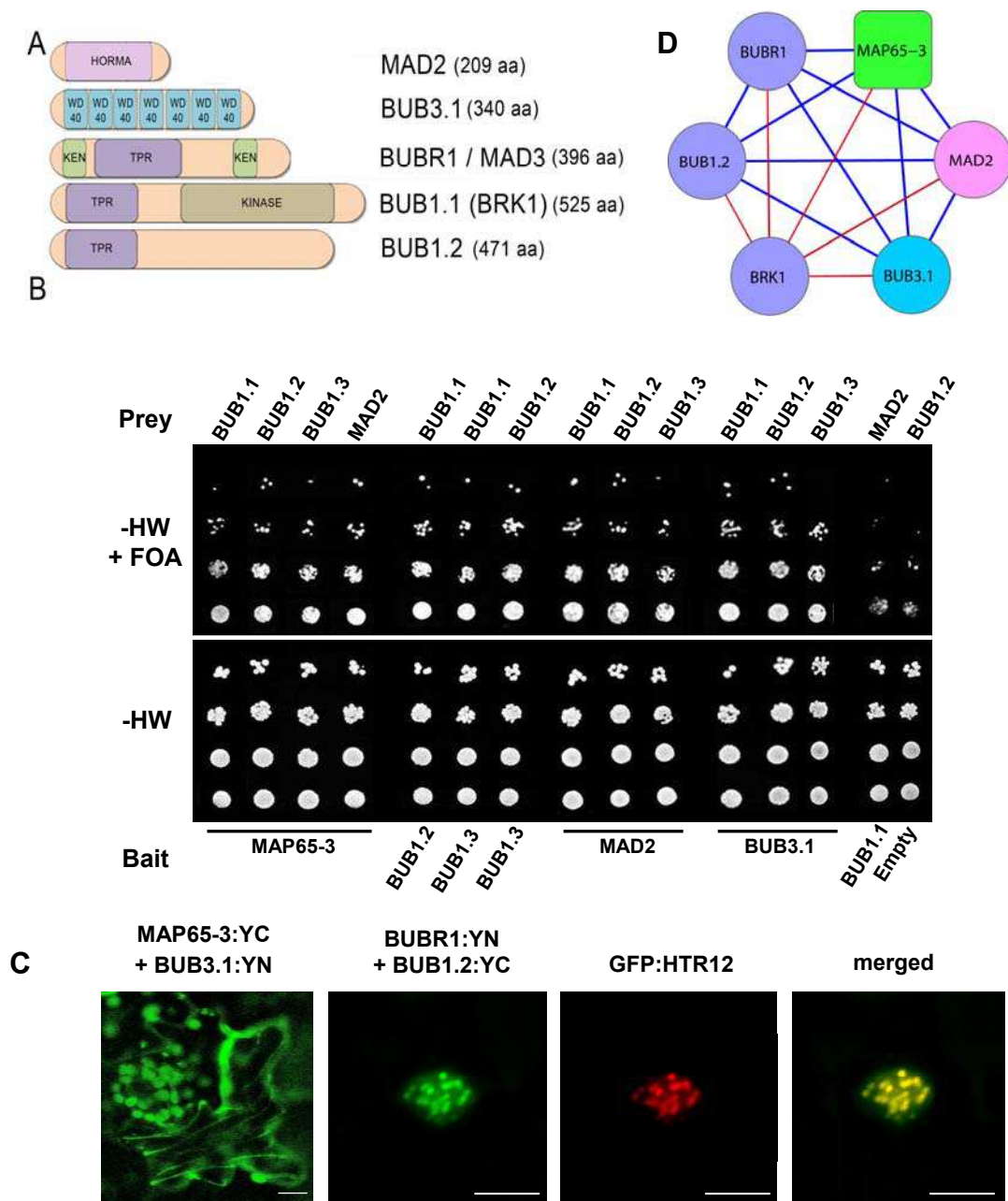


Figure 2. Interactions between the core components of the SAC and MAP65-3 in yeast and *in planta*. (A) Domain organisation of Arabidopsis MAD2, BUB3.1, MAD3/BUBR1, BUB1-related kinase BUB1.1 or BRK1 and BUB1-like protein BUB1.2. The conserved functional motifs KEN, TPR (tetratricopeptides repeat motif), kinase, WD-40 repeats and HORMA (PF02301) domain are indicated. Proteins are drawn to scale. (B) Interactions in the Y2H split-ubiquitin system. Dilution series of yeast JD53 cells expressing both bait:Cub:URA3 fusions and Nub:prey fusions were grown on yeast medium minus histidine and tryptophan (-HT) but containing 5-FOA, as indicated. Interaction resulted in uracil auxotrophy and 5-FOA resistance. (C) *In planta* bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay. Single-plane confocal images of agroinfiltrated tobacco epidermal leaf cells co-expressing the prey or bait fused to the N- and C-terminal halves of the YFP (YN and YC, respectively) (green channel), and GFP:HTR12 (red channel). The merged image shows that BUBR1 and BUB1.2 interaction colocalised with HTR12 in yellow chromocenter spots. Bars, 10 μ m. (D) Interaction network. Edge colors show the type of assay that detected the interaction of each couple: Y2H (red) or both BiFC and Y2H (blue).

Results

MAP65-3 interacts with BUB3.1, MAD2 and BUB1/BUBR1/MAD3 proteins

To identify MAP65-3-interacting proteins, Arabidopsis MAP65-3 (AT5G51600) was used as bait to screen a split-ubiquitin yeast-two-hybrid (Y2H) Arabidopsis cDNA libraries generated from mRNAs isolated from 7 dpi dissected galls or inflorescences. Eight different prey cDNA clones were identified. Here, we described the identification of a cDNA clone encoding the 340 amino acids (AA) residues of the BUB (BUDDING UNINHIBITED BY BENZYMIDAZOL) 3.1 protein (AT3G19590). Figure 1 shows the specificity of the interaction between MAP65-3 and BUB3.1. Indeed no interactions were detected with MAP65-1, MAP65-4, MAP65-5 and MAP65-8. BUB3.1 is involved in the regulation of the Spindle Assembly Checkpoint (SAC). This mitosis-regulated protein interacts with Arabidopsis orthologs of the checkpoint proteins BUBR1 (AT2G33560) and MAD2 (AT3G25980) (Caillaud et al., 2009).

To study possible interactions between MAP65-3 and the SAC proteins, we used the Y2H split-ubiquitin and *in planta* bimolecular fluorescence complementation (BiFC) approaches. In addition to BUB3.1, BUBR1, and MAD2, two Arabidopsis MAD3/BUB1-related sequences were identified and cloned. Arabidopsis BUB1-related kinase (BRK1, AT1G20635; Uniprot F4IVI0) is a 525 AA protein containing a BUB1-MAD3 N-terminal conserved domain (AA 1-162, Prosite PS51489) and a C-terminal protein kinase domain (AA 222-520, PS50011) (Fig. 2A; Fig S1 and S2). The BUB1-MAD3 N-terminal domain includes a tetratricopeptides repeat motif (TPR) which is known to mediate the binding of BUB1 or BUBR1 to the kinetochore MT-binding protein Blinkin (KNL1/Spc105/CASC5) (Bolanos-Garcia et al., 2009; Kiyomitsu et al., 2007). Arabidopsis BRK1 shows 49% and 61% identity over its entire length with the recently characterized BRK1 from monocots (*Oryza sativa*) and dicots (*Vitis vinifera*), respectively (Karpov et al., 2010; Wang et al., 2012) (Fig. 2A, Fig. S1

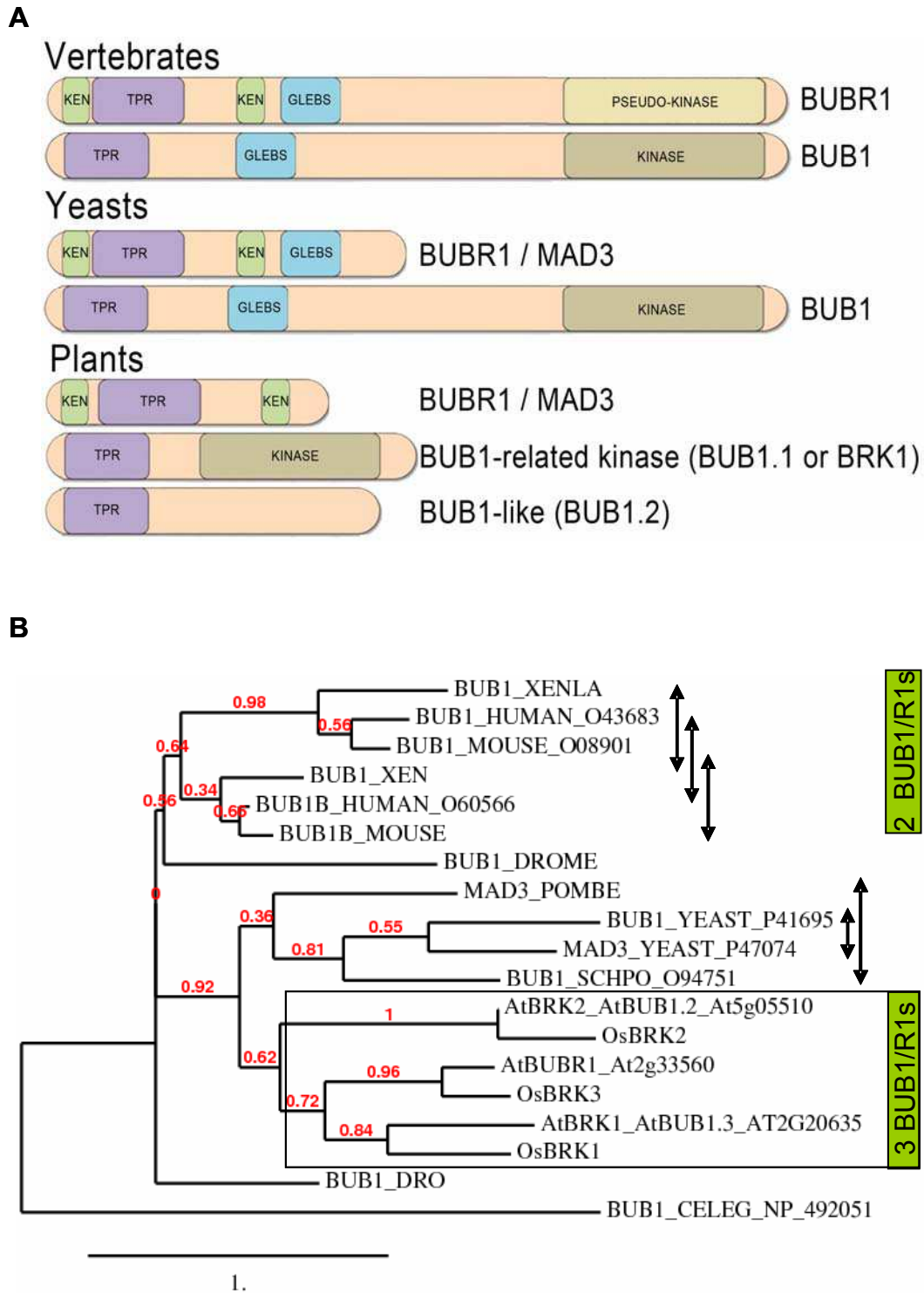


Figure S1. Comparison of MAD3/BUBR1 and BUB1-related proteins in plants, yeasts and vertebrates. (A) Domain organisation of MAD3/BUBR1 and BUB1. The conserved functional motifs KEN, GLEBS (BUB3-binding region), TPR (tetrapeptide repeat motif), kinase or pseudo-kinase (Suijkerbuijk et al., 2012) are indicated. Proteins are drawn to scale. (B) Phylogenetic tree of eukaryotic BUB1 and BUBR1/MAD3 sequences using MUSCLE alignment and PhyML. The branch length is proportional to the number of substitutions per site.

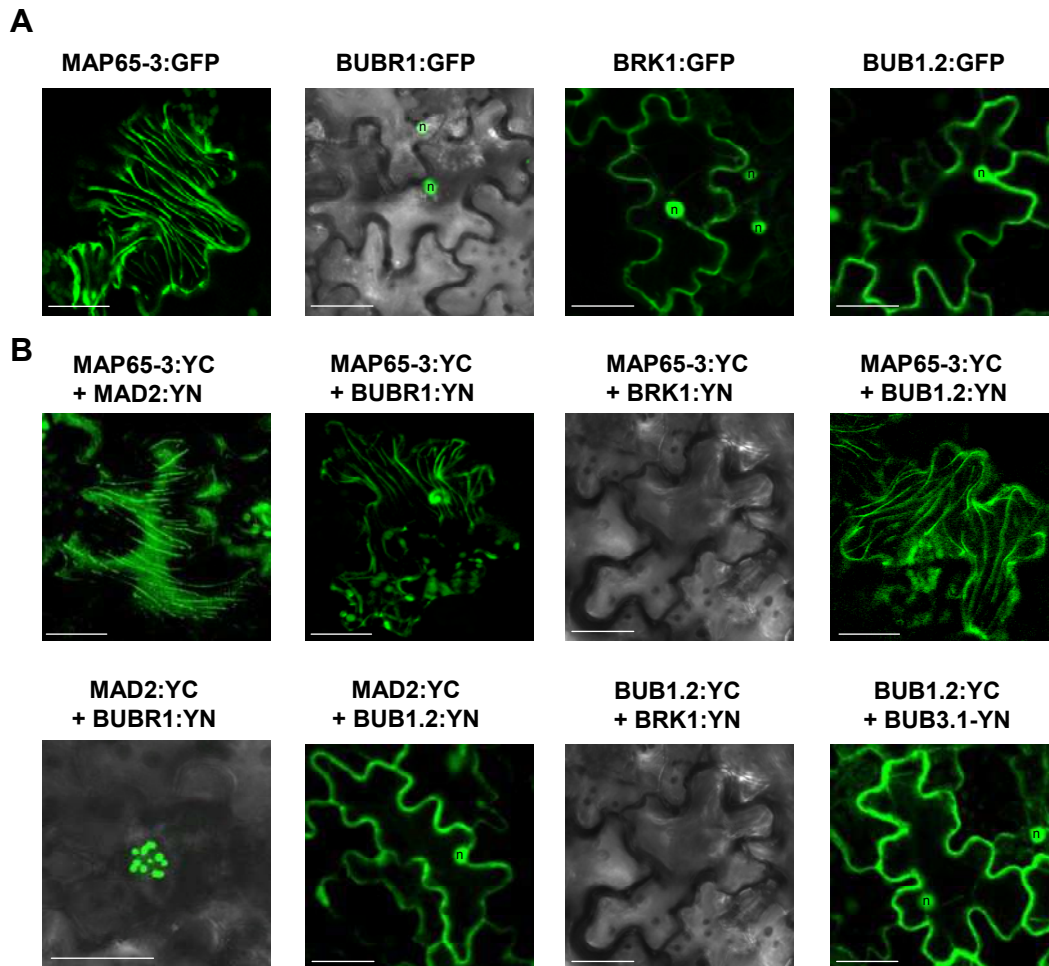


Figure S3. Interactions of MAP65-3 and SAC components *in planta*. (A) Subcellular localization of proteins fused to GFP in agroinfiltrated *N. benthamiana* leaf epidermis. MAP65-3 is associated with large bundles of MT arrays. BRK1 and BUB1.2 fused to GFP are detected in both the nucleus and the cytoplasm whereas BUBR1 fused to GFP is specifically targeted to the nucleus. Similar results were obtained with GFP N- and C-terminal fusions. (B) *In planta* BiFC assay. Confocal images of epidermal leaf cells infiltrated with *A. tumefaciens* co-expressing protein fused to the C-terminal half of YFP (YC) and protein fused to the N-terminal half of YFP (YN). Bars, 20 μ m; n, nucleus.

and S2). In contrast BUB1-like 2 (BUB1.2, AT5G05510) is unusual and differs from AtBRK1 and vertebrate BUB1 by the absence of a C-terminal kinase domain, like the MAD3 proteins of yeasts and Arabidopsis BUBR1. In addition BUB1.2 lacks also the conserved KEN boxes critical for checkpoint activity. Thus, Arabidopsis present three BUB1/BUBR1/MAD3 proteins including two BUB1-like (BRK1 and BUB1.2) and one BUBR1 (Fig 2A; Fig. S1).

We demonstrated that MAP65-3 interacted with BUB3.1, MAD2, BUBR1, BRK1 and BUB1.2 in yeast. All these proteins also interacted with each other (Fig. 2B). These interactions were confirmed in a reciprocal bait-prey experiment. To validate these physical interactions, we performed *in planta* BiFC experiments. Following transient expression in *Nicotiana benthamiana* leaf epidermis, MAP65-3 fused to GFP is associated with large bundles of cortical MT arrays (Fig S3). BRK1 and BUB1.2 fused to GFP in N- or C-terminal were detected in both the nucleus and the cytoplasm, as previously described for MAD2 and BUB3.1 (Caillaud et al., 2009), whereas BUBR1 was specifically targeted to the nucleus (Fig. S3). Using BiFC (Caillaud et al., 2009; Hu et al., 2001), we showed that coexpression of the constructs encoding MAP65-3:YC (MAP65-3 fused to the C-terminal half of YFP) and BUB3.1:YN (BUB3 fused to the N-terminal half of YFP), resulted in the reconstituted YFP complexes being targeted to MT arrays ($n = 20$; Fig. 2C). Similar results were obtained with all tested SAC components except BRK1 for which no YFP fluorescence was detected. We investigated whether BUBR1, BUB3.1 and MAD2 could also interact with BRK1 and BUB1.2 *in planta*. BUB1.2 interacted with MAD2 or BUB3.1 in the nuclei and cytoplasm of epidermal cells (Fig. S3). Interactions between BUBR1:YN and BUB1.2:YC were observed exclusively in the nucleus, as bright subnuclear foci (Fig. 2). Using the centromeric Histone H3 variant from *A. thaliana* GFP:HTR12 (CENH3, AT1G01370) as *in vivo* marker for centromeres (Lermontova et al., 2011; Talbert et al., 2002), we confirmed that, as already

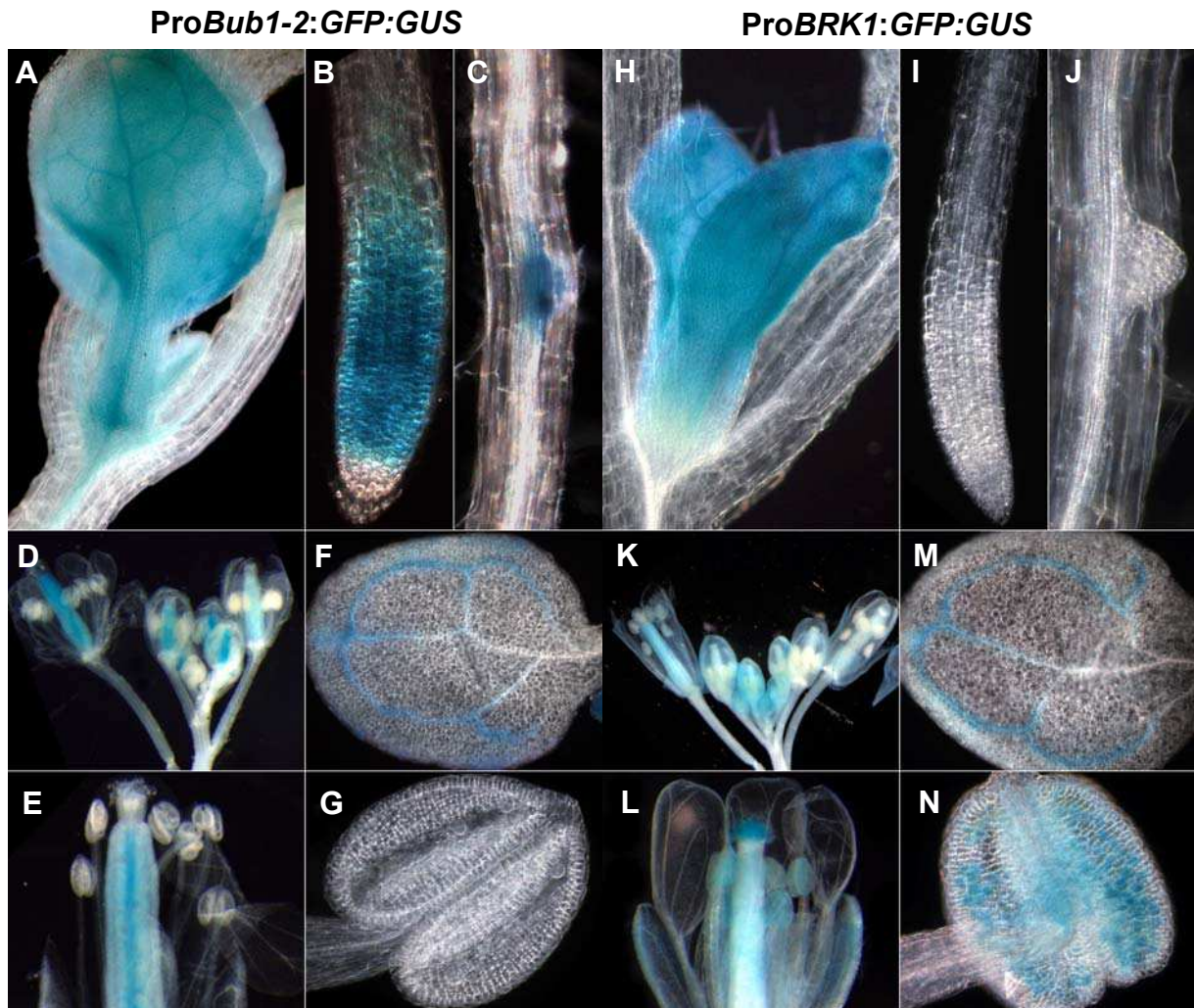


Figure 3. Expression pattern of *BUB1.2* and *BRK1* during *Arabidopsis* development. Arabidopsis lines transformed with the promoter:GUS fusions *ProBUB1.2:GFP:GUS* (A-G) or *ProBRK1:GFP:GUS* (H-N). (A, H) developing leaves of 7-day-old seedlings, (B, I) root meristems, (C, J) in lateral root primordia, (D, K) inflorescences, (E, L) flowers, (F, M) leaves and (G, N) anthers.

observed for BUBR1 and MAD2 (Fig S3), BUBR1 and BUB1.2 interact specifically at interphase chromocenters, which correspond to the position on the chromosome at which kinetochore proteins associate.

Arabidopsis SAC components are co-expressed with MAP65-3 in dividing cells and nematode-feeding cells

We investigated the pattern of expression of the *A. thaliana* *BUB1.2* and *BRK.1* genes during plant development, using *A. thaliana* transgenic lines (n=5) transformed with the corresponding promoter-GUS reporter gene constructs. *BUB1.2* promoter directed expression in tissues with a high proportion of dividing cells, early in organ development, in young leaves (Fig 3A), root meristems (Fig. 3B), lateral root primordia (Fig. 3C). GUS expression was found in the carpels of floral buds and flowers (Fig 3D, E) and in the vascular bundles of the leaves (Fig. 3F). Thus as observed for BUBR1, BUB3.1 and MAD2, BUB1.2 is co-expressed with MAP65-3 in all dividing cells. In contrast ProBRK1:GFP:GUS lines, GUS expression was observed in young leaves but not in root meristems (Fig 3H-J). In flower, its expression was detected in the papillae and in pollen (Fig 3K, L, N).

Root-knot nematode infection of promoter-GUS lines showed that BUB3.1, BUBR1, BUB1.2 and MAD2 lines displayed early GUS activity in galls that was first detected <48h after giant cell initiation (3 days after infection, dai) (Fig 4). These expressions were observed over a three-week period during the giant cell formation (5 to 21 dai), but was detected at later stages (30 dai) in BUB3.1, BUB1.2 and BUBR1 lines. Sections through galls clearly showed GUS staining in developing giant cells and in the surrounding dividing cells (Fig 4). No GUS activity was detected in the cortical cells of the gall. Intriguingly, weak GUS expression was observed only in galls 10 dai in ProBRK1:GFP:GUS lines. QPCR analysis confirmed the upregulation of BUB3.1, BUBR1, BUB1.2 and MAD2 in galls from 7 to 21 dai (Fig S4).

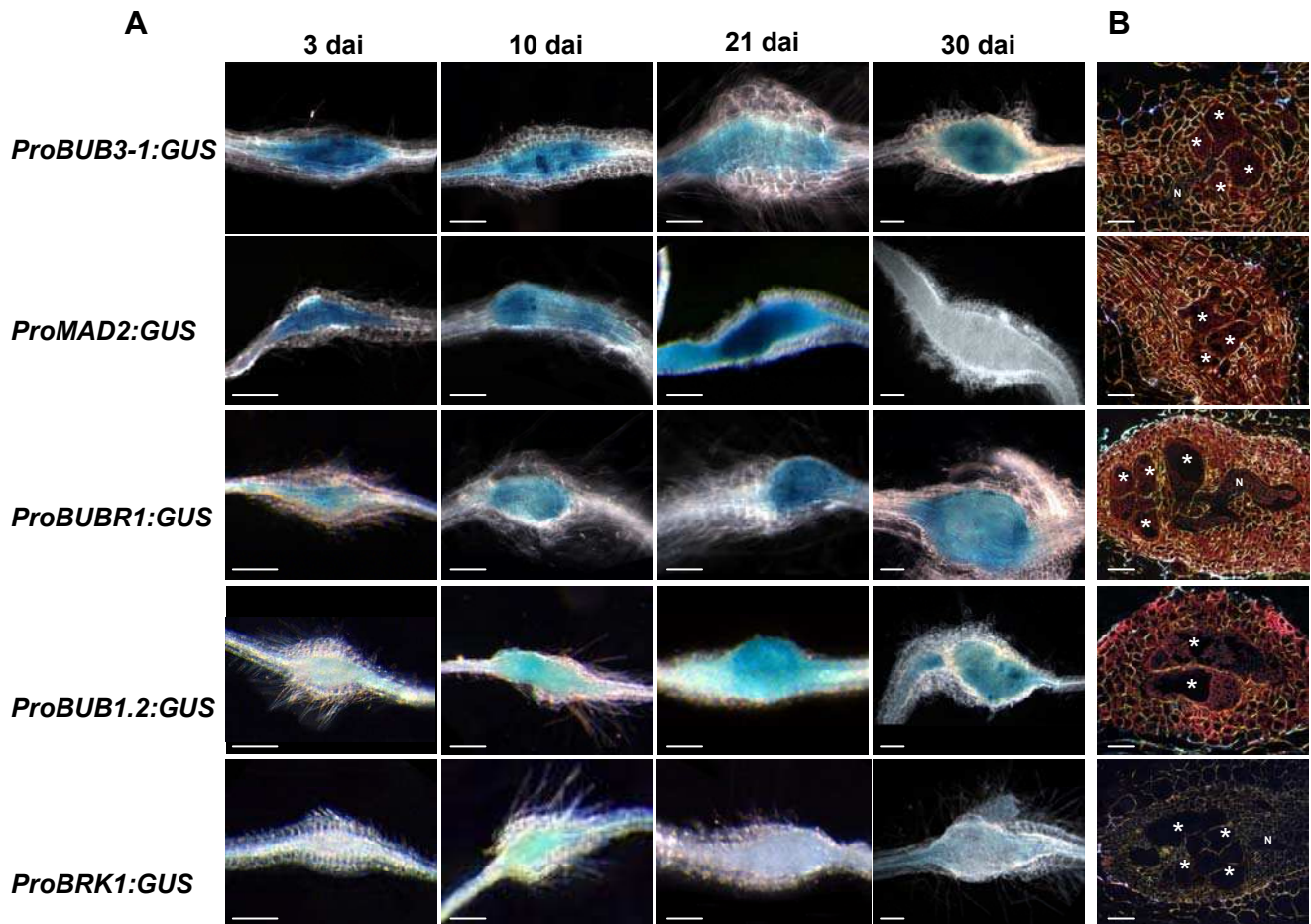


Figure 4. The SAC components Arabidopsis lines display GUS activity in galls induced by root-knot nematodes. (A) GUS activity in root gall from 3 to 30 days after *M. incognita* infection. (B) Section of 21-dai galls examined by dark-field microscopy. GUS activity (detected by formation of a pink precipitate) is observed in the giant cells (*) and in the cells surrounding the giant cells and the nematode larvae (N). Bars, 100 μ m in (A) and 25 μ m in (B).

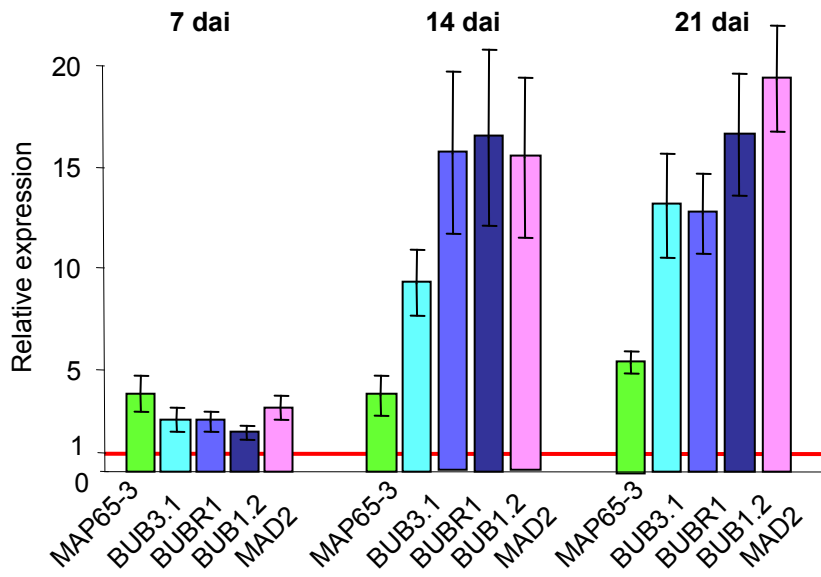


Figure S4. qRT-PCR expression analysis of SAC components during root-knot nematode infection. The means (\pm SD) of three independent biological replicates are shown. RNA was extracted from dissected galls and from non inoculated non-meristematic root fragments.

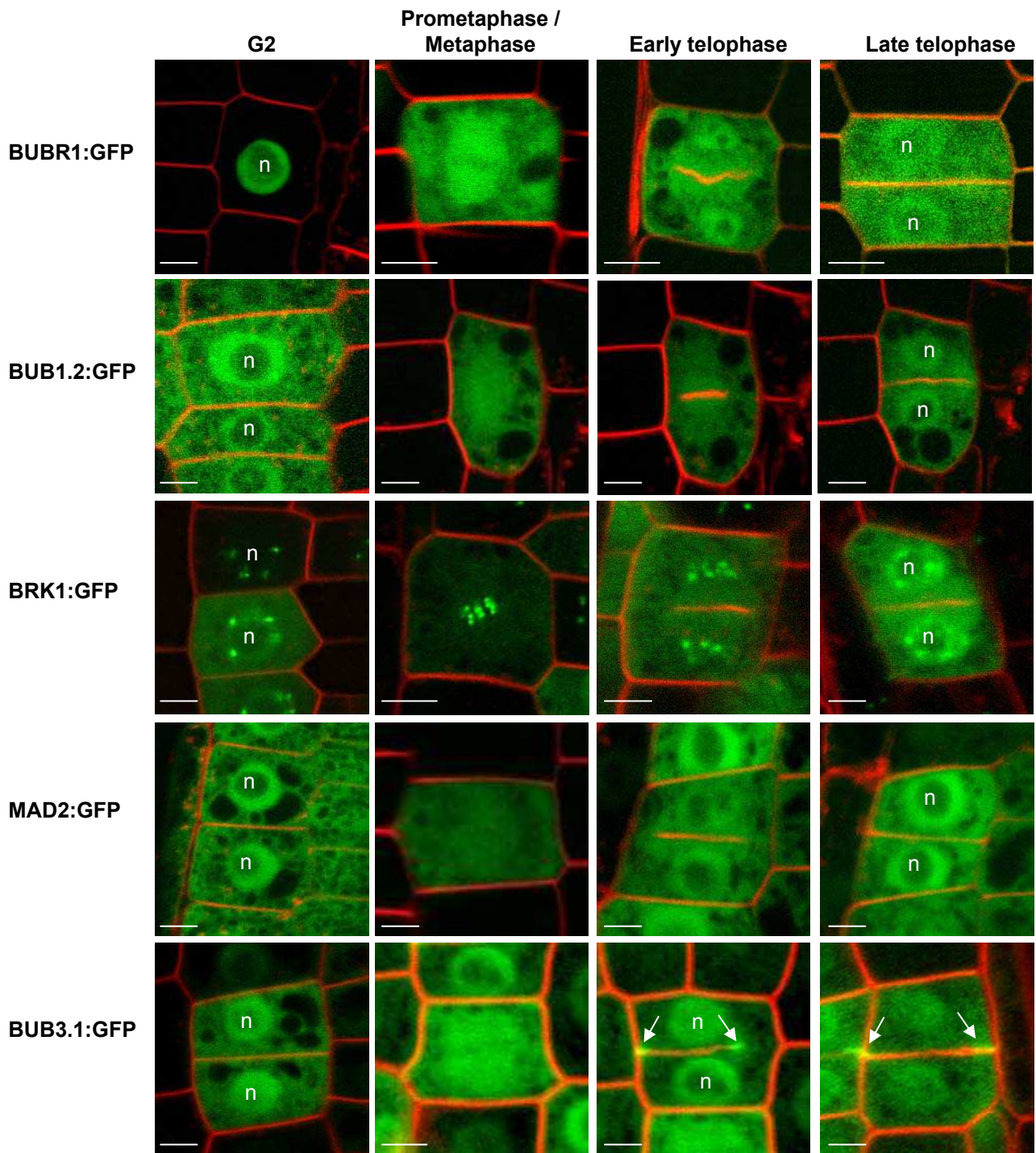


Figure 5. Subcellular distribution of GFP fusions of SAC components during mitosis in *Arabidopsis* roots. Single optical sections of meristematic root cells expressing BUBR1:GFP, BUB1.2:GFP, BRK1:GFP, BUB3.1:GFP or MAD2:GFP fusion constructs under the control of the MAP65-3 promoter (green channel). The plasma membrane was stained by FM4-64 (red channel). BUBR1:GFP and BUB3.1 were detected in the cytoplasm and more concentrated at the mitotic spindle. By telophase, BUB3.1:GFP was detected in daughter nuclei (n) and in the midline at the cell periphery (arrows), forming a ring around the edge of the newly formed cell plate. BRK1:GFP was detectable at kinetochores of chromosomes throughout mitosis. Bars, 5 μ m.

SAC component localization during mitosis in Arabidopsis

To gain insight into the SAC in plant, we profiled the spatial distribution of SAC proteins in *Arabidopsis* plants stably transformed with BUBR1:GFP, BUB1.2:GFP, BRK1:GFP, BUB3.1:GFP and MAD2:GFP constructs. As the use of their native promoters gave no detectable signal, we use the MAP65-3 promoter to drive a mitosis-specific GFP expression. At a prometaphase-like stage, none of these SAC proteins were found to localize on kinetochores except BRK1 that cluster strongly in bright spots on condensing chromosomes corresponding to kinetochores (Fig 5). Interestingly BRK1:GFP was detectable at kinetochores throughout mitosis. BUBR1:GFP and BUB3.1 were detected in the cytoplasm and more concentrated at the mitotic spindle. In late anaphase to telophase, BUB3.1:GFP was detected in daughter nuclei (n) and in the midline of the phragmoplast (Fig 5), the cytokinetic apparatus where the Golgi-derived vesicles fuse to form a cell plate. During giant cell formation, BRK1:GFP and BUBR1:GFP signals were detected with difficulty, in giant cell nuclei, at kinetochores or in nucleoplasm, respectively (Fig 6). The large increase in the number of kinetochores observed in the BRK1:GFP gall line confirmed the multiple round of endoreduplication essential for giant cells maturation (de Almeida Engler and Gheysen, 2013).

Arabidopsis *brk1*, *bub1.2* and *bubr1* mutants

To analyze the functions of the MAD3/BUBR1 and BUB1 proteins, T-DNA insertional mutations at the BUB1.2, BRK1, and BUBR1 loci were isolated. Unfortunately, Arabidopsis BUB3.1 knock-out (KO) mutant have been shown to be embryo-lethal (Lermontova et al., 2008). We identified one KO mutant per gene for which no full-length transcript was detected (Fig 7). These *bubr1*, *bub1.2* and *brk1* mutant plants were morphologically similar to wild

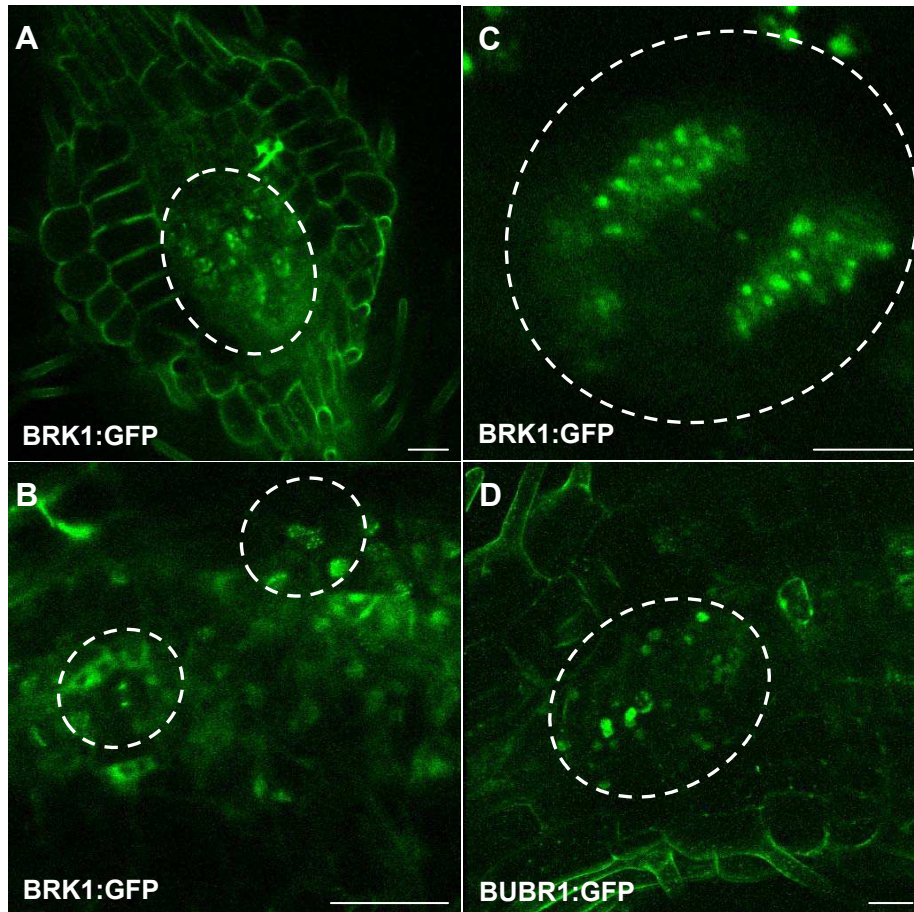


Figure 6. Subcellular distribution of BRK1:GFP and BUBR1:GFP fusions in nematode-induced giant cells. Projections of Arabidopsis galls expressing BRK1:GFP or BUBR1:GFP fusion constructs under the control of the MAP65-3 promoter (green channel). Vibroslices of 100 μm were performed on galls embedded in agar 7 dpi. BRK1:GFP (A, B, C) and BUBR1:GFP (D) were detected in giant cell nuclei, at kinetochores or in nucleoplasm, respectively. Bars, 50 μm (A, B and D) or 5 μm (C).

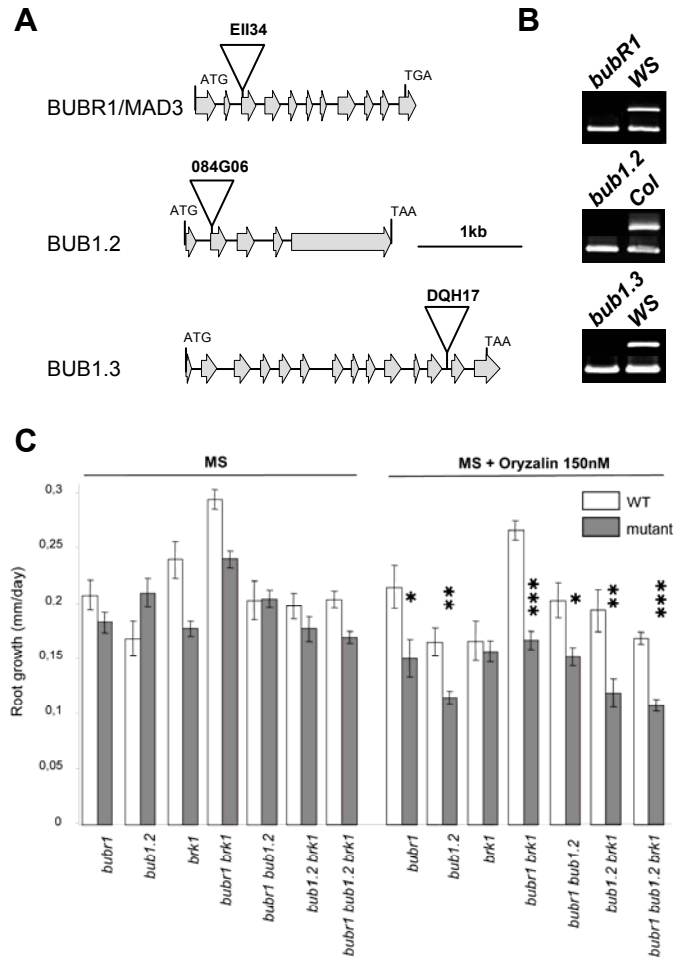


Figure 7. Phenotype of *bubr1*, *bub1.2* and *brk1* single, double and triple mutant plants. (A) Schematic illustration of the genomic organization of the BUBR1, BUB1.2 and BRK1 genes and the positions of corresponding T-DNA insertions. Exons and introns are displayed as open arrows and lines, respectively. (B) RT-PCR revealed transcripts in the wild-type Arabidopsis ecotypes Col or Ws. Amplicons spanning the insertion sites were absent from all KO mutants. MAP65-3 CDS was used as positive control. (C) Root growth of 25-day-old seedlings grown on vertically placed plates in the presence or absence of 150 nM oryzalin. The data are means (\pm S.D.) of more than 25 seedlings in triplicate. Significant differences (* $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, *** $P < 0.0001$) between wild type (WT) and mutants were determined for each growth conditions by a Student's *t* test.

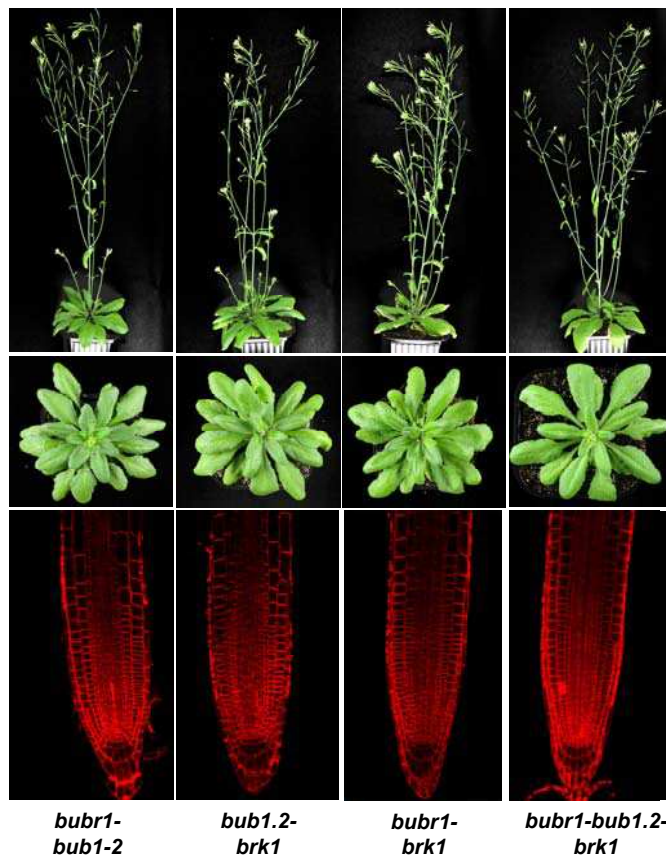
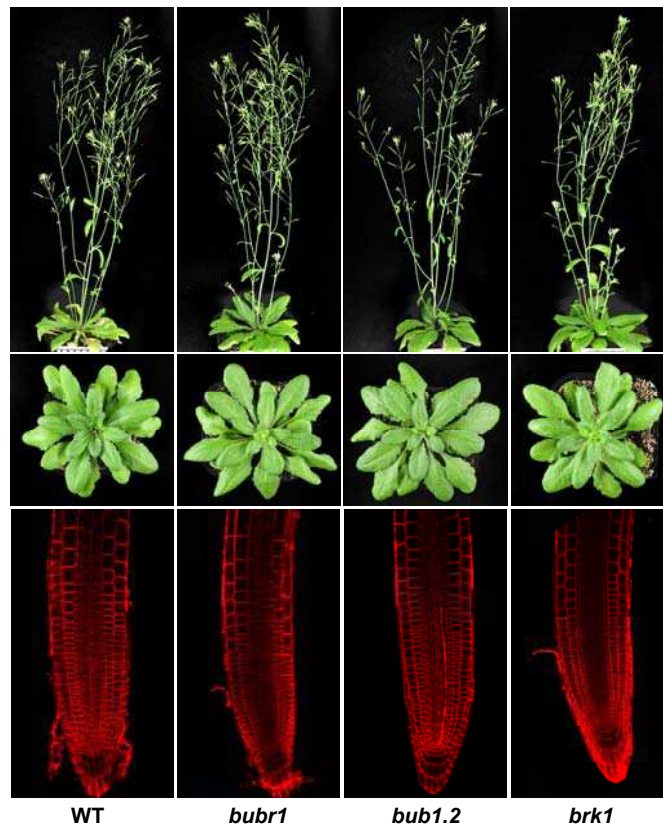


Figure S5. Similar morphologies of wild type, single, double and triple *bub1/bub1.2/brk1* mutant plant under normal growth conditions. Aerial parts on soil after 7 weeks, rosette leaves, and FM4-64 stained root meristems of single *bub1*, *bub1.2* and *brk1* double and triple mutants were similar to the corresponding WT plants (Col0 or WS).

type plants under normal growth conditions and developed normal roots, leaves, shoot and flowers (Fig S5). Addition of oryzalin, a MT-destabilizing agent, to the growth medium inhibited root growth of the two single mutant *bubr1* and *bubl.2* as well as the double and triple mutant (Fig 7C). This phenotype is consistent with the fact that SAC mutants could be insensitive to spindle defects, and fail to arrest in metaphase, thus accumulating errors and grow slowly. We analyzed DNA and MT dynamics in the different mutants. At the chromosomal level, *bubr1* mutant showed misaligned chromosome at the metaphase plate (Fig 8A) and consequent lagging chromosomes in anaphase (Fig 8B) while *bubl.2* and *brk1* exhibited wild type phenotype. The *bubr1-bubl.2* mutant showed also anaphase lagging chromosome (Fig 8 G,H,I,K-N) and consequent micronuclei in late telophase (Fig 8 J and J'). Moreover, cytoskeletal abnormalities were found in the double mutant. After nuclear envelope breakdown, defects in spindle polarity and spindle MT organization occurred (Fig 8G-I, K-L). As the double mutant, the triple mutant showed slow congression (Fig 8O, U-W) and unstable metaphase plate (Fig 8 P-R). Consequently, anaphase was strongly delayed and chromatid segregation could lead to aneuploidy linked to chromosome lagging (Fig 8 S and T). Time-lapse analysis (Fig S6) exhibited tilted phragmoplast in *bubr1 bubl.2*, with a symmetrical growth leading to micronuclei.

Next to this developmental defects, we investigated then the ability of root-knot nematodes to induce their feeding giant cells. Following nematode infection, all the mutants had similar number of galls and egg masses to corresponding wild-type plants (Fig S7). This shows the capacity of the nematode to infect the plants and its ability to induce a functional feeding site in order to develop and reproduce.

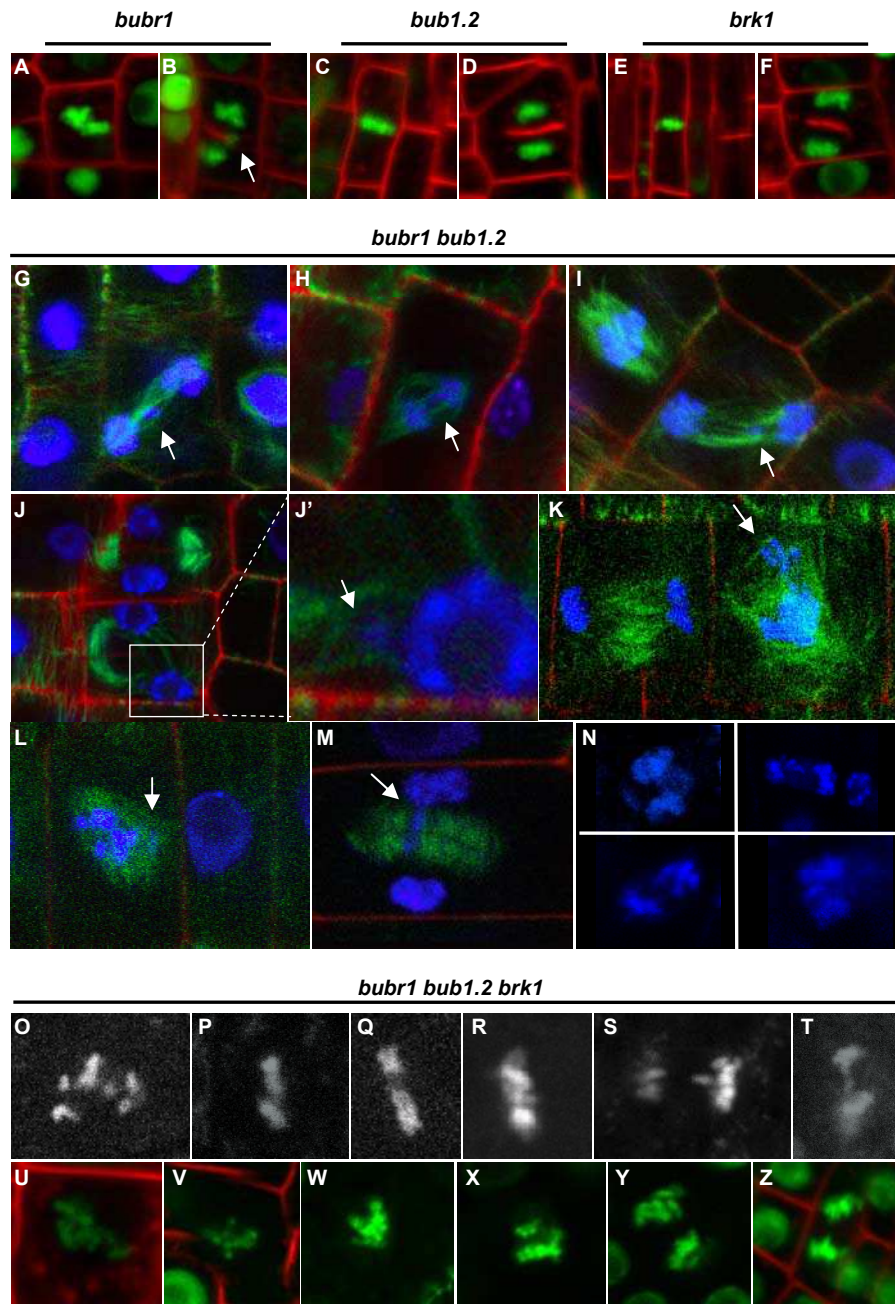


Figure 8. Mitotic defects during mitosis in single *bubr1*, double *bubr1 bub1.2* and triple *bubr1 bub1.2 brk1* mutants. MBD:GFP (green channel) and H2B:YFP (blue channel) during mitosis in the double *bubr1 bub1.2* mutants. (A-Z) Single optical section of meristematic root cells expressing H2B:YFP (green or blue channel) and (G-N) MBD:GFP (green channel). The plasma membrane was stained by FM4-64 (red channel). (A) *bubr1* single mutant showed defects in chromosome alignment during metaphase and consequent lagging chromosome (arrows) in telophase (B). *bub1.2* single mutant (C,D) and *brk1* (E, F) were similar to the WT. (G-N) *bubr1 bub1.2* double mutant showed defects in the mitotic spindle, with oblique spindle (G,H and I) and may exhibit tripolar spindle (H, K and L). This mutant presented lagging chromosomes (G, H, I, K, L,M, N) and subsequent micronuclei (J and J', arrow). (O-Z) *bubr1 bub1.2 brk1* triple mutant showed similar defects to *bubr1 bub1.2* double mutant. The triple mutant showed metaphasic chromosome misalignment (O, P,U,V and W), metaphase delay (Q,R) and chromosome misalignment in anaphase and telophase (S, X,Y and Z). An anaphase bridge is presented in (T).

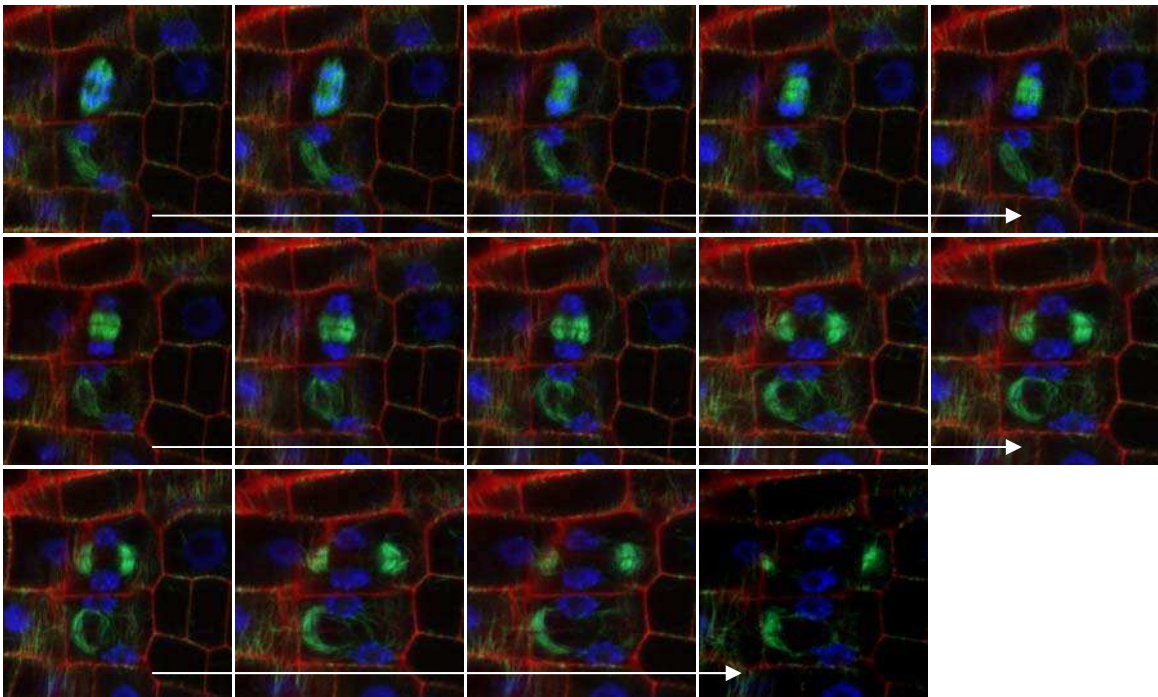


Figure S6. Mitotic defects during mitosis in *bub1 bub1.2* mutants. Selected frames from a fluorescence time-lapse analysis of the distribution of MAP4:GFP (green channel) and H2B:YFP (blue channel) during mitosis in the double *bub1 bub1.2* mutants. The plasma membrane was stained by FM4-64 (red channel).

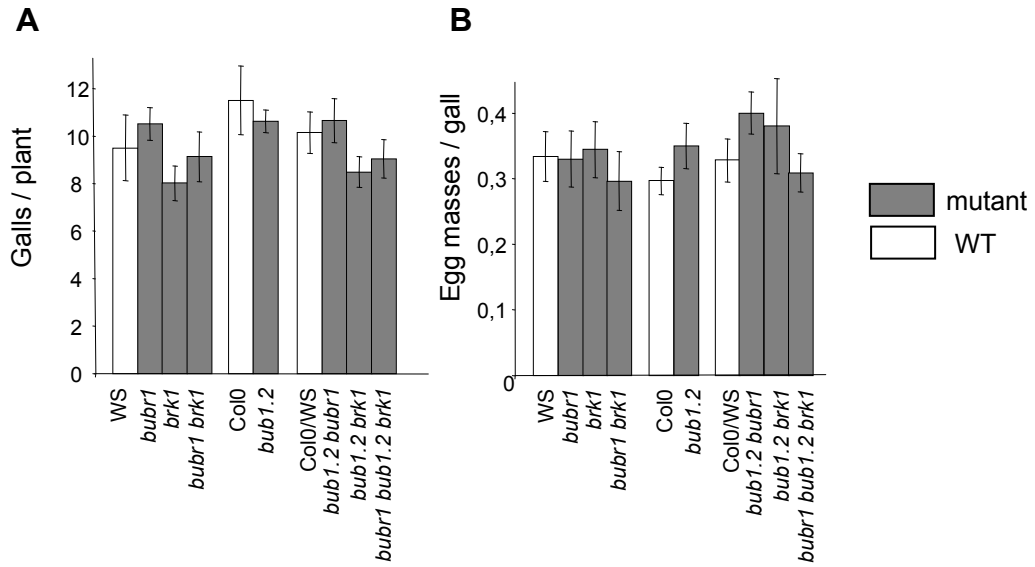


Figure S7. Root-knot nematode infection is not altered in *bubr1*, *bub1.2* and/or *brk1* mutants. (A) Numbers of galls per plant induced by *M. incognita* at 14 dpi in the single, double and triple mutants and corresponding wild-type plants. (B) Number of egg masses per gall produced 60 dpi. The values shown are the means (\pm SD) of data obtained for 20 seedlings of each line. No statistical significance difference between values was detected using a Student's *t*-test ($P < 0.01$).

Discussion

We report the interaction between MAP65-3 and BUB3.1 using Y2H and *in planta* BiFC. The MAP65-3 / BUB3.1 interaction has been confirmed biochemically in cell culture by tandem affinity purification coupled to mass spectrometry using BUB3.1 as bait (Van Leene et al., 2010). In addition to the characterized Arabidopsis BUBR1 and MAD2, we identified two potential new BUB1-like as SAC members. Although they share extensive sequence homology and domain architecture, MAD3/BUBR1 and BUB1 have distinct roles in the SAC (Bolanos-Garcia and Blundell, 2010). Animal and fungal species with BUB family genes contains either a single or two BUB-like proteins. These paralogous pairs arose by independent gene duplications throughout evolution, followed by parallel subfunctionalization in which preservation of the ancestral, amino-terminal KEN box or (pseudo)kinase was mutually exclusive (Suijkerbuijk et al., 2012). Intriguingly monocot (rice) and dicot plants (Arabidopsis) contain three BUB1/BUBR1/MAD3 proteins including two BUB1-like lacking KEN box, one with a kinase domain (BRK1) and one without (BUB1.2). We showed that MAP65-3 and SAC components BUBR1, BUB1.2, MAD2 and BUB3.1 interact together in yeast and *in planta*. This interaction is consistent to animal models where the MAP65 homolog yeast Ase1p (Daniel et al., 2006) and human PRC1 (Kurasawa et al., 2004) interact with SAC components and may play together essential roles in the organization of central spindles and midzone formation. BRK1 interactions were not confirmed in *N. tabacum* epidermis. These results could be due to the mislocalization of BRK1 observed in this species. Stable transformation in Arabidopsis showed that BRK1:GFP localize to centrosomes whereas a nuclear and cytoplasm localization was observed in tobacco. BRK1 may require a specific interaction with Arabidopsis proteins absent in tobacco epidermis. Despite BRK1, we showed that all the SAC components interact together in yeast and *in planta*. Additionally to the previous interaction shown between BUB3.1, BUBR1 and MAD2

(Caillaud et al., 2009), we report here further interactions with BUB1.2. Surprisingly, BUB1.2 –as MAD2- interacts specifically with BUBR1 at interphase centromeres, where the kinetochore proteins load during mitosis. These data concord with animal models where from yeast to humans, direct interaction between BUBR1, BUB1, BUB3 and MAD2 has been reported as they own to the same complex (Chen, 2002; Sczaniecka et al., 2008; Sudakin et al., 2001).

We then investigated the distribution of *A. thaliana* SAC proteins *in vivo* in normal mitosis conditions, when SAC is inactivated. This was made possible since the expression of the chimeric proteins did not prevent cell cycle progression. Before mitosis entry in G₂, BUB3.1, BUB1.2 and MAD2 proteins were localised to the nucleus and gave a weak cytoplasmic signal while BUBR1 was found exclusively in nuclei. In early prophase, BUBR1, BUB3.1 and MAD2 became localised in the cytoplasm following nuclear envelope breakdown and remained there until the end of metaphase. None kinetochore recruitment were observed during prometaphase and metaphase during a normal mitosis. Moreover BUBR1 and BUB3.1 were detected more concentrated at the mitotic spindle, suggesting a potential translocation from kinetochores to spindle poles along microtubules as observed from hMAD2 (Howell et al., 2000). Although kinetochore localization during prometaphase is a common characteristic among higher eukaryotes (Wei et al., 2011), it is difficult to observe under physiological conditions in *S. cerevisiae* and the distinct enrichment of SAC proteins on kinetochore require alterations or defects in kinetochore or spindle integrity (Kerscher et al., 2003). Yet, the maize and wheat MAD2 homologs have been first shown to localize on kinetochore during early mitosis (Kimbara et al., 2004; Yu et al., 1999). Interestingly although there is subtle difference between plants species where the wheat and Arabidopsis MAD2 localize on kinetochore only after a microtubule-destabilizing drug treatment (Kimbara et al., 2004). On the other hand, the maize MAD2, shows different localization patterns between mitosis and

meiosis, suggesting factors differences (microtubule attachment vs tension) sensed by the SAC in plants (Yu et al., 1999) as occasionally presented in higher eukaryotes (Kapoor et al., 2000; Shannon et al., 2002). Unlike our data, AtMAD2 showed a kinetochore localization in BY-2 cells, during normal mitosis (Ding et al., 2012). However, this kinetochore localization has never been observed in Arabidopsis plants and no serious KO phenotype has been reported (Ding et al., 2012). Moreover, in telophase, BUB3.1 localized to phragmoplaste midline during plant cytokinesis, as observed previously in tobacco cells (Caillaud et al., 2009). Interestingly, BRK1 was found associated on the centromeres in G2 and on the kinetochores during all the mitosis. These data are consistent with our previous study showing that checkpoint protein is recruited at kinetochore only in case of damage in spindle assembly. Our data suggest that in plant, kinetochores do not recruit high level of these SAC proteins during normal mitosis which is consistent with the idea that plant chromosomes are continuously linked to microtubules.

Here we report a normal growth and development for the *bubr1*, *bub1.2* and *brk1* and the corresponding double and triple plant mutants. However, all the mutants except *brk1*, showed a higher sensitivity consisting on an affected growth on the MT-destabilizing agent oryzalin. Like the *S. cerevisiae* model, the plant SAC should not be required under normal growth conditions (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991) and is needed to arrest cell division only when spindle structure is disrupted. However, SAC in *S. cerevisiae* is essential as the mutants exhibited abnormal nuclear division and cytokinesis continue to occur leading to death. By contrast, in plants, the consequent defects are not lethal, maybe allowed, showing a high plasticity in the green kingdom (Wang et al., 2012). Despite the minor defects observed in the SAC mutants, a recent study report strong phenotypes following MAD2 and BUBR1 inactivation in Arabidopsis petals, implying significant role in the cell division (Burgos-Rivera and Dawe, 2012).

We further analyse DNA and microtubule dynamics in the mutant background. The *bubr1* mutant, as in the *bubr1-bub1.2* and *bubr1-bub1.2-brk1* present typical SAC mutant phenotype as metaphasic chromosome fail to congress and align correctly, leading to lagging chromosome and consequent micronuclei. BUBR1, like MAD2 binds directly to and inhibits CDC20, the essential cofactor required by the APC/C to initiate mitotic exit. BUBR1 also determine basal mitotic timing, which is the minimum time elapses between nuclear envelope breakdown (NEB) and anaphase onset (Meraldi et al., 2004). BUBR1 as a third function, promoting proper kinetochore-microtubule linkage (Lampson and Kapoor, 2005); The multifunctionality of BUBR1 protein makes the phenotypes resulting from its inactivation is lethal in all metazoaires except in *Drosophila melanogaster* (Buffin et al., 2007) and difficult to interpret. The chromosome delay and unstable metaphase alignment seen in our mutants support an important role for BUBR1 in promoting K-MT attachment and are similar to the phenotypes described in mammalian cells after siRNA treatment (Lampson and Kapoor, 2005). However, the cytoskeletal abnormalities with defects in spindle polarity and spindle MT organization seen in the *bubr1-bub1.2* mutant has just been reported once in *D. melanogaster* (Rahmani et al., 2009). This may be a consequence of defective K-MT attachment or, more specifically, alterations in the activities of kinetochore-associated factors influencing MT stability or dynamics. Together this functions with the addionnal role in the SAC, lead to the observed lagging chromosome and micronuclei observed in the three mutants. Depletion of proteins such as CLASP or EB1, wich bind to and stabilize MT + end, leads to this cytoskeletal abnormalities and congression problems (Goshima et al., 2005; Maiato et al., 2002). Such proteins or their regulators are thus potential candidates for BUBR1 regulation. It will be interesting to further compare the developmental defects of *bur1* mutants with those of mutants in APC/C subunits and confirmed APC/C regulators.

Absence of chromosomal abnormalities during normal mitosis and growth defects under spindle perturbations conditions in the *brk1* mutants were not expected because of its exciting localization on kinetochores. However, this lack of mitotic phenotype has been confirmed in the *Oryza sativa* mutant homolog *Osbrk1* (Wang et al., 2012). The sterility phenotype reported for *Osbrk1* is caused by precocious separation of sister chromatids after metaphase I, which results from secondary SAC distinct roles of BRK1 in a cohesion-protecting protein SGO1 recruitment. AtBRK1 and OsBRK1 present an identical structure and a highly-conserved kinase domain, which have been proven to be functional in rice (Wang et al., 2012). However, it has been speculate that the persistence of BRK1 on the kinetochore might be related to its absence of a KEN Box motif and so the nonessential, structural function of this protein within the kinetochore, as well as in fission yeast (Bernard et al., 1998; Wang et al., 2012). Together this proposal and the lack of mitotic phenotype, we suggest a minor role of BUB1 in the mitotic SAC and that BUB1 should have lost its classical functions during evolution of the plant kingdom.

A previous study showed a defect in nematode feeding cell formation in the absence of a functional MAP65-3 (Caillaud et al., 2008). In the *map65-3* mutant, giant cells started to develop but did not complete their differentiation, because of accumulation of mitotic defects and were destroyed, leading to impaired maturation and death of nematodes. We investigated here the role of SAC proteins in giant cells formation. Surprisingly, none severe defects were observed as the nematode is capable to infect the plant, induce a feeding site and reproduce. And yet cell cycle activation in one of the first and essential change that occur in giant cells ontogenesis (Gheysen and Fenoll, 2002) Moreover, a recent study report a dramatically effect while overexpressing the cell cycle inhibitor Kip-related protein 4 (KRP4). Ectopic *KRP4* expression in galls led to aberrant nuclear structure, disturbing giant cell expansion and

nematode reproduction. The anomalous nuclear phenotype in this mutants are caused by abnormal chromosome segregation, thus indicating the importance of correct mitosis and subsequent a major role of the SAC in the giant cells. Furthermore, endoreduplication are essential for feeding site maturation (de Almeida Engler and Gheysen, 2013). CCS52A and CCS52B, coactivators of the APC/C, control endoreduplication and play a key role in giant cells formation (de Almeida Engler et al., 2012; Favery et al., 2002). Knowing that MCC is the key negative effector of the APC/C, we expected precocious endoreduplication thus bloquing further nuclear division and impairment in giant cells maturation. However, APC/C play a key role in giant cell ontogenesis and supplementary analysis on this complex and its regulation will provide better knowledge of endoreduplication mechanism induced by nematode.

Together, our data suggest that aspects of SAC function are conserved in plants. As in yeast and drosophila, plant SAC mechanism is not essential to organism survey and may play a role only when spindle structure is disrupted. Specifically, the BUBR1 may play a key role among the checkpoint. Although defects in chromosome structure and number is lethal within all the animals, plants have evolved remarquable adaptability and plasticity to bypass these defects (Rieder and Maiato, 2004). Moreover, the association of BUB3.1 with mitotic spindle and phragmoplaste structures suggests that plants may coordinate assembly of both structures through shared machinery. This study provides clues to the possible functional links between the spindle and phragmoplaste assembly checkpoints, ensuring failsafe mitosis.

Materials and Methods

Plant materials, growth conditions, and nematode infection

Arabidopsis Wt ecotypes (and T-DNA insertion lines were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (GABI_084G06 in Columbia Col0 background ecotype) and the INRA Institute in Versailles, France (DQH17 and EII34 in Wassilewskija WS background ecotype). ProBUBR1, ProMAD2 and ProBUB3.1:GFP:GUS lines were previously generated (Caillaud et al., 2009). For *in vitro* analyses, seeds were surface sterilized and grown on MS medium containing 1% sucrose, 0.7% plant cell culture tested agar (Sigma, St. Louis, MO, USA), and 50 µg/mL of kanamycin. Plates were inclined at an angle of 60° to allow the roots to grow along the surface. Kanamycin resistance was scored in 2-week-old seedlings. For nematode infection *in vitro*, 100 surface-sterilized freshly hatched *M. incognita* J2 were added on each 2-week-old seedling. The plates were kept at 20°C with a 16-h photoperiod. All observations were obtained from three independent experiments. *N. benthamiana* plants were grown under continuous light for 1 month at 26°C. Infiltration of *Agrobacterium tumefaciens* into tobacco leaves was as described (Caillaud et al., 2009) and plants were analysed two days after infiltration. For drug treatment, oryzalin (Sigma) was used at final concentration of 150 nM. Homozygous mutants were crossed with *Pro_{35S}:MBD:GFP* or *Pro_{35S}:H2B:YFP* *Arabidopsis* plants. Plants expressing the two constructs were obtained and used for microscopy analysis.

Gene and promoter cloning and RT-qPCR analysis.

A. thaliana proteins orthologous to human BUB1 were identified by BLASTP analysis. Interpro scans (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) were used to study domain organisation. The *A. thaliana* BUB1.2 and BRK1 coding sequences were amplified by PCR, using specific primers

Gene (AGI)	Primer name	Primer sequence (5'-3')	Use
AtBUB3.1 (At3g19590)	AT3G19590_QPCR_R	TTTAAACTGGAATTTGTCATC	qRT-PCR
	AT3G19590_QPCR_L	CGGCGTAGAAAGGAAGAAAC	qRT-PCR
AtBUBR1 (At2g33560)	At2g33560_I3R	CCGCCTTCAAAACACACACA	genotyping
	At2g33560_E1_ATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACCATG</u> GCCAGCCGAAACGAAGGT	genotyping/cloning
	At2g33560_QPCR_R	TGAAAGGCACATCATGGTACA	qRT-PCR
	At2g33560_QPCR_L	AGACATTTCCACCCAACAG	qRT-PCR
AtMAD2 (At3g25980)	At3g25980_QPCR_R	ATGGACTTCGATGTTGCTT	qRT-PCR
	At3g25980_QPCR_L	CGAAAATTCACCTCTCCAA	qRT-PCR
AtBUB1.2 (At5g05510)	At5g05510_E1	<u>AAAAAGCAGGCTTCACCATG</u> GCGAAGAACGAGAACGGCT	genotyping/gene cloning
	At5g05510_E1_noATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCGCGAAGAACGAGAACGGCT</u>	gene cloning
	At5g05510_E11R_STOP	<u>AGAAAGCTGGGTGTTA</u> GAAAGTCCATTGGCATTGCA	gene cloning
	At5g05510_E11R_noSTOP	<u>AGAAAGCTGGGTGGA</u> AGTCCATTGGCATTGCA	gene cloning
	At5g05510_P5GW	<u>AAAAAGCAGGCTTCTCTA</u> ATTCTTCTCGCCAAGACC	promoter cloning
	At5g05510_P3GW	<u>AGAAAGCTGGGTGTTTT</u> ACTTCGCGAATTGAAGA	promoter cloning
	At5g05510_QPCR_R	TTGGTGGATCCACAATAAA	qRT-PCR
	At5g05510_QPCR_L	CCACTTGTCCCTGTTTCACA	qRT-PCR/genotyping
AtBRK1 (At2g20635)	At2g20635_E1_noATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACA</u> ATCGGTTACAGAGACG	gene cloning
	At2g20635_E1_ATG	<u>AAAAAGCAGGCTTCACCATG</u> ACAATCGGTTACAGAGACG	gene cloning
	At2g20635_E14R_STOP	<u>AGAAAGCTGGGTGTTA</u> CGAAGAGCATAACGAGATG	gene cloning/genotyping
	At2g20635_E14R_noSTOP	<u>AGAAAGCTGGGTGCGA</u> AGAGCATAACGAGATG	gene cloning
	At2g20635_P5GW	<u>AAAAAGCAGGCTTCTCT</u> CTAGAAGAATCAATATCATCG	promoter cloning
	At2g20635_P3GW	<u>AGAAAGCTGGGTGTTTT</u> CGAGCCGTAGGAAGAGAG	promoter cloning
	At2g20635_I10	CCGCTCCAATATTGCTGATTAG	genotyping

Primers used to clone MAD2, BUB3.1 and BUBR1 promoters and genes were previously described (Caillaud et al., 2009).

Figure S8. Specific primers used in this study.

(Fig S8), inserted into the pDON207 donor vector and then into the pK7FWG2, PK7GWF2 plant expression vector and BiFC vectors (pAM-35SS-GWY-YFPc and pAM-35SS-GWY-YFPn), using Gateway Technology (Invitrogen). For the promoter:GUS fusion, fragments of the 1kb immediately upstream from the start codon, were amplified by PCR, inserted into the pDON207 donor vector and then into the pKGWFS7 plant vector. For the expression of GFP fusion under the control of AtMAP65-3 promoter, the *Pro*_{35S} *Hind*III / *Spe*I fragment of the pK7WGF2 and pK7FWG2 vectors (Karimi et al., 2002) was replaced by *Pro*_{MAP65-3} as described (Caillaud et al., 2008). For RT-qPCR, total RNAs of non-meristematic roots and galls of *A. thaliana* cv. WS dissected at various time points after nematode inoculation (7, 14, 21 DAI) were extracted. RT-qPCR analyses were performed according to the procedure previously described (Jammes et al., 2005) in the Opticon 2 system (MJ research, Bio-Rad). At5g10790 (*UBP22*) and At5g62050 (*OXA1*) were used for normalization of qRT-PCR data. The primer list is given in Fig S8. Three independent quantitative RT-PCR reactions were carried out per sample and three biological replicates were performed.

Histochemical localisation of GUS activity and microscopic analyses

Wild-type (WS ecotype) *A. thaliana* plants were stably transformed and GUS activity was assayed histochemically, as previously described (Caillaud et al., 2008), on at least five independent transformed plants for each construct. Galls, root apex, and shoot apical meristems were dissected from GUS-stained plants, fixed in 1% glutaraldehyde and 4% formaldehyde in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2, dehydrated, and embedded in Technovit 7100 (Heraeus Kulzer, Wehrheim, Germany) as described by the manufacturer. Sections (4 µm) were stained with 0.05% ruthenium red or toluidine blue and mounted in DPX (BDH Laboratory Supplies, VWR International, Fontenay-sous-Bois, France). Samples were observed with a Zeiss Axioplan 2 microscope (Jena, Germany) and images analysed

with AxioVision 4.7 (Zeiss). Optical sections of tobacco leaf epidermal cells or tobacco cell cultures were observed with a $\times 63$ water immersion apochromatic objective (numerical aperture 1.2, Zeiss) fitted to an inverted confocal microscope (model LSM510; Zeiss) at 25°C. Fluorescent dye FM4-64 (Molecular probes) was used at 1 μ M final concentration. GFP, YFP and FM4-64 fluorescence were monitored in Channel mode with a BP 505-530, 488 beam splitters and LP 530 filters for GFP. For drug treatment, digital images were acquired with an AxioCam HRc camera (Zeiss) and analysed using LSM Image Browser (Zeiss). To visualize GFP fusions in nematode feeding site, galls of 7 dpi were excised and embedded in agar 7%. Vibroslices of 100 μ m - for galls 7 dpi were obtained using a vibratome HM560V (Microm).

Yeast two-hybrid split-ubiquitin assay

The split-ubiquitin assay was carried out in *S. cerevisiae* strain JD53, as previously described [35]. The *BUBR1*, *BUB3.1*, *MAD2*, *BUB1.2* and *BRK1* coding sequences were inserted into the GW:Cub:URA3 bait vector (pMKZ) and the NuI:GW prey vector, using the Gateway system. Standard procedures were used for yeast growth and transformation. Transformants were selected on 5-fluoroorotic acid (5-FOA) plates containing minimal medium with yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and glucose, supplemented with lysine, leucine, uracil (M-HT), and 1 mg/ml 5-FOA.

Acknowledgments

We thank Marylin Vantard (iRTSV, Grenoble, France), Anne-Catherine Schmit and Marie-Edith Chabouté (IBMP, Strasbourg, France), Ariane Abrieu and Anna Castro (CRBM, Montpellier, France), Paulo Vieira for fruitful discussions. We thank Richard Cyr (Pennsylvania State University, USA) for the generous gift of *Pro35S:MBD:GFP* seeds and Frédéric Berger (Temasek LifeSciences Laboratory, Singapore) for *Pro35S:H2B:YFP* seeds,

Catherine Mura for growing tobacco plants, Mansour Karimi (VIB Ghent, Belgium) for the plant Gateway vectors, Imre E. Somssich (Max-Planck Institut, Köln, Germany) for the split-ubiquitin system.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LP MCC MQ ID PL PK PA BF. Performed the experiments: LP MCC BG MQ ID PL. Analyzed the data: LP MCC MQ PK PA BF. Wrote the paper: LP BF.

References

Abad, P., Rosso, M.-N., Castagnone-Sereno, P., de Almeida-Engler, J., and Favery, B. (2009). Invasion, feeding and development. In *Root-knot Nematodes*, (King's Lynn, UK: Roland N. Perry, Maurice Moens and James Starr), pp. 163–181.

De Almeida Engler, J., and Gheysen, G. (2013). Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? *Mol. Plant-Microbe Interactions Mpmi* 26, 17–24.

De Almeida Engler, J., Kyndt, T., Vieira, P., Van Cappelle, E., Boudolf, V., Sanchez, V., Escobar, C., De Veylder, L., Engler, G., Abad, P., et al. (2012). CCS52 and DEL1 genes are key components of the endocycle in nematode-induced feeding sites. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 72, 185–198.

Bernard, P., Hardwick, K., and Javerzat, J.P. (1998). Fission yeast bub1 is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis. *J. Cell Biol.* 143, 1775–1787.

Bolanos-Garcia, V.M., Kiyomitsu, T., D'Arcy, S., Chirgadze, D.Y., Grossmann, J.G., Matak-Vinkovic, D., Venkitaraman, A.R., Yanagida, M., Robinson, C.V., and Blundell, T.L. (2009). The Crystal Structure of the N-Terminal Region of BUB1 Provides Insight into the Mechanism of BUB1 Recruitment to Kinetochores. *Structure* 17, 105–116.

Buffin, E., Emre, D., and Karess, R.E. (2007). Flies without a spindle checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 9, 565–572.

Burgos-Rivera, B., and Dawe, R.K. (2012). An Arabidopsis tissue-specific RNAi method for studying genes essential to mitosis. *Plos One* 7, e51388.

Caillaud, M.-C., Lecomte, P., Jammes, F., Quentin, M., Pagnotta, S., Andrio, E., de Almeida Engler, J., Marfaing, N., Gounon, P., Abad, P., et al. (2008). MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 20, 423–437.

- 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.
- Chen, R.-H. (2002). BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J. Cell Biol.* *158*, 487–496.
- Chen, R.H., Waters, J.C., Salmon, E.D., and Murray, A.W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component XMAD2 with unattached kinetochores. *Science* *274*, 242–246.
- Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* *112*, 407–421.
- Daniel, J.A., Keyes, B.E., Ng, Y.P.Y., Freeman, C.O., and Burke, D.J. (2006). Diverse Functions of Spindle Assembly Checkpoint Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *172*, 53–65.
- 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 Mol. Biol.* *79*, 203–216.
- Favery, B., Complainville, A., Vinardell, J.M., Lecomte, P., Vaubert, D., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E., Crespi, M., and Abad, P. (2002). The endosymbiosis-induced genes ENOD40 and CCS52a are involved in endoparasitic-nematode interactions in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interactions Mpmi* *15*, 1008–1013.
- Gheysen, G., and Fenoll, C. (2002). Gene expression in nematode feeding sites. *Annu. Rev. Phytopathol.* *40*, 191–219.
- Goshima, G., Nédélec, F., and Vale, R.D. (2005). Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J. Cell Biol.* *171*, 229–240.
- Houben, A., and Schubert, I. (2003). DNA and proteins of plant centromeres. *Curr. Opin. Plant Biol.* *6*, 554–560.
- Howell, B.J., Hoffman, D.B., Fang, G., Murray, A.W., and Salmon, E.D. (2000). Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *J. Cell Biol.* *150*, 1233–1250.
- Howell, B.J., Moree, B., Farrar, E.M., Stewart, S., Fang, G., and Salmon, E.D. (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr. Biol. Cb* *14*, 953–964.
- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* *66*, 507–517.
- Hu, C.-D., Grinberg, A.V., and Kerppola, T.K. (2001). Visualization of Protein Interactions in Living Cells Using Bimolecular Fluorescence Complementation (BiFC) Analysis. In *Current Protocols in Protein Science*, (John Wiley & Sons, Inc.),.

- Jammes, F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M.-L., Renou, J.P., Abad, P., and Favery, B. (2005). Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *44*, 447–458.
- Jones, M.G.K., and Payne, H.L. (1978). Early Stages of Nematode-induced Giant-cell Formation in Roots of *Impatiens balsamina*. *J. Nematol.* *10*, 70–84.
- Kapoor, T.M., Mayer, T.U., Coughlin, M.L., and Mitchison, T.J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* *150*, 975–988.
- Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAYTM vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* *7*, 193–195.
- Karpov, P.A., Raevskii, A.V., and Blium, I.B. (2010). [Bioinformatic search for plant homologs of protein kinase BUB1--the keypoint of mitotic spindle assembly]. *Тsitologiiĭa Genet.* *44*, 57–69.
- Kerscher, O., Crotti, L.B., and Basrai, M.A. (2003). Recognizing chromosomes in trouble: association of the spindle checkpoint protein Bub3p with altered kinetochores and a unique defective centromere. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6406–6418.
- Khodjakov, A., and Rieder, C.L. (2009). The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J. Biol.* *8*, 88.
- Kimbara, J., Endo, T.R., and Nasuda, S. (2004). Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* *12*, 703–714.
- Kiyomitsu, T., Obuse, C., and Yanagida, M. (2007). Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev. Cell* *13*, 663–676.
- Kurasawa, Y., Earnshaw, W.C., Mochizuki, Y., Dohmae, N., and Todokoro, K. (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *Embo J.* *23*, 3237–3248.
- Lampson, M.A., and Kapoor, T.M. (2005). The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat. Cell Biol.* *7*, 93–98.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., et al. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 397.
- Lermontova, I., Fuchs, J., and Schubert, I. (2008). The *Arabidopsis* checkpoint protein Bub3.1 is essential for gametophyte development. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *13*, 5202–5211.
- Lermontova, I., Rutten, T., and Schubert, I. (2011). Deposition, turnover, and release of CENH3 at *Arabidopsis* centromeres. *Chromosoma* *120*, 633–640.

Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* 66, 519–531.

Maiato, H., Sampaio, P., Lemos, C.L., Findlay, J., Carmena, M., Earnshaw, W.C., and Sunkel, C.E. (2002). MAST/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity. *J. Cell Biol.* 157, 749–760.

Menges, M., De Jager, S.M., Gruissem, W., and Murray, J.A.H. (2005). Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* 41, 546–566.

Meraldi, P., Draviam, V.M., and Sorger, P.K. (2004). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev. Cell* 7, 45–60.

Müller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P.J., and Hauser, M.-T. (2004). The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr. Biol. Cb* 14, 412–417.

Musacchio, A. (2011). Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 366, 3595–3604.

Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 379–393.

Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 427–438.

Rahmani, Z., Gagou, M.E., Lefebvre, C., Emre, D., and Karess, R.E. (2009). Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J. Cell Biol.* 187, 597–605.

Rieder, C.L., and Maiato, H. (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* 7, 637–651.

Sczaniecka, M., Feoktistova, A., May, K.M., Chen, J.-S., Blyth, J., Gould, K.L., and Hardwick, K.G. (2008). The spindle checkpoint functions of Mad3 and Mad2 depend on a Mad3 KEN box-mediated interaction with Cdc20-anaphase-promoting complex (APC/C). *J. Biol. Chem.* 283, 23039–23047.

Shannon, K.B., Canman, J.C., and Salmon, E.D. (2002). Mad2 and BubR1 function in a single checkpoint pathway that responds to a loss of tension. *Mol. Biol. Cell* 13, 3706–3719.

Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* 154, 925–936.

Suijkerbuijk, S.J.E., van Dam, T.J.P., Karagöz, G.E., von Castelmur, E., Hubner, N.C., Duarte, A.M.S., Vleugel, M., Perrakis, A., Rüdiger, S.G.D., Snel, B., et al. (2012). The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase. *Dev. Cell* 22, 1321–1329.

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. *Plant Cell* *14*, 1053–1066.

Taylor, S.S., Ha, E., and McKeon, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J. Cell Biol.* *142*, 1–11.

Wang, M., Tang, D., Luo, Q., Jin, Y., Shen, Y., Wang, K., and Cheng, Z. (2012). BRK1, a Bub1-Related Kinase, Is Essential for Generating Proper Tension between Homologous Kinetochores at Metaphase I of Rice Meiosis. *Plant Cell*.

Wasteney, G. (2002). MT organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J Cell Sci* *1345–1354*.

Wei, Y., Multi, S., Yang, C.-R., Ma, J., Zhang, Q.-H., Wang, Z.-B., Li, M., Wei, L., Ge, Z.-J., Zhang, C.-H., et al. (2011). Spindle assembly checkpoint regulates mitotic cell cycle progression during preimplantation embryo development. *Plos One* *6*, e21557.

Wiggers, R.J., Starr, J.L., and Price, H.J. (1990). DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology* *80*, 1391–1395.

Yu, H.G., Muszynski, M.G., and Kelly Dawe, R. (1999). The maize homologue of the cell cycle checkpoint protein MAD2 reveals kinetochore substructure and contrasting mitotic and meiotic localization patterns. *J. Cell Biol.* *145*, 425–435.

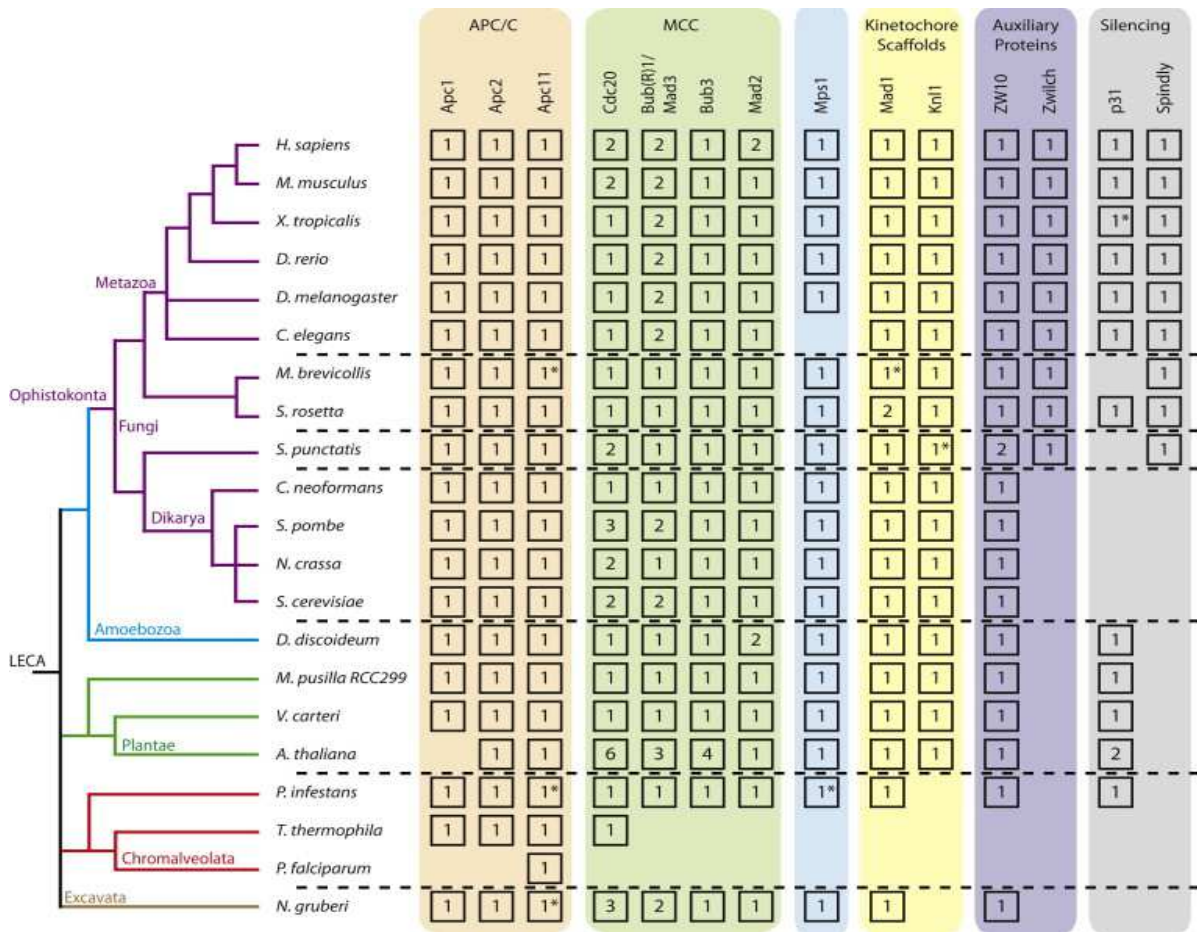


Figure 30: Identification des composants du SAC à travers l'évolution.

Représentation schématique d'un arbre phylogénétique d'espèces appartenant aux cinq phyla d'eucaryotes. Les gènes sont regroupés par catégories fonctionnelles (MCC, MPS1, Échafaudage du kinétochore, Protéines Auxiliaires, Protéines de répression et Sous-unités composantes de l'APC/C) (* représente des homologues identifiés à partir de gènes non annotés). (Vleugel et al., 2012)

DISCUSSION

Le Point de Surveillance de la Mitose ou « Spindle Checkpoint Assembly » (SAC) est un mécanisme moléculaire clef assurant la protection des cellules eucaryotes. Au cours de la mitose, la ségrégation correcte des chromosomes nécessite un attachement bipolaire des chromatides au fuseau mitotique. Le rôle du SAC est d'empêcher une mauvaise ségrégation des chromosomes qui pourrait conduire à des instabilités chromosomiques et des aneuploïdies conduisant très souvent à un processus apoptotique. Pour cela, le point de contrôle du fuseau mitotique inhibe la séparation des chromatides sœurs tant que tous les chromosomes ne sont pas correctement attachés au fuseau mitotique. Il retarde la transition irréversible métaphase/anaphase en produisant un signal inhibiteur de l'activité du complexe APC/C.

L'effecteur du SAC est le « Mitotic Checkpoint Complex » qui comprend au sens strict les protéines BUB3, BUBR1 et MAD2 (de par leurs liaisons directes avec CDC20) auxquelles on associe souvent MAD1 et les protéines kinases BUB1 et MPS1 (Monopolar Spindle 1) (Musacchio and Salmon, 2007). Lorsque j'ai commencé ma thèse, très peu d'études avaient été réalisées sur ces protéines. Seule la protéine MAD2, caractérisée pour sa localisation subcellulaire chez le maïs et le blé (Kimbara et al., 2004; Yu et al., 1999) et CDC20 chez la carotte (Luo et al., 1997) avait été identifiées. En parallèle, l'APC/C avait aussi été caractérisé chez *Arabidopsis* (Capron et al., 2003; Eloy et al., 2006). Mes objectifs de thèse étaient donc de caractériser les protéines BUB3, BUBR1, BUB1 et MAD2 chez *Arabidopsis* au cours du développement de la plante et lors de l'interaction avec le nématode. La plupart des composants du SAC sont présents chez toutes les espèces eucaryotes (Figure 30) et sont assez bien conservés (Vleugel et al., 2012). Parmi les organismes étudiés, il est intéressant de noter que c'est chez *Arabidopsis* que l'on retrouve le plus d'évènements de duplication des membres du MCC: on retrouve ainsi 6 copies du gène *CDC20*, 3 gènes *BUB(R)1/MAD3*, 4 gènes *BUB3* et un *MAD2*.

* *Confirmation de l'appartenance des homologues à un même complexe.*

Nous avons dans un premier temps montré l'interaction entre BUB3.1 et MAP65.3 et validé la spécificité de cette interaction. En effet, BUB3.1 a été testé pour son interaction avec d'autres protéines MAP65 associées au fuseau mitotique (-1, -4, -5 et -8). Dans nos conditions, BUB3-1 n'a montré aucune interaction avec d'autres MAP65. Nous aurions attendu une interaction avec MAP65-4,

seule protéine végétale montrée comme localisant sur les fibres kinétochoriennes (Fache et al., 2010). Chez *S. cerevisiae*, Ase1p (homologue de la famille des MAP65) interagit avec BUB3 et MAD2 (Daniel et al., 2006). De plus, chez l'humain, PRC1 interagit avec CENP-E, kinésine partenaire de BUBR1 (Kurasawa et al., 2004).

La technique de double hybride en levure a également validé l'interaction entre tous les membres du complexe ainsi qu'avec MAP65-3. Ces interactions ont en parallèle été étudiées *in planta*, dans des cellules épidermiques de tabac avec la technique de « Bimolecular Fluorescence Complementation ». Cette stratégie nous a permis, en plus de valider l'interaction entre toutes les protéines, de visualiser la potentielle localisation de l'interaction, même si cette localisation reste discutable car les cellules épidermiques sont en interphase. Une seule protéine, BRK1, n'a montré d'interaction avec aucune autre protéine. Nous avons en parallèle étudié la localisation subcellulaire des protéines fusionnées à la GFP, surexprimées seules, en cellules épidermiques de tabac. BUB3.1, BUB1.2, BRK1 et MAD2, lorsqu'elles sont surexprimées dans ces cellules en interphase ne présentent pas de localisation particulière: elles sont nucléaires et cytoplasmiques. Seule BUBR1 se localise uniquement dans les noyaux. La plupart des interactions validées a donc été validée dans les noyaux et cytoplasmes, néanmoins certaines présentent des profils beaucoup plus intéressants. Ainsi, BUBR1 (localisée dans le noyau lorsqu'exprimée seule) interagit avec MAD2 (nucléaire et cytoplasmique) et avec BUB1.2 (nucléaire et cytoplasmique) uniquement au niveau des chromocentres, région sur laquelle viennent s'associer les protéines du kinétochore lors de la mitose. Cette localisation a été validée par un comarquage avec HTR12, le variant de l'histone centromérique CENH3 chez *Arabidopsis* (Lermontova et al., 2011a; Talbert et al., 2002). Cette localisation est inattendue, sachant qu'en interphase, les centromères ne présentent pas de structure kinétochorienne et donc de plateforme de recrutement des protéines du SAC (Santaguida and Musacchio, 2009). La localisation de BRK1 est surprenante également : alors que lorsqu'elle est surexprimée dans des plantes d'*Arabidopsis*, cette protéine est toujours localisée sur les centromères (même en interphase), sa surexpression en cellules de tabac n'indique aucun profil centromérique, suggérant une composition différente de l'ADN centromérique et/ou des histones entre *Arabidopsis* et le tabac, empêchant ainsi son recrutement. Les interactions des membres du complexe avec MAP65.3 ont aussi été validées et se localisent le long des microtubules corticaux. Cette localisation correspond à celle observée pour MAP65.3 lorsque cette protéine est surexprimée dans des cellules interphasiques. Cette protéine n'est cependant détectée uniquement dans les cellules en division *in planta* (Caillaud et al., 2009).

L'interaction entre toutes les protéines étudiées est en accord avec la littérature. En effet, de la levure à l'humain toutes les protéines interagissent entre elles (Fraschini et al., 2001; Millband and Hardwick, 2002; Sudakin et al., 2001; Taylor et al., 1998). Chez les animaux, la plupart des interactions sont validées par coimmunoprécipitation ou par « tandem affinity purification » et le lieu de l'interaction est souvent extrapolé à partir des colocalisations de protéines ou de non-

recrutement/perte de localisation d'une protéine suite à l'inactivation d'une autre (discuté dans l'introduction bibliographique). En fonction des organismes étudiés, le recrutement au kinétochore et la hiérarchisation des protéines varie (Chen, 2002; Heinrich et al., 2012; Johnson et al., 2004; Vigneron et al., 2004). Quoiqu'il en soit, le kinétochore reste le lieu majeur de l'assemblage des sous-complexes du MCC. Ce travail valide l'interaction entre ces composants pour la première fois *in planta*. Seules les interactions MAP65.3-BUB3.1 et AtMAD2-AtMAD1 ont également été validées *in planta* (Ding et al., 2012a; Van Leene et al., 2010).

* *Les homologues du SAC sont exprimés au cours de la mitose.*

Une analyse transcriptomique globale sur des cultures cellulaires synchronisées d'*Arabidopsis* a montré que *BUB3.1*, *BUBR1* et *MAD2* étaient régulés au cours du cycle cellulaire et qu'ils présentaient une induction lors de la transition G2/M (Menges et al., 2005). L'analyse des profils d'expression des gènes sur des plantes présentant les fusions promoteur-GUS a permis de montrer que *BUB3.1*, *BUBR1*, *BUB1.2* et *MAD2* présentaient le même profil d'expression spatio-temporel que *MAP65-3*. Ainsi, au cours du développement de la plante, ces gènes sont exprimés dans les tissus enrichis en cellules en division. *BRK1* présente également une induction dans les tissus riches en cellules en division mais seulement dans les parties aériennes. L'expression de ces gènes lors de l'interaction plantes-nématodes a été également étudiée et montre que *BUB3.1*, *BUBR1*, *BUB1.2*, et *MAD2* sont exprimés dans les galles en formation et l'analyse histologique précise cette expression dans les cellules géantes en formation ainsi que dans les cellules avoisinantes en cours de division. *BRK1* ne présente pas d'induction particulière dans les galles en formation que ce soit dans les cellules géantes ou les cellules avoisinantes.

* *Localisation subcellulaire non attendue des protéines du SAC.*

Nous avons dans un premier temps analysé la localisation subcellulaire des protéines dans des cultures de cellules de tabac (BY-2) synchronisées. Lors d'une mitose normale, les protéines BUB3.1, BUBR1 et MAD2 présentent une localisation cytoplasmique diffuse, sans aucun profil spécifique. Cependant, dans une autre étude, Ding et al. (2012) utilisent des cellules BY-2 de tabac, et montre AtMAD2 associée aux kinétochores dès la prophase et jusqu'en fin de prométaphase lors d'une mitose normale. En métaphase, lorsque les chromosomes sont parfaitement alignés sur la plaque métaphasique, AtMAD2 disparaît alors des kinétochores et présente une localisation cytoplasmique diffuse (Ding et al., 2012). Néanmoins, nous avons montré que lorsque des défauts d'attachement des microtubules au fuseau mitotique sont provoqués par l'ajout de drogues déstabilisant les microtubules (le propyzamide), BUB3.1, BUBR1 et MAD2 se relocalisent spécifiquement au niveau des kinétochores. Cette relocalisation lors de défauts d'attachements des microtubules aux kinétochores suggère ainsi un rôle conservé du SAC chez *Arabidopsis*. L'initiation de l'anaphase requiert l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome 26S des substrats de l'APC/C (la sécurine et la

CDK1). Nous avons également retardé l'initiation de l'anaphase par ajout d'un inhibiteur du protéasome 26S, le MG132, efficace chez les mammifères et dans les cultures cellulaires de plantes. Cet inhibiteur permet de préserver les fuseaux mitotiques en métaphase et l'attachement kinétochore/microtubule (Genschik et al., 1998). Les cellules traitées avec cet inhibiteur sont observées en métaphase, les chromosomes condensés, alignés sur la plaque métaphasique, attachés de part et d'autre par le fuseau mitotique. De façon surprenante, nous avons montré que BUB3.1, BUBR1 et MAD2 se relocalisent sur les kinétochores dans ce cas, et progressivement, les protéines diffusent des kinétochores, pour s'associer le long des fibres kinétochoriennes (Caillaud et al., 2009). Ce profil le long des fibres kinétochoriennes n'est pas observé chez les animaux, bien qu'il soit démontré que ces protéines soient relarguées des kinétochores par le mécanisme de « stripping » (Shah et al., 2004). Ce mécanisme propose un décrochage du sous complexe MAD1-C-MAD2 des kinétochores et le transport vers les pôles, le long des fibres kinétochoriennes *via* la protéine motrice dynéine, médié par la protéine Spindly et le complexe RZZ. Il a été mis en évidence, qu'en plus de MAD2, la dynéine transporte BUBR1 et MPS1 (Howell et al., 2001; Wojcik et al., 2001). Les protéines ne sont jamais observées le long des fibres-k mais retrouvées associées aux pôles du fuseau en anaphase (Howell et al., 2000, 2004).

Afin d'observer la localisation subcellulaire de ces protéines *in planta* chez *Arabidopsis*, des plantes ont été transformées avec l'ADNc du gène fusionné à un fluorochrome sous le contrôle de son propre promoteur. L'expression n'étant pas détectable dans la plupart des cas, nous avons réalisé des constructions soit en surexprimant l'ADNc (promoteur constitutif fort 35S) soit en utilisant le promoteur de *MAP65-3* (présentant un profil d'expression spatio-temporel identique à celui des gènes à un seuil détectable). Dans les cellules méristématiques de racines d'*Arabidopsis*, lors de la phase G2 (juste avant l'entrée en mitose), BUBR1 présente une localisation nucléaire, BUB1.2 et MAD2 sont nucléaires et cytoplasmiques et BRK1 se localise fortement au niveau des centromères et présente une faible expression de la GFP dans le cytoplasme. L'étude plus précise de la dynamique de la localisation de ces protéines au cours de la mitose a été étudiée. Lors de d'une mitose normale, toutes les protéines présentent une localisation cytoplasmique et ne semblent pas se relocaliser spécifiquement au niveau des kinétochores. De plus, BUB3.1 et BUBR1 présentent une localisation dominante au niveau des fuseaux mitotiques, suggérant une association avec les fibres kinétochoriennes, comme il a été observé dans les cellules BY-2. Et de façon très intéressante, BUB3.1 présente une localisation supplémentaire lors de la cytokinèse, au niveau du centre du phragmoplaste en expansion (comme *MAP65-3*) (Caillaud et al., 2009).

Chez *Arabidopsis*, une étude rapporte le même profil de localisation subcellulaire de MAD2 lors de l'interphase : AtMAD2 présente une localisation diffuse dans le cytoplasme et apparaît plus concentrée dans le nucléoplasme des noyaux. Cette localisation a été précisée grâce à une

immunolocalisation (avec des anticorps dirigés contre HsMAD2): lors de l'interphase, MAD2 serait enrichie au niveau de l'enveloppe nucléaire (Ding et al., 2012). En effet, lors de l'interphase, MAD2 est exprimée et associée *via* MAD1 à une nucléoporine NUA, présente sur l'enveloppe nucléaire. Il est intéressant de noter que les auteurs n'ont pu visualiser la localisation de MAD2 sur l'enveloppe nucléaire qu'en immunolocalisation et non avec la surexpression de la protéine fusionnée à la GFP : le fort signal diffus de MAD2 masquerait son signal spécifique sur l'enveloppe nucléaire et les techniques de lavage d'immunolocalisation la révélerait (Ding et al., 2012). Dans cette étude, les auteurs n'ont également pas observé de relocalisation spécifique sur les kinétochores de MAD2 lors de la mitose. Ces résultats pourraient être corrélés à ceux obtenus chez une autre espèce végétale. En effet chez le blé, MAD2, cytoplasmique en interphase, se reconcentre dans les noyaux en prophase mais ne présente pas de localisation kinétochorienne en prophase et prométaphase lors d'une mitose normale (Kimbara et al., 2004). Cette absence de localisation kinétochorienne de MAD2 est assez surprenante. En effet, lors de l'étude des interactions des protéines *in planta* (BiFc), l'interaction MAD2-BUBR1 avait lieu spécifiquement au niveau des centromères indiquant donc une capacité d'interaction au niveau des kinétochores, de plus dans des cellules épidermiques « en interphase » (Caillaud et al., 2009). Chez le maïs, MAD2 est retrouvée associée aux kinétochores dans les cellules mitotiques et méiotiques (Yu et al., 1999). Chez le maïs, lors d'une mitose normale, MAD2 se concentre au niveau des kinétochores en prométaphase et disparaît des chromosomes métaphasiques bi-orientés, en corrélation avec leur attachement aux fibres kinétochoriennes. Cette localisation de protéine « senseur de l'attachement kinétochores/microtubule » est en accord avec ce qui a été précédemment observé chez les autres organismes modèles: la levure (Ikui et al., 2002), le xénope (Chen et al., 1996) et les mammifères (Howell et al., 2000; Li and Benezra, 1996; Wei et al., 2011). Par contre, toujours chez le maïs, lors de la méiose (contrairement aux cellules mitotiques), la disparition de MAD2 des kinétochores est plutôt corrélée à la distance entre les kinétochores, laissant supposer un rôle supplémentaire en tant que senseur de la tension intra-kinétochorienne (Yu et al., 1999). Ce rôle de MAD2 sensible à la tension a été reporté dans d'autres modèles tel que le xénope (Kapoor et al., 2000) et dans des cellules PtK (Shannon et al., 2002), laissant supposer diverses fonctions de cette protéine selon les organismes étudiés. Ces résultats diffèrent de ceux observés au laboratoire : en effet, nous n'avons jamais visualisé cette relocalisation aux kinétochores lors d'une mitose normale que ce soit dans des cellules BY-2 de tabac (Caillaud et al., 2009) ou dans des plantes d'*Arabidopsis* : MAD2 présente un signal cytoplasmique diffus pendant toutes les étapes de la mitose. Néanmoins, dans notre étude en cellules BY-2, MAD2 se relocalise aux kinétochores lors de défauts de fuseau mitotique ou lors d'un arrêt prolongé en métaphase prouvant ainsi que le motif permettant la localisation aux kinétochores est fonctionnel (Caillaud et al., 2009).

Chez le riz *Oryza sativa*, OsBRK1 est localisé aux kinétochores dès l'interphase, et lors de la mitose et la méiose (Wang et al., 2012a). Le pool de BUB1 associé aux kinétochores ne semble pas

être relargué suite à l'attachement kinétochore/MT. Ces résultats corréleront nos observations d'AtBRK1. Cette localisation centromérique de la protéine BUB1 est largement conservée chez les eucaryotes, avec seulement des différences temporelles. Chez les mammifères, lors de la mitose, BUB1 se localise aux kinétochores lors des étapes précoces de la prophase (Howell et al., 2004). Suite à l'attachement des MT aux kinétochores, il s'ensuit une diminution du pool de BUB1 kinétochorien (Taylor et al., 2001). Cette distribution spatio-temporelle a également été observée chez la souris (Taylor and McKeon, 1997). Chez le xénope en revanche, il est très difficile d'observer la protéine BUB1 lors de l'anaphase, indiquant ainsi que BUB1 serait relarguée des kinétochores dès l'inactivation du SAC (Sharp-Baker and Chen, 2001). Chez la levure à fission *S. pombe*, la dissociation des kinétochores de BUB1 est différée comparée aux autres eucaryotes (Bernard et al., 1998). Lors de l'entrée en mitose, SpBUB1 est recrutée aux kinétochores et y reste jusqu'à la télophase. Il a été proposé que cette localisation kinétochorienne de SpBUB1 en anaphase soit due au fait de la fonction non essentielle, uniquement structurale de BUB1 aux kinétochores (Bernard et al., 1998). De plus, SpBUB1 est associée aux kinétochores pendant tout le processus méiotique, de la prophase I jusqu'en anaphase II (Bernard et al., 2001). Les localisations d'OsBRK1 et d'AtBRK1 aux kinétochores présenteraient ainsi une distribution spatio-temporelle similaire à celle de la levure à fission. Il est intéressant de noter qu'AtBRK1 (tout comme OsBRK1) ne possède pas de motifs « KEN Box » conservés, comme chez la levure à fission. Les motifs KEN Box sont requis pour la reconnaissance spécifique des substrats des activateurs de l'APC/C, i.e. CDC20 et CDH1 (Pfleger and Kirschner, 2000). De plus ces motifs KEN Box ont été montrés comme favorisant la propre dégradation de BUB1 par l'APC/C^{CDH1} pendant la sortie de mitose chez l'humain (Qi and Yu, 2007). Il existe aussi 2 KEN Box sur la protéine BUB1 de la souris, et seulement une chez le xénope et la levure à bourgeonnement. Chez ces organismes, BUB1 se dissocient des kinétochores en métaphase et disparaît en anaphase. La persistance des protéines BUB1 d'Arabidopsis, du riz et de la levure à fission en anaphase, serait ainsi corrélée à l'absence de motif KEN Box (Wang et al., 2012a). Cependant, l'autre protéine d'Arabidopsis la plus proche de BUB1, AtBRK2 ne présente aucune localisation spécifique, bien qu'elle interagisse au niveau des centromères avec BUBR1 dans des cellules interphasiques de tabac. AtBRK2 ne présentent pas non plus de domaine « KEN Box », ni de kinase.

Chez les animaux, de façon similaire à BUB1, BUBR1 est associé dès la prophase aux kinétochores (Chan et al., 1998; Jablonski et al., 1998; Taylor et al., 1998). Lors de la métaphase lorsque les chromosomes sont bi-orientés, l'intensité de BUBR1 diminue jusqu'à devenir indétectable en anaphase. Il semblerait cependant que contrairement à la localisation kinétochorienne de BUB1 activée par une absence d'attachement des MT et de tension, BUBR1 serait plutôt recrutée lors d'un manque de tension (Taylor et al., 2001). Quoiqu'il en soit, chez tous les eucaryotes, BUBR1 est localisé sur les kinétochores au cours de la mitose (Millband and Hardwick, 2002; Taylor et al., 1998).

Chez *Arabidopsis*, BUBR1 ne présente pas de profil centromérique mais pourrait être potentiellement le candidat idéal pour un recrutement kinétochorien: en effet, dans des cellules épidermiques de tabac, il est la protéine qui interagit spécifiquement au niveau des centromères avec MAD2 (Caillaud et al., 2009) et avec AtBUB1.2. De plus, il présente une localisation beaucoup plus dense au niveau des fibres kinétochoriennes (comme BUB3.1), laissant supposer une diffusion le long des fibres-k suite à une localisation kinétochorienne.

La protéine AtBUB3 présente une localisation cytoplasmique et nucléaire avant l'entrée en mitose et n'est pas relocalisée aux kinétochores en prométaphase, quelque soit le sens de la construction. Cette localisation a été confirmée par une autre étude de BUB3.1 chez *Arabidopsis* (Lermontova et al., 2008). Cette localisation nucléaire prémitotique a aussi été observée dans les cellules de levure et d'humain (Kerscher et al., 2003; Taylor et al., 1998) ainsi que par immunolocalisation chez le xénope (Campbell and Hardwick, 2003). Contrairement à *Arabidopsis*, chez les autres organismes, BUB3 est recrutée aux kinétochores dès la prométaphase. En revanche, chez *Arabidopsis*, lors d'une mitose normale, AtBUB3 présente une localisation beaucoup plus dense au niveau des fibres kinétochoriennes (comme BUBR1) et se retrouve lors de la télophase associée au centre du phragmoplaste, autour de la nouvelle plaque cellulaire en expansion. Le centre du phragmoplaste est défini par l'interface entre les extrémités (+) des microtubules du phragmoplaste et la nouvelle plaque cellulaire. Il y aurait à cette interface des molécules supplémentaires permettant de stabiliser et de faire le lien entre les extrémités (+) des microtubules et la membrane de la plaque cellulaire, facilitant ainsi l'apport de matrice provenant des vésicules de Golgi à la plaque cellulaire en croissance (Austin et al., 2005), dont BUB3.1 pourrait faire partie.

L'absence d'observation de relocalisation aux kinétochores, lors d'une mitose normale, de BUB3.1, BUBR1, BUB1.2 et MAD2 ne permet donc pas de valider leurs implications dans le SAC. Chez les animaux, malgré quelques différences dans la localisation spatio-temporelle des protéines, le recrutement aux kinétochores est ubiquitaire lors de l'étape de prométaphase. Cependant cette phase est extrêmement courte et la présence des protéines aux kinétochores non attachés l'est encore plus : par exemple des expériences de FRAP ont déterminé que le temps de demi-vie de MAD2 aux kinétochores humains était de 24s (Howell et al., 2000). De plus, dans les méristèmes d'*Arabidopsis*, peu de cellules sont en cours de division. Malgré l'utilisation d'un inhibiteur de la synthèse d'ADN (l'hydroxyurée), permettant de synchroniser les cellules et d'augmenter le pool de cellules en cours de mitose, aucun kinétochore marqué n'a jamais été observé. Il pourrait être judicieux de réaliser ces observations sur des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* synchronisées. De plus, *Arabidopsis* ne possède que 5 chromosomes, il serait possible que la durée de prométaphase (temps nécessaire à la bi-orientation des chromosomes) soit encore plus simple et du coup, plus courte que chez l'humain. Une autre explication émanerait du mécanisme de formation du fuseau mitotique chez les plantes. Chez les

animaux, le mécanisme dominant de formation du fuseau serait le mécanisme de « recherche et capture » où les microtubules irradiant des COMT vers le centre de la cellule à la recherche des chromosomes. Alors que chez les végétaux, en l'absence de structure analogue aux COMT, le mécanisme dominant serait celui de « l'auto-assemblage » où les MT sont générés à partir de polymérisation issue des kinétochores. De plus, la mise en place du fuseau bipolaire s'effectue avant la rupture de l'enveloppe nucléaire chez *Arabidopsis* (Chan et al., 2005). Ces différentes raisons permettraient d'expliquer l'efficacité de l'attachement kinétochore/MT et l'absence d'activation du SAC. Une autre explication pourrait être la quantité en excès de protéines dans les cellules qui masquerait le signal : en effet, il a été montré chez l'humain qu'une petite fraction du pool des protéines du SAC (estimée à 50-5000 molécules) se relocalise aux kinétochores en prométaphase (Howell et al., 2004). Un exemple provient de l'étude sur AtMAD2, où les auteurs n'ont pu observer la localisation sur l'enveloppe nucléaire de MAD2 qu'avec la technique d'immunolocalisation et non avec l'utilisation de protéines marquées à la GFP (Ding et al., 2012), bien que celle-ci n'ait pas pu permettre d'observation au niveau des kinétochores. De plus une étude chez la souris reporte une localisation kinétochorienne visible de BUB3 lors de sa surexpression (Wei et al., 2011). *Arabidopsis* n'est pas le modèle idéal d'étude de la mitose, de part la petite taille de ses cellules et ses chromosomes (Zhang and Dawe, 2011).

Chez certains organismes, comme la levure *S. cerevisiae*, l'observation des protéines du SAC au niveau des kinétochores est assez rare: en effet, les protéines se relocalisent aux kinétochores seulement lors d'altérations ou défauts au niveau des kinétochores ou de l'intégrité du fuseau (Kerscher et al., 2003). Dans des conditions physiologiques, les cellules rencontrent rarement une situation au cours de laquelle tous les chromosomes présentent des défauts dans la structure kinétochorienne ou d'assemblage du fuseau, d'où l'observation de seulement quelques kinétochores marqués sur les 32 présents. Afin de visualiser les protéines du SAC sur l'ensemble des kinétochores, il est souvent d'usage de traiter les cellules avec des drogues inhibant la poly/dépolymérisation des microtubules. Chez le blé, la protéine MAD2 ne présente pas de profil kinétochorien au cours d'une mitose normale (Kimbara et al., 2004). Les auteurs ont observé une relocalisation kinétochorienne seulement suite à un traitement avec des drogues déstabilisant le fuseau mitotique. Plusieurs essais ont été réalisés au laboratoire afin d'observer ce profil kinétochorien d'activation du SAC en racines d'*Arabidopsis*. Les plantes ont été mises en présence de drogues déstabilisant le réseau de microtubules (Propyzamide, Oryzoline) afin de créer des défauts au niveau de l'assemblage du fuseau mitotique et ainsi activer le « Mitotic Checkpoint Complex ». L'utilisation de l'inhibiteur du protéasome 26S (MG132), induisant un arrêt en métaphase a également été utilisé. Dans les méristèmes racinaires, les protéines BUBR1, BUB1.2, BUB3.1 et MAD2 n'ont pu être relocalisées spécifiquement aux kinétochores alors que l'utilisation de ces mêmes molécules avait permis de visualiser une relocalisation kinétochorienne de MAD2, BUB3.1 et BUBR1 dans les cellules BY-2 (Caillaud et al., 2009). L'observation de plantes marqueurs, présentant le « Microtubule Binding

Domain » de MAP4 fusionné à la GFP et l'histone H2B lié à l'YFP, a cependant prouvé l'effet de ces drogues sur le cytosquelette de microtubules (présence de câbles de microtubules épais et anormaux). Cependant ces effets intracellulaires n'ont été observés que dans les couches périphériques de la racine. Dans les couches plus profondes, les cellules en mitose présentaient des figures mitotiques (PPB, fuseau et phragmoplaste) normaux et une division cellulaire non ralentie ni altérée. Ces observations suggèrent un problème probable de perméabilisation des racines, empêchant la pénétration de ces drogues jusqu'aux cellules en division (malgré l'utilisation de plusieurs perméabilisants et enzymes de dégradations des parois).

* *Phénotype associé à l'inactivation des gènes du SAC.*

Les mutants surexpressseurs (utilisés principalement pour l'étude des localisations subcellulaires) n'ont pas présentés de phénotype particulier. Pourtant chez la souris, lors de la surexpression de BUB3, BUBR1 et MAD2, les protéines restent sur les kinétochores des chromosomes bi-orientés en métaphase et empêche la ségrégation des chromatides sœurs en inhibant la transition métaphase/anaphase (Li et al., 2009b; Wei et al., 2011) résultant en un blocage du cycle cellulaire. La surexpression de BUB1 et de MAD3 chez la levure résulte aussi en une instabilité chromosomique (Warren et al., 2002). De façon intéressante, une surexpression de MAD2 est observée dans plusieurs cellules tumorales et même une surexpression transitoire de MAD2 est suffisante pour déclencher la formation d'une tumeur (Sotillo et al., 2007).

Au laboratoire, nous disposons également de mutants KO de *bubr1*, *bubl.2*, *brk1* et *mad2*. L'inactivation totale de *BUB3.1* étant létale, nous disposons également d'un mutant homozygote présentant une réduction significative du transcrit de *BUB3.1*. L'analyse macroscopique de ces mutants n'a révélé aucunes formes de défauts que ce soit au niveau de leurs croissances végétatives (rosettes, hampes florales) que de leurs appareils reproducteurs (pistils, étamines, siliques et embryons). Nous nous attendions dans un premier temps à un phénotype mutant similaire à celui de *map65.3* : plantes à croissance altérée (naines) et présentant des défauts cellulaires (cytokinèse incomplète avec des parois avortées, noyaux interconnectés et par conséquent des cellules multinucléées et hypertrophiées) altérant ainsi l'aspect morphologique des cellules, facilement observable au niveau des méristèmes racinaires. Les études cytologiques des différents mutants du SAC n'ont montré aucune altération de la structure morphologique de la racine, pas de noyaux connectés ni de cellules multinucléées et par conséquent pas hypertrophiées. Une des hypothèses formulée alors était une possible redondance fonctionnelle entre les protéines BUB1 et BUBR1. Nous avons alors généré des doubles mutants: *bubr1-bubl.2*, *bubl.2-brk1* et *bubr1-brk1* ainsi qu'un triple mutant *bubr1-bubl.2-brk1*.

Récemment, une étude chez *Arabidopsis* a confirmé nos observations : des mutants KO ou surexprimeurs de *MAD2* ne montrent pas de phénotype particulier tant au niveau macroscopique que microscopique (Ding et al., 2012). Le seul phénotype mis en évidence par les auteurs est une croissance altérée de la racine principale des plantes *mad2* sur du milieu carencé en sucre, phénotype partiellement restauré par l'ajout de sucrose. Les plantes surexprimant *MAD2* présentent quant à elles une croissance accrue quelque soit le niveau de sucrose. L'absence de *MAD2* inhiberait donc la croissance de la racine primaire alors que sa surexpression la favoriserait. Les auteurs expliquent ce phénotype par le fait que la présence de sucrose favorise la division cellulaire de la racine via une surexpression de cycline D (Eveland and Jackson, 2012). Cette diminution de croissance racinaire sur milieu carencé en sucre s'explique par une diminution de la taille de la zone de division du méristème racinaire principal (Ding et al., 2012). Dans les méristèmes racinaires, il existe un pool de cellules souches (le centre quiescent) qui génère des cellules qui vont se diviser (avec un nombre défini de division, propre à chaque écotype) dans le méristème proximal : la zone de division (ZD). Ces cellules entrent ensuite dans une zone d'élongation et de différenciation. Les mutants *mad2* présentent une ZD inférieure à celle du sauvage lors d'une carence en sucre, phénotype partiellement restauré par l'ajout de sucrose. Les surexprimeurs présentent quant à eux des ZD plus grande, sur les deux types de milieux. *AtMAD2* serait donc impliquée dans la modulation de la taille méristématique et le contrôle de la transition vers la zone de différenciation chez *Arabidopsis*. Au laboratoire, nous avons reproduit cette expérience sur tous les mutants disponibles (simple, double et triple mutant) et nous n'avons jamais réussi à observer ce phénotype, tant au niveau de la croissance racinaire, qu'au niveau de la taille de la zone de division. Toutes les plantes, dont les sauvages, présentent une croissance altérée sur un milieu carencé en sucrose et ne présentent aucune différence entre elles sur milieu supplémenté de sucrose. Il est intéressant de noter que ce phénotype KO de *MAD2* correspond au phénotype KO de la nucléoporine *NUA* (i.e. qui permet sa localisation sur l'enveloppe nucléaire) (Ding et al., 2012). En effet, les mutants KO *NUA* présentent une réduction de la taille de la zone de division du méristème ainsi que de la taille de la racine principale. Chez les autres organismes modèles, une déplétion de cette nucléoporine induit une réduction du signal de *MAD2* sur les kinétochores, accélère l'entrée en anaphase et conduit à une misségrégation des chromosomes (Lee et al., 2008; Lince-Faria et al., 2009; De Souza et al., 2009). La présence de *MAD2* sur l'enveloppe nucléaire grâce à *MAD1* qui la relie à *NUA* est donc essentielle à sa fonction dans le SAC. Plusieurs mutants de l'APC/C ont été étudiés chez *Arabidopsis*. De façon intéressante, un mutant d'un régulateur négatif de l'APC/C, *uvi4* (Ultraviolet-B-Insensitive4) présente un phénotype similaire à celui de *mad2* et *nua* au niveau de la taille de la ZD du méristème de la racine principale (Heyman et al., 2011). *UVI4* utilise des motifs conservés d'interaction avec l'APC/C pour empêcher la liaison du substrat *CCS52A1* (l'homologue de *CDH1* chez les végétaux) au cours de la phase S, inhibant ainsi le « turnover » de la cycline de type 1, *CYCA2;3*. Les mutants *uvi4* sortent prématurément du cycle cellulaire et déclenchent l'entrée dans la phase d'endocycle. Une perte d'inhibition de l'APC/C pendant les phases S et M déclencherait ainsi

une sortie du cycle cellulaire et une différenciation des cellules, régulant ainsi la taille des méristèmes et le taux de croissance.

MAD2 est un composant clef du SAC, de part sa liaison directe avec CDC20 et son inhibition de l'APC/C et est très bien conservée de la levure aux mammifères. Bien que son inactivation ne soit pas létale chez les levures et la drosophile (Barnhart et al., 2011; Buffin et al., 2007; Orr et al., 2007), les phénotypes associés à son inactivation sont critiques chez les autres organismes modèles : chez *C. elegans* (Hajeri et al., 2008; Kitagawa and Rose, 1999), et les mammifères (Dobles et al., 2000; Meraldi and Sorger, 2005; Michel et al., 2001). Sa répression ou son inactivation provoque un mauvais alignement des chromosomes métaphasiques, accélère la transition métaphase/anaphase et augmente donc le nombre d'erreurs de ségrégations chromosomiques, causant la formation de micronoyaux et d'aneuploïdie, initiant alors une apoptose des cellules. Il semblerait que chez les végétaux, de part le peu de phénotypes associés à son inactivation ou sa surexpression, son rôle ne soit pas indispensable.

Récemment, une équipe a développé une technique permettant d'étudier le rôle de protéines indispensables pour le développement végétal (Burgos-Rivera and Dawe, 2012). Classiquement, les stratégies utilisées sont le « RNAi » contrôlé par un promoteur inductible (chimique ou température). Ici la méthode utilisée est un RNAi tissu-spécifique dans le pétale. Ils ont, entre autre, choisi comme gènes cibles AtMAD2 et AtBUBR1, de part leurs fonctions essentielles dans la division cellulaire décrites dans la littérature. Une répression de ces gènes dans les pétales, bien que ces gènes ne soient pas exprimés dans ces tissus, a induit une croissance très altérée de ces tissus. Cependant, aucun phénotype lié à la division cellulaire n'a été décelé : pas d'arrêt du cycle cellulaire, pas de « lagging » chromosome (chromosomes retardataires dans leurs migrations qui donneront par la suite des micronoyaux), ni de micronoyaux. Les auteurs se reportent à un rôle potentiel de BUBR1 et MAD2 dans la cytokinèse, comme BUB3.1 dans notre étude précédent (Caillaud et al., 2009), bien qu'aucun phénotype liés à la cytokinèse (parois avortées, cellules multinucléées) n'ait été visualisé.

Contrairement aux autres organismes, trois isoformes de la protéine BUB3 sont présentes chez Arabidopsis : BUB3.1, BUB3.2 et BUB3.3. La grande similarité entre leurs séquences nucléotidiques de BUB3.1 et BUB3.2 suggère un évènement de duplication assez récent, alors que BUB3.3 présente peu de similarités et son origine est moins évidente (Lermontova et al., 2008). Les trois homologues de BUB3 chez Arabidopsis présente des domaines WD40 répétés connus pour leurs implications dans les interactions protéines-protéines (Smith, 2008). De part l'absence d'expression de *BUB3.2* et *BUB3.3* dans les tissus riches en cellules en division, nous nous sommes focalisés par la suite sur BUB3.1. Le KO des gènes BUB3.1 et BUB3.2 indique l'importance de la différence fonctionnelle des deux isoformes. BUB3.1 apparait comme étant essentiel au cours de l'embryogénèse : aucune plante homozygote n'est obtenue de part son phénotype embryo-létal (alors que le KO de BUB3.2 ne présente aucun phénotype). Ce phénotype confirme le rôle essentiel de BUB3 chez les autres

organismes où l'inactivation de BUB3 conduit à un phénotype embryo-létal chez la souris (Babu et al., 2003; Kalitsis et al., 2000). De part la fonction essentielle de BUB3.1, son rôle dans le développement des gamétophytes a été analysé chez des plantes hétérozygotes pour la mutation. Le développement des grains de pollen apparait retardé chez le mutant et présente une viabilité réduite: il en résulte des étamines plus petites, contenant moins de grains de pollen que le sauvage (Lermontova et al., 2008). Les ovules présentent aussi des défauts de développement et certaines présentent un arrêt au stade mononucléé (avant les mitoses gamétophytiques). Au laboratoire, nous avons également étudié ce phénotype embryo-létal: des « backcross » réciproques entre un sauvage et des plantes hétérozygotes nous ont permis de montrer que la mutation pouvait être transmise aussi bien par les gamètes mâles que femelles. Nous en avons donc conclu que BUB3.1 aurait plutôt un rôle indispensable lors de l'embryogenèse. Quoiqu'il en soit, nous n'avons jamais réussi à obtenir des plantes *bub3.1* complémentées. Par la suite nous nous sommes focalisés sur le mutant présentant une diminution de transcrits. Nous attendions un phénotype similaire à celui des plantes *map65.3* (pour son implication dans la cytokinèse) de part la localisation de BUB3.1 au niveau des phragmoplastes. Ce mutant ne présente aucun phénotype visible, tant au niveau macroscopique que microscopique (pas de parois avortées, de noyaux connectés). Pourtant, chez les animaux, une simple réduction des transcrits de *BUB3* entraîne des phénotypes. En effet, comme les souris *bub3* homozygote sont embryo-létales (Kalitsis et al., 2000), des souris hétérozygotes *bub3* ont été analysées et présentent une séparation prématurée des chromatides sœurs, et des aneuploïdies (Kalitsis et al., 2005). Notre hypothèse serait que BUB3.1 fait partie d'un complexe de capture d'extrémités (+) associé avec d'autres protéines du centre du phragmoplaste et pourrait ainsi réguler l'expansion de la plaque cellulaire (Caillaud et al., 2009). L'analyse de l'expression des gènes régulateurs du cycle cellulaire dans des cellules synchronisées d'*Arabidopsis* montre que l'expression de BUB3.1 est coréglée avec d'autres gènes liés à la cytokinèse (Menges et al., 2005). D'autres protéines végétales, telles que AtAurora-1 ((Van Damme et al., 2004), une kinésine motrice PAKRP2 (Lee et al., 2001), la sous unité CDC27/HOBBIT de l'APC/C (Pérez-Pérez et al., 2008) et MAP65.3 (Caillaud et al., 2008b) présentent une localisation identique à BUB3.1 au centre du phragmoplaste lors de la cytokinèse. Chez les végétaux, la famille des protéines kinases Aurora B est dupliquée en trois exemplaires *AtAurora1*, *AtAurora2* et *AtAurora3* (Van Damme et al., 2004). Ces 3 kinases phosphorylent la protéine centromérique CENH3 (Demidov et al., 2009) et l'inhibition de leurs activités montrent un rôle dans la transition métaphase/anaphase et dans la ségrégation des chromosomes en cellules BY2 du tabac (Kurihara et al., 2006). *AtAurora1* et *AtAurora2* localisent au niveau des noyaux pendant l'interphase et sur le fuseau mitotique dans les cellules en division ainsi qu'avec la nouvelle plaque cellulaire émergente dans des cellules de tabac BY-2 (Van Damme et al., 2011). *AtAurora1* aurait aussi un rôle dans la nucléation des microtubules acentrosomale à partir des noyaux et de microtubules déjà existants (Binarová et al., 2000; Murata et al., 2005). L'inactivation des kinases *AtAurora 1* et *2* conduit à des défauts majeurs, très souvent létaux de part leurs rôles important dans la cytokinèse: elles sont associées au phragmoplaste, et

lorsqu'elles sont absentes, les divisions cellulaires sont orientées aléatoirement altérant sévèrement les structures racinaires (Van Damme et al., 2011). Il semblerait donc que les kinases Aurora coordonnent les évènements spatiotemporels de la mitose et de la cytokinèse et possèderaient donc des fonctions supplémentaires par rapport aux animaux (Kirioukhova et al., 2011). Il serait très intéressant de tester l'interaction entre BUB3.1 et ces deux Aurora. L'hypothèse serait que, chez les plantes, BUB3.1 pourrait être impliquée à la fois dans la régulation de la transition métaphase/anaphase mais aurait également une fonction supplémentaire chez les végétaux dans l'expansion du phragmoplaste, coordonnant ainsi deux étapes du cycle cellulaire. Ces résultats suggèreraient que les plantes utilisent des mécanismes communs pour la coordination du fuseau mitotique et du phragmoplaste, indiquant de potentiels liens entre les complexes de surveillance de l'assemblage du fuseau et du phragmoplaste. EBI (« End Binding protein-1 »), MAP interagissant avec les extrémités (+) des microtubules (complexe « +TIPs ») présente une localisation particulière : en plus de son association avec le fuseau et le phragmoplaste, elle est recrutée dans le noyau dès la prophase. Une réduction d'EBI compromet l'alignement des microtubules du fuseau et du phragmoplaste et causent de fréquents « lagging » chromosomes en anaphase (Komaki et al., 2010), suggérant un rôle dans les deux processus la ségrégation des chromosomes et la cytokinèse. La localisation particulière de MAP65-3 qui est concentrée au centre du phragmoplaste en fait un très bon candidat pour être membre du complexe « +TIPs » chez *Arabidopsis*. Les localisations similaires de BUB3.1 et MAP65-3 au cours de la cytokinèse, ainsi que leurs interactions, permet d'émettre l'hypothèse que cette protéine du SAC, qui contrôle la transition entre la métaphase et l'anaphase, pourrait également contrôler l'expansion du phragmoplaste permettant ainsi la cytokinèse végétale. Il serait dès lors intéressant d'étudier la localisation subcellulaire de BUB3.1 en absence de MAP65-3 et d'étudier si BUB3.1 est toujours localisée au centre du phragmoplaste. L'étude conjointe de MAP65-3 et de BUB3.1 (ou plus largement du SAC) permettra sans aucun doute de mieux comprendre les processus de régulation de l'expansion du phragmoplaste chez les plantes.

L'étude cytologique des mutants *bubr1*, *bub1.2*, et *brk1*, ainsi que des doubles et du triple mutants n'avait pas révélé de phénotype majeur. Récemment, nous nous sommes intéressés à la dynamique de l'ADN et des réseaux de microtubules au cours de la mitose, dans ces fonds mutants grâce à des marqueurs MBD-GFP et H2B-YFP introgressés dans les différents génotypes. L'analyse des simples mutants *bub1.2* et *brk1* n'a révélé aucun phénotype : les chromosomes s'alignent correctement en métaphase et ségrègent correctement en anaphase. Cependant dans le fond mutant *bubr1*, les chromosomes peuvent présenter un mauvais alignement en métaphase, un retard de migration des chromosomes et dans certains cas, des « lagging » chromosomes. Ce phénotype a également été observé dans les doubles mutants *bubr1- bub1.2* ainsi que dans le triple mutant *bubr1-*

bub1.2- brk1. De plus, les double-mutants présentent aussi très souvent des plaques métaphasiques bloquées, en attente et une altération de la morphologie des fuseaux mitotiques : présence récurrente de fuseaux mitotiques obliques ainsi que de fuseaux à polarité altérée (tripolaires). Nous n'avons pas pour l'instant visualisé la dynamique des réseaux de microtubules chez le triple mutant. Ces différents résultats sont en accord avec le phénotype attendu suite à l'inactivation de BUBR1 dans la littérature chez la levure à fission ainsi que chez tous les métazoaires (Basu et al., 1999; Bernard et al., 1998; Jeganathan et al., 2007; Schliekelman et al., 2009; Shannon et al., 2002). BUBR1 est un composant capital du MCC (de part sa liaison directe avec MAD2), il est également impliqué dans la détermination du « timing » de la mitose et joue également un rôle essentiel dans l'établissement de l'attachement kinétochore/microtubule. De part ses trois fonctions indépendantes, les phénotypes dus à son inactivation sont diverses et difficiles à interpréter. Dans la littérature, des études poussées permettent de différencier les rôles de BUBR1 en fonction des domaines protéiques mutés. Quoiqu'il en soit, nous observons ici la totalité des phénotypes dûs à l'inactivation de BUBR1. La présence de BUBR1 étant essentielle à la survie de l'organisme, il est souvent difficile d'observer tous les phénotypes liés à son inactivation. Chez la drosophile, les cellules n'ont apparemment pas besoin du SAC pour réaliser une mitose correcte (Buffin et al., 2007), permettant ainsi une étude plus poussée des phénotypes KO. Une étude sur des neuroblastes de larves de drosophile a permis d'observer différents types de défauts liés à l'inactivation de BUBR1, phénotypes correspondants à ceux retrouvés dans nos mutants d'*Arabidopsis* (Rahmani et al., 2009). Une inactivation de la kinase de BUBR1 a confirmé une tendance à prolonger la prométaphase et a révélé des défauts dans la formation des fuseaux mitotiques. Dans les mutants, le temps entre la dissolution de l'enveloppe nucléaire et l'anaphase est trois fois plus long, la congression est très lente et les chromosomes présentent de mauvais alignements sur la plaque métaphasique. La longueur des fuseaux mitotiques varie entre la prométaphase et la métaphase, se contracte (Rahmani et al., 2009). D'autre part, l'inactivation des domaines KEN Box de BUBR1 a conduit à des défauts typiques de l'altération de sa fonction dans le SAC : absence d'arrêt en prométaphase suite à des défauts du fuseau et par conséquent une mauvaise ségrégation des chromosomes et aneuploïdie des cellules. Les altérations de fuseaux dans les mutants *BUBR1Kinase-inactivée* n'ont jamais été décrites dans d'autres modèles animaux, et serait une conséquence de mauvais attachement kinétochore/microtubule, ou plus précisément une altération des facteurs associés aux kinétochores impliqués dans la stabilité ou la dynamique des MT. Les défauts observés sur les mutants *bubr1* présentent des similarités avec ceux observés lors de l'inactivation de protéines interagissant avec la GCP3, protéine 3 du complexe γ -tubuline (Janski et al., 2012). Le double mutant *gip1-gip2* présente des défauts sévères de croissance, et de stérilité dû à une désorganisation des MT, des fuseaux mitotiques à polarité anormale conduisant à des défauts de ségrégations des chromosomes. L'inactivation de protéines (+) TIP, telle que EB1 ou CLASP conduit aux mêmes types de défauts de fuseaux et d'altérations de congressions chromosomiques (Goshima et al., 2005; Maiato et al., 2002). L'altération des fuseaux mitotiques associée aux perturbations

d'attachement kinétochore/microtubule et de congressions, fait apparaître des figures mitotiques ressemblant fortement à des fuseaux tripolaires comme ceux observés chez *Arabidopsis*. En ajoutant l'absence de fonction dans le SAC, tous ces phénotypes confondus associés à BUBR1 expliquent les défauts observés dans nos mutants. AtBUBR1 présenterait ainsi une fonction conservée chez les végétaux.

Une récente étude chez le riz, s'intéresse à des mutants KO de BRK1, *Osbrk1* : les plantes présentent une croissance végétative non altérée mais montrent par contre un phénotype de stérilité totale (Wang et al., 2012a). L'étude des gamètes du mutant a révélé des défauts de formation du mégaspore ainsi que des microspores les rendant non viables. En effet, lors de la méiose, l'absence d'OsBRK1 entraîne une séparation précoce des chromatides sœurs lors de l'anaphase I conduisant à un défaut d'alignements des chromatides lors de la métaphase II, une séparation inégale en anaphase II et donc la formation de micronoyaux dans le stade tétrade. Les auteurs ont expliqué cette séparation précoce en anaphase I par la perte de cohésion des chromatides sœurs due à une absence de recrutement d'OsSGO1 dans les plantes *Osbrk1*. Wang et al. (2012a) montrent que OsBRK1 recrute OsSGO1 (l'homologue végétal de SGO1 -Shugoshin1-, impliqué dans la protection des cohésines) au niveau des centromères. De façon intéressante, les plantes *Ossgo1* présentent le même phénotype mutant que les plantes *Osbrk1* (Wang et al., 2011). Ce résultat est en accord avec les modèles animaux où il est montré que le domaine kinase de BUB1 est essentiel au recrutement de Shugoshin (Fernius and Hardwick, 2007; Kitajima et al., 2005). Mais les plantes *Osbrk1* présentent des défauts kinétochoriens supplémentaires par rapport aux plantes *Ossgo1* : dès la métaphase I, les fuseaux mitotiques sont anormaux car les fibres kinétochoriennes présentent des attachements mérotéliques (certaines fibres-k se lient en plus aux kinétochores frères, donnant lieu à des kinétochores attachés aux deux pôles opposés). Dans les plantes *Osbrk1*, ces attachements mérotéliques n'étant pas corrigés, BRK1 aurait donc un rôle de « senseur » de la tension. Chez la levure à fission, une autre protéine Shugoshin, SGO2, est impliquée dans le recrutement du « Chromosomal Passenger Complexe » aux centromères, complexe « senseur » de la tension (Kawashima et al., 2007). Chez la levure à fission, la délétion de BUB1 perturberait la localisation centromérique de SGO2, qui ne pourrait plus recruter Aurora B résultant ainsi en une insensibilité à l'absence de tension intra-kinétochorienne lors d'attachements mérotéliques. Chez les plantes, deux membres de la famille Shugoshin ont été identifiés, bien que SGO2 n'ait pas encore été caractérisé (Wang et al., 2011; Watanabe, 2005). Chez *Arabidopsis*, trois Aurora kinases ont été identifiées (Kawabe et al., 2005). Parmi les trois protéines, seule Aurora3 localise au niveau des centromères lors de la mitose (Demidov et al., 2005). Chez le riz, Wang et al. (2012) émettent l'hypothèse qu'OsBRK1 pourrait être requis pour le recrutement d'au moins un membre de la famille des Aurora, expliquant ainsi ce phénotype de « tension insensible ». Ces phénotypes d'*Osbrk1* sont rencontrés uniquement dans la méiose. En effet, le phénotype principal de *Osbrk1* dans la perte de cohésion des chromatides sœurs (dû à une absence de recrutement de

OsSGO1) augmente les probabilités d'apparition d'attachements mérotéliques lors de l'anaphase II et révèlent donc le second phénotype attribué à OsBRK1 (dans le potentiel recrutement d'Aurora et la sensibilité à la tension). Quoiqu'il en soit, aucun phénotype mitotique n'a été observé chez les plantes *Osbrk1* et les auteurs émettent l'hypothèse qu'OsBRK1 ne serait pas impliqué à proprement parler dans le SAC. Il semblerait donc que BRK1 (*At* et *Os*) et AtBUB1.2 aient perdu leurs fonctions classiques dans le SAC dans le règne végétal au cours de l'évolution.

Chez certains organismes, tel que les levures ou la drosophile, l'inactivation des protéines du SAC n'est pas létale (Buffin et al., 2007; Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991) mais peut potentiellement engendrer des phénotypes au cours d'une mitose normale, comme chez la levure à fission (Bernard et al., 1998). Chez *S. cerevisiae* en revanche, il est nécessaire d'altérer le fuseau mitotique (par traitement avec des drogues déstabilisant les MT) pour observer un quelconque phénotype. Nous avons pour cela analysé la croissance des racines des différents mutants sur milieux supplémentés de drogues dépolymérisant les MT. Deux herbicides ont été choisis pour leurs utilisations récurrentes dans la littérature végétale : le propyzamide et l'oryzaline (qui se fixent sur la β et l' α -tubuline, respectivement). Les mutants ne montrent pas plus de sensibilité que le sauvage sur propyzamide mais tous les mutants (sauf *brk1*) présentent par contre une nette altération de la croissance en présence d'oryzaline. Il est très intéressant de noter que cette absence de phénotype lors de traitements aux drogues déstabilisant les MT a aussi été observé chez le mutant *brk1* du riz (Wang et al., 2012a). Les phénotypes cellulaires associés n'ont pas encore été étudiés, mais selon toutes vraisemblances, il semblerait qu'ils se comportent comme les mutants du SAC de *S. cerevisiae* (Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991) : les mutants n'activeraient pas de signal "d'arrêt en métaphase" en présence de défauts du fuseau et sépareraient leurs chromatides de façon imparfaite. Les conséquences sont une perte rapide de chromosomes, altérant la croissance de l'individu. Un phénotype similaire est associé à une réduction d'une MAP associée aux extrémités (+) des MT : les plantes déficientes en EBI présente une hypersensibilité aux drogues déstabilisant les MT (Komaki et al., 2010). Contrairement aux levures, les plantes ne meurent pas, sûrement par leur plus grande flexibilité et plasticité à des réarrangements et changements chromosomiques. En effet, chez le riz, des racines sauvages traitées à un agent déstabilisant les microtubules présentent des défauts caractéristiques d'absence de SAC (défauts de ségrégations de chromosomes et la formation de micronoyaux en seulement 2h) (Wang et al., 2012a). Chez *Arabidopsis*, des plantules germant sur un milieu supplémenté de drogues présentent un niveau supérieur d'endopolyploïdisation (Lermontova et al., 2008). Une comparaison de la proportion de cellules 2C-64C de plantules d'*Arabidopsis* sauvage poussant sur milieu normal ou avec du propyzamide, montre que le traitement chimique conduit à une inhibition de la mitose et de façon concomitante, une induction de phase d'endocycle. Par conséquence, *Arabidopsis* serait moins sensible aux traitements déstabilisants les MT, causant des arrêts mitotiques.

Plus largement, quelques autres acteurs du SAC ont été identifiés chez les végétaux. Au vu de ces résultats, il semblerait donc que de toutes les kinases impliquées dans le SAC, ce soit plutôt la famille des Aurora et MPS1 qui soient les meilleurs candidats pour la transduction du signal chez les plantes (Demidov et al., 2005). En effet, dans des cellules humaines BUB1 déficientes, l'arrêt mitotique est médié par l'activité kinase d'Aurora (Morrow et al., 2005). D'autre part, MPS1 est souvent considérée comme un membre du MCC car son inactivation supprime l'activité du SAC dans tous les organismes testés (contrairement à BUB1) (Lan and Cleveland, 2010). Cette kinase est impliquée dans beaucoup de processus contribuant à l'inhibition de l'APC/C : elle permet le recrutement aux kinétochores non attachés de BUB1, BUBR1, RZZ et MAD1, la phosphorylation et la stabilisation de MAD2 (Zich et al., 2012) ainsi que la stabilisation du MCC (Hewitt et al., 2010). L'homologue de MPS1 a récemment été identifié chez *Arabidopsis* et son rôle semble conservé chez les plantes (de Oliveira et al., 2012). Chez *Arabidopsis*, MPS1 est un régulateur du cycle cellulaire impliqué en aval de la voie de signalisation de la phytohormone auxine et aurait des rôles majeurs dans les processus développementaux tel que l'initiation de racines latérales. Cependant son inactivation par un inhibiteur spécifique n'a pas montré de défauts majeurs de l'architecture des tissus, et n'a pas révélé de phénotypes liés à son rôle dans le SAC. Pour l'autre kinase importante du SAC, AuroraB du CPC, il semblerait que ce soit AtAurora3 qui ait un rôle similaire de part sa localisation sur les kinétochores lors de la mitose (Kawabe et al., 2005) et sa surexpression entraînerait un désassemblage du fuseau mitotique et une altération de l'orientation de la division cellulaire. Elle est requise pour la ségrégation correcte des chromosomes et la transition métaphase/anaphase chez les végétaux : en effet, son inactivation avec un inhibiteur spécifique chez le tabac induit un retard de l'entrée en anaphase, une sortie prématurée de la mitose et la présence fréquente de « lagging » chromosome et de micronoyaux (Kurihara et al., 2006). Les mécanismes moléculaires associés aux Kinases Aurora ne sont pas encore bien identifiés chez les plantes. Les autres homologues des protéines du CPC : INCENP, la survivine et la boréaline n'ont pas encore été identifiées (Petrovská et al., 2012). Les coactivateurs, CDH1 et CDC20 sont aussi retrouvés chez les plantes. Chez *Arabidopsis*, il existe 5 isoformes de CDC20 (Kevei et al., 2011). Il semblerait que seules 2 isoformes, AtCDC20.1 et AtCDC20.2 conservent les fonctions de leur homologue animal. Ces deux gènes sont exprimés dans les tissus en division (avec une expression supplémentaire pour AtCDC20.1 dans les grains de pollen et les embryons) et présentent des interactions spécifiques avec les cyclines mitotiques et les homologues végétaux du MCC (Kevei et al., 2011). Leur altération conduit à des défauts sévères du développement de la plante ainsi qu'à une stérilité mâle. Les trois autres isoformes n'étant pas exprimées, elles sembleraient être des pseudogènes à fonctions encore inconnues. Chez les plantes, il existe aussi 2 isoformes CDH1, CCS52A et CCS52B. Elles ont été identifiées chez *Medicago truncatula* et sont aussi impliquées dans la sortie de mitose et contrôlent les cycles d'endoréduplication (Cebolla et al., 1999; Tarayre et al., 2004; Vinardell et al., 2003). Chez

Arabidopsis, le gène *AtCCS52A* est dupliqué et les 2 isoformes se partagent les fonctions de *MtCCS52A* d'une manière complémentaire en fonction de leurs profils d'expression. *AtCCS52A1* stimule l'endoréduplication et la sortie de mitose alors qu'*AtCCS52A2* intervient dans le maintien des cellules souches (Vanstraelen et al., 2009). Les homologues des deux coactivateurs CDH1 et CDC20 présentent donc une conservation de leurs fonctions mitotiques dans le règne végétal. D'autre part, l'inactivation des sous unités de l'APC/C, APC1 et APC4, conduit à de nombreux défauts dans la gaméto-genèse femelle et l'embryogenèse : polarités et nombres anormaux de noyaux conduisant à un arrêt du développement précoce (Wang et al., 2013). De façon intéressante, l'APC/C n'est pas exprimé de façon cycle-cellulaire dépendant, il est ubiquitaire dans des cellules différenciées et serait impliqué dans la régulation hormonale, le développement vasculaire et la détermination morphologique des cellules (Lindsay et al., 2011; Marrocco et al., 2009). La présence des régulateurs de l'APC/C est aussi essentielle : comme UVI4 (Heyman et al., 2011) dont le mutant présente des endomitoses ectopiques, GIG1 serait aussi un régulateur négatif des activateurs de l'APC/C (CDC20 et CCS52) et son inactivation déclencherai de l'endocycle ectopique (Iwata et al., 2011). L'APC/C aurait donc un rôle supplémentaire dans la détermination du devenir cellulaire en plus de son rôle dans la progression mitotique. L'endomitose et l'endocycle seraient régulés par des mécanismes communs, dans lesquels deux régulateurs GIG1 et UVI4 inhiberait l'APC/C de deux manières différentes (Iwata et al., 2012).

Afin de confirmer la relation entre les composants du MCC que nous avons étudiés et leurs partenaires connus dans le mécanisme du SAC, il aurait été aussi intéressant de tester des interactions en utilisant comme appât la protéine BUBR1, de part ses liaisons directes avec la kinésine CENP-E (Chen, 2002), la MAP associée aux extrémités (+) des MT, EB1 (Zhang et al., 2007) et avec une protéine, Ajuba, nouvellement caractérisée en tant que MAP et présentant un profil de (+) TIP (Ferrand et al., 2009). Il aurait été aussi important de vérifier l'interaction de nos potentiels composants du MCC avec les protéines créant la plateforme de recrutement sur les kinétochores (i.e. le complexe KMN), sachant que l'un des composants, KNL-1, interagit directement avec BUBR1 et BUB1 (Bolanos-Garcia et al., 2011; Krenn et al., 2012). Il a été récemment suggéré, par analyse de la séquence et de la structure de la kinase *AtMPS1*, membre essentiel du SAC, qu'elle pourrait interagir avec *AtMAD2* et *AtBUBR1* (de Oliveira et al., 2012). D'autres part, *AtCDC20.1* et *AtCDC20.2* (les deux isoformes d'Arabidopsis qui présentent des fonctions conservées dans le SAC) ont été montré comme interagissant en levures avec BUB1, BUBR1 et MAD2 ; mais pas avec BUB3.1 (Kevei et al., 2011). Ces résultats sont en accord avec le modèle animal, sauf pour BUB3 qui interagit normalement également avec CDC20 (D'Arcy et al., 2010; Fang, 2002; Fraschini et al., 2001; Luo et al., 2000).

Il est intéressant de noter que parmi toutes les protéines impliquées dans la composition des kinétochores ou dans la régulation du cycle cellulaire caractérisées chez les plantes, les phénotypes liés à leurs inactivations sont fréquemment observés seulement au cours de la méiose. En effet, l'homologue de MIS12 (membre du complexe KMN, impliqué dans l'attachement kinétochore/MT) a

été identifié chez le maïs (Li and Dawe, 2009). Son inactivation conduit à une séparation des kinétochores frères lors de la méiose et une orientation aléatoire des chromatides en métaphase I conduisant à des « lagging » chromosomes. L'orthologue putatif d'INCENP, WYR, a été identifié chez *Arabidopsis* (Kirioukhova et al., 2011). Les mutants *wyr* présentent des défauts lors de division cellulaire dans le gamétophyte mâle et dans l'endosperme et un défaut de cytokinèse lors de l'embryogénèse suggérant un rôle conservé chez les végétaux. Un des composants majeurs déterminants les kinétochores est CENP-A. Son homologue végétal, CENH3 a été analysé chez *Arabidopsis*. Son KO cause un nanisme aux plantes mutantes résultant d'un nombre réduit de divisions mitotiques bien que celles-ci ne présentent pas d'erreurs (Lermontova et al., 2011b). Les mutants présentent également une fertilité réduite due à des erreurs de ségrégation chromosomique, conduisant à des « lagging » chromosomes et des micronoyaux. Un autre composant majeur de la plaque interne des kinétochores a été identifié chez *Arabidopsis* : la protéine CENP-C (Ogura et al., 2004). Aucune étude ne décrit une inactivation de cette protéine, supposant que le phénotype soit léthal. Cependant son inactivation spécifiquement dans les pétales altèrent gravement leur croissance : bien qu'aucun phénotype lié à la division cellulaire n'ait été rapporté, les tissus présentent un ratio supérieur de cellules en cours de mitose, suggérant un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire (Burgos-Rivera and Dawe, 2012). Un mutant *afd1*, caractérisé chez le maïs, montre une séparation prématurée des chromatides sœurs conduisant également à des défauts de ségrégations chromosomiques. Enfin, deux responsables de la cohésions des chromatides sont été caractérisées chez le riz : il s'agit de OsREC8 (l'homologue de la cohésine REC8, connu comme étant un interactant de BUB1) (Shao et al., 2011) et OsSGO1 (Wang et al., 2011), l'homologue de Shugoshin. L'inactivation de ces protéines conduit à la perte de cohésion des chromatides dès la méiose I et des erreurs de ségrégation. Il est intéressant de noter que malgré leurs fonctions essentielles au cours du processus de méiose, aucun phénotype mitotique n'a été reporté.

* *Le MCC dans les cellules géantes.*

L'analyse fonctionnelle de MAP65-3 a permis de mettre en évidence que lorsque des aberrations s'accumulent au cours des mitoses successives, les cellules géantes dégénèrent. En effet, dans les cellules géantes MAP65.3 est associée et régule les « mini » plaques cellulaires qui séparent les deux noyaux fils. Dans les mutants *map65.3*, la cytokinèse est donc aussi initiée, mais l'accumulation de défauts (parois avortées, noyaux connectés) résultant d'anomalies de l'expansion du phragmoplaste, au cours des mitoses successives, conduirait à une dégénérescence du site nourricier et la mort du nématode (Caillaud et al., 2008). Ces résultats montrent que ces mitoses successives réalisées lors de la mise en place des cellules géantes doivent nécessairement être particulièrement surveillées, pour éviter toutes aberrations conduisant à une altération du site nourricier pour le

nématode. Dès lors, il était particulièrement pertinent d'étudier comment la cellule géante contrôle les multiples fuseaux mitotiques générés en métaphase lors des événements de mitoses. L'hypothèse était que ce système de surveillance de la mitose pouvait être particulièrement sollicité lors de l'ontogenèse des cellules géantes, permettant d'assurer avec succès les séparations multiples et synchrones des chromosomes.

Les profils d'expression des gènes du SAC, après infection par *M. incognita*, a permis de montrer l'induction de *BUB3.1*, *BUBR1*, *BUB1.2* et *MAD2* dans les galles, dans les cellules géantes en formation ainsi que dans les cellules avoisinantes en division, confirmant ainsi leurs implications dans ce processus. *BRK1* ne semble quant à lui pas exprimé dans les galles ni dans aucune partie racinaire. L'analyse de la localisation subcellulaire des protéines dans les cellules géantes a été réalisée *in vivo*. Cependant, la difficulté d'observation de ces tissus n'a pas permis de retirer des informations judicieuses. *BUBR1*, étant nucléaire et *BUB3.1* et *MAD2* étant nucléaires et cytoplasmiques, les observations réalisées ont permis d'observer des noyaux, dans des cellules multinucléées. Dans ces tissus, aucune localisation kinétochorienne n'a été observée. Pourtant, lors de l'ontogénèse des cellules géantes, il peut y avoir une dizaine de divisions nucléaires synchrones : la taille des cellules ainsi que le nombre de chromosomes à ségréger devraient augmenter les probabilités d'erreurs d'attachement kinétochore/MT ou de retard d'alignement sur la plaque métaphasique conduisant à l'activation du SAC. Cependant, il est extrêmement difficile d'observer des divisions cellulaires dans ces cellules. De plus, aucune localisation de *BUB3.1*, comme pour *MAP65.3*, n'a été observée au niveau de « mini » phragmoplastes. Bien que les cellules géantes résultent de divisions nucléaires successives sans division cellulaire, la cytokinèse y est en effet quand même initiée bien qu'incomplète. L'utilisation de lignée d'*Arabidopsis* exprimant le marqueur *MBD-GFP*, ainsi que les études d'immunolocalisation des MT dans les cellules géantes réalisées auparavant (de Almeida Engler et al., 2004) n'ont jamais montré l'existence de phragmoplastes en expansion, en forme d'anneau.

Bien que la nature des processus impliqués dans la reprogrammation cellulaire et l'inactivation de la cytokinèse reste encore inconnue, la reprise du cycle cellulaire est une étape clé de l'induction des cellules géantes et son altération influe sur le développement et la reproduction des nématodes (Gheysen and Fenoll, 2002; Goverse et al., 2000). Les mutants KO des gènes du SAC ont donc été analysés suite à l'infection par le nématode. Tous les mutants, *bub3.1*, *bubr1*, *bub1.2*, *brk1*, *mad2* ainsi que les doubles et le triple mutant ne présentent aucun phénotype que ce soit au niveau du nombre de galles induites ou sur le nombre de masses d'œufs présentes sur les galles. Le nombre de galles est un marqueur de la capacité d'infection du nématode alors que les masses d'œufs représentent le développement et la reproduction aboutis du nématode et indirectement, la formation correcte des sites nourriciers. De part l'absence de phénotype, la structure et la morphologie des sites nourriciers n'ont pas été observés chez ces mutants. Cette analyse serait cependant intéressante à réaliser.

Cette absence de phénotype mutant est assez surprenante de part l'importance du bon déroulement des mitoses successives au sein des cellules géantes. Récemment une étude a été réalisée sur des régulateurs du cycle cellulaire, la famille des inhibiteurs KRP (« Kip-Related Proteins ») (Morgan, 1997). Ces KRP sont associés au « switch » de la mitose vers les phases d'endoréduplication et sont impliquées dans plusieurs étapes de la division cellulaire. Les KRP lient et inhibent l'activité des kinases dépendantes de la cycline (CDK) au cours des phases S et M. Un niveau faible en KRP bloque la division cellulaire et induit l'endoréduplication alors que leurs surexpressions conduisent à une diminution du contenu en ADN des noyaux (Wang et al., 2008). Le rôle des 7 membres de cette famille chez *Arabidopsis* a été récemment étudié lors de l'ontogenèse des cellules géantes (Vieira et al., 2012b, 2013b). La surexpression de *KRP1* et *KRP2* réduit le nombre de mitoses dans les cellules géantes, empêchant ainsi leurs ontogénèses ainsi que celui des cellules avoisinantes (Vieira et al., 2013b). L'accumulation de KRP dans les galles en développement inactiverait les complexes CDKA/CYC et empêcherait ainsi la progression du cycle cellulaire. D'autre part, une surexpression de *KRP4* entraîne des noyaux malformés et interconnectés, affectant ainsi la morphologie des cellules géantes et par conséquent le développement du nématode (Vieira et al., 2012b). Il est intéressant de noter que la surexpression de *KRP4* produit des instabilités mitotiques, et provoquerait des misségrégations de chromosomes conduisant à ces noyaux malformés et interconnectés. Cette étude montre à quel point le processus de surveillance de l'assemblage du fuseau devrait être essentiel dans le processus de formation des cellules géantes.

Afin d'augmenter la taille du site nourricier ainsi que de son activité métabolique, les cellules géantes subissent des phénomènes d'endoréduplication (pour revue, de Almeida Engler and Gheysen, 2013). La localisation ectopique de BRK1 (sous le contrôle du promoteur de *MAP65.3*) a été informative, de part son marquage sur les centromères, et a confirmé la présence d'endoréduplication au sein des noyaux des cellules géantes. Le processus d'endoréduplication requiert la surexpression des gènes *E2Fa* et *DPA* qui induisent des gènes clés de la phase S retrouvés exprimés dans les galles (de Almeida Engler and Gheysen, 2013). Le passage du cycle mitotique au cycle d'endoréduplication est contrôlé par *CCS52A*, dont le gène a été retrouvé induit dans les galles (de Almeida Engler et al., 2012; Favery et al., 2002). Une récente étude montre que l'inactivation et la surexpression des gènes *CCS52A* et *DELI* (un répresseur de l'endocycle) respectivement affecte radicalement la croissance des cellules géantes et altère le développement des nématodes (de Almeida Engler et al., 2012; Vieira et al., 2013a). L'endoréduplication est contrôlée par l'APC/C et son activateur *CCS52A*, activation contrôlée également par deux régulateurs négatifs *UVI4* et *GIG1* (Iwata et al., 2012). Sachant que l'endoréduplication est régulée par l'APC/C, principale cible du MCC, il aurait été attendu un phénotype due à une dérégulation de l'endoréduplication chez les mutants du SAC. En effet, les mutants *uvi4* (Heyman et al., 2011) présentent des endomitoses ectopiques, et les mutants *gig1* (Gigas cells 1) de l'endoréduplication ectopique (Iwata et al., 2011). L'absence d'inhibition de l'APC/C dans

les mutants du SAC aurait pu provoquer de l'endoréduplication précoce dans les cellules géantes, bloquant ainsi les divisions nucléaires ultérieures et la maturation partielle du site nourricier. Une autre possibilité serait qu'il y ait bien eu de l'endoréduplication précoce, mais n'altérant ni la maturation des cellules géantes ni l'hyperactivité métabolique essentielle à la nutrition du nématode, et que celui-ci ait été capable de se développer et se reproduire. Quoiqu'il en soit, l'APC/C tient un rôle clef dans ce mécanisme et il serait intéressant d'étudier sa régulation qu'elle soit directement ou indirectement contrôlée par le nématode.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le travail effectué au cours de cette thèse a permis d'identifier un complexe protéique de surveillance de la mitose très bien caractérisé chez les métazoaires et la levure mais encore inconnu chez les plantes. Tous les organismes ont en commun un mécanisme de base du SAC, également présent chez LECA (« Last Eukaryotic Common Ancestor »). Cependant il existe des spécificités d'espèces, des duplications, des délétions ou des modifications fonctionnelles relatives aux différents types de mitose retrouvée chez les organismes : mitose ouverte/fermée, avec des centromères mono ou holocentriques, dépendant de la taille du kinétochore et du nombre de MT attachées / kinétochore, du nombre de chromosomes à ségréger, de la taille des cellules et du nombre de cellules à créer dans l'organisme (Vleugel et al., 2012).

Chez certains organismes, tel que les levures ou la drosophile, l'inactivation des protéines du SAC n'est pas létale (Buffin et al., 2007; Hoyt et al., 1991; Li and Murray, 1991). Chez les plantes, il semblerait que le SAC ne soit pas indispensable et que la dépendance des végétaux vis-à-vis du SAC se rapprochent plus du cas de la levure à fission où l'inactivation de ses composants peut engendrer des phénotypes au cours d'une mitose normale mais non létaux (Bernard et al., 1998). En effet, chez les plantes, la plupart des inactivations des différents composants du SAC ne présentent aucun phénotype mitotique (à l'exception de BUBR1) et les seuls phénotypes drastiques sont rapportés au processus de la méiose. Un seul métazoaire présente une indépendance vis-à-vis du SAC : il s'agit de la drosophile. Une des explications rapportées serait l'efficacité du système de division cellulaire dans cet organisme, de par la rapidité de la mitose et du faible nombre de chromosome. Cette explication pourrait être potentiellement commune avec *Arabidopsis* mais pas applicable aux végétaux en général (20 chromosomes chez le maïs, 24 chez le riz, et certaines graminées telle que *Poa litorosa* présentant jusqu'à $2n = 266$).

Il semblerait donc que les végétaux contournent l'arrêt en métaphase causé par des défauts de fuseaux mitotiques beaucoup plus facilement que les levures ou métazoaires. Cette notion est en accord avec le fait que les cellules végétales puissent rapidement échapper à des conditions d'inhibition de l'assemblage du fuseau et réentreraient dans un nouveau cycle cellulaire avec un noyau à $4N$ (Rieder and Maiato, 2004). En effet, chez *Arabidopsis*, les cycles d'endoréduplication, qui omettent la phase G2 et la mitose, se produisent en plus des cycles cellulaires et génère des noyaux endopolyploïdes (Brodsky and Uryvaeva, 1977). Il aurait été extrêmement intéressant d'analyser le contenu en ADN de nos différents mutants (en conditions normales ou stressées) de part cette capacité

des cellules végétales à « switcher » vers des phases d'endoréduplication et par les fonctions rapportées de l'APC/C dans l'induction de l'endomitose et de l'endoréduplication. Un seul des composants du SAC étudié présente un phénotype attendu, car léthal. Mais le phénotype embryo-léthal observée chez *bub3.1* pourrait être expliqué par sa potentielle implication dans la régulation de l'expansion du phragmoplaste. Ces résultats, ainsi que ceux sur les protéines Aurora (qui présentent également des rôles supplémentaires dans la cytokinèse végétale), suggèreraient que les plantes utilisent des mécanismes communs pour la coordination du fuseau mitotique et du phragmoplaste, indiquant de potentiels liens entre les complexes de surveillance de l'assemblage du fuseau et de l'expansion du phragmoplaste.

L'objectif initial de ce travail était de préciser le rôle de MAP65.3 au cours de la division cellulaire et d'expliquer ainsi son rôle essentiel dans l'ontogénèse des cellules géantes. Les rôles de MAP65.3 au cours de la division cellulaire peuvent être découplés de part son implication dans le fuseau mitotique et son contrôle de l'expansion du phragmoplaste. Cependant, en absence de MAP65-3, les défauts lors de la formation du fuseau mitotique n'étaient pas observés systématiquement dans les cellules en division. Une des hypothèses était que MAP65-3 ne serait indispensable à l'organisation du fuseau mitotique qu'en cas de perturbations lors de la séparation des chromosomes. Il serait intéressant de regarder si MAP65.3 appartient à ce complexe régulateur au niveau des kinétochores de MAP associée aux extrémités (+) des MT. Une des pistes possibles pourrait être l'analyse de l'activation du SAC dans des plantes mutantes *map65.3* en étudiant la localisation subcellulaire des protéines et leurs potentielles relocalisations aux kinétochores. L'analyse de doubles mutants *map65.3-bub* pourrait également révéler quelques informations supplémentaires également: en plus du phénotype très sérieux de *map65.3*, il serait possible d'observer une aggravation de congression et ségrégation chromosomique, conduisant à la formation de micronoyaux supplémentaires. En ce qui concerne le rôle de MAP65.3 dans le contrôle de l'expansion du phragmoplaste, une seule des protéines étudiées pourrait être impliquée dans ce processus. L'étude de la localisation subcellulaire de BUB3.1 pourrait révéler une perte de sa colocalisation au niveau du phragmoplaste dans un fond génétique *map65.3*. Ces différentes études permettraient de révéler la potentielle double implication de MAP65.3 ainsi que de BUB3.1 lors de l'accrochage des microtubules aux kinétochores ou lors de la coordination entre la formation du fuseau mitotique et la cytokinèse.

L'étude du rôle de ce complexe protéique de surveillance de la mitose lors de la formation des cellules géantes aurait du permettre de mieux comprendre les dérégulations du cycle cellulaire engendré par le nématode lors de l'interaction compatible. L'analyse cytologique (nombre et ploïdie des noyaux) de galles induites chez les différents mutants permettra de déterminer si l'inactivation des composants du SAC modifie l'ontogénèse des cellules géantes. Quoiqu'il en soit, l'APC/C tient un rôle clef dans le mécanisme d'endoréduplication, et certains de ces activateurs tel que CCS52A a été retrouvé induit lors de la formation du site nourricier. Il serait intéressant d'étudier sa régulation

qu'elle soit directement ou indirectement contrôlée par le nématode. Dans certains cas de parasites obligatoires chez l'humain, certains virus manipulent le cycle cellulaire de l'hôte en ciblant directement l'APC/C, l'inhibant ou le manipulant pour leurs propres bénéfices (Mo et al., 2012).

Le travail effectué au cours de cette thèse a permis l'identification d'un processus clef de la division cellulaire : le « Mitotic Checkpoint Complex » chez *Arabidopsis*. Malgré l'absence de phénotypes sérieux attendus, ces résultats ont constitué une avancée scientifique dans la compréhension du processus de la mitose chez les végétaux. L'étude plus approfondie de la cible du MCC, l'APC/C pourrait permettre une meilleure compréhension de l'étude des interactions plantes-pathogènes mais également de processus cellulaires fondamentaux du développement chez les végétaux. La compréhension des mécanismes moléculaires manipulés par les agents pathogènes lors du développement de la maladie a pour objectif final de développer de nouvelles méthodes de lutte contre ces agents pathogènes plus respectueuses de l'environnement.

REFERENCES

- Abad, P., Gouzy, J., Aury, J.-M., Castagnone-Sereno, P., Danchin, E.G.J., Deleury, E., Perfus-Barbeoch, L., Anthouard, V., Artiguenave, F., Blok, V.C., et al. (2008). Genome sequence of the metazoan plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Nat. Biotechnol.* *26*, 909–915.
- Abrieu, A., Kahana, J.A., Wood, K.W., and Cleveland, D.W. (2000). CENP-E as an essential component of the mitotic checkpoint in vitro. *Cell* *102*, 817–826.
- Abrieu, A., Magnaghi-Jaulin, L., Kahana, J.A., Peter, M., Castro, A., Vigneron, S., Lorca, T., Cleveland, D.W., and Labbé, J.C. (2001). Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell* *106*, 83–93.
- Akiyoshi, B., Sarangapani, K.K., Powers, A.F., Nelson, C.R., Reichow, S.L., Arellano-Santoyo, H., Gonen, T., Ranish, J.A., Asbury, C.L., and Biggins, S. (2010). Tension directly stabilizes reconstituted kinetochore-microtubule attachments. *Nature* *468*, 576–579.
- Allshire, R.C., and Karpen, G.H. (2008). Epigenetic regulation of centromeric chromatin: old dogs, new tricks? *Nat. Rev. Genet.* *9*, 923–937.
- Alushin, G.M., Musinipally, V., Matson, D., Tooley, J., Stukenberg, P.T., and Nogales, E. (2012). Multimodal microtubule binding by the Ndc80 kinetochore complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1161–1167.
- Ambrose, J.C., and Cyr, R. (2008). Mitotic spindle organization by the preprophase band. *Mol Plant* *1*, 950–960.
- Ambrose, J.C., Shoji, T., Kotzer, A.M., Pighin, J.A., and Wasteneys, G.O. (2007). The Arabidopsis CLASP gene encodes a microtubule-associated protein involved in cell expansion and division. *Plant Cell* *19*, 2763–2775.
- De Antoni, A., Pearson, C.G., Cimini, D., Canman, J.C., Sala, V., Nezi, L., Mapelli, M., Sironi, L., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2005). The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* *15*, 214–225.
- Asada, T., Kuriyama, R., and Shibaoka, H. (1997). TKRP125, a kinesin-related protein involved in the centrosome-independent organization of the cytokinetic apparatus in tobacco BY-2 cells. *J. Cell. Sci.* *110 (Pt 2)*, 179–189.
- Austin, J.R., 2nd, Seguí-Simarro, J.M., and Staehelin, L.A. (2005). Quantitative analysis of changes in spatial distribution and plus-end geometry of microtubules involved in plant-cell cytokinesis. *J. Cell. Sci.* *118*, 3895–3903.
- Babu, J.R., Jeganathan, K.B., Baker, D.J., Wu, X., Kang-Decker, N., and van Deursen, J.M. (2003). Rae1 is an essential mitotic checkpoint regulator that cooperates with Bub3 to prevent chromosome missegregation. *J. Cell Biol.* *160*, 341–353.
- Bader, J.R., Kasuboski, J.M., Winding, M., Vaughan, P.S., Hinchcliffe, E.H., and Vaughan, K.T. (2011). Polo-like kinase1 is required for recruitment of dynein to kinetochores during mitosis. *J. Biol. Chem.* *286*, 20769–20777.

- Baldacci-Cresp, F., Chang, C., Maucourt, M., Deborde, C., Hopkins, J., Lecomte, P., Bernillon, S., Brouquisse, R., Moing, A., Abad, P., et al. (2012). (Homo)glutathione deficiency impairs root-knot nematode development in *Medicago truncatula*. *PLoS Pathog.* *8*, e1002471.
- Bannigan, A., Scheible, W.-R., Lukowitz, W., Fagerstrom, C., Wadsworth, P., Somerville, C., and Baskin, T.I. (2007). A conserved role for kinesin-5 in plant mitosis. *J. Cell. Sci.* *120*, 2819–2827.
- Bannigan, A., Lizotte-Waniewski, M., Riley, M., and Baskin, T.I. (2008). Emerging molecular mechanisms that power and regulate the anastral mitotic spindle of flowering plants. *Cell Motil. Cytoskeleton* *65*, 1–11.
- Banora, M.Y., Rodiuc, N., Baldacci-Cresp, F., Smertenko, A., Bleve-Zacheo, T., Mellilo, M.T., Karimi, M., Hilson, P., Evrard, J.-L., Favery, B., et al. (2011). Feeding cells induced by phytoparasitic nematodes require γ -tubulin ring complex for microtubule reorganization. *PLoS Pathog.* *7*, e1002343.
- Barcala, M., García, A., Cabrera, J., Casson, S., Lindsey, K., Favery, B., García-Casado, G., Solano, R., Fenoll, C., and Escobar, C. (2010). Early transcriptomic events in microdissected *Arabidopsis* nematode-induced giant cells. *Plant J.* *61*, 698–712.
- Barisic, M., Sohm, B., Mikolcevic, P., Wandke, C., Rauch, V., Ringer, T., Hess, M., Bonn, G., and Geley, S. (2010). Spindly/CCDC99 is required for efficient chromosome congression and mitotic checkpoint regulation. *Mol. Biol. Cell* *21*, 1968–1981.
- Barnhart, E.L., Dorer, R.K., Murray, A.W., and Schuyler, S.C. (2011). Reduced Mad2 expression keeps relaxed kinetochores from arresting budding yeast in mitosis. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2448–2457.
- Barthels, N., Lee, F.M. van der, Klap, J., Goddijn, O.J., Karimi, M., Puzio, P., Grundler, F.M., Ohl, S.A., Lindsey, K., Robertson, L., et al. (1997). Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *Plant Cell* *9*, 2119–2134.
- Bar-Or, C., Kapulnik, Y., and Koltai, H. (2005). A broad characterization of the transcriptional profile of the compatible tomato response to the plant parasitic root knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Eur J Plant Pathol* *111*, 181–192.
- Basu, J., Bousbaa, H., Logarinho, E., Li, Z., Williams, B.C., Lopes, C., Sunkel, C.E., and Goldberg, M.L. (1999). Mutations in the essential spindle checkpoint gene *bub1* cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* *146*, 13–28.
- Bellafiore, S., Shen, Z., Rosso, M.-N., Abad, P., Shih, P., and Briggs, S.P. (2008). Direct identification of the *Meloidogyne incognita* secretome reveals proteins with host cell reprogramming potential. *PLoS Pathog.* *4*, e1000192.
- Bernard, P., Hardwick, K., and Javerzat, J.P. (1998). Fission yeast *bub1* is a mitotic centromere protein essential for the spindle checkpoint and the preservation of correct ploidy through mitosis. *J. Cell Biol.* *143*, 1775–1787.
- Bernard, P., Maure, J.F., and Javerzat, J.P. (2001). Fission yeast *Bub1* is essential in setting up the meiotic pattern of chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* *3*, 522–526.
- Bharadwaj, R., and Yu, H. (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* *23*, 2016–2027.
- Bhatarai, K.K., Xie, Q.-G., Mantelin, S., Bishnoi, U., Girke, T., Navarre, D.A., and Kaloshian, I. (2008). Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway. *Mol. Plant Microbe Interact.* *21*, 1205–1214.

- Biggins, S., and Walczak, C.E. (2003). Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr. Biol.* *13*, R449–460.
- Binarová, P., Cenklová, V., Hause, B., Kubátová, E., Lysák, M., Dolezel, J., Bögre, L., and Dráber, P. (2000). Nuclear gamma-tubulin during acentriolar plant mitosis. *Plant Cell* *12*, 433–442.
- Binarová, P., Cenklová, V., Procházková, J., Dostkocilová, A., Volc, J., Vrlík, M., and Bögre, L. (2006). Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *18*, 1199–1212.
- Birchler, J.A., Gao, Z., Sharma, A., Presting, G.G., and Han, F. (2011). Epigenetic aspects of centromere function in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* *14*, 217–222.
- Blok, V.C., Jones, J.T., Phillips, M.S., and Trudgill, D.L. (2008). Parasitism genes and host range disparities in biotrophic nematodes: the conundrum of polyphagy versus specialisation. *BioEssays* *30*, 249–259.
- Bolanos-Garcia, V.M., and Blundell, T.L. (2011). BUB1 and BUBR1: multifaceted kinases of the cell cycle. *Trends Biochem. Sci.* *36*, 141–150.
- Bolanos-Garcia, V.M., Beaufile, S., Renault, A., Grossmann, J.G., Brewerton, S., Lee, M., Venkitaraman, A., and Blundell, T.L. (2005). The Conserved N-Terminal Region of the Mitotic Checkpoint Protein BUBR1: A Putative TPR Motif of High Surface Activity. *Biophys J* *89*, 2640–2649.
- Bolanos-Garcia, V.M., Lischetti, T., Matak-Vinković, D., Cota, E., Simpson, P.J., Chirgadze, D.Y., Spring, D.R., Robinson, C.V., Nilsson, J., and Blundell, T.L. (2011). Structure of a Blinkin-BUBR1 complex reveals an interaction crucial for kinetochore-mitotic checkpoint regulation via an unanticipated binding Site. *Structure* *19*, 1691–1700.
- Bonaccorsi, S., Giansanti, M.G., and Gatti, M. (1998). Spindle self-organization and cytokinesis during male meiosis in asterless mutants of *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Biol.* *142*, 751–761.
- Bouchez, D., Camilleri, C., and Caboche, M. (1993). A binary vector based on Basta resistance for in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences. Série 3, Sciences de La Vie* *316*, 1188–1193.
- Brodsky, W.Y., and Uryvaeva, I.V. (1977). Cell polyploidy: its relation to tissue growth and function. *Int. Rev. Cytol.* *50*, 275–332.
- Brown, R.C., and Lemmon, B.E. (1997). Transition from mitotic apparatus to cytokinetic apparatus in pollen mitosis of the slipper orchid. *Protoplasma* *198*, 43–52.
- Brown, D.J., Robertson, W.M., and Trudgill, D.L. (1995). Transmission of viruses by plant nematodes. *Annu Rev Phytopathol* *33*, 223–249.
- Bryant, J.A., and Francis, D. (2011). The plant cell cycle. *Ann Bot* *107*, 1063.
- Buffin, E., Emre, D., and Karess, R.E. (2007). Flies without a spindle checkpoint. *Nat. Cell Biol.* *9*, 565–572.
- Burgos-Rivera, B., and Dawe, R.K. (2012). An *Arabidopsis* tissue-specific RNAi method for studying genes essential to mitosis. *PLoS ONE* *7*, e51388.
- Burton, J.L., and Solomon, M.J. (2007). Mad3p, a pseudosubstrate inhibitor of APC^{Cdc20} in the spindle assembly checkpoint. *Genes Dev.* *21*, 655–667.

- Buschhorn, B.A., Petzold, G., Galova, M., Dube, P., Kraft, C., Herzog, F., Stark, H., and Peters, J.-M. (2011). Substrate binding on the APC/C occurs between the coactivator Cdh1 and the processivity factor Doc1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 6–13.
- Caillaud, M.-C., Dubreuil, G., Quentin, M., Perfus-Barbeoch, L., Lecomte, P., de Almeida Engler, J., Abad, P., Rosso, M.-N., and Favery, B. (2008a). Root-knot nematodes manipulate plant cell functions during a compatible interaction. *J. Plant Physiol.* *165*, 104–113.
- Caillaud, M.-C., Lecomte, P., Jammes, F., Quentin, M., Pagnotta, S., Andrio, E., de Almeida Engler, J., Marfaing, N., Gounon, P., Abad, P., et al. (2008b). MAP65-3 microtubule-associated protein is essential for nematode-induced giant cell ontogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* *20*, 423–437.
- 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.
- Caillaud, M.-C. (2009). Etude de l'Organisation du Cytosquelette dans les Cellules Géantes induites par le Nématode à Galles Meloidogyne incognita chez la plante modèle Arabidopsis thaliana. Thèse de l'Université Nice Sophia Antipolis.
- Campbell, L., and Hardwick, K.G. (2003). Analysis of Bub3 spindle checkpoint function in *Xenopus* egg extracts. *J. Cell. Sci.* *116*, 617–628.
- Capron, A., Okrész, L., and Genschik, P. (2003). First glance at the plant APC/C, a highly conserved ubiquitin-protein ligase. *Trends Plant Sci.* *8*, 83–89.
- Castagnone-Sereno, P., Wajnberg, E., Bongiovanni, M., Leroy, F., and Dalmasso, A. (1994). Genetic variation in *Meloidogyne incognita* virulence against the tomato Mi resistance gene: evidence from isofemale line selection studies. *Theoret. Appl. Genetics* *88*, 749–753.
- Caudron, M., Bunt, G., Bastiaens, P., and Karsenti, E. (2005). Spatial coordination of spindle assembly by chromosome-mediated signaling gradients. *Science* *309*, 1373–1376.
- Cebolla, A., Vinardell, J.M., Kiss, E., Oláh, B., Roudier, F., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (1999). The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* *18*, 4476–4484.
- Chan, G.K., and Yen, T.J. (2003). The mitotic checkpoint: a signaling pathway that allows a single unattached kinetochore to inhibit mitotic exit. *Prog Cell Cycle Res* *5*, 431–439.
- Chan, G.K., Schaar, B.T., and Yen, T.J. (1998). Characterization of the kinetochore binding domain of CENP-E reveals interactions with the kinetochore proteins CENP-F and hBUBR1. *J. Cell Biol.* *143*, 49–63.
- Chan, G.K., Jablonski, S.A., Sudakin, V., Hittle, J.C., and Yen, T.J. (1999a). Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J. Cell Biol.* *146*, 941–954.
- Chan, J., Jensen, C.G., Jensen, L.C., Bush, M., and Lloyd, C.W. (1999b). The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *96*, 14931–14936.
- Chan, J., Calder, G., Fox, S., and Lloyd, C. (2005). Localization of the Microtubule End Binding Protein EB1 Reveals Alternative Pathways of Spindle Development in Arabidopsis Suspension Cells. *Plant Cell* *17*, 1737–1748.

- Chan, Y.W., Fava, L.L., Uldschmid, A., Schmitz, M.H.A., Gerlich, D.W., Nigg, E.A., and Santamaria, A. (2009). Mitotic control of kinetochore-associated dynein and spindle orientation by human Spindly. *J. Cell Biol.* *185*, 859–874.
- Chang-Jie, J., and Sonobe, S. (1993). Identification and preliminary characterization of a 65 kDa higher-plant microtubule-associated protein. *J Cell Sci* *105*, 891–901.
- Chao, W.C.H., Kulkarni, K., Zhang, Z., Kong, E.H., and Barford, D. (2012). Structure of the mitotic checkpoint complex. *Nature* *484*, 208–213.
- Cheeseman, I.M., and Desai, A. (2008). Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 33–46.
- Cheeseman, I.M., Enquist-Newman, M., Müller-Reichert, T., Drubin, D.G., and Barnes, G. (2001). Mitotic spindle integrity and kinetochore function linked by the Duo1p/Dam1p complex. *J. Cell Biol.* *152*, 197–212.
- Cheeseman, I.M., Chappie, J.S., Wilson-Kubalek, E.M., and Desai, A. (2006). The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* *127*, 983–997.
- Chen, R.-H. (2002). BubR1 is essential for kinetochore localization of other spindle checkpoint proteins and its phosphorylation requires Mad1. *J. Cell Biol.* *158*, 487–496.
- Chen, R.-H. (2004). Phosphorylation and activation of Bub1 on unattached chromosomes facilitate the spindle checkpoint. *EMBO J.* *23*, 3113–3121.
- Chen, R.H., Waters, J.C., Salmon, E.D., and Murray, A.W. (1996). Association of spindle assembly checkpoint component X MAD2 with unattached kinetochores. *Science* *274*, 242–246.
- Choi, E., Choe, H., Min, J., Choi, J.Y., Kim, J., and Lee, H. (2009). BubR1 acetylation at prometaphase is required for modulating APC/C activity and timing of mitosis. *EMBO J.* *28*, 2077–2089.
- Chung, E., and Chen, R.-H. (2003). Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint. *Nat. Cell Biol.* *5*, 748–753.
- Ciferri, C., Pasqualato, S., Screpanti, E., Varetto, G., Santaguida, S., Dos Reis, G., Maiolica, A., Polka, J., De Luca, J.G., De Wulf, P., et al. (2008). Implications for kinetochore-microtubule attachment from the structure of an engineered Ndc80 complex. *Cell* *133*, 427–439.
- Cimini, D., Moree, B., Canman, J.C., and Salmon, E.D. (2003). Merotelic kinetochore orientation occurs frequently during early mitosis in mammalian tissue cells and error correction is achieved by two different mechanisms. *J. Cell. Sci.* *116*, 4213–4225.
- Clément, M., Ketelaar, T., Rodiuc, N., Banora, M.Y., Smertenko, A., Engler, G., Abad, P., Hussey, P.J., and de Almeida Engler, J. (2009). Actin-depolymerizing factor2-mediated actin dynamics are essential for root-knot nematode infection of *Arabidopsis*. *Plant Cell* *21*, 2963–2979.
- Cleveland, D.W., Mao, Y., and Sullivan, K.F. (2003). Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* *112*, 407–421.
- Cui, Y., Cheng, X., Zhang, C., Zhang, Y., Li, S., Wang, C., and Guadagno, T.M. (2010). Degradation of the human mitotic checkpoint kinase Mps1 is cell cycle-regulated by APC-cCdc20 and APC-cCdh1 ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* *285*, 32988–32998.

- D'Angiolella, V., Mari, C., Nocera, D., Rametti, L., and Grieco, D. (2003). The spindle checkpoint requires cyclin-dependent kinase activity. *Genes Dev.* *17*, 2520–2525.
- D'Arcy, S., Davies, O.R., Blundell, T.L., and Bolanos-Garcia, V.M. (2010). Defining the molecular basis of BubR1 kinetochore interactions and APC/C-CDC20 inhibition. *J. Biol. Chem.* *285*, 14764–14776.
- Damiani, I., Baldacci-Cresp, F., Hopkins, J., Andrio, E., Balzergue, S., Lecomte, P., Puppo, A., Abad, P., Favery, B., and Hérouart, D. (2012). Plant genes involved in harbouring symbiotic rhizobia or pathogenic nematodes. *New Phytol.* *194*, 511–522.
- Danchin, E.G.J., and Rosso, M.-N. (2012). Lateral gene transfers have polished animal genomes: lessons from nematodes. *Front Cell Infect Microbiol* *2*, 27.
- Danchin, E.G.J., Rosso, M.-N., Vieira, P., de Almeida-Engler, J., Coutinho, P.M., Henrissat, B., and Abad, P. (2010). Multiple lateral gene transfers and duplications have promoted plant parasitism ability in nematodes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 17651–17656.
- Daniel, J.A., Keyes, B.E., Ng, Y.P.Y., Freeman, C.O., and Burke, D.J. (2006). Diverse Functions of Spindle Assembly Checkpoint Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *172*, 53–65.
- Davis, E.L., Hussey, R.S., Baum, T.J., Bakker, J., Schots, A., Rosso, M.-N., and Abad, P. (2000). NEMATODE PARASITISM GENES. *Annu Rev Phytopathol* *38*, 365–396.
- Davis, E.L., Hussey, R.S., and Baum, T.J. (2004). Getting to the roots of parasitism by nematodes. *Trends Parasitol.* *20*, 134–141.
- Dawe, R.K., and Cande, W.Z. (1996). Induction of centromeric activity in maize by suppressor of meiotic drive 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *93*, 8512–8517.
- De Almeida Engler, J., and Gheysen, G. (2013). Nematode-induced endoreduplication in plant host cells: why and how? *Mol. Plant Microbe Interact.* *26*, 17–24.
- De Almeida Engler, J., De Vleeschauwer, V., Burssens, S., Celenza, J.L., Jr, Inzé, D., Van Montagu, M., Engler, G., and Gheysen, G. (1999). Molecular markers and cell cycle inhibitors show the importance of cell cycle progression in nematode-induced galls and syncytia. *Plant Cell* *11*, 793–808.
- De Almeida Engler, J., Van Poucke, K., Karimi, M., De Groodt, R., Gheysen, G., Engler, G., and Gheysen, G. (2004). Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant J.* *38*, 12–26.
- De Almeida Engler, J., Kyndt, T., Vieira, P., Van Cappelle, E., Boudolf, V., Sanchez, V., Escobar, C., De Veylder, L., Engler, G., Abad, P., et al. (2012). CCS52 and DEL1 genes are key components of the endocycle in nematode-induced feeding sites. *The Plant Journal* *72*, 185–198.
- De Oliveira, E.A.G., Romeiro, N.C., Ribeiro, E. da S., Santa-Catarina, C., Oliveira, A.E.A., Silveira, V., de Souza Filho, G.A., Venancio, T.M., and Cruz, M.A.L. (2012). Structural and functional characterization of the protein kinase Mps1 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* *7*, e45707.
- DeLuca, J.G., Howell, B.J., Canman, J.C., Hickey, J.M., Fang, G., and Salmon, E.D. (2003). Nuf2 and Hec1 are required for retention of the checkpoint proteins Mad1 and Mad2 to kinetochores. *Curr. Biol.* *13*, 2103–2109.
- DeLuca, J.G., Dong, Y., Hergert, P., Strauss, J., Hickey, J.M., Salmon, E.D., and McEwen, B.F. (2005). Hec1 and nuf2 are core components of the kinetochore outer plate essential for organizing microtubule attachment sites. *Mol. Biol. Cell* *16*, 519–531.

- Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F.R., and Houben, A. (2005). Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in Arabidopsis and other plants. *Plant Cell* *17*, 836–848.
- Demidov, D., Hesse, S., Tewes, A., Rutten, T., Fuchs, J., Ashtiyani, R.K., Lein, S., Fischer, A., Reuter, G., and Houben, A. (2009). Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in Arabidopsis. *Plant J.* *59*, 221–230.
- De Souza, C.P., Hashmi, S.B., Nayak, T., Oakley, B., and Osmani, S.A. (2009). Mlp1 acts as a mitotic scaffold to spatially regulate spindle assembly checkpoint proteins in *Aspergillus nidulans*. *Mol. Biol. Cell* *20*, 2146–2159.
- Dhonukshe, P., Vischer, N., and Gadella, T.W.J., Jr (2006). Contribution of microtubule growth polarity and flux to spindle assembly and functioning in plant cells. *J. Cell. Sci.* *119*, 3193–3205.
- 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 Mol. Biol.* *79*, 203–216.
- Ditchfield, C., Johnson, V.L., Tighe, A., Ellston, R., Haworth, C., Johnson, T., Mortlock, A., Keen, N., and Taylor, S.S. (2003). Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J. Cell Biol.* *161*, 267–280.
- Dixon, R.A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C.-J., Reddy, M.S.S., and Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence—a genomics perspective. *Mol. Plant Pathol.* *3*, 371–390.
- Djian-Caporalino, C., and Panchaud-Mattei, E. (1998). Lutte biologique contre les nématodes phytoparasites (dossier nématodes).
- Djian-Caporalino, C., Fazari, A., Arguel, M.J., Vernie, T., VandeCastele, C., Faure, I., Brunoud, G., Pijarowski, L., Palloix, A., Lefebvre, V., et al. (2007). Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) Me resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome. *Theor. Appl. Genet.* *114*, 473–486.
- 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.
- Dorhout, R., Gommers, F.J., and Kollöffel, C. (1993). Phloem transport of carboxyfluorescein through tomato roots infected with *Meloidogyne incognita*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* *43*, 1–10.
- Doyle, E.A., and Lambert, K.N. (2003). *Meloidogyne javanica* chorismate mutase 1 alters plant cell development. *Mol. Plant Microbe Interact.* *16*, 123–131.
- Du, Y., and Dawe, R.K. (2007). Maize NDC80 is a constitutive feature of the central kinetochore. *Chromosome Res.* *15*, 767–775.
- Dubreuil, G., Magliano, M., Deleury, E., Abad, P., and Rosso, M.N. (2007). Transcriptome analysis of root-knot nematode functions induced in the early stages of parasitism. *New Phytol.* *176*, 426–436.
- Elowe, S., Dulla, K., Uldschmid, A., Li, X., Dou, Z., and Nigg, E.A. (2010). Uncoupling of the spindle-checkpoint and chromosome-congression functions of BubR1. *J. Cell. Sci.* *123*, 84–94.
- Elowe, S. (2011). Bub1 and BubR1: at the interface between chromosome attachment and the spindle checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 3085–3093.

- Eloy, N.B., Coppens, F., Beemster, G.T.S., Hemerly, A.S., and Ferreira, P.C.G. (2006). The Arabidopsis anaphase promoting complex (APC): regulation through subunit availability in plant tissues. *Cell Cycle* 5, 1957–1965.
- 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. *Plant J.* 68, 351–363.
- Emanuele, M.J., Lan, W., Jwa, M., Miller, S.A., Chan, C.S.M., and Stukenberg, P.T. (2008). Aurora B kinase and protein phosphatase 1 have opposing roles in modulating kinetochore assembly. *J. Cell Biol.* 181, 241–254.
- Espeut, J., Cheerambathur, D.K., Krenning, L., Oegema, K., and Desai, A. (2012). Microtubule binding by KNL-1 contributes to spindle checkpoint silencing at the kinetochore. *J. Cell Biol.* 196, 469–482.
- Eulgem, T. (2005). Regulation of the Arabidopsis defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* 10, 71–78.
- Eveland, A.L., and Jackson, D.P. (2012). Sugars, signalling, and plant development. *J. Exp. Bot.* 63, 3367–3377.
- Fache, V., Gaillard, J., Van Damme, D., Geelen, D., Neumann, E., Stoppin-Mellet, V., and Vantard, M. (2010). Arabidopsis kinetochore fiber-associated MAP65-4 cross-links microtubules and promotes microtubule bundle elongation. *Plant Cell* 22, 3804–3815.
- Fang, G. (2002). Checkpoint protein BubR1 acts synergistically with Mad2 to inhibit anaphase-promoting complex. *Mol. Biol. Cell* 13, 755–766.
- Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M.W. (1998). The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. *Genes Dev.* 12, 1871–1883.
- Fava, L.L., Kaulich, M., Nigg, E.A., and Santamaria, A. (2011). Probing the in vivo function of Mad1:C-Mad2 in the spindle assembly checkpoint. *EMBO J.* 30, 3322–3336.
- Favery, B., Lecomte, P., Gil, N., Bechtold, N., Bouchez, D., Dalmasso, A., and Abad, P. (1998). RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *EMBO J.* 17, 6799–6811.
- Favery, B., Complainville, A., Vinardell, J.M., Lecomte, P., Vaubert, D., Mergaert, P., Kondorosi, A., Kondorosi, E., Crespi, M., and Abad, P. (2002). The endosymbiosis-induced genes ENOD40 and CCS52a are involved in endoparasitic-nematode interactions in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 1008–1013.
- Favery, B., Chelysheva, L.A., Lebris, M., Jammes, F., Marmagne, A., De Almeida-Engler, J., Lecomte, P., Vaury, C., Arkowitz, R.A., and Abad, P. (2004). Arabidopsis formin AtFH6 is a plasma membrane-associated protein upregulated in giant cells induced by parasitic nematodes. *Plant Cell* 16, 2529–2540.
- Fernius, J., and Hardwick, K.G. (2007). Bub1 kinase targets Sgo1 to ensure efficient chromosome biorientation in budding yeast mitosis. *PLoS Genet.* 3, e213.
- Ferrand, A., Chevrier, V., Chauvin, J.-P., and Birnbaum, D. (2009). Ajuba: a new microtubule-associated protein that interacts with BUBR1 and Aurora B at kinetochores in metaphase. *Biol. Cell* 101, 221–235.

- Foley, E.A., and Kapoor, T.M. (2012). Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signalling at the kinetochore. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 25–37.
- Foster, S.A., and Morgan, D.O. (2012). The APC/C subunit Mnd2/Apc15 promotes Cdc20 autoubiquitination and spindle assembly checkpoint inactivation. *Mol. Cell* *47*, 921–932.
- Fosu-Nyarko, J., Jones, M.G.K., and Wang, Z. (2009). Functional characterization of transcripts expressed in early-stage *Meloidogyne javanica*-induced giant cells isolated by laser microdissection. *Mol. Plant Pathol.* *10*, 237–248.
- Fraschini, R., Beretta, A., Sironi, L., Musacchio, A., Lucchini, G., and Piatti, S. (2001). Bub3 interaction with Mad2, Mad3 and Cdc20 is mediated by WD40 repeats and does not require intact kinetochores. *EMBO J.* *20*, 6648–6659.
- Fudali, S.L., Wang, C., and Williamson, V.M. (2013). Ethylene signaling pathway modulates attractiveness of host roots to the root-knot nematode *Meloidogyne hapla*. *Mol. Plant Microbe Interact.* *26*, 75–86.
- Fuller, V.L., Lilley, C.J., Atkinson, H.J., and Urwin, P.E. (2007). Differential gene expression in *Arabidopsis* following infection by plant-parasitic nematodes *Meloidogyne incognita* and *Heterodera schachtii*. *Mol. Plant Pathol.* *8*, 595–609.
- Furlong, F., Fitzpatrick, P., O'Toole, S., Phelan, S., McGrogan, B., Maguire, A., O'Grady, A., Gallagher, M., Prencipe, M., McGoldrick, A., et al. (2012). Low MAD2 expression levels associate with reduced progression-free survival in patients with high-grade serous epithelial ovarian cancer. *J. Pathol.* *226*, 746–755.
- Gal, T.Z., Aussenberg, E.R., Burdman, S., Kapulnik, Y., and Koltai, H. (2006). Expression of a plant expansin is involved in the establishment of root knot nematode parasitism in tomato. *Planta* *224*, 155–162.
- Gao, X., Chen, Z., Zhang, J., Li, X., Chen, G., Li, X., and Wu, C. (2012). OsLIS-L1 encoding a lissencephaly type-1-like protein with WD40 repeats is required for plant height and male gametophyte formation in rice. *Planta* *235*, 713–727.
- Gao, Y.-F., Li, T., Chang, Y., Wang, Y.-B., Zhang, W.-N., Li, W.-H., He, K., Mu, R., Zhen, C., Man, J.-H., et al. (2011). Cdk1-phosphorylated CUEDC2 promotes spindle checkpoint inactivation and chromosomal instability. *Nat. Cell Biol.* *13*, 924–933.
- Gassmann, R., Essex, A., Hu, J.-S., Maddox, P.S., Motegi, F., Sugimoto, A., O'Rourke, S.M., Bowerman, B., McLeod, I., Yates, J.R., 3rd, et al. (2008). A new mechanism controlling kinetochore-microtubule interactions revealed by comparison of two dynein-targeting components: SPDL-1 and the Rod/Zwilch/Zw10 complex. *Genes Dev.* *22*, 2385–2399.
- Gassmann, R., Holland, A.J., Varma, D., Wan, X., Civril, F., Cleveland, D.W., Oegema, K., Salmon, E.D., and Desai, A. (2010). Removal of Spindly from microtubule-attached kinetochores controls spindle checkpoint silencing in human cells. *Genes Dev.* *24*, 957–971.
- Genschik, Criqui, Parmentier, Derevier, and Fleck (1998). Cell cycle -dependent proteolysis in plants. Identification Of the destruction box pathway and metaphase arrest produced by the proteasome inhibitor mg132. *Plant Cell* *10*, 2063–2076.
- Gheysen, G., and Fenoll, C. (2002). Gene expression in nematode feeding sites. *Annu Rev Phytopathol* *40*, 191–219.

- Gheysen, G., and Mitchum, M.G. (2011). How nematodes manipulate plant development pathways for infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* *14*, 415–421.
- Gheysen, G., Engler, J. de A., and Montagu, M. van (1997). Cell Cycle Regulation in Nematode Feeding Sites. In *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions*, C. Fenoll, F.M.W. Grundler, and S.A. Ohl, eds. (Springer Netherlands), pp. 120–132.
- Giazer, I., Orion, D., and Apelbaum, A. (1983). Interrelationships between Ethylene Production, Gall Formation, and Root-knot Nematode Development in Tomato Plants Infected with *Meloidogyne javanica*. *J Nematol* *15*, 539–544.
- Gordon, D.J., Resio, B., and Pellman, D. (2012). Causes and consequences of aneuploidy in cancer. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 189–203.
- Goshima, G., and Kimura, A. (2010). New look inside the spindle: microtubule-dependent microtubule generation within the spindle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 44–49.
- Goshima, G., Nédélec, F., and Vale, R.D. (2005). Mechanisms for focusing mitotic spindle poles by minus end-directed motor proteins. *J. Cell Biol.* *171*, 229–240.
- Goverse, A., de Engler, J.A., Verhees, J., van der Krol, S., Helder, J.H., and Gheysen, G. (2000). Cell cycle activation by plant parasitic nematodes. *Plant Mol. Biol.* *43*, 747–761.
- Granger, C., and Cyr, R. (2001). Use of abnormal preprophase bands to decipher division plane determination. *J. Cell. Sci.* *114*, 599–607.
- Greene, L.M., Campiani, G., Lawler, M., Williams, D.C., and Zisterer, D.M. (2008). BubR1 is required for a sustained mitotic spindle checkpoint arrest in human cancer cells treated with tubulin-targeting pyrrolo-1,5-benzoxazepines. *Mol. Pharmacol.* *73*, 419–430.
- Grunewald, W., Karimi, M., Wieczorek, K., Van de Cappelle, E., Wischnitzki, E., Grundler, F., Inzé, D., Beeckman, T., and Gheysen, G. (2008). A role for AtWRKY23 in feeding site establishment of plant-parasitic nematodes. *Plant Physiol.* *148*, 358–368.
- Guo, Y., Kim, C., Ahmad, S., Zhang, J., and Mao, Y. (2012). CENP-E--dependent BubR1 autophosphorylation enhances chromosome alignment and the mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.* *198*, 205–217.
- Habu, T., Kim, S.H., Weinstein, J., and Matsumoto, T. (2002). Identification of a MAD2-binding protein, CMT2, and its role in mitosis. *EMBO J.* *21*, 6419–6428.
- Haegeman, A., Bauters, L., Kyndt, T., Rahman, M.M., and Gheysen, G. (2012a). Identification of candidate effector genes in the transcriptome of the rice root knot nematode *Meloidogyne graminicola*. *Mol. Plant Pathol.*
- Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J.T., and Gheysen, G. (2012b). Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* *492*, 19–31.
- Hagan, R.S., Manak, M.S., Buch, H.K., Meier, M.G., Meraldi, P., Shah, J.V., and Sorger, P.K. (2011). p31(comet) acts to ensure timely spindle checkpoint silencing subsequent to kinetochore attachment. *Mol. Biol. Cell* *22*, 4236–4246.
- Hajeri, V.A., Stewart, A.M., Moore, L.L., and Padilla, P.A. (2008). Genetic analysis of the spindle checkpoint genes *san-1*, *mdf-2*, *bub-3* and the CENP-F homologues *hcp-1* and *hcp-2* in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Division* *3*, 6.

- Hamada, T. (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *J. Plant Res.* *120*, 79–98.
- Hamamouch, N., Li, C., Seo, P.J., Park, C.-M., and Davis, E.L. (2011). Expression of Arabidopsis pathogenesis-related genes during nematode infection. *Mol. Plant Pathol.* *12*, 355–364.
- Hammes, U.Z., Schachtman, D.P., Berg, R.H., Nielsen, E., Koch, W., McIntyre, L.M., and Taylor, C.G. (2005). Nematode-induced changes of transporter gene expression in Arabidopsis roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* *18*, 1247–1257.
- Hardham, A.R. (2013). Microtubules and biotic interactions. *Plant J.* doi: 10.1111/tpj.12171
- Hardwick, K.G., Johnston, R.C., Smith, D.L., and Murray, A.W. (2000). MAD3 encodes a novel component of the spindle checkpoint which interacts with Bub3p, Cdc20p, and Mad2p. *J. Cell Biol.* *148*, 871–882.
- He, X., Patterson, T.E., and Sazer, S. (1997). The *Schizosaccharomyces pombe* spindle checkpoint protein mad2p blocks anaphase and genetically interacts with the anaphase-promoting complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 7965–7970.
- Heald, R., Tournebize, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A., and Karsenti, E. (1996). Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* *382*, 420–425.
- Henikoff, S., and Furuyama, T. (2010). Epigenetic inheritance of centromeres. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *75*, 51–60.
- Herzog, F., Primorac, I., Dube, P., Lenart, P., Sander, B., Mechtler, K., Stark, H., and Peters, J.-M. (2009). Structure of the anaphase-promoting complex/cyclosome interacting with a mitotic checkpoint complex. *Science* *323*, 1477–1481.
- Hewezi, T., and Baum, T.J. (2013). Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* *26*, 9–16.
- Hewitt, L., Tighe, A., Santaguida, S., White, A.M., Jones, C.D., Musacchio, A., Green, S., and Taylor, S.S. (2010). Sustained Mps1 activity is required in mitosis to recruit O-Mad2 to the Mad1-C-Mad2 core complex. *J. Cell Biol.* *190*, 25–34.
- Heyman, J., and De Veylder, L. (2012). The anaphase-promoting complex/cyclosome in control of plant development. *Mol Plant* *5*, 1182–1194.
- 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. *Plant Cell* *23*, 4394–4410.
- Ho, C.-M.K., Hotta, T., Guo, F., Roberson, R.W., Lee, Y.-R.J., and Liu, B. (2011). Interaction of antiparallel microtubules in the phragmoplast is mediated by the microtubule-associated protein MAP65-3 in Arabidopsis. *Plant Cell* *23*, 2909–2923.
- Hoth, S., Stadler, R., Sauer, N., and Hammes, U.Z. (2008). Differential vascularization of nematode-induced feeding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 12617–12622.
- Hotta, T., Haraguchi, T., and Mizuno, K. (2007). A novel function of plant histone H1: microtubule nucleation and continuous plus end association. *Cell Struct. Funct.* *32*, 79–87.

- Houben, A., and Schubert, I. (2003). DNA and proteins of plant centromeres. *Current Opinion in Plant Biology* 6, 554–560.
- Howell, B.J., Hoffman, D.B., Fang, G., Murray, A.W., and Salmon, E.D. (2000). Visualization of Mad2 dynamics at kinetochores, along spindle fibers, and at spindle poles in living cells. *J. Cell Biol.* 150, 1233–1250.
- Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J. Cell Biol.* 155, 1159–1172.
- Howell, B.J., Moree, B., Farrar, E.M., Stewart, S., Fang, G., and Salmon, E.D. (2004). Spindle checkpoint protein dynamics at kinetochores in living cells. *Curr. Biol.* 14, 953–964.
- Hoyt, M.A., Totis, L., and Roberts, B.T. (1991). *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell* 66, 507–517.
- Huang, C. (1985). Formation, anatomy, and physiology of giant cells induced by root-knot nematodes. In *An Advanced Treatise on Meloidogyne, Vol 1, Biology and Control.*, p. pp 115–164.
- Huang, H., and Yen, T.J. (2009). BubR1 is an effector of multiple mitotic kinases that specifies kinetochore: microtubule attachments and checkpoint. *Cell Cycle* 8, 1164–1167.
- Huang, G., Gao, B., Maier, T., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., and Hussey, R.S. (2003). A profile of putative parasitism genes expressed in the esophageal gland cells of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 376–381.
- Huang, G., Dong, R., Maier, T., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., and Hussey, R.S. (2004). Use of solid-phase subtractive hybridization for the identification of parasitism gene candidates from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Pathol.* 5, 217–222.
- Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., and Hussey, R.S. (2005a). Developmental expression and molecular analysis of two *Meloidogyne incognita* pectate lyase genes. *Int. J. Parasitol.* 35, 685–692.
- Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., and Hussey, R.S. (2005b). Two chorismate mutase genes from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Pathol.* 6, 23–30.
- Huang, G., Dong, R., Allen, R., Davis, E.L., Baum, T.J., and Hussey, R.S. (2006). A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 463–470.
- Hussey, R.S. (1989). Disease-Inducing Secretions of Plant-Parasitic Nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 27, 123–141.
- Hussey, R.S., and Mims, C.W. (1991). Ultrastructure of feeding tubes formed in giant-cells induced in plants by the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Protoplasma* Volume 162, Issue 2–3, pp 99–107.
- Hussey, P.J., Hawkins, T.J., Igarashi, H., Kaloriti, D., and Smertenko, A. (2002). The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol. Biol.* 50, 915–924.
- Hussey, R.S., Mims, C.W., and Iii, S.W.W. (1992). Immunocytochemical localization of callose in root cortical cells parasitized by the ring nematode *Criconebella xenoplax*. *Protoplasma* 171, 1–6.

Hutangura, P., Mathesius, U., Jones, M.G.K., and Rolfe, B.G. Auxin induction is a trigger for root gall formation caused by root-knot nematodes in white clover and is associated with the activation of the flavonoid pathway. *Australian Journal of Plant Physiology* 26, 221–231.

Ibrahim, H.M.M., Hosseini, P., Alkharouf, N.W., Hussein, E.H.A., Gamal El-Din, A.E.K.Y., Aly, M.A.M., and Matthews, B.F. (2011). Analysis of gene expression in soybean (*Glycine max*) roots in response to the root knot nematode *Meloidogyne incognita* using microarrays and KEGG pathways. *BMC Genomics* 12, 220.

Iwanaga, Y., Chi, Y.-H., Miyazato, A., Sheleg, S., Haller, K., Peloponese, J.-M., Jr, Li, Y., Ward, J.M., Benezra, R., and Jeang, K.-T. (2007). Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice. *Cancer Res.* 67, 160–166.

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*. *Plant Cell* 23, 4382–4393.

Iwata, E., Ikeda, S., Abe, N., Kobayashi, A., Kurata, M., Matsunaga, S., Yoshioka, Y., Criqui, M.-C., Genschik, P., and Ito, M. (2012). Roles of GIG1 and UVI4 in genome duplication in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal Behav* 7, 1079–1081.

Jablonski, S.A., Chan, G.K., Cooke, C.A., Earnshaw, W.C., and Yen, T.J. (1998). The hBUB1 and hBUBR1 kinases sequentially assemble onto kinetochores during prophase with hBUBR1 concentrating at the kinetochore plates in mitosis. *Chromosoma* 107, 386–396.

Jammes, F., Lecomte, P., de Almeida-Engler, J., Bitton, F., Martin-Magniette, M.-L., Renou, J.P., Abad, P., and Favery, B. (2005). Genome-wide expression profiling of the host response to root-knot nematode infection in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44, 447–458.

Janski, N., Masoud, K., Batzenschlager, M., Herzog, E., Evrard, J.-L., Houlné, G., Bourge, M., Chabouté, M.-E., and Schmit, A.-C. (2012). The GCP3-interacting proteins GIP1 and GIP2 are required for γ -tubulin complex protein localization, spindle integrity, and chromosomal stability. *Plant Cell* 24, 1171–1187.

Jaouannet, M. (2011). Caractérisation fonctionnelle d'effecteurs du nématode phytoparasite *Meloidogyne incognita* participant au succès de l'infection et à la suppression des défenses de l'hôte. Thèse de l'Université Nice Sophia Antipolis.

Jaouannet, M., Perfus-Barbeoch, L., Deleury, E., Magliano, M., Engler, G., Vieira, P., Danchin, E.G.J., Da Rocha, M., Coquillard, P., Abad, P., et al. (2012). A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei. *New Phytol.* 194, 924–931.

Jaouannet, M., Magliano, M., Arguel, M.J., Gourgues, M., Evangelisti, E., Abad, P., and Rosso, M.N. (2013). The root-knot nematode calreticulin Mi-CRT is a key effector in plant defense suppression. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 97–105.

Jarquin-Barberena, H., Dalmasso, A., Guiran, G. de, and Cardin, M.C. (1991). Acquired virulence in the plant parasitic nematode *Meloidogyne incognita*: 1. Biological analysis of the phenomenon. *Revue de Nématologie* 14, 299–303.

Jaubert, S., Ledger, T.N., Laffaire, J.B., Piotte, C., Abad, P., and Rosso, M.-N. (2002a). Direct identification of stylet secreted proteins from root-knot nematodes by a proteomic approach. *Mol. Biochem. Parasitol.* 121, 205–211.

- Jaubert, S., Laffaire, J.-B., Abad, P., and Rosso, M.-N. (2002b). A polygalacturonase of animal origin isolated from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *FEBS Lett.* *522*, 109–112.
- Jaubert, S., Laffaire, J.-B., Ledger, T.N., Escoubas, P., Amri, E.-Z., Abad, P., and Rosso, M.N. (2004). Comparative analysis of two 14-3-3 homologues and their expression pattern in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *Int. J. Parasitol.* *34*, 873–880.
- Jaubert, S., Milac, A.L., Petrescu, A.J., de Almeida-Engler, J., Abad, P., and Rosso, M.-N. (2005). In planta secretion of a calreticulin by migratory and sedentary stages of root-knot nematode. *Mol. Plant Microbe Interact.* *18*, 1277–1284.
- Jeganathan, K., Malureanu, L., Baker, D.J., Abraham, S.C., and van Deursen, J.M. (2007). Bub1 mediates cell death in response to chromosome missegregation and acts to suppress spontaneous tumorigenesis. *J. Cell Biol.* *179*, 255–267.
- Jensen, C.G. (1982). Dynamics of spindle microtubule organization: kinetochore fiber microtubules of plant endosperm. *J. Cell Biol.* *92*, 540–558.
- Jeyaprakash, A.A., Santamaria, A., Jayachandran, U., Chan, Y.W., Benda, C., Nigg, E.A., and Conti, E. (2012). Structural and functional organization of the Ska complex, a key component of the kinetochore-microtubule interface. *Mol. Cell* *46*, 274–286.
- Jia, L., Li, B., Warrington, R.T., Hao, X., Wang, S., and Yu, H. (2011). Defining pathways of spindle checkpoint silencing: functional redundancy between Cdc20 ubiquitination and p31(comet). *Mol. Biol. Cell* *22*, 4227–4235.
- Jiang, W., Jimenez, G., Wells, N.J., Hope, T.J., Wahl, G.M., Hunter, T., and Fukunaga, R. (1998). PRC1: a human mitotic spindle-associated CDK substrate protein required for cytokinesis. *Mol. Cell* *2*, 877–885.
- Joglekar, A.P., Bloom, K.S., and Salmon, E.D. (2010). Mechanisms of force generation by end-on kinetochore-microtubule attachments. *Curr. Opin. Cell Biol.* *22*, 57–67.
- Johnson, V.L., Scott, M.I.F., Holt, S.V., Hussein, D., and Taylor, S.S. (2004). Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *J. Cell. Sci.* *117*, 1577–1589.
- Jones, M.G.K. (1981). The development and function of plant cells modified by endoparasitic nematodes. *Plant Parasitic Nematodes*, B.M. Zuckerman and R.A. Rhode, Eds (New York:Academic Press) pp.225–279.
- Jones, M.G.K., and Payne, H.L. (1978). Early Stages of Nematode-induced Giant-cell Formation in Roots of *Impatiens balsamina*. *J Nematol* *10*, 70–84.
- Kaláb, P., Pralle, A., Isacoff, E.Y., Heald, R., and Weis, K. (2006). Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells. *Nature* *440*, 697–701.
- Kalitsis, P., Earle, E., Fowler, K.J., and Choo, K.H. (2000). Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes Dev.* *14*, 2277–2282.
- Kalitsis, P., Fowler, K.J., Griffiths, B., Earle, E., Chow, C.W., Jansen, K., and Choo, K.H.A. (2005). Increased chromosome instability but not cancer predisposition in haploinsufficient Bub3 mice. *Genes Chromosomes Cancer* *44*, 29–36.

- Kapoor, T.M., Mayer, T.U., Coughlin, M.L., and Mitchison, T.J. (2000). Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* *150*, 975–988.
- Kapoor, T.M., Lampson, M.A., Hergert, P., Cameron, L., Cimini, D., Salmon, E.D., McEwen, B.F., and Khodjakov, A. (2006). Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* *311*, 388–391.
- Karess, R. (2005). Rod-Zw10-Zwilch: a key player in the spindle checkpoint. *Trends Cell Biol.* *15*, 386–392.
- Karsenti, E., Kobayashi, S., Mitchison, T., and Kirschner, M. (1984). Role of the centrosome in organizing the interphase microtubule array: properties of cytoplasts containing or lacking centrosomes. *J. Cell Biol.* *98*, 1763–1776.
- Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2005). Characterization of plant Aurora kinases during mitosis. *Plant Mol. Biol.* *58*, 1–13.
- Kawamura, E., Himmelspach, R., Rashbrooke, M.C., Whittington, A.T., Gale, K.R., Collings, D.A., and Wasteneys, G.O. (2006). MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the Arabidopsis root. *Plant Physiol.* *140*, 102–114.
- Kawashima, S.A., Tsukahara, T., Langegger, M., Hauf, S., Kitajima, T.S., and Watanabe, Y. (2007). Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev.* *21*, 420–435.
- Kelly, A.E., and Funabiki, H. (2009). Correcting aberrant kinetochore microtubule attachments: an Aurora B-centric view. *Curr. Opin. Cell Biol.* *21*, 51–58.
- Kemmler, S., Stach, M., Knapp, M., Ortiz, J., Pfannstiel, J., Ruppert, T., and Lechner, J. (2009). Mimicking Ndc80 phosphorylation triggers spindle assembly checkpoint signalling. *EMBO J.* *28*, 1099–1110.
- Kerscher, O., Crotti, L.B., and Basrai, M.A. (2003). Recognizing chromosomes in trouble: association of the spindle checkpoint protein Bub3p with altered kinetochores and a unique defective centromere. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 6406–6418.
- 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.
- Khodjakov, A., and Rieder, C.L. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J. Cell Biol.* *153*, 237–242.
- Khodjakov, A., and Rieder, C.L. (2009). The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *J. Biol.* *8*, 88.
- Khodjakov, A., Cole, R.W., Oakley, B.R., and Rieder, C.L. (2000). Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates. *Curr. Biol.* *10*, 59–67.
- Khodjakov, A., Copenagle, L., Gordon, M.B., Compton, D.A., and Kapoor, T.M. (2003). Minus-end capture of preformed kinetochore fibers contributes to spindle morphogenesis. *J. Cell Biol.* *160*, 671–683.

- Kim, S., Sun, H., Ball, H.L., Wassmann, K., Luo, X., and Yu, H. (2010). Phosphorylation of the spindle checkpoint protein Mad2 regulates its conformational transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *107*, 19772–19777.
- Kim, S.H., Lin, D.P., Matsumoto, S., Kitazono, A., and Matsumoto, T. (1998). Fission yeast Slp1: an effector of the Mad2-dependent spindle checkpoint. *Science* *279*, 1045–1047.
- Kim, S., and Yu, H. (2011). Mutual regulation between the spindle checkpoint and APC/C. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 551–558.
- Kimbara, J., Endo, T.R., and Nasuda, S. (2004). Characterization of the genes encoding for MAD2 homologues in wheat. *Chromosome Res.* *12*, 703–714.
- King, J.M., and Nicklas, R.B. (2000). Tension on chromosomes increases the number of kinetochore microtubules but only within limits. *J. Cell. Sci.* *113 Pt 21*, 3815–3823.
- King, E.M.J., van der Sar, S.J.A., and Hardwick, K.G. (2007a). Mad3 KEN boxes mediate both Cdc20 and Mad3 turnover, and are critical for the spindle checkpoint. *PLoS ONE* *2*, e342.
- King, E.M.J., Rachidi, N., Morrice, N., Hardwick, K.G., and Stark, M.J.R. (2007b). Ipl1p-dependent phosphorylation of Mad3p is required for the spindle checkpoint response to lack of tension at kinetochores. *Genes Dev.* *21*, 1163–1168.
- Kirioukhova, O., Johnston, A.J., Kleen, D., Kägi, C., Baskar, R., Moore, J.M., Bäumllein, H., Gross-Hardt, R., and Grossniklaus, U. (2011). Female gametophytic cell specification and seed development require the function of the putative Arabidopsis INCENP ortholog WYRD. *Development* *138*, 3409–3420.
- Kitagawa, R., and Rose, A.M. (1999). Components of the spindle-assembly checkpoint are essential in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Cell Biol.* *1*, 514–521.
- Kitajima, T.S., Hauf, S., Ohsugi, M., Yamamoto, T., and Watanabe, Y. (2005). Human Bub1 defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr. Biol.* *15*, 353–359.
- Kitamura, E., Tanaka, K., Komoto, S., Kitamura, Y., Antony, C., and Tanaka, T.U. (2010). Kinetochores generate microtubules with distal plus ends: their roles and limited lifetime in mitosis. *Dev. Cell* *18*, 248–259.
- Kiyomitsu, T., Obuse, C., and Yanagida, M. (2007). Human Blinkin/AF15q14 is required for chromosome alignment and the mitotic checkpoint through direct interaction with Bub1 and BubR1. *Dev. Cell* *13*, 663–676.
- Klebig, C., Korinth, D., and Meraldi, P. (2009). Bub1 regulates chromosome segregation in a kinetochore-independent manner. *J. Cell Biol.* *185*, 841–858.
- Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., and Agard, D.A. (2011). Microtubule nucleation by γ -tubulin complexes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 709–721.
- Komaki, S., Abe, T., Coutuer, S., Inzé, D., Russinova, E., and Hashimoto, T. (2010). Nuclear-localized subtype of end-binding 1 protein regulates spindle organization in Arabidopsis. *J. Cell. Sci.* *123*, 451–459.
- Kondorosi, E., and Kondorosi, A. (2004). Endoreduplication and activation of the anaphase-promoting complex during symbiotic cell development. *FEBS Lett.* *567*, 152–157.

- Kops, G.J.P.L., and Shah, J.V. (2012). Connecting up and clearing out: how kinetochore attachment silences the spindle assembly checkpoint. *Chromosoma* *121*, 509–525.
- Kops, G.J.P.L., Saurin, A.T., and Meraldi, P. (2010). Finding the middle ground: how kinetochores power chromosome congression. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 2145–2161.
- Kraft, C., Vodermaier, H.C., Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, F., and Peters, J.-M. (2005). The WD40 propeller domain of Cdh1 functions as a destruction box receptor for APC/C substrates. *Mol. Cell* *18*, 543–553.
- Krenn, V., Wehenkel, A., Li, X., Santaguida, S., and Musacchio, A. (2012). Structural analysis reveals features of the spindle checkpoint kinase Bub1-kinetochore subunit Knl1 interaction. *J. Cell Biol.* *196*, 451–467.
- Kulukian, A., Han, J.S., and Cleveland, D.W. (2009). Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev. Cell* *16*, 105–117.
- Kurasawa, Y., Earnshaw, W.C., Mochizuki, Y., Dohmae, N., and Todokoro, K. (2004). Essential roles of KIF4 and its binding partner PRC1 in organized central spindle midzone formation. *EMBO J.* *23*, 3237–3248.
- Kurihara, D., Matsunaga, S., Kawabe, A., Fujimoto, S., Noda, M., Uchiyama, S., and Fukui, K. (2006). Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells. *Plant J.* *48*, 572–580.
- Kyndt, T., Denil, S., Haegeman, A., Trooskens, G., Bauters, L., Van Criekinge, W., De Meyer, T., and Gheysen, G. (2012). Transcriptional reprogramming by root knot and migratory nematode infection in rice. *New Phytol.* *196*, 887–900.
- Lammens, T., Boudolf, V., Kheibarshekan, L., Zalmas, L.P., Gaamouche, 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 14721–14726.
- Lammeren, A.A.M.V. (1988). Structure and function of the microtubular cytoskeleton during endosperm development in wheat: an immunofluorescence study. *Protoplasma* *146*, 18–27.
- Lampson, M.A., and Cheeseman, I.M. (2011). Sensing centromere tension: Aurora B and the regulation of kinetochore function. *Trends Cell Biol.* *21*, 133–140.
- Lampson, M.A., Renduchitala, K., Khodjakov, A., and Kapoor, T.M. (2004). Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat. Cell Biol.* *6*, 232–237.
- Lan, W., and Cleveland, D.W. (2010). A chemical tool box defines mitotic and interphase roles for Mps1 kinase. *J. Cell Biol.* *190*, 21–24.
- Lan, W., Zhang, X., Kline-Smith, S.L., Rosasco, S.E., Barrett-Wilt, G.A., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Walczak, C.E., and Stukenberg, P.T. (2004). Aurora B phosphorylates centromeric MCAK and regulates its localization and microtubule depolymerization activity. *Curr. Biol.* *14*, 273–286.
- Lara-Gonzalez, P., Scott, M.I.F., Diez, M., Sen, O., and Taylor, S.S. (2011). BubR1 blocks substrate recruitment to the APC/C in a KEN-box-dependent manner. *J. Cell. Sci.* *124*, 4332–4345.
- Lara-Gonzalez, P., Westhorpe, F.G., and Taylor, S.S. (2012). The spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol. Cb* *22*, R966–980.

- Larsen, N.A., Al-Bassam, J., Wei, R.R., and Harrison, S.C. (2007). Structural analysis of Bub3 interactions in the mitotic spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 1201–1206.
- Ledger, T.N., Jaubert, S., Bosselut, N., Abad, P., and Rosso, M.-N. (2006). Characterization of a new beta-1,4-endoglucanase gene from the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and evolutionary scheme for phytonematode family 5 glycosyl hydrolases. *Gene* *382*, 121–128.
- Lee, S.H., Sterling, H., Burlingame, A., and McCormick, F. (2008). Tpr directly binds to Mad1 and Mad2 and is important for the Mad1-Mad2-mediated mitotic spindle checkpoint. *Genes Dev.* *22*, 2926–2931.
- Lee, Y.R., Giang, H.M., and Liu, B. (2001). A novel plant kinesin-related protein specifically associates with the phragmoplast organelles. *Plant Cell* *13*, 2427–2439.
- Lermontova, I., Fuchs, J., and Schubert, I. (2008). The Arabidopsis checkpoint protein Bub3.1 is essential for gametophyte development. *Front. Biosci.* *13*, 5202–5211.
- Lermontova, I., Rutten, T., and Schubert, I. (2011a). Deposition, turnover, and release of CENH3 at Arabidopsis centromeres. *Chromosoma* *120*, 633–640.
- Lermontova, I., Koroleva, O., Rutten, T., Fuchs, J., Schubert, V., Moraes, I., Koszegi, D., and Schubert, I. (2011b). Knockdown of CENH3 in Arabidopsis reduces mitotic divisions and causes sterility by disturbed meiotic chromosome segregation. *Plant J.* *68*, 40–50.
- Lesage, B., Qian, J., and Bollen, M. (2011). Spindle checkpoint silencing: PP1 tips the balance. *Curr. Biol.* *21*, R898–903.
- Li, R., and Murray, A.W. (1991). Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell* *66*, 519–531.
- Li, X., and Dawe, R.K. (2009). Fused sister kinetochores initiate the reductional division in meiosis I. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1103–1108.
- Li, Y., and Benezra, R. (1996). Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. *Science* *274*, 246–248.
- Li, M., Fang, X., Wei, Z., York, J.P., and Zhang, P. (2009a). Loss of spindle assembly checkpoint-mediated inhibition of Cdc20 promotes tumorigenesis in mice. *J. Cell Biol.* *185*, 983–994.
- Li, M., Li, S., Yuan, J., Wang, Z.-B., Sun, S.-C., Schatten, H., and Sun, Q.-Y. (2009b). Bub3 is a spindle assembly checkpoint protein regulating chromosome segregation during mouse oocyte meiosis. *PLoS ONE* *4*, e7701.
- Li, Y., Gorbea, C., Mahaffey, D., Rechsteiner, M., and Benezra, R. (1997). MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *94*, 12431–12436.
- Liang, H., Lim, H.H., Venkitaraman, A., and Surana, U. (2012). Cdk1 promotes kinetochore bi-orientation and regulates Cdc20 expression during recovery from spindle checkpoint arrest. *EMBO J.* *31*, 403–416.
- Lima, M. de F., Eloy, N.B., Pegoraro, C., Sagit, R., Rojas, C., Bretz, T., Vargas, L., Elofsson, A., de Oliveira, A.C., Hemerly, A.S., et al. (2010). Genomic evolution and complexity of the Anaphase-promoting Complex (APC) in land plants. *BMC Plant Biol.* *10*, 254.

- Lin, B., Zhuo, K., Wu, P., Cui, R., Zhang, L.-H., and Liao, J. (2013). A novel effector protein, MJ-NULG1a, targeted to giant cell nuclei plays a role in *Meloidogyne javanica* parasitism. *Mol. Plant Microbe Interact.* *26*, 55–66.
- Lince-Faria, M., Maffini, S., Orr, B., Ding, Y., Cláudia Florindo, Sunkel, C.E., Tavares, A., Johansen, J., Johansen, K.M., and Maiato, H. (2009). Spatiotemporal control of mitosis by the conserved spindle matrix protein Megator. *J. Cell Biol.* *184*, 647–657.
- Lindsay, D.L., Bonham-Smith, P.C., Postnikoff, S., Gray, G.R., and Harkness, T.A.A. (2011). A role for the anaphase promoting complex in hormone regulation. *Planta* *233*, 1223–1235.
- Liu, D., Vleugel, M., Backer, C.B., Hori, T., Fukagawa, T., Cheeseman, I.M., and Lampson, M.A. (2010). Regulated targeting of protein phosphatase 1 to the outer kinetochore by KNL1 opposes Aurora B kinase. *J. Cell Biol.* *188*, 809–820.
- Lloyd, C.W. (1991). *The Cytoskeletal basis of plant growth and form* (Academic Press).
- Lloyd, C., and Chan, J. (2006). Not so divided: the common basis of plant and animal cell division. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 147–152.
- Lloyd, C., and Hussey, P. (2001). Microtubule-associated proteins in plants--why we need a MAP. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *2*, 40–47.
- Logarinho, E., Bousbaa, H., Dias, J.M., Lopes, C., Amorim, I., Antunes-Martins, A., and Sunkel, C.E. (2004). Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in *Drosophila* cells. *J. Cell. Sci.* *117*, 1757–1771.
- Logarinho, E., Resende, T., Torres, C., and Bousbaa, H. (2008). The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1798–1813.
- Lohar, D.P., Schaff, J.E., Laskey, J.G., Kieber, J.J., Bilyeu, K.D., and Bird, D.M. (2004). Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses. *Plant J.* *38*, 203–214.
- London, N., Ceto, S., Ranish, J.A., and Biggins, S. (2012). Phosphoregulation of Spc105 by Mps1 and PP1 regulates Bub1 localization to kinetochores. *Curr. Biol.* *22*, 900–906.
- Lu, Y., Wang, Z., Ge, L., Chen, N., and Liu, H. (2009). The RZZ complex and the spindle assembly checkpoint. *Cell Struct. Funct.* *34*, 31–45.
- Luo, M., Costa, S., Bernacchia, G., and Cella, R. (1997). Cloning and characterisation of a carrot cDNA coding for a WD repeat protein homologous to *Drosophila* fizzy, human p55CDC and yeast CDC20 proteins. *Plant Mol. Biol.* *34*, 325–330.
- Luo, X., Tang, Z., Rizo, J., and Yu, H. (2002). The Mad2 spindle checkpoint protein undergoes similar major conformational changes upon binding to either Mad1 or Cdc20. *Mol. Cell* *9*, 59–71.
- Luo, X., Tang, Z., Xia, G., Wassmann, K., Matsumoto, T., Rizo, J., and Yu, H. (2004). The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natively folded states. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 338–345.
- Maciver, S.K., and Hussey, P.J. (2002). The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* *3*, reviews3007.

- Magyar, Z., De Veylder, L., Atanassova, A., Bakó, L., Inzé, D., and Bögre, L. (2005). The role of the Arabidopsis E2FB transcription factor in regulating auxin-dependent cell division. *Plant Cell* *17*, 2527–2541.
- Maiato, H., and Sunkel, C.E. (2004). Kinetochores-microtubule interactions during cell division. *Chromosome Res.* *12*, 585–597.
- Maiato, H., Sampaio, P., Lemos, C.L., Findlay, J., Carmena, M., Earnshaw, W.C., and Sunkel, C.E. (2002). MAST/Orbit has a role in microtubule-kinetochore attachment and is essential for chromosome alignment and maintenance of spindle bipolarity. *J. Cell Biol.* *157*, 749–760.
- Maiato, H., Rieder, C.L., and Khodjakov, A. (2004). Kinetochores-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis. *J. Cell Biol.* *167*, 831–840.
- Maldonado, M., and Kapoor, T.M. (2011). Constitutive Mad1 targeting to kinetochores uncouples checkpoint signalling from chromosome biorientation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 475–482.
- Malureanu, L.A., Jeganathan, K.B., Hamada, M., Wasilewski, L., Davenport, J., and van Deursen, J.M. (2009). BubR1 N terminus acts as a soluble inhibitor of cyclin B degradation by APC/C(Cdc20) in interphase. *Dev. Cell* *16*, 118–131.
- Mansfeld, J., Collin, P., Collins, M.O., Choudhary, J.S., and Pines, J. (2011). APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1234–1243.
- Mao, Y., Desai, A., and Cleveland, D.W. (2005). Microtubule capture by CENP-E silences BubR1-dependent mitotic checkpoint signaling. *J. Cell Biol.* *170*, 873–880.
- Mapelli, M., Massimiliano, L., Santaguida, S., and Musacchio, A. (2007). The Mad2 conformational dimer: structure and implications for the spindle assembly checkpoint. *Cell* *131*, 730–743.
- Maresca, T.J., and Salmon, E.D. (2009). Intrakinetochores stretch is associated with changes in kinetochore phosphorylation and spindle assembly checkpoint activity. *J. Cell Biol.* *184*, 373–381.
- Maresca, T.J., and Salmon, E.D. (2010). Welcome to a new kind of tension: translating kinetochore mechanics into a wait-anaphase signal. *J. Cell. Sci.* *123*, 825–835.
- Maresca, T.J., Groen, A.C., Gatlin, J.C., Ohi, R., Mitchison, T.J., and Salmon, E.D. (2009). Spindle assembly in the absence of a RanGTP gradient requires localized CPC activity. *Curr. Biol.* *19*, 1210–1215.
- Mariani, L., Chiroli, E., Nezi, L., Muller, H., Piatti, S., Musacchio, A., and Ciliberto, A. (2012). Role of the Mad2 dimerization interface in the spindle assembly checkpoint independent of kinetochores. *Curr. Biol.* *22*, 1900–1908.
- 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.
- Matsuura, S., Matsumoto, Y., Morishima, K., Izumi, H., Matsumoto, H., Ito, E., Tsutsui, K., Kobayashi, J., Tauchi, H., Kajiwara, Y., et al. (2006). Monoallelic BUB1B mutations and defective mitotic-spindle checkpoint in seven families with premature chromatid separation (PCS) syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* *140*, 358–367.

- Matthies, H.J., McDonald, H.B., Goldstein, L.S., and Theurkauf, W.E. (1996). Anastral meiotic spindle morphogenesis: role of the non-claret disjunctional kinesin-like protein. *J. Cell Biol.* *134*, 455–464.
- Mazarei, M., Lennon, K.A., Puthoff, D.P., Rodermel, S.R., and Baum, T.J. (2003). Expression of an Arabidopsis phosphoglycerate mutase homologue is localized to apical meristems, regulated by hormones, and induced by sedentary plant-parasitic nematodes. *Plant Mol. Biol.* *53*, 513–530.
- McAinsh, A.D., and Meraldi, P. (2011). The CCAN complex: linking centromere specification to control of kinetochore-microtubule dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* *22*, 946–952.
- McEwen, B.F., and Dong, Y. (2009). Releasing the spindle assembly checkpoint without tension. *J. Cell Biol.* *184*, 355–356.
- McEwen, B.F., and Dong, Y. (2010). Contrasting models for kinetochore microtubule attachment in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.* *67*, 2163–2172.
- McGuinness, B.E., Anger, M., Kouznetsova, A., Gil-Bernabé, A.M., Helmhart, W., Kudo, N.R., Wuensche, A., Taylor, S., Hoog, C., Novak, B., et al. (2009). Regulation of APC/C activity in oocytes by a Bub1-dependent spindle assembly checkpoint. *Curr. Biol.* *19*, 369–380.
- Megraw, T.L., Kao, L.R., and Kaufman, T.C. (2001). Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr. Biol.* *11*, 116–120.
- Menges, M., and Murray, J.A.H. (2002). Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* *30*, 203–212.
- Menges, M., De Jager, S.M., Gruijssem, 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.
- Meraldi, P., and Sorger, P.K. (2005). A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *EMBO J.* *24*, 1621–1633.
- Meraldi, P., Draviam, V.M., and Sorger, P.K. (2004). Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev. Cell* *7*, 45–60.
- Meraldi, P., McAinsh, A.D., Rheinbay, E., and Sorger, P.K. (2006). Phylogenetic and structural analysis of centromeric DNA and kinetochore proteins. *Genome Biol.* *7*, R23.
- Meunier, S., and Vernos, I. (2011). K-fibre minus ends are stabilized by a RanGTP-dependent mechanism essential for functional spindle assembly. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1406–1414.
- Michel, L., Diaz-Rodriguez, E., Narayan, G., Hernando, E., Murty, V.V.V.S., and Benezra, R. (2004). Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *101*, 4459–4464.
- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V., and Benezra, R. (2001). MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature* *409*, 355–359.
- Millband, D.N., and Hardwick, K.G. (2002). Fission yeast Mad3p is required for Mad2p to inhibit the anaphase-promoting complex and localizes to kinetochores in a Bub1p-, Bub3p-, and Mph1p-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 2728–2742.

- Min, M., and Lindon, C. (2012). Substrate targeting by the ubiquitin-proteasome system in mitosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 482–491.
- Miniowitz-Shemtov, S., Eytan, E., Ganoth, D., Sitry-Shevah, D., Dumin, E., and Hershko, A. (2012). Role of phosphorylation of Cdc20 in p31(comet)-stimulated disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 8056–8060.
- Minshull, J., Sun, H., Tonks, N.K., and Murray, A.W. (1994). A MAP kinase-dependent spindle assembly checkpoint in *Xenopus* egg extracts. *Cell* *79*, 475–486.
- Mitreva-Dautova, M., Roze, E., Overmars, H., de Graaff, L., Schots, A., Helder, J., Goverse, A., Bakker, J., and Smant, G. (2006). A symbiont-independent endo-1,4-beta-xylanase from the plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita*. *Mol. Plant Microbe Interact.* *19*, 521–529.
- Mo, M., Shahar, S., Fleming, S.B., and Mercer, A.A. (2012). How viruses affect the cell cycle through manipulation of the APC/C. *Trends Microbiol.* *20*, 440–448.
- Mollinari, C., Kleman, J.-P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T., and Margolis, R.L. (2002). PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone. *J Cell Biol* *157*, 1175–1186.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *13*, 261–291.
- Morrow, C.J., Tighe, A., Johnson, V.L., Scott, M.I.F., Ditchfield, C., and Taylor, S.S. (2005). Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J. Cell. Sci.* *118*, 3639–3652.
- Müller, S., Fuchs, E., Ovecka, M., Wysocka-Diller, J., Benfey, P.N., and Hauser, M.-T. (2002). Two new loci, PLEIADE and HYADE, implicate organ-specific regulation of cytokinesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* *130*, 312–324.
- Müller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P.J., and Hauser, M.-T. (2004). The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function. *Curr. Biol.* *14*, 412–417.
- Müller, S., Wright, A.J., and Smith, L.G. (2009). Division plane control in plants: new players in the band. *Trends Cell Biol.* *19*, 180–188.
- Murata, T., Sonobe, S., Baskin, T.I., Hyodo, S., Hasezawa, S., Nagata, T., Horio, T., and Hasebe, M. (2005). Microtubule-dependent microtubule nucleation based on recruitment of gamma-tubulin in higher plants. *Nat. Cell Biol.* *7*, 961–968.
- Murray, A.W. (2012). Don't make me mad, Bub! *Dev. Cell* *22*, 1123–1125.
- Musacchio, A. (2011). Spindle assembly checkpoint: the third decade. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* *366*, 3595–3604.
- Musacchio, A., and Hardwick, K.G. (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *3*, 731–741.
- Musacchio, A., and Salmon, E.D. (2007). The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 379–393.
- Nagaki, K., Kashihara, K., and Murata, M. (2009). Characterization of the two centromeric proteins CENP-C and MIS12 in *Nicotiana* species. *Chromosome Res.* *17*, 719–726.

- Nédélec, F., Surrey, T., and Karsenti, E. (2003). Self-organisation and forces in the microtubule cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 118–124.
- Niebel, A., de Almeida Engler, J., Hemerly, A., Ferreira, P., Inzé, D., Van Montagu, M., and Gheysen, G. (1996). Induction of *cdc2a* and *cycl1At* expression in *Arabidopsis thaliana* during early phases of nematode-induced feeding cell formation. *Plant J.* *10*, 1037–1043.
- Nilsson, J., Yekezare, M., Minshull, J., and Pines, J. (2008). The APC/C maintains the spindle assembly checkpoint by targeting Cdc20 for destruction. *Nat. Cell Biol.* *10*, 1411–1420.
- Nobre, M.J.G., Mende, N. von, Dolan, L., Schmidt, K.P., Evans, K., and Mulligan, B. (1995). Immunolabelling of cell surfaces of *Arabidopsis thaliana* roots following infection by *Meloidogyne incognita* (Nematoda). *J. Exp. Bot.* *46*, 1711–1720.
- O’Connell, C.B., Loncarek, J., Hergert, P., Kourtidis, A., Conklin, D.S., and Khodjakov, A. (2008). The spindle assembly checkpoint is satisfied in the absence of interkinetochore tension during mitosis with unreplicated genomes. *J. Cell Biol.* *183*, 29–36.
- O’Connell, C.B., Loncarek, J., Kaláb, P., and Khodjakov, A. (2009). Relative contributions of chromatin and kinetochores to mitotic spindle assembly. *J. Cell Biol.* *187*, 43–51.
- Ogura, Y., Shibata, F., Sato, H., and Murata, M. (2004). Characterization of a CENP-C homolog in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet. Syst.* *79*, 139–144.
- Oliveira, R.A., and Nasmyth, K. (2010). Getting through anaphase: splitting the sisters and beyond. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 1639–1644.
- Opperman, C.H., Bird, D.M., Williamson, V.M., Rokhsar, D.S., Burke, M., Cohn, J., Cromer, J., Diener, S., Gajan, J., Graham, S., et al. (2008). Sequence and genetic map of *Meloidogyne hapla*: A compact nematode genome for plant parasitism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *105*, 14802–14807.
- Orr, B., Bousbaa, H., and Sunkel, C.E. (2007). Mad2-independent spindle assembly checkpoint activation and controlled metaphase-anaphase transition in *Drosophila* S2 cells. *Mol. Biol. Cell* *18*, 850–863.
- Palframan, W.J., Meehl, J.B., Jaspersen, S.L., Winey, M., and Murray, A.W. (2006). Anaphase inactivation of the spindle checkpoint. *Science* *313*, 680–684.
- Pan, J., and Chen, R.-H. (2004). Spindle checkpoint regulates Cdc20p stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *18*, 1439–1451.
- Pastuglia, M., Azimzadeh, J., Goussot, M., Camilleri, C., Belcram, K., Evrard, J.-L., Schmit, A.-C., Guerche, P., and Bouchez, D. (2006). Gamma-tubulin is essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *18*, 1412–1425.
- Pegard, A., Brizzard, G., Fazari, A., Soucaze, O., Abad, P., and Djian-Caporalino, C. (2005). Histological Characterization of Resistance to Different Root-Knot Nematode Species Related to Phenolics Accumulation in *Capsicum annuum*. *Phytopathology* *95*, 158–165.
- Perera, D., and Taylor, S.S. (2010). Sgo1 establishes the centromeric cohesion protection mechanism in G2 before subsequent Bub1-dependent recruitment in mitosis. *J. Cell. Sci.* *123*, 653–659.
- Pérez-Pérez, J.M., Serralbo, O., Vanstraelen, M., González, C., Criqui, M.-C., Genschik, P., Kondorosí, E., and Scheres, B. (2008). Specialization of CDC27 function in the *Arabidopsis thaliana* anaphase-promoting complex (APC/C). *Plant J.* *53*, 78–89.

- Petrovic, A., Pasqualato, S., Dube, P., Krenn, V., Santaguida, S., Cittaro, D., Monzani, S., Massimiliano, L., Keller, J., Tarricone, A., et al. (2010). The MIS12 complex is a protein interaction hub for outer kinetochore assembly. *J. Cell Biol.* *190*, 835–852.
- Petrovská, B., Cenklová, V., Pochylová, Z., Kourová, H., Doskočilová, A., Plíhal, O., Binarová, L., and Binarová, P. (2012). Plant Aurora kinases play a role in maintenance of primary meristems and control of endoreduplication. *New Phytol.* *193*, 590–604.
- Pfleger, C.M., and Kirschner, M.W. (2000). The KEN box: an APC recognition signal distinct from the D box targeted by Cdh1. *Genes Dev.* *14*, 655–665.
- Pines, J. (2011). Cubism and the cell cycle: the many faces of the APC/C. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *12*, 427–438.
- Pinsky, B.A., and Biggins, S. (2005). The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol.* *15*, 486–493.
- Piotte, C., Arthaud, L., Abad, P., and Rosso, M.N. (1999). Molecular cloning of an acetylcholinesterase gene from the plant parasitic nematodes, *Meloidogyne incognita* and *Meloidogyne javanica*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *99*, 247–256.
- Poddar, A., Stukenberg, P.T., and Burke, D.J. (2005). Two Complexes of Spindle Checkpoint Proteins Containing Cdc20 and Mad2 Assemble during Mitosis Independently of the Kinetochore in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* *4*, 867–878.
- Putkey, F.R., Cramer, T., Mophew, M.K., Silk, A.D., Johnson, R.S., McIntosh, J.R., and Cleveland, D.W. (2002). Unstable kinetochore-microtubule capture and chromosomal instability following deletion of CENP-E. *Dev. Cell* *3*, 351–365.
- Qi, W., and Yu, H. (2007). KEN-box-dependent degradation of the Bub1 spindle checkpoint kinase by the anaphase-promoting complex/cyclosome. *J. Biol. Chem.* *282*, 3672–3679.
- Quentin, M., Abad, P. and Favery, B. (2013). Plant parasitic nematode effectors target host defense and nuclear functions to establish feeding cells. *Front. Plant-Microbe Interact.* *4*, 53.
- Rahmani, Z., Gagou, M.E., Lefebvre, C., Emre, D., and Karess, R.E. (2009). Separating the spindle, checkpoint, and timer functions of BubR1. *J. Cell Biol.* *187*, 597–605.
- Ravi, M., Shibata, F., Ramahi, J.S., Nagaki, K., Chen, C., Murata, M., and Chan, S.W.L. (2011). Meiosis-specific loading of the centromere-specific histone CENH3 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* *7*, e1002121.
- Rebois, R.V. (1980). Ultrastructure of a feeding peg and tube associated with *Rotylenchulus reniformis* in cotton. *Nematologica* *26*, 396–405.
- Reddy, S.K., Rape, M., Margansky, W.A., and Kirschner, M.W. (2007). Ubiquitination by the anaphase-promoting complex drives spindle checkpoint inactivation. *Nature* *446*, 921–925.
- Rieder, C.L. (2005). Kinetochore fiber formation in animal somatic cells: dueling mechanisms come to a draw. *Chromosoma* *114*, 310–318.
- Rieder, C.L., and Maiato, H. (2004). Stuck in division or passing through: what happens when cells cannot satisfy the spindle assembly checkpoint. *Dev. Cell* *7*, 637–651.

- Rieder, C.L., Schultz, A., Cole, R., and Sluder, G. (1994). Anaphase onset in vertebrate somatic cells is controlled by a checkpoint that monitors sister kinetochore attachment to the spindle. *J. Cell Biol.* *127*, 1301–1310.
- Rieder, C.L., Cole, R.W., Khodjakov, A., and Sluder, G. (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* *130*, 941–948.
- Rosso, M.N., Favery, B., Piotte, C., Arthaud, L., De Boer, J.M., Hussey, R.S., Bakker, J., Baum, T.J., and Abad, P. (1999). Isolation of a cDNA encoding a beta-1,4-endoglucanase in the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and expression analysis during plant parasitism. *Mol. Plant Microbe Interact.* *12*, 585–591.
- Rosso, M.N., Jones, J.T., and Abad, P. (2009). RNAi and functional genomics in plant parasitic nematodes. *Annu Rev Phytopathol* *47*, 207–232.
- Rosso, M.-N., Vieira, P., de Almeida-Engler, J., and Castagnone-Sereno, P. (2011). Proteins secreted by root-knot nematodes accumulate in the extracellular compartment during root infection. *Plant Signal. Behav.* *6*, 1232–1234.
- Roze, E., Hanse, B., Mitreva, M., Vanholme, B., Bakker, J., and Smant, G. (2008). Mining the secretome of the root-knot nematode *Meloidogyne chitwoodi* for candidate parasitism genes. *Mol. Plant Pathol.* *9*, 1–10.
- Ruchaud, S., Carmena, M., and Earnshaw, W.C. (2007). The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell* *131*, 230–231.
- Santaguida, S., and Musacchio, A. (2009). The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* *28*, 2511–2531.
- Santaguida, S., Vernieri, C., Villa, F., Ciliberto, A., and Musacchio, A. (2011). Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction. *EMBO J.* *30*, 1508–1519.
- Sasabe, M., Kosetsu, K., Hidaka, M., Murase, A., and Machida, Y. (2011). *Arabidopsis thaliana* MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant Signal Behav* *6*, 743–747.
- Sasser, J.N., and Freckman, D.W. (1987). A world perspective on nematology; the role of society. In *Vistas on Nematology*, (Hyattsville, USA, Society of Nematologists.: In J.A. Veech & D.W. Dickerson), pp. pp. 7–14.
- Sato, H., Shibata, F., and Murata, M. (2005). Characterization of a Mis12 homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome Res.* *13*, 827–834.
- Saurin, A.T., van der Waal, M.S., Medema, R.H., Lens, S.M.A., and Kops, G.J.P.L. (2011). Aurora B potentiates Mps1 activation to ensure rapid checkpoint establishment at the onset of mitosis. *Nat Commun* *2*, 316.
- Schliekelman, M., Cowley, D.O., O’Quinn, R., Oliver, T.G., Lu, L., Salmon, E.D., and Van Dyke, T. (2009). Impaired Bub1 function in vivo compromises tension-dependent checkpoint function leading to aneuploidy and tumorigenesis. *Cancer Res.* *69*, 45–54.
- Schuyler, S.C., Liu, J.Y., and Pellman, D. (2003). The molecular function of Ase1p. *J Cell Biol* *160*, 517–528.

- Sczaniecka, M., Feoktistova, A., May, K.M., Chen, J.-S., Blyth, J., Gould, K.L., and Hardwick, K.G. (2008). The spindle checkpoint functions of Mad3 and Mad2 depend on a Mad3 KEN box-mediated interaction with Cdc20-anaphase-promoting complex (APC/C). *J. Biol. Chem.* *283*, 23039–23047.
- Seguí-Simarro, J.M., Austin, J.R., 2nd, White, E.A., and Staehelin, L.A. (2004). Electron tomographic analysis of somatic cell plate formation in meristematic cells of *Arabidopsis* preserved by high-pressure freezing. *Plant Cell* *16*, 836–856.
- Seltzer, V., Janski, N., Canaday, J., Herzog, E., Erhardt, M., Evrard, J.-L., and Schmit, A.-C. (2007). *Arabidopsis* GCP2 and GCP3 are part of a soluble gamma-tubulin complex and have nuclear envelope targeting domains. *Plant J.* *52*, 322–331.
- Serralbo, O., Pérez-Pérez, J.M., Heidstra, R., and Scheres, B. (2006). Non-cell-autonomous rescue of anaphase-promoting complex function revealed by mosaic analysis of HOBBIT, an *Arabidopsis* CDC27 homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *103*, 13250–13255.
- Shah, J.V., Botvinick, E., Bonday, Z., Furnari, F., Berns, M., and Cleveland, D.W. (2004). Dynamics of centromere and kinetochore proteins; implications for checkpoint signaling and silencing. *Curr. Biol.* *14*, 942–952.
- Shannon, K.B., Canman, J.C., and Salmon, E.D. (2002). Mad2 and BubR1 function in a single checkpoint pathway that responds to a loss of tension. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3706–3719.
- 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 Physiol.* *156*, 1386–1396.
- Sharp-Baker, H., and Chen, R.H. (2001). Spindle checkpoint protein Bub1 is required for kinetochore localization of Mad1, Mad2, Bub3, and CENP-E, independently of its kinase activity. *J. Cell Biol.* *153*, 1239–1250.
- Shepperd, L.A., Meadows, J.C., Sochaj, A.M., Lancaster, T.C., Zou, J., Buttrick, G.J., Rappsilber, J., Hardwick, K.G., and Millar, J.B.A. (2012). Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Curr. Biol.* *22*, 891–899.
- Sijmons, P.C., Atkinson, H.J., and Wyss, U. (1994). Parasitic Strategies of Root Nematodes and Associated Host Cell Responses. *Annual Review of Phytopathology* *32*, 235–259.
- Silva, P., Barbosa, J., Nascimento, A.V., Faria, J., Reis, R., and Bousbaa, H. (2011). Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell Prolif.* *44*, 391–400.
- Simonetta, M., Manzoni, R., Mosca, R., Mapelli, M., Massimiliano, L., Vink, M., Novak, B., Musacchio, A., and Ciliberto, A. (2009). The influence of catalysis on mad2 activation dynamics. *PLoS Biol.* *7*, e10.
- Skoufias, D.A., Andreassen, P.R., Lacroix, F.B., Wilson, L., and Margolis, R.L. (2001). Mammalian mad2 and bub1/bubR1 recognize distinct spindle-attachment and kinetochore-tension checkpoints. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 4492–4497.
- Smertenko, A.P., Chang, H.-Y., Wagner, V., Kaloriti, D., Fenyk, S., Sonobe, S., Lloyd, C., Hauser, M.-T., and Hussey, P.J. (2004). The *Arabidopsis* microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *Plant Cell* *16*, 2035–2047.

- Smertenko, A.P., Kaloriti, D., Chang, H.-Y., Fiserova, J., Opatrny, Z., and Hussey, P.J. (2008). The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of Arabidopsis microtubule-associated protein MAP65 isoforms. *Plant Cell* 20, 3346–3358.
- Smith, T.F. (2008). Diversity of WD-repeat proteins. *Subcell. Biochem.* 48, 20–30.
- Sotillo, R., Hernando, E., Díaz-Rodríguez, E., Teruya-Feldstein, J., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., and Benezra, R. (2007). Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. *Cancer Cell* 11, 9–23.
- Starr, J.L. (1993). Dynamics of the Nuclear Complement of Giant Cells Induced by Meloidogyne incognita. *J Nematol* 25, 416–421.
- Stewart, G.R., Perry, R.N., and Wright, D.J. (1993). Studies on the amphid specific glycoprotein gp32 in different life-cycle stages of Meloidogyne species. *Parasitology* 107, 573–578.
- Sudakin, V., Chan, G.K., and Yen, T.J. (2001). Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* 154, 925–936.
- Suijkerbuijk, S.J.E., van Dam, T.J.P., Karagöz, G.E., von Castelmur, E., Hubner, N.C., Duarte, A.M.S., Vleugel, M., Perrakis, A., Rüdiger, S.G.D., Snel, B., et al. (2012). The vertebrate mitotic checkpoint protein BUBR1 is an unusual pseudokinase. *Dev. Cell* 22, 1321–1329.
- Takeuchi, K., and Fukagawa, T. (2012). Molecular architecture of vertebrate kinetochores. *Exp. Cell Res.* 318, 1367–1374.
- 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. *Plant Cell* 14, 1053–1066.
- Tanaka, T.U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M.J.R., and Nasmyth, K. (2002). Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell* 108, 317–329.
- Tang, Z., Bharadwaj, R., Li, B., and Yu, H. (2001). Mad2-Independent inhibition of APCCdc20 by the mitotic checkpoint protein BubR1. *Dev. Cell* 1, 227–237.
- Tang, Z., Shu, H., Oncel, D., Chen, S., and Yu, H. (2004). Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol. Cell* 16, 387–397.
- Tarayre, S., Vinardell, J.M., Cebolla, A., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (2004). Two classes of the CDH1-type activators of the anaphase-promoting complex in plants: novel functional domains and distinct regulation. *Plant Cell* 16, 422–434.
- Taylor, S.S., and McKeon, F. (1997). Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell* 89, 727–735.
- Taylor, S.S., Ha, E., and McKeon, F. (1998). The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J. Cell Biol.* 142, 1–11.
- Taylor, S.S., Hussein, D., Wang, Y., Elderkin, S., and Morrow, C.J. (2001). Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J. Cell. Sci.* 114, 4385–4395.

- Teichner, A., Eytan, E., Sitry-Shevah, D., Miniowitz-Shemtov, S., Dumin, E., Gromis, J., and Hershko, A. (2011). p31comet Promotes disassembly of the mitotic checkpoint complex in an ATP-dependent process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 3187–3192.
- Ten Hoopen, R., Schleker, T., Manteuffel, R., and Schubert, I. (2002). Transient CENP-E-like kinetochore proteins in plants. *Chromosome Res.* *10*, 561–570.
- Thompson, S.L., Bakhoum, S.F., and Compton, D.A. (2010). Mechanisms of chromosomal instability. *Curr. Biol.* *20*, R285–295.
- Torosantucci, L., De Luca, M., Guarguaglini, G., Lavia, P., and Degrassi, F. (2008). Localized RanGTP accumulation promotes microtubule nucleation at kinetochores in somatic mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *19*, 1873–1882.
- Tournebize, R., Heald, R., and Hyman, A. (1997). Role of chromosomes in assembly of meiotic and mitotic spindles. *Prog Cell Cycle Res* *3*, 271–284.
- Triantaphyllou, A.C. Cytogenetics, cytotaxonomy and phylogeny of root-knot nematodes.
- Tulu, U.S., Fagerstrom, C., Ferenz, N.P., and Wadsworth, P. (2006). Molecular requirements for kinetochore-associated microtubule formation in mammalian cells. *Curr. Biol.* *16*, 536–541.
- Uchida, K.S.K., Takagaki, K., Kumada, K., Hirayama, Y., Noda, T., and Hirota, T. (2009). Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* *184*, 383–390.
- Uzunova, K., Dye, B.T., Schutz, H., Ladurner, R., Petzold, G., Toyoda, Y., Jarvis, M.A., Brown, N.G., Poser, I., Novatchkova, M., et al. (2012). APC15 mediates CDC20 autoubiquitylation by APC/C(MCC) and disassembly of the mitotic checkpoint complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 1116–1123.
- Van Damme, D., and Geelen, D. (2008). Demarcation of the cortical division zone in dividing plant cells. *Cell Biology International* *32*, 178–187.
- Van Damme, D., Bouget, F.-Y., Van Poucke, K., Inzé, D., and Geelen, D. (2004). Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins. *Plant J.* *40*, 386–398.
- Van Damme, D., De Rybel, B., Gudesblat, G., Demidov, D., Grunewald, W., De Smet, I., Houben, A., Beeckman, T., and Russinova, E. (2011). Arabidopsis α Aurora kinases function in formative cell division plane orientation. *Plant Cell* *23*, 4013–4024.
- Vanholme, B., De Meutter, J., Tytgat, T., Van Montagu, M., Coomans, A., and Gheysen, G. (2004). Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene* *332*, 13–27.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., et al. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in Arabidopsis thaliana. *Mol. Syst. Biol.* *6*, 397.
- Van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu Rev Phytopathol* *44*, 135–162.
- Vanstraelen, M., Baloban, M., Da Ines, O., Cultrone, A., Lammens, T., Boudolf, V., Brown, S.C., De Veylder, L., Mergaert, P., and Kondorosi, E. (2009). APC/C-CCS52A complexes control meristem maintenance in the Arabidopsis root. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 11806–11811.

- Vercauteren, I., Van Der Schueren, E., Van Montagu, M., and Gheysen, G. (2001). *Arabidopsis thaliana* genes expressed in the early compatible interaction with root-knot nematodes. *Mol. Plant Microbe Interact.* *14*, 288–299.
- Vieira, P., Danchin, E.G.J., Neveu, C., Crozat, C., Jaubert, S., Hussey, R.S., Engler, G., Abad, P., de Almeida-Engler, J., Castagnone-Sereno, P., et al. (2011). The plant apoplast is an important recipient compartment for nematode secreted proteins. *J. Exp. Bot.* *62*, 1241–1253.
- Vieira, P., Banora, M.Y., Castagnone-Sereno, P., Rosso, M.-N., Engler, G., and de Almeida Engler, J. (2012a). An immunocytochemical procedure for protein localization in various nematode life stages combined with plant tissues using methylacrylate-embedded specimens. *Phytopathology* *102*, 990–996.
- Vieira, P., Engler, G., and de Almeida Engler, J. (2012b). Whole-mount confocal imaging of nuclei in giant feeding cells induced by root-knot nematodes in *Arabidopsis*. *New Phytol.* *195*, 488–496.
- Vieira, P., Kyndt, T., Gheysen, G., and Engler, J. de A. (2013a). An insight into critical endocycle genes for plant-parasitic nematode feeding sites establishment. *Plant Signal Behav.* *8*.
- Vieira, P., Escudero, C., Rodiuc, N., Boruc, J., Russinova, E., Glab, N., Mota, M., De Veylder, L., Abad, P., Engler, G., et al. (2013b). Ectopic expression of Kip-related proteins restrains root-knot nematode-feeding site expansion. *New Phytol.*
- Vigneron, S., Prieto, S., Bernis, C., Labbé, J.-C., Castro, A., and Lorca, T. (2004). Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol. Biol. Cell* *15*, 4584–4596.
- Villate, L., Fievet, V., Hanse, B., Delemarre, F., Plantard, O., Esmenjaud, D., and van Helden, M. (2008). Spatial distribution of the dagger nematode *Xiphinema index* and its associated Grapevine fanleaf virus in French vineyard. *Phytopathology* *98*, 942–948.
- Vinardell, J.M., Fedorova, E., Cebolla, A., Kevei, Z., Horvath, G., Kelemen, Z., Tarayre, S., Roudier, F., Mergaert, P., Kondorosi, A., et al. (2003). Endoreduplication mediated by the anaphase-promoting complex activator CCS52A is required for symbiotic cell differentiation in *Medicago truncatula* nodules. *Plant Cell* *15*, 2093–2105.
- Vink, M., Simonetta, M., Transidico, P., Ferrari, K., Mapelli, M., De Antoni, A., Massimiliano, L., Ciliberto, A., Faretta, M., Salmon, E.D., et al. (2006). In vitro FRAP identifies the minimal requirements for Mad2 kinetochore dynamics. *Curr. Biol.* *16*, 755–766.
- Visconti, R., Palazzo, L., and Grieco, D. (2010). Requirement for proteolysis in spindle assembly checkpoint silencing. *Cell Cycle* *9*, 564–569.
- Vleugel, M., Hoogendoorn, E., Snel, B., and Kops, G.J.P.L. (2012). Evolution and function of the mitotic checkpoint. *Dev. Cell* *23*, 239–250.
- Von Mende, N. (1997). Invasion and Migration Behaviour of Sedentary Nematodes. *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions Developments in Plant Pathology* pp 51–64.
- Vos, J.W., Safadi, F., Reddy, A.S., and Hepler, P.K. (2000). The kinesin-like calmodulin binding protein is differentially involved in cell division. *Plant Cell* *12*, 979–990.
- Van de Cappelle, E., Plovie, E., Kyndt, T., Grunewald, W., Cannoot, B., and Gheysen, G. (2008). *AtCDKA;1* silencing in *Arabidopsis thaliana* reduces reproduction of sedentary plant-parasitic nematodes. *Plant Biotechnol. J.* *6*, 749–757.

- Van der Waal, M.S., Hengeveld, R.C.C., van der Horst, A., and Lens, S.M.A. (2012). Cell division control by the Chromosomal Passenger Complex. *Exp. Cell Res.* *318*, 1407–1420.
- Walczak, C.E., and Shaw, S.L. (2010). A MAP for bundling microtubules. *Cell* *142*, 364–367.
- Walczak, C.E., Vernos, I., Mitchison, T.J., Karsenti, E., and Heald, R. (1998). A model for the proposed roles of different microtubule-based motor proteins in establishing spindle bipolarity. *Curr. Biol.* *8*, 903–913.
- Walczak, C.E., Cai, S., and Khodjakov, A. (2010). Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 91–102.
- Wang, H., Zhou, Y., Bird, D.A., and Fowke, L.C. (2008). Functions, regulation and cellular localization of plant cyclin-dependent kinase inhibitors. *J Microsc* *231*, 234–246.
- 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. *Plant J.* *67*, 583–594.
- 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. *Plant Cell*.
- Wang, Q., Liu, T., Fang, Y., Xie, S., Huang, X., Mahmood, R., Ramaswamy, G., Sakamoto, K.M., Darzynkiewicz, Z., Xu, M., et al. (2004). BUBR1 deficiency results in abnormal megakaryopoiesis. *Blood* *103*, 1278–1285.
- Wang, X., Replogle, A., Davis, E.L., and Mitchum, M.G. (2007). The tobacco *Cel7* gene promoter is auxin-responsive and locally induced in nematode feeding sites of heterologous plants. *Mol. Plant Pathol.* *8*, 423–436.
- 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. *Plant J.* *69*, 227–240.
- Wang, Y., Hou, Y., Gu, H., Kang, D., Chen, Z.-L., Liu, J., and Qu, L.-J. (2013). The Arabidopsis Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Subunit 1 is Critical for Both Female Gametogenesis and Embryogenesis(F). *J Integr Plant Biol* *55*, 64–74.
- Warren, C.D., Brady, D.M., Johnston, R.C., Hanna, J.S., Hardwick, K.G., and Spencer, F.A. (2002). Distinct chromosome segregation roles for spindle checkpoint proteins. *Mol. Biol. Cell* *13*, 3029–3041.
- Wassmann, K., Liberal, V., and Benezra, R. (2003). Mad2 phosphorylation regulates its association with Mad1 and the APC/C. *EMBO J.* *22*, 797–806.
- Wasteneys, G.O. (2002). Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *J. Cell. Sci.* *115*, 1345–1354.
- Watanabe, Y. (2005). Shugoshin: guardian spirit at the centromere. *Curr. Opin. Cell Biol.* *17*, 590–595.
- Watanabe, Y. (2012). Geometry and force behind kinetochore orientation: lessons from meiosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 370–382.

- Waters, J.C., Mitchison, T.J., Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (1996). The kinetochore microtubule minus-end disassembly associated with poleward flux produces a force that can do work. *Mol. Biol. Cell* 7, 1547–1558.
- Waters, J.C., Chen, R.H., Murray, A.W., and Salmon, E.D. (1998). Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *J. Cell Biol.* 141, 1181–1191.
- Wei, Y., Multi, S., Yang, C.-R., Ma, J., Zhang, Q.-H., Wang, Z.-B., Li, M., Wei, L., Ge, Z.-J., Zhang, C.-H., et al. (2011). Spindle assembly checkpoint regulates mitotic cell cycle progression during preimplantation embryo development. *PLoS ONE* 6, e21557.
- Weiss, E., and Winey, M. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body duplication gene MPS1 is part of a mitotic checkpoint. *J. Cell Biol.* 132, 111–123.
- Wendell, K.L., Wilson, L., and Jordan, M.A. (1993). Mitotic block in HeLa cells by vinblastine: ultrastructural changes in kinetochore-microtubule attachment and in centrosomes. *J. Cell. Sci.* 104 (Pt 2), 261–274.
- Westhorpe, F.G., Tighe, A., Lara-Gonzalez, P., and Taylor, S.S. (2011). p31comet-mediated extraction of Mad2 from the MCC promotes efficient mitotic exit. *J. Cell. Sci.* 124, 3905–3916.
- Whyte, J., Bader, J.R., Tauhata, S.B.F., Raycroft, M., Hornick, J., Pfister, K.K., Lane, W.S., Chan, G.K., Hinchcliffe, E.H., Vaughan, P.S., et al. (2008). Phosphorylation regulates targeting of cytoplasmic dynein to kinetochores during mitosis. *J. Cell Biol.* 183, 819–834.
- Wicker-Planquart, C., Stoppin-Mellet, V., Blanchoin, L., and Vantard, M. (2004). Interactions of tobacco microtubule-associated protein MAP65-1b with microtubules. *Plant J.* 39, 126–134.
- Wigge, P.A., and Kilmartin, J.V. (2001). The Ndc80p complex from *Saccharomyces cerevisiae* contains conserved centromere components and has a function in chromosome segregation. *J. Cell Biol.* 152, 349–360.
- Wiggers, R.J., Starr, J.L., and Price, H.J. (1990). DNA content and variation in chromosome number in plant cells affected by *Meloidogyne incognita* and *M. arenaria*. *Phytopathology* 80, 1391–1395.
- Williamson, V.M., and Kumar, A. (2006). Nematode resistance in plants: the battle underground. *Trends Genet.* 22, 396–403.
- Wilson, M., Bird, D., and Van der Knaap, E. (1994). A comprehensive subtractive cDNA cloning approach to identify nematode-induced transcripts in tomato. *Phytopathology* 84:299–303.
- Windecker, H., Langegger, M., Heinrich, S., and Hauf, S. (2009). Bub1 and Bub3 promote the conversion from monopolar to bipolar chromosome attachment independently of shugoshin. *EMBO Rep.* 10, 1022–1028.
- Wojcik, E., Basto, R., Serr, M., Scaërou, F., Karess, R., and Hays, T. (2001). Kinetochore dynein: its dynamics and role in the transport of the Rough deal checkpoint protein. *Nat. Cell Biol.* 3, 1001–1007.
- Wuyts, N., Lognay, G., Swennen, R., and De Waele, D. (2006). Nematode infection and reproduction in transgenic and mutant *Arabidopsis* and tobacco with an altered phenylpropanoid metabolism. *J. Exp. Bot.* 57, 2825–2835.
- Wyss, U. (1997). Root Parasitic Nematodes: An Overview. In *Cellular and Molecular Aspects of Plant-Nematode Interactions*, C. Fenoll, F.M.W. Grundler, and S.A. Ohl, eds. (Springer Netherlands), pp. 5–22.

- Wyss, U., Grundler, F.M.W., and Munch, A. (1992). The Parasitic Behaviour of Second-Stage Juveniles of *Meloidogyne Incognita* in Roots of *Arabidopsis Thaliana*. *Nematologica* *38*, 98–111.
- Xue, B., Hamamouch, N., Li, C., Huang, G., Hussey, R.S., Baum, T.J., and Davis, E.L. (2013). The 8D05 parasitism gene of *Meloidogyne incognita* is required for successful infection of host roots. *Phytopathology* *103*, 175–181.
- Yamagishi, Y., Yang, C.-H., Tanno, Y., and Watanabe, Y. (2012). MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nat. Cell Biol.* *14*, 746–752.
- Yamaguchi, S., Decottignies, A., and Nurse, P. (2003). Function of Cdc2p-dependent Bub1p phosphorylation and Bub1p kinase activity in the mitotic and meiotic spindle checkpoint. *EMBO J.* *22*, 1075–1087.
- Yang, M., Li, B., Tomchick, D.R., Machius, M., Rizo, J., Yu, H., and Luo, X. (2007). p31comet blocks Mad2 activation through structural mimicry. *Cell* *131*, 744–755.
- Yasuhara, H., and Oe, Y. (2011). TMBP200, a XMAP215 homologue of tobacco BY-2 cells, has an essential role in plant mitosis. *Protoplasma* *248*, 493–502.
- Yi, H., Sardesai, N., Fujinuma, T., Chan, C.-W., Veena, and Gelvin, S.B. (2006). Constitutive expression exposes functional redundancy between the *Arabidopsis* histone H2A gene HTA1 and other H2A gene family members. *Plant Cell* *18*, 1575–1589.
- Yoneda, A., Akatsuka, M., Hoshino, H., Kumagai, F., and Hasezawa, S. (2005). Decision of spindle poles and division plane by double preprophase bands in a BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Plant Cell Physiol.* *46*, 531–538.
- Yu, H. (2007). Cdc20: a WD40 activator for a cell cycle degradation machine. *Mol. Cell* *27*, 3–16.
- Yu, H.G., Muszynski, M.G., and Kelly Dawe, R. (1999). The maize homologue of the cell cycle checkpoint protein MAD2 reveals kinetochore substructure and contrasting mitotic and meiotic localization patterns. *J. Cell Biol.* *145*, 425–435.
- Zeng, C.J.T., Lee, Y.-R.J., and Liu, B. (2009). The WD40 repeat protein NEDD1 functions in microtubule organization during cell division in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* *21*, 1129–1140.
- Zhang, H., and Dawe, R.K. (2011). Mechanisms of plant spindle formation. *Chromosome Res.* *19*, 335–344.
- Zhang, J., Ahmad, S., and Mao, Y. (2007). BubR1 and APC/EB1 cooperate to maintain metaphase chromosome alignment. *J. Cell Biol.* *178*, 773–784.
- Zhang, W., Lee, H.-R., Koo, D.-H., and Jiang, J. (2008). Epigenetic modification of centromeric chromatin: hypomethylation of DNA sequences in the CENH3-associated chromatin in *Arabidopsis thaliana* and maize. *Plant Cell* *20*, 25–34.
- 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. *Plant Cell* *23*, 1033–1046.
- Zich, J., Sochaj, A.M., Syred, H.M., Milne, L., Cook, A.G., Ohkura, H., Rappsilber, J., and Hardwick, K.G. (2012). Kinase activity of fission yeast Mph1 is required for Mad2 and Mad3 to stably bind the anaphase promoting complex. *Curr. Biol.* *22*, 296–301.

Zirkle, R.E. (1970). Ultraviolet-microbeam irradiation of newt-cell cytoplasm: spindle destruction, false anaphase, and delay of true anaphase. *Radiat. Res.* *41*, 516–537.

POSTERS

Dissecting molecular regulation of MAP65-3, a Microtubule-Associated Protein essential for nematode-induced giant cell formation

Laetitia Paganelli, Michaël Quentin, Isabelle Baurès, Marie-Cécile Caillaud, Philippe Lecomte, Nicolas Marfaing, Pierre Abad and Bruno Favery

A-CNRS-Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR1301-6243, Interactions Biotiques et Santé Végétale, 400 route des Chappes, F-06903 Sophia Antipolis, France

Contacts laetitia.paganelli@sophia.inra.fr; favery@sophia.inra.fr



Summary: Root knot nematodes *Meloidogyne* spp. have evolved the ability to manipulate host functions to their own advantage, by redifferentiating root cells into multinucleate and hypertrophied feeding cells. These giant cells result from repeated rounds of karyokinesis without cell division. To obtain a more comprehensive view of the molecular mechanisms underlying the giant cell ontogenesis, we focused on the functional analysis of *Arabidopsis* *MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN 65-3* (*MAP65-3*) identified by a promoter trap strategy. *MAP65-3* gene transcriptional activation occurred early in giant cells. Plants expressing *PromoterMAP65-3::GFP::GUS* confirmed that *MAP65-3* was expressed in dividing cells such as in root meristems. A detailed functional analysis demonstrated that *MAP65-3* is crucial for multinucleate giant cell development in *Arabidopsis* roots infected with parasitic nematodes and is associated with "mini cell plates", which separate daughter nuclei in the giant cells. We showed that *MAP65-3* plays a key role in organizing microtubule arrays during mitosis and cytokinesis (Caillaud *et al.*, 2008 Plant Cell). To deepen our understanding of the *MAP65-3* roles and microtubule cytoskeleton dynamics during giant cell ontogenesis, we developed two strategies. To identify signalling components upstream of *MAP65-3*, a forward genetic screen was set up. Plants expressing *PromoterMAP65-3::GFP::GUS* reporter genes were mutagenized by EMS. We are currently screening M2 plants to identify mutants with a loss of GFP fluorescence in root meristems. Genetic analysis of these mutants will be initiated and candidates will be analysed for their function during giant cell ontogenesis. In addition, *MAP65-3* interacting proteins will be searched using a yeast two-hybrid system. The screening of two prey cDNA libraries (meristems of uninfected plants or galls) will allow us to estimate whether *MAP65-3* uses the same protein partners during plant development and during plant-nematode interaction.

ESSENTIAL ROLE OF MAP65-3 DURING GIANT CELL FORMATION

Promoter-trap strategy = GUS in nematode induced giant cell

DY283 line: One T-DNA inserted in *MAP65-3*

GUS activity in giant cells (*) 7 days after inoculation (dai) with *M. incognita* (N). Root meristem

MAP65-3 expression pattern = tissue enriched in dividing cells

map65-3 KO mutant = defect in giant cell ontogenesis

Wild type (wt) *map65-3* KO mutant

1 dai

10 dai

21 dai

2 months

mini cell plate

abnormal cell wall stub

mature giant cells

aborted giant cells

MAP65-3 colocalizes with "mini cell plates" separating daughter nuclei in developing giant cells

MAP4-MBD::GFP

PMAP65-3::MAP65-3::GFP

Multiple mitotic spindles in giant cells

Mini cell plate decorated by MAP65-3

mini cell plate

MAP65-3

Identification of signaling components upstream of MAP65-3

15,000 seeds from homozygous plants expressing GFP and GUS reporter genes under the control of the *MAP65-3* promoter were mutagenized with EMS

Screening *in vitro* for M2 plants with GFP-affected pattern

M2 lines are screened for loss of GFP/GUS expression in the root meristem, and backcrosses performed on candidate lines

Selection of lines with defect in GFP/GUS expression in giant cells, and analysis of *M. incognita* development on the mutated lines

Mapping

Identification and characterization of MAP65-3 interacting proteins

Yeast Split-Ubiquitin System

Prey cDNA library (galls, dividing cells)

MAP65-3

FOA

No interaction

Interacting Protein

In planta validation by « Bimolecular Fluorescent Complementation » (BiFC)

MAP65-3

Candidate Protein

Transient protein expression in tobacco leaves

Interaction observed on the microtubule cortical array

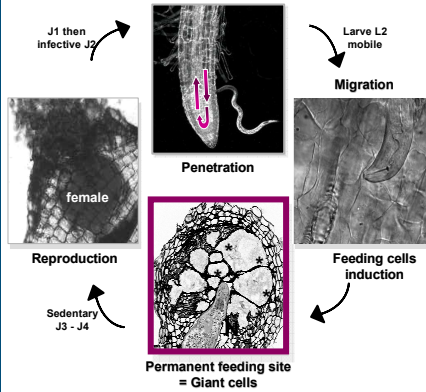
Biochemical validation

Dissecting roles of MAP65-3 and the Mitotic Checkpoint Complex in nematode-induced giant cell formation

Laëtitia Paganelli, Marie-Cécile Caillaud, Philippe Lecomte, Isabelle Damiani, Nicolas Marfaing, Pierre Abad and Bruno Favery

INRA-CNRS-Université de Nice Sophia-Antipolis, UMR1301-6243, Interactions Biotiques et Santé Végétale, 400 route des Chappes, F-06903 Sophia Antipolis, France

contacts laetitia.paganelli@sophia.inra.fr; favery@sophia.inra.fr



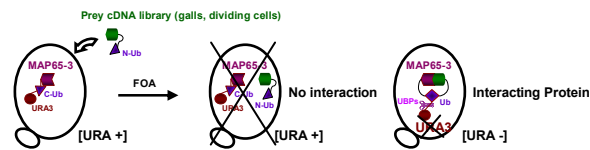
Introduction: Root knot nematodes (RKN) from the genus *Meloidogyne* are among the most damaging plant pathogens worldwide. They have evolved strategies enabling them to infest thousands of plant species, probably by manipulating fundamental key elements of plant cell development. These obligate sedentary endoparasitic nematodes interact with their hosts in a remarkable manner. During compatible interaction, they establish and maintain permanent feeding cells, which are essential for their growth and reproduction. These feeding cells enlarge considerably and become multinucleate through synchronous nuclear divisions in the absence of cell division, and are called giant cells. The hyperplasia of the surrounding cells leads to the formation of the typical root gall. Characterizing plant genes required for giant cell development may give insight on the strategies developed by nematodes to manipulate host functions.

Large genetic screens and knockout of genes activated in the early stages of giant cells formation have led to the characterization of a Microtubule-Associated Protein **MAP65-3 essential for giant cell development** (Caillaud *et al.*, 2008). **MAP65-3** gene transcriptional activation occurred early in root cells. Plants expressing Promoter**MAP65-3**:GFP:GUS confirmed that **MAP65-3** was expressed in dividing cells such as in root meristems. We showed that **MAP65-3** plays a key role in organizing microtubule arrays during mitosis and cytokinesis. A detailed functional analysis demonstrated that **MAP65-3** is crucial for multinucleate giant cell development in *Arabidopsis* roots infected with parasitic nematodes: in the absence of functional **MAP65-3**, giant cells fail to develop but do not complete their differentiation. These giant cell defects impair the maturation of the infecting nematodes. Thus, **MAP65-3** is required for successful pathogen growth and development.

The present project aims at the elucidation of the molecular mechanisms underlying cytoskeleton regulator-dependent disease susceptibility. Towards this goal, search for **MAP65-3 interacting proteins** was undertaken.

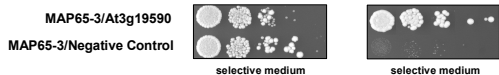
Identification and characterization of MAP65-3 interacting proteins

Yeast two-hybrid (Y2H) Split-Ubiquitin System



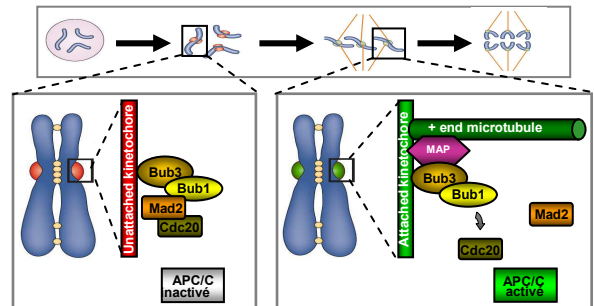
First interacting protein: At3G19590 : homology with human and yeast BUB3 protein

Validation of MAP65-3/At3g19590 interaction by Y2H Split-Ubiquitin



BUB3 is a member of the Mitotic Checkpoint Complex (MCC)

Required to block anaphase onset until all chromosomes are properly attached to the spindle microtubules



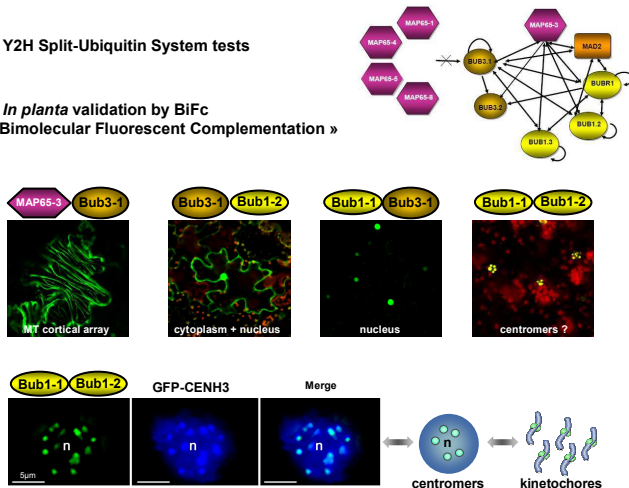
Arabidopsis orthologues: 4 X Bub3, 3 X Bub1, Mad2

CHARACTERIZATION OF THE MCC IN ARABIDOPSIS AND ITS ROLE IN GIANT CELL FORMATION

All MCC proteins interact together and with MAP65-3

Y2H Split-Ubiquitin System tests

In planta validation by BiFC « Bimolecular Fluorescent Complementation »



Functional analysis of the MCC proteins and role in giant cell formation

BUB3.1, MAD2 and two BUB1 are expressed in galls induced by RKN

	0dai	3dai	6dai	9dai	12dai	15dai	18dai	21dai	1st mal
MAP65-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BUB3-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BUB3-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BUB3-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BUB3-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BUB1-1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BUB1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BUB1-3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAD2	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Expression profile during plant development and nematode interaction

In progress

- Nematode resistance test on KO mutants & Search for developmental phenotypes
- In planta subcellular localization studies
 - in giant cells
 - during normal cell cycle or altered by microtubules-destabilizing treatment

