



**HAL**  
open science

# Contrôle spatial de la division cellulaire chez les plantes : rôle des protéines TRM6-TRM7-TRM8 d'Arabidopsis thaliana dans la formation de l'anneau de préprophase

Estelle Schaefer

## ► To cite this version:

Estelle Schaefer. Contrôle spatial de la division cellulaire chez les plantes : rôle des protéines TRM6-TRM7-TRM8 d'Arabidopsis thaliana dans la formation de l'anneau de préprophase. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2014. Français. NNT : 2014PA112042 . tel-01552311v1

**HAL Id: tel-01552311**

**<https://theses.hal.science/tel-01552311v1>**

Submitted on 2 Jul 2017 (v1), last revised 21 Sep 2017 (v2)

**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.



Comprendre le monde,  
construire l'avenir®



UNIVERSITE PARIS-SUD  
UFR des Sciences



Ecole Doctorale : Sciences du végétal

*DISCIPLINE : BIOLOGIE*

## THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN SCIENCES DE L'UNIVERSITE PARIS SUD

par

**Estelle SCHAEFER**

**Contrôle spatial de la division cellulaire chez les  
plantes : rôle des protéines TRM6-TRM7-TRM8  
*d'Arabidopsis thaliana* dans la formation de  
l'anneau de préprophase**

Soutenance prévue le 13 mars 2014

### Composition du jury :

<i>Rapporteurs :</i>	Anne-Catherine Schmit	IBMP - Strasbourg
	Téva Vernoux	RDP - Lyon
<i>Examineurs :</i>	Frédéric Coquelle	Paris-Sud 11 - ISV
	Herman Höfte	IJPB - Versailles
	Daniel Van Damme	VIB - Gent
<i>Directrice de thèse :</i>	Martine Pastuglia	IJPB - Versailles



## Remerciements

Ces remerciements s'adressent à toutes les personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à l'aboutissement de mon projet de thèse.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Anne-Catherine Schmit, Téva Vernoux, Frédéric Coquelle, Herman Höfte et Daniel Van Damme d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je tiens à remercier Martine Pastuglia et David Bouchez pour la confiance qu'ils m'ont témoignée tout au long de ce travail, pour m'avoir confié ce beau projet et pour leurs conseils. Je remercie plus particulièrement Martine pour son énergie, sa disponibilité, sa gentillesse et sa façon très didactique de m'expliquer les choses. Je souhaite remercier également Magalie Uyttewaal, Katia Belcram et Magali Goussot qui m'ont accompagnée tout au long de cette thèse. L'aide et le temps qu'elles m'ont accordé, dans la bonne humeur, ont été pour moi d'une grande valeur et une expérience enrichissante sur le plan professionnel et personnel.

Merci à Yann Duroc pour sa présence et son soutien. Merci à Olivier Grandjean pour son aide précieuse au confocal et à Halima Morin pour les hybridations *in situ*. Je n'oublie pas Olivier Hamant, Daniel Van Damme et Jean-Christophe Palauqui pour m'avoir soutenu et guidé lors des comités de thèse.

Je remercie également les serristes qui s'occupent quotidiennement de nos plantes ainsi que les membres du bâtiment 7, notamment ceux de la laverie et les membres du pôle MSM.

Je remercie aussi Magalie Uyttewaal, Carine Rizzolatti, Béate Hoffman, Lina Malouk, Nawel Haili et Jennifer Dahan pour les moments passés ensemble.

Je remercie également mes amis: le groupe de Nancy (Laurent, Jeanne, Victoire, Nicolas, Frédo, Clémence, Dorothée, Christophe, Yvon...), Julie et sa petite famille, Agathe et Alexia, et ceux que j'aurais oublié de mentionner ici.

Je n'oublie pas les Dirat : les parents Sylvie et Henri, la sœur Charlotte et surtout le frère. Max, merci pour ton aide pour les illustrations, mais plus particulièrement pour tout le reste. Ton humour et ta façon d'être font oublier tous les tracas quotidiens !

Enfin, un immense merci à mes parents et ma sœur pour leur soutien et leur générosité depuis 28 ans. Je leur dédie cette thèse.

En un mot : Merci



## Abréviations

3AT : 3-Amino Triazole  
AD : Activating Domain  
ADN : Acide Désoxyribonucléique  
ADNc : ADN complémentaire  
ADZ : Actine Depleted Zone  
ADD1 : ALTERNATIVE DISCORDIA1  
APC : Anaphase Promoting Complex  
ARN : Acide Ribonucléique  
BD : Binding Domain  
BiFC : Biomolecular Fluorescence Complementation  
BY-2 : Bright-Yellow 2  
CAK : CDK-Activating Kinase  
CAP350 : Centrosome Associated Protein 350  
CDC20 : Cell Division Cycle 20  
CDH1 : CDC20 Homolog 1  
CDK : Cycline Dependent Kinase  
CDS : Cortical Division Site  
CDZ : Cortical Division Zone  
CEI : Cellule initiale cortex/endoderme  
CLASP : CLIP-Associated Protein  
CSI1 : Cellulose Synthase Interactive protein 1  
CYC : Cycline  
D-box : Boite de destruction  
DCD1 : DISCORDIA1  
FOP : Fibroblast Growth Factor Oncogen Partner  
FOR20 : FOP-related Protein of 20 kDa  
FORIN1 : FOR20 interacting protein 1  
GCP : Gamma-tubulin Containing Protein  
GDP : Guanosine diphosphate  
GFP : Green Fluorescente Protein  
GTP : Guanosine triphosphate  
GUS :  $\beta$ -glucurodinase  
GW : Gateway  
IP : iodure de propidium  
kDa : kilo Dalton  
KDZ : Kinesin CDKA;1 associated Depleted Zone  
KINU : KINESIN Ungrouped  
KRP4 : Kip-related protein 4  
LRC : Lateral Root Cap  
MAP : Microtubule Associated Protein  
MOR1 : Microtubule organization 1  
MSA : M-specific activator  
MT : microtubule  
MTOC : Centre Organisateur des Microtubules  
NAA : acide 1-naphthaleneacetic

NPA : acide naphthylphtalamique  
OFD1 : Oral Facial Digital 1  
ORF : Open Reading Frame  
pb (ou bp) : paires de bases  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
pH : potentiel hydrogène  
pI : point isoélectrique  
PI : propidium iodide  
PLT : PLETHORA  
POK : PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN  
PP2A : Protéine Phosphatase de type 2A  
PPB : PreProphase Band  
Pro35S : Cauliflower Mosaic Virus 35S promotor  
RanGAP1 : Ran GTPase Activating Protein1  
RFP : Red Fluorescente Protein  
RSA1 : Regulator of Spindle Assembly 1  
SCR : SCARECROW  
SHR : SHORTROOT  
TAN : TANGLED  
TAP-Tag : Tandem Afinity Purification Tag  
TOF : TON1-OFD1-FOP  
TON : TONNEAU  
TPXL-1 : TPX2 (Targeting Protein for Xenopus Klp2)-Like family member  
TRM : TON1 Recruiting Motif  
TTP : TON1-TRM-PP2A  
TuRC : Tubulin Ring Complex  
TuSC : Tubulin Small Complex  
X-gluc : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronique  
YFP : Yellow Fluorescent Protein  
WOX5 : WUSCHEL-related homeobox

<b>Introduction.....</b>	<b>7</b>
<b>1 La position des plans de division dans la racine est finement contrôlée ...</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Organisation générale de la racine .....</b>	<b>13</b>
1.1.1 Différents tissus composent la racine.....	13
1.1.2 La racine est découpée en quatre zones distinctes .....	17
<b>1.2 L'identité des cellules est déterminée par le centre quiescent et les cellules initiales .....</b>	<b>21</b>
1.2.1 La voie SHORTROOT/SCARECROW est impliquée dans la division formatrice endoderme/cortex .....	21
1.2.2 D'autres mécanismes de transcription sont impliqués dans l'organisation cellulaire du méristème racinaire .....	23
<b>1.3 Contrôle hormonal de la croissance racinaire.....</b>	<b>25</b>
1.3.1 Le rôle de l'auxine dans le développement racinaire .....	25
1.3.2 D'autres hormones sont impliquées dans le développement de la racine.....	29
<b>1.4 La géométrie de la cellule influence la détermination du plan de division .....</b>	<b>31</b>
<b>2 La détermination du plan de division est prémitotique chez les plantes terrestres.....</b>	<b>33</b>
<b>2.1 Structure des microtubules chez les plantes terrestres .....</b>	<b>33</b>
2.1.1 Structure des microtubules .....	33
2.1.2 La nucléation des microtubules chez les cellules animales .....	33
2.1.3 Nucléation des microtubules chez les cellules végétales .....	37
2.1.4 Instabilité dynamique .....	41
2.1.5 Des nombreuses protéines participent à la formation de réseaux de microtubules .....	43
<b>2.2 Les réseaux de microtubules sont impliqués dans le développement des plantes</b>	<b>47</b>
2.2.1 Le réseau d'interphase chez les cellules végétales .....	49
2.2.2 La PPB détermine le plan de division de manière prémitotique .....	49
2.2.3 Les marqueurs de la zone de division corticale .....	65
<b>3 Le cycle cellulaire chez les plantes.....</b>	<b>77</b>
<b>3.1 Les régulateurs clés du cycle cellulaire .....</b>	<b>77</b>
3.1.1 CDK – cyclin-dependent kinases .....	79
3.1.2 Cyclines .....	79
<b>3.2 La progression du cycle cellulaire.....</b>	<b>83</b>
3.2.1 La transition G2/M.....	85
3.2.2 Progression de la mitose grâce à l'Anaphase Promoting Complex.....	87
<b>3.3 Localisation des acteurs du cycle cellulaire à la PPB .....</b>	<b>91</b>
3.3.1 CDKA;1, CYCA1;1 et CYCB1;2 sont localisées à la PPB .....	91
3.3.2 D'autres régulateurs du cycle cellulaire sont localisés à la PPB.....	93
<b>4 Contexte et objectifs de la thèse .....</b>	<b>95</b>
<b>4.1 TON1.....</b>	<b>97</b>
<b>4.2 FASS/PP2A .....</b>	<b>103</b>
<b>4.3 La famille des protéines TRM .....</b>	<b>107</b>
<b>4.4 Objectifs de la thèse.....</b>	<b>111</b>



**Rôle des protéines TRM6, TRM7 et TRM8 dans la formation de l'anneau de préprophase.....115**

**Article: Normal morphogenesis in plants lacking PPB.....119**

**Etude de l'expression des gènes *TRM19* et *TRM29*.....173**

1. Patron d'expression et localisation subcellulaire de TRM19..... 177
  1. 1. Patron d'expression de TRM19..... 177
  1. 2. Localisation subcellulaire de TRM19 ..... 179
2. Patron d'expression de *TRM29* ..... 183
3. Matériel et méthodes ..... 189

**Existe-t-il un complexe TTP chez l'homme?.....201**

1. Introduction : Des similarités entre protéines animales et végétales..... 203
2. Matériel et méthodes..... 213
3. Résultats : Des interactions conservées entre protéines animales et végétales..... 217
4. Discussion ..... 219

**Conclusion générale.....225**

**Bibliographie.....237**





# Introduction

---



L'ancêtre commun aux plantes et aux animaux a existé il y a plus d'un milliard d'années et était unicellulaire (Meyerowitz, 2002). La multicellularité des organismes actuels est donc apparue de façon indépendante dans les deux lignages, dont les modes de développement sont différents à de multiples égards. Malgré ces divergences, les animaux et plantes actuels partagent de nombreuses caractéristiques cellulaires et moléculaires communes à tous les eucaryotes, apparues avant la séparation des deux lignages. C'est en particulier le cas du cytosquelette, constitué de microtubules et de microfilaments d'actine, qui joue un rôle majeur au cours de la division, de l'élongation et de la différenciation cellulaire (Mitchison, 1995). Néanmoins, bien que les composants de base soient les mêmes, le cytosquelette est organisé et mobilisé de façon différente dans les deux lignages, comme c'est le cas lors de la division cellulaire.

Au cours de l'évolution, les plantes ont acquis un certain nombre de caractéristiques morphologiques et cellulaires. Une des adaptations les plus marquantes et spécifique aux plantes est l'existence de la paroi pecto-cellulosique, enveloppe rigide entourant la cellule végétale et qui la colle aux cellules voisines. La paroi a de fortes répercussions sur la vie des cellules végétales. En effet, la présence de la paroi autour de la cellule implique un certain nombre de contraintes au niveau cellulaire, tout particulièrement lors de la division cellulaire. Du fait de la paroi et de la forte pression de turgescence au sein des cellules, la séparation des deux cellules filles ne peut se faire par constriction et formation d'un sillon de division, comme chez les cellules animales, et les cellules végétales ont développé d'autres modalités pour se diviser comme la synthèse d'une nouvelle plaque cellulaire entre les deux cellules filles. D'autre part, la paroi empêchant toute migration cellulaire, la position des cellules les unes par rapport aux autres dépend de la position et de l'orientation des plans de division ainsi que de l'élongation cellulaire. Par conséquent, la morphogenèse et l'organisation cellulaire des tissus végétaux reposent fortement sur un contrôle spatio-temporel précis du plan de division. Chez les plantes terrestres, le positionnement des plans de division implique une structure de microtubules spécifique aux Embryophytes : l'anneau de préprophase ou PPB (PreProphase Band). La PPB se forme au cortex lors de la fin de la phase G2 et disparaît peu après la rupture de l'enveloppe nucléaire. Elle détermine avec précision le site d'insertion de la nouvelle plaque cellulaire qui se forme entre les deux cellules filles.



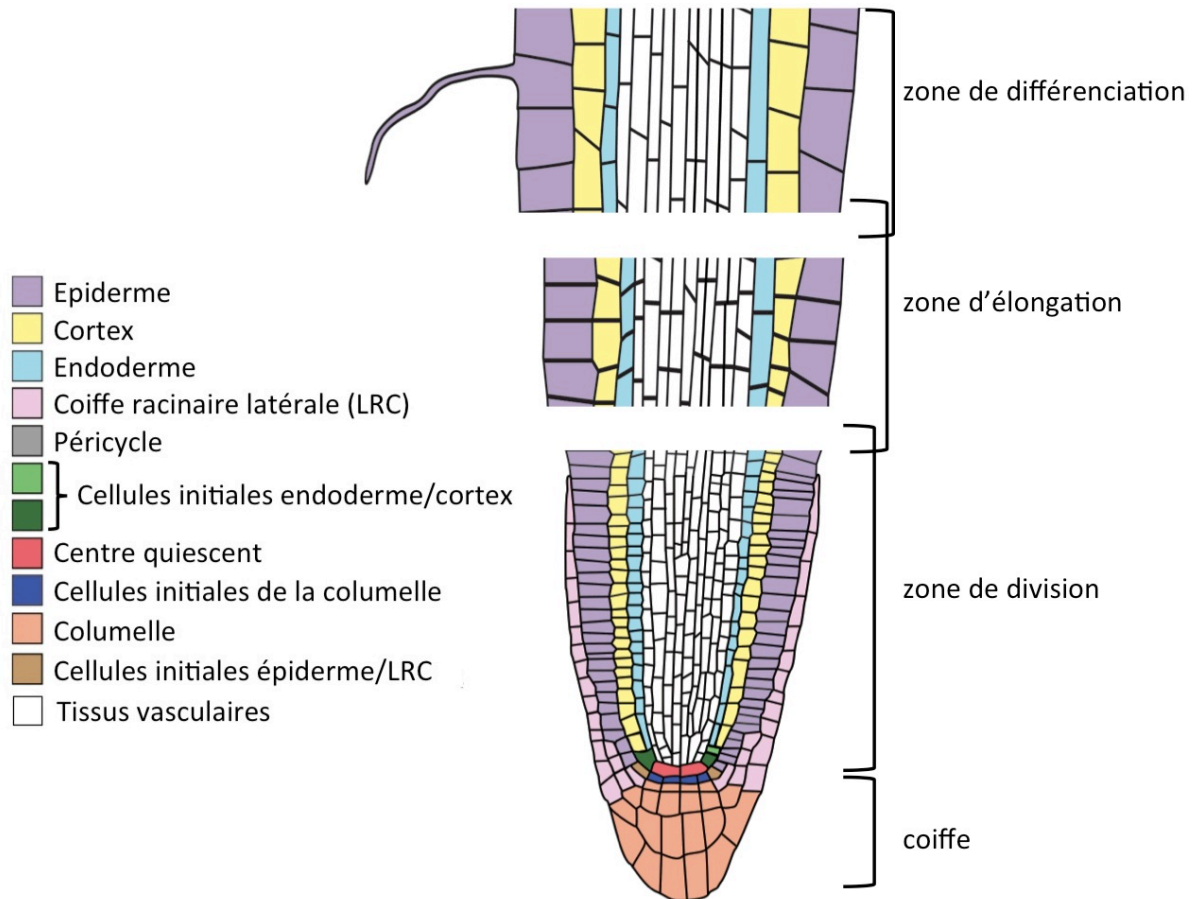
Dans cette introduction, je ferai un état des lieux des connaissances sur la détermination du plan de division chez les plantes terrestres, en insistant sur les informations qui me semblent pertinentes et apportent des éléments essentiels à la compréhension de ce manuscrit. Pour cela, dans une première partie, je m'intéresserai principalement aux voies de signalisation qui contrôlent le positionnement des plans de division en prenant comme exemple la racine d'*Arabidopsis*. La racine d'*Arabidopsis* présente une organisation simple et bien caractérisée et est un modèle d'étude depuis de nombreuses années. La deuxième partie sera consacrée à la formation et au rôle d'une structure impliquée dans la détermination du plan de division, l'anneau de préprophase. Cet anneau étant constitué de microtubules, je détaillerai la formation et l'organisation des microtubules au cours du cycle cellulaire, ainsi que leur rôle dans le positionnement des plans de division. Enfin, la dernière partie présentera le cycle cellulaire des cellules végétales, étroitement lié au cycle des microtubules, et les liens qui commencent à émerger entre le contrôle temporel et le contrôle spatial de la division.

## **1 La position des plans de division dans la racine est finement contrôlée**

Le développement des plantes se compose de deux grandes étapes : l'embryogénèse et le développement post-embryonnaire. A la différence des animaux multicellulaires où les tissus et le plan d'organisation sont déterminés pendant l'embryogénèse, chez les plantes, l'organisation des tissus est établie durant le développement embryonnaire mais leur mise en place n'est pas limitée à ce stade. Elle se déroule tout au long de la vie de la plante grâce à l'activité des méristèmes, amas de petites cellules indifférenciées et capables de se diviser par mitoses. Les cellules des méristèmes permettent de former un nouvel organe et assurent également le maintien du stock de cellules indifférenciées du méristème.

L'organisation cellulaire des tissus est déterminée par la division, l'élongation et la différenciation des cellules. La position du plan de clivage est un événement fondamental pour l'architecture des tissus et la morphogénèse (Metzinger and Bergmann, 2010; Rasmussen et al., 2011a; Smolarkiewicz and Dhonukshe, 2013). Les cellules se multiplient





**Figure 1 : Représentation schématique d'une pointe racinaire d'*Arabidopsis*.** Les différents tissus sont organisés en files cellulaires le long de la racine. Adapté de (Perilli et al., 2012).

principalement par divisions symétriques. Les divisions asymétriques sont associées à l'initiation de nouveaux organes ou à la formation de nouveaux types cellulaires. Dans cette partie, je me focaliserai sur la racine d'*Arabidopsis*, où il a été montré que facteurs de transcription et hormones, en particulier l'auxine, jouent un rôle fondamental dans le contrôle du plan de division.

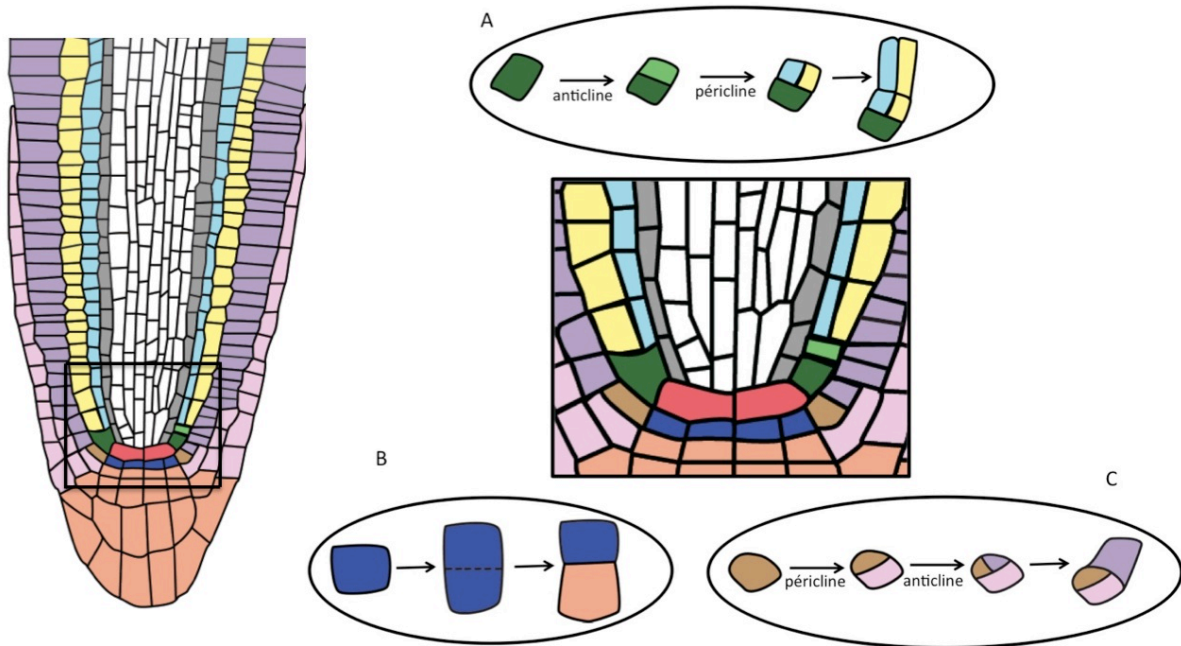
La racine d'*Arabidopsis thaliana* présente une organisation tissulaire relativement simple. Dans les différents tissus, il n'y a qu'un faible nombre de files cellulaires. Ce nombre est constant d'une plante à l'autre et facilement observable en coupe transversale et longitudinale. La racine d'*Arabidopsis* est donc un modèle simple pour l'étude du développement.

## 1.1 Organisation générale de la racine

### 1.1.1 Différents tissus composent la racine

La racine est composée de plusieurs tissus (figure 1) : l'épiderme, le cortex, l'endoderme, le péricycle, les tissus conducteurs, la coiffe racinaire latérale (LRC) et la columelle (Aida et al., 2004; Campilho et al., 2006). Chaque tissu est formé d'un ensemble de cellules présentant les mêmes fonctions et produites par des cellules spécifiques qui se divisent activement : les cellules initiales. Le maintien des cellules initiales dans un état indifférencié est assuré par le centre quiescent (Jurgens et al., 1994; van den Berg et al., 1997). Ce dernier est composé de quatre cellules qui ne se divisent que rarement pour se renouveler et remplacer les cellules initiales déplacées de leur position (Kidner et al., 2000).

Les divisions cellulaires asymétriques, où les cellules filles acquièrent des identités distinctes, sont appelées des divisions formatrices (Hardham and Gunning, 1978; Scheres and Benfey, 1999; Rasmussen et al., 2011a; Smolarkiewicz and Dhonukshe, 2013). Elles ont lieu à divers stades de développement comme lors des stades précoces de l'embryon, lorsque le protoderme se met en place, ou lors de la formation d'organes latéraux (Jurgens, 1995; De Smet and Beeckman, 2011).



**Figure 2 : Formation des différents tissus racinaires chez *Arabidopsis*.** Tous les tissus de la racine ont pour origine le centre quiescent (en rouge) et les cellules initiales. A : La cellule initiale cortex/endoderme (en vert foncé) se divise de manière asymétrique pour se maintenir et former une autre cellule (en vert clair) qui se divise également asymétriquement et forme les cellules précurseurs de l'endoderme (en bleu clair) et du cortex (en jaune). Après quelques divisions supplémentaires, les cellules se différencient en cortex mature (parenchyme cortical) et en cellules de l'endoderme. B : Les cellules initiales de la columelle (en bleu foncé) produisent les cellules de la columelle (en orange) qui ne se divisent pas et se différencient directement. C : La coiffe racinaire latérale (en rose) est formée par division péricline de la cellule initiale épiderme/coiffe racinaire latérale (en brun). Les cellules filles de ces cellules initiales formées par divisions horizontales forment l'épiderme (en violet). Les cellules initiales des tissus vasculaires (en blanc) et le péri-cycle qui les entourent forment des cellules apicales qui se différencient et des cellules basales qui maintiennent les cellules initiales. Adapté de (Abrash and Bergmann, 2009).

L'épiderme, la coiffe racinaire latérale (LRC) et la columelle constituent la surface extérieure de la racine. La columelle se forme par division des cellules initiales de la columelle situées en dessous du centre quiescent (figure 2 B). Les cellules de la columelle agissent comme des statocytes, cellules impliquées dans la perception de la gravité (Morita, 2010). La perception de la gravité dépend d'amyloplastés spécialisés, les statolithes, qui sédimentent selon la gravité.

L'épiderme est le tissu le plus superficiel présent à la surface de toute la plante et généralement constitué d'une seule assise cellulaire. Certaines cellules de l'épiderme racinaire se différencient en poils racinaires afin d'assurer la nutrition en eau et sels minéraux. Les cellules de l'épiderme et de la LRC dérivent des cellules initiales Epiderme/LRC situées sur les côtés du centre quiescent (figure 2 C). Les initiales Epiderme/LRC se divisent une première fois de manière péricline, la nouvelle paroi formée étant parallèle aux parois latérales de la cellule mère. La cellule fille la plus externe deviendra une nouvelle couche de la coiffe racinaire latérale. La cellule fille la plus interne se divisera ensuite de manière anticline pour produire une cellule initiale et une cellule fille qui se différenciera en cellules de l'épiderme.

Le cortex se situe juste en dessous de l'épiderme. Ces cellules servent au stockage des nutriments comme c'est le cas chez la racine de carotte ou chez la patate douce (Harrison et al., 2003). Le cortex est bordé à l'intérieur par l'endoderme, composé d'une seule assise cellulaire. Les parois des cellules de l'endoderme sont épaissies par de la lignine puis, au cours de leur différenciation, par de la subérine, substance imperméable à l'eau. Il a récemment été montré que les parois de ces cellules sont constituées de lignine (Roppolo et al., 2011). Ces cellules forment le cadre de Caspary, qui empêche le passage de l'eau et des solutés du cortex au cylindre central par diffusion apoplasmique. L'eau et les solutés qui s'y trouvent ne peuvent passer l'endoderme qu'en franchissant la membrane de ces cellules à l'aide de transporteurs, ce qui permet de réguler les mouvements d'eau et de sélectionner les ions et molécules qui entrent et sortent des tissus vasculaires. Le cortex et l'endoderme sont produits par les cellules initiales cortex/endoderme (CEI), qui se divisent de manière anticline, la paroi formée étant perpendiculaire aux parois latérales de la cellule mère, pour se régénérer et produire les cellules filles des CEI (figure 2 A). Ces cellules filles se divisent ensuite de façon péricline pour générer l'endoderme et le cortex.



Le péricycle est situé entre l'endoderme et les tissus conducteurs. Certaines cellules du péricycle peuvent se dédifférencier pour former un nouveau méristème qui donnera naissance aux racines latérales. Les tissus conducteurs des plantes comprennent les vaisseaux du xylème et du phloème qui transportent l'eau et les sels minéraux (xylème) et les produits issus de la photosynthèse nécessaires au développement de la plante (phloème) (Dolan et al., 1993).

### **1.1.2 La racine est découpée en quatre zones distinctes**

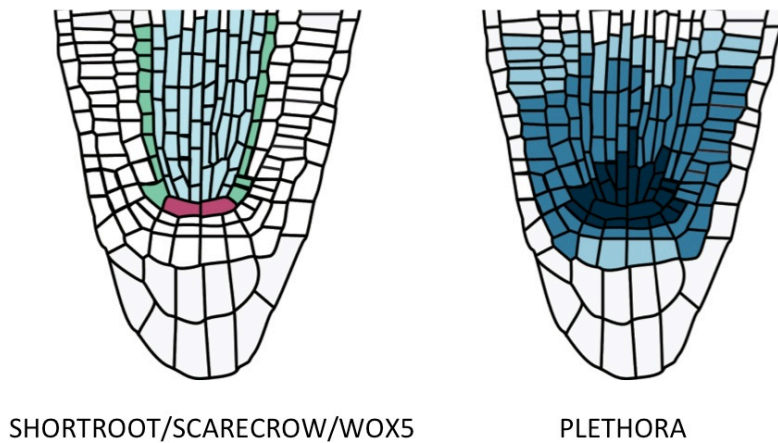
On distingue quatre zones au sein de la racine : la coiffe, la zone de division, la zone d'élongation et la zone de différenciation (figure 1) (Dolan et al., 1993). La coiffe sert de protection à la pointe racinaire. Les cellules de la coiffe se détachent de la racine en continu et sont remplacées par de nouvelles cellules au fur et à mesure de la progression de la racine dans le sol. Au dessus de la coiffe se trouve la zone de division qui correspond au méristème de la racine. Les cellules s'y divisent plusieurs fois et produisent d'autres cellules qui s'allongeront et se différencieront. Les divisions cellulaires se raréfient au fur et à mesure que l'on s'éloigne de la pointe racinaire, jusqu'à ce que les cellules perdent leur capacité à se diviser. La position de la transition entre la zone de division et la zone d'élongation, située au-dessus, détermine la taille du méristème (Beemster and Baskin, 1998). Dans la zone d'élongation, les cellules perdent leur capacité à se diviser et s'allongent. L'élongation des cellules contribue à la croissance primaire de la racine. Les cellules passant d'une période de mitoses à une période d'élongation subissent d'importants changements cellulaires comme le développement d'une vacuole centrale, la réorganisation du cytosquelette, et s'engagent dans une phase de croissance rapide (Verbelen et al., 2006). Au delà, dans la zone de différenciation, la taille des cellules n'augmente plus. Certaines cellules acquièrent des caractéristiques et des fonctions spécialisées comme par exemple, lors de la formation de poils racinaires.



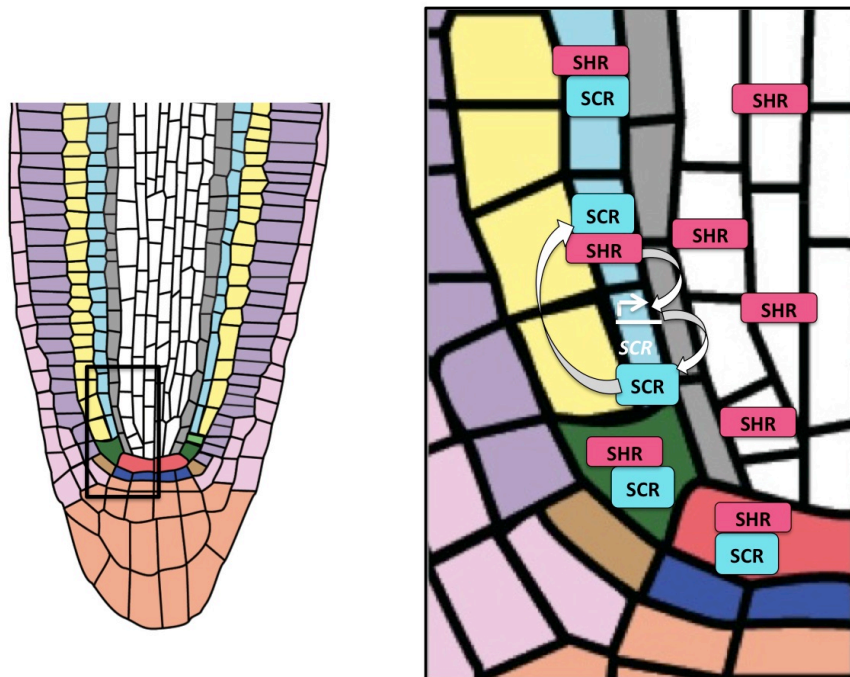
Les frontières entre ces différentes zones ne sont pas clairement établies et peuvent être différentes d'une file cellulaire à une autre. Contrairement à ce qui a longtemps été admis, le méristème racinaire ne produit pas de nouvelles cellules pendant toute la vie de la plante et la croissance de la racine est déterminée. Ainsi, dans des conditions optimales, la croissance de la racine primaire d'*Arabidopsis* s'arrête après 4 ou 5 semaines. L'organisation cellulaire à l'intérieur du méristème racinaire évolue au cours du développement de la racine (Baum et al., 2002; De Tullio et al., 2010). Pendant la première semaine après germination, le nombre de cellules et la taille du méristème racinaire augmentent. Puis une à quatre semaines après germination, le nombre de couches corticales et de cellules des tissus conducteurs augmente et conduit à la diminution de la taille du méristème. Au fur et à mesure que la racine vieillit, le réseau de cellules initiales se désorganise et préfigure l'arrêt de la croissance de la racine. La racine est très réactive aux conditions environnementales et l'organisation du méristème évolue également en fonction de l'environnement. Dans des conditions non favorables, le méristème se réorganise rapidement, ne produit plus de nouvelles cellules, la croissance de la racine s'arrête et la production de racines secondaires augmente. Par exemple, une déficience en phosphate provoque la différenciation progressive de toutes les cellules du méristème racinaire et un arrêt précoce de la croissance de la racine (Sanchez-Calderon et al., 2005).

Le développement de la racine est sous contrôle hormonal (Garay-Arroyo et al., 2012; Petricka et al., 2012). L'analyse génétique de mutants présentant des défauts d'identité cellulaire a montré que la formation des tissus racinaires est contrôlée par des facteurs de transcription (Petricka et al., 2012; Smolarkiewicz and Dhonukshe, 2013). Ces derniers seraient des effecteurs de l'auxine dans la formation des cellules du centre quiescent et des cellules initiales.





**Figure 3 :** Représentation schématique du gradient d'expression de **SHORTROOT**, **SCARECROW**, **WOXY5** et **PLETHORA** dans le méristème racinaire. A gauche: gradient d'expression des gènes *SHORTROOT* (*SHR*), *SCARECROW* (*SCR*) et *WOXY5*. L'expression de *SHR* (en bleu) est restreinte aux tissus vasculaires. *SCR* (en vert) est exprimé dans l'endoderme et les cellules initiales endoderme/cortex et dans le centre quiescent. L'expression de *WOXY5* (en rose) est restreinte aux cellules du centre quiescent. A droite: gradient d'expression des protéines **PLETHORA** (bleu clair : expression faible, bleu foncé : expression élevée). L'expression est maximale dans les cellules du centre quiescent et les cellules initiales



**Figure 4 :** Action coordonnée de **SHORTROOT** et **SCARECROW** dans la détermination de l'endoderme. Le facteur de transcription *SHR* (en rose) détermine l'identité des cellules lors des divisions des cellules initiales endoderme/cortex. *SHR* diffuse des tissus vasculaires vers les tissus adjacents : cellules du centre quiescent, cellules initiales endoderme/cortex et cellules de l'endoderme. Dans l'endoderme, *SHR* se lie à *SCR* (en bleu) et active sa transcription (en blanc). En retour, *SCR* restreint l'expression de *SHR* au cortex et induit l'identité des cellules de l'endoderme. Adapté de (Abrash and Bergmann, 2009).

## 1.2 L'identité des cellules est déterminée par le centre quiescent et les cellules initiales

L'identité des cellules de la racine est déterminée par plusieurs voies parallèles, notamment la voie SHORTROOT (SHR)/ SCARECROW (SCR) dépendante (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000; Sabatini et al., 2003). Ces facteurs de transcription fournissent des informations de position essentielles à la morphogenèse et au développement de la racine. Ils régulent à la fois les divisions des cellules initiales et l'identité des cellules formées.

### 1.2.1 La voie SHORTROOT/SCARECROW est impliquée dans la division formatrice endoderme/cortex

*SHORTROOT (SHR)* et *SCARECROW (SCR)* codent des facteurs de transcription de la famille GRAS (GIBBERELLIN INSENSITIVE (GAI), REPRESSOR OF GA1–3 (RGA), SCR) et agissent comme des régulateurs clés dans la détermination de l'endoderme et du cortex (Sabatini et al., 2003). SCR et SHR contrôlent les divisions formatrices des cellules initiales endoderme/cortex (ou CEI) (Benfey et al., 1993; Scheres et al., 1995; Di Laurenzio et al., 1996; Sabatini et al., 2003). Ils ont été initialement isolés à partir de mutants présentant des racines courtes (Benfey et al., 1993; van den Berg et al., 1995). Les mutations *shr* et *scr* provoquent la formation d'une seule file cellulaire pour l'endoderme et le cortex, indiquant que SHR et SCR contrôlent la division asymétrique de la cellule fille des CEI (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000). Chez le mutant *shr*, cette couche cellulaire ne possède que les caractéristiques du cortex, alors que chez le mutant *scr*, cette file de cellules possède des caractéristiques de l'endoderme et du cortex (Benfey et al., 1993; Scheres et al., 1995; Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000). Ces données montrent que SHR est nécessaire à la division cellulaire donnant naissance à l'endoderme et à l'identité de ce tissu (Di Laurenzio et al., 1996; Helariutta et al., 2000; Nakajima et al., 2001). *SHR* n'est transcrit qu'au niveau des tissus vasculaires mais la protéine SHR se déplace jusqu'aux cellules initiales endoderme/cortex, où elle active directement l'expression de *SCR* et induit les divisions asymétriques périclinales qui génèrent l'endoderme et le cortex (figures 3 et 4) (Helariutta et al., 2000; Nakajima et al., 2001; Gallagher et al., 2004; Heidstra et al., 2004; Levesque et al., 2006). En retour, SCR restreint le mouvement de SHR à une seule file



cellulaire d'endoderme en séquestrant la protéine à l'intérieur du noyau (Cui et al., 2007). L'activité de SCR est inhibée par sa liaison à la protéine RETINOBLASTOMA-RELATED (RBR), facteur régulant la progression du cycle cellulaire (Cruz-Ramirez et al., 2012). Chez *Arabidopsis*, la cycline CYCD6;1 inhiberait RBR (Sozzani et al., 2010). L'expression de CYCD6;1 nécessite une augmentation de la quantité d'auxine et l'activité de SHR et SCR (Cruz-Ramirez et al., 2012).

### 1.2.2 D'autres mécanismes de transcription sont impliqués dans l'organisation cellulaire du méristème racinaire

Le facteur de transcription WOX5 (WUSCHEL-related homeobox) est exprimé dans le centre quiescent (figure 3). Chez les mutants *shr* and *scr*, l'expression de *WOX5* est fortement réduite, voir indétectable, et dépendrait donc de l'activité de *SCR* et *SHR* (Sarkar et al., 2007). *WOX5* est nécessaire pour empêcher la différenciation des cellules initiales (Sarkar et al., 2007) et servirait de signal aux cellules du centre quiescent pour maintenir l'identité des cellules initiales de la columelle dans un état indifférencié (Haecker et al., 2004; Sarkar et al., 2007; Ding and Friml, 2010).

Les trois gènes *PLETHORA* (*PLT*) codent une famille de facteurs de transcription à domaine AP2 qui contrôle l'activité du centre quiescent et des cellules initiales de la racine (Aida et al., 2004; Galinha et al., 2007). Ils sont transcrits suite à une accumulation d'auxine dans la cellule (Blilou et al., 2005). Les taux de protéines *PLT* les plus élevés sont situés dans les cellules du centre quiescent et les cellules initiales, où elles induisent la division cellulaire (figure 3) (Galinha et al., 2007). Les triples mutants *plt1plt2plt3* n'ayant pas de coiffe racinaire latérale (LRC), il est possible que ces protéines soient impliquées dans l'identité des cellules de la LRC (Galinha et al., 2007).

Une famille de peptides impliquée dans la régulation de l'identité des cellules initiales a été identifiée: les RGFs (Root meristem Growth Factors), également appelés GLV (GOLVEN) et CLEL (CLE-Like) (Matsuzaki et al., 2010). Ils sont nécessaires au maintien des cellules initiales et du centre quiescent (Matsuzaki et al., 2010; Perilli et al., 2012; Delay et al., 2013). Il a été montré que RGF1 régule le niveau et le domaine d'expression des protéines *PLT* (Matsuzaki et al., 2010; Perilli et al., 2012; Delay et al., 2013).



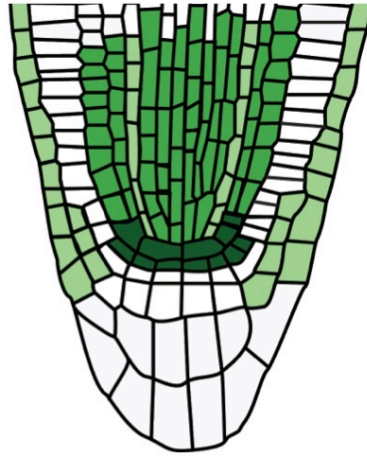
### 1.3 Contrôle hormonal de la croissance racinaire

Les hormones jouent un rôle important dans la régulation de la croissance et du développement des plantes (Garay-Arroyo et al., 2012; Petricka et al., 2012). Huit classes d'hormones ont été identifiées : l'auxine, les cytokinines, les gibbérellines, l'éthylène, l'acide abscissique, les brassinostéroïdes, les strigolactones et l'acide jasmonique (Santner et al., 2009; Santner and Estelle, 2009; Wolters and Jurgens, 2009). Ce sont des régulateurs clés de la division, de l'élongation et de la différenciation cellulaire (Santner et al., 2009; Santner and Estelle, 2009; Wolters and Jurgens, 2009; Depuydt and Hardtke, 2011). Leurs activités dépendent de leur synthèse, de leur transport, de leur accumulation dans la vacuole, de leur dégradation mais aussi de leur interaction avec d'autres hormones. Certaines hormones ont des effets similaires alors que d'autres ont des effets opposés (Benkova and Hejatko, 2009; Galinha et al., 2009; Santner et al., 2009; Santner and Estelle, 2009; Wolters and Jurgens, 2009). Je parlerais ici principalement du rôle de l'auxine, hormone végétale la plus étudiée, dans le développement racinaire.

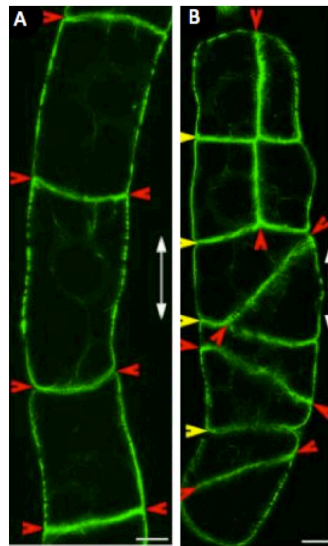
#### 1.3.1 Le rôle de l'auxine dans le développement racinaire

L'auxine joue un rôle important dans le développement de la racine. Elle est impliquée dans l'organisation du méristème apical, dans le gravitropisme, l'élongation de la racine et dans l'initiation et l'émergence des racines latérales (Reed et al., 1998; Sabatini et al., 1999; Woodward and Bartel, 2005).

L'auxine existe sous forme active et sous forme inactive. La forme inactive est utilisée pour son stockage car elle est protégée des réactions d'oxydation (Ostin et al., 1998). La forme d'auxine prédominante est l'acide indole-acétique. Elle est synthétisée à partir du tryptophane dans les parties aériennes (dans les jeunes feuilles et le méristème apical caulinaire) et dans les racines. L'auxine utilisée lors du développement racinaire peut provenir de l'une de ces deux sources, ou des deux (Ljung et al., 2005; Petersson et al., 2009).



**Figure 5 : Représentation schématique du gradient d'auxine dans le méristème racinaire.** Les concentrations les plus élevées (en vert foncé) sont trouvées dans les cellules du centre quiescent et les cellules initiales. Le cortex, l'endoderme, la coiffe racinaire latérale et les tissus vasculaires contiennent des concentrations moyennes d'auxine alors que les cellules de la columelle et de l'épiderme possèdent de faibles concentrations en auxine. D'après (Petersson et al., 2009).



**Figure 6 : Effet de l'acide naphthylphthalamique (NPA) sur l'orientation des divisions.** Le NPA provoque des plans de division anormaux dans les cellules de tabac BY-2. A : divisions anticlines (en rouge) chez des cellules BY-2 non traitées. B : divisions cellulaire anormales (en rouge) chez les cellules BY-2 traitées au NPA. D'après (Dhonukshe et al., 2005).

L'auxine se déplace au sein de la plante par deux mécanismes : le transport à longue distance et le transport à courte distance. Le transport à longue distance a lieu dans le phloème, qui transporte principalement l'auxine des parties aériennes vers la racine (Ljung et al., 2001). Le transport à courte distance correspond au déplacement de l'auxine à travers la membrane plasmique des cellules, par diffusion membranaire, par sécrétion ou grâce à des transporteurs membranaires (Paponov et al., 2005; Petrasek and Friml, 2009; Vanneste and Friml, 2009). Le transport directionnel d'auxine est assuré par des transporteurs. L'auxine entre d'un côté de la cellule par diffusion et à l'aide du transporteur AUXIN RESISTANT1 (AUX1), et sort à l'autre extrémité de la cellule grâce aux protéines d'efflux PIN. La répartition des transporteurs d'auxine PIN au sein de la membrane plasmique joue un rôle important dans la direction du flux d'auxine en orientant le transport polarisé d'auxine d'une cellule à une autre (Petrasek et al., 2006; Wisniewska et al., 2006; Vieten et al., 2007; Zazimalova et al., 2007; Mravec et al., 2008). L'expression et la localisation des protéines PIN sont essentielles pour maintenir un gradient d'auxine le long de la racine (Blakeslee et al., 2005).

La concentration d'auxine est maximum dans les cellules du centre quiescent qui se divisent peu. La concentration diminue dans les cellules initiales. Au sein de la zone méristématique où la prolifération des cellules est rapide, la concentration en auxine est faible. Elle diminue encore dans les zones d'élongation et de différenciation, où les cellules ne se divisent plus (figure 5) (Grieneisen et al., 2007). Ce gradient de distribution d'auxine est corrélé au gradient d'expression de PLETHORA (Aida et al., 2004). En effet, l'expression des facteurs de transcription PLT est régulée par l'auxine lors de la formation de la racine (Aida et al., 2004; Blilou et al., 2005). De plus, l'application d'acide naphthylphthalamique (NPA), un inhibiteur de l'efflux d'auxine, perturbe l'orientation des divisions des cellules de tabac BY-2 (figure 6) (Dhonukshe et al., 2005), confirmant que le flux et le gradient d'auxine sont nécessaires à l'orientation des divisions cellulaires.



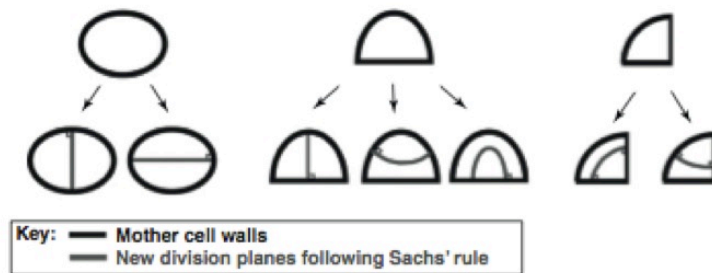


### 1.3.2 D'autres hormones sont impliquées dans le développement de la racine

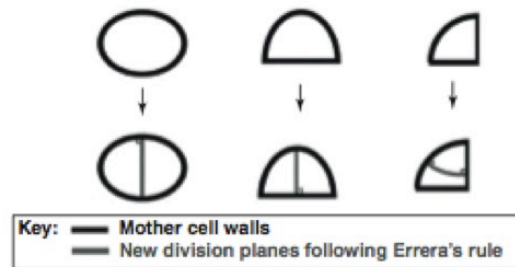
Bien que l'auxine ait un rôle central dans le développement racinaire, d'autres hormones sont impliquées dans la division et l'élongation cellulaire de la racine. Les cytokinines sont des dérivés d'adénine abondants dans les tissus en division. Elles sont majoritairement synthétisées dans la columelle de la pointe racinaire (Aloni et al., 2004). Elles contrôlent la différenciation des cellules dans la racine (Miyawaki et al., 2004; Dello Iorio et al., 2007; Kyojuka, 2007). Elles réduisent le nombre de cellules en division et inhibent la croissance racinaire en stimulant la différenciation cellulaire (Dello Iorio et al., 2007). Le rapport auxine/cytokinine joue un rôle important dans le devenir des cellules de la racine. En effet, il permet de maintenir la taille du méristème racinaire et de contrôler la transition entre les phases de prolifération et d'élongation des cellules. Un taux élevé d'auxine par rapport aux cytokinines est nécessaire au maintien de la division cellulaire et empêche l'élongation et la différenciation cellulaire. Au contraire, un taux élevé de cytokinines par rapport à l'auxine est important pour la transition de la zone de division à la zone de différenciation. L'acide gibbérellique joue aussi un rôle important dans la croissance racinaire. Il stimule la division cellulaire dans la zone méristématique et l'élongation de la racine en empêchant l'inhibition de la croissance racinaire provoquée par les cytokinines (Fu and Harberd, 2003; Achard et al., 2009; Ubeda-Tomas et al., 2009; Moubayidin et al., 2010).

De même, les brassinostéroïdes sont des stéroïdes qui contrôlent la croissance de la racine (Clouse and Sasse, 1998; Gonzalez-Garcia et al., 2011; Hacham et al., 2011). Ils stimulent la division cellulaire et l'expression de *SCR*, *SHR* et *WOX5*. En l'absence de signalisation de brassinostéroïdes, l'expression de ces gènes est inhibée (Gonzalez-Garcia et al., 2011; Du et al., 2012). L'éthylène module les rares divisions des cellules du centre quiescent (Ortega-Martinez et al., 2007).

- A** Règles de Sachs : les plans de division sont perpendiculaires aux parois de la cellule mère et forment deux cellules filles de taille égale.



- B** Règles d'Errera: le plan de division le plus probable est le plan le plus court respectant les règles de Sachs



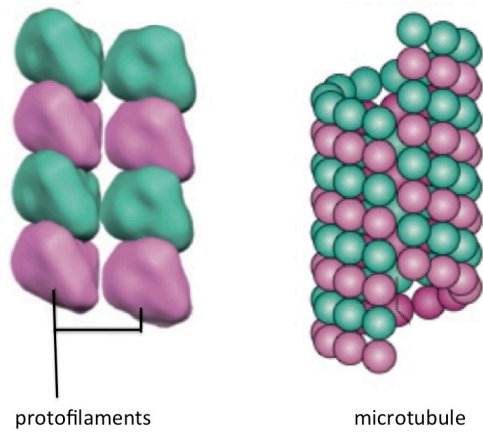
**Figure 7 : Détermination de la position du plan de division chez les cellules végétales.**

A : Illustration de tous les plans de division possibles respectant les règles de Sachs pour différentes géométries de cellules végétales. B : Illustration des prédictions de position du plan de division pour différentes géométries de cellules végétales respectant la règle d'Errera. D'après (Minc and Piel, 2012)

#### 1.4 La géométrie de la cellule influence la détermination du plan de division

Prédire le comportement des cellules est un défi majeur en biologie cellulaire et biologie du développement. Au cours du 19<sup>ème</sup> siècle, l'observation du plan de clivage chez des cellules animales et végétales a conduit à l'établissement de règles empiriques basées sur des arguments géométriques. Sachs et Hofmeister, biologistes du 19<sup>ème</sup> siècle, suggèrent que les cellules végétales ont tendance à se diviser en deux cellules filles de même taille en un plan perpendiculaire aux parois pré-existantes (figure 7). Les règles de Sachs sont observées dans la plupart des divisions des cellules végétales mais ne sont pas réellement prédictives car plusieurs orientations sont possibles pour une géométrie de cellule donnée (Minc and Piel, 2012). Plus tard, Errera affine cette règle en proposant que le plan de division se positionne de façon à minimiser la surface de la nouvelle frontière entre les cellules filles (figure 7). Une étude récente propose un nouveau modèle pour les divisions symétriques, construit sur l'hypothèse d'Errera (Besson and Dumais, 2011). Pour l'améliorer, Besson et Dumais ont étudié les positions de plans de division dans les tissus végétaux. Pour une géométrie de cellule donnée, plusieurs configurations de plans de division ont été observées (figure 7). Les plans de division préférentiellement choisis seraient ceux qui nécessitent le moins d'énergie (Besson and Dumais, 2011). Selon leur modèle, la probabilité que le plan de division s'établisse dans une certaine configuration serait inversement proportionnelle à l'exponentielle de la longueur du plan de division. Il a été proposé que le cytosquelette joue un rôle prépondérant pour la définition de ce plan.

Chez les plantes terrestres, le plan de division est définitivement fixé avant la mitose, par l'anneau de préprophase, aussi appelé la bande de préprophase ou PPB, qui intègre les différents signaux précédemment décrits.



**Figure 8 : Structure des microtubules.** Les hétérodimères d' $\alpha$ -tubuline (rose) et de  $\beta$ -tubuline (vert) s'organisent en protofilaments. Les microtubules sont formés de 13 protofilaments. D'après (Kollman et al., 2011).

## 2 La détermination du plan de division est prémitotique chez les plantes terrestres

La bande de préprophase ou PPB est une structure de microtubules qui prédit précisément la position du plan de division chez les plantes terrestres. Je présenterai d'abord les microtubules. L'organisation des réseaux de microtubules est très complexe et dépend de la nucléation, de la polymérisation et la dépolymérisation des microtubules, de leur transport au sein de la cellule et des nombreuses protéines capables de moduler les interactions entre microtubules. Les réseaux sont très dynamiques et en constante évolution au cours du cycle cellulaire.

### 2.1 Structure des microtubules chez les plantes terrestres

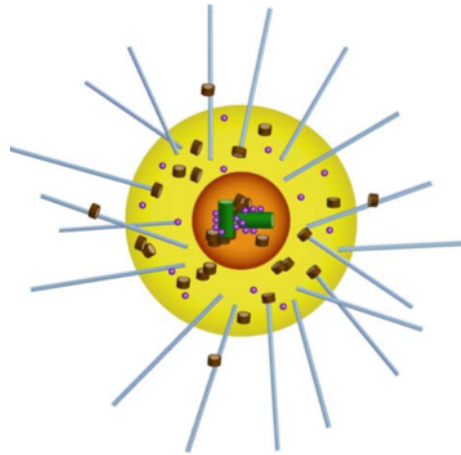
Les microtubules sont des polymères dynamiques capables de former des réseaux tridimensionnels hautement structurés.

#### 2.1.1 Structure des microtubules

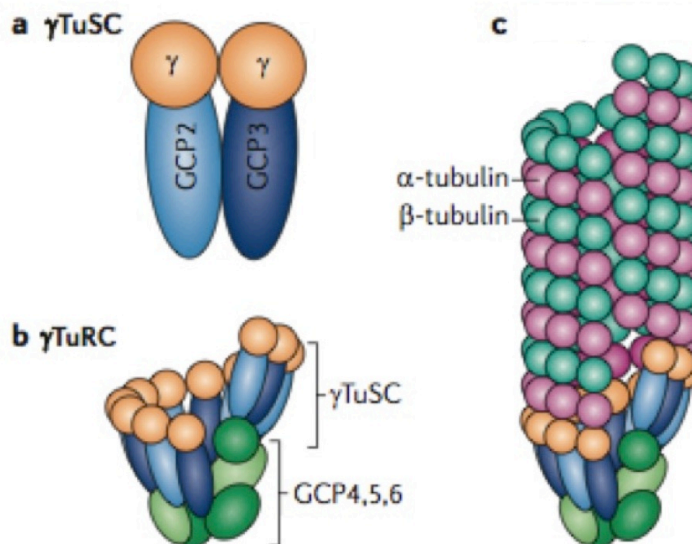
Les microtubules sont constitués d'hétéro-dimères d' $\alpha$  et de  $\beta$ -tubuline, protéines hautement conservées chez tous les eucaryotes. Ces dimères assemblés de manière linéaire forment un protofilament (figure 8). Un microtubule est généralement constitué de 13 protofilaments qui forment un tube creux de 24 nm de diamètre. Les hétérodimères de tubuline sont assemblés tête-bêche au sein d'un protofilament et l'ajout des hétérodimères se fait de façon orientée avec les sous-unités d' $\alpha$ -tubuline positionnées vers l'extrémité (-) et les sous-unités de  $\beta$ -tubuline orientées vers l'extrémité (+) des microtubules. Cette organisation est responsable de la polarité des microtubules.

#### 2.1.2 La nucléation des microtubules chez les cellules animales

On appelle « nucléation » la formation d'un nouveau microtubule. Elle participe à la régulation des réseaux de microtubules. Je présenterai dans cette partie la nucléation des microtubules chez les cellules animales, qui est beaucoup mieux caractérisée que la nucléation des microtubules des cellules végétales.



**Figure 9 : Structure du centrosome.** Le centrosome des cellules de Mammifères est composé de deux centrioles (en vert) entourés par un ensemble de protéines dans une matrice appelée matrice péricentriolaire (en jaune). Les complexes de nucléation (en violet) font partie de la matrice péricentriolaire et participent à la nucléation des microtubules (en bleu). Les complexes d'ancrage (en brun) retiennent les microtubules au centrosome. D'après (Schatten, 2008)



**Figure 10 : Les complexes  $\gamma$ -tubuline et leur assemblage.** (a) Le complexe  $\gamma$ -TuSC ( $\gamma$ -tubuline Small Complex) est la partie essentielle de la machinerie de nucléation des microtubules. Il possède deux  $\gamma$ -tubulines, une GCP2 et une GCP3. (b) Les multiples complexes  $\gamma$ -TuSC s'assemblent avec GCP4, GCP5 et GCP6 et forment un  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -tubulin Ring Complex). (c) La disposition des  $\gamma$ -TuSCs en anneau offrirait une plate-forme d'assemblage pour les microtubules. D'après (Kollman et al., 2011)

La nucléation des microtubules a lieu au sein des centres organisateurs de microtubules (Microtubule-Organizing centers ou MTOCs) (Luders and Stearns, 2007). Le principal MTOC des cellules animales est le centrosome (Azimzadeh and Bornens, 2007; Bornens, 2012). Le centrosome est une structure sphérique constituée d'une paire de centrioles, entourée d'une matrice péricentriolaire (figure 9). Il s'agit du site de nucléation des microtubules lors de la formation du réseau d'interphase et du fuseau mitotique. La matrice péricentriolaire est composée de nombreuses protéines centrosomales, dont la  $\gamma$ -tubuline et le complexe de nucléation  $\gamma$ -TuRC ( $\gamma$ -tubulin Ring Complex). Les microtubules sont ancrés au centrosome par leur extrémité (-) (Bornens, 2002). En interphase, le centrosome est associé avec le noyau. Au cours de la phase S, les centrioles se dupliquent. Un centriole fils apparaît à la base de chaque centriole mère. Deux centrosomes se forment et accumulent du matériel péricentriolaire pendant la phase G2. Les deux centrosomes restent appariés jusqu'à la mitose. Durant la prophase, les centrosomes migrent à chaque pôle du noyau et forment deux faisceaux de microtubules qui préfigurent les pôles du fuseau mitotique. A la fin de la mitose, chaque cellule fille reçoit un centrosome contenant une paire de centrioles.

Les complexes de nucléation  $\gamma$ -TuRCs sont composés de  $\gamma$ -tubuline et de protéines GCP ( $\gamma$ -tubulin-containing complex proteins), GCP2 à GCP6 (figure 10) (Moritz et al., 1995; Zheng et al., 1995; Moritz et al., 1998; Oegema et al., 1999; Gunawardane et al., 2000; Murphy et al., 2001). Les protéines GCP2 et GCP3 s'associent avec la  $\gamma$ -tubuline et forment un complexe  $\gamma$ -TuSC ( $\gamma$ -tubuline Small Complex) (Oegema et al., 1999). Ces petits complexes formeraient le cœur des complexes de nucléation. Les  $\gamma$ -TuRCs sont composés de plusieurs  $\gamma$ -TuSC et des protéines GCP4, GCP5 et GCP6 (Zheng et al., 1995). L'analyse structurale des complexes  $\gamma$ -TuSCs suggère qu'un changement de position de GCP3 au sein du complexe  $\gamma$ -TuSC activerait le complexe de nucléation  $\gamma$ -TuRC (Kollman et al., 2011). Les molécules de  $\gamma$ -tubuline du  $\gamma$ -TuRC forment un anneau qui servirait de plate-forme pour l'assemblage des hétérodimères d' $\alpha$  et de  $\beta$ -tubuline (Kollman et al., 2011; Teixido-Travesa et al., 2012). Les complexes  $\gamma$ -TuRCs participent aussi à la stabilisation des microtubules en capturant les extrémités (-) (Wiese and Zheng, 2000; Anders and Sawin, 2011).



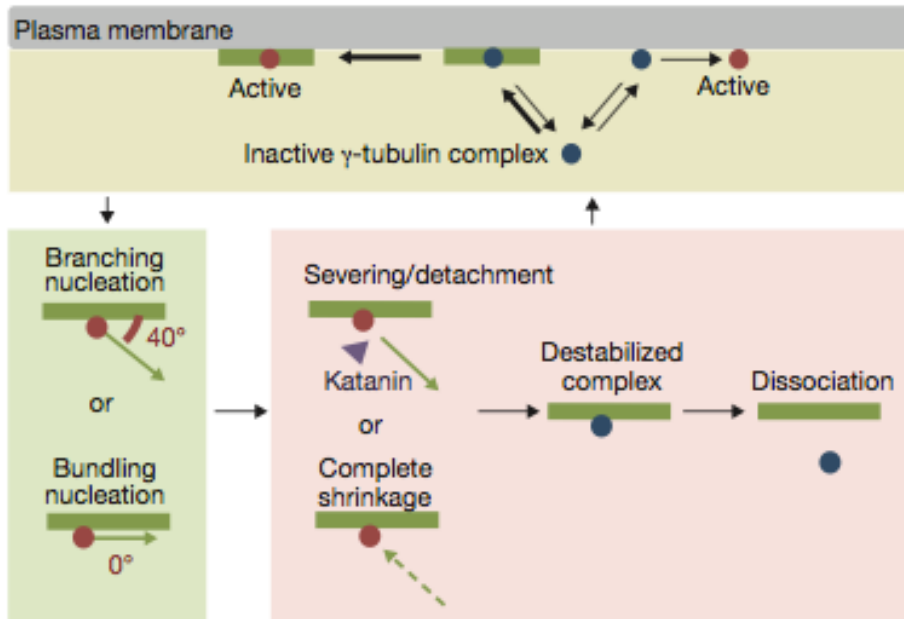


D'autres protéines n'appartenant pas à la famille des GCP ont été identifiées au sein des complexes  $\gamma$ -TuRCs. Les protéines MOZART1 (mitotic-spindle organizing protein associated with a ring of  $\gamma$ -tubulin 1) et MOZART2 ont été identifiées comme faisant partie des  $\gamma$ -TuRC (Hutchins et al., 2010; Teixido-Travesa et al., 2010). Chez la levure, MOZART1 est nécessaire au recrutement des complexes de nucléation aux MTOCs (Masuda et al., 2013). Chez les animaux, MOZART1 pourrait jouer un rôle similaire et recruter les complexes  $\gamma$ -TuRCs au centrosome. MOZART2 serait impliquée dans l'organisation du réseau de microtubules d'interphase (Teixido-Travesa et al., 2010). La protéine NEDD1 co-purifie fréquemment avec le complexe  $\gamma$ -TuRC mais ne ferait pas partie intégrante du complexe. Elle serait impliquée dans la localisation des  $\gamma$ -TuRCs au centrosome (Haren et al., 2006; Luders et al., 2006).

### 2.1.3 Nucléation des microtubules chez les cellules végétales

Contrairement à beaucoup d'eucaryotes, les cellules des plantes terrestres n'ont pas de MTOC bien défini comme le centrosome des animaux. Cependant, différents composants des complexes de nucléation animaux sont conservés chez les plantes. C'est le cas de la  $\gamma$ -tubuline (Liu et al., 1994). Les analyses génétiques ont montré que l'absence de  $\gamma$ -tubuline provoque de graves défauts de développement et est embryon-létale. La nucléation des microtubules est très affectée et les réseaux sont désorganisés (Binarova et al., 2006; Pastuglia et al., 2006). Le génome d'*Arabidopsis* code également plusieurs protéines GCP : GCP2, GCP3, GCP4, GCP5 et GCP6 (Erhardt et al., 2002; Schmit, 2002; Pastuglia and Bouchez, 2007; Seltzer et al., 2007; Kong et al., 2010; Janski et al., 2012; Nakamura et al., 2012; Hashimoto, 2013). Comme dans les cellules animales, les complexes de nucléation  $\gamma$ -TuRC sont composés de  $\gamma$ -tubuline et des protéines GCPs.

Chez les plantes, les sites de nucléation sont dispersés dans le cytoplasme, au niveau de l'enveloppe nucléaire, aux pôles du fuseau mitotique, au phragmoplaste et dans le cortex, espace sous-membranaire de la cellule (Stoppin et al., 1994; Erhardt et al., 2002; Chan et al., 2003; Drykova et al., 2003; Seltzer et al., 2003; Shaw et al., 2003; Shaw et al., 2005; Nakamura et al., 2010; Smertenko et al., 2011). La signification de la localisation de la  $\gamma$ -tubuline tout au long des microtubules dans les cellules végétales a longtemps été un

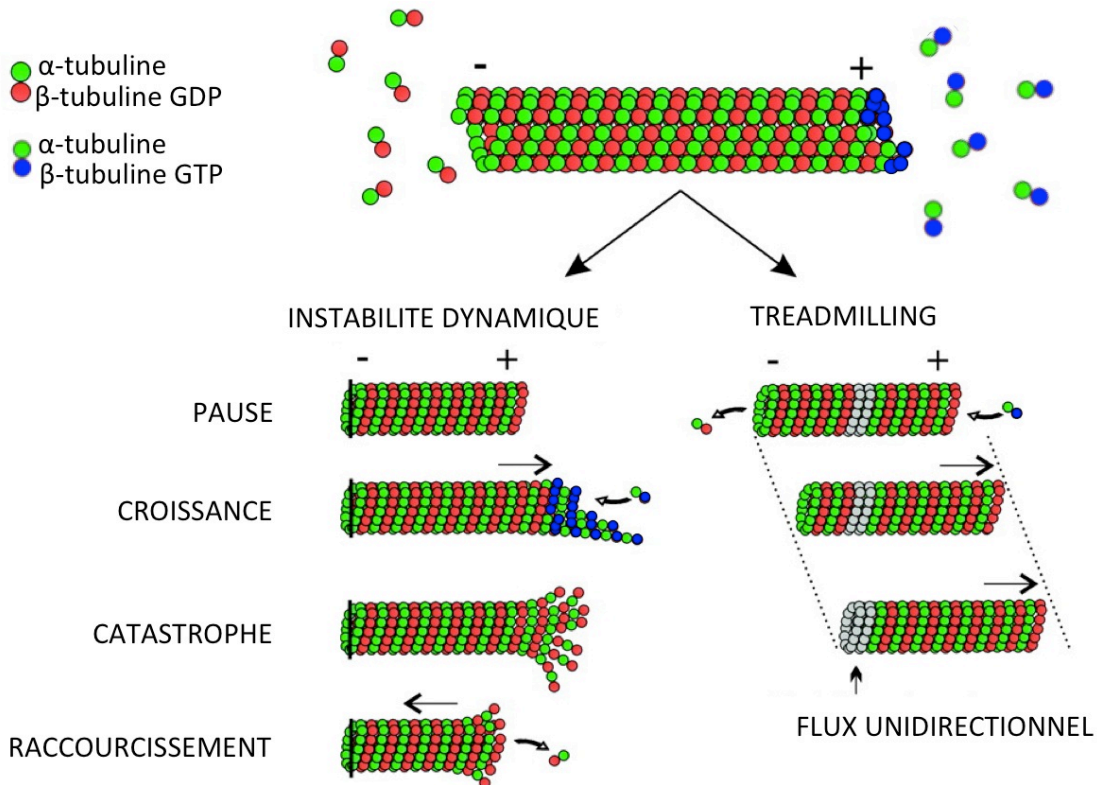


**Figure 11 : Modèle de nucléation et de relargage des microtubules corticaux dans les cellules végétales en interphase.** Les complexes de nucléation s'associent de manière transitoire au cortex de la cellule (rond bleu), et deviennent actifs (rond rouge) lorsqu'ils interagissent avec un microtubule pré-existant (vert). Le complexe actif nucléé immédiatement un nouveau microtubule avec un angle d'environ 40° par rapport au microtubule pré-existant. Le nouveau microtubule peut également se former parallèlement au microtubule pré-existant, formant instantanément un faisceau. La katanine (triangle violet) coupe le microtubule nouvellement formé à son extrémité (-). La coupure déstabilise l'association entre le complexe de nucléation et le microtubule pré-existant et provoque le relargage du microtubule formé à son extrémité (-). La déstabilisation du complexe de nucléation peut aussi être due à la dépolymérisation complète du microtubule formé. D'après (Nakamura et al., 2010).

mystère pour les biologistes. La  $\gamma$ -tubuline a ainsi été observée le long des microtubules du réseau d'interphase, de la PPB, autour du noyau, aux futurs pôles du fuseau et au phragmoplaste (Liu et al., 1993; Panteris et al., 2000). Il a été montré qu'en interphase, la localisation de la  $\gamma$ -tubuline coïncide avec l'émergence de nouveaux microtubules suggérant que ces sites correspondent à des sites de nucléation (Murata et al., 2005; Nakamura et al., 2010). La  $\gamma$ -tubuline cytosolique est recrutée sur des microtubules corticaux pré-existants grâce à GCP2 et GCP3 pour assurer la nucléation de nouveaux microtubules (Murata et al., 2005; Murata and Hasebe, 2007; Nakamura and Hashimoto, 2009; Nakamura et al., 2010). La réduction de l'expression de GCP4 chez *Arabidopsis* suggère qu'elle serait également impliquée dans la nucléation et l'organisation des microtubules (Kong et al., 2010).

D'autres homologues de protéines animales ont été identifiés chez *Arabidopsis*. Les plantes possèdent un homologue de NEDD1 qui joue un rôle critique dans l'organisation des microtubules (Zeng et al., 2009). NEDD1 co-localise avec la  $\gamma$ -tubuline sur les microtubules du fuseau et du phragmoplaste (Zeng et al., 2009). Il est possible que NEDD1 joue un rôle au sein des complexes  $\gamma$ -TuRC aux sites de nucléation dans les cellules végétales. Chez les plantes, MOZART1 est aussi appelée GIP1 (GCP3-Interacting Protein 1) car elle est capable de se lier à GCP3 (Janski et al., 2012; Nakamura et al., 2012). Elle est localisée aux  $\gamma$ -TuRCs sur les microtubules mitotiques et d'interphase (Nakamura et al., 2012). Chez les plantes, MOZART1 est impliquée dans le recrutement des complexes  $\gamma$ -TuRCs à la surface des microtubules et/ou l'activation des complexes  $\gamma$ -TuRC, une fois liés aux microtubules, par interaction avec GCP3 (Fishel and Dixit, 2013).

Plusieurs types de nucléation ont été mis en évidence chez les plantes (figure 11). Dans la majorité des cas, un nouveau microtubule est initié à partir d'un microtubule pré-existant et l'angle formé entre les deux microtubules est compris entre 20° et 60° et centré autour de 40° (Murata et al., 2005; Chan et al., 2009; Nakamura et al., 2010; Kirik et al., 2012). Il s'agit d'une nucléation branchée (Murata et al., 2005; Chan et al., 2009; Nakamura et al., 2010). Cet angle de 40° permettrait aux microtubules de former des réseaux branchés et d'explorer ainsi un espace cellulaire plus important. Un deuxième type de nucléation a été observé, il s'agit de la nucléation parallèle. Dans ce cas, le nouveau microtubule croît le long d'un microtubule pré-existant. La nucléation parallèle est deux fois moins fréquente que la



**Figure 12 : Dynamique des microtubules.** Les microtubules sont composés d'hétérodimères d' $\alpha$ -tubuline et de  $\beta$ -tubuline assemblés tête-bêche pour former des protofilaments qui s'associent en microtubules. L'extrémité (-) de  $\beta$ -tubuline est très dynamique alors que l'extrémité (+) d' $\alpha$ -tubuline l'est moins. Lorsque les extrémités (-) des microtubules sont ancrées, seules les extrémités (+) libres sont dynamiques et subissent des périodes de croissance et de raccourcissement avec des transitions entre ces deux phases ce qui caractérise l'instabilité dynamique. Si les deux extrémités des microtubules sont librement accessibles aux sous-unités de tubuline, l'assemblage dynamique peut être marqué par une polymérisation nette à l'extrémité (+) et une dépolymérisation nette à l'extrémité (-), entraînant un flux unidirectionnel des sous-unités (en gris) et un repositionnement apparent du microtubule (treadmilling). D'après (Dixit and Cyr, 2004; Pastuglia and Bouchez, 2007).

nucléation branchée (Chan et al., 2009; Nakamura et al., 2010; Kirik et al., 2012). Dans les deux cas, le nouveau microtubule croît préférentiellement dans la même direction que le microtubule mère. Un dernier type de nucléation, rare, représente 1 à 2% de la nucléation des microtubules. Il s'agit de la nucléation *de novo*. Dans ce cas, le nouveau microtubule est initié sans microtubule pré-existant au niveau du cortex (Shaw et al., 2003; Chan et al., 2009; Nakamura et al., 2010; Kirik et al., 2012).

Les microtubules des cellules végétales ne sont pas attachés de façon stable à leur site de nucléation. Ils sont libérés dans les 60 secondes qui suivent leur nucléation grâce à une protéine qui sectionne les microtubules, la katanine (Nakamura et al., 2010). La katanine utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour déstabiliser les interactions entre les sous-unités de tubuline (Hamada, 2007). L'activité de la katanine serait responsable du détachement des microtubules fils du complexe de nucléation, libérant les microtubules (figure 11). Le détachement du microtubule aurait lieu avant celui du complexe de nucléation. La perte du microtubule fils, soit par l'action de la katanine, soit par dépolymérisation complète, serait suffisante pour déclencher la dissociation du complexe de nucléation du cortex de la cellule (Nakamura et al., 2010). La katanine a été localisée au cortex, autour du noyau, aux pôles du fuseau, à la PPB et au phragmoplaste (McClinton et al., 2001; Nakamura et al., 2010; Panteris et al., 2011). Les mutants *katanine* présentent des perturbations des réseaux parallèles de microtubules corticaux et des dépôts de microfibrilles de cellulose (Bichet et al., 2001; Burk et al., 2001; Bouquin et al., 2003) et également des défauts d'organisation des microtubules en préprophase/prophase et en cytokinèse (Panteris et al., 2011). Ces données suggèrent que la libération des microtubules est indispensable à l'organisation des réseaux de microtubules dans les cellules en division et dans les cellules en élongation.

Lorsque le microtubule n'est pas associé à un complexe de nucléation et que ses deux extrémités sont libres, il peut se produire un phénomène de « treadmilling » qui se caractérise par une addition d'hétérodimères à l'extrémité (+) et une perte de tubuline à l'extrémité (-) du microtubule (figure 12). Il en résulte un déplacement apparent du microtubule dans la direction de l'extrémité (+) (Shaw et al., 2003).



#### 2.1.4 Instabilité dynamique

Les microtubules sont des structures très dynamiques qui alternent entre des phases de polymérisation et des phases de dépolymérisation (figure 12). L'extrémité (+) des microtubules est très dynamique contrairement à l'extrémité (-), composée de sous-unités d' $\alpha$ -tubuline et relativement stable (Jiang and Akhmanova, 2011). L'alternance entre les phases de polymérisation et les phases de dépolymérisation dépend de l'hydrolyse du GTP.

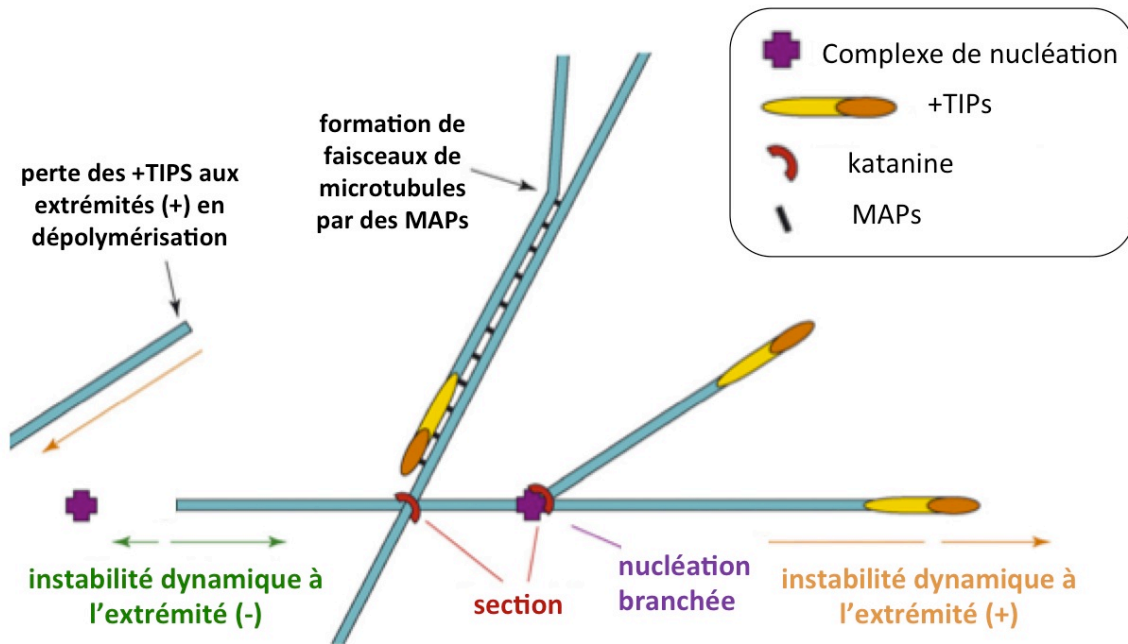
Lors d'une période de polymérisation, l'ajout de dimères de tubuline se fait préférentiellement à l'extrémité (+) du microtubule, où les sous-unités de  $\beta$ -tubuline sont liées à un résidu GTP (Pastuglia and Bouchez, 2007). L'hydrolyse du GTP en GDP est déclenchée par l'ajout d'un nouveau dimère de tubuline. Un microtubule en phase de croissance possède une coiffe de  $\beta$ -tubuline/GTP, qui stabilise le microtubule à l'extrémité (+). L'hydrolyse du GTP change la conformation des sous-unités de tubuline et affaiblit leurs liaisons au sein des protofilaments. Cette modification entraînerait une courbure des protofilaments qui déstabiliserait les microtubules (Melki et al., 1989; Mandelkow et al., 1991). La coiffe de  $\beta$ -tubuline/GTP serait donc suffisante pour stabiliser le microtubule composé de  $\beta$ -tubuline/GDP. Si le microtubule perd cette coiffe, il entre alors dans une phase de dépolymérisation, appelée « catastrophe ». L'alternance de phases de catastrophe et de phases de sauvetage, au cours desquelles le microtubule est de nouveau polymérisé, est appelée « instabilité dynamique » (Mitchison and Kirschner, 1984).

Le microtubule peut également entrer dans une dépolymérisation irréversible et disparaître complètement (figure 12). Les périodes sans polymérisation ni dépolymérisation sont appelées des « pauses ». L'instabilité dynamique permet aux microtubules d'explorer l'espace intracellulaire et aux réseaux de se réorganiser rapidement au cours de la mitose (Nogales, 1999) ou en réponse à des signaux hormonaux ou environnementaux.

#### 2.1.5 Des nombreuses protéines participent à la formation de réseaux de microtubules

On connaît encore peu de choses sur les mécanismes moléculaires qui contrôlent la dynamique des microtubules des cellules végétales, les ancrent à la membrane, guident la formation des réseaux corticaux et lient le cytosquelette au cycle cellulaire. En se liant physiquement aux microtubules, les MAPs, Microtubule-Associated Proteins, contrôlent





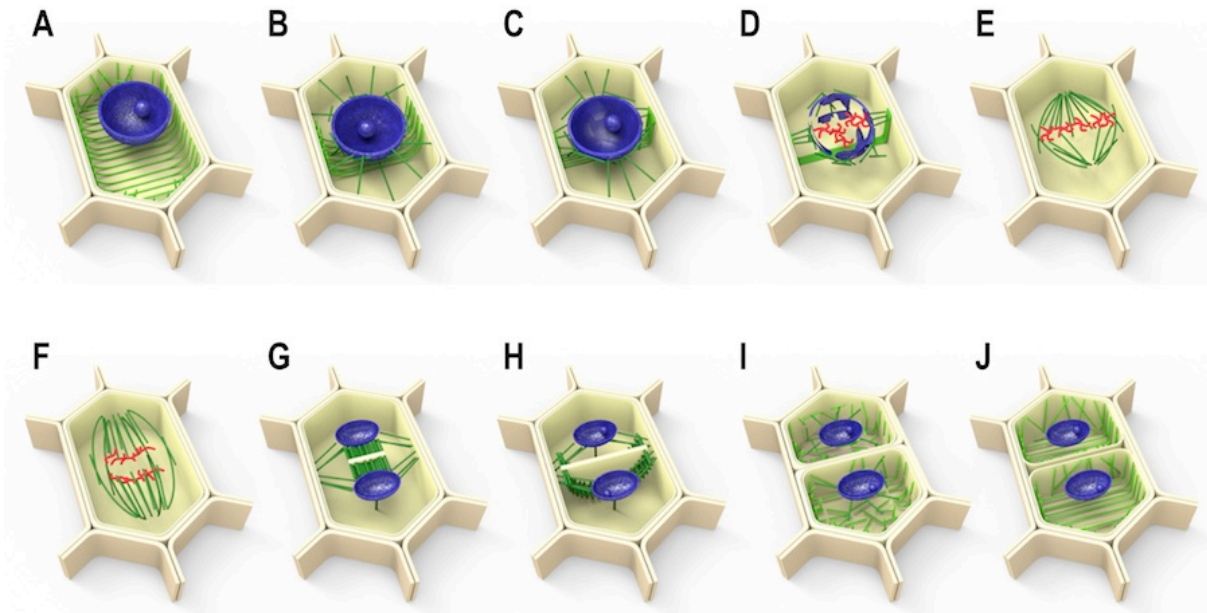
**Figure 13 : Comportements des microtubules corticaux et rôle de quelques MAPs.** Les deux extrémités des microtubules sont dynamiques avec des périodes de croissance, de pause et de raccourcissement, l'extrémité (+) étant plus dynamique (la longueur des flèches reflète les vitesses des dynamiques). Les microtubules sont nucléés à partir des complexes de nucléation, après quoi l'extrémité (-) des microtubules est probablement libérée par la katanine qui sectionne les microtubules. Diverses protéines +TIPs sont localisées aux extrémités (+) des microtubules et modulent leur longueur. La formation de faisceaux de microtubules a lieu lorsque deux microtubules parallèles sont liés par des MAPs. D'après (Sedbrook and Kaloriti, 2008).

l'organisation et la désorganisation des réseaux de microtubules (Hamada, 2007; Struk and Dhonukshe, 2013). Elles sont impliquées dans la coupure et le treadmilling des microtubules, dans la promotion d'événements de polymérisation ou de catastrophes, ou encore dans l'association de microtubules entre eux en faisceau appelée « bundling » (Dixit and Cyr, 2004). Voici quelques exemples de fonctions assurées par les MAPs.

Une famille de MAPs très conservée chez les eucaryotes, la famille des MAP65, est impliquée dans la formation des faisceaux de microtubules (Jiang and Sonobe, 1993). Il existe neuf MAP65 chez *Arabidopsis*. Elles stabilisent les microtubules en formant des ponts entre les microtubules (figure 13) (Chan et al., 1999; Smertenko et al., 2004; Mao et al., 2005; Gaillard et al., 2008; Fache et al., 2010). Les membres de la famille des MAP65 ne sont pas localisés de la même manière au cours du cycle cellulaire. Par exemple, MAP65-1 se lie aux microtubules corticaux, à la PPB, au fuseau et au phragmoplaste (Smertenko et al., 2000; Smertenko et al., 2004; Van Damme et al., 2004) alors que MAP65-5 n'est localisée qu'au réseau d'interphase et au phragmoplaste (Van Damme et al., 2004). Les MAP65 n'ont pas toutes les mêmes propriétés. MAP65-1 induit la formation de larges faisceaux de microtubules antiparallèles (Gaillard et al., 2008). Au contraire, MAP65-4 entraîne la formation de faisceaux à partir de microtubules adjacents, qu'ils soient parallèles ou antiparallèles (Fache et al., 2010).

Comme décrit précédemment, la katanine est une MAP qui déstabilise les microtubules par sectionnement (figure 13). Elle permet ainsi la libération des extrémités (-) des microtubules des sites de nucléation, la coupure des microtubules au niveau des intersections et la fragmentation des microtubules (McClinton et al., 2001; Nakamura et al., 2010; Panteris et al., 2011; Lindeboom et al., 2013).

Les kinésines sont des protéines impliquées dans l'organisation des réseaux de microtubules et le transport de molécules et d'organites (Hamada, 2007). 61 kinésines ont été identifiées chez *Arabidopsis thaliana*. Elles sont caractérisées par la présence d'un domaine moteur kinésine contenant des sites de liaison à l'ATP et d'un domaine de liaison aux microtubules (Reddy, 2001; Lee and Liu, 2004). Grâce à l'énergie libérée par l'hydrolyse de l'ATP, ces protéines motrices se déplacent le long des microtubules de manière unidirectionnelle (Bloom, 1992). Elles sont capables d'interagir avec deux microtubules et d'entraîner un déplacement des microtubules les uns par rapport aux autres. Les kinésines semblent



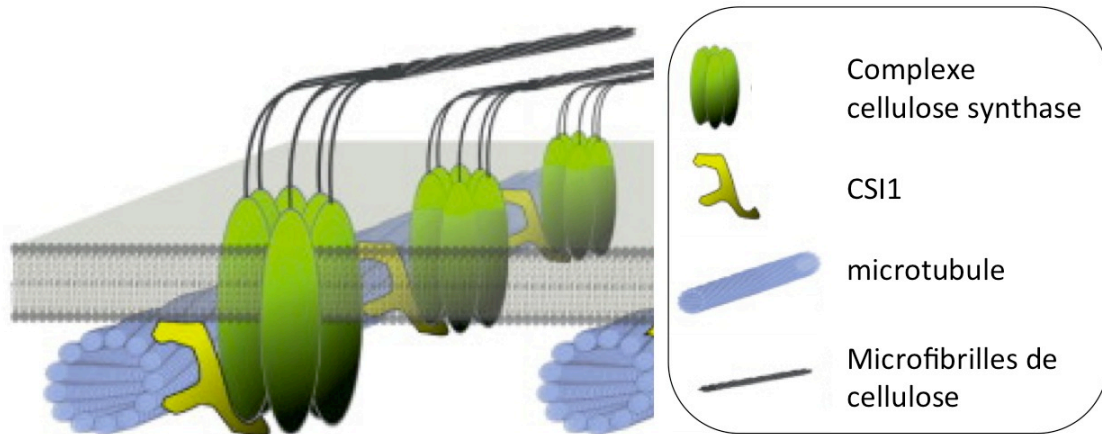
**Figure 14 : Organisation du cytosquelette dans les cellules végétales au cours du cycle cellulaire.** (A) En interphase, les microtubules corticaux sont organisés parallèlement les uns aux autres. Le noyau est localisé au bord de la cellule. (B) Juste avant la mitose, le noyau est repositionné au centre de la cellule. Le réseau de microtubules cortical se réorganise en une bande de microtubules condensés, la PPB, à l'équateur de la cellule autour du noyau. Les microtubules s'organisent également à la périphérie du noyau et rayonnent vers les bords de la cellule. (C) En prophase, la PPB devient plus étroite et les microtubules en dehors de la PPB se dépolymérisent. (D) A la fin de la prophase, les microtubules périnucléaires s'accumulent aux futurs pôles de la division. L'enveloppe nucléaire se rompt puis la PPB se dépolymérise. (E) En métaphase, les chromosomes sont alignés sur la plaque métaphasique. Les microtubules du fuseau connectent les pôles du fuseau aux kinétochores. Les microtubules interpolaire stabilisent le fuseau et participent à son élongation. (F) En anaphase, le fuseau ségrège les chromosomes qui migrent vers les pôles. (G) Au début de la télophase, le phragmoplaste se forme en un cylindre concentrique de deux réseaux anti-parallèles de microtubules, responsable de la formation de la nouvelle plaque cellulaire entre les deux noyaux filles. (H) Le phragmoplaste s'étend de manière centrifuge, guidant la plaque cellulaire vers la zone corticale précédemment établie par la PPB. (I) Quand la cytokinèse est terminée, les microtubules s'étendent du noyau vers le cortex de la cellule et les microtubules corticaux apparaissent. (J) Le réseau de microtubules corticaux s'oriente perpendiculairement à l'axe d'élongation de la cellule avec la plupart des microtubules positionnés de façon parallèle les uns par rapport aux autres. Les microtubules sont en vert, les noyaux et nucléoles en bleus et les chromosomes en rouge.

essentielles à divers processus cellulaires comme la formation du fuseau mitotique, la dépolymérisation ou encore l'organisation des microtubules du phragmoplaste (Lee and Liu, 2000; Ambrose et al., 2005; Zhu and Dixit, 2012).

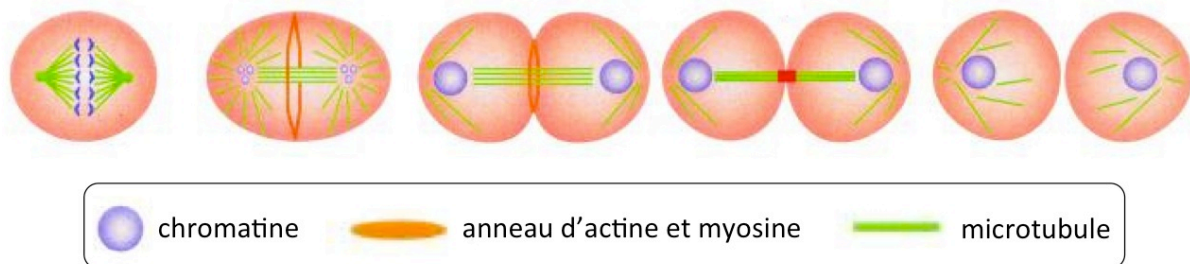
Les +TIPs (Microtubule plus-end-tracking proteins) regroupent différentes familles de protéines ayant la propriété de se lier préférentiellement à l'extrémité (+) des microtubules (figure 13). Elles sont impliquées dans le transport des microtubules et dans leur liaison à d'autres structures comme la membrane, le cortex, les kinétochores ou l'appareil de Golgi (Vaughan, 2004; Pastuglia and Bouchez, 2007). Le recrutement des +TIPs à l'extrémité (+) des microtubules permet également de stabiliser ou de déstabiliser l'extrémité du microtubule en croissance, d'augmenter la polymérisation du microtubule et de favoriser la réorganisation des réseaux.

## **2.2 Les réseaux de microtubules sont impliqués dans le développement des plantes**

Au cours de la division des cellules végétales, quatre réseaux de microtubules se succèdent : le réseau d'interphase, la PPB, le fuseau mitotique et le phragmoplaste (figure 14). Avant le début de la mitose, à la fin de la phase G2, les microtubules corticaux se réorganisent et passent d'un réseau d'interphase occupant tout le cortex de la cellule à un anneau occupant un espace cellulaire très restreint, la PPB (figure 14 A, B, C). Cet anneau transitoire détermine de manière prémitotique le futur plan de division de la cellule. La mitose débute ensuite par la prophase, durant laquelle les chromosomes se condensent et les pôles du fuseau se mettent en place. La rupture de l'enveloppe nucléaire et la dépolymérisation de la PPB marquent la fin de la prophase (figure 14 D). En métaphase, le fuseau se forme et les chromosomes s'alignent sur la plaque métaphasique. Chaque chromatide sœur est alors capturée par des microtubules émanant des pôles du fuseau (figure 14 E). En anaphase, le fuseau assure la ségrégation des chromosomes (figure F). Les chromatides sœurs se séparent et chacune migre à un pôle de la cellule pour former deux lots génétiquement identiques. En télophase le fuseau est désassemblé, les chromosomes se décondensent et l'enveloppe nucléaire se reforme. Le phragmoplaste assure la mise en place de la plaque cellulaire, qui s'étend de manière centrifuge jusqu'à atteindre les parois de la cellule mère,



**Figure 15 : Représentation schématique de l'orientation de la cellulose par les microtubules.** CS1 est impliquée dans l'orientation des complexes cellulose synthases le long des microtubules corticaux. D'après (Bringmann et al., 2012b)



**Figure 16 : Division des cellules animales.** Dans les cellules animales, le site de division est déterminé par un signal provenant de la zone centrale du fuseau et par un signal propagé par les microtubules astraux. L'intégration des signaux provenant des microtubules permet la formation du sillon de clivage. L'anneau d'actine et de myosine se contracte jusqu'à séparation des deux cellules filles. D'après (Guertin et al., 2002).

à l'emplacement exact occupé précédemment par la PPB (figure 14 G, H, I). La cytokinèse est achevée en fin de télophase et assure la séparation des deux cellules filles. Parmi ces réseaux, la PPB et le phragmoplaste sont deux structures de microtubules spécifiques des cellules de plantes.

### **2.2.2 Le réseau d'interphase chez les cellules végétales**

Dans une cellule en interphase, la majorité des microtubules sont localisés au cortex de la cellule, région de quelques micromètres d'épaisseur située sous la membrane plasmique (figure 14 A). Ils forment des faisceaux de microtubules parallèles, orientés perpendiculairement à l'axe de croissance de la cellule (figure 15). Lorsque la cellule a fini de croître, ils se réorientent de manière oblique ou longitudinale (Smith, 2003).

Le réseau de microtubules d'interphase participe à la mise en place de la paroi. La paroi est constituée en partie de microfibrilles de cellulose qui sont des polymères de glucose. Ces microfibrilles sont perpendiculaires ou obliques par rapport à l'axe de croissance de la cellule et rappellent l'arrangement des microtubules corticaux (figure 15) (Baskin, 2001; Lloyd, 2006). Ces molécules sont synthétisées par des complexes de cellulose synthases, enchassés dans la membrane plasmique et qui synthétisent les microfibrilles à la surface externe de la membrane. Il a été montré que les complexes cellulose synthases se déplacent dans la membrane plasmique et que leur déplacement suit les microtubules sous-jacents (Paredes et al., 2006). De plus, la co-localisation entre la trajectoire des microtubules et celle des complexes de cellulose synthase a également lieu lors de la réorientation des microtubules (Chan et al., 2010). La protéine CSI1 qui se lie à la fois aux complexes de cellulose synthases et aux microtubules, pourrait être responsable de ce co-alignement. CSI1 s'associe à la membrane plasmique et est importante pour le co-alignement des complexes cellulose synthase (Bringmann et al., 2012a; Li et al., 2012; Mei et al., 2012).

### **2.2.3 La PPB détermine le plan de division de manière prémitotique**

Le mode de détermination du plan de division est différent selon les organismes considérés (Guertin et al., 2002; Eggert et al., 2006; Barr and Gruneberg, 2007; Van Damme and Geelen, 2008). Chez les cellules animales, ce sont les pôles du fuseau qui définissent le plan de division, qui est donc fixé au cours de la mitose (figure 16).



L'orientation du fuseau serait dictée par la forme (Minc et al., 2011) et/ou la polarité de la cellule (Siller and Doe, 2009). Chez les plantes, le plan de division est fixé de façon prémitotique par la PPB.

#### 2.2.3.1 *Rôle de la PPB dans la détermination du plan de division*

Découverte en 1966, la PPB est un anneau cortical de microtubules qui entoure la cellule mère au futur site d'insertion de la plaque cellulaire (Pickett-Heaps and Northcote, 1966). Elle est présente dans toutes les cellules de plantes terrestres où la caryokinèse est immédiatement suivie de la cytokinèse, dès la première division du zygote, et dans toutes les divisions, symétriques et asymétriques. Il existe quelques exceptions comme les divisions méiotiques et celles qui suivent la gamétogénèse ou encore chez la mousse *Physcomitrella patens*, les divisions au stade filamenteux du protonema (Doonan et al., 1985). La PPB étant une structure de microtubules spécifique des Embryophytes, elle représenterait une adaptation des plantes à la vie terrestre, en facilitant la coordination de la division cellulaire et l'organisation en trois dimensions des végétaux (Wick, 1991; Mineyuki, 1999).

La PPB est une structure transitoire, formée en fin de phase G2 et qui persiste jusqu'à la rupture de l'enveloppe nucléaire en fin de prophase (Wick and Duniec, 1983b; Venverloo and Libbenga, 1987; Mineyuki et al., 1988). La région corticale identifiée par la PPB en début de mitose, maintenue pendant la division cellulaire, et correspondant au site d'insertion de la nouvelle plaque cellulaire en fin de mitose est appelée « Cortical Division Zone » ou CDZ. La PPB est également composée, dans une moindre mesure, de microfilaments d'actine (Palevitz, 1987) qui seraient impliqués dans la condensation de l'anneau (Eleftheriou and Palevitz, 1992). Dans les étapes suivantes de la mitose, le réseau d'actine est exclu de la CDZ et est considéré comme un « marqueur négatif » du futur plan de division.

La PPB constitue un marqueur cytologique précoce et très précis du futur plan de division dans les cellules qui vont s'engager dans la mitose (Mineyuki, 1999). Bien que la formation de la PPB ne soit pas indispensable à la division cellulaire, plusieurs expériences ont montré son importance dans la détermination du site de division cortical (CDS), site d'insertion de la plaque cellulaire lors de la cytokinèse (Mineyuki and Gunning, 1990). Par exemple, l'insertion de la plaque cellulaire au cortex se fait de façon aléatoire dans des cellules de mutants ne formant pas de PPB ou dans des cellules dont les microtubules ont





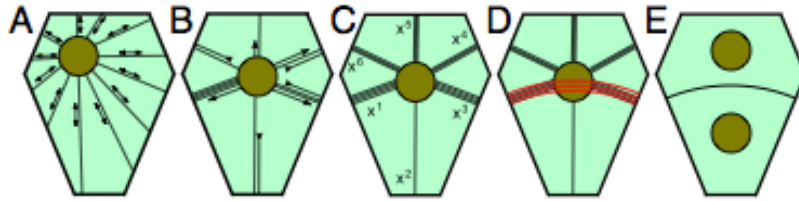
été dépolymérisés par l'application de drogues (Murata and Wada, 1991; Traas et al., 1995b; Mineyuki, 1999). Dans ces cas, l'absence de PPB est corrélée à une orientation anormale de la division cellulaire, confirmant le rôle clé de la PPB dans la détermination du plan de division. Cependant, on ignore comment sa position est déterminée et la nature de l'information déposée à la CDZ puis reconnue par le phragmoplaste lors de la cytokinèse. La PPB laisserait une empreinte moléculaire qui persisterait au cours de la mitose et permettrait de guider la plaque cellulaire et de connecter la nouvelle plaque cellulaire à la membrane de la cellule mère de façon précise (Mineyuki and Gunning, 1990).

### 2.2.3.2 *Mise en place et évolution de la PPB*

Un des mystères de la formation de la PPB est de savoir comment les microtubules qui la composent deviennent restreints à une fine bande corticale centrée autour du noyau alors qu'ils occupaient la totalité du cortex en interphase (figure 14 A, B, C).

#### 2.2.3.2.1 *Positionnement de la PPB*

Chez les cellules végétales, la position du noyau est un indicateur du futur plan de division. La PPB et le noyau sont en relation étroite puisqu'en début de prophase, le noyau et la PPB sont sur un même plan équatorial. La migration du noyau vers le centre de la cellule a lieu en phase G2 avant les divisions symétriques et asymétriques afin d'assurer l'alignement de la PPB et du noyau (Gallagher and Smith, 1999). Dans les petites cellules méristématiques, le noyau occupe une grande place dans la cellule et est déjà en position centrale. Quand le noyau prémitotique des cellules est déplacé par centrifugation avant formation de la PPB, la majorité des cellules forment une PPB autour du noyau déplacé (Mineyuki and Gunning, 1990; Mineyuki and Palevitz, 1990; Murata and Wada, 1991), indiquant que le noyau prémitotique a un rôle important dans la détermination du site de formation de la PPB (Murata and Wada, 1991). Au contraire, quand le noyau prémitotique est déplacé dans les cellules à division asymétrique, la PPB est toujours formée indépendamment de la position du noyau (Pickett-Heaps, 1969), impliquant donc d'autres facteurs dans la détermination de la position et de l'orientation de la PPB. Notamment, le phragmosome est un autre marqueur du futur plan de division dans les cellules vacuolisées. Il s'agit d'une région de cytoplasme qui se forme avant la mitose et à l'intérieur de laquelle se déroulent la caryokinèse et la cytokinèse. En interphase, les vacuoles occupent la plus



**Figure 17 : Modèle mécanistique de sélection du plan de division.** A : Avant la prophase, les microtubules partent du noyau. B : Les microtubules se réorganisent dans des configurations correspondant aux plus courtes distances entre le noyau et les bords de la cellule. C : La configuration impliquant les microtubules les plus courts est favorisée. D : la PPB se forme sur les bords de la cellule les plus peuplés de microtubules. E : La plaque cellulaire se forme dans la même position que la PPB.  $x^u$  représente la densité de microtubules endoplasmiques sur chacun des six bords  $u$  de la cellule. D'après (Besson and Dumais, 2011).

grande partie du cytoplasme, poussant le noyau contre la membrane. Dans les cellules très vacuolisées, durant la phase G2, les vacuoles se fragmentent et permettent au noyau de migrer vers le centre de la cellule (Sinnott and Bloch, 1940). Le noyau est ensuite suspendu au centre de la cellule par de nombreuses travées cytoplasmiques contenant des filaments d'actine et des microtubules et qui lient le noyau au cortex (Lloyd, 1991; Dhonukshe et al., 2005).

En préprophase, on peut distinguer deux classes de microtubules cytoplasmiques nucléés soit à la surface nucléaire soit au cortex (figure 17):

- les microtubules unidirectionnels, partant du noyau par les travées cytoplasmiques et le connectant au cortex en dehors de la PPB. Leurs extrémités (+) sont orientées vers le cortex, contribuant probablement au maintien de l'appareil mitotique au centre de la cellule (Dhonukshe et al., 2005).
- les microtubules bidirectionnels qui connectent la PPB au noyau. Leurs extrémités (+) sont orientées vers le noyau ou partent du noyau. Ces microtubules contribueraient à positionner et maintenir le noyau au centre de la PPB.

Les travées cytoplasmiques et les microtubules sont sous tension en préprophase et auraient tendance à adopter l'axe le plus court à travers la cellule pour relier le noyau au cortex (Hahne and Hoffmann, 1984). Cette tension permettrait aux microtubules d'interpréter la géométrie de la cellule (Flanders et al., 1990). De plus, la distribution des microtubules guiderait la PPB qui se formerait préférentiellement sur les parois qui possèdent le plus de microtubules cytoplasmiques (Wick and Duniec, 1983a; Besson and Dumais, 2011). Cela expliquerait l'alignement du plan de division avec l'axe le plus court de la cellule dans la plupart des cas.

#### 2.2.3.2.2 Formation, maturation et dépolymérisation de la PPB

Le changement de dynamique des microtubules durant la phase G2 serait un élément clé de la formation de la PPB. Dans des cellules de tabac BY-2, lors de la formation de la PPB, les microtubules se dépolymérisent en dehors de la PPB (Dhonukshe and Gadella, 2003). La dépolymérisation des microtubules pourrait être provoquée par l'inactivation de protéines



stabilisatrices et/ou l'activation de protéines déstabilisatrices de microtubules. Cette dépolymérisation serait à l'origine d'un pool de tubuline libre, utilisé pour la formation de nouveaux microtubules. En effet, Mineyuki a montré que la formation de la PPB ne nécessite pas une nouvelle synthèse de tubuline mais qu'elle implique un pool de tubuline existant (Mineyuki, 1999).

De plus, la présence de  $\gamma$ -tubuline le long des microtubules de la PPB suggère la présence de sites de nucléation au niveau de l'anneau (Liu et al., 1993). La nucléation de nouveaux microtubules au sein de la PPB, à partir de la tubuline libérée par la dépolymérisation des microtubules corticaux, pourrait participer à la formation de la PPB.

Enfin, pendant la formation de la PPB, l'instabilité dynamique et la longueur des microtubules augmentent (Vos et al., 2004). Ces modifications favoriseraient l'exploration du cortex cellulaire par les microtubules, la rencontre avec d'autres microtubules et la capture au sein de la PPB. Ce mécanisme est appelé le mécanisme de « search and capture » (Vos et al., 2004). Contrairement aux microtubules en dehors de la PPB, les microtubules au sein de la PPB sont plus stables et s'agrègent en faisceaux. Les microtubules capturés par « search and capture » seraient rapidement alignés et associés au sein de la PPB.

Bien que les facteurs responsables de l'altération de la dynamique et de la stabilité des microtubules de la PPB soient inconnus, des membres de la famille des MAP65, qui s'associent avec la PPB dans les cellules en préprophase et prophase pourraient jouer un rôle important dans la stabilisation des microtubules de la PPB (Smertenko et al., 2004; Gaillard et al., 2008).

Après la formation d'une PPB large en fin de phase G2, la PPB devient plus étroite lors de l'entrée en prophase (Wick and Duniec, 1983b). On parle de maturation de la PPB. A la fin de la prophase, la PPB disparaît. Le signal qui initie la dépolymérisation de la PPB est encore inconnu. Des expériences de centrifugation de protonema d'*Adiantum* et de cellules d'oignons ont montré que le déplacement du noyau hors du plan équatorial occupé par la PPB, après formation de la PPB, provoque un retard de la dépolymérisation de la PPB jusqu'en métaphase voir après la mitose (Mineyuki et al., 1991b; Murata and Wada, 1991). De plus, la rupture de l'enveloppe nucléaire précède toujours la disparition de la PPB d'environ deux ou trois minutes (Dixit and Cyr, 2002) (figure 15 D). Il semblerait qu'un facteur soit libéré du noyau au moment de la rupture de l'enveloppe nucléaire et soit



responsable de la dépolymérisation de la PPB (Mineyuki et al., 1991b; Murata and Wada, 1991; Dixit and Cyr, 2002).

### ***2.2.3.3 Le fuseau mitotique se forme perpendiculairement au plan défini par la PPB***

En fin de prophase, les microtubules périnucléaires se concentrent à deux pôles opposés et forment ce que l'on appelle les coiffes polaires, définissant un axe généralement perpendiculaire au plan de la PPB et qui préfigure l'axe du futur fuseau (figure 14 C) (Pickett-Heaps and Northcote, 1966). Les microtubules périnucléaires s'organisent le long de cet axe pour former un fuseau bipolaire de prophase. L'ancrage du fuseau au cortex est assuré par les microtubules polaires. Durant la transition vers la métaphase, l'enveloppe nucléaire se rompt et la PPB se dépolymérise (figure 14 D). Il a été suggéré que la PPB serve de stock de microtubules ou de tubuline pour la formation du fuseau (Pickett-Heaps, 1969). Les microtubules kinétochoriens s'étendent à partir des pôles du fuseau pour créer des connections avec les kinétochores des chromosomes. Les microtubules chevauchants rejoignent ceux du pôle opposé. Le fuseau se développe et les microtubules polaires disparaissent. En métaphase, les chromosomes sont alignés sur le plan équatorial (figure 14 E). En anaphase, le raccourcissement des microtubules kinétochoriens et l'élongation des faisceaux de microtubules chevauchants permettent aux chromosomes de migrer vers les deux pôles opposés du fuseau (figure 14 F) (Chan et al., 2005; Yoneda et al., 2005). A la fin de l'anaphase, le fuseau est dépolymérisé, mais les microtubules persistent au centre de la cellule pendant la télophase pour initier la formation du phragmoplaste et déclencher la cytokinèse.

De nombreuses études ont depuis longtemps suggéré que la PPB influencerait la formation et l'orientation du fuseau (Mineyuki et al., 1991b; Nogami et al., 1996; Yoneda et al., 2005; Lloyd and Chan, 2006; Panteris et al., 2006; Bannigan et al., 2008). Le comportement du fuseau a été examiné dans des cultures cellulaires. Dans la lignée cellulaire utilisée par Chan et al., 70% des cellules ne produisent pas de PPB (Chan et al., 2005). Dans les cellules de cette lignée ayant une PPB, les pôles du fuseau se forment avant la dépolymérisation de la PPB et la rupture de l'enveloppe nucléaire. Le fuseau qui se forme ensuite est toujours perpendiculaire au plan de la PPB. Au contraire, dans les cellules sans





PPB, la bipolarité du fuseau se met toujours en place après rupture de l'enveloppe nucléaire et son orientation est variable (Chan et al., 2005). La dépolymérisation des microtubules par traitement pharmacologique, après formation mais avant maturation de la PPB, modifie l'orientation du fuseau qui n'est plus perpendiculaire au plan déterminé par la PPB (Marcus et al., 2005). Cependant, le phragmoplaste guide toujours la plaque cellulaire au site précédemment occupé par la PPB et la division cellulaire est correctement orientée. Ces résultats montrent que la maturation de la PPB n'est pas indispensable à la détermination du plan de division mais qu'elle est importante pour l'orientation du fuseau. La PPB semble donc nécessaire pour le contrôle temporel et spatial de la formation du fuseau. Elle serait impliquée dans l'organisation des microtubules aux pôles du fuseau à la surface de l'enveloppe nucléaire (Wick and Duniec, 1983b; Chan et al., 2005; Marcus et al., 2005; Ambrose and Cyr, 2008). La PPB aurait, en ce sens, un rôle comparable au centrosome des animaux, en guidant la position et l'orientation du fuseau (Ambrose and Cyr, 2008).

#### ***2.2.3.4 Le phragmoplaste se met en place au site de division cortical***

En fin de mitose, la cytokinèse conduit à la production de deux cellules filles (figure 14 G, H, I). Contrairement à la cytokinèse animale, chez les plantes terrestres, la plaque cellulaire, composée de la nouvelle membrane plasmique et de la nouvelle paroi, est formée au centre de la cellule par le phragmoplaste. Deux voies participent à la construction de la plaque cellulaire :

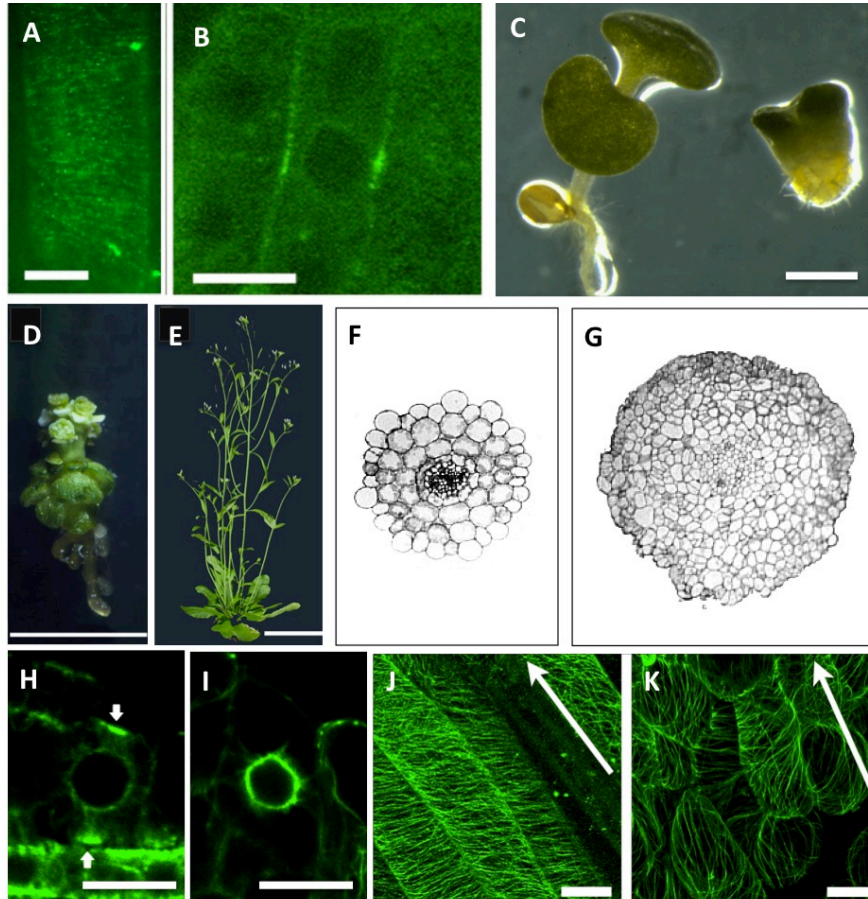
- la fusion de vésicules dérivées du Golgi (Nebenfuhr and Staehelin, 2001; Segui-Simarro and Staehelin, 2006). En interphase, les saccules de Golgi sont distribués de manière homogène dans le cytoplasme (Nebenfuhr et al., 2000). En phase G2, Les vésicules de l'appareil de Golgi fusionnent avec la membrane plasmique aux alentours de la PPB et pourraient être impliquées dans l'identité de la CDZ (Hardham and Gunning, 1978; Galatis and Mitrakos, 1979; Dhonukshe et al., 2005). Au sein du phragmoplaste, les microtubules sont alignés de part et d'autre de la plaque cellulaire, les extrémités (+) se faisant face au centre de la cellule (Austin et al., 2005). Ils assurent le transport des vésicules golgiennes qui contiennent les précurseurs de la paroi grâce à des protéines motrices de type kinésine (Goldstein and Philp, 1999). Les vésicules fusionnent avec la plaque cellulaire en développement, libérant ainsi les éléments nécessaires à la création de la nouvelle paroi cellulaire entre les deux cellules (Samuels et al., 1995; Verma, 2001).



- l'endocytose. La région de la PPB est un site actif d'endocytose. L'endocytose pourrait être impliquée dans la suppression de protéines spécifiques de la membrane plasmique. Cette modification au niveau de la PPB contribuerait à l'établissement de la CDZ. Des protéines de la membrane plasmique et des composants de la paroi sont délivrés à la plaque cellulaire par endocytose et participent ainsi à la cytokinèse (Dhonukshe et al., 2006). Le taux d'endocytose augmente fortement pendant la formation de la plaque cellulaire.

La plaque cellulaire en formation s'étend de façon centrifuge jusqu'aux parois latérales de la cellule mère, à l'emplacement précis marqué précédemment par la PPB.

Le phragmoplaste, composé de microtubules et de microfilaments, est mis en place en fin d'anaphase à partir des microtubules du fuseau mitotique et par polymérisation de nouveaux microtubules (Staehein and Hepler, 1996). Dans la plupart des cellules, le phragmoplaste est déjà aligné avec le plan de division et la nouvelle plaque cellulaire s'étend jusqu'à l'ancien site de la PPB. Cependant, si le fuseau n'est pas aligné avec le plan de division comme c'est le cas dans certains types cellulaires, le phragmoplaste en croissance peut être guidé jusqu'au CDS (Granger and Cyr, 2001). Le phragmoplaste est alors initialement orienté de manière oblique, puis se repositionne au moment de la cytokinèse pour que la plaque cellulaire s'attache au CDS (Hepler and Palevitz, 1986; Cleary and Smith, 1998). Sous certaines conditions expérimentales, quand l'orientation du fuseau n'est pas perpendiculaire au plan défini par la PPB (avec un angle supérieur à 60° par rapport au plan de la PPB), le phragmoplaste ne peut pas être guidé jusqu'au CDS. Il semble que le mécanisme d'orientation du phragmoplaste ne peut pas se faire au delà d'une distance critique par rapport au CDS déterminé par la PPB (Granger and Cyr, 2001; Marcus et al., 2005). La nature de l'information laissée par la PPB permettant la reconnaissance de la CDZ n'est pas connue mais plusieurs composants de la CDZ ont été identifiés.



**Figure 18 : Localisation de TON1 et phénotype des mutants *ton1* et *fass* chez *Arabidopsis*.**

(A) Dans les cellules en interphase, TON1 est localisée de manière ponctuelle le long des microtubules. (B) Dans les cellules en division, TON1 est localisée à la PPB. (C) Plantules sauvage (à gauche) et mutant *ton1* (à droite) 7 jours après germination. (D-E) Mutant *fass* fort (D) et plante sauvage (E). (F-G) Coupe transversale de l'hypocotyle de plantule *fass* (F) et sauvage (G) 5 jours après germination. (H-K) Organisation des microtubules chez une plantule sauvage (H et I) et *fass* (I et K). En préprophase, les microtubules sont organisés en PPB chez le sauvage (H) et autour du noyau chez *fass* (I). En interphase, les microtubules sont essentiellement transverses chez le sauvage (J) et n'ont pas d'orientation préférentielle chez *fass* (K). Echelle : 10  $\mu\text{m}$  en (A), (H) et (I), 20  $\mu\text{m}$  en (B), 50  $\mu\text{m}$  en (J) et (K), 5 mm en (C) et (D), 5 cm en (E). D'après (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008)

## 2.2.4 Les marqueurs de la zone de division corticale

### 2.2.4.1 Les marqueurs positifs de la zone de division corticale

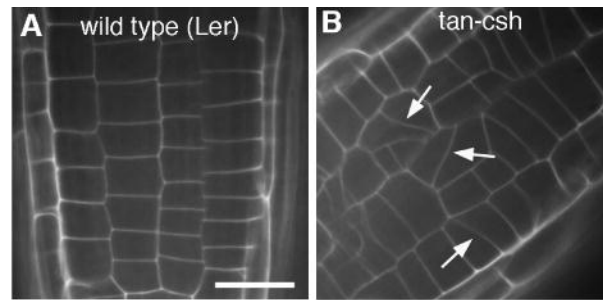
Plusieurs protéines ont été localisées à la PPB et sont susceptibles d'être impliquées dans sa formation et/ou dans la détermination de la CDZ.

#### 2.2.4.1.1 TON1 et FASS

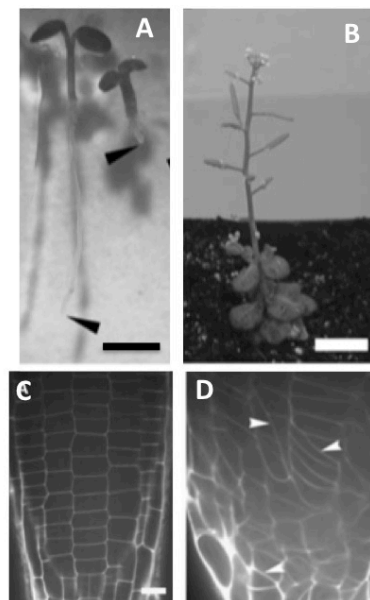
Les protéines TON1 et FASS d'*Arabidopsis* ainsi que les deux homologues de FASS chez le maïs, DISCORDIA1 (DCD1) et ALTERNATIVE DISCORDIA1 (ADD1) ont été localisés à la PPB et persistent au cortex jusqu'en métaphase, après disparition de la PPB (figure 18 B) (Azimzadeh et al., 2008; Wright et al., 2009; Spinner et al., 2013). Elles ne sont pas localisées aux autres structures mitotiques, le fuseau et le phragmoplaste (Azimzadeh et al., 2008; Spinner et al., 2013). En interphase, TON1 a été localisée de manière ponctuelle le long des microtubules du réseau cortical (figure 18 A) (Azimzadeh et al., 2008; Spinner et al., 2013) et FASS a été localisée dans le cytoplasme (Kirik et al., 2012).

TON1 est une petite protéine acide qui possède un motif de dimérisation LisH en N-terminal. La moitié N-terminale de TON1 présente des similarités avec la région N-terminale de la protéine humaine FOP, localisée au centrosome (Azimzadeh et al., 2008). FASS, DCD1 et ADD1 sont des sous-unités régulatrices de complexe phosphatase PP2A (Camilleri et al., 2002; Wright et al., 2009; Spinner et al., 2013). On retrouve des homologues de FASS chez *C. elegans* et chez l'homme, respectivement RSA-1 et G5PR. Il a été montré que RSA-1 recrute les complexes PP2A au centrosome (Schlaitz et al., 2007).

Les mutants *tonneau1* et *fass* présentent une forte perturbation de la forme et de la croissance de la plante (figure 18 C-G) (Mayer et al., 1991; Traas et al., 1995b). Les plantes sont naines et stériles. Les mutations *ton1* et *fass* entraînent des défauts de morphogénèse cellulaire (Torres-Ruiz and Jürgens, 1994; Traas et al., 1995b; McClinton and Sung, 1997; Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008). Ces mutations provoquent l'absence complète de PPB chez *Arabidopsis*; à la place, les microtubules s'accumulent autour du noyau (figure 18 H, I) (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008). L'organisation du réseau d'interphase est également perturbée, les microtubules étant distribués majoritairement de manière aléatoire, localement parallèles entre eux mais mal orientés par rapport à l'axe d'élongation de la plante (figure 18 J K). En revanche, les réseaux mitotiques non corticaux tels que le



**Figure 19 : Phénotype racinaire du mutant *tan*.** Coloration à l'iodure de propidium de pointes racinaires de 5-6 jours d'une plantule sauvage (A) et de mutant *tan* (B). Les flèches indiquent les divisions mal orientées. Echelle : 10  $\mu$ m. D'après (Walker et al., 2007)



**Figure 20 : Phénotype du double mutant *pok1 pok2*.** (A) Plantules de 5 jours sauvage (à gauche), double mutant *pok1 pok2* (à droite). (B) Double mutant *pok1 pok2* adulte. (C-D) Coloration à l'iodure de propidium de méristèmes racinaires de plantule sauvage (C) et de double mutant *pok1 pok2*. Les flèches indiquent les divisions mal orientées. Echelle : 0,5 cm en (A), 1 cm en (B) et 25  $\mu$ m en (C-D). D'après (Muller et al., 2006).

fuseau mitotique ou le phragmoplaste se forment normalement. Néanmoins, l'orientation du phragmoplaste est perturbée, et la plaque cellulaire s'attache de manière aléatoire au cortex.

Chez le maïs, *DCD1* et *ADD1* fonctionnent de manière redondante dans la formation de la PPB (Wright et al., 2009). En effet, le knock-down de ces deux gènes provoque l'absence de PPB ou des PPB malformées. De façon surprenante, contrairement au mutant *fass*, le double mutant *dcd1 add1* n'est pas viable. Il est possible que la fonction ne soit pas la même chez les deux espèces ou que d'autres partenaires compensent la perte de fonction TON1/FASS chez *Arabidopsis*.

Ces observations montrent que l'absence de PPB entraîne une perturbation de la détermination du plan de division, sans pour autant bloquer la mitose et la cytokinèse.

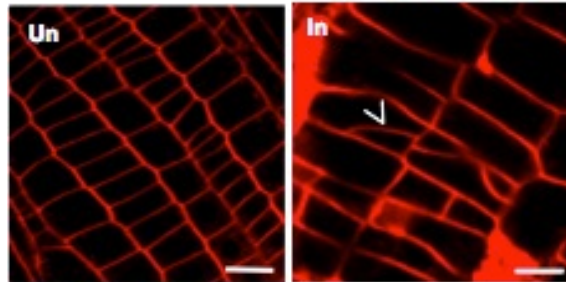
#### 2.2.4.1.2 TANGLED, POK1 et POK2 sont impliquées dans l'orientation du phragmoplaste

TANGLED (TAN) est une MAP localisée à la PPB qui persiste à la CDZ pendant toute la mitose et la cytokinèse, suggérant qu'elle joue un rôle dans le marquage du site de division après rupture de la PPB (Smith et al., 2001; Walker et al., 2007; Rasmussen et al., 2011b).

Le gène *TAN* a d'abord été étudié chez le maïs, où la mutation entraîne une réduction de la taille des plantes. Au niveau cellulaire, elle affecte à la fois la position de la PPB et celle du phragmoplaste dans les cellules épidermiques et provoque de nombreuses divisions mal orientées (Smith et al., 1996; Cleary and Smith, 1998). Chez *Arabidopsis*, le mutant ne présente pas de phénotype à l'œil nu mais des défauts similaires d'orientation des plans de division, beaucoup moins prononcés, sont observés (figure 19). L'orientation anormale des plans de division est principalement attribuée à l'incapacité de la plupart des phragmoplastes à être guidés au CDS (Smith et al., 2001; Wright et al., 2009).

PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN 1 et 2 (POK1 et POK2) sont deux kinésines interagissant avec TAN (Muller et al., 2006). Les mutants *pok1* et *pok2* d'*Arabidopsis* ont été isolés. Alors que les simples mutants n'ont pas de phénotype, le double mutant *pok1 pok2* est nain avec des plans de divisions mal orientés (figure 20). Ces défauts suggèrent que ces kinésines sont impliquées dans l'orientation du plan de division (Muller et al., 2006). Comme chez les mutants *tan1*, les phragmoplastes sont mal orientés. Dans les cellules *pok1 pok2* formant une PPB, TAN n'est pas localisée à la PPB. POK1 et POK2 sont donc nécessaires au





**Figure 21 : Effet de la réduction de l'expression de RanGAP1 dans la racine.** Pointes racinaires d'*Arabidopsis* colorées au FM4-64. A gauche, racine sauvage. A droite, racine dont l'expression de RanGAP1 est réduite. Echelle : 20  $\mu$ m. D'après (Xu et al., 2008).

recrutement de TAN à la CDZ, suggérant que leurs fonctions sont essentielles à la localisation de TAN en préprophase.

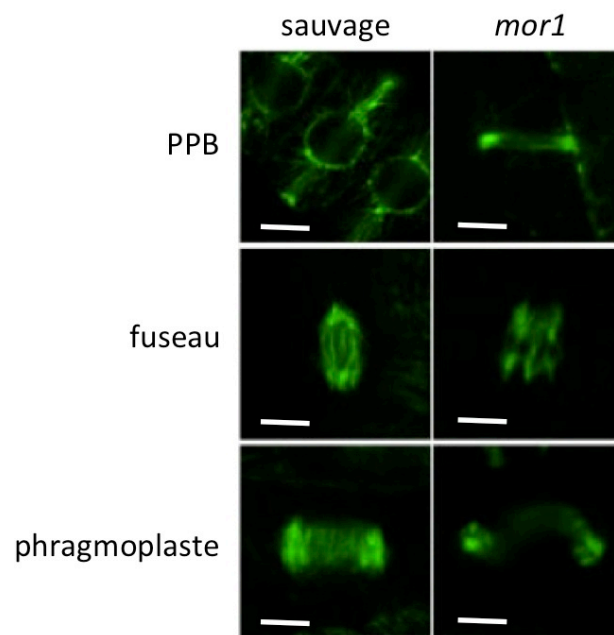
#### 2.2.4.1.3 RanGAP1 (Ran GTPase Activating Protein 1) est impliquée dans l'établissement du CDS

RanGAP1 est une protéine activatrice de la GTPase Ran. Elle est présente au CDS durant toute la mitose et la cytokinèse (Xu et al., 2008). RanGAP1, comme TAN, interagit directement avec POK1 et POK2 mais contrairement à TAN, chez le double mutant *pok1 pok2*, RanGAP1 est localisée à la PPB. POK1 et POK2 ne seraient donc pas responsables de son recrutement à la PPB. Cependant, chez ce double mutant, RanGAP1 n'est plus localisée à la CDZ après disparition de la PPB. RanGAP1 pourrait être impliquée dans le maintien de l'identité de la CDZ. Il est possible que RanGAP1 interagisse avec d'autres kinésines, responsables de son recrutement à la PPB. POK1 et POK2 seraient ensuite nécessaires pour recruter un facteur indispensable à la persistance de RanGAP1 après disparition de la PPB.

La déplétion de RanGAP1, tout comme la mutation *tan*, provoque des défauts de cytokinèse (parois cellulaires incomplètes ou plaques cellulaires mal orientées) (figure 21) (Xu et al., 2008). TAN et RanGAP1 pourraient être impliquées dans l'établissement de la plaque cellulaire en fin de division, et potentiellement dans la formation de la PPB en préprophase (Xu et al., 2008).

#### 2.2.4.1.4 Microtubule Organization 1 (MOR1)

MOR1 est une protéine de la famille des MAP215 (Whittington et al., 2001), caractérisée par la présence de domaines TOG (Tumor Overexpressed Gene Protein) en N-terminal. Comme la plupart des protéines de cette famille, MOR1 possède 5 domaines TOG (Lechner et al., 2012). Chaque domaine TOG contient 6 HEAT repeat alignés (Slep, 2009), qui seraient impliqués dans les interactions entre protéines (Neuwald and Hirano, 2000). Elle est localisée à la PPB, aux autres réseaux mitotiques de microtubules et au réseau d'interphase (Twell et al., 2002; Yasuhara et al., 2002; Hamada et al., 2004; Kawamura et al., 2006).

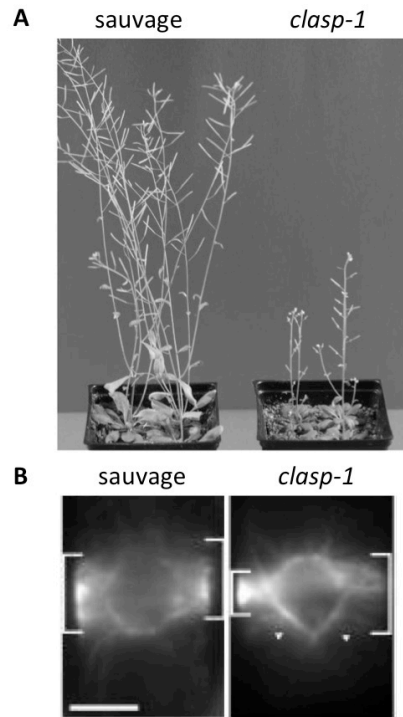


**Figure 22 : Effet de la mutation *mor1* sur l'organisation des microtubules en mitose.** Organisation des microtubules chez une plantule sauvage (à gauche) et chez le mutant thermo-sensible *mor1* (à droite). Echelle : 5  $\mu\text{m}$ . D'après (Kawamura et al., 2006)

Plusieurs allèles *mor1* ont été identifiés chez *Arabidopsis* dont un allèle sévère létal à l'état homozygote (Twell et al., 2002). D'autres allèles thermo-sensibles ont été isolés. Ils résultent tous de la substitution d'un acide aminé dans un HEAT repeat (Whittington et al., 2001; Twell et al., 2002; Konishi and Sugiyama, 2003; Eleftheriou et al., 2005; Kawamura et al., 2006). Quand les plantules mutantes sont transférées à température restrictive (29°C), les microtubules sont plus courts et tous les réseaux de microtubules sont affectés (Whittington et al., 2001; Kawamura et al., 2006). Environ la moitié des cellules en division ne forment pas de PPB et dans celles qui en forment, les PPB sont mal orientées et désorganisées (figure 22) (Kawamura et al., 2006). Les fuseaux formés sont courts et les phragmoplastes tordus (figure 21). L'analyse de la dynamique des microtubules chez les mutants suggère que MOR1 inhibe les événements de pause, augmentant l'instabilité dynamique des microtubules (Kawamura and Wasteneys, 2008). De plus, MOR1 serait impliquée dans la formation de longs microtubules (Whittington et al., 2001; Kawamura et al., 2006). Son homologue chez le tabac, TMBP200/MAP200, augmente la longueur des microtubules in vitro (Hamada et al., 2004) et son homologue animal, XMAP215, catalyse l'ajout des dimères de tubuline à l'extrémité (+) des microtubules et favoriserait ainsi leur croissance (Brouhard et al., 2008). MOR1 pourrait donc participer à la formation de la PPB en régulant la dynamique des microtubules (Kawamura et al., 2006; Kawamura and Wasteneys, 2008).

#### 2.2.4.1.5 CLIP-associated protein (CLASP)

CLASP est une MAP capable de s'associer avec les microtubules, préférentiellement à leur extrémité (+), et de les stabiliser (Ambrose et al., 2007; Kirik et al., 2007). La protéine CLASP est présente sur tous les réseaux de microtubules et serait impliquée dans l'organisation spatiale des réseaux de microtubules corticaux (Ambrose and Wasteneys, 2008; Ambrose et al., 2011). Elle s'accumule sur les arêtes formées entre deux faces d'une cellule polyédrique, en particulier dans les cellules en division et en élongation (Ambrose et al., 2011). La mutation *clasp-1* provoque des défauts de morphogénèse (figure 23 A). Au niveau cellulaire, elle entraîne la formation de PPB peu développées dont la densité en microtubules est hétérogène (figure 23 B). La forme des fuseaux et des phragmoplastes est également altérée. Les mutants *clasp-1* d'*Arabidopsis* sont nains et présentent une activité



**Figure 23 : Phénotype du mutant *clasp-1*.** (A) Plantes de 44 jours sauvage (à gauche) et mutant (à droite). (B) Organisation de la PPB dans les cellules de racine de 7 jours chez la sauvage (à gauche) et chez le mutant (à droite). Echelle : 5  $\mu\text{m}$  en (B). D'après (Ambrose et al., 2007)

mitotique réduite ainsi que des défauts d'élongation cellulaire et des formes de cellules altérées (Ambrose et al., 2007; Kirik et al., 2007). Les mutants *clasp* présentent également des défauts d'ancrage des microtubules au cortex cellulaire ce qui entraîne un détachement partiel des microtubules de la membrane plasmique. Ambrose suggère que c'est en modulant le degré d'ancrage des microtubules au cortex via la protéine CLASP que la cellule peut réguler les différents degrés d'organisation des réseaux de microtubules (Ambrose and Wasteneys, 2008). Les cellules végétales polyédriques possèdent des arêtes à angles plus ou moins aigus. Les arêtes à angles aigus créent une barrière physique à la croissance des microtubules, empêchant l'organisation longitudinale des microtubules et autorisant les réseaux transverses de microtubules. La localisation de CLASP pourrait diminuer la fréquence des événements de catastrophe en permettant la croissance des microtubules autour des arêtes aiguës de la cellule (Ambrose et al., 2011).

#### 2.2.4.1.6 KINESIN Ungrouped a (KINUa)

Le gène *KINUa* fait partie d'une nouvelle famille de kinésines composée de trois membres, *KINUa*, *KINUb* et *KINUc*, caractérisée par la présence d'un domaine moteur en N-terminal et d'un domaine armadillo en C-terminal (Sakai et al., 2008). Le domaine moteur de ces kinésines ne ressemble à aucun des domaines moteurs identifiés, faisant de ces trois protéines une famille à part (Miki et al., 2005).

La protéine KINUa a été localisée à la PPB dans les cellules épidermiques en division d'*Arabidopsis* et dans les cellules BY-2 (Malcos and Cyr, 2011). KINUa est présente au réseau d'interphase et à la PPB jusqu'à rupture de l'enveloppe nucléaire puis disparaît (Malcos and Cyr, 2011). La dégradation rapide de cette protéine en métaphase est due à une boîte de destruction présente dans sa séquence protéique (voir III. B. 2.) (Malcos and Cyr, 2011). Aucune analyse génétique n'ayant été réalisée, il n'est pas possible de connaître le rôle de cette protéine lors de la division cellulaire.



#### 2.2.4.2 *Les marqueurs négatifs de la zone de division corticale*

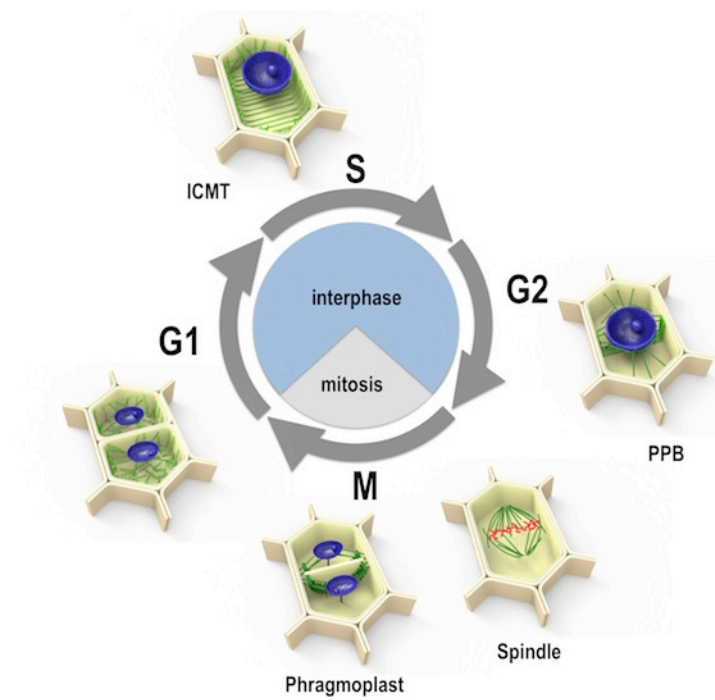
##### 2.2.4.2.1 Actine Depleted Zone (ADZ)

Alors que les microfilaments et les microtubules de la PPB se dépolymérisent en prophase, les filaments actine corticaux sont retenus dans le reste de la cellule, créant une zone dépourvue d'actine (ADZ) qui coïncide avec la CDZ. Cette ADZ persiste et marque négativement le site de division pendant la mitose et la cytokinèse (Cleary et al., 1992; Hoshino et al., 2003; Sano et al., 2005). Dans des cellules BY-2 synchronisées, l'ajout de bistheonellide A, une drogue dépolymérisant l'actine, provoque la perturbation de l'orientation des plaques cellulaires quand elle est appliquée lors de la formation de l'ADZ, alors qu'elle a peu d'effet lorsqu'elle est appliquée pendant la cytokinèse (Hoshino et al., 2003). Ces expériences suggèrent que la présence de l'ADZ pendant la cytokinèse n'est pas essentielle pour l'orientation du phragmoplaste, mais que l'ADZ ou l'actine de la PPB joue un rôle important dans l'établissement ou le maintien du site de division.

##### 2.2.4.2.2 Kinesin CDKA;1 associated Depleted Zone (KDZ)

La kinésine KCA1 a été identifiée comme second marqueur négatif du site de division (Vanstraelen et al., 2006). KCA1 possède un domaine de liaison à l'ATP et aux microtubules, caractéristique des kinésines, et deux sites putatifs de phosphorylation de CDKA;1, avec qui elle interagit (Vanstraelen et al., 2004). KCA1 a été localisée aux microtubules dans les cellules BY-2 (Vanstraelen et al., 2004). Dans les cellules en division, KCA1 est localisée au niveau de la membrane plasmique, du phragmoplaste et de la plaque cellulaire nouvellement formée lors de la cytokinèse (Vanstraelen et al., 2004; Vanstraelen et al., 2006). De la formation de la PPB jusqu'à la fin de la cytokinèse, KCA1 est exclue du futur plan de division formant la KDZ (Kinesin CDKA;1 associated Depleted Zone). La KDZ se forme avant l'ADZ puis elles co-localisent après la disparition de la PPB (Vanstraelen et al., 2006). Les études pharmacologiques ont montré que les microtubules ne sont pas nécessaires pour le maintien de la KDZ pendant la mitose et la cytokinèse mais que les microtubules sont nécessaires à sa formation (Vanstraelen et al., 2006). Plus de recherches sont nécessaires pour déterminer le rôle de la KDZ dans le contrôle spatial de la cytokinèse.





**Figure 25 : Le cycle cellulaire est divisé en quatre phases.** Les phase G1, S et G2 correspondent à l'interphase. La phase M est composée de la prophase, la métaphase, l'anaphase et la télophase.

### 3 Le cycle cellulaire chez les plantes

La formation de la PPB et le cycle de microtubules et le cycle cellulaire semblent intimement liés : la PPB est en effet une structure spécifique de la transition G2/M suggérant que le cycle cellulaire contrôle le moment de formation de la PPB. Pour autant, il ne s'agit pas d'un couplage obligatoire puisque chez les mutants qui ne forment pas de PPB, l'entrée en mitose et la progression du cycle cellulaire se déroulent normalement (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008). Plusieurs acteurs du cycle cellulaire ont récemment été localisés à la PPB, renforçant l'idée d'un lien entre le contrôle temporel (cycle cellulaire) et le contrôle spatial (PPB) de la division. Dans cette partie, je décrirai les composants et les mécanismes de régulation du cycle cellulaire, la progression du cycle cellulaire lors de la transition G2/M et enfin les protéines du cycle cellulaire ayant été localisée à la PPB.

Le cycle cellulaire correspond à l'intervalle de temps qui sépare une division cellulaire de la suivante. Il est divisé en quatre phases : la phase G1 (Gap 1) au cours de laquelle la cellule effectue sa croissance, la phase S (Synthèse) au cours de laquelle l'ADN est répliqué, la phase G2 (Gap2) au cours de laquelle les molécules nécessaires à la division cellulaire sont synthétisées et enfin la phase M (Mitose) au cours de laquelle ont lieu la division nucléaire et la division cytoplasmique (figure 25). La succession des phases G1, S et G2 constituent l'interphase (Francis, 2007). La succession des cycles cellulaires implique des points de contrôle et la progression du cycle cellulaire.

#### 3.1 Les régulateurs clés du cycle cellulaire

Au cours de l'évolution, les mécanismes principaux de contrôle du cycle cellulaire ont été fortement conservés chez tous les eucaryotes (Amon, 1998). Chez des espèces aussi différentes que la levure ou l'homme, la progression des phases du cycle cellulaire est dirigée par des complexes protéiques constitués de kinases cycline-dépendantes (CDK), représentant la sous-unité catalytique, et de cyclines (CYC), représentant la sous-unité régulatrice (Nigg, 1995; Nurse, 1997). Des CDK et des cyclines ont été identifiées chez les plantes et certaines d'entre elles jouent un rôle dans le contrôle de la division cellulaire (Hemerly et al., 1995; Doerner et al., 1996). Diverses molécules comme des hormones de



croissance, des kinases, des phosphatases, des protéines régulatrices ou des facteurs de transcription contrôlent l'expression et l'activité de ces protéines lors du cycle cellulaire et de la mitose (Hemerly et al., 1992; Ferreira et al., 1994; Doerner et al., 1996; Zhang et al., 1996; Wang et al., 1998; Roovers and Assoian, 2000; Inze and De Veylder, 2006; Perry and Kornbluth, 2007; Francis, 2011).

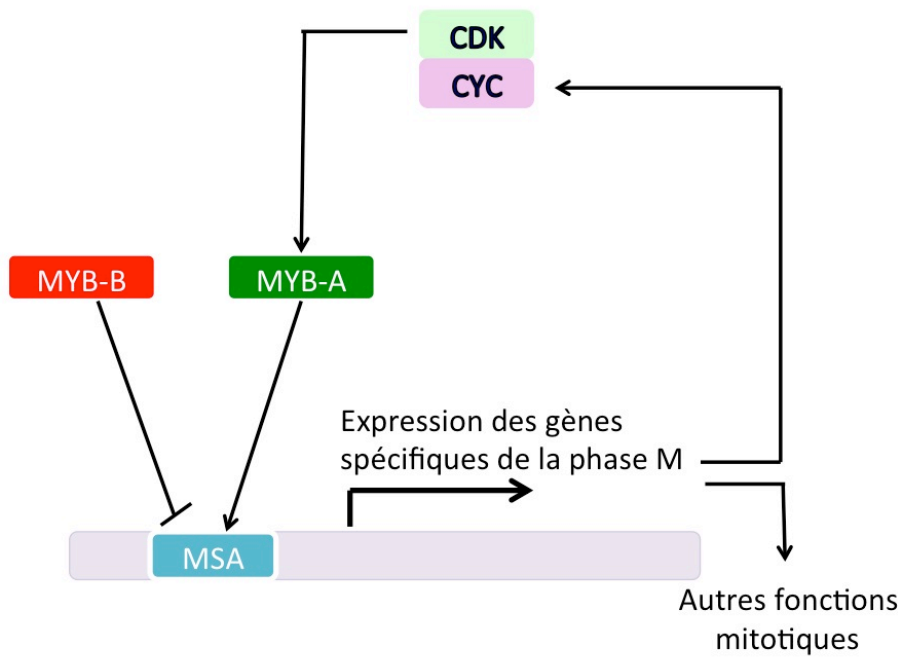
### 3.1.1 CDK – cyclin-dependent kinases

Les CDK appartiennent à la famille des sérine/thréonine kinases. Elles catalysent le transfert d'un groupement phosphate de l'ATP sur les résidus sérine ou thréonine de leurs substrats. Tous les eucaryotes possèdent au moins une CDK contenant un domaine très conservé de liaison aux cyclines appelé motif PSTAIRE (EGVPSTAIREISLLKE). Les CDK ne sont fonctionnelles que lorsqu'elles sont associées à une cycline : c'est donc l'association d'une CDK avec une cycline qui permet d'activer l'activité kinase du complexe CDK/CYC. Sachant qu'une CDK peut s'associer à des cyclines différentes et qu'une cycline peut s'associer à des CDK différentes, les combinaisons peuvent être multiples. Chez *Arabidopsis*, 29 gènes codant des CDK ont été identifiés et classés en sept catégories, notées de A à G, en fonction de leur séquence protéique (Vandepoele et al., 2002; Menges et al., 2005).

### 3.1.2 Cyclines

Dans tous les systèmes eucaryotes, les cyclines sont fortement conservées. Elles sont essentielles pour l'activation des CDK et représentent donc la première cible de régulation du cycle cellulaire. La liaison d'une cycline à une CDK induit un changement de conformation qui libère le site catalytique de CDK. 49 gènes de cyclines ont été identifiés chez *Arabidopsis* (Vandepoele et al., 2002; Wang et al., 2004). On distingue deux grands groupes de cyclines selon leur rôle et le moment du cycle où elles sont actives: les cyclines de type D, qui interviennent lors de la transition G1/S, et les cyclines mitotiques de type A et B, impliquées dans les phases S, G2 et M (Pines, 1996; Renaudin et al., 1996; Inze and De Veylder, 2006). Toutes ces cyclines possèdent un domaine très conservé, appelé « cyclin box », qui correspond au site de liaison à une CDK, et qui est indispensable à la formation du complexe CDK/CYC.

Les cyclines mitotiques contiennent un autre motif conservé, responsable de leur dégradation, la « boîte de destruction » ou D-Box (destruction-box), dont le motif



**Figure 26 : Modèle de régulation de l'expression des gènes pendant la transition G2/M dans les cellules de tabac.** Les facteurs de transcription MYB A se lient aux éléments MSA et activent les promoteurs des gènes spécifiques de la transition G2/M, comme CYC B, dont le rôle est important pour la progression de la mitose et de la cytokinèse. MYB A pourrait être activée par phosphorylation via un complexe CDK/CYC B. Adaptée de (Doonan and Sablowski, 2010)

correspond aux résidus RxxLxxxxN (Glotzer et al., 1991). Cependant, chaque type de cyclines A ou B possède différentes séquences de D-box, ce qui pourrait refléter l'existence de plusieurs systèmes de dégradation des cyclines, à des moments différents du cycle cellulaire. Les D-box sont des signaux de dégradation reconnus par le complexe APC (Anaphase Promoting Complex). Elles ciblent la dégradation des cyclines mitotiques par ubiquitination pendant la mitose (Glotzer et al., 1991). En 2000, une autre boîte de destruction a été identifiée : la KEN-box (Pfleger and Kirschner, 2000), dont la séquence consensus KENxxxN est également reconnue par l'APC.

L'étude de la séquence des promoteurs de cyclines a permis de révéler l'existence des éléments MSA (M-specific activators), spécifiques des plantes, dont la séquence consensus est TC(T/C)AACGG(T/C)(T/C)A. Ils contrôlent l'activation des promoteurs de gènes lors de la transition G2/M (Ito et al., 2001). Ils ont été découverts chez *Catharanthus roseus* dans le promoteur de gènes de cyclines de type B, exprimés spécifiquement en phase G2 et en phase M. Les ARNm de *CYC B* s'accumulent surtout pendant la phase M dans les méristèmes caulinaux apicaux (Fobert et al., 1994; Kouchi et al., 1995) et dans des cultures de cellules synchronisées (Ito et al., 1997; Menges and Murray, 2002). L'accumulation périodique d'ARNm de *CYC B* est un des facteurs déterminants de l'entrée en mitose. Le promoteur de la cycline B CYM de *Catharanthus roseus* est capable de provoquer la transcription d'un gène rapporteur  $\beta$ -glucuronidase spécifiquement en phase M dans les cellules BY-2 synchronisées (Ito et al., 1997). L'étude des éléments régulateurs du promoteur de CYM a montré qu'un élément de neuf paires de base est essentiel à l'activation du promoteur spécifiquement en phase M dans les cellules BY-2 (Ito et al., 1998). Des séquences similaires ont été identifiées dans les promoteurs de *CYCB* chez le tabac, le soja et *Arabidopsis*. Chez le tabac, trois protéines appartenant à la famille des facteurs de transcription MYB (NtMYB A1, NtMYB A2 et NtMYB B) ont été identifiées par crible simple-hybride comme pouvant se lier directement à la séquence MSA. NtMYB A1 et NtMYB A2 sont capables d'activer les promoteurs contenant des éléments MSA alors que NtMYB B inhiberait l'action de MYB A2 et MYB A1 (figure 26) (Ito et al., 2001). L'accumulation d'ARNm de *NtMYB A1* et *NtMYB A2* commence juste avant l'apparition des transcrits de *CYCB1* et atteint son maximum pendant la mitose (Ito et al., 2001), renforçant l'idée que MYB A1 et MYB A2 sont impliquées dans l'induction des gènes de cyclines de type B. Au contraire,



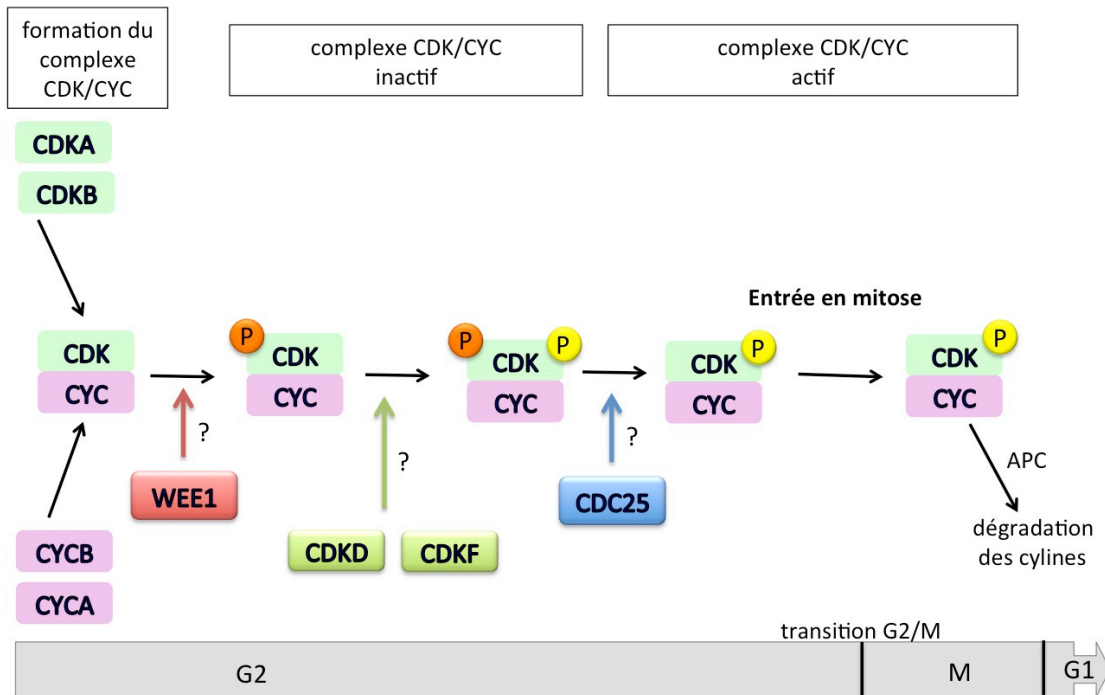
l'accumulation des ARNm de *NtMYB B* ne dépend pas du cycle cellulaire. Un niveau constant de *NtMYB B* inhiberait l'activation des éléments MSA pendant les phases G1, S et G2, jusqu'à ce que les niveaux de *NtMYB A1* et *NtMYB A2* atteignent un certain seuil. Ces dernières entreraient alors en compétition avec *NtMYB B* pour se lier aux éléments MSA et activer l'expression des gènes. Des éléments MSA ont été identifiés dans les promoteurs des gènes *NtMYB A1* et *NtMYB A2* (Kato et al., 2009). *NtMYB A2* et *NtMYB A1* activeraient donc leur propre transcription. De plus, une fois *CYCB* activé par *NtMYB A2*, *CYCB* formerait un complexe avec une CDK pour activer *NtMYB A2* par phosphorylation. Ce feedback positif permettrait d'amplifier rapidement l'expression de *NtMYB A2* (figure 26) (Araki et al., 2004). Les éléments MSA sont nécessaires et suffisants pour activer un certain nombre de gènes co-régulés et spécifiques de la transition G2/M comme *KNOLLE* ou *ENDOSPERM DEFECTIVE 1* (Ito et al., 2001; Haga et al., 2007; Pignocchi et al., 2009). Chez *Arabidopsis*, sur 82 gènes exprimés spécifiquement en G2/M, 65 contiennent au moins un élément MSA dans leur promoteur (Menges et al., 2005).

L'expression et la destruction des cyclines mitotiques sont très précisément régulées dans le temps, et permettent d'activer ou d'inactiver les complexes CDK/CYC afin d'assurer le déroulement des différents événements du cycle cellulaire (Sullivan and Morgan, 2007).

### 3.2 La progression du cycle cellulaire

Des points de contrôle permettent de vérifier que chaque étape du cycle s'est déroulée correctement, plus particulièrement lors de la transition G1/S et lors de la transition G2/M. Ils permettent aussi d'empêcher l'entrée en mitose avant que la réplication de l'ADN ne soit complète ou en réponse à un stress. Dans cette partie, je détaillerai la régulation du complexe CDK/CYC, la transition G2/M au cours de laquelle la PPB se forme et la progression du cycle cellulaire grâce à l'APC.





**Figure 27 : Représentation schématique de la régulation de la transition G2/M chez les plantes.** Pendant la phase G2 du cycle cellulaire, les cyclines A, B, et potentiellement D, s'associent avec des CDK de type A et B. La voie d'activation des CDK, impliquant CDKD et CDKF, contrôle l'activité des complexes CDK/CYC par phosphorylation (en jaune). L'activité des CDK pourrait être régulée négativement par phosphorylation (en orange) via la kinase WEE1. L'orthologue de CDC25, potentiellement capable de supprimer le groupement phosphate inhibiteur de CDK, reste à être identifiée. Une fois les complexes CDK/CYC actifs, ils déclenchent la transition G2/M. La sortie de la mitose nécessite la destruction des cyclines par protéolyse. Cette destruction est initiée par l'activation de l'APC. Adaptée de (Inze and De Veylder, 2006)

### 3.2.1 La transition G2/M

Les cellules sortent de la phase G2 et entrent en mitose grâce à l'activation de CDKs (Francis, 2011). Chez *Arabidopsis*, deux types de CDKs, CDK de type A (CDKA) et CDK de type B (CDKB), sont impliqués dans l'entrée en mitose (Menges et al., 2005; Van Leene et al., 2010; Francis, 2011). L'analyse de l'expression de ces CDK a montré que l'unique gène *CDKA* d'*Arabidopsis* est transcrit de manière constitutive, alors que les quatre gènes *CDK* de type B montrent un profil d'expression dépendant du cycle cellulaire, avec une accumulation de transcrits et de protéines lors de la transition G2/M (Mironov et al., 1999; Joubes et al., 2000; Francis, 2011). Chez *Arabidopsis*, les cyclines mitotiques A et B s'expriment principalement dans les tissus en division (Menges et al., 2005). Les cyclines A sont impliquées dans la progression de la phase S puis détruites pendant la transition G2/M (Bursens et al., 2000), alors que les cyclines B contrôlent la transition G2/M et sont détruites en anaphase (Hemerly et al., 1992; Ferreira et al., 1994; Menges and Murray, 2002; Menges et al., 2005). Chez *Arabidopsis*, lorsque la cycline B1 est mutée, de façon à ce qu'elle ne soit plus dégradée, la mitose se déroule normalement jusqu'en métaphase. Au delà, la mitose est complètement perturbée (Weingartner et al., 2004). La synthèse et la dégradation des cyclines sont nécessaires et très contrôlées dans le temps.

CDKA et CDKB régulent la transition G2/M en s'associant avec une cycline B par phosphorylation d'un résidu tyrosine de CDK (figure 27) (Krek and Nigg, 1991; Booher et al., 1993; Boudolf et al., 2004; Inze and De Veylder, 2006). Une fois les complexes CDK/CYC formés, ils sont régulés par des activateurs CAK (CDK-Activating Kinase) et des inhibiteurs.

Le génome d'*Arabidopsis* contient quatre gènes codant des CAK qui correspondent à des CDKs de type D et de type F (Umeda et al., 1998; Joubes et al., 2000; Vandepoele et al., 2002; Umeda et al., 2005). Ils sont responsables de la phosphorylation d'un résidu thréonine de la T-loop de CDKA (en jaune sur la figure 27) (Yamaguchi et al., 1998). Cette modification est indispensable car elle provoque un changement de conformation qui stabilise l'ouverture de la T-loop, permettant la reconnaissance et la liaison avec le substrat (Dewitte and Murray, 2003). CDKF est capable de compléter la mutation du gène *CAK* chez la levure (Umeda et al., 1998; Vandepoele et al., 2002) mais on ignore encore son rôle dans le contrôle du cycle cellulaire (Gutierrez, 2009). Lorsque les complexes CDKA/CYC et CDKB/CYC sont actifs, ils phosphorylent diverses protéines cibles qui contribuent à l'entrée en mitose.



Les complexes CDKA/CYCB phosphorylent notamment les facteurs MYB, évoqués précédemment, qui interagissent avec les éléments MSA des promoteurs de gènes nécessaires pour la progression en mitose.

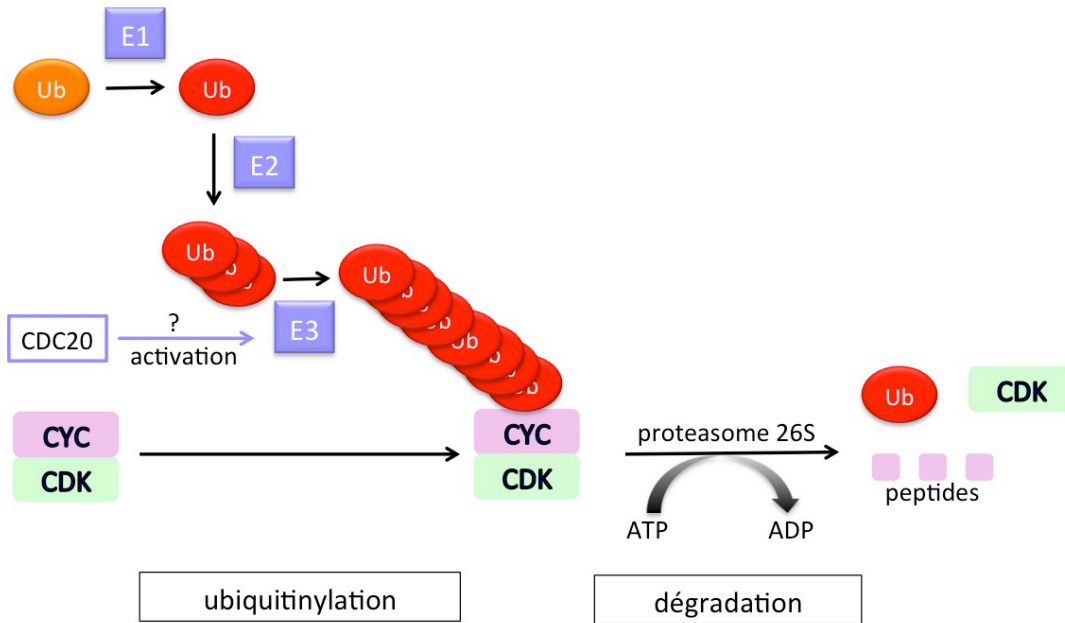
Chez les animaux, la transition G2/M est également régulée par la phosphatase CDC25 (Nurse, 1990). Un gène homologue a été identifié chez *Arabidopsis* mais les mutants associés au gène correspondant ne présentent aucun phénotype (Spadafora et al., 2011). On ignore donc si ce gène joue un rôle dans la transition G2/M (Boudolf et al., 2006).

L'activité des complexes CDK/CYC impliqués dans la transition G2/M est également régulée par des phosphorylations inhibitrices des résidus thréonine 14 et tyrosine 15 de CDK (en orange sur la figure 27). Ces phosphorylations seraient catalysées par la protéine kinase WEE1 (Russo et al., 1996; Sun et al., 1999; Sorrell et al., 2002; Vandepoele et al., 2002). WEE1 est capable d'inhiber l'activité de CDK *in vitro* (Sun et al., 1999) et il a été montré récemment que WEE1 est régulée au cours du cycle cellulaire et détruite par le protéasome 26S (Cook et al., 2013). Cette kinase pourrait donc être un des facteurs capable d'inhiber l'activité mitotique des CDK (Stals and Inze, 2001).

Ainsi, l'activité des complexes CDK/CYC est contrôlée par le taux de cyclines et de CDK, en régulant la transcription, la traduction, le turn-over des protéines, et/ou leur localisation intracellulaire, mais aussi par des phosphorylations qui activent (via CAK) ou inhibent (via WEE1) le complexe.

### 3.2.2 Progression de la mitose grâce à l'Anaphase Promoting Complex

La progression de la mitose est régulée par la destruction des cyclines grâce à l'Anaphase Promoting Complex (APC) (Glotzer et al., 1991). L'APC est une enzyme qui possède une activité ubiquitine-ligase qui lui permet d'étiqueter les protéines à dégrader avec l'ubiquitine et ainsi de les cibler spécifiquement au protéasome 26S en vue de leur dégradation (Xie et al., 2010). L'APC identifie ses protéines cibles grâce à la présence de motifs de dégradation évoqués précédemment, les D-box et KEN-box. La D-box est un motif suffisant pour induire la dégradation et peut être transposée sur d'autres protéines afin d'induire leur dégradation en phase M (Glotzer et al., 1991).



**Figure 28 : Dégradation des cyclines en métaphase/anaphase par l'APC (E3).** L'enzyme E1 active les molécules d'ubiquitine, assemblées par E2. L'APC, ou enzyme E3, serait activé par CDC20, et fixé aux cyclines. Les cyclines sont alors reconnues par le protéasome 26S, entraînant leur dégradation par protéolyse. CDK est inactivée et la cellule sort de la phase M.

La première étape de la dégradation des protéines consiste en l'activation de l'ubiquitine par des enzymes ubiquitine-activatrices E1 (figure 28). En effet, les ubiquitine-ligases ne peuvent pas utiliser directement l'ubiquitine pour la lier aux protéines cibles. L'étape suivante correspond au transfert de l'ubiquitine activée sur des enzymes de conjugaison E2, qui lient les molécules d'ubiquitine les unes aux autres permettant la formation d'une chaîne poly-ubiquitinée (figure 28). Enfin, les enzymes ubiquitine-ligases E3 lient la chaîne d'ubiquitine à la protéine cible à dégrader. L'APC est une ubiquitine-ligase E3 formée d'une dizaine de sous-unités. Une fois poly-ubiquitinées, les protéines mitotiques sont dégradées spécifiquement par le protéasome 26S (figure 28). Ce complexe multiprotéique dégrade les protéines étiquetées par au moins quatre molécules d'ubiquitine mais ne peut pas dégrader les protéines qui ne sont pas liées à l'ubiquitine (Xie et al., 2010). La régulation de la dégradation cyclique des protéines responsables de la progression du cycle cellulaire s'effectue lors de l'étape d'ubiquitylation et non au niveau du protéasome.

L'APC est lui-même soumis à régulation par des activateurs. Dans les cellules animales, les principales protéines activatrices de l'APC sont les protéines CDC20 (Cell Division Cycle 20) et CDH1 (CDC20 Homolog 1) (Lorca et al., 1998; Peters, 2002). Les complexes APC/CDC20 et APC/CDH1 ont des substrats mitotiques différents. Le complexe APC/CDC20 cible uniquement les protéines possédant un motif D-box, alors que le complexe APC/CDH1 reconnaît les motifs D-box et KEN-box (Pfleger and Kirschner, 2000; Hagting et al., 2002; Sullivan and Morgan, 2007). Les deux sous-unités activatrices de l'APC interviennent successivement dans le cycle cellulaire. À partir de la métaphase, l'APC est activé par la protéine CDC20. En anaphase, CDC20, qui possède une KEN-box, est à son tour ubiquitylée et dégradée par le complexe APC/CDH1. À partir de l'anaphase, la protéine CDH1 active à son tour l'APC en fin de phase M et en phase G1 (Hagting et al., 2002; Peters, 2006; Pesin and Orr-Weaver, 2008). En fin de phase G1, CDH1 est de nouveau phosphorylée par les complexes CDK/CYC et se sépare de l'APC. L'APC est alors inactivé et le restera durant toute l'interphase, il sera réactivé lors de la mitose du cycle de division suivant.



Chez *Arabidopsis*, cinq gènes codent des homologues de *CDC20* et trois codent des homologues de *CDH1* (*CCS52* chez les plantes). Les mutations des sous-unités de l'APC sont létales (Heyman and De Veylder, 2012) et un RNAi dirigé contre les deux gènes *AtCDC20-1* et *AtCDC20-2* présente un phénotype de plantes naines (Kevei et al., 2011), confirmant le rôle essentiel de la régulation du cycle cellulaire dans le développement de la plante.

### 3.3 Localisation des acteurs du cycle cellulaire à la PPB

Plusieurs protéines essentielles du cycle cellulaire ont été localisées à la PPB et suggèrent l'existence d'un lien entre ce réseau de microtubules et la progression du cycle cellulaire.

#### 3.3.1 CDKA;1, CYCA1;1 et CYCB1;2 sont localisées à la PPB

CDKA;1 est localisée à la PPB mature en fin de phase G2 (Mineyuki et al., 1991a; Colasanti et al., 1993; Mews et al., 1997; Stals et al., 1997; Weingartner et al., 2001; Boruc et al., 2010). L'injection du complexe actif CDKA;1/CYCB dans des cellules végétales, avant l'entrée en mitose, accélère la disparition de la PPB et la rupture de l'enveloppe nucléaire mais n'affecte pas les autres réseaux de microtubules (Hush et al., 1996). De plus, la disparition de la PPB est retardée lorsque l'activité de CDKA;1 est inhibée par traitement chimique (Binarova et al., 1998). CYCB1;2 est localisée à la PPB mature chez le maïs (Mews et al., 1997). Cette localisation coïncide avec celle de CDKA;1 car l'association de CYCB1;2 avec la PPB a lieu peu avant la dépolymérisation de l'anneau. Ces données suggèrent que CDKA;1 formerait un complexe avec CYCB1;2 et serait impliquée dans la dépolymérisation de la PPB (Weingartner et al., 2001).

CYCA1;1 a également été localisée à la PPB chez le maïs, dans les cellules BY-2 et chez *Arabidopsis* (Mews et al., 1997; Boruc et al., 2010). Elle interagit avec CDKA;1 dans les cellules de jeunes feuilles de tabac (Boruc et al., 2010). Comme ces deux protéines sont présentes à la PPB, il est possible que le complexe CDKA;1/CYCA1;1 soit formé à la PPB lors de la transition G2/M. L'ensemble de ces données suggèrent la présence de complexes CDK/CYC actifs à la PPB.

Il est intéressant de noter qu'un allèle hypomorphe *cdka;1* provoque des défauts de plans de division dans la pointe racinaire (Magalie Uyttewaal, résultats non publiés) et des défauts de cytokinèse dans l'épiderme des feuilles (Borowska-Wykret et al., 2013). Le





recrutement de CDKA;1 à la PPB pourrait être nécessaire à la régulation, par phosphorylation, de protéines régulant la dynamique et l'organisation des microtubules. Il est également possible que la phosphorylation de composants de la PPB par CDKA;1 soit indispensable à l'identité de la CDZ. Une cible potentielle de CDKA;1 pourrait être TON1, capable d'interagir avec CDKA;1 en TAP-Tag (Van Leene et al., 2007) et qui possède un site consensus de phosphorylation par CDK.

La localisation de complexes CDK/CYC à la PPB rappelle le rôle joué par le centrosome des cellules animales lors de la division cellulaire. Chez les cellules animales, lors de la transition G2/M, CK1, l'homologue de CDKA, s'associe avec une cycline B1. L'activation du complexe CDK1/CYCB1 est l'événement clé nécessaire pour l'initiation de la mitose (Nurse, 1990). Dans les cellules en interphase, CDK1/CYC1 s'accumule dans le cytoplasme (Pines and Hunter, 1991; Bailly et al., 1992; Hagting et al., 1998; Toyoshima et al., 1998) puis le complexe actif CDK1/CYC1 est localisé au centrosome en prophase. Cette localisation est indispensable à la progression de la phase M (Li et al., 1997). Le centrosome fonctionnerait comme un site d'intégration des protéines qui déclenchent la mitose.

### 3.3.2 D'autres régulateurs du cycle cellulaire sont localisés à la PPB

Deux sous-unités de l'APC sont localisées à la PPB : CDH-1 related protéine, ou CCS52A2, capable d'interagir avec plusieurs cyclines chez *Arabidopsis* (Fulop et al., 2005), et RAE1 (Lee et al., 2009; Boruc et al., 2010). L'ubiquitinylation de protéines à la PPB pourrait participer à la régulation temporelle des protéines associées à la PPB et dégradées lors de la métaphase. La présence de D-box chez plusieurs protéines associées aux microtubules et impliquées dans leur organisation dynamique, comme les MAP65, suggère que le cytosquelette pourrait être régulé par le cycle cellulaire (Hussey et al., 2002).

KRP4, Kip-related protein 4, est un inhibiteur de CDK de la famille des KRP, qui possède un domaine de liaison aux CDK. (Wang et al., 1997; De Veylder et al., 2001). Il est capable d'interagir avec CDKA;1 mais aussi avec plusieurs cyclines de type A et D (Zhou et al., 2002; Van Leene et al., 2007; Boruc et al., 2010). KRP4 pourrait être un inhibiteur clé des complexes CDK/CYC localisé à la PPB. Il permettrait de conserver les complexes inactifs jusqu'au moment de la dépolymérisation de la PPB. CKS2 est une protéine structurale du complexe CDK/CYC qui a été localisé à la PPB chez *Arabidopsis* et dans les cellules BY-2



(Boruc et al., 2010). Elle interagit avec CDKA;1 et avec KRP4 chez *Arabidopsis* (Boruc et al., 2010).

Toutes ces observations suggèrent l'existence d'un lien, conservé au cours de l'évolution, entre la machinerie du cycle cellulaire et l'organisation du cytosquelette cortical. Les complexes CDK/CYC participeraient au contrôle de l'organisation des microtubules et potentiellement à la détermination du plan de division chez les plantes. La PPB servirait de point de rencontre entre les composants du cycle cellulaire et les marqueurs de la CDZ afin d'assurer le contrôle temporel et spatial de la division cellulaire.

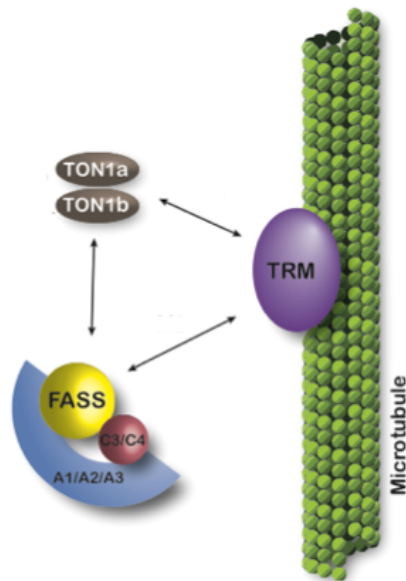
## 4 Contexte et objectifs de la thèse

On ignore encore beaucoup de choses sur toutes les étapes de la formation/dépolymérisation de la PPB ainsi que sur son rôle et beaucoup de questions restent en suspens comme par exemple :

(1) La détermination prémitotique du plan de division : comment la PPB intègre-t-elle les différents signaux que nous avons étudiés dans cette introduction (hormones, facteurs de transcription, géométrie de la cellule) pour fixer le plan de division avant la mitose lors de la transition G2/M ? Les microtubules d'interphase jouent-ils un rôle dans le positionnement de la PPB ?

(2) La formation et la maturation de la PPB: quels sont les facteurs moléculaires agissant sur la dynamique des microtubules et responsables de la réorganisation du réseau d'interphase en PPB, et de la maturation de la PPB au fur et à mesure de la progression en G2/M ? Comment les protéines localisées à la PPB sont-elles recrutées ? Certaines protéines sont-elles recrutées au futur site de division avant la formation de la PPB ?

(3) La dépolymérisation de la PPB : comment est orchestrée la dépolymérisation de la PPB après la rupture de l'enveloppe nucléaire ? Des signaux sont-ils libérés du noyau provoquant la dépolymérisation des microtubules de la PPB ? Des acteurs du cycle cellulaire sont-ils impliqués dans cette dépolymérisation ?



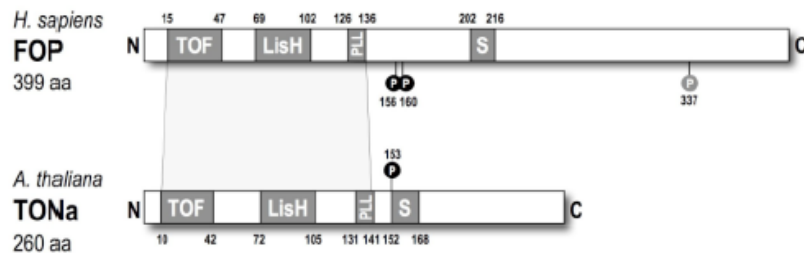
**Figure 29 : Le complexe TTP.** Le complexe TTP est composé des protéines TON1a et TON1b (en brun), d'un complexe phosphatase PP2A, dont FASS est la sous-unité régulatrice (en jaune), PP2A-A1, A2 et A3 sont les sous-unités structurales (en bleu) et PP2A-C3 et C4 sont les sous-unités catalytiques (en rouge), et des protéines TRMs, capables de se lier aux microtubules. Les flèches représentent les interactions identifiées par TAP-TAG, crible double-hybride et BiFC. Chaque partenaire est capable d'interagir avec les autres composants du complexe TTP.

L'équipe au sein de laquelle j'ai effectuée ma thèse s'intitule « Contrôle spatial de la division chez les plantes » (SPACE). Les objectifs de l'équipe visent à déterminer les voies de régulation et les interactions moléculaires mise en jeu lors de la formation de la PPB, en particulier en lien avec le cycle cellulaire, et leur signification dans la morphogénèse des plantes supérieures et son évolution.

Historiquement, les travaux de l'équipe SPACE se sont attachés à caractériser les mutants « *tonneau1* » (*ton1*) et « *fass* » qui présentent de profondes altérations morphologiques et au niveau cellulaire, d'importants défauts de division et d'élongation (Mayer et al., 1991; Torres-Ruiz and Jürgens, 1994; Traas et al., 1995a). Les réseaux de microtubules corticaux dans ces mutants sont fortement perturbés, tant en interphase qu'à l'entrée de la division. L'anneau de préprophase est absent, ce qui conduit à un positionnement incorrect des plans de division et à une expansion polarisée anormale. L'équipe SPACE a isolé et caractérisé les gènes *TON1* et *FASS* et, grâce à des approches pluridisciplinaires, a mis en évidence un réseau de protéines végétales, le complexe TTP (*TON1*, *TRM*, *PP2A*), impliqué dans le contrôle spatial de la division cellulaire et l'organisation des microtubules corticaux d'interphase (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008; Drevensek et al., 2012; Spinner et al., 2013). L'équipe a également démontré la persistance de ce mécanisme à travers 500 millions d'années d'évolution des plantes terrestres (Spinner et al., 2010).

#### 4.1 TON1

Le mutant *ton1* est représenté par un seul allèle provoqué par la délétion partielle de deux gènes fortement homologues et organisés en tandem, les gènes *TON1a* et *TON1b* (Nacry et al., 1998; Azimzadeh et al., 2008). Le mutant *ton1* est donc un double mutant. Ce mutant peut être complémenté par *TON1a* ou par *TON1b*. De plus, *TON1a* et *TON1b* ont le même patron d'expression constitutif, montrant peu ou pas de variations pendant le développement ou au cours du cycle cellulaire. Jusqu'à présent, les gènes *TON1a* et *TON1b* était donc considérés comme fonctionnellement redondants. Mais récemment, un nouvel allèle *ton1a*, provoquant l'expression d'une protéine tronquée, a été identifié (Kirik et al., 2012). L'insertion de cette nouvelle mutation dans un allèle faible de *fass* provoque une aggravation du phénotype *fass*. Ces nouveaux résultats suggèrent que la redondance entre les gènes *TON1a* et *TON1b* n'est pas totale.



**Figure 30 : Organisation de TON1 et de FOP.** Le domaine N-terminal de ces protéines est fortement similaire et contient des motifs conservés dont le motif de dimérisation LisH/PLL, un domaine conservé TOF (de fonction inconnue), une courte région riche en sérine (S), et des sites de phosphorylation de résidus sérine vers la position 150-160. FOP possède de nombreux sites de phosphorylation thréonine (<http://www.phosphosite.org>). La région de similarité de séquences est indiquée en gris clair. D’après (Azimzadeh et al., 2008).

Les gènes *TON1a* et *TON1b* codent des petites protéines de 29 kDa partageant 85% d'identité (Azimzadeh et al., 2008). Des ESTs de TON1 ont été identifiées chez les Angiospermes et les Gymnospermes et montrent toutes une forte identité de séquence avec TON1 sur toute leur longueur. Plusieurs protéines partiellement similaires à TON1 ont été identifiées, des protistes aux vertébrés. La région N-terminale de TON1 est similaire à la région N-terminale de protéines humaines : FOP (pour FGFR1 Oncogene Partner) et FOR20, deux protéines apparentées impliquées dans le cycle cellulaire et la ciliogénèse, (Popovici et al., 1999; Sedjai et al., 2010) et OFD1 (pour Oral Facial Digital 1) (Ferrante et al., 2001). Ces protéines sont localisées au centrosome des cellules animales (Andersen et al., 2003; Romio et al., 2003; Yan et al., 2006; Sedjai et al., 2010). Des alignements multiples et l'analyse de motifs de ces protéines ont révélé trois régions de forte conservation de séquence (figure 30) : un motif jusqu'à présent non-identifié de 33 résidus dans la région N-terminale (motif TOF pour TON1, OFD1 et FOP), un motif de dimérisation LisH de 34 résidus (Emes and Ponting, 2001) et une région contenant les résidus conservés PLL, qui, d'après les données structurales (Mikolajka et al., 2006), participerait, avec le motif LisH, à la dimérisation de la protéine. La dimérisation de TON1 est essentielle à sa fonction. En effet, la version monomérique de TON1 obtenue par mutagénèse ne complémente pas *ton1* et le phénotype observé est celui d'un mutant *ton1*. De plus, les interactions de TON1 monomérique avec FASS et TRM sont perturbées (Duroc, données non publiées). Les mutations de la protéine OFD1 provoquent des malformations de la bouche, du visage et des doigts chez l'homme. Les études génétiques ont montré que plusieurs de ces mutations sont situées dans la région N-terminale de la protéine, dont certaines dans le motif LisH. Comme pour TON1, la dimérisation de la protéine OFD1 serait donc importante pour sa fonction. Les régions N-terminales de TON1 et de FOP contiennent également un site de phosphorylation proche de la région de dimérisation LisH/PLL (Benschop et al., 2007) et une courte région riche en sérine (figure 30). FOP est phosphorylée au cours du cycle cellulaire dans les cellules humaines et reste localisée au centrosome pendant la division (Yan et al., 2006). TON1 est localisée à la PPB et au réseau d'interphase mais n'est pas associée aux structures mitotiques (fuseau et phragmoplaste).





Il n'existe pas de gène codant une protéine similaire sur toute la longueur de TON1 dans les séquences d'algues vertes disponibles, et la protéine FOP de *Chlamydomonas* est à égale distance de FOP et des protéines TON1 des plantes terrestres. L'apparition de protéines TON1 typiques semble donc corrélée à l'acquisition de la PPB chez les Embryophytes. Dans les séquences génomiques disponibles, la position du premier intron est strictement conservée entre les protéines des plantes et les protéines animales contenant le motif TOF, démontrant une origine évolutive commune.

Des interactions entre TON1 et les deux centrines codées par le génome d'*Arabidopsis* ont été identifiées (Azimzadeh et al., 2008). Les centrines sont des protéines proches de la calmoduline et contenant quatre domaines EF-Hand liant chacun un ion calcium. Elles sont associées aux centrosomes dans les cellules animales. Ce sont des composants essentiels des centres organisateurs de microtubules (Salisbury, 1995). Chez les eucaryotes, les centrines jouent un rôle dans la dynamique des centrosomes, en contrôlant la cohésion des structures centrosomales et la duplication des centrioles (Salisbury, 1995). Les centrines sont présentes dans tout le règne végétal, des algues aux Angiospermes. Les centrines sont associés à la membrane chez les plantes (DelVecchio et al., 1997; Blackman et al., 1999; Stoppin-Mellet et al., 1999; Harper et al., 2000). Aucune fonction n'a été révélée pour les centrines de plantes mis à part l'implication d'une des deux centrines d'*Arabidopsis* dans les processus de réparation de l'ADN. L'interaction détectée entre la centrine représente un élément de plus liant TON1a et TON1b au centrosome des cellules animales.

TON1 interagit avec CDKA;1 en TAP-TAG (Van Leene et al., 2007) et en BiFC (Duroc, données non publiées). De plus, TON1 est capable de recruter CDKA;1 aux microtubules (Duroc, données non publiées) et la localisation de CDKA;1 à la PPB suggère que TON1 pourrait être responsable de son recrutement (Weingartner et al., 2001). Il a également été montré que TON1 peut être phosphorylée *in vitro* par le complexe CDKB2/CYCB1 (Schnittger, données non publiées). Ces données établissent un lien direct entre la machinerie du cycle cellulaire et l'organisation du cytosquelette cortical lors de la transition G2/M.



TON1 est capable d'interagir directement avec les protéines TRMs. Cela a été montré chez la levure en double-hybride et dans les feuilles de tabac par BiFC (Drevensek et al., 2012; Spinner et al., 2013). Ces expériences ont montré que le domaine N-terminal de TON1 est impliqué dans l'interaction avec les protéines TRMs. De plus, TON1 interagit directement avec FASS en double-hybride chez la levure. Ces interactions ont toutes été confirmées par TAP-TAG (Spinner et al., 2013).

## 4.2 FASS/PP2A

Les mutants *fass* sont représentés par plusieurs allèles présentant une gradation de phénotype et issus de mutagenèse chimique, de mutagenèse par irradiation ou de mutagenèse insertionnelle. Pour tous les allèles disponibles, les cellules se divisent sans former d'anneau de préprophase et il semble que l'élongation soit plus ou moins affectée dans cette série allélique.

FASS est une protéine cytoplasmique localisée à la PPB en interphase et qui persiste à la CDZ jusqu'en métaphase. FASS code une sous-unité régulatrice de complexe phosphatase PP2A (Camilleri et al., 2002; Spinner et al., 2013). La phosphatase PP2A est l'une des phosphatases à spécificité Sérine/Thréonine les plus abondantes chez les plantes. Les phosphatases PP2A assurent de multiples fonctions tant dans la signalisation cellulaire que durant la mitose ou encore dans le métabolisme cellulaire.

Les PP2A sont des enzymes trimériques composées d'une sous-unité catalytique (PP2A-C), d'une sous-unité régulatrice (PP2A-B) contrôlant la spécificité du substrat et/ou la localisation subcellulaire de l'enzyme, et d'une sous-unité structurale (PP2A-A) permettant l'interaction entre sous-unités B et sous-unité C (Janssens et al., 2008). Des interactions directes entre FASS et des sous-unités A et C de PP2A ont été mises en évidence par BiFC et dans le système double hybride chez la levure.

Chez *Arabidopsis*, il existe trois isoformes de sous-unité structurale qui semblent toutes être impliquées dans la fonction du complexe TTP (Spinner et al., 2013). Les trois isoformes co-purifient avec le complexe TTP en TAP-TAG. Les mutations *pp2a-a1*, *-a2* ou *-a3* aggravent toutes le phénotype d'un allèle hypomorphe de *fass* et entraînent des défauts d'orientation de plans de division. Bien que la protéine PP2A-A1 ait une localisation essentiellement cytoplasmique et périnucléaire, il y a un enrichissement de cette protéine au cortex à l'entrée en mitose et qui coïncide avec la PPB. Enfin, des expériences



d'immunolocalisation de la tubuline ont montré que la PPB est absente chez les doubles mutants *pp2a-a1 pp2a-a2* ou *pp2a-a1 pp2a-a3*, et comme chez les mutants *ton1* et *fass* en préprophase, les microtubules s'accumulent autour du noyau.

Il existe cinq isoformes de sous-unité catalytique chez *Arabidopsis* dont deux seulement (PP2A-C3 et PP2A-C4) co-purifient avec FASS dans les expériences de TAP-TAG. Le phénotype du double mutant *pp2a-c3 pp2a-c4* a récemment été publié par une équipe espagnole : alors que les simples mutants *pp2a-c3* et *pp2a-c4* ne présentent pas d'importants défauts morphologiques, le double mutant *pp2a-c3 pp2a-c4* est fortement altéré et ressemble de façon frappante à un allèle nul de *fass* (Ballesteros et al., 2013).

Toutes ces données suggèrent donc fortement que FASS interagit avec les trois sous-unités structurales d'*Arabidopsis* et avec deux des sous-unités catalytiques PP2A-C présentes chez *Arabidopsis* et que l'activité phosphatase du complexe TTP/PP2A est nécessaire à la formation de la PPB et la détermination du plan de division (Spinner et al., 2013). De plus, des expériences de purification de complexe par TAP-TAG sur des cultures cellulaires d'*Arabidopsis* ont révélé que le complexe phosphatase FASS/PP2A est très robuste et co-purifie toujours avec les protéines TON1 et TRM.

On ignore encore les cibles de l'activité phosphatase de ce complexe PP2A. Un candidat évident à tester est la phosphoprotéine TON1 (Benschop et al., 2007) puisqu'elle interagit et co-localise avec FASS à la PPB et que la mutation *ton1* provoque le même phénotype que celle de *fass* (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008). L'importance des événements de phosphorylation pour la formation de la PPB est connue depuis de nombreuses années : il a, par exemple, été montré dans des cultures de cellules de luzerne, qu'après traitement avec un inhibiteur de PP2A tel que l'endothall, les microtubules corticaux sont désorganisés et la formation des PPB est affectée (Ayaydin et al., 2000). Après traitement avec un autre inhibiteur de PP2A, la cantharidine, les microtubules corticaux des cellules de racines de maïs sont dépolymérisés, alors que l'application d'inhibiteurs de kinase provoque la stabilisation des microtubules (Tian et al., 2004). La phosphorylation/déphosphorylation des protéines jouerait ainsi un rôle crucial dans l'organisation et la dynamique des microtubules.



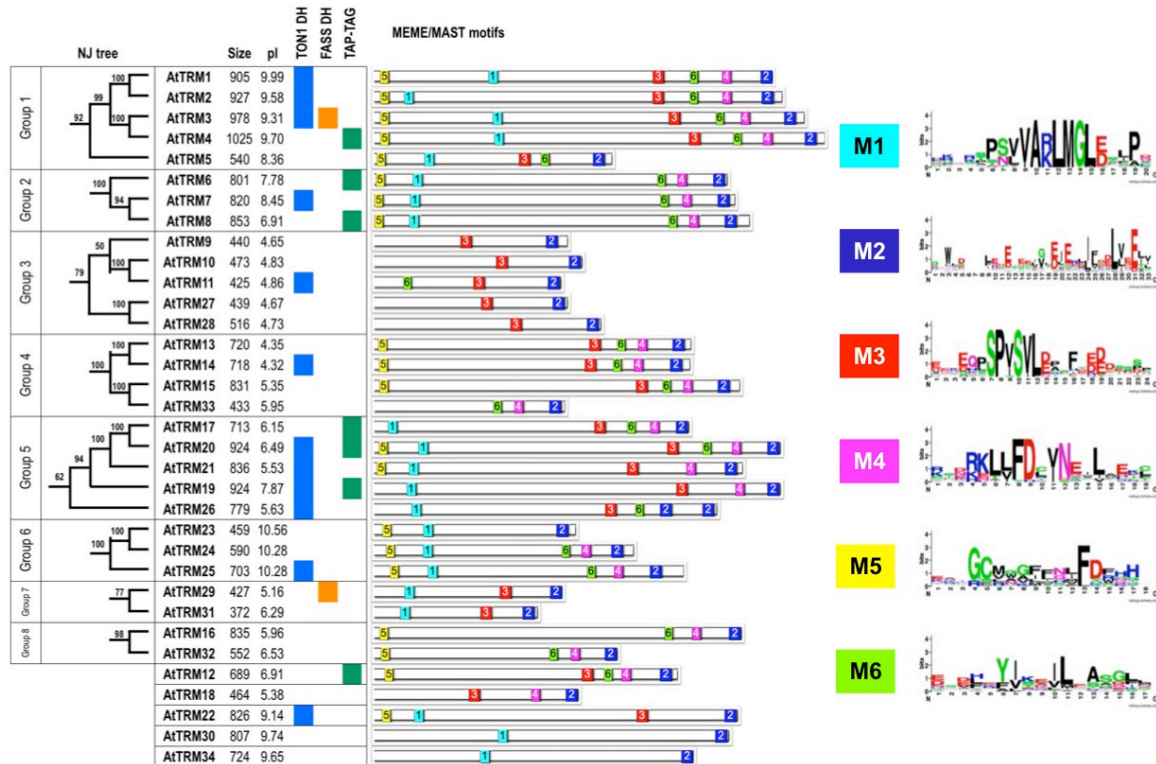
Récemment, il a été montré que FASS est impliquée dans la régulation de la géométrie de nucléation des microtubules (Kirik et al., 2012). Chez le mutant *fass*, la nucléation des microtubules est beaucoup moins fréquente que chez le sauvage et le mode de nucléation prédominant n'est pas la nucléation branchée mais la nucléation parallèle. FASS serait impliquée dans l'augmentation de la fréquence de nucléation branchée et diminuerait la fréquence de nucléation parallèle.

FASS est fortement conservée chez les eucaryotes et possède de véritables homologues chez *C. elegans* et chez l'homme, respectivement RSA-1 et G5PR (ou PPP2R3C). RSA-1 recrute les complexes PP2A au centrosome, où il régule la formation du fuseau et la croissance des microtubules (Schlaitz et al., 2007). La fonction de G5PR est encore inconnue.

### 4.3 La famille des protéines TRM

La famille des protéines TRM (**TON1 Recruiting Motif**) a été identifiée par crible double-hybride en utilisant TON1b comme appât (Drevensek et al., 2012). La famille des TRMs est composée de 34 membres et est caractérisée par la présence de six motifs au sein des séquences protéiques (figure 31). Ces motifs ont été nommés M1 à M6, M1 étant le motif le plus conservé et M6 le moins conservé. Ils sont composés de 17 à 25 acides aminés et sont toujours disposés dans le même ordre le long de la séquence protéique (M5-M1-M3-M6-M4-M2). Chaque protéine TRM contient entre deux et six de ces motifs et toutes contiennent en position C-terminale le motif M2 qui est impliqué dans l'interaction avec TON1. Deux protéines TRM ont également été identifiées lors d'un crible double-hybride utilisant FASS comme appât. Le motif M3 est impliqué dans l'interaction avec FASS. Il est présent dans la majorité des protéines de la famille. Les autres motifs, non encore caractérisés, pourraient être impliqués dans des interactions avec d'autres partenaires moléculaires. En dehors ces motifs partagés, certaines TRMs partagent des homologies de séquences entre elles, ce qui a permis de définir huit groupes de deux à cinq membres. Il n'y a aucune similarité de séquence en dehors des motifs conservés entre deux protéines TRM appartenant à des groupes différents. Les TRMs co-purifient avec TON1 et FASS dans les expériences de TAP-TAG et lorsqu'une protéine TRM, la protéine TRM19, a été utilisée comme appât, les autres sous-unités du complexe TTP ont été isolées (TON1, FASS, PP2A-A et PP2A-C).



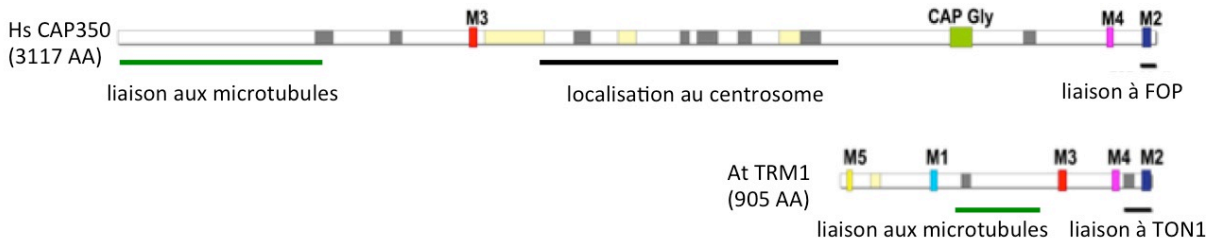


**Figure 31 : La famille des 34 protéines TRMs est définie par six motifs.** Les TRMs sont regroupées en différents groupes (notés de 1 à 8 à gauche du tableau), à l'exception de quelques unes ne partageant pas de similarités notables avec d'autres protéines de la famille. Certaines protéines ont été identifiées par crible double-hybride en utilisant TON1 (carrés bleus) et FASS (carrés oranges) comme appât, et par TAP-TAG (carrés verts). Les motifs présents chez les TRMs sont présentés à droite du tableau. Toutes les TRMs possèdent le motif M2 (en bleu) et la plupart d'entre elles possèdent le motif M3 (en rouge).

Environ la moitié des protéines TRMs possèdent un grand domaine basique central, impliqué, chez la protéine TRM1, dans l'interaction avec les microtubules. Il a été montré que TRM1 est une MAP se liant aux microtubules corticaux d'interphase chez *Arabidopsis*. Toutes les protéines TRMs possédant un domaine basique et qui ont été testées à ce jour (c'est-à-dire quatre protéines) sont capables de se lier aux microtubules (Drevensek et al., 2012). De plus, ces protéines sont capables de recruter TON1 via le motif M2, et plus largement le complexe TTP, aux microtubules (Drevensek et al., 2012; Spinner et al., 2013).

La famille des TRMs est spécifique des plantes terrestres (Drevensek et al., 2012). 34 TRMs ont été identifiées chez le riz, 19 chez *Physcomitrella*. Certains motifs TRM sont conservés chez une protéine de *Chlamydomonas*. On retrouve également les motifs M2, M3 et M4, dans la protéine centrosomale humaine CAP350, une protéine de 350kDa qui recrute FOP au centrosome (figure 32) (Yan et al., 2006). Ces trois motifs sont localisés dans le même ordre que chez les TRMs. De plus, le motif M2 en position C-terminale de CAP350, a été montré nécessaire et suffisant au recrutement de FOP au centrosome, rappelant ainsi le recrutement de TON1 aux microtubules par le motif M2 des TRMs (Yan et al., 2006; Drevensek et al., 2012). Ainsi, les partenaires du complexe TTP, TON1, FASS et TRMs, montrent des homologies de séquences plus ou moins étendues avec des protéines présentes au centrosome. De plus, ce sont non seulement les séquences qui sont conservées mais également les interactions entre partenaires. En effet, un complexe comprenant FOP, G5PR et CAP350 a été identifié chez l'homme par une approche protéomique (Hutchins et al., 2010). Les résultats de l'équipe SPACE mettent ainsi en évidence des arguments convergents pour la présence de composants centrosomaux au cortex végétal. Ces résultats représentent la première indication d'un lien fonctionnel et évolutif entre centrosomes animaux et cytosquelette végétal, en dehors des aspects de nucléation des microtubules. Ces réseaux moléculaires pourraient, en partie ou en totalité, représenter des mécanismes anciens communs aux eucaryotes, conservés au cours de la divergence entre règnes, et réalloués au cortex dans les cellules végétales.

Jusqu'ici, le sous-groupe 1 (TRM1 à 5), avec la protéine TRM1 prise comme archétype, a été le plus étudié par l'équipe (Drevensek et al., 2012). *TRM1* et *TRM2* sont également appelées respectivement *LONGIFOLIA2* et *LONGIFOLIA1* en raison du phénotype



**Figure 32 : Organisation de CAP350 et de TRM1.** La protéine CAP350 possède les motifs M2, M3 et M4 des protéines TRMs. Dans la représentation schématique de CAP350, les domaines gris représentent les régions coiled-coil. CAP350 possède un domaine de localisation au centrosome (en noir). CAP350 et TRM1 possèdent un domaine de liaison aux microtubules (en vert) ainsi qu'un domaine d'interaction avec, respectivement FOP et TON1, en N-terminal et qui inclut le motif M2.

de surexpression de ces deux protéines produisant des plantules à feuilles allongées (Lee et al., 2006). Ces défauts d'élongation sont également visibles dans les siliques et les fleurs.

L'équipe SPACE a réalisé une caractérisation fonctionnelle de ce sous-groupe grâce à une analyse génétique de différentes combinaisons de mutants, du simple au quintuple mutant. Le quintuple mutant est plus trapu que la plante sauvage, les feuilles sont plus rondes, les siliques plus courtes mais il ne ressemble en aucun cas aux mutants *ton1* et *fass*. Ce sous-groupe *TRM1-5* ne semble affecter que l'élongation cellulaire (Lee et al., 2006; Drevensek et al., 2012) (données non publiées).

#### 4.4 Objectifs de la thèse

Le phénotype pléiotrope des mutants *ton1* et *fass*, ainsi que l'expression constitutive des gènes *FASS* et *TON1* et leur localisation en interphase et lors de la transition G2/M, suggèrent que ces protéines sont non seulement impliquées dans la formation de la PPB lors de l'entrée en mitose, mais également en interphase dans l'organisation du cytosquelette cortical, et dans d'autres processus comme la réponse au gravitropisme comme l'a révélé la caractérisation fonctionnelle du gène *TON1* de la mousse *Physcomitrella patens* (Spinner et al., 2010).

Les différents partenaires du complexe TTP existent sous plusieurs isoformes, à l'exception de *FASS*. En effet, le génome d'*Arabidopsis* code deux protéines *TON1*, trois sous-unités structurales *PP2A-A*, cinq sous-unités catalytiques *PP2A-C* (dont deux semblent spécifiquement impliquées dans le complexe TTP) et 34 protéines *TRMs*. Les gènes *TRMs* ont également des patrons d'expression très différents comme l'indiquent les données transcriptomiques disponibles (Zimmermann et al., 2004). Certains gènes *TRMs* sont exprimés pendant tout le développement de la plante, alors que d'autres sont induits à des stades spécifiques ou dans des tissus spécialisés. Au sein du complexe, ce sont donc les protéines *TRM* qui montrent la plus grande diversité. L'hypothèse de travail de l'équipe est que l'hétérogénéité de séquences et de patrons d'expression au sein de la famille *TRM* reflète la diversité de fonctions du complexe TTP et que les protéines *TRMs* représentent des adaptateurs moléculaires nécessaires au recrutement du complexe TTP vers différentes structures ou compartiments cellulaires, et ce, en relation avec le cycle cellulaire.



Mon sujet de thèse consistait à identifier, si elles existent, les TRMs spécifiquement impliquées dans la formation de la PPB. Pour cela, j'ai analysé les données de transcriptome disponibles afin d'identifier les gènes *TRMs* s'exprimant préférentiellement en début de mitose et j'ai entrepris leur caractérisation fonctionnelle.

Tous les composants du complexe TTP possédant des homologues chez l'homme, j'ai également choisi, comme projet annexe, d'explorer la conservation des interactions que nous avons détectées dans le complexe TTP au sein du complexe de protéines humaines.



Rôle des protéines TRM6, TRM7 et TRM8  
dans la formation de l'anneau de  
préprophase chez *Arabidopsis thaliana*

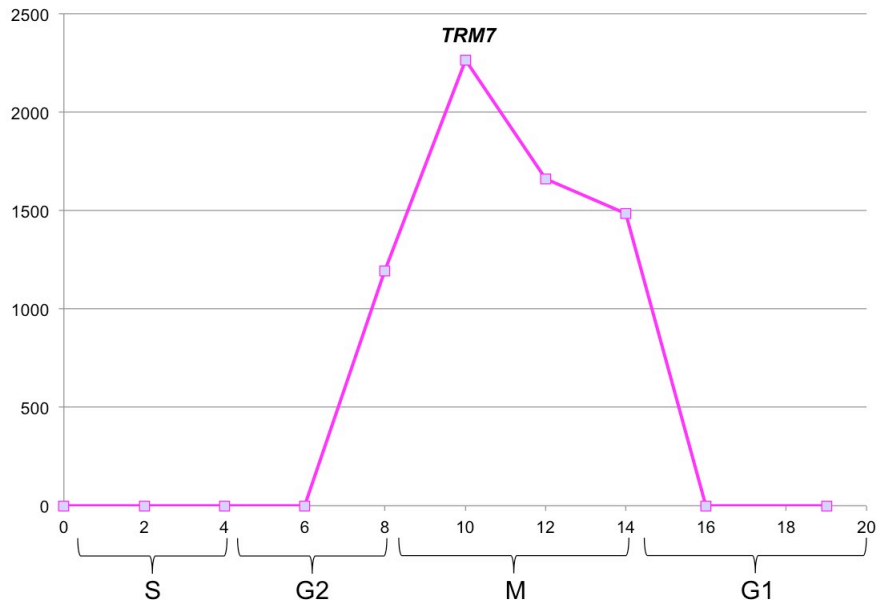
---





Dans l'article qui suit, je présente l'étude de l'expression du gène *TRM7* et la caractérisation fonctionnelle du sous-groupe de protéines TRM6-TRM7-TRM8. Ce travail a constitué la plus grande partie de ma thèse.

J'ai choisi de présenter l'ensemble de ces résultats dans un article. Cependant, quelques analyses supplémentaires, indiquées dans le corps de l'article, seront réalisées avant sa soumission.



**Figure 1: Expression profile of *TRM7* expression in synchronized cell culture.** Absolute expression levels of *TRM7* were obtained from aphidicholine synchronization of cell culture (Menges et al., 2003). Time after aphidicolin release is given in hours.

# Normal morphogenesis in plants lacking PPB

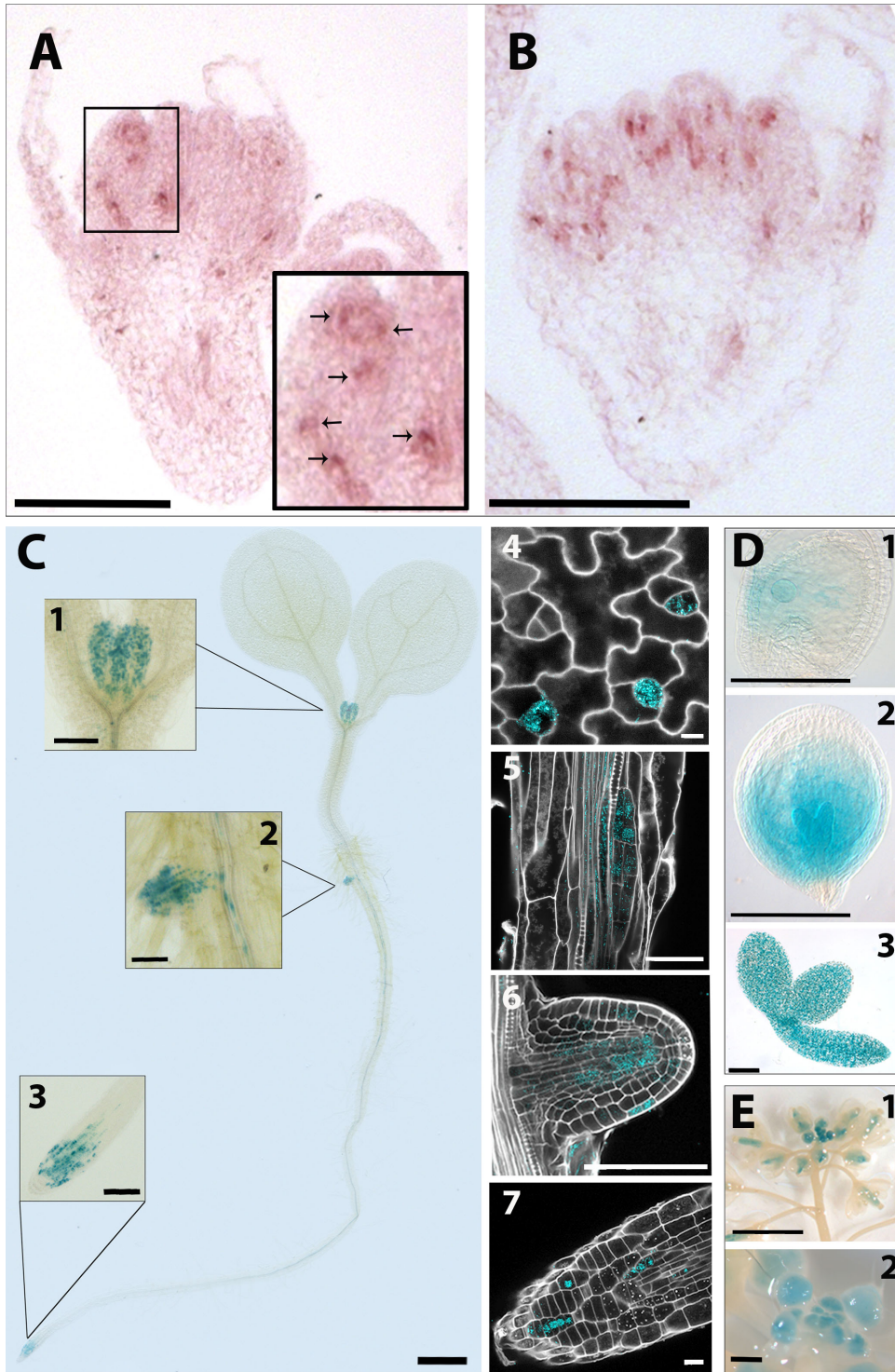
Estelle Schaefer, Katia Belcram, Magali Goussot, Yann Duroc, Magalie Uyttewaal, David Bouchez and Martine Pastuglia

INRA, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) UMR1318, Saclay Plant Science, 78000 Versailles, France

AgroParisTech, Institut Jean-Pierre Bourgin (IJPB) UMR1318, Saclay Plant Science, 78000 Versailles, France

## **Abstract**

In the absence of cell migration, the orientation of cell division is crucial for cellular organization in plant tissues. In land plants, the division plane position is predicted during the G2 to M phase transition by the preprophase band (PPB), a transient and premitotic cortical ring of microtubules. The molecular pathway leading to PPB formation is still largely unknown although the TTP protein complex has recently been shown to be required for this process. Here we describe the characterization of one isoform of the TTP complex, the TONNEAU1-recruiting motif 7 (TRM7). We show that TRM7 is specifically expressed at the G2/M transition where it localizes to PPB. Consistent with the localization data, analysis of *Arabidopsis trm7* mutant shows abnormal division planes and PPB formation defects in dividing tissues. Further analysis of the subgroup TRM6-TRM7-TRM8 reveals an almost complete absence of PPBs in dividing cells of the triple mutant *trm6 trm7 trm8*. Surprisingly and contrary to others *ttp* mutants lacking PPBs, the overall phenotype of *trm6 trm7 trm8* mutant is only slightly affected, contradicting the well established view that PPB is an obligate determinant of division plane positioning. Taken together, these data suggest that we have uncoupled the role of the TTP in interphase from its role in mitosis by isolating specific mitotic isoforms. In addition, this triple mutant provides an invaluable material to reevaluate the role of the PPB in division plane determination in plant cells.



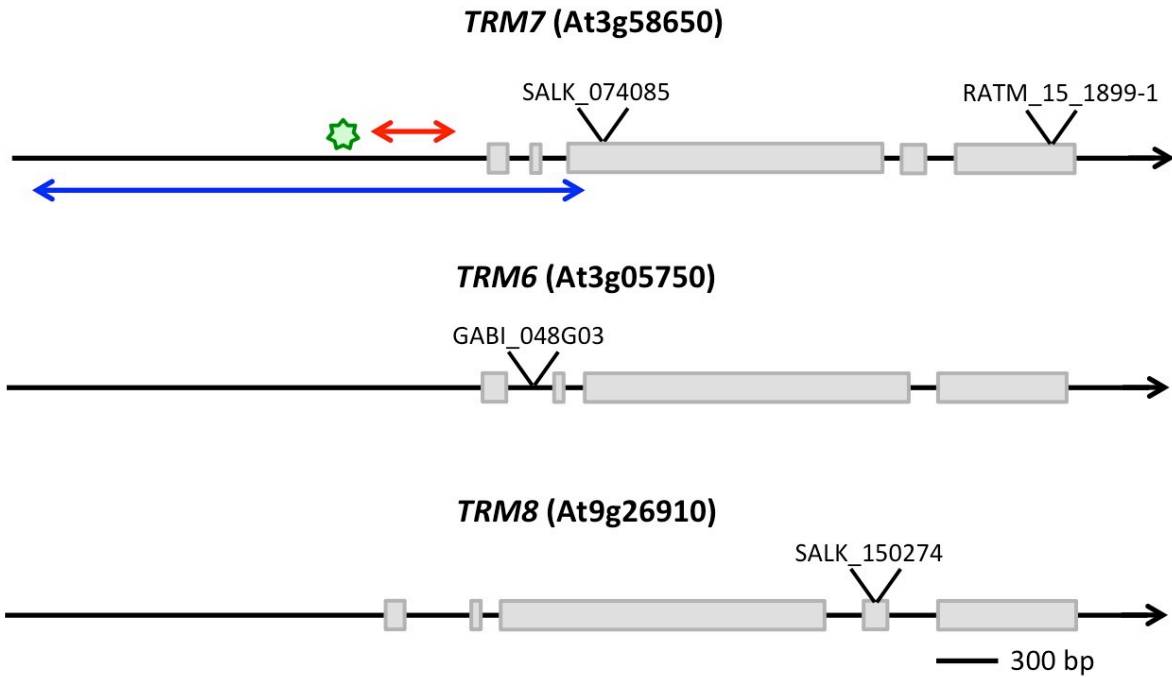
**Figure 2: Analysis of *TRM7* expression pattern.**

A-B: *In situ* hybridization was performed with specific probes for transcripts of *TRM7* (A) and *HISTONE 4* (B) on longitudinal sections of wild-type floral buds. Scale bars = 100  $\mu$ m. C-E: Expression pattern of Pro*TRM7*:*TRM7*<sup>1-72</sup>-GUS fusion as revealed by histochemical GUS staining. C: 5 day-old seedling. C1: young leaves; C4: epidermis of cotyledon; C2, C5 and C6: emerging lateral roots; C3 and C7: primary root tip. PI counterstaining in C4-C7 was performed after GUS staining. D: Globular (D1), heart (D2) and mature (D3) embryos. E1: inflorescence. E2: Shoot apical meristem. Scale bars = 20  $\mu$ m (C4, C2, C7), 100  $\mu$ m (C1, C3, C4, C5, C6 and D), 500  $\mu$ m (E2) and 5 mm (C and E1).

## Introduction

Plant cells are embedded within a semi-rigid pecto-cellulosic cell wall that prevents cell migration. As a consequence, the three-dimensional cellular organization of tissues can be viewed as a direct result of cell division and elongation, since new cells remain deposited in place after mitosis with no possibility for subsequent relocation. Cell division in plant cells is accomplished through the formation of a centrifugal growing cell plate that anchors at and fuses with the parental plasma membrane and cell wall. The insertion site of the cell plate to the mother plasma membrane is predicted prior to mitosis by the position of a transient cortical microtubule structure, the preprophase band (PPB). The PPB is formed late in G2 as a dense ring of microtubules encircling the nucleus at the cell cortex, and disappears a few minutes after nuclear envelope breakdown (Wick and Duniec, 1983; Venverloo and Libbenga, 1987; Mineyuki et al., 1988). The PPB is believed to leave a signal at the cortex guiding the growing cell plate to the cortical division site (Mineyuki and Gunning, 1990). The region of the plasma membrane defined by the PPB and maintained throughout mitosis is called the cortical division zone (CDZ) (Van Damme et al., 2007). What drives PPB orientation and position is still unclear. The role of the interphase cortical microtubules in division plane orientation is likely to be significant. For example, upon wounding, the switch of cell polarity in cells surrounding the wound is always preceded by the reorientation of the interphase cortical microtubules in cells adjacent to the wound, long before PPB formation in these cells (Hush et al., 1990). In interphase, the majority of microtubules are present at the cortex, organized in parallel arrays transverse to the cell elongation axis. When the cell becomes committed to divide in G2, the microtubules array undergoes a complete and major reorganization, leading to PPB formation and to the depolymerization of microtubules outside the PPB. Concomitantly, the nuclear envelope becomes an active site for microtubules nucleation, and microtubules nucleated from the nuclear surface connect the nucleus to the cortex. The PPB is always ultimately co-aligned with the nuclear equator in early prophase (Duroc et al., 2010; Mineyuki, 1999).

Even if molecular pathways leading to PPB formation are still unknown, a few genes involved in PPB formation and/or CDZ identity have been identified, whose disruptions are correlated to division plane defects (Muller et al., 2009; Van Damme, 2009; Struk and Dhonukshe, 2013). In this respect, the most spectacular mutations are *Arabidopsis TONI* and



**Figure 3: Schematic representation of *TRM6*, *TRM7* and *TRM8* genes.**

Grey boxes represent coding sequences. T-DNA position of insertional mutants, GABI\_048G03 (*trm6*), SALK\_074085 (*trm7-1*), RATM\_15\_1899\_1 (*trm7-2*) and SALK\_150274 (*trm8*) are represented along *TRM6*, *TRM7* and *TRM8* sequences. Blue arrow represents the sequence used to study *TRM7* expression in promoter-GUS fusion analysis (2,7 kb). The green asterisk localizes the MSA element in *TRM7* promoter. Red arrow represents the probe used for *in situ* hybridization (400 bp).

*FASS*, since they lead to a complete absence of PPB; division plane positioning as well as cell elongation are strongly perturbed, mutant plants are extremely dwarf, but the plant overall architecture, as well as cell differentiation, remains surprisingly correct (Mayer et al., 1991; Torres-Ruiz and Jürgens, 1994; Traas et al., 1995; Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008). Both *TON1* and *FASS* in *Arabidopsis*, as well as *FASS* homologues in Maize, *DISCORDIA1* and *ALTERNATIVE DISCORDIA1* (Wright et al., 2009), and *PpTON1* in the moss *Physcomitrella patens* (Spinner et al., 2010) have been shown to be involved in cortical microtubules organization during interphase and PPB formation. They localize to the division zone from the preprophase stage up to metaphase, after PPB disassembly, suggesting a role in PPB formation and CDZ identity (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008; Wright et al., 2009; Kirik et al., 2012; Spinner et al., 2013). *FASS* was recently shown to be involved in microtubule nucleation (Kirik et al., 2012). A growing number of microtubule-associated proteins (MAP) localize as well to the PPB and other microtubule arrays, such as *MOR1* (Twell et al., 2002; Yasuhara et al., 2002; Hamada et al., 2004; Kawamura et al., 2006) or *CLASP* (Ambrose et al., 2007; Kirik et al., 2007) or localize to the CDZ during mitosis and cytokinesis, such as *TANGLED* (Smith et al., 2001; Walker et al., 2007; Rasmusen et al., 2011) or *RanGAP1* (Xu et al., 2008). However, the disruption of these proteins affects not only PPB but also other cellular structures, like interphase microtubules arrays, spindle or phragmoplast formation.

*TON1* and *FASS* have recently been shown to be part of the same protein complex, the TTP complex, responsible for PPB formation and spatial control of cell division in land plants (Spinner et al., 2013). This complex is composed of *TON1*, *TON1*-Recruiting Motif (TRMs) proteins (Drevensek et al., 2012), and a Protein Phosphatase 2A (PP2A) complex with *FASS* as the regulatory subunit. The TTP complex also includes a PP2A catalytic subunit, either PP2A-C3 or PP2A-C4, as well as one of the three *Arabidopsis* PP2A structural subunits (Spinner et al., 2013). PP2A-C3 or -C4 and PP2A-A1, -A2 and -A3 are all required for PPB formation since *pp2aa1 pp2aa2*, *pp2aa1 pp2aa3* and *pp2ac3 pp2ac4* double mutations lead to the complete absence of PPB.

The TRM super-family is a newly identified protein super-family composed of 34 members which share six short conserved motifs, including a *TON1*-interacting motif present in all TRMs (Drevensek et al., 2012). This super-family seems rather diverse since most TRMs do not display any extended sequence similarity apart for the presence of the six TRM motifs. About half of TRMs are predicted to be microtubule-associated proteins and at least





**Figure 4: Sequence alignment of promoters of TRM7 homologues in Brassiceae.**

The MSA element (TCYAACGGYYA) (in orange) present at 700 bp upstream the ATG start codon is conserved in *Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*, *Capsella rubella*, *Brassica rapa* and *Thellungiella halophila*.

two of them, TRM1 and TRM8 were shown to recruit TON1 and FASS to the microtubules (Drevensek et al., 2012; Spinner et al., 2013). Except for *TRM1* and *TRM2* genes, which have been involved in cell elongation in *Arabidopsis* leaf (Lee et al., 2006), the role of this super-family is largely unknown. Based on the variety of transcriptional expression patterns among *TRM* genes, sequence diversity and localization pattern (Drevensek et al., 2012), TRMs are presumably involved in various processes.

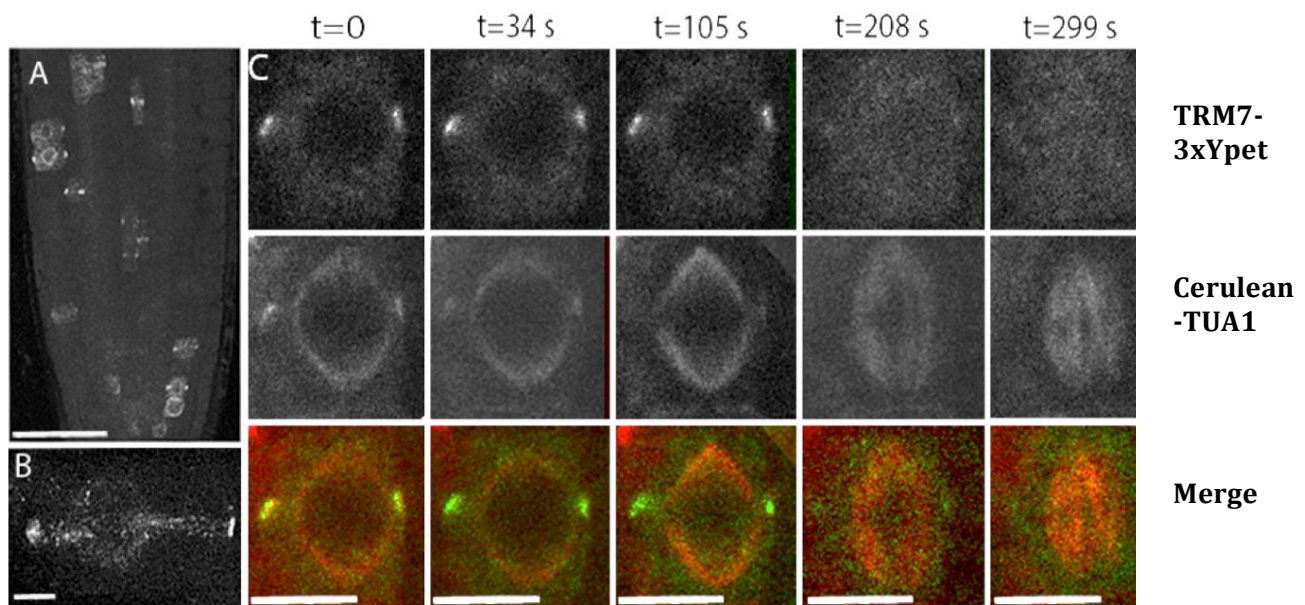
Here, we focus on *TRM7* and show that it is a mitotic gene, specifically expressed during the G2 to M transition in dividing tissues. A TRM7-3xYpet fusion starts to accumulate at the preprophase stage where it localizes to the PPB, persists at the cell cortex up to metaphase and disappears afterwards. *TRM7* disruption leads to defects in PPB formation and division plane orientation. Finally, the disruption of the entire TRM7 subgroup, *i.e.* TRM6-TRM7-TRM8, leads to an absence of PPB. Surprisingly, depending on the tissues examined, division planes are mildly affected compared to *ton1* and *fass* mutants and plant morphology is only slightly disturbed. These results suggest, for the first time, that PPB does not play a pivotal role in division plane determination as was thought for the last 50 years.

## Results

### TRM7 has a mitotic expression

We hypothesized that among the TRM super family, only a few TRMs participate to PPB formation within the TTP complex. In order to identify TRMs specifically involved in this process, we looked for genes whose expression is up-regulated in mitosis. Analysis of transcriptomic data using the Genevestigator tool (Zimmermann et al., 2004) suggested that one member of the *TRM* family, *TRM7*, is a cell cycle regulated gene with a peak of expression at the G2/M transition (Menges et al., 2003) (figure 1). To assess *TRM7* expression *in planta*, we used *in situ* hybridization and TRM7 promoter/ $\beta$ -glucuronidase (GUS) fusion.

*In situ* hybridization of flower buds revealed that *TRM7* RNA accumulated in only a few cells, in a spotty pattern reminiscent of cell cycle-regulated genes (figures 2A and 2B). To monitor *TRM7* expression in various tissues, we used the GUS reporter gene fused to the *TRM7* native promoter (2,3 kb) along with the first two exons and introns of *TRM7* (*i.e.* a Pro*TRM7*:TRM7<sup>1-72</sup>-GUS gene translational fusion, see figure 3). Histochemical GUS staining was performed on ten transgenic lines, all lines showing the same expression pattern



**Figure 5: Localization of TRM7-3xYpet in *Arabidopsis* root tips.**

A : Root tip of a 3 day-old seedling expressing TRM7-3xYpet. Scale bar = 50 μm. B : Cortical ring of TRM7-3xYpet (maximum projection). Scale bar = 15 μm. C : Time course experiment illustrating the disappearance of TRM7-3xYpet in cells undergoing the PPB-to-spindle transition. Elapsed time is indicated at the top, labels on the right side identify the images showing microtubules (Cerulean-TUA1), TRM7-3xYpet and merged images (TRM7-3xYpet in green and Cerulen-TUA1 in red). The TRM7-3xYpet ring disappears as the cell progresses to metaphase. Scale bars = 15 μm

(figure 2C-2E). *TRM7* expression was restricted to meristematic zones and dividing cells and tissues. At the seedling stage, GUS staining was prominent in meristematic tissues: the shoot apical meristem, the root tip and emerging lateral root with a pronounced spotty pattern typical of cell cycle expressed proteins (Colon-Carmona et al., 1999) (figure 2C). *TRM7* expression was also visible in meristemoids cells, which are actively dividing cells of cotyledons (figure 2C). In the shoot apical meristems of 6 week-old plants, GUS staining was restricted to the center of the floral meristem and to the youngest floral buds (figure 2E). Embryos from the globular to the mature stage were stained (figure 2D). Thus, *TRM7* expression is restricted to actively dividing tissues.

Furthermore, sequence analysis of the *TRM7* promoter revealed the presence at 700 bp upstream of the ATG of a common cis-acting element, called the M-specific activator (MSA) element (TCYAACGGYYA), sufficient for the periodic G2/M specific activation of promoters (Ito et al., 1998; Ito et al., 2001) (figure 3). This motif is conserved in the promoter sequences of *TRM7* homologues across Brassicacea (figure 4). *TRM7* ranked 25<sup>th</sup> in the online Cyclebase database of cell-cycle experiments (Gauthier et al., 2008).

Hence, based on gene expression and promoter sequence analysis, *TRM7* is a bona-fide cell cycle gene.

### **TRM7 is a specific PPB marker**

We next determined the subcellular localization of the full length TRM7 protein. To this end, we employed recombineering (Zhou et al., 2011) to insert three consecutive copies of the cDNA encoding for the bright fluorescent protein Ypet (3xYpet) at the 3' end of the genomic coding sequence of *TRM7*. The TRM7-3xYpet construct rescued the *trm7* phenotype (see below). We examined 20 independent lines. 6 lines did not display any fluorescent signal while 14 showed a similar fluorescent pattern. In root tips, TRM7-3xYpet fluorescence was present at low level, and appeared only in a subset of cells, as a diffuse cytoplasmic signal and well-defined cortical rings strongly reminiscent of PPB (figure 5A and 5B). To demonstrate that TRM7 specifically labeled PPBs, we crossed a TRM7-3xYpet line with a Pro35S:Cerulean-TUA1 microtubule marker line. Remarkably, positive TRM7-3xYpet cells displayed a PPB as revealed by the cerulean-TUA1 marker. In addition, time-lapse observations enabled to investigate TRM7-3xYpet kinetic at the cortex during the cell cycle (figure 5C). TRM7-3xYpet persisted at the cortex a few minutes longer than the microtubular PPB but was not detectable anymore at the metaphase stage. Hence, at the protein level,

			<b>M5</b>			
TRM6	1	MVEMEAVERRKRSRGGFLNMFDPGKSRKLFSSSSSSSKLSEGSQKQKQNAQNPSKSWPSLIEGDEIGKNSTYNPRSDSS				80
TRM7	1	---MDVVERKRPRGAFNLNFDWHGKSRKLFSSNLS--QLSEESKQAKENVQNPSITPHSVFEVDQSVKNPTYNPRSDSS		KENVQN		75
TRM8	1	---MEVVERKRSRGGFLNLDWHGKSRKLFSGSTS--ELSEESKQPAQNLLKSRV---SLIEVDEIGKSSNNQRSDSS				72
			<b>M1</b>			
TRM6	81	CSTSTPTSDDGQGSKAPSVVARLMGLESIPVNALEPRRNPDPDFPYFLRSSRKASTWDAYENLGYVNLRSYDYGISWDHL				160
TRM7	76	CCASSVTSDDGNVVRA-SVVARLMGLEGLPLPNVLEPRVNPDLDPYFLRSSRQANTWDAN-----VDRQSDFDGVSWDHL				149
TRM8	73	CCASSVTSDDGQGTTRAPSVVARLMGLESIPVNPVQEPRLNPDLDPFLLRPSQNTNRWDAYENLGYVNLRSYDYGISWDHL				152
TRM6	161	DSRMNKE-CNRPIDRFQETETLPPRSAPKIPVTHNRLLSPIRSPGFVQSRNPASVMEEASRMIEPSPRVVAKTRF-SSSDS				238
TRM7	150	DSRTSKGPRKRMIERFQETETLPPRSAPKISVTHNKLLSPIRNPGFVPSRNPAYVMEAAASRMIEQSPRMIARTRMVSSSDS				229
TRM8	153	DSRTNNG-RNQPIERFQSETFFPPRSAPKICVTNRRHLSPIRSPGFVPSRNPAYVMEAAASRMIEPSPRMVARTRF-SPSNS				230
TRM6	239	SSSLPMKIRDLEKLEASQKQSP--QISNGTCNNKCFRGKQDEKRTTLPLKTQERNLLGESRFGGSKG-KVKPPSVSA				315
TRM7	230	SSPVLRIIRDLEKLEAAQKASTSVPQISNDTRNSRYLRGDQNEKKTIV-----LGKNSYDALKGGEVKKPFAA				299
TRM8	231	PSSVPMRIQDLREKLEAAQKSSR--QNSNDFNLKYPGSKHNEKRITTSLTTPSTSKFMGKSSDGLKG-KVKPSYVSA				307
TRM6	316	HAKANTIHKRDSMLSNGYR-----DQKKKVKETKNRIVKS--GLKESSASTRKTVDKPNNQKQ-----QFAETSVSNQRG				384
TRM7	300	QAKVSSNQKQDLSMSSSGNKRMSGQKEKVEAKNRAVKSQNSKGSLSLTKGNVLRQNNQKQNCRDNQ-----QS				370
TRM8	308	QAKAGTTP-----LSVT-----RNSANQKEKADAKKCVVKSQNALRGAPISMGKNMFKQNNQKQNCRDNQPSMTSVLNQKS				378
TRM6	385	RKVMKKV-NKVLVENGTTTKKPGFTATSAKKSTSSSLSRKKNLSRSKPPANGVQEAGVNSDKRIKKEKVIKCNITVDGG				463
TRM7	371	RRVMKNVNVKLVESGISIKSSSGFTMSSAEKPTSLPLSRKKSLSRKKPRNGVQESGIYEDKRIKKEKSIKCNISIDGD				450
TRM8	379	SKVNNKVVNKVPVESGISIKQLGLSTASAENKTSLSLSRKKTLPRSKLPLNGMQKSGISDDKRTKRSENMIKCNITIDGG				458
TRM6	464	LKTGDDDRKDMVDVISFTFSSPIKGLSSDSQYFLKNDQDAESALCFNKIDSDSLNFLEKLEKRELTSMKESSCSSLTQE				543
TRM7	451	SSTSDDQKRDMDVISFTFSSSIKGLSSPH---SQGTKQDADSAIRFNVIQGGDSLALLEQKLELTTKIESSSSSLIQE				527
TRM8	459	LNKGKDDRRKEMDVISFTFSSPIKGLSSDLSSTQIGQDQDTSVAVSFN-IGGDSLALLEQKLELTSMKESSCSSLTQE				537
TRM6	544	EESGSIKDWVNGTRSLPDDQ-----DNGLSESESDSDYSSSFYKKKIFQAE-----DDEEVNSFST---AENLQI				608
TRM7	528	EPLS-SISKDRANAMISSPSKYSGLTQSSLDRLVTESESVSD-CTSFNSQKVKQKVIQGEQEVSSITTLTEADDFAL				605
TRM8	538	EPSY-SIPDEMNGMISFSSEYKSTQNGLRKVLSESESVSD-CTSFYDKQKQFQ----IQAEHEVSSISTVTEADDLRS				611
			<b>M6</b>			
TRM6	609	SCSTSFSSSR-----NDYHHNIEETELSESV---ALSEAEEGHDWELEYITEIIASGQLMIKEF				664
TRM7	606	SCSKSISDCRHDREYGMKQSSSDQELTWGSSNESQHTLDETESAT-----LDWELEYITEIILNSGQLMFQDF				672
TRM8	612	SCSKGFSDCRQTAEYGTIQSSSDQELTWVLSNESHQAQDESELSESVVTLTSYSEAEERLDWEFEYIISEILGSDQLMVKEY				691
			<b>M4</b>			
TRM6	665	SLGMATD--ILPLSLFDETEGRDA--RGKIERKTLFDLVNQLWTLKCEQMFMGTCCKGVLGKQDIFLERREILADQVLKE		RERKTLFDLVNQLWTLKCEQMFMGTCCKGVLGKQDIFLERREILADQVLKE		740
TRM7	673	ASGTTNESLLPSSLFDEMERSGAATSMKTERKALFDCVNOCLAVKFERMLIGSCKGMMSGILLEHRDLLAEVNRK		RERKALFDCVNOCLAVKFERMLIGSCKGMMSGILLEHRDLLAEVNRK		752
TRM8	692	ALGMATD--VLPASLFDEME-GRGEVTAAKIERKTLFDLVNKLALRCEQMFMGSCRLLGKGGFLFEQRDWLAEEVNRE		RERKTLFDLVNKLALRCEQMFMGSCRLLGKGGFLFEQRDWLAEEVNRE		768
			<b>M2</b>			
TRM6	741	AQGLKMMREMMDELVDNDMSSCEGKWLDMYRETYEEGIEIEEIVSELVDDLINDLIMCC-----		MYRETYEEGIEIEEIVSELVDDLINDLIMCC-----		801
TRM7	753	VKGLKMMREMMIDELVDHDMSCFEGRWIGYEREMFEEGIDMEGEIVSALVDDLVSDILS-----TSVLKRS		YEREMFEEGIDMEGEIVSALVDDLVSDILS-----		818
TRM8	769	IHGLKMMREMMDELVDKEMSSFEGRWLDFERETYEEGIDIEGEIVSTLVDDLVNDLVSGTQRRTLRQREGVVSALVEPH		FERETYEEGIDIEGEIVSTLVDDLVNDLVSGTQRRTLRQREGVVSALVEPH		848
TRM6		-----				
TRM7	819	LL---	820			
TRM8	849	LLSAF	853			

**Figure 6: Protein sequences alignment of TRM6, TRM7 and TRM8 protein sequences.** TRM motifs 1, 2, 4, 5 and 6 are represented in cyan, blue, pink, yellow and green, respectively. Destruction boxes (RxxLxxxN) are represented by the red box and the KEN-kox (KENxxxN) by the orange box.

TRM7 has a very short expression window, labeling PPBs at the G2 to M transition and disappearing upon metaphase.

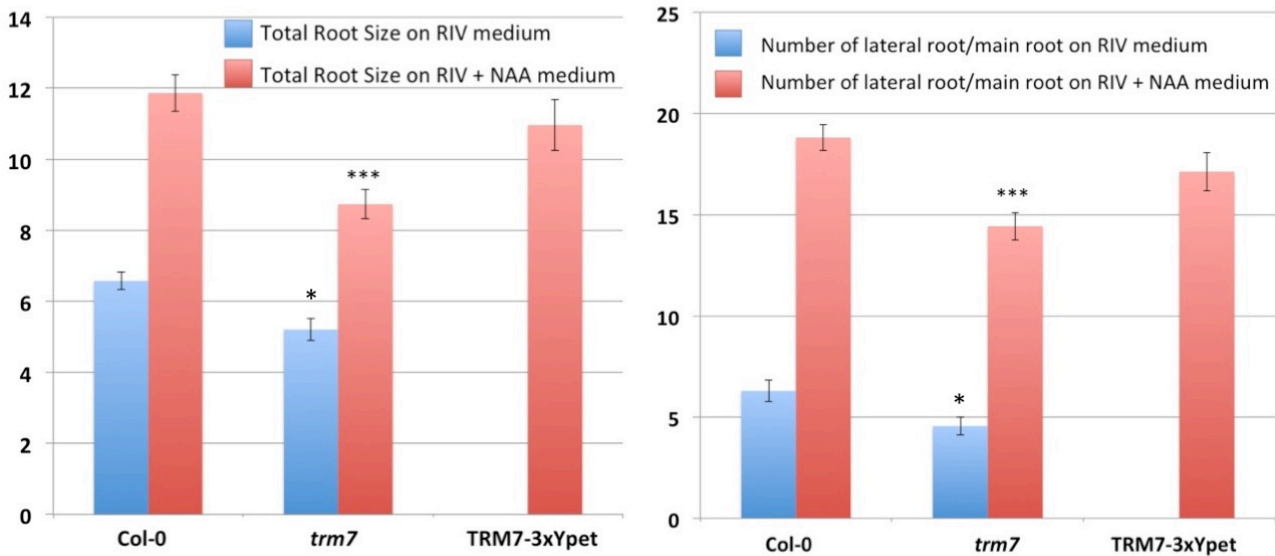
Protein sequence analysis revealed the presence of two putative Destruction boxes and one KEN box that could participate in TRM7 targeted degradation during mitosis (Figure 6). The KEN box at the N-terminal of the protein likely explains the spotty GUS expression pattern that we previously observed (figure 2C). Indeed, this pattern indicates a rapid turnover of the fusion protein at least shorter than one cell cycle, whereas GUS protein is reported to be a fairly stable protein with a 50 hours turn over in mesophyll protoplasts (Jefferson et al., 1987). This spotty pattern seen with our TRM7-GUS translational fusion thus likely resulted from the presence in the GUS fusion of the TRM7 KEN box targeting it to degradation.

To our knowledge, TRM7 is the first protein found to specifically localize to the PPB.

### **TRM7 depletion induces mild division plane defects**

In order to study the role of TRM7 in *Arabidopsis*, we conducted a genetic analysis and isolated *trm7* mutant alleles. The *trm7-1* allele (SALK\_074085) corresponds to a T-DNA insertion near the *TRM7* start codon whereas the *trm7-2* allele (RATM\_15\_1899\_1) has a T-DNA inserted at the C-terminal end of the ORF (figure 3). Both *trm7-1* and *trm7-2* homozygous plants appeared morphologically normal when grown in greenhouse.

We then studied root growth of *in vitro* grown seedlings and showed that the *TRM7* mutation slightly altered the total root size (*i.e.* the length of primary and secondary roots) and the number of lateral roots (figure 7). In order to try to enhance *trm7* phenotype, we cultivated *trm7* mutant plants on 1-naphthaleneacetic acid (NAA), at a concentration known to promote secondary roots emergence (Himanen et al., 2002; Dubrovsky et al., 2008). 5 day-old seedlings were grown vertically on “Root In Vitro” (RIV) medium (see Materiel and Methods) then transferred for 5 more days on the same medium supplemented with 13  $\mu$ M of NAA. Under these conditions, the total root size and the number of lateral roots of wild-type seedlings were highly superior to the one of *trm7* plants (t-test,  $p < 0,0001$ ) (figure 7). We then used this assay to assess the functionality of the TRM7-3xYpet fusion protein used previously. The TRM7-3xYpet construct was introduced in a *trm7* background by transformation and the total root size and the number of lateral roots per main root of seedlings grown on NAA were measured. The TRM7-3xYpet line in a *trm7* background



**Figure 7: The TRM7-3xYpet fusion complements the *trm7* root phenotype.**

Quantification of the total root size and the number of lateral roots per main root between wild-type (Col-0), *trm7-1* mutant (*trm7*) and *trm7-1* plants expressing the TRM7-3xYpet construct (TRM7-3xYpet). On RIV medium, the differences of total root size and the number of lateral roots per main root between the wild-type (n = 14) and *trm7* mutant (n = 20) are significant (t-test, one asterisk, p = 0,003 and p = 0,01 respectively). However, on a medium supplemented with NAA, differences between wild-type (n = 16) and *trm7* mutant (n = 16) are even more contrasted and are highly significant (t-test, triple asterisk, p = 0,00003 and p = 0,00005). *trm7* plants expressing the TRM7-3xYpet construct show a total root size and a number of lateral roots comparable to the wild-type (n = 16, t-test, p = 0,32 and p = 0,15). Error bars indicate the standard error.

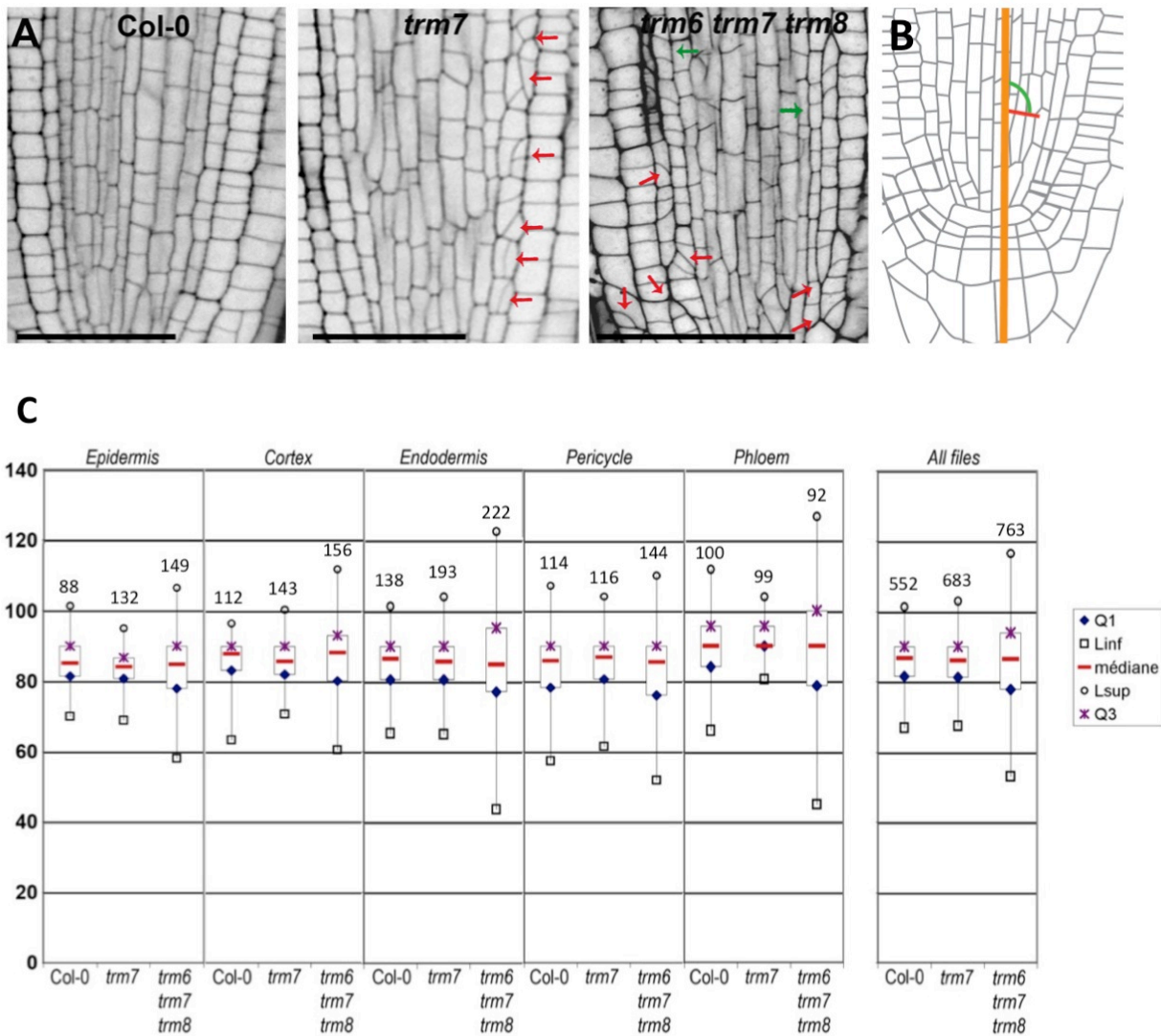
displayed no differences with the wild-type (t-test,  $p > 0,3$  and  $p > 0,1$  respectively) (figure 7) showing that the TRM7-3xYpet protein is functional. Analysis of other lines will definitely confirm the complementation of *trm7* phenotype by this construct.

Since TRM7 is a PPB marker, we carefully looked in these mutants at the cellular organization to detect any defects in division plane positioning. We focused on the *Arabidopsis* root which has a highly stereotypical pattern of cell division. Roots exhibit a radial arrangement of tissues. From the outside in, these are epidermis, cortex, endodermis, pericycle and the vascular tissues. These cell files originate from four types of initial cells at the tip. Initials divide either solely anticlinal (orthogonal to the axis of growth) resulting in a single file of cells or first anticlinal then periclinal (parallel to the axis of growth) resulting in two or more cell layers. The quiescent center, consisting of a few mitotically inactive cells, is in contact with all the initials of the root meristem. Each cell within a cell file will undergo a small number of anticlinal divisions during which time they will acquire their specific fates.

We used propidium iodide (PI) staining to image the entire root tip and analyzed cellular organization of both *trm7* mutant alleles. Plants homozygous for each of the two *trm7* alleles exhibited occasional cell pattern defects in one cell file of the root tip whereas most division planes were correctly oriented (Figure 8). Defects ranged from oblique to a 90° shift, resulting in occasional additional cell files (figure 8). Since both alleles displayed the same phenotype, all following experiments were realized using the *trm7-1* mutant (Col-0 background).

To trace back the origin of these alterations, we followed division planes positioning in early embryos using PI staining. Early embryogenesis in *Arabidopsis* involves a well-characterized and constant pattern of cell divisions (figure 9A). The zygote first divides asymmetrically to produce a basal cell that will undergo a series of transverse divisions to generate the suspensor and an apical cell that will develop into the embryo proper. After two rounds of longitudinal divisions and one round of transverse divisions, the apical cell gives rise to an eight-celled embryo (figure 9A). In *trm7* embryos, abnormal division planes, mostly represented by slightly tilted planes, were visible in the three rounds of divisions of the embryo proper showing that division planes were frequently mis-positioned during early embryogenesis (figure 9C, 9D and 9G).





**Figure 8: Division plane orientation defects in *trm7* and *trm6 trm7 trm8* mutants.**

A: Longitudinal views of root tips of wild-type (Col-0), *trm7* and *trm6 trm7 trm8* 3 day-old seedlings stained with propidium iodide. Red and green arrows indicate abnormal division planes and additional cell files respectively.

B-C: Quantification of division plane defects in the epidermis, cortex, endodermis, pericycle and phloem of three wild-type, *trm7* and *trm6 trm7 trm8* roots. B: Inside each root cell file, the angle (in green) formed by one division plane (in red) and the axis of elongation of the root (in orange) was calculated. Data are represented by box plot in C. Each box marks the first (Q1 in blue) and third (Q3 in purple) quartile of the population, thus representing the middle 50% of the distribution. The red dash within the box marks the median. Lines extending vertically from the boxes indicate variability outside the first and third quartile, *i.e.* the lowest datum still within 1,5 of the inter quartile range of the lower quartile (Linf), and the highest datum still within 1,5 of the inter quartile range of the upper quartile (Lsup). The number of cells observed is indicated above the box plot.

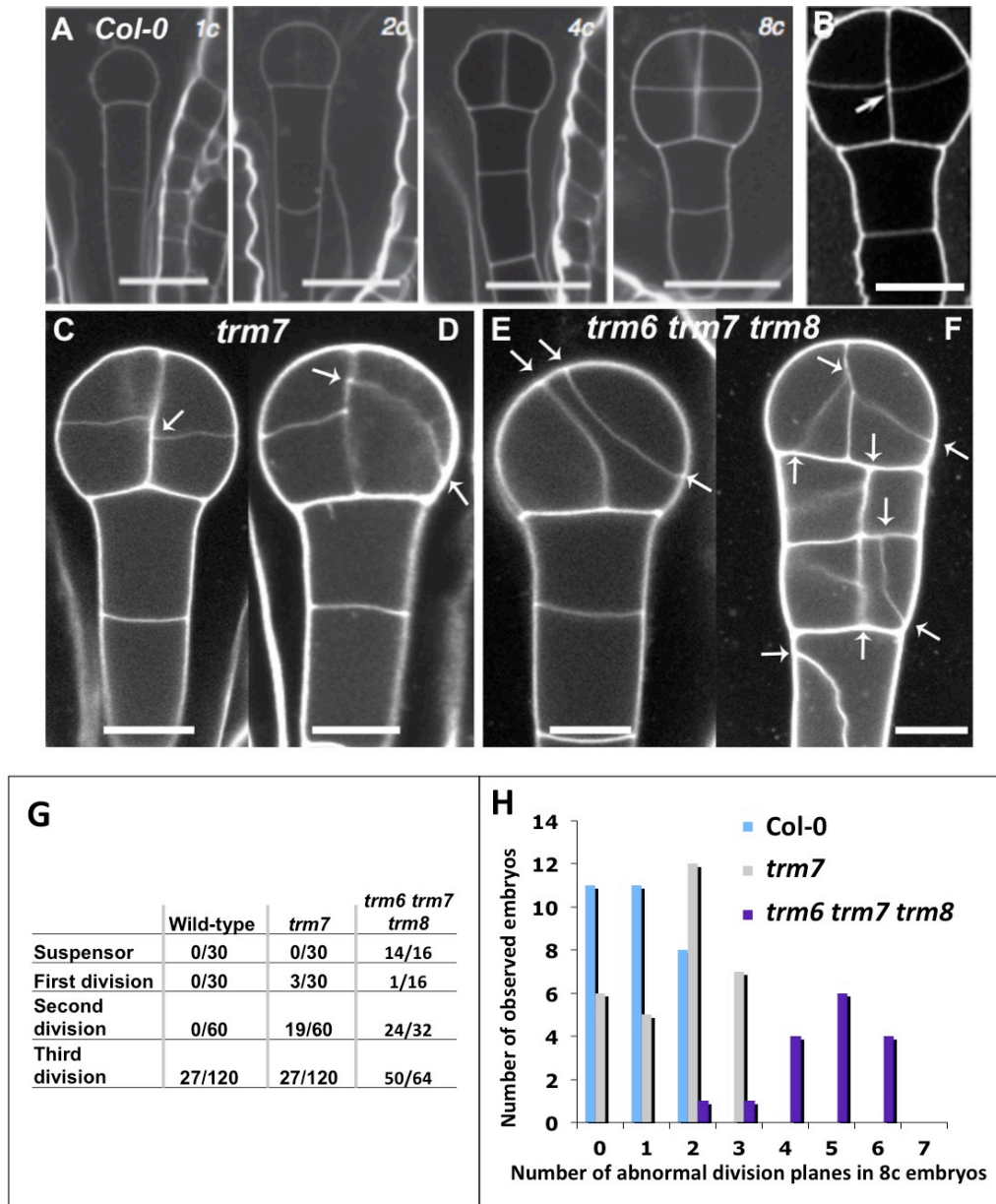
## TRM6-TRM7-TRM8 family is involved in division plane determination

As TRM7 belongs to a small subgroup of TRM proteins together with TRM6 and TRM8, which shares respectively 75 and 74% of similarity with TRM7, we anticipated that redundancy within this subgroup could be responsible for the mild phenotype of *trm7* mutants. Unlike *TRM7*, *TRM6* and *TRM8* expression profiles are not cell-cycle regulated. We isolated insertional mutants for *TRM6* and *TRM8* (figure 3) and obtained combinations of double mutants, as well as a *trm6 trm7 trm8* triple mutant. Single and double mutants were morphologically normal, except for a slight silique phenotype as mutations accumulated (figure 10). However, the *trm6 trm7 trm8* triple mutant exhibited a stronger phenotype. Leaves are rounder, shoots and petioles are thicker and siliques are much shorter and thicker than the wild-type (figure 10). However, the overall plant morphogenesis is normal and triple mutant plants are fertile.

We then performed a detailed and quantitative analysis of the *trm7* and the *trm6 trm7 trm8* phenotype at the cellular level. PI staining of root tips showed that *trm6 trm7 trm8* displayed frequent aberrantly oriented cell division planes in every cell file (figure 8A). 90° shifts were also observed at much higher frequencies than in *trm7* mutant and resulted in additional cell files (figure 8A). We quantified division plane orientation in the division zone of wild-type, *trm7* and *trm6 trm7 trm8* roots and measured the angle between the root elongation axis and each division plane. Box-plot analysis showed that *trm7* is similar to wild-type emphasizing that division defects observed in this tissue are rare events (figure 8). In contrast, the triple mutant displayed a wide dispersion of angles in all cell types of the root. However, the division plane orientation was not randomized, which is illustrated by the conserved tissue organization in parallel cell files in *trm6 trm7 trm8* mutant (figure 8).

Division plane defects were also observed during early embryogenesis. Aberrant division planes were prominent in *trm6 trm7 trm8* embryos. All embryos examined had misplaced planes from the second round of division, a feature never observed in wild-type. Moreover, defects were often severe, with division planes highly shifted (figure 9E-9H). Contrary to wild-type and *trm7* mutant, *trm6 trm7 trm8* embryos also displayed abnormal division planes in the suspensor cells, occasionally with a 90° shift creating a two-file suspensor (figure 9F and 9G).

We next analyzed cellular organization in the shoot apical meristem and imaged the L1 layer of Col-0, *trm7* and *trm6 trm7 trm8* meristems using FM4-64 staining (figure 11). In wild-type, cell division occurs primarily in the anticlinal plane, perpendicular to the meristem



**Figure 9: Cell division plane defects in 8-celled *trm7* and *trm6 trm7 trm8* embryos.**

A-F: Propidium iodide (PI) staining wild-type (A and B), *trm7* (C and D) and *trm6 trm7 trm8* (E and F) embryos. In A is shown the cleavage pattern in wild-type embryos from the single-celled (1c) to the 8-celled stage embryo (8c). The first division of the apical cell is longitudinal, whereas the basal cell divides by transverse divisions leading to the formation of the suspensor. The two-celled embryo then divides by a second longitudinal division perpendicular to the plane of the previous division. The four resulting cells then divide by transverse divisions, giving rise to the eight-celled embryo. Scale bar = 20  $\mu$ m in A and 10  $\mu$ m in B-F.

G: Quantification of cell division planes defects observed in wild-type (n = 30), *trm7* (n = 30) and *trm6 trm7 trm8* (n = 16). In wild-type, occasional tilted division planes (27/120) are seen during the third round of division as shown in B. In contrast, in *trm7* and *trm6 trm7 trm8* mutants, abnormal division planes are already visible in the first and second round of divisions. In *trm7* embryos, all defects in the first and second round of divisions and most defects in the third round of division (23/27) concern slightly tilted planes as in C. Severe division plane defects are only seen in 4/27 defects observed in the third division as in D.

surface (figure 11D). In transverse sections of *trm7* and most frequently in *trm6 trm7 trm8* meristems, division plane defects were observed as evidenced by oblique planes. Cell shape was also greatly affected in the triple mutant. Shoot apical meristem cells have a characteristic polygonal shape. They divide along the plane that minimizes the surface area of the cell plate while creating daughter cells of equal size, the new wall meeting the cell boundary at 90° (Besson and Dumais, 2011) (figure 11). Although a statistical analysis will be needed, many cells in the *trm6 trm7 trm8* meristems divided without following these rules. Division planes were often oblique with respect to the parental walls, and did not follow the shortest path, generating long triangular cells contrasting with the Col-0 cell shape (figure 11A-B). Cell division plane defects were also obvious in the boundary domains between meristem and floral primordia. While in the wild-type, division plane were aligned to the boundary axis, in the *trm6 trm7 trm8* mutant, division planes were randomized (figure 11C). Finally, the triple mutant did not seem to strictly follow the 4-way avoidance rule that is seen in wild-type (Lloyd, 1991). The general rule is that only three cell edges can meet at a point so that a new cell plate will not insert upon the maternal wall opposite the point where a neighboring cross wall is already attached (Lloyd, 1991). Four-way junctions were frequently seen in the triple *trm6 trm7 trm8* mutant (figure 11A-B).

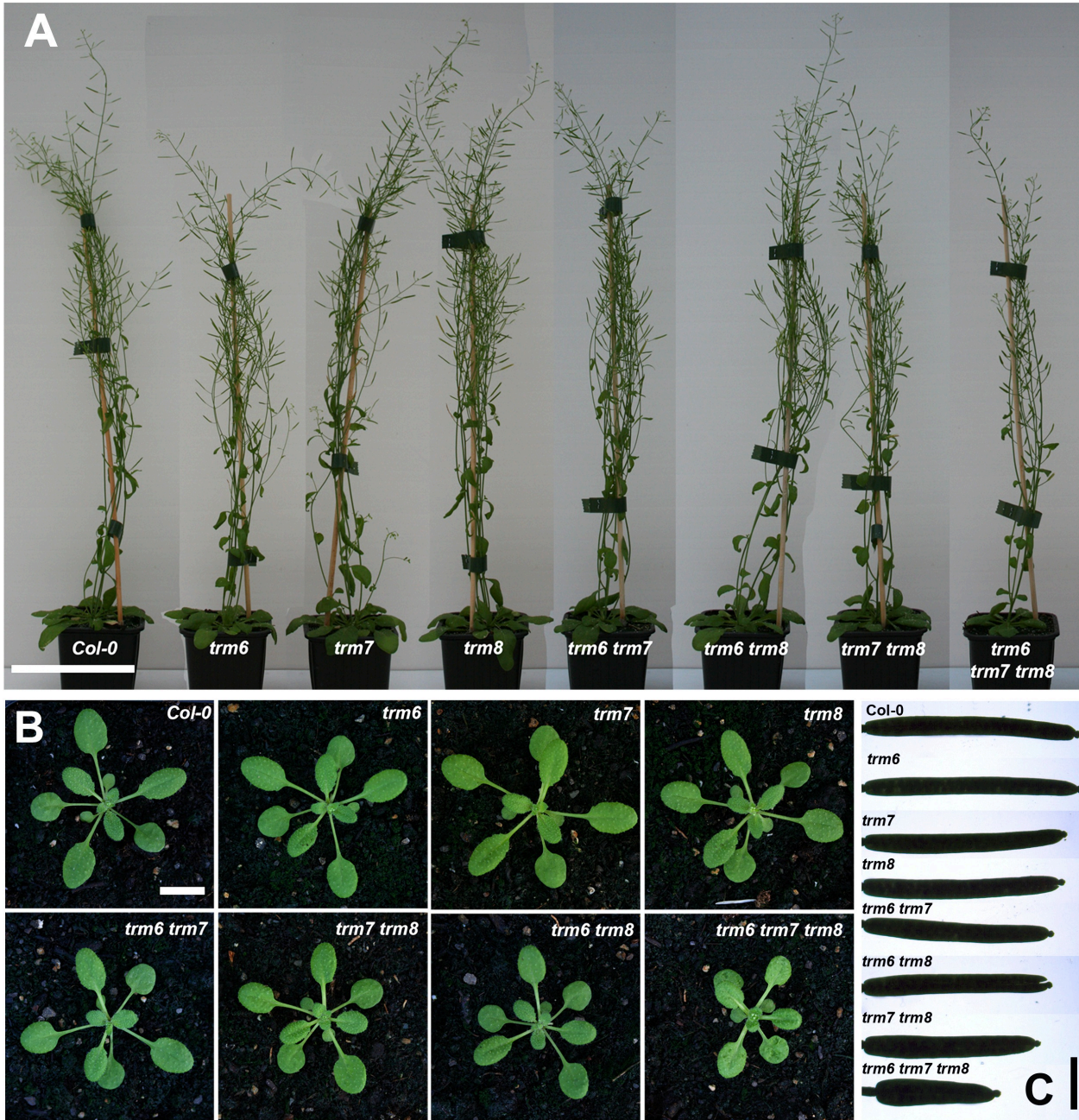
Finally, we observed cell pattern in the adaxial epidermis of cotyledons of 3 and 10 day-old seedlings. In wild-type, epidermis cellular pattern includes different types of cells (Bergmann and Sack, 2007). While most leaf cells differentiate into pavement cells, a subset undergoes a transition to become a meristemoid mother cell. Meristemoid mother cells divide asymmetrically to enter the stomatal lineage and create a meristemoid and a larger cell that can differentiate into a pavement cell or undergo another division to form a satellite meristemoid oriented away from an existing stomatal precursor. All meristemoids eventually

---

### Figure 9 (continued)

In *trm6 trm7 trm8* embryos, orientation defects are much more severe. For example, among 50 abnormal division planes observed in *trm6 trm7 trm8* embryos, 20 appeared slightly tilted while 30 were strongly misplaced (as in E and F). Aberrant division planes are also common in the suspensor of *trm6 trm7 trm8* embryos (in 14/16 embryos as shown in F) but never observed in the wild-type and *trm7* embryos.

H: Number of embryos displaying 0 to 6 abnormal division planes in wild-type compared to *trm7* and *trm6 trm7 trm8* embryos. Most *trm7* embryos have 2 or 3 abnormal division planes and all *trm6 trm7 trm8* embryos have at least 2 abnormal division planes. Wild-type embryos reported here as having abnormal division planes only have slightly tilted division planes as in B.



**Figure 10: Overview of representative *trm6*, *trm7*, *trm8*, *trm6 trm7*, *trm6*, *trm8*, *trm7 trm8* and *trm6 trm7 trm8* mutant phenotypes.**

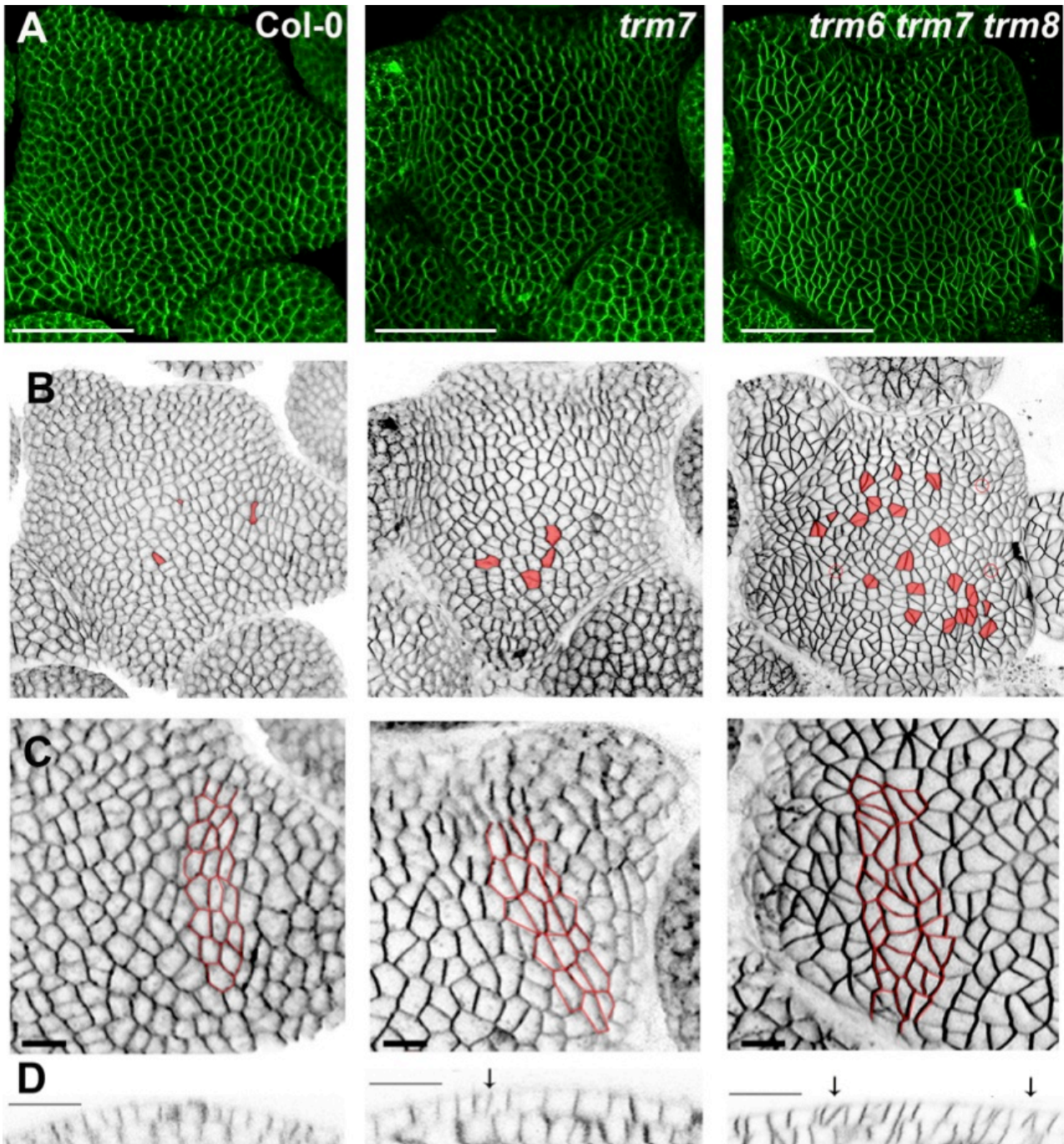
Pictures of rosettes (A), mature plants (B), and siliques (C) of wild-type, *trm6*, *trm7*, *trm8*, *trm6 trm7*, *trm6*, *trm8*, *trm7 trm8* and *trm6 trm7 trm8* mutants are presented. Scale bars = 10 cm (A), 1 cm (B) and 2,5 mm (C).

become a guard mother cell that divides once symmetrically to produce the two equally sized guard cells of stomata (figure 12). Epidermal cell pattern did not appear to be impaired in *trm7* mutant (figure 12). In contrast, in the *trm6 trm7 trm8* mutant, clusters of meristemoid cells of the stomatal lineage as well as adjacent stomata were observed, reflecting abnormal division plane positioning. Strikingly, the overall morphology of the pavement cells of 3 day-old cotyledons appeared more elongated than in the wild-type and did not present the typical lobes of the epidermis (figure 12B). Nevertheless, this phenotype was less affected in older cotyledons and the cell shape in 10 day-old cotyledons looked more like the wild-type pattern.

Abnormal division plane positioning in dividing tissues, *i.e.* root tip, embryo, shoot apical meristem and cotyledon epidermis, is thus a shared syndrome of *ttp* mutants (Spinner et al., 2013), further linking *TRM6*, *TRM7* and *TRM8* to a functional network required for division plane positioning in plant cells.

### The TRM6-TRM7-TRM8 family is required for PPB formation

Depletion of TON1, FASS, PP2A-A or PP2A-C prevents PPB formation (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008; Spinner et al., 2013). To search for PPB formation defects in mutants of the TRM6-TRM7-TRM8 subgroup, we performed immunolocalizations of microtubules in root dividing cells of Col-0 and mutant combinations of *TRM6*, *TRM7*, *TRM8*. Counterstaining with an anti-KNOLLE antibody allowed to identify cells in early mitosis, as this mitotic marker accumulates at the trans-Golgi network at G2 to M transition (Lauber et al., 1997; Reichardt et al., 2007) (figure 13). At the preprophase stage, in wild-type, 98% of cells at the preprophase stage displayed a PPB, whereas only 2% did not (n=127) (figure 13A). In this respect, *trm6* and *trm8* single mutants and *trm6 trm8* double mutants were identical to the wild-type. Interestingly, in *trm7* mutant, microtubules exhibited different arrangements at the G2/M transition (n=93): 53% of KNOLLE-positive cells displayed a normal PPB (figure 13D) whereas 20% showed no PPB at all (figure 13E). This absence of PPB was associated to an accumulation of perinuclear microtubules, a feature already reported in PPB defective *ttp* mutants (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008; Spinner et al., 2013). In addition, 27% of G2/M KNOLLE-positive cells displayed a frailed PPB with sparse cortical microtubules and dense perinuclear microtubules (figure 13B). Combining the *trm6* or *trm8* with *trm7* mutation enhanced this *trm7* molecular phenotype since 37% and 56% respectively of the G2/M KNOLLE-positive cells had no PPB (n = 76



**Figure 11: Cell division defects in the shoot apical meristem.**

A: FM4-64 staining of Col-0, *trm7* and *trm6 trm7 trm8* shoot apical meristems. B: Negative images of shoot apical meristems. Cells with abnormal cell wall positioning are represented in red. Four-way junctions are encircled in red. C: Representation of abnormal division planes in organ boundaries of Col-0, *trm7* and *trm6 trm7 trm8* shoot apical meristems. Division planes are represented in red. D: Orthogonal projection of the anticlinal divisions of the L1 cell layer. Tilted cell walls are indicated by the arrows. Scale bars = 50  $\mu\text{m}$  (A and D) and 5  $\mu\text{m}$  (C).

and  $n = 78$  respectively). Strikingly, in *trm6 trm7 trm8* mutant, 92% of cells did not form a PPB at the G2/M transition ( $n=102$ ) (figure 13C). The few other cells at the preprophase stage (8%) displayed abnormal PPBs with dense perinuclear microtubules and sparse cortical microtubules (figure 13F). Spindles and phragmoplasts formed with frequencies and appearance comparable to wild-type cells (figure 13G).

The TRM6-TRM7-TRM8 subgroup is thus necessary for PPB formation.

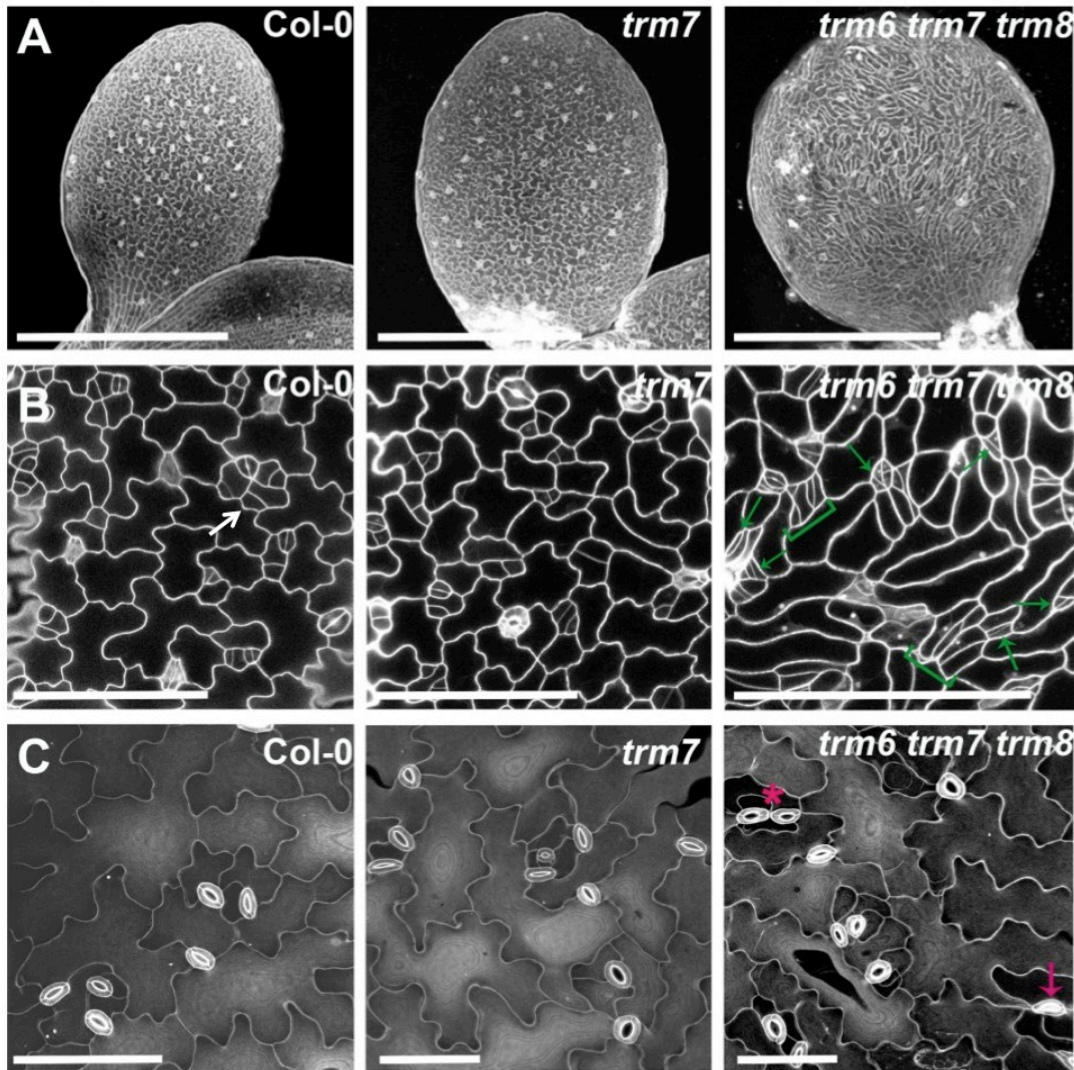
### TRM7 is part of the TTP complex

TRM7 was initially identified in a two-hybrid screen using TON1b as bait (Drevensek et al., 2012). TRM6 and TRM8, which are in the same TRM subgroup as TRM7 and share respectively 75 and 74% of similarity with TRM7, were shown to co-purify with TON1 and FASS in several TAP-Tag experiments (Spinner et al., 2013).

In order to further demonstrate that TRM7 is a *bona fide* partner of a TTP complex, we analyzed genetic interactions between *TRM7* and *TTP* genes. To this end, we crossed a *trm7-1* mutant, either with *fass*, a *ton1a* single mutant (Kirik et al., 2012) or *pp2a-a1* (Garbers et al., 1996) mutants. Introducing a *trm7* mutation in a weak allele of *fass* (*fass-14*) enhanced the *fass-14* phenotype (figure 14). *trm7 fass-14* double mutant roots were shorter than the parental *fass-14* allele. Similarly, while *trm7* and *ton1a* single mutants do not have any obvious morphological phenotype, the *trm7 ton1a* double mutant had rounded leaves, shorter petioles and thicker and shorter siliques (figure 14). Likewise, introducing the *trm7* mutation in a *pp2a-a1* mutant background resulted in a plant resembling *trm7 ton1a* mutant, thus clearly affected compared to the parental genotypes, both presenting a morphological wild-type phenotype (figure 14).

Several members of the TRM family, including TRM8, are microtubule-associated proteins (Drevensek et al., 2012). In addition, both TRM8 and TRM1 have been shown to be able to recruit TTP partners to the microtubules arrays in transient expression assays (Drevensek et al., 2012; Spinner et al., 2013). We therefore tested the ability of TRM7 to recruit TON1 and FASS to the microtubules arrays by transient co-expression of these proteins in *N. Benthamiana* leaf cells. When expressed in *N. benthamiana* cells, RFP-TRM7 localized along dense linear arrays strongly reminiscent of cortical microtubule arrays arrangements in these cells, which span neck-to-neck regions in leaf pavement cells. Although this will have to be formerly demonstrated upon co-localization with a microtubule marker,





**Figure 12: Cell division plane defects in stomata lineage.**

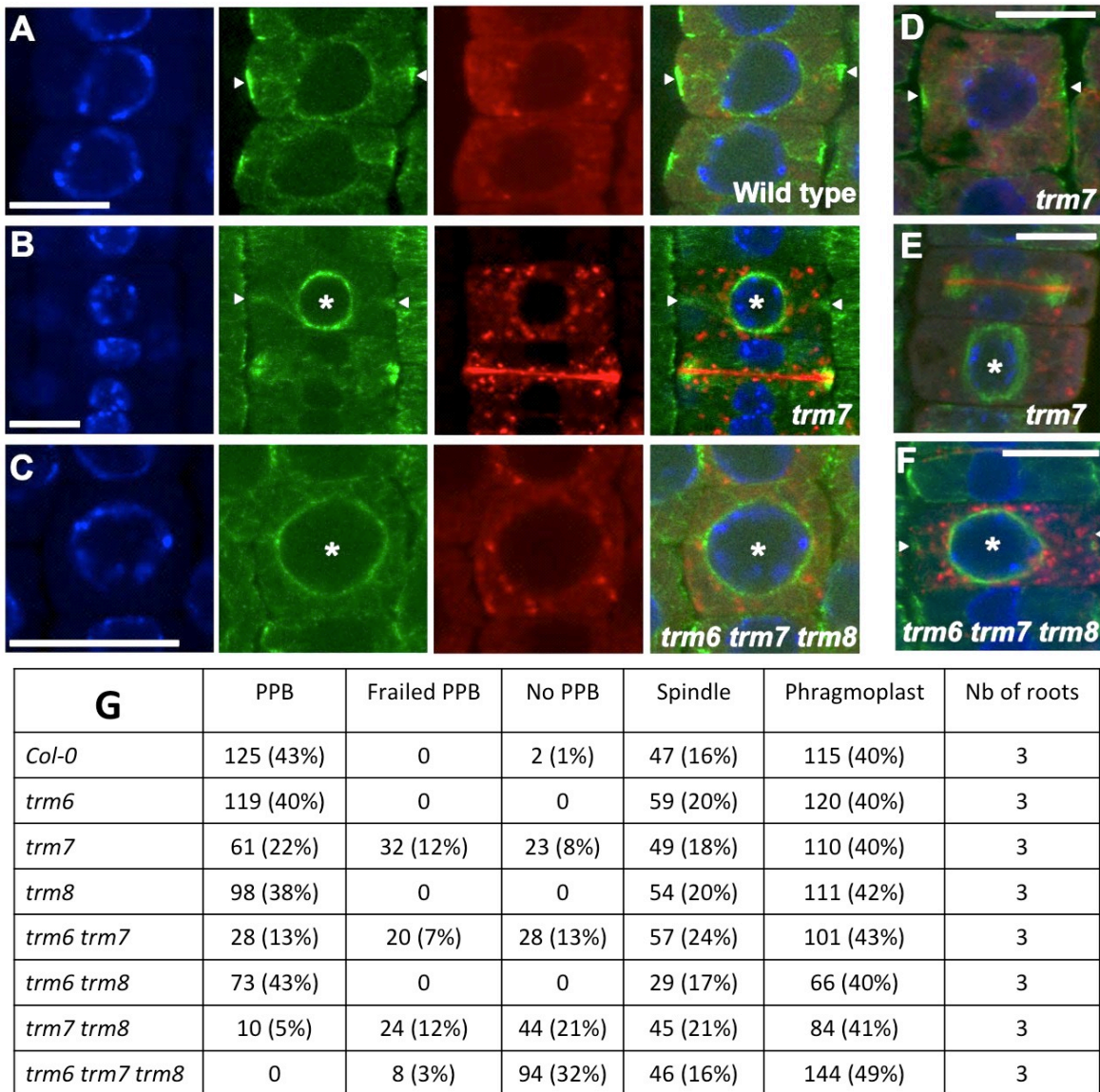
A-C: Propidium iodide (PI) staining of epidermis of cotyledons of wild-type, *trm7* and *trm6 trm7 trm8* seedlings. The formation of stomata is initiated by a dispersed population of multipotent stem cells, called meristemoid mother cells. First, meristemoid mother cells divide asymmetrically to form two cells of unequal size. The larger cell acts as a spacer to prevent adjacent stomata, whereas the smaller cell, called a meristemoid, undergoes several asymmetric divisions to produce more meristemoids before becoming a guard mother cell. Finally, the guard mother cell divides symmetrically to generate two guard cells. A: Whole cotyledon of 3 day-old seedlings, B: Cotyledon epidermis of 3 day-old seedlings, C: Cotyledon epidermis of 10 day-old seedlings. White arrow points to a meristemoid cell. Green arrows and brackets indicate abnormal division planes and abnormal cluster of cells respectively. Pink asterisk and arrow indicate adjacent stomatas and abnormal stomata. Scale bars = 500  $\mu\text{m}$  (A), 100  $\mu\text{m}$  (B and C).

this result together with PPB localization of TRM7 and its homology with TRM8 strongly suggests that TRM7 is also a *bona fide* microtubule associated protein. We addressed whether TRM7 could recruit the TTP complex to the microtubules. In contrast to TRM7, GFP-TON1 fluorescence accumulated in the cytoplasm when overexpressed in this assay. However, upon co-expression with RFP-TRM7, cytosolic GFP-TON1 fluorescence re-localized from the cytoplasm to the cortical microtubules (Figure 17). Similarly, the BiFC signal corresponding to the interaction between FASS and TON1 (YFP<sup>N</sup>-FASS/YFP<sup>C</sup>-TON1) re-localized from the cytoplasm to the cortical microtubules array where it co-localized with RFP-TRM7 (figure 17).

TRM7 is thus able to interact with TTP complex partners both *in vivo* and *in vitro*, and to recruit the complex to the microtubules arrays. These results further indicate that TRM7 is part of a TTP complex acting at the G2/M transition and required for PPB formation.

## Discussion

Although the PPB was discovered almost 50 years ago, molecular events leading to its formation are still largely unknown. In our attempt to identify members of the TTP complex specifically involved in PPB formation, we identified a member of the TRM super-family exclusively expressed at the G2/M transition. Transcriptomic analysis, *in situ* hybridizations, promoter-GUS fusion experiments, and TRM7 sub-cellular localization all demonstrate that TRM7 exhibits a very tight expression window centered on the G2/M PPB stage. TRM7-3xYpet accumulated only in cells displaying a PPB, and prominently labeled this structure. TRM7 has thus a singular localization profile among proteins shown to label the PPB, since all other PPB-localized proteins decorate diverse microtubular or cellular structures as well (i.e. interphase microtubule arrays, spindle or phragmoplast, nuclear envelope, cytoplasm, kinetochore, cortical division site throughout mitosis, etc.; reviewed in (Duroc et al., 2010)). TRM7 thus provides the first PPB-specific marker to date, which should prove to be highly useful in the future to broaden our knowledge of the PPB function, and to uncover the sequence of molecular/cellular events leading to PPB formation and disappearance. For example, isolating isoform(s) of the TTP complex active at the G2/M transition, together with their associated proteins and putative substrates of the PP2A phosphatase is now conceivable, for example through TAP-Tag experiments on synchronized cells using TRM7 as a bait.



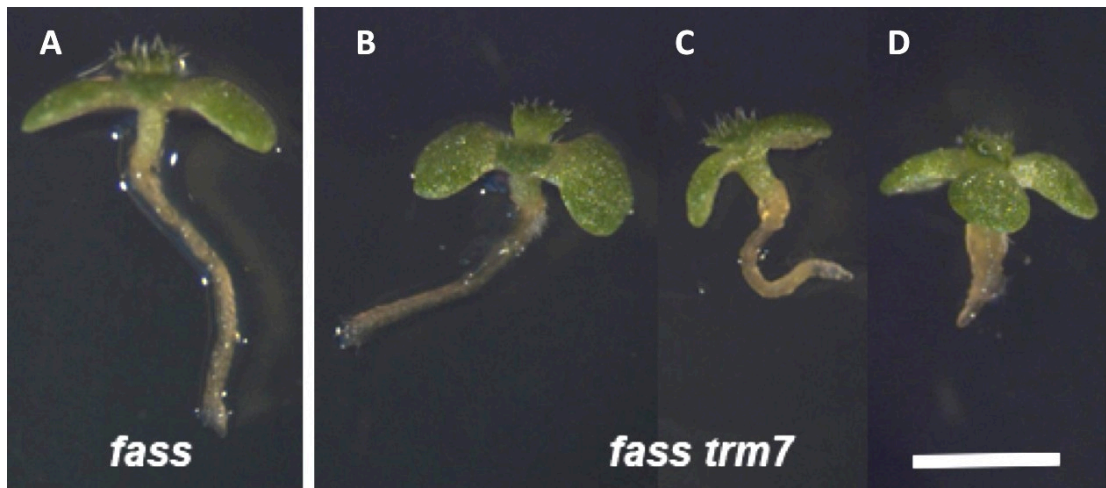
**Figure 13: The TRM6-TRM7-TRM8 family is required for PPB formation.**

(A-F) Whole-mount immuno-localizations of root tip cells of 4 day-old seedlings using anti- $\alpha$ -tubulin (green), DAPI staining (blue) and anti-KNOLLE (red). In A is shown a wild-type cell at the preprophase stage displaying KNOLLE accumulation at the trans-Golgi network and a typical PPB (arrowheads). Even if normal PPBs are observed in the *trm7* background (D), many abnormal preprophase stages are seen in this background (B, E). These are abnormal PPBs (B), named “frailed” PPBs, displaying sparse microtubules at the cortex and a high density of microtubules at the nucleus compared to typical PPBs observed in the wild-type. Absence of PPBs at the preprophase stage also occurs in *trm7* as shown in E. This is associated with a high density of microtubules around the nucleus. In the *trm6 trm7 trm8* background, a few cells at preprophase display abnormal frailed PPBs (F) while most cells divide without forming a PPB (C) and instead have dense perinuclear microtubules. Scale bars = 10  $\mu$ m.

(G) PPB defects in all combinations of *trm6*, *trm7* and *trm8* mutations. Mitotic stages in KNOLLE-positive cells were assessed using the anti- $\alpha$ tubulin antibody. The number and percentage of KNOLLE-positive cells with spindles, phragmoplasts, PPBs, frailed PPBs or without PPB are indicated as well as the number of roots observed.

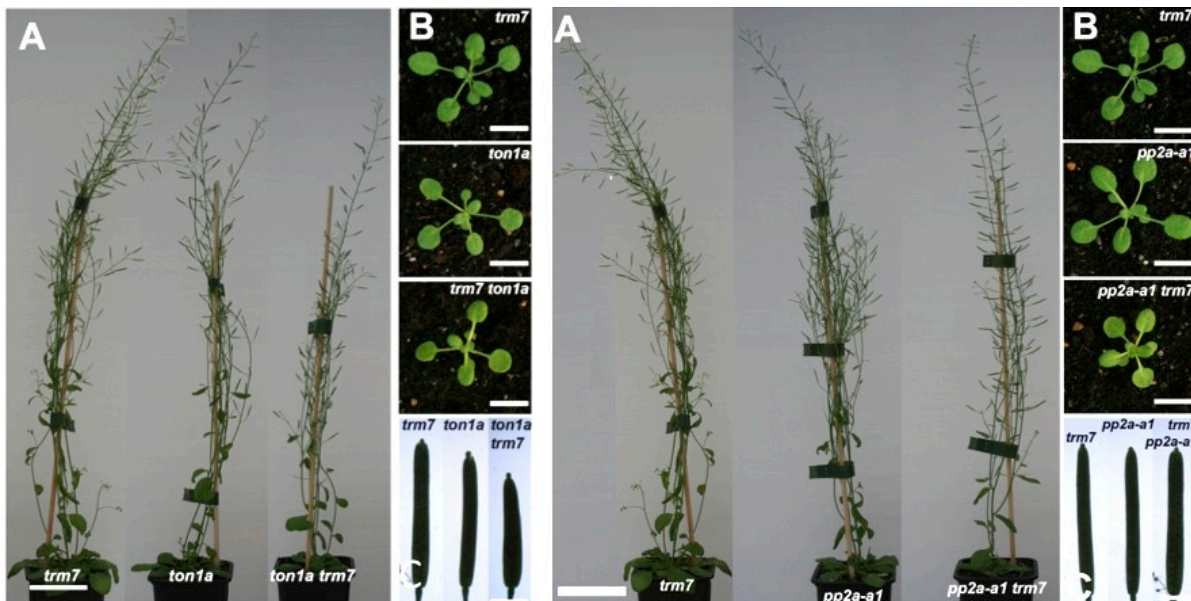
In accordance with the expression profile and localization of the protein, genetic analyses showed that TRM7 depletion significantly affects PPB formation, since in *trm7* mutants, PPBs are often frequently abnormal or missing. Moreover, knocking out the entire TRM7 subgroup (*i.e.* TRM6, TRM7 and TRM8) leads to a near complete absence of PPBs at the onset of mitosis. *trm6 trm7 trm8* mutant cells at the G2/M stage do not form a PPB with very few exceptions (8%). In the very few cells showing a PPB, this structure is malformed. This results show that we have uncovered a sub-group of TRM essential for PPB function. Given the diversity and probable functional redundancy of the TRM super-family (34 members in *Arabidopsis* (Drevensek et al., 2012), we cannot exclude at this stage that other TRMs could also be involved in this process. However, our findings based on genetic interactions, co-localization studies and TAG-tag approaches (Spinner et al., 2013) strongly suggest that the TRM6-TRM7-TRM8 subgroup contribute to a specific isoform of the TTP complex that is specifically involved in PPB formation. Sub-cellular localization studies reinforces this assumption since TON1, FASS, PP2A-A1 and TRM7 -and possibly TRM6 and TRM8 as well, this will have to be determined in the future- all accumulate at the PPB and disappear from the cortex soon after nuclear envelope breakdown (Azimzadeh et al., 2008) (Camilleri et al., 2002; Spinner et al., 2013). Based on the ability of TRM7 and TRM8 to recruit TON1 and FASS to microtubules arrays (figure 17 and (Spinner et al., 2013)), we hypothesize that TRM7, together with TRM6 and TRM8, could be a molecular adapter recruiting the TON1-FASS/PP2A activity at the cortex for PPB formation or maintenance.

To propose a precise role for TRM7 in PPB formation or maintenance, time-lapse observations will be useful to decipher the exact timing of TRM7 appearance at the cortex upon G2/M transition, and to determine whether TRM7 appears at the cortical division site before PPB formation *per se*, or whether PPB formation precedes TRM7 recruitment. Another prominent microtubular feature of *trm6 trm7 trm8* triple mutants is a strong accumulation of microtubules around the nucleus at the G2/M transition. This has already been noted for other *ttp* mutants lacking PPBs such as *ton1*, *fass*, or *pp2a-a* and *pp2a-c* mutants. The TTP complex could also be involved at the cortex in anchoring microtubules bridging the nucleus to the plasma membrane. It is also possible that these bridging microtubules play a key role in PPB formation.



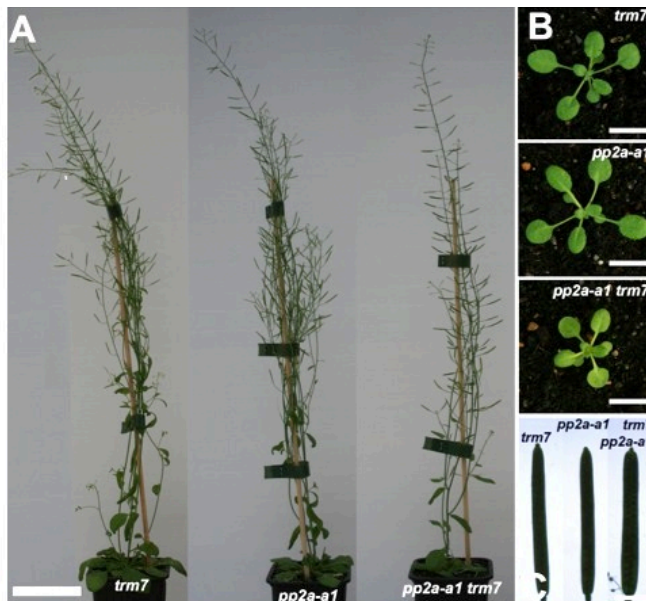
**Figure 14: Genetic interaction between *FASS* and *TRM7*.**

(A-D) 9 day-old seedlings of the *fass-14* allele (A) and the *fass-14 trm7* double mutant. Combining *trm7* mutation with the weak *fass-14* allele enhances the *fass* phenotype. The enhancer effect varies from plant to plant. Around half of *fass-14 trm7* double mutant is indistinguishable from the *fass-14* parental allele (B) whereas the other half displays a mild (C) or strong (D) phenotype compare to *fass-14*. Scale bar = 2 mm.



**Figure 15: Overview of representative *trm7*, *ton1a* and *trm7 ton1a* mutant phenotypes.**

Images of mature plants (A), rosettes (B) and siliques (C) of *trm7*, *ton1a* and *trm7 ton1a* mutants are presented. Scale bars = 1 cm (A), 10 cm (B) and 2,5 mm (C).



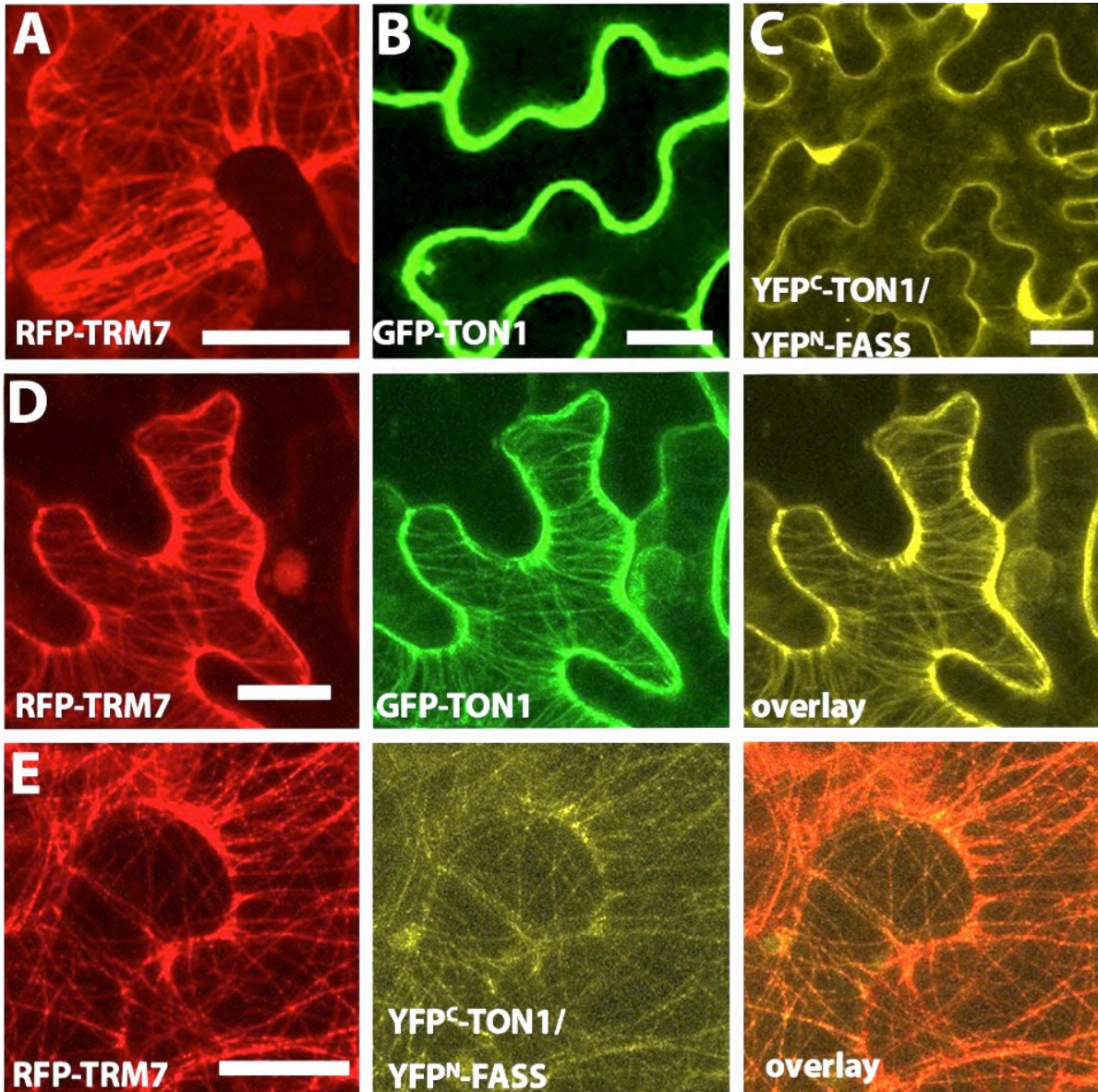
**Figure 16: Overview of representative *trm7*, *pp2a-a1* and *trm7 pp2a-a1* mutant phenotypes.**

Images of mature plants (A), rosettes (B) and siliques (C) of *trm7*, *pp2a-a1* and *trm7 pp2a-a1* mutants are presented. Scale bars = 10 cm (B) and 2,5 mm (C).

Sharp disappearance of TRM7 upon metaphase strongly suggests a rapid turnover for this protein through an active degradation process. TRM6, TRM7, TRM8 protein sequences all contain recognition signals for the APC degradosome, a complex involved in degradation of cell cycle-regulated proteins (Glotzer et al., 1991; Peters, 2006): TRM6, TRM7, TRM8 each possesses two putative D-box (figure 6) and TRM7, a KEN box (Pfleger and Kirschner, 2000) at its N-terminus. In addition TRM6 has two PEST sequences, also known to dramatically reduce protein half-life by targeting proteins for proteolytic degradation (Rogers et al., 1986). Gain- and loss-of-function experiments of the KEN and D-Box of TRM7 will be required to formally demonstrate that this motifs and the APC are involved in TRM7 turnover.

At the cellular level, depletion of the TRM6-TRM7-TRM8 subgroup is associated with strong defects in division plane orientation in all tissues examined. In *trm7* single mutants, such defects are detected very early in embryo development, starting from the first division of the zygote. In contrast, division planes defects in *trm7* roots, shoot apical meristems or cotyledon epidermis are relatively rare events. On the other hand, division plane defects are highly prominent and numerous in early *trm6 trm7 trm8* embryos, and are also readily observed in the root and the shoot apical meristems of the triple mutant, even though they do not affect all divisions. In this respect, epidermal cells of the shoot apical meristem appear much more sensitive to TRM6-TRM7-TRM8 depletion than the root tip cells, possibly reflecting strong differences in cellular organization, cell-to-cell contacts and mechanical constraints between the two types of meristem. The stronger orientation defects detected in early embryogenesis compared to defects in root tips or shoot apical meristems suggest two hypothesis: either the TRM6-TRM7-TRM8 subgroup has a specific role only in embryogenesis, or possibly that in the absence of surrounding tissues imposing physical constraints and positioning cues, early embryogenesis requires a stricter control of cell division compare to older multi-cellular organized tissues.

The *trm6 trm7 trm8* triple mutant developmental phenotype is surprisingly mild compared to the severe developmental syndrome of stunted and misshapen *ton1* or *fass* plants mutant plants (Torres-Ruiz and Jürgens, 1994; Traas et al., 1995) or *pp2ac3-c4* double mutants (Ballesteros et al., 2013). Strikingly, the absence of PPB formation in the triple *trm6 trm7 trm8* mutant plants does not induce a complete randomization of division planes as seen in *ton1* and *fass* PPB-less plants. This argues for a re-interpretation of the phenotype of *ton1* and *fass* mutants, that most presumably originates not solely from the PPB absence, but rather



**Figure 17: TRM7 targets TTP proteins to the microtubular cytoskeleton.**

A: RFP-TRM7 signal labels the cortical microtubular cytoskeletal array when expressed in *N. Benthamiana* leaf epidermal cells. B-C: GFP-TON1 (B) and BiFC TON1-FASS signal (C) localize to the cytoplasm. D-E: Upon co-expression with RFP-TRM7, the GFP-TON1 signal (D) and the BiFC TON1-FASS fluorescence (E) relocalized to microtubule arrays where it co-localized with TRM7. All micrographs are projections of Z-stack confocal images. Scale bars = 20  $\mu\text{m}$ .

from a combination of interphasic and premitotic defects. This advocates for a general role of TON1 and FASS in formation, maintenance and function of cortical microtubules arrays, both in interphase and upon mitotic entry, as already suggested (Azimzadeh et al., 2008; Spinner et al., 2013). A major implication is that for the first time, the *trm6 trm7 trm8* mutants allow to fully uncouple the mitotic function of the TTP complex from its interphasic function, contrarily to all *ttp* mutants analyzed so far, where intertwined division and interphase defects contribute to severe developmental alterations. Accordingly, such mutants allow to tackle PPB function *per se*, without interference from mutation- or drug-induced defects affecting the cortical interphase array. The availability of such specific mutants affecting TTP function at the G2/M transition represents an invaluable material to specifically assess the role of the PPB in plant cells.

These findings question the central role of the PPB in division plane positioning and seem to contradict the well established view that the PPB is an indispensable, primary determinant to properly establish the cortical division site in plant cells. Since the initial discovery of the PPB more than 45 years ago in wheat cells by Pickett-Heaps and Northcote (1966) (Pickett-Heaps and Northcote, 1966), strict correlation between PPB position and the final division site has been repeatedly observed for a variety of cell types and treatments.

Likewise, experimental obliterations of the PPB have also pointed to an important role of this structure in the determination of the ultimate division site (Mineyuki, 1999). Such converging correlative evidence contributed to establish PPB formation as causal to division site establishment. Here, division angle measurements in root tips of the triple *trm6 trm7 trm8* mutant show that although the median angle is similar to the wild-type in most cell files, division planes are far more dispersed around the median in the triple mutant. This suggests that PPB formation is not strictly needed for recognizing spatial cues and establishing the division site, but should rather be viewed as a noise-reducing structure, adding robustness to an intrinsically noisy process and reducing variations around a pre-defined axis of division.

A corollary of this view is that the definition of division plane orientation comes first, and is subsequently stabilized by a PPB-driven process. What is the primary determinant of division plane orientation? Several pieces of evidence point to the interphase cortical microtubule array, as illustrated by random positioning of division planes when the interphase array is perturbed like in *ton1* or *fass* mutants. This is also evidenced in the circumferential reorientation of interphase arrays around wounded cells that always precedes PPB appearance



Primer's name	5' 3' sequence	description
TRM7-GW1	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAC ATG GAC GTC GTT GAG AGA AAA	Amplification of the first fragment of <i>TRM7</i> coding sequence
TRM7-A	TGCTCGATCATTCTTGAAGC	
TRM7-B	CGAAACTTTACCCCCGAGAT	
TRM7-C	AAACATGAGCTGCCAGAGT	Amplification of the second fragment of <i>TRM7</i> coding sequence
RATM_15_1899 RP	CAGATCAAGAGCTCACTTGGG	Amplification of the third fragment of <i>TRM7</i> coding sequence
TRM7-GW2	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTA CAA CAA CGA CCG TTT AAG AA	
TRM7-F1	GCTCTCTCTGTCGTCATTTC	Probe for <i>in situ</i> hybridization
TRM7-R1-T7	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTGGATCCATCCATTAA GTGT	
pTRM7-U2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGGTTTAAAG GAGGAAGGGGACA	Amplification of <i>TRM7</i> promoter
pTRM7-L2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCGGGTTGT AAGTTGGGTTTC	
REC F-TRM7	ATTTAGTTAGTGATATTTTA TCTACTAGTGTTCTTAAACG GTCGTTGTTGGGAGGTGGA GGTGGAGCT	Recombination between 3xYpet and <i>TRM7</i> genomic sequence
REC R-TRM7	CAGACAATTTTCAAGAACGAAAGCTTCTTACGAAGA CA ATACAAGTTAGGCCCCAGCG GCCGCAGCAGCACC	
Test F	GAGAGATGATGATCGACGAGC	Confirmation of the presence of <i>TRM7</i> sequence
Test R	TGAGAAACCGAAGAACTCGTG	
Salk074085LP	CTGGTTGTTTTGCCTAAGCAC	<i>trm7_1</i> genotyping
Salk074085RP	TCAAAACCCCTCTATTACGCC	
Lbsalk2	GCTTTCTTCCCTTCCTTTCTC	Salk mutant genotyping
RATM_15_1899 RP	CAGATCAAGAGCTCACTTGGG	<i>trm7_2</i> genotyping
RATM_15_1899 LP	AGGGGCAAATTGAAATTTTTG	
Ds5-2a	TCCGTTCCGTTTTTCGTTTTTTAC	
TRM8-4	CCCAAAACGGTCTGCGTAAA	<i>trm8</i> genotyping
TRM8-5	TTCTCCTCGGCCTTCCATT	
G048G03 RP	AGTTGGCTGAGATTGAGTACAT	<i>trm6</i> genotyping
G048G03 LP	ATAGCCCGTTACACTCCTTG	
gabi	ATATTGACCATCATACTCATTGC	Gabi mutant allele genotyping
390	AGCACATCCTTCCTTGTGTGAAGG	<i>pp2a-1</i> wild-type allele genotyping
391	AACTTGCTTATGATGTTAAGGCGC	
307	TGTCCCGCGTCATCGGCGGGGTC	<i>pp2a-1</i> mutant allele genotyping
308	AGCACATCCTTCCTTGTGTGAAGG	
A42	ACGTTTAGCAAATTCCTAGCCT	<i>ton1a</i> genotyping
A43	ATGACTCACCCGATGCTTGA	

**Table 1 : List of primers used in this study**

in the same orientation (Hush et al., 1990). Another determinant of division plane orientation is cell geometry, since the orientation of division planes during symmetric division obeys simple geometric rules (Besson and Dumais, 2011; Minc et al., 2011). It was shown recently that the intrinsic geometry of cells can provide an organizing cue that can bias the orientation of interphase cortical microtubules (Ambrose et al., 2011). A third clue to the orientation of division planes is mechanical stress. Mechanical stress affects the cortical microtubule arrays, whether mechanical perturbations are induced by stretching or compressing tissues (Hejnowicz et al., 2000), centrifugation (Wymer et al., 1996), or wounding (Hamant et al., 2008). Mechanical forces also affect the orientation of cell division and it has been proposed that microtubules could be an integrator of mechanical stress (reviewed in (Louveau and Hamant, 2013)). Finally, hormone signaling also plays a role in division plane orientation since for example, inhibition of auxin transport induces abnormal division planes (Dhonukshe et al., 2005).

In conclusion, our results suggest that the PPB, rather than an obligate determinant of division plane position, should be viewed as part of a surveillance mechanism at the onset of mitosis, that integrates cell cycle progression, cell shape, mechanical constraints and signaling, in order to generate robustness in cell division geometry.

## Material and Methods

### Biological material and growth conditions

*Arabidopsis* seedlings were grown in the greenhouse under long-day conditions (16h of light and 8h of dark) except for *in situ* hybridizations cultivated in short-day conditions (8h of light). *Arabidopsis* seedlings were grown *in vitro* under long-day conditions (16h of light and 8h of dark; 21°C) on “*Arabidopsis*” medium (5 mM KNO<sub>3</sub>, 2,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 X micro elements (1000 X micro elements: 70 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 14 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 0,2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0,01 mM CoCl<sub>2</sub>), 1 X vitamins (500 X vitamins: 5% Myo-Inositol, 0,05% panthotenate, 0,05% niacin, 0,05% pyridoxine, 0,05% thiamine, 0,005% biotin), 0,0008% BCP, 0,07% MES, 1% saccharose, 0,005% ferric citrate, 0,7% agar, pH 5,8). Seedlings used to study TRM7-3xYpet localization were grown on a half-strength Murashige and Skoog medium at pH 5,7. Plants used to measure the total root size and the number of lateral roots per main root were grown vertically on the “Root In Vitro” media: 5mM KNO<sub>3</sub>, 2,5 mM Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 2,5 mM



KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 4 X micro elements (1000 X micro elements: 70 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 14 mM MnCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CuSO<sub>4</sub>, 0,2 mM Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl, 1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0,01 mM CoCl<sub>2</sub>), 1 X vitamins (500 X vitamins: 5% Myo-Inositol, 0,05% panthotenate, 0,05% niacin, 0,05% pyridoxine, 0,05% thiamine, 0,005% biotin), 0,0008% BCP, 0,07% MES, 1% saccharose, 0,005% ferric citrate, 1% Phytblend).

*Nicotiana benthamiana* plants were grown in the green house under 16h of light, a diurnal temperature of 25°C and a nocturnal temperature of 20°C.

Mutant used in the study were in the Col-0 background except for the *trm7\_2* allele (Nossen background). T-DNA insertion mutants for *TRM7* (*trm7-1*: SALK\_074085, *trm7-2*: RATM\_15\_1899\_1), *TRM6* (GABI\_048G03) and *TRM8* (SALK\_150274) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre. Sequencing identified T-DNA insertion sites. *pp2a-a1* and *ton1a* mutants were given by A. Delong (Brown University, RI, USA) and V. Kirik (Illinois State University, IL, USA) respectively. *ton1a* mutation creates a Tail restriction site allowing plants genotyping by digestion of the PCR product amplified by A42/A43 primers (Table 1). The *fass* mutant used in this study is the *fass-14* allele (Spinner et al., 2013).

The Cerulean-TUA1 microtubule marker, gift of D. Ehrhardt (Stanford University, USA), was introduced in TRM7-3xYpet plants by transformation.

The DH10B *Escherichia coli* strain was used for cloning. Bacteria were cultivated at 37°C in a LB medium (Bactotryptone 1% (m/v), yeast extract 0,5% (m/v), NaCl 170 mM, pH 7,5) (Sambrook et al., 1989). For homologous recombination, the *Escherichia coli* strain SW105 (DH10B [*lcl857(cro--bioA) <> araCPBADflpe*]) was also used and cultivated at 28°C.

### DNA extraction from plants and genotyping

Plant material (piece of rosette leaf or seedling) was frozen and crushed. Tissues were incubated in 200 µL of extraction buffer (200 mM Tris pH 9.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA and 0,5% SDS) at 50°C for 15 min and centrifuged for 10 min at 4°C. 120 µL of isopropanol was added to 120 µL of supernatant. After 10 min of centrifugation at 10 000g, DNA was washed with 100 µL of 70% ethanol then resuspended DNA in 100 µL of TE (Tris Hcl 10 mM, EDTA 1 mM). Genotyping PCR was performed on 1 µL genomic DNA. The primers used to genotype mutants are indicated in table 1.



### Root measurements

The total root size and the number of lateral roots per main root were calculated using the EZ-Rhizo software (Armengaud et al., 2009).

### Constructs design

*TRM7* promoter was amplified by PCR from the BAC F20A2 with specific primers flanked by AttB1 and AttB2 sites (table 1), cloned into the Gateway vector pDONR207 using BP recombination (Invitrogen) and sequenced. The expression vector was obtained after LR recombination (Invitrogen) between this entry vector and a destination vector derived from the pBI101 in which the Gateway cassette was introduced (pBI101-R1R2-GUS, Bertrand Dubreucq, IJPB, France).

The G60832 clone containing the *TRM7* open-reading frame (ORF) was obtained from the ABRC but lacked the first 477 bp of the ORF and presented two mutations at the end of *TRM7* ORF. In order to obtain the entire wild-type *TRM7* ORF (2463 bp), we amplified the first 520 bp of the ORF from a yeast cDNA library available in the lab (Spinner et al., 2013). The middle part of the fragment (from 501 to 2008 bp), was amplified from the G60832 clone and the last fragment (from 1880 to 2463 bp) was amplified from the BAC F20A2. All three fragments have overlapping ends that allowed us to produce, by PCR, the full-length ORF. The full length *TRM7* ORF was cloned into the Gateway pDONR207 vector using BP recombination (Invitrogen). This entry vector was sequenced and used in LR recombination (Invitrogen) with the destination vector pH7WGR2 for expression of N-terminal RFP fusion.

### Generation of TRM7-3xYpet lines

A 3xYpet tag was fused to the C-terminus of *TRM7* by recombineering (Zhou et al., 2011). The JAtY clone 53E09 (purchased from the John Innes Center, Norwich, UK) was selected based on bacterial artificial chromosome end sequence information from the database <http://arabidopsislocalizome.org/index.htm>. In this clone, *TRM7* coding sequence is preceded and followed by 5 and 50 kb of genomic DNA, respectively. The JAtY transformation-competent bacterial artificial chromosome was transferred to *Escherichia coli* strain SW105, kindly provided by S. Creekmore (National Cancer Institute – Frederick MD, USA). A recombineering cassette was generated by inserting the ampicillin resistance gene flanked by flippase recognition sites at the 3' end of the codon-optimized 3xYpet tag (Zhou et al., 2011).



The cassette was amplified by PCR using two long recombineering primers: the forward primer included 50 nucleotides homologous to the region upstream the STOP codon of *TRM7* and the reverse primer included 50 nucleotides homologous to the region downstream the STOP codon *TRM7* (figure 13). Cassette recombination into the JatY clone was performed by electroporation of the recombination cassette into a SW105 bacteria carrying that JAtY 53E09 clone followed by an incubation of 1 H at 28°C and three washing steps (1 x salts, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,4% glucose and 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>). The ampicillin marker was removed from recombineered clone upon induction of the *FLIPPASE* gene expression by 10% L-arabinose for 3h at 28°C. The junctions between TRM7 and the 3xYpet tag, as well as the introduced into *Agrobacterium tumefaciens*, which was used to transform wild-type, and *trm7 Arabidopsis* plants by floral dipping. Transformed lines were selected based on Basta resistance and further screen by PCR, ensuring the presence of tagged *TRM7* gene. T2 seedlings were analyzed for YFP fluorescence. 20 TRM7-3xYpet lines were analyzed, 14 displaying a weak but consistent fluorescent signal.

### Plant transformation

Transient expression in *N. Benthamiana*: Each expression vector was introduced in *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 (pMP90) by electroporation. *Agrobacterium* bacterial cultures were incubated overnight at 28°C with agitation. Each culture was pelleted, washed, and resuspended in the infiltration buffer (13 g/L S-medium (Duchefa) and 40 g/L sucrose, pH 5.7) to an OD<sub>600</sub> of 0.5. The inoculum was delivered to the lamina tissue of *N. Benthamiana* leaves by gentle pressure infiltration through the lower epidermis. To enhance transient expression of RFP fusion protein, the viral suppressor of gene silencing p19 (Voinnet et al., 2003) was coexpressed in *N. benthamiana* leaves. For coinfiltration experiments, equal volumes of the two (or three or four) cultures of OD<sub>600</sub> of 0.5 were mixed before agroinfiltration.

Stably transformation in *A. thaliana*: 5 mL of agrobacteria preculture were cultivated in 1 L of LB medium with gentamicin (50 µg/mL), rifampicin (25 µg/mL) and the appropriate antibiotic for 14H at 28°C to obtain an OD<sub>600</sub> of 0,8. The agrobacterium culture was pelleted and resuspended in infiltration buffer (saccharose 5% (m/v), Silwet 0,02% (m/v), MgCl<sub>2</sub> 10 mM). For transformation of the JAtYt vectors, saccharose was replaced by glucose. 4 to 6-week-old plants were immersed in the infiltration solution for 2 min. Transformed seeds (T1





generation) were selected *in vitro* on a medium containing cefotaxin (200 µg/mL) and the appropriate antibiotic or in the greenhouse for BASTA selection.

### **GFP/RFP and YFP Imaging**

Tobacco leaves were mounted in water and viewed directly using a LSM 710 confocal microscope (Carl Zeiss). Samples were excited in sequential mode at 488 nm with an emission band of 493-558 nm for GFP detection and at 561 nm with an emission band of 578-657 nm for mRFP detection.

TRM7-3xYpet *Arabidopsis* roots of 3 day-old seedlings were fixed in 4% paraformaldehyde and 0,1% triton under vacuum for 1h, washed in PBS and incubated 15 min in methanol. Tissues were mounted in citifluor and viewed using a hybrid detector of a TCS-SP5 confocal laser microscope (Leica) using a 20 X 0,7 objective. Samples were excited in sequential mode at 514 nm with an emission band of 520-600 nm for YFP detection. Image focusing on one cell were taken by photon counting.

TRM7-3xYpet *Arabidopsis* roots of 3 day-old seedlings were mounted in water for time-lapse observations and viewed using a hybrid detector of a TCS-SP5 confocal laser microscope (Leica) using a 20 X 0,7 objective. Samples were excited at 514 nm with an emission band of 520-600 nm for YFP detection and at 458 nm with an emission band of 461-510 nm for CER detection.

### **Propidium iodide (PI) staining and imaging**

For embryo and root observations, seeds and 5 day-old *Arabidopsis* seedlings were fixed overnight at 4°C in 50% methanol and 10% acetic acid. After two washings in water, tissues were incubated in 1% periodic acid for 20 min and washed 3 times with water. Tissues were stained with PI (0,1 mg/mL) for 1h and washed. Hydrate chlorate (4 g in 1 mL of glycerol and 2 mL of water) was used to clarify the tissues. Seedlings were mounted in Hoyer's medium (30 g of arabic gum, 200g of hydrate chlorate, 20 g of glycerol and 50 mL of water).

For epidermis observations, 3 day-old *Arabidopsis* seedlings were incubated in PI (1 mg/mL) for 15 min and cotyledons were mounted in water. Fluorescence of PI stained tissues was recorded after an excitation of 514 nm using a detection band of 570-650 nm.



### **FM4-64 staining and imaging**

Shoot apical meristems from plants grown in short-days conditions were dissected and incubated in the FM4-64 dye (200 µg/mL) for 30 min, followed by two washing steps. FM4-64 was visualized using 488 nm laser excitation and 620 to 800 nm spectral detection with a Leica SP2 confocal microscope using a long-distance lens. Projections of the meristem surface were generated using Merryproj software (de Reuille et al., 2005).

### **β-glucuronidase (GUS) staining**

Flowers of T1 plants and T2 seedlings, grown *in vitro* without antibiotic, were used for GUS staining. 10 independent lines were studied. Seedlings were incubated in GUS buffer (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, X-gluc 0,8 mM (in DMSO)), vacuum infiltrated for 10 min and incubated for 3 hours at 37°C. After removing GUS buffer, tissues were destained in 95% ethanol during 4 hours and then conserved in 70% ethanol. Flowers were incubated in the fixation buffer (6 volumes of 95% ethanol, 3 volumes of chloroform and 1 volume of water) and vacuum infiltrated for 2 min 30. Fixation buffer was replaced by GUS buffer without X-gluc (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, Triton X-100 0,1%). Tissues were washed twice with GUS buffer, vacuum infiltrated for 5 min in the same buffer and washed one more time. Flowers were vacuum infiltrated for 30 min in GUS buffer with X-gluc (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, Triton X-100 0,1%, X-gluc 1,6 mM (in DMSO)) and incubated overnight at 37°C. The next morning, tissues were destained in 95% ethanol during 4 hours and then conserved in 70% ethanol.

### ***In situ* hybridizations**

An antisense probe was amplified from DNA of the BAC F20A2 using one sense primer and one antisense primer that included T7 RNA polymerase binding site in 5' (TGTAATACGACTCACTATAGGGC). The probe is produced using an *in vitro* transcription kit (Promega) allowing labeling of RNA by DIG-11-UTP (Roche), UTP bound by digoxigenin. Shoot apical meristems were fixed with 4% formaldehyde in PBS under vacuum for 1h. Tissues were dehydrated in a graded ethanol series (10, 30, 50, 70 and 95%) and incubated overnight in 95% ethanol with 0,1% eosin (Sigma). HistoClear (Prolabo) progressively replaced ethanol until immersion in 100% HistoClear. Then, tissues were incubated in 50% HistoClear and 50% paraffin (Labonord) and in 100% paraffin overnight at



60°C. Paraffin sections (8  $\mu\text{m}$  thick) were cut with a steel blades (feather S 35) on a microtome and attached to precoated slides (DAKO) recovered by sterile water. After dewaxing in histoclear and rehydration in decreasing ethanol (100-95-85-70-50-30-0%) and increasing salts (0-0-0,42-0,85-0,85-0,85-0,85%) series, sections were incubated for 10 min with Proteinase K (1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Tris EDTA) at 37°C. Tissues sections were dehydrated through the same ethanol and salts series and conserved at 4°C. A pre-hybridization step was performed for 1h at 42°C in 50% deionized formamide, 5 x SSC, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  heparin, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  tRNA (Roche) and 0,1% Tween 20. Tissue sections were hybridized overnight at 42°C in hybridization buffer containing approximately 100 ng/mL of antisense DIG-labeled RNA probe. 15 mL of hybridization buffer contains 5 mL of formamide, 2 mL of dextran sulphate, 5 mL of 20 x SSC, 1 mL of tRNA (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 750  $\mu\text{L}$  of Tween 20%, 250  $\mu\text{L}$  of 50 x Denhardt's and 1 mL of salts solution 10X (3 M NaCl, 100 mM Tris Hcl pH 8, 100 mM of sodium phosphate buffer pH 6,8 and 50 mM EDTA pH 8). An anti-digoxigenin antibody with phosphatase (Roche) was used to detect RNA-RNA hybrids labeled with digoxigenin. Revelation was performed with NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) (Roche) and BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Roche). Slides are mounted in citifluor, cover with cover slip and conserved at 4°C. Images were taken with an Apotome microscope (Zeiss).

### **Immunolocalizations**

*Arabidopsis* roots of 3 to 4 day-old seedlings were processed for wholemout immunolocalization. Tissues were fixed in a 4% paraformaldehyde and 0,1% triton buffer for 1h under vacuum, then washed in 0,1% triton buffer for 10 min. Then, samples were permeabilized in methanol for 10 min and rehydrated in PBS for 10 min. Cell walls were digested using the following buffer for 30 min: 25 mM MES, pH 5,5, 8 mM  $\text{CaCl}_2$ , 600 mM mannitol, 0,02% pectolyase and 0,1% macerozyme. Non-specific sites were blocked for 20 min with a 0,1% BSA solution. Tissues were hybridized with the B-5-1-2 monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma) and the anti-KNOLLE antibody (kind gift of G. Jürgens, University of Tübingen, Germany) overnight at 4°C. The next day, tissues were washed for 15 min in 50 mM glycine solution, incubated with secondary antibodies for 1h and washed again. Seedlings were mounted in citifluor and DAPI.



## Acknowledgments

We thank Alison Delong for the *pp2a-a1* mutant, Victor Kirik for the *ton1a* mutant and David Ehrhardt for the Cerulean-TUA1 marker line. We also thank Jean-Sébastien Ferré, Lilian Dahuron and Patrick Grillot for taking care of the plants and Olivier Grandjean for his help on the microscopy platform. We thank the “Region Ile de France” and “Conseil Général des Yvelines” for supporting our microscopy platform. E.S. received a PhD fellowship from the French Ministry for Research. Y.D. was funded by the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0056). This work was supported from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-08-BLAN-0056).

## Bibliography

- Ambrose, C., Allard, J.F., Cytrynbaum, E.N., and Wasteneys, G.O.** (2011). A CLASP-modulated cell edge barrier mechanism drives cell-wide cortical microtubule organization in *Arabidopsis*. *Nature communications* **2**, 430.
- 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.
- Armengaud, P., Zambaux, K., Hills, A., Sulpice, R., Pattison, R.J., Blatt, M.R., and Amtmann, A.** (2009). EZ-Rhizo: integrated software for the fast and accurate measurement of root system architecture. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **57**, 945-956.
- Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amieur, N., Parcy, F., Pastuglia, M., and Bouchez, D.** (2008). *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* **20**, 2146-2159.
- Ballesteros, I., Dominguez, T., Sauer, M., Paredes, P., Duprat, A., Rojo, E., Sanmartin, M., and Sanchez-Serrano, J.J.** (2013). Specialized functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in *Arabidopsis*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **73**, 862-872.
- Bergmann, D.C., and Sack, F.D.** (2007). Stomatal development. *Annu Rev Plant Biol* **58**, 163-181.
- Besson, S., and Dumais, J.** (2011). Universal rule for the symmetric division of plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 6294-6299.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D.** (2002). The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel PP2A regulatory subunit essential for the control of cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**, 833-845.
- Colon-Carmona, A., You, R., Haimovitch-Gal, T., and Doerner, P.** (1999). Technical advance: spatio-temporal analysis of mitotic activity with a labile cyclin-GUS fusion protein. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **20**, 503-508.





- de Reuille, P.B., Bohn-Courseau, I., Godin, C., and Traas, J.** (2005). A protocol to analyse cellular dynamics during plant development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **44**, 1045-1053.
- Dhonukshe, P., Mathur, J., Hulskamp, M., and Gadella, T.W., Jr.** (2005). Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biol* **3**, 11.
- Drevensek, S., Goussot, M., Duroc, Y., Christodoulidou, A., Steyaert, S., Schaefer, E., Duvernois, E., Grandjean, O., Vantard, M., Bouchez, D., and Pastuglia, M.** (2012). The Arabidopsis TRM1-TON1 Interaction Reveals a Recruitment Network Common to Plant Cortical Microtubule Arrays and Eukaryotic Centrosomes. *Plant Cell* **24**, 178-191.
- Dubrovsky, J.G., Sauer, M., Napsucialy-Mendivil, S., Ivanchenko, M.G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., and Benkova, E.** (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 8790-8794.
- Duroc, Y., Bouchez, D., and Pastuglia, M.** (2010). The preprophase band and division site determination in land plants. In *The Plant Cytoskeleton*, B. Liu, ed (New York: Springer USA), pp. 145-185.
- Garbers, C., DeLong, A., Deruere, J., Bernasconi, P., and Soll, D.** (1996). A mutation in protein phosphatase 2A regulatory subunit A affects auxin transport in Arabidopsis. *EMBO J.* **15**, 2115-2124.
- Gauthier, N.P., Larsen, M.E., Wernersson, R., de Lichtenberg, U., Jensen, L.J., Brunak, S., and Jensen, T.S.** (2008). Cyclebase.org--a comprehensive multi-organism online database of cell-cycle experiments. *Nucleic acids research* **36**, D854-859.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- Hamada, T., Igarashi, H., Itoh, T.J., Shimmen, T., and Sonobe, S.** (2004). Characterization of a 200 kDa microtubule-associated protein of tobacco BY-2 cells, a member of the XMAP215/MOR1 family. *Plant Cell Physiol* **45**, 1233-1242.
- Hamant, O., Heisler, M.G., Jonsson, H., Krupinski, P., Uyttewaal, M., Bokov, P., Corson, F., Sahlín, P., Boudaoud, A., Meyerowitz, E.M., Couder, Y., and Traas, J.** (2008). Developmental patterning by mechanical signals in Arabidopsis. *Science* **322**, 1650-1655.
- Hejnowicz, Z., Rusin, A., and Rusin, T.** (2000). Tensile tissue stress affects the orientation of cortical microtubules in the epidermis of sunflower hypocotyl. *Journal of Plant Growth Regulation* **19**, 31-44.
- Himanen, K., Boucheron, E., Vanneste, S., de Almeida Engler, J., Inze, D., and Beekman, T.** (2002). Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *The Plant cell* **14**, 2339-2351.
- Hush, J.M., Hawes, C.R., and Overall, R.L.** (1990). Interphase microtubule re-orientation predicts a new cell polarity in wounded pea roots. *Journal of Cell Science* **96**, 47-61.
- Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y., and Watanabe, A.** (1998). A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *The Plant cell* **10**, 331-341.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., and Watanabe, A.** (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *The Plant cell* **13**, 1891-1905.



- Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., and Bevan, M.W.** (1987). GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal* **6**, 3901-3907.
- 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.
- Kirik, A., Ehrhardt, D.W., and Kirik, V.** (2012). TONNEAU2/FASS regulates the geometry of microtubule nucleation and cortical array organization in interphase Arabidopsis cells. *The Plant cell* **24**, 1158-1170.
- Kirik, V., Herrmann, U., Parupalli, C., Sedbrook, J.C., Ehrhardt, D.W., and Hulskamp, M.** (2007). CLASP localizes in two discrete patterns on cortical microtubules and is required for cell morphogenesis and cell division in Arabidopsis. *J Cell Sci* **120**, 4416-4425.
- Lauber, M.H., Waizenegger, I., Steinmann, T., Schwarz, H., Mayer, U., Hwang, I., Lukowitz, W., and Jurgens, G.** (1997). The Arabidopsis KNOLLE protein is a cytokinesis-specific syntaxin. *J. Cell Biol.* **139**, 1485-1493.
- Lee, Y.K., Kim, G.T., Kim, I.J., Park, J., Kwak, S.S., Choi, G., and Chung, W.I.** (2006). *LONGIFOLIA1* and *LONGIFOLIA2*, two homologous genes, regulate longitudinal cell elongation in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 4305-4314.
- Lloyd, C.W.** (1991). How does the cytoskeleton read the laws of geometry in aligning the division plane of plant cells? *Development Supplement* **1**, 55-65.
- Louveaux, M., and Hamant, O.** (2013). The mechanics behind cell division. *Curr Opin Plant Biol* **16**, 774-779.
- Marc, J., Granger, C.L., Brincat, J., Fisher, D.D., Kao, T., McCubbin, A.G., and Cyr, R.J.** (1998). A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *The Plant cell* **10**, 1927-1940.
- Martin, K., Kopperud, K., Chakrabarty, R., Banerjee, R., Brooks, R., and Goodin, M.M.** (2009). Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **59**, 150-162.
- Mayer, Y., Torres Ruiz, R.A., Berleth, T., Misera, S., and Jurgens, G.** (1991). Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. *Nature* **353**, 402-407.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., and Murray, J.A.** (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol Biol* **53**, 423-442.
- Minc, N., Burgess, D., and Chang, F.** (2011). Influence of cell geometry on division-plane positioning. *Cell* **144**, 414-426.
- Mineyuki, Y.** (1999). The preprophase band of microtubules : its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **187**, 1-49.
- Mineyuki, Y., and Gunning, B.E.S.** (1990). A role for preprophase bands of microtubules in maturation of new cell walls, and a general proposal on the function of preprophase band sites in cell division in higher plants. *Journal of Cell Science* **97**, 527-537.
- Mineyuki, Y., Wick, S.M., and Gunning, B.E.S.** (1988). Preprophase Bands of Microtubules and the Cell-Cycle - Kinetics and Experimental Uncoupling of Their Formation from the Nuclear-Cycle in Onion Root-Tip Cells. *Planta* **174**, 518-526.
- Muller, 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.
- Peters, J.M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 644-656.



- 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.
- Pickett-Heaps, J.D., and Northcote, D.H.** (1966). Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. *J. Cell Sci.* **1**, 109-120.
- Rasmussen, C.G., Sun, B., and Smith, L.G.** (2011). Tangled localization at the cortical division site of plant cells occurs by several mechanisms. *Journal of cell science* **124**, 270-279.
- Reichardt, I., Stierhof, Y.D., Mayer, U., Richter, S., Schwarz, H., Schumacher, K., and Jurgens, G.** (2007). Plant cytokinesis requires de novo secretory trafficking but not endocytosis. *Curr. Biol.* **17**, 2047-2053.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Smith, L.G., Gerttula, S.M., Han, S.C., and Levy, J.** (2001). TANGLED1: A microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *Journal of Cell Biology* **152**, 231-236.
- Spinner, L., Pastuglia, M., Belcram, K., Pegoraro, M., Goussot, M., Bouchez, D., and Schaefer, D.** (2010). The function of TONNEAU1 in moss reveals ancient mechanisms of division plane specification and cell elongation in land plants. *Development* **137**, 2733-2742.
- Spinner, L., Gadeyne, A., Belcram, K., Goussot, M., Moison, M., Duroc, Y., Eeckhout, D., De Winne, N., Schaefer, E., Van De Slijke, E., Persiau, G., Witters, E., Gevaert, K., De Jaeger, G., Bouchez, D., Van Damme, D., and Pastuglia, M.** (2013). A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nature communications* **4**, 1863.
- Struk, S., and Dhonukshe, P.** (2013). MAPs: cellular navigators for microtubule array orientations in Arabidopsis. *Plant cell reports.*
- Torres-Ruiz, R.A., and Jürgens, G.** (1994). Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* **120**, 2967-2978.
- Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D., and Caboche, M.** (1995). Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* **375**, 676-677.
- Twell, D., Park, S.K., Hawkins, T.J., Schubert, D., Schmidt, R., Smertenko, A., and Hussey, P.J.** (2002). MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat. Cell Biol.* **4**, 711-714.
- Van Damme, D.** (2009). Division plane determination during plant somatic cytokinesis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 745-751.
- Van Damme, D., Vanstraelen, M., and Geelen, D.** (2007). Cortical division zone establishment in plant cells. *Trends Plant Sci.* **12**, 458-464.
- Venverloo, C.J., and Libbenga, K.R.** (1987). Regulation of the plane of cell division in vacuolated cells. I. The function of nuclear positioning and phragmosome formation. *J Plant Physiol* **131**, 267-284.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and 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.



- Walker, K.L., Muller, S., Moss, D., Ehrhardt, D.W., and Smith, L.G.** (2007). Arabidopsis TANGLED Identifies the Division Plane throughout Mitosis and Cytokinesis. *Curr Biol* **17**, 1827-1836.
- Wick, S.M., and Duniec, J.** (1983). Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. Transition between the pre-prophase band and the mitotic. *Protolasma* **122**, 45-55.
- Wright, A.J., Gallagher, K., and Smith, L.G.** (2009). *discordial* and *alternative discordial* function redundantly at the cortical division site to promote preprophase band formation and orient division planes in maize. *Plant Cell* **21**, 234-247.
- Wymer, C.L., Wymer, S.A., Cosgrove, D.J., and Cyr, R.J.** (1996). Plant cell growth responds to external forces and the response requires intact microtubules. *Plant Physiol* **110**, 425-430.
- Xu, X.F.M., Zhao, Q., Rodrigo-Peiris, T., Brkljacic, J., He, C.S., Muller, S., and Meier, I.** (2008). RanGAP1 is a continuous marker of the Arabidopsis cell division plane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18637-18642.
- Yasuhara, H., Muraoka, M., Shogaki, H., Mori, H., and Sonobe, S.** (2002). TMBP200, a microtubule bundling polypeptide isolated from telophase tobacco BY-2 cells is a MOR1 homologue. *Plant Cell Physiol* **43**, 595-603.
- Zhou, R., Benavente, L.M., Stepanova, A.N., and Alonso, J.M.** (2011). A recombineering-based gene tagging system for Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **66**, 712-723.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.



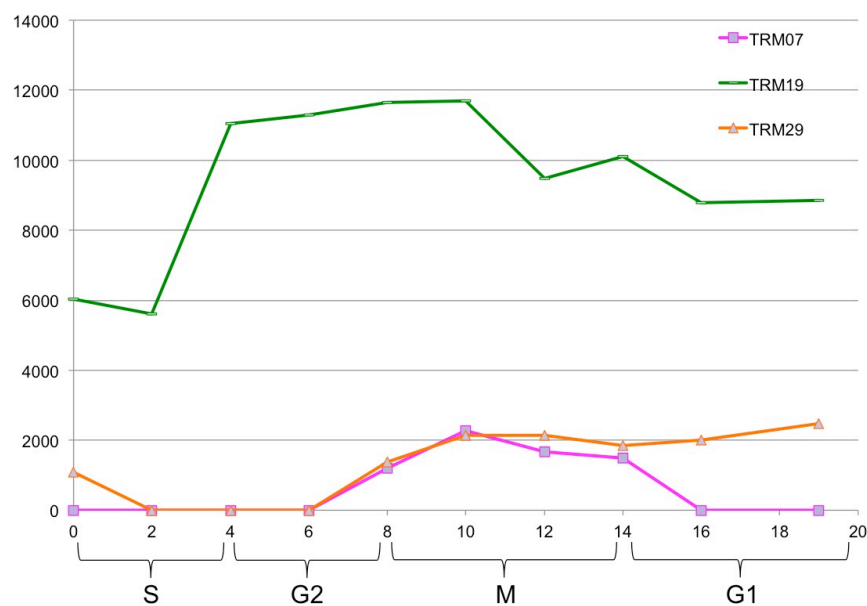


Etude de l'expression des gènes  
*TRM19* et *TRM29*

---

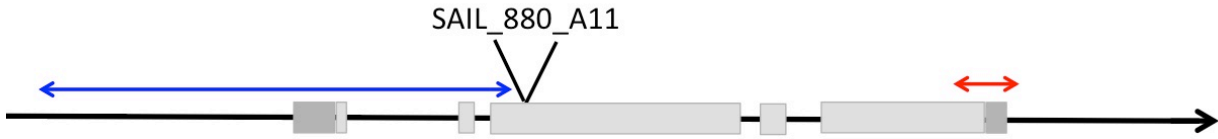


Les données transcriptomiques sur cellules d'*Arabidopsis* synchronisées disponibles suggèrent qu'en dehors de *TRM7* qui montre un profil mitotique caractéristique (Cyclebase : periodic rank = 25) (Gauthier et al., 2008), deux autres gènes *TRMs*, *TRM19* et *TRM29*, semblent montrer un pic d'expression lors de la mitose (figure 1) (Menges et al., 2003). L'expression du gène *TRM19* est globalement élevée dans les cultures cellulaires, quelle que soit la phase du cycle. Bien que l'analyse statistique sur les données existantes ne permette pas de conclure avec certitude sur le caractère cyclique de son expression (Gauthier et al., 2008), en fin de phase S, son expression double jusqu'en fin de mitose puis diminue légèrement. Contrairement à l'expression de *TRM19*, celle du gène *TRM29* montre un caractère cyclique significatif avec un pic d'expression prédit en G1 (Cyclebase : periodic rank = 84) (Gauthier et al., 2008) : elle est faible en phase S puis augmente au cours de la phase G2 et reste stable pendant la mitose et la phase G1. Pour affiner ces données et déterminer si le patron d'expression de ces deux gènes est cohérent avec un rôle en mitose, j'ai étudié leur expression dans les tissus méristématiques d'*Arabidopsis*, où les divisions cellulaires sont fréquentes.

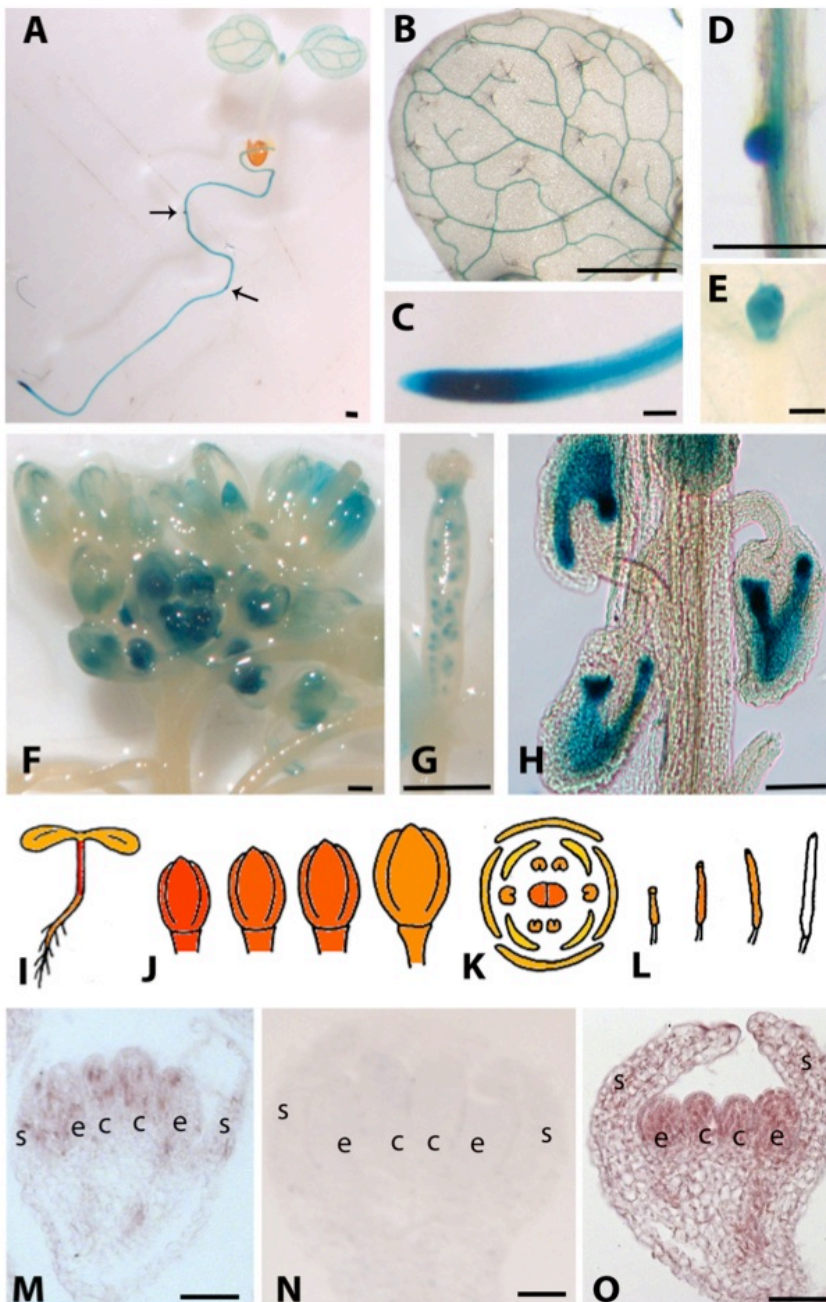


**Figure 1 : Evolution de l'expression des gènes *TRM19* et *TRM29* dans des cultures cellulaires synchronisées** (Menges et al., 2003). Ces résultats ont été obtenus à partir de cultures cellulaires synchronisées à l'aphidicoline, drogue qui inhibe l'activité de l'ADN polymérase et bloque les cellules en phase S. L'aphidicoline est éliminée du milieu de culture par lavages, permettant aux cellules de redémarrer un cycle cellulaire en phase S de manière synchronisée (t=0). En abscisse, le temps est donné en heure. En ordonnée, le niveau d'expression est donné en valeur absolue. En rose, niveau d'expression de *TRM7* ; en vert, niveau d'expression de *TRM19* ; en orange, niveau d'expression de *TRM29*.

### At3g5340



**Figure 2 : Représentation schématique du gène *TRM19*.** Les boîtes gris foncé représentent les régions non traduites en 5' et 3' du gène. Les boîtes gris clair représentent les exons. La position du T-DNA du mutant d'insertion *SAIL\_880\_A11* est représentée dans le 3<sup>ème</sup> exon. La flèche bleue représente la séquence utilisée lors de l'étude du promoteur. La flèche rouge représente la sonde utilisée pour l'hybridation *in situ* dans les boutons floraux (500 pb).



**Figure 3 : Patron d'expression de *TRM19*.**

A-H : Patron d'expression de *TRM19* révélé par l'activité du gène codant la  $\beta$ -glucuronidase sous contrôle du promoteur *TRM19*. A : plantule de 7 jours, les racines secondaires émergentes sont indiquées par les flèches noires, B : feuille de plantule de 15 jours, C : pointe racinaire d'une plantule de 7 jours, D : racine émergente d'une plantule de 15 jours, E : méristème apical caulinaire d'une plantule de 7 jours, F : méristème apical d'une plante de 6 semaines, G : silique, H : graines accrochées à la silique. I-L : patron d'expression prédit par eFP Browser. I : plantule, J : boutons floraux, K : diagramme floral, L : siliques en développement. M-O : les boutons floraux ont été hybridés avec une sonde antisens *HISTONE 4* (M), une sonde sens (N) et une sonde antisens *TRM19* (O). s, sépale ; e, primordium d'étamine ; c, primordium de carpelle.

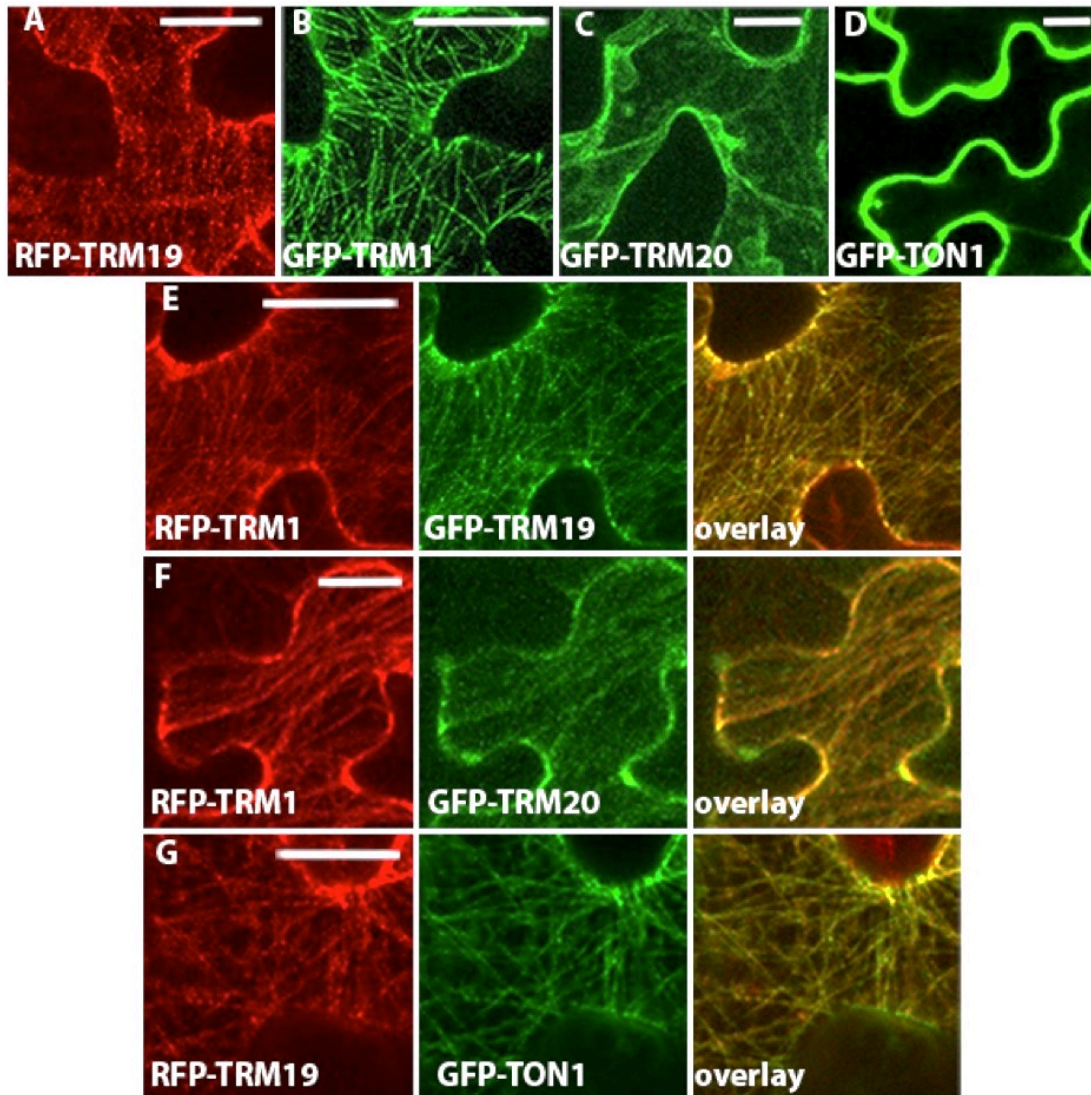
Barre d'échelle : A, B, F, G : 1 mm ; C, D, E, H : 200  $\mu$ m ; M-O : 30  $\mu$ m

## 1. Patron d'expression et localisation subcellulaire de *TRM19*

### 1. 1. Patron d'expression de *TRM19*

Deux techniques complémentaires ont été utilisées pour étudier le patron d'expression de *TRM19* : des hybridations *in situ* afin de révéler la cyclicité de l'expression du gène dans les tissus en division, et une fusion traductionnelle entre *TRM19*<sup>1-64</sup> et le gène codant la  $\beta$ -glucurodinase sous contrôle du promoteur *TRM19*, pour analyser le profil tissulaire de l'expression du *TRM19*. La séquence choisie correspond à 2200 pb de promoteur et à 1400 pb de gène permettant l'expression des 64 premiers acides aminés de *TRM19*. Nous avons inclus le début du gène car il contient deux longs introns qui peuvent potentiellement contenir des séquences régulatrices de l'expression du gène. Nous avons étudié 10 lignées transformées indépendantes qui montraient globalement le même patron d'expression pour le gène *TRM19* (figure 3A-H) après incubation avec le substrat de la  $\beta$ -glucurodinase, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronique (X-gluc). Chez les plantules de 7 et 15 jours, les tissus vasculaires de la racine et des cotylédons ainsi que le méristème apical caulinaire sont colorés (figure 3A, 3B et 3E). Le signal le plus fort est observé dans la pointe racinaire (Figure 3C). Les racines secondaires émergentes, apparentes dans les plantules de 15 jours, sont également fortement marquées (figure 3D). Les prélèvements réalisés sur des plantes de six semaines ont permis d'étudier l'expression de *TRM19* dans le méristème apical où le signal est visible dans les fleurs les plus jeunes (figure 3F). Au sein des siliques, l'albumen des graines est marqué (figure 3G et 3H).

Nous avons réalisé des hybridations *in situ* sur des boutons floraux dans le but de comparer l'expression de *TRM19* avec celle d'un gène dont l'expression est cyclique comme le gène *HISTONE 4*, exprimé spécifiquement lors de la phase S du cycle cellulaire. L'hybridation de la sonde *HISTONE 4* avec les ARNm des cellules des boutons floraux est restreinte aux cellules en phase S et produit un marquage hétérogène au sein des tissus en division (figure 3M). Ce patron « tacheté » est caractéristique des gènes dits cycliques, transcrits durant une phase précise du cycle cellulaire. Une sonde sens utilisée comme témoin négatif pour *TRM19* ne montre aucun marquage dans les boutons floraux (figure 3N). La sonde antisens *TRM19* de 500 pb est en partie située dans la région 3' non



**Figure 4 : Localisation subcellulaire de TRM19.** Localisation de RFP-TRM19 (A), de GFP-TRM1 (B), de GFP-TRM20 (C) et de GFP-TON1 (D) dans les cellules épidermiques de feuilles de *N. benthamiana*. La co-expression de RFP-TRM1 avec GFP-TRM19 (E) et GFP-TRM20 (F) localise TRM19 et TRM20 aux microtubules. RFP-TRM19 recrute GFP-TON1 aux microtubules (G). Les observations ont été réalisées le même jour dans les mêmes conditions. Les plages d'excitation et de réception des protéines fluorescentes sont les mêmes lors des différentes observations. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m

codante du gène (figure 2), pour assurer sa spécificité et éviter les hybridations éventuelles avec les transcrits des autres gènes du sous-groupe dont fait partie *TRM19* (sous-groupe 5).

Le signal *TRM19* est présent de manière uniforme dans les boutons floraux et plus fortement dans les cellules des primordia des organes floraux centraux, carpelles et étamines (figure 30). Ce patron d'expression est donc différent de celui de l'*HISTONE 4* puisque *TRM19* ne présente pas de marquage hétérogène dans les boutons floraux comme c'est le cas par hybridation avec une sonde *HISTONE 4*. L'expression de *TRM19* ne semble pas cyclique mais plutôt généralement forte dans les tissus en division.

Globalement, ces expériences montrent que l'expression de *TRM19* est plus forte dans les tissus en division (pointe racinaire, racines émergentes, méristème apical caulinaire, primordia floraux). Ces résultats concordent avec les données eFP Browser (Winter et al., 2007) (figure 31-L) et sont cohérents avec les données transcriptome obtenues sur cultures cellulaires synchronisées, avec une expression de base forte qui augmente à l'entrée en mitose. L'expression de *TRM19* est également très forte dans les cultures cellulaires en suspension (Spinner et al., 2013).

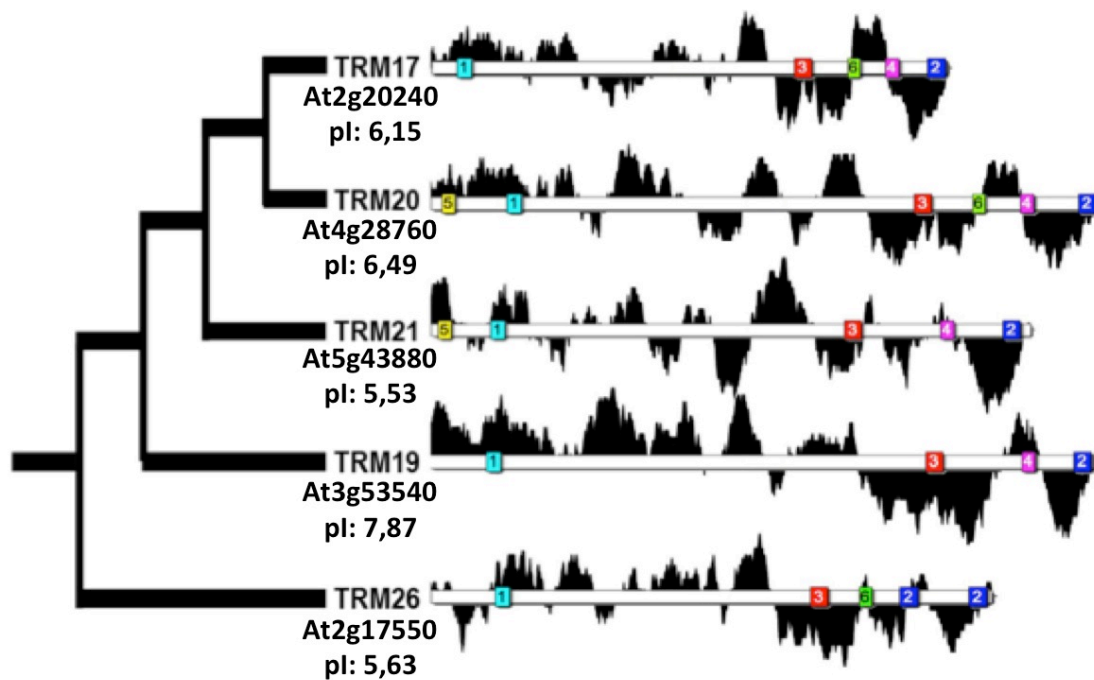
Ces données d'expression sont compatibles avec un rôle dans la division cellulaire. En effet, même si le gène *TRM19* est exprimé constitutivement, il est possible que son expression accrue en mitose soit déterminante. L'activité de la protéine *TRM19* peut aussi être régulée et la protéine n'être active qu'à un moment précis du cycle cellulaire. *TRM19* pourrait également interagir avec des protéines partenaires différents suivant les phases du cycle cellulaire.

## 1. 2. Localisation subcellulaire de *TRM19*

Pour étudier la localisation subcellulaire de *TRM19*, nous avons fusionné la protéine à une étiquette fluorescente. L'expression transitoire de la protéine de fusion RFP-*TRM19* ou de la protéine GFP-*TRM19* sous contrôle du promoteur 35S dans des cellules épidermiques de *N. Benthamiana* montre que *TRM19* est majoritairement localisée dans le cytoplasme même si elle se trouve faiblement associée aux microtubules avec la présence de petits agrégats le long des microtubules (figure 4A).

Afin d'étudier plus précisément l'affinité de *TRM19* pour les microtubules, nous avons comparé sa localisation à celle d'une protéine TRM localisée spécifiquement aux



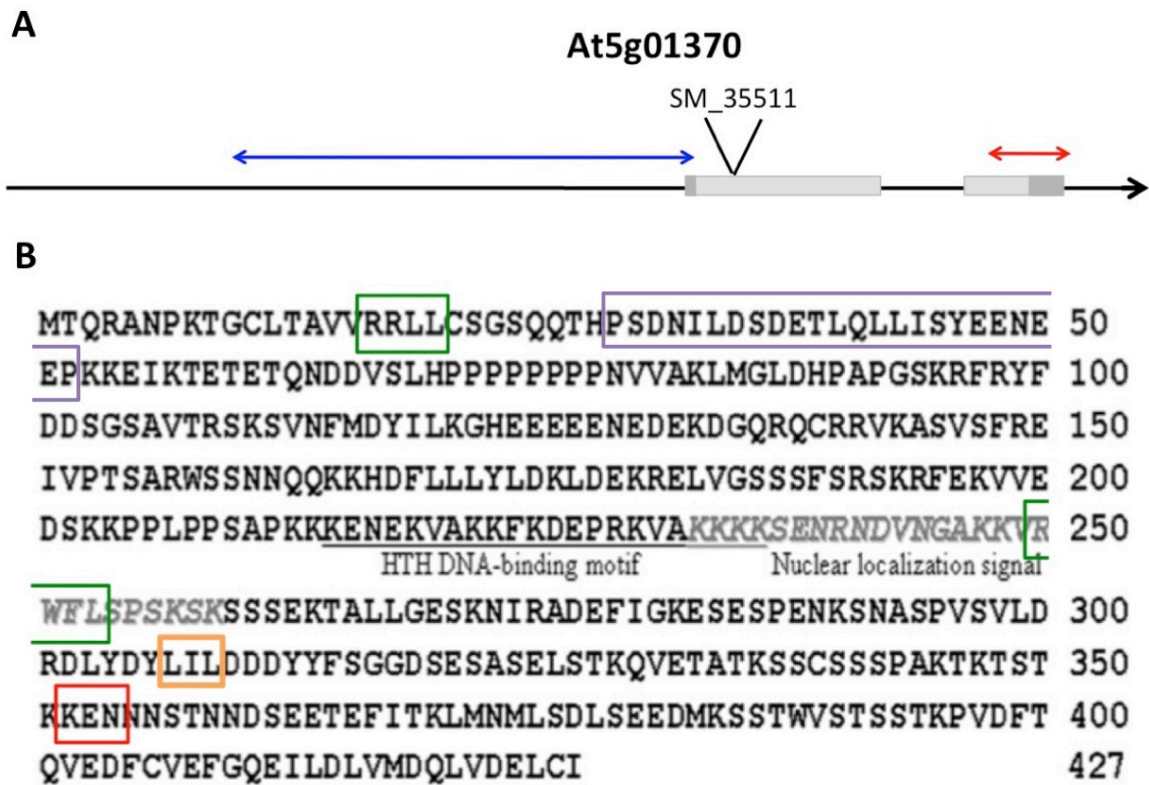


**Figure 5 : Profil acido-basique des protéines du sous-groupe 5 de la famille des TRMs.** Les charges de la protéine sont indiquées en noir. Les charges situées au-dessus de la protéine représentent les domaines basiques et les charges situées au-dessous représentent les domaines acides. Le point isoélectrique est indiqué sous le nom de chaque protéine. Les carrés de couleur représentent les motifs présents chez les protéines de ce sous-groupe (M5-M1-M3-M4-M2) (Drevensek et al., 2012).

microtubules, TRM1 (Drevensek et al., 2012) (figure 4B). De façon surprenante, lorsque TRM19 est co-exprimée avec TRM1, la localisation de TRM19 change : TRM19 est alors majoritairement associée aux microtubules (figure 4E), suggérant que TRM1 et TRM19 interagissent et que cette interaction déplace la localisation de TRM19. Pour étudier la capacité de TRM1 à recruter d'autres TRMs aux microtubules, nous avons co-exprimé TRM1 et TRM20, dont la localisation au cytoplasme a déjà été établie (Drevensek et al., 2012) (figure 4C). Là encore, la co-expression de TRM1 et TRM20 induit la localisation de TRM20 aux microtubules même si un signal cytoplasmique persiste (figure 4F).

Enfin, pour déterminer si TRM19, comme TRM1, TRM8, TRM7 ((Drevensek et al., 2012; Spinner et al., 2013), ce manuscrit) est capable de recruter TON1 aux microtubules, nous avons co-exprimé TRM19 et TON1 dans les cellules épidermiques de tabac. Alors que quand TON1 est exprimée seule, elle est localisée dans le cytoplasme (figure 4D), dans les cellules exprimant les deux protéines, TON1 s'associe également aux microtubules (figure 4G).

TRM19 fait partie du sous-groupe 5 des TRMs avec TRM17, TRM20, TRM21 et TRM26. Parmi ce sous-groupe, TRM20 et TRM26 sont localisées dans le cytoplasme lorsqu'elles sont exprimées de façon transitoire dans les cellules épidermiques de tabac (Drevensek et al., 2012). Au contraire, nous avons montré ici que TRM19 est capable de s'associer faiblement aux microtubules dans ce système. Cette divergence de localisation peut s'expliquer par les caractéristiques biochimiques de ces protéines. Il est en effet connu que de nombreuses MAPs ont une affinité pour les microtubules via un domaine basique qui se lie à la queue acide des tubulines. L'étude des profils acido-basiques des protéines de ce sous-groupe (figure 5) montre qu'à la différence de TRM20 et TRM26, TRM19 possède une série de petits domaines basiques dans sa moitié N-terminale. On retrouve d'ailleurs cette caractéristique dans son point isoélectrique. Alors que TRM17, TRM20, TRM21 et TRM16 ont un point isoélectrique inférieur à 6,5, TRM19 a un point isoélectrique de 7,9 montrant ainsi que cette protéine est globalement basique. La faible affinité de TRM19 pour les microtubules par rapport à TRM1 peut s'expliquer par le fait que TRM1 est une protéine extrêmement basique (point isoélectrique de 10) par rapport à TRM19. Enfin, il faut noter que la présence de TRM19 aux microtubules corticaux est cohérente avec l'identification de TRM19 dans le phosphoprotéome cortical d'*Arabidopsis* (Benschop et al., 2007).



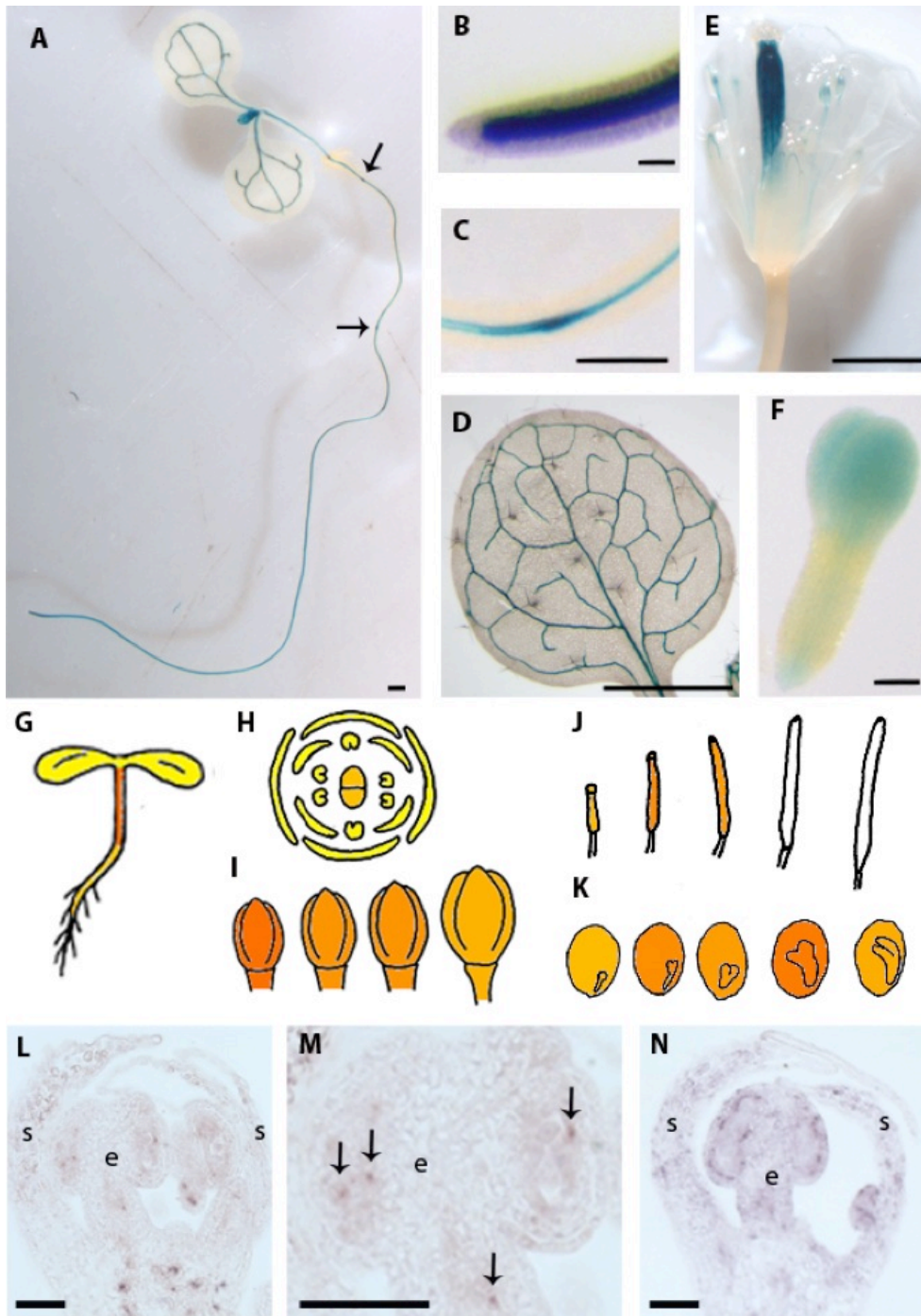
**Figure 6 : Représentation schématique du gène *TRM29*.** En A : Les boîtes gris foncé représentent les régions non traduites en 5' et 3' du gène. Les boîtes gris clair représentent les exons. La position du T-DNA du mutant d'insertion SM3\_35511 est représentée dans le premier exon. La flèche bleue représente la séquence utilisée lors de l'étude du promoteur (2,5 kb). La flèche rouge représente la sonde utilisée pour l'hybridation *in situ* dans les boutons floraux (440 pb). En B : TRM29 possède un domaine de liaison à l'ADN, (le HTH DNA-binding motif), un domaine de localisation au noyau (en gris), deux boîtes de destruction potentielles (en vert), une boîte KEN (en rouge), un motif LIL (en orange) et une séquence PEST potentielle (en violet).

TRM19 fait partie intégrante du complexe TTP puisqu'elle s'associe *in vivo* avec TON1 et les trois sous-unités de PP2A (FASS, PP2A-A et PP2A-C) dans des expériences de TAP-Tag sur des cultures cellulaires en suspension. Etonnamment, TRM1 est capable de recruter TRM19 au réseau de microtubules corticaux, montrant pour la première fois que des interactions entre protéines TRMs pourraient être possible. Le recrutement de TRM19 par TRM1 est d'autant plus surprenant que, lors de purifications TAP-Tag à partir de cultures cellulaires en utilisant TRM19 comme appât, aucune interaction entre TRM19 et une autre TRM n'a été identifiée (Spinner et al., 2013). TRM1 est également capable de recruter aux microtubules une protéine spécifiquement localisée au cytoplasme, TRM20, confirmant l'existence d'interactions entre TRMs.

Pour compléter la caractérisation fonctionnelle de TRM19, il faudra étudier la localisation subcellulaire de TRM19 *in planta* et, en particulier, suivre sa localisation au cours du cycle cellulaire, par exemple dans la pointe racinaire, où ce gène est très fortement exprimé. Ces données pourront permettre d'identifier le rôle de TRM19 et une des fonctions associées à la famille des TRMs. L'étude génétique devra être poursuivie. Pour l'instant, seul un allèle *trm19* mutant a été étudié (SAIL\_880\_A11) et ne présente pas de phénotype évident, cultivé en serre ou *in vitro*. Des combinaisons de mutations à l'intérieur du sous-groupe 5 ou avec les autres TRMs surexprimées à l'entrée en mitose pourront conduire à des phénotypes plus marqués.

## 2. Patron d'expression de *TRM29*

Deux techniques ont été utilisées pour étudier le patron d'expression de *TRM29* : des hybridations *in situ* et l'expression du gène rapporteur codant la  $\beta$ -glucurodinase sous contrôle du promoteur *TRM29*, afin de révéler respectivement la cyclicité et le profil tissulaire de l'expression de *TRM29*. La séquence de promoteur comprend les 2,5 kb en amont du codon de début de traduction (figure 6). Nous avons révélé l'activité du gène rapporteur de la  $\beta$ -glucurodinase par incubation avec le substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronique (X-gluc) chez 10 lignées indépendantes. Ces lignées montrent globalement le même patron d'expression (figure 7A-F). Chez les plantules de 7 et 15 jours, les tissus vasculaires de la racine et des cotylédons ainsi que le méristème apical caulinaire sont marqués (figure 7A et 7D). Dans la pointe racinaire, le signal est plus fort que le long de la



**Figure 7 : Patron d'expression de *TRM29*.** A-F : patron d'expression révélé par l'activité du gène codant le  $\beta$ -glucuronidase sous contrôle du promoteur *TRM29*. A : plantule de 7 jours, les racines secondaires émergentes sont indiquées par des flèches, B : pointe racinaire d'une plantule de 7 jours, C : racine émergente chez une plantule de 7 jours, D : jeune feuille d'une plantule de 15 jours, E : fleur d'une plante de six semaines, F : embryon stade cordiforme, G-K : patron d'expression prédit par eFP Browser. G : plantule, H : diagramme floral, I : boutons floraux, J : siliques, K : graine et embryon. L-N : Les boutons floraux ont été hybridés avec une sonde antisens *TRM29* (L et M) et une sonde antisens *HISTONE 4* (N). Les flèches indiquent les cellules marquées par la sonde *TRM29*. S, sépale : e, étamine. Barre d'échelle : A, B, D, E : 1 mm ; C, F : 50  $\mu$ m ; L-N : 30  $\mu$ m.

racine et restreint aux tissus vasculaires (Figure 7B). Les racines secondaires émergentes, apparentes dans les plantules de 15 jours, sont marquées (figure 7C). Les prélèvements réalisés sur des plantes de six semaines ont permis d'étudier l'expression de *TRM29* dans les fleurs où le signal est principalement visible dans les siliques (figure 7E) et dans l'embryon (figure 7F). Ces résultats concordent avec ceux de Wang *et al.* (Wang *et al.*, 2008) et montrent que *TRM29* est principalement exprimé dans les tissus vasculaires, notamment dans les tissus en division comme la pointe racinaire, les racines secondaires émergentes et l'embryon. Les données eFP Browser (Winter *et al.*, 2007) montrent également que *TRM29* est exprimé dans les jeunes siliques et l'embryon. Cependant, ces données n'indiquent pas que le gène est beaucoup plus exprimé dans le pistil que dans les autres organes floraux. Enfin, les données décrites chez la plantule indiquent que *TRM29* serait plus exprimé dans l'hypocotyle, ce que notre expérience ne reflète pas (figure 7G-K).

Nous avons réalisé des hybridations *in situ* sur des boutons floraux dans le but de comparer l'expression de *TRM29* avec celle d'un gène dont l'expression est cyclique. La sonde antisens *TRM29* de 440 pb est située dans la région 3' non codante du gène, spécifique de *TRM29* (figure 6). Le signal *TRM29* n'est présent que dans quelques cellules des primordia de boutons floraux (figure 7L et 7M) rappelant ainsi le patron d'expression d'un gène exprimé cycliquement comme le gène *HISTONE 4* (figure 7N). Le faible nombre de cellules marquées par rapport à *HISTONE 4* s'explique sans doute par la durée de la fenêtre d'expression de ces deux gènes. *HISTONE 4* est un gène qui s'exprime pendant la phase S du cycle cellulaire qui est relativement longue. *TRM29* semble donc avoir une fenêtre d'expression plus courte.

Au niveau protéique, la séquence de *TRM29* montre qu'elle possède une KEN-box putatives, signal de reconnaissance par l'APC (Anaphase Promoting Complex) (figure 6), ainsi qu'une séquence PEST potentielle, généralement associée aux protéines ayant une courte demi-vie dans la cellule et qui servirait de peptide de signalisation pour la dégradation des protéines (Rogers *et al.*, 1986). La séquence de la protéine contient également deux Destruction box (D-box) potentielles de type RxxL, mais qui n'obéissent pas au motif consensus RxxLxxxN. La présence de séquences de dégradation chez *TRM29* pourrait suggérer que la protéine est dégradée activement au cours du cycle cellulaire, notamment par l'APC. Ces signaux putatifs de dégradation de *TRM29* pourront être étudiés plus



précisément en réalisant une fusion traductionnelle entre le gène *TRM29* et le gène codant la  $\beta$ -glucurodinase. L'obtention d'un patron d'expression hétérogène dans les tissus méristématiques comme observé pour *TRM7* sera le signe d'une dégradation active éventuelle de la protéine. La mutagenèse dirigée des séquences de dégradation putatives pourra permettre de conclure définitivement quant à leur rôle dans la stabilité de la protéine.

*TRM29* est une des rares TRMs à avoir fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle (bien que préliminaire). Elle a été identifiée comme une protéine nucléaire capable d'interagir avec le facteur de transcription *ALCATRAZ*, impliqué dans la séparation des cellules pendant la déhiscence des fruits (Wang et al., 2008). Elle possède un domaine de liaison potentiel à l'ADN de type HTH (Helix Turn Helix) DNA-binding domain motif, identifié chez de nombreuses protéines régulant l'expression des gènes. La localisation nucléaire de *TRM29* a été obtenue après expression de la protéine fusionnée à la GFP sous contrôle d'un promoteur fort : il faudra la confirmer en exprimant *TRM29* étiquetée mais sous contrôle de son promoteur endogène. Il est en effet possible que sa localisation change au cours de la vie de la cellule puisque *TRM29* possède dans sa séquence primaire à la fois un signal putatif de localisation nucléaire (KKKKSENNDVNGAKKVRW) et un court signal putatif d'exportation du noyau (LIL) (Wang et al., 2008). La caractérisation de *TRM29* n'a apparemment pas été poursuivie plus avant depuis la publication initiale.

Il faudra également poursuivre la caractérisation fonctionnelle de ce gène par une étude génétique. Un seul allèle a pour l'instant été étudié. Le mutant d'insertion homozygote, *SM3\_35511*, ne présente aucun phénotype, cultivé en serre ou *in vitro*. *TRM29* formant un sous-groupe avec *TRM31*, il pourra être intéressant d'obtenir le double mutant correspondant et de s'affranchir d'une éventuelle redondance au sein de ce sous-groupe.



Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'
pTRM19-U	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATCGACTACATAGGTCAAGG
pTRM19-L2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTCATCGGTACTCCAGTAGGAAA
pTRM29-U	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTGATATCGAATTTATCAATGGG
pTRM29-L	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGGTGATGGCTGATAATGATG
TRM19-sens	AGAGCCATCCTTGTGGAGG
TRM19-antisensT7	TGTAATACGACTCACTATAGGGCTGTCATTACAGGGACACATGC
TRM29-sens	CGGAGTTGTCAACAAAGCAA
TRM29-antisensT7	TGTAATACGACTCACTATAGGGCATTGGCCGCATAACACTTTT
TRM29-sens-P1-T7	TGTAATACGACTCACTATAGGGCCGGAGTTGTCAACAAAGCAA
TRM29-sens-P2	ATTGGCCGCATAACACTTTT
SAIL880A11_LP	TATCAGGGCAGTGTGGTTGG
SAIL880A11_RP	TGTGCTTTGAAGATCATGCAG
LB3sail	TAGCATCTGAATTCATAACCAATC TCGATACAC
SM3_35511_LP	AGACTTATTCTCCGGCGACTC
SM3_35511_RP	TAATTAGTTGGTGGGTCCCTCG
SPM32	TACGAATAAGAGCGTCCATTTTAGAGTGA

**Figure 8 : Liste des amorces utilisées**

### 3. Matériel et méthodes

#### Matériel biologique

Matériel végétal et conditions de culture : Les plantes d'*Arabidopsis thaliana* écotype Columbia (Col-0) sont cultivées en serre ou *in vitro* dans les conditions suivantes : 16h de lumière (21°C) et 8h d'obscurité (21°C), excepté pour les plantes ayant servi de matériel pour les hybridations *in situ*, qui ont été cultivées en jours courts, 8h de jours (20°C) et 16h d'obscurité (19°C), pendant 40 jours puis transférées en jours longs. Les semis *in vitro* ont été réalisés sur milieu de culture *Arabidopsis* : KNO<sub>3</sub> 5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,5 mM, MgSO<sub>4</sub> 2 mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2 mM, microéléments 1 X (microéléments 1000 X : H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 70 mM, MnCl<sub>2</sub> 14 mM, CuSO<sub>4</sub> 0,5 mM, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 0,2 mM, NaCl 10 mM, ZnSO<sub>4</sub> 1 mM, CoCl<sub>2</sub> 0,01 mM), vitamines 1X (vitamines 500X : Myo-Inositol 5%, panthotenate 0,05%, niacine 0,05%, pyridoxine 0,05%, thiamine 0,05%, biotine 0,005%), BCP 0,0008%, MES 0,07%, saccharose 1%, citrate de fer 0,005%, agar 0,7%, pH 5,8. Les mutants d'insertion *trm19* (SAIL\_880-A11) et *trm29* (SM3\_35511) ont été génotypés avec les amorces suivantes. Le premier couple est spécifique de l'allèle sauvage et le second est spécifique de la bordure gauche de la séquence d'insertion. *trm19* : SAIL880A11\_LP/SAIL880A11\_RP et SAIL880A11\_RP/LB3sail. *trm29* : SM3\_35511\_LP/SM3\_35511\_RP et SM3\_35511\_RP/SPM32.

Les plantes de *Nicotiana Benthamiana* sont cultivées en serre dans les conditions suivantes : 16h de lumière (25°C) et 8h d'obscurité (20°C).

Souche de bactéries *Escherichia coli*: La souche DH10B a été utilisée. Les bactéries sont cultivées à 37°C dans un milieu de culture LB (Bactotryptone 1% (m/v), yeast extract 0,5% (m/v), NaCl 170 mM, pH 7,5) (Sambrook et al., 1989).

Souche d'Agrobactérie et conditions de culture : La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 pMP90 a été utilisée pour les transformations génétiques d'*Arabidopsis thaliana* et pour les transformations transitoires de *Nicotiana Benthamiana*. Elle est dérivée de la souche sauvage C58 et possède les gènes de résistance à la rifampicine et à la



gentamycine respectivement situés sur le chromosome bactérien et sur le plasmide Ti désarmé. Les bactéries sont cultivées à 28°C dans un milieu LB.

### Vecteurs utilisés

Les promoteurs de *TRM19* et *TRM29* ont été amplifiés par PCR à partir de BAC, respectivement F16C18 et F6B1 pour *TRM19* et *TRM29* grâce à des amorces spécifiques (pTRM19-U/pTRM19-L2 et pTRM29-U/pTRM29-L) (figure 8) auxquelles ont été ajoutées les séquences AttB1 et AttB2 de recombinaison. Les vecteurs d'entrée obtenus après recombinaison BP (Gateway) dans le pDONR207 (Invitrogen) ont été séquencés. Le vecteur pBI101-R1R2-GUS, dérivé du vecteur pBI101 dans lequel a été introduite la cassette Gateway (Bertrand Dubreucq, IJPB), a été utilisé comme vecteur de destination dans les réactions LR avec les deux vecteurs d'entrée précédemment obtenus. Les vecteurs d'expression obtenus sont introduits dans les Agrobactéries par électroporation.

Le vecteur d'entrée contenant la séquence codante de TRM19 a été donné par Astrid Gadeyne (VIB, Gand). Le vecteur de destination pH7RWG2 a été utilisé en recombinaison LR (Gateway) pour réaliser la fusion de la RFP en N-terminal de la protéine. Les vecteurs portant les constructions GFP-TRM19 (don d'Astrid Gadeyne, VIB Gand), RFP-TRM1 et GFP-TRM20 sous contrôle du promoteur 35S étaient déjà disponibles au laboratoire.

### Transformation transitoire et observation chez *N. Benthamiana*

Les cultures d'agrobactéries transformées ont été incubées sur la nuit à 28°C avec agitation. Les cultures sont centrifugées, le culot est lavé puis resuspendu dans une solution d'infiltration (13 g/L S-medium (Duchefa) et 40 g/L sucrose, pH 5.7) à une DO<sub>600</sub> de 0.5. Les inoculums sont infiltrés dans les cellules épidermiques des feuilles à l'aide d'une seringue de 2mL sans aiguille. Pour augmenter l'expression des protéines fusionnées avec la RFP ou la GFP, le suppresseur de « gene silencing » P19 a été co-exprimé dans les feuilles de tabac. L'épiderme des feuilles est observé 3 jours après infiltration avec un microscope confocal LSM 710 Zeiss à l'aide d'un objectif x63/1.20 W C-Apochromat. Les fluorochromes sont excités respectivement à 488 nm pour la GFP et à 561 nm pour la RFP. Le spectre d'émission est récolté de 493 à 558 nm pour la GFP et de 578 à 657 nm pour la RFP. La fluorescence est enregistrée de manière séquentielle.



### Transformation d'*Arabidopsis thaliana*

5 mL de préculture d'Agrobactéries sont cultivées dans un litre de milieu LB contenant de la gentamycine (50 µg/mL), de la rifampicine (25 µg/mL) et de la Kanamycine (20 µg/mL) pendant environ 14h à 28°C pour obtenir une culture de densité proche de 0,8 unité d'absorbance à 600 nm. La culture est ensuite centrifugée à 4000 rpm pendant 10 min. Le culot de bactéries est resuspendu dans 500mL de solution d'infiltration (saccharose 5% (m/v), Silwet 0,02% (m/v), MgCl<sub>2</sub> 10 mM). Les hampes florales des plantes âgées de 4 à 6 semaines sont alors immergées dans la solution d'infiltration pendant 2 min.

### Sélection des transformants

La sélection des graines transformées (génération T1) se fait en culture *in vitro* sur un milieu contenant de la kanamycine (50 µg/mL) et de la céfotaxime (200 µg/mL). Après 10 jours de culture, les plantes résistantes sont repiquées en serre.

### Coloration GUS

Les fleurs des plantes T1 et les plantules T2, cultivées *in vitro* sans antibiotique, ont été utilisées pour les colorations GUS. Les plantules sont introduites dans des tubes de 1,5 mL contenant 500 µL de tampon GUS (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, X-gluc 0,8 mM (dilué dans DMSO)). Les plantules sont infiltrées 10 min sous vide puis placées pendant la nuit à 37°C. Après avoir enlevé le tampon GUS, les tissus sont décolorés avec 500 µL d'éthanol 95% pendant une demi-journée. L'éthanol 95% est ensuite remplacé par de l'éthanol 70%. Les fleurs des plantes T1 sont introduites dans des tubes de 1,5 mL contenant 500 µL de tampon de fixation (6 volumes d'éthanol 95%, 3 volumes de chloroforme et 1 volume d'eau) et infiltrées sous vide pendant 2 min 30. Le tampon de fixation est remplacé par du tampon GUS sans X-gluc (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, Triton X-100 0,1%). Les tissus sont rincés deux fois avec le tampon GUS sans X-gluc puis infiltré 5 min dans ce même tampon. Les tissus sont rincés une dernière fois avec ce tampon puis on ajoute 500µL du tampon GUS avec X-gluc (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 2 mM, Triton X-100 0,1%, X-gluc 1,6 mM (dilué dans DMSO)). Après 30 min d'infiltration sous vide, les tubes sont placés à 37°C pendant la nuit. Le lendemain, les tissus sont décolorés avec 500 µL



d'éthanol 95% pendant une demi-journée. L'éthanol 95% est ensuite remplacé par de l'éthanol 70%.

#### Hybridation *in situ* des ARNm

Préparation des sondes ARN marquées avec le DIG-11-UTP : Les sondes ont été amplifiées à partir d'ADN de BAC, respectivement F16C18 et F6B1 pour *TRM19* et *TRM29*. Une sonde antisens a été synthétisée pour chaque gène en utilisant les amorces TRM19-sens/TRM19-antisensT7 et TRM29-sens/TRM29-antisensT7 (figure 8). La même sonde *TRM29* sens a été utilisée comme contrôle pour les deux gènes en utilisant les amorces TRM29-sens-P2/TRM29-sens-P1-T7 (figure 8). Pour amplifier la séquence d'ADN de la sonde sens, on utilise une amorce sens à laquelle a été ajoutée la séquence reconnue par la reverse transcriptase T7 (TGTAATACGACTCACTATAGGGC) en 5'. Pour amplifier les séquences d'ADN des sondes antisens, la séquence reconnue par la reverse transcriptase T7 est ajoutée en 5' à l'amorce antisens. La sonde est produite par transcription *in vitro*, pendant laquelle les ARN sont marqués par l'ajout d'un nucléotide modifié : le DIG-11-UTP (Roche), UTP auquel est fixé une molécule de digoxigénine. Cette étape est réalisée grâce à un kit de transcription *in vitro* (Promega) dans le mélange suivant : 1 µg de produit PCR, 4 µL de tampon 5x, 1 µL ATP, 1 µL GTP, 1 µL CTP, 2 µL UTP (1 µL UTP + 1 µL DIG-UTP), 1µL d'inhibiteur de RNase (Roche), 2,5 µL d'ARN polymérase T7, eau traitée au DEPC (DiEthylPyroCarbonate) (Sigma) qsp 20µL. La transcription a lieu à 37°C pendant une heure. Après 1 H, on ajoute 1 µL de DNase et 70 µL d'eau et 10 µL d'ARNt (10 µg/µL). Ce mélange est de nouveau incubé à 37°C pendant 15 min. Les sondes ARN sont ensuite précipitées avec 20µL d'acétate d'ammonium 10 M et 240 µL d'éthanol 100% pendant la nuit à -20°C. Après une centrifugation de 30 min à 15000 g à 4°C, le culot est rincé avec de l'éthanol 70% froid, séché et repris dans 40 µL d'eau traitée au DEPC.

Fixation, déshydratation et inclusion des tissus végétaux : Les méristèmes apicaux caulinaires sont récoltés et immédiatement fixés dans du formaldéhyde 4% pendant une heure sous vide. Les tissus sont lavés à l'eau. Les tissus sont déshydratés dans des bains d'éthanol d'une heure de concentration croissante (10, 30, 50, 70 et 95%) puis incubés pendant la nuit dans de l'éthanol 95% avec 0,1% d'éosine (Sigma). L'éosine permet de colorer les tissus en rouge afin qu'ils soient visibles dans les blocs de paraffine. Le





lendemain, l'éthanol est progressivement remplacés par de l'histoclear (Prolabo) jusqu'à ce que les tissus soient immergés dans 100% d'histoclear. Les tissus sont alors placés dans des cassettes permettant de les plonger dans un bain contenant 50% d'histoclear et 50% de paraffine (Labonord) à 60°C. Les cassettes sont ensuite placées dans 100% de paraffine pendant la nuit à 60°C. Le lendemain, la paraffine est changée deux fois, toutes les 3 heures, puis les tissus sont inclus dans des moules et conservés à 4°C.

**Coupe et préparation des lames :** Les blocs de paraffine sont coupés sur un microtome avec des lames en acier. Des coupes de 8 µm d'épaisseur sont déposées sur des lames prétraitées DAKO recouvertes d'eau stérile et posées sur plaque chauffante à 40°C. Une fois l'eau éliminée à l'aide d'une pipette, les lames restent sur la plaque pendant la nuit. Elles sont ensuite conservées à 4°C. L'ensemble des bains et du matériel utilisés par la suite sont sans RNase afin d'éviter la dégradation des ARN cibles présents sur les coupe. Les lames sont placées dans deux bains d'histoclear de 10 min afin d'éliminer la paraffine. Elles sont ensuite réhydratées par des bains successifs de 30 sec de concentrations décroissantes d'éthanol (100-95-85-70-50-30-0%) et de concentrations croissantes en sel (0-0-0,42-0,85-0,85-0,85-0,85%). Les coupes sont alors traitées à la protéinase K (SIGMA) (1 µg/ml Tris EDTA) pendant 10 min à 37°C, afin de digérer les protéines et de faciliter l'accessibilité des ARN cibles aux sondes. Puis, les lames sont incubées 2 min dans une solution de glycine à 0,2% dans du PBS afin d'arrêter la réaction de la protéinase K. Elles sont ensuite traitées par l'anhydride acétique (Merck) à 0,5% dans une solution de triéthanolamine 0,1 M (pH 8). L'ion acétyl se fixe sur les fonctions amines existantes ce qui évite des hybridations aspécifiques. Enfin, les lames sont déshydratées dans les bains précédents de solution saline puis d'éthanol (30 sec dans chaque bain), puis stockées à 4°C.

**Hybridations *in situ* :** Les lames sont préhybridées pendant 1h à la température d'hybridation (42°) dans un tampon de préhybridation (50% formamide déionisé, SSC 5 X, 50 µg/ml d'héparine, 100 µg/ml d'ARNt (Roche) et 0,1% de Tween 20%). Les lames sont ensuite incubées avec la sonde ARN. Pour une lame, 1 à 9 µL de sonde sont dilués dans 9 à 1 µL d'eau BIOFIT suivant la concentration de la sonde. Après une dénaturation de 2 min à 80°C, on ajoute 210 µL de tampon d'hybridation dont la composition pour 15 mL est la suivante : 5 mL formamide, 2 mL sulfate de dextran, 5 mL de SSC 20X, 1 mL ARNt (100 µg/ml), 750 µL tween 20%, 250 µL de Denhardt's 50X et 1 mL de solution saline 10X (NaCl 3 M, Tris Hcl pH 8



100 mM, tampon phosphate de sodium 100 mM pH 6,8, EDTA 50 mM pH 8). Après avoir déposé cette solution sur une lame contenant les échantillons, on pose une autre lame par dessus et on met les paires de lames à hybrider dans une boîte humide (50% formamide, 50% SSC 2X sur du papier propre) pendant la nuit à 42°C. Les lames sont ensuite lavées pendant 1h dans SSC 2X et 50% formamide à 42°C. Après 5min dans du NTE (NaCl 0,5 M, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM), le bain suivant dure 30 min dans du NTE et de la RNase à 37°C. Après rinçage dans le NTE, les lames sont incubées 1h dans SSC 2X et 50% formamide. Elles sont ensuite conservées pendant la nuit dans du PBS. La détection immunologique a lieu le lendemain. Pour cela, les coupes sont d'abord incubées 1h dans un tampon contenant un agent bloquant (Tris 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; agent bloquant (blocking reagent 1096176 Roche) 0,5%) puis 1h dans un tampon contenant de la BSA (Bovine Serum Albumine) (Sigma) pour bloquer les sites non-spécifiques (Tris 100mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; BSA 1% ; Triton X 100 0,5%). La détection immunologique des hybrides ARN-ARN marqués à la digoxigénine utilise un anticorps anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline (dilution 1/1250 d'anticorps (Roche) dans Tris 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; BSA 1% ; TritonX100 0,5%). Après 1H d'incubation avec l'anticorps, l'excès d'anticorps est éliminé par deux lavages de 20min en présence de BSA et de Triton (Tris 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM ; BSA 1% ; Triton X100 0,5%) puis dans un tampon Tris 100 mM pH 7,5 ; NaCl 150 mM dans une nouvelle boîte. Enfin, les lames sont lavées avec un tampon Tris 100 mM pH 9,5 ; NaCl 100 mM ; MgCl<sub>2</sub> 50 mM. La réaction de coloration est initiée à un pH alcalin. On ajoute 225 µL de NBT (Nitroblue tetrazolium chloride) (Roche) et 337 µL de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) (Roche) à 50 µL du dernier tampon. Un précipité se forme pendant la nuit, à l'obscurité, par oxydation du BCIP et réduction du NBT. La réaction est arrêtée dans la solution de TE (Tris 10 mM pH 7,5, EDTA 5 mM) pendant 15 min. Les lames sont ensuite montées dans du citifluor recouvertes d'une lamelle puis conservées à 4°C. Les images ont été réalisées avec un microscope apotome Zeiss.



# Existe-t-il un complexe TTP chez l'homme ?

---

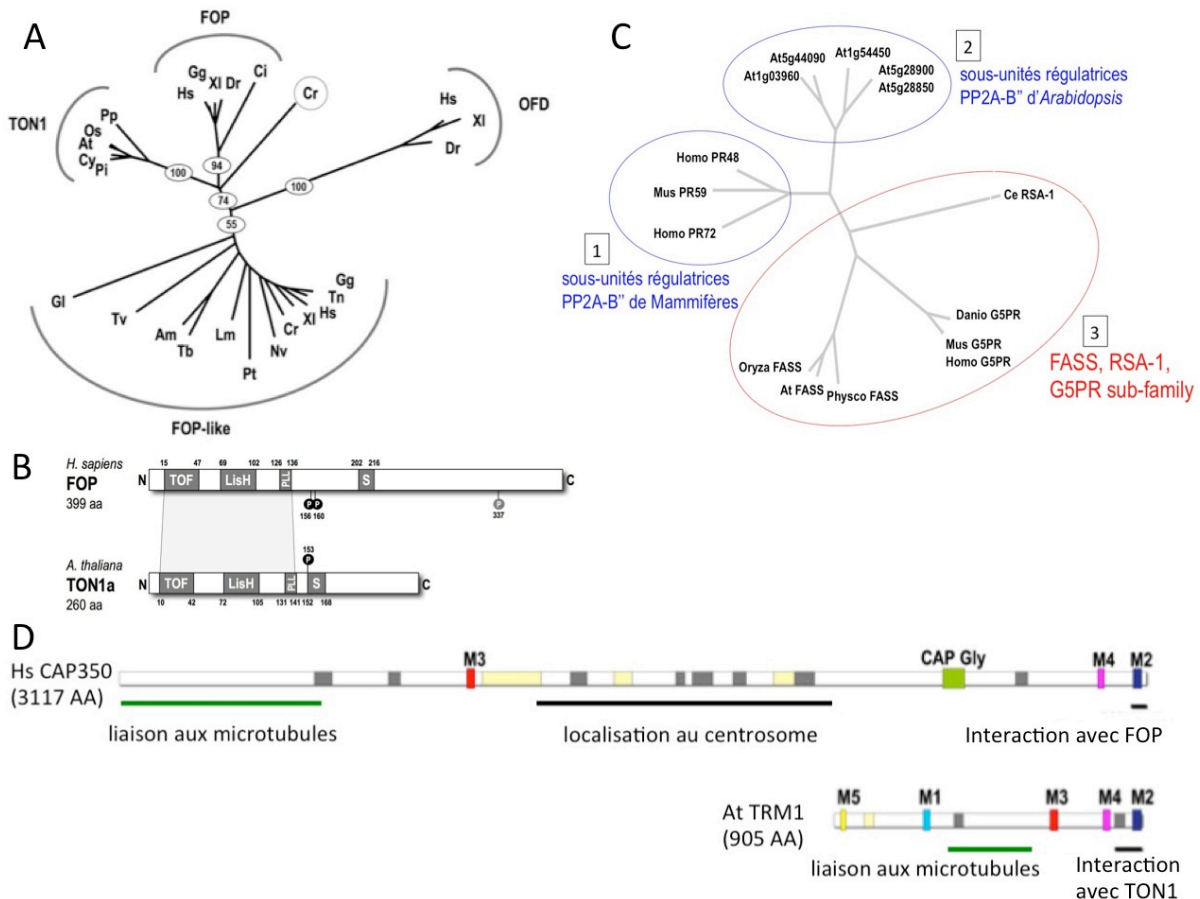


## 1 Introduction : Des similarités entre protéines animales et végétales

Dans la plupart des cellules du règne animal, le centrosome est le principal centre organisateur de microtubules. Il est composé de deux centrioles entourés d'une matrice péricentriolaire. Le centrosome est responsable de la nucléation des microtubules et de leur organisation dans la cellule, notamment lors de la formation du réseau d'interphase et du fuseau mitotique. En interphase, le centrosome est associé au noyau. Au cours de la phase S, les centrioles se dupliquent. Chaque paire de centrioles est composée de l'ancien et d'un nouveau centriole. L'ancien centriole porte des appendices nécessaires à la formation du cil primaire, organe sensoriel important dans les voies de signalisation (Michaud and Yoder, 2006; Goetz and Anderson, 2010). Pendant la phase G2, les centrosomes migrent chacun à un pôle du noyau pour participer pendant la mitose, à la formation du fuseau mitotique. En fin de division, les deux cellules filles reçoivent chacune un centrosome. De nombreuses cellules possèdent également des réseaux de granules cytoplasmiques, appelés satellites centriolaires, localisés autour du centrosome et potentiellement impliqués dans la communication entre le centrosome et le cytoplasme (Barenz et al., 2011).

Chez les cellules végétales, il n'existe pas de centre organisateur de microtubules comparable au centrosome des cellules animales. Au contraire, la formation de nouveaux microtubules a lieu au niveau de différents sites dispersés dans la cellule : au cytoplasme, au cortex, au niveau de l'enveloppe nucléaire, à la PPB, aux pôles du fuseau mitotique et au phragmoplaste. Étonnamment, les protéines du complexe TTP partagent toutes, à des degrés plus ou moins élevés, des similarités de séquences avec des protéines présentes au centrosome des cellules animales.





**Figure 1 : Similarités entre protéines du complexe TTP et protéines animales.** A : Arbre phylogénétique des homologues de TON1. Quatre groupes émergent de l'alignement des 180 résidus N-terminaux : TON1 chez les plantes terrestres, FOP (FGFR1 (Fibroblast Growth Factor Receptor 1) Oncogen Partner) chez les Vertébrés, OFD (Oral Facial Digital) chez les Vertébrés, et un groupes de petites protéines partageant des similarités avec FOP chez différentes eucaryotes. La protéine FOP-like chez l'homme est appelée FOR20 (FOP-Related protein of 20 kDa). At, *Arabidopsis thaliana*; Os, *Oryza sativa*; Pi, *Pinus tadea*; Cy, *Cycas rumphii*; Pp, *Physcomitrella patens*; Hs, *Homo sapiens*; Gg, *Gallus gallus*; Xl, *Xenopus laevis*; Dr, *Danio rerio*; Ci, *Ciona Intestinalis*; Cr, *Chlamydomonas reinhardtii*; Tn, *Tetraodon nigroviridis*; Nv, *Nematostella vectensis*; Pt, *Paramecium tetraurelia*; Lm, *Leishmania major*; Tb, *Trypanosoma brucei*; Am, *Apis mellifera*; Tv, *Trichomonas vaginalis*; Gl, *Giardia lamblia*. B : Le domaine N-terminal de TON1 et FOP est similaire à 43% sur les 180 premiers résidus et contient des motifs fortement conservés dont le motif de dimérisation LisH/PLL et un domaine conservé TOF (TON1-OFD1-FOP) de fonction inconnue. C : Arbre phylogénétique des homologues de FASS. At, *Arabidopsis thaliana*; Dr, *Danio rerio*; Hs, *Homo sapiens*; Mm, *Mus musculus*. Le groupe 1 contient les sous-unités B'' régulatrices identifiées chez les Mammifères. Le groupe 2 contient les cinq sous-unités B'' putatives identifiées dans le génome d'*Arabidopsis*. Le groupe 3 contient la protéine FASS d'*Arabidopsis* et des protéines identifiées par similarité de séquence chez l'homme, la souris et le poisson zèbre D : La protéine CAP350 (également appelée CEP350 pour Centrosomal Protein 350 kDa) possède les motifs M2, M3 et M4 des protéines TRMs. CAP350 et TRM1 possèdent un domaine de liaison aux microtubules (en vert) ainsi qu'un domaine d'interaction avec, respectivement FOP et TON1, en N-terminal et qui inclus le motif M2. D'après (Camilleri et al., 2002; Azimzadeh et al., 2008; Drevensek et al., 2012).

Les 180 résidus N-terminaux des protéines TON1 sont similaires aux régions N-terminales des protéines FOP (**FGFR1 Oncogen Partner**) (45% de similarité), FOR20 (FOP-Related protein of 20 kDa) (31%) et OFD1 (**O**ral **F**acial **D**igital) (30%) (Azimzadeh et al., 2008), toutes localisées au centrosome dans les cellules humaines (Andersen et al., 2003; Sedjai et al., 2010) (figure 1A). L'alignement des séquences protéiques de TON1, FOP et OFD1 a mis en évidence la conservation de trois domaines : un domaine N-terminal jusqu'alors inconnu d'une trentaine de résidus nommé TOF (**T**ON1-**O**FD1-**F**OP), un motif LisH de 34 résidus et un motif PLL, tous deux impliqués dans la dimérisation de ces protéines (Emes and Ponting, 2001; Mikolajka et al., 2006) (figure 1B). Le motif de dimérisation LisH est nécessaire à la fonction de TON1 puisqu'une forme mutante de TON1 incapable de dimérisation ne complète pas le phénotype du mutant *ton1*. De plus, la forme mutante de TON1 monomérique n'est pas capable d'interagir avec FASS en BiFC ou avec TRM1 en double hybride (Duroc *et al*, données non publiées).

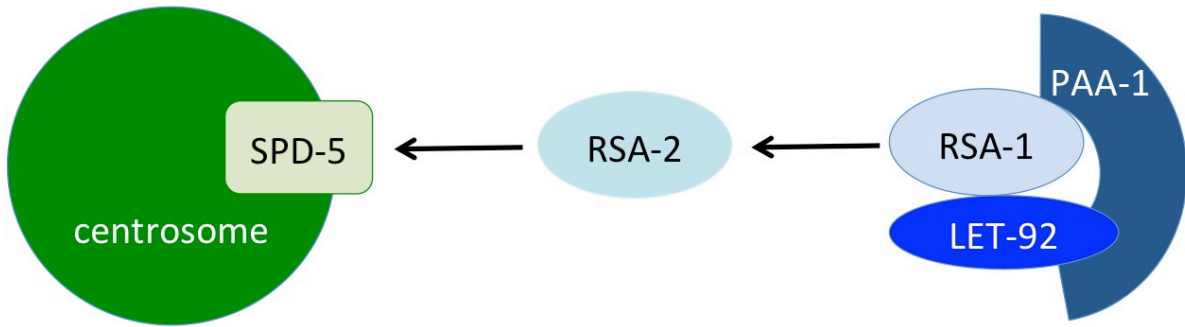
FOP a initialement été identifiée chez l'homme dans une translocation à l'origine d'un syndrome prolifératif conduisant à la production de cellules sanguines anormales d'allure cancéreuse dans la moelle osseuse (Popovici et al., 1999). Cette translocation provoque la localisation au centrosome d'une protéine chimérique entre FOP et la kinase FGFR1 (**F**ibroblast **G**rowth **F**actor **R**eceptor **1**), entraînant la dérégulation du contrôle du cycle cellulaire (Delaval et al., 2005; Lelievre et al., 2008). FOP est impliquée dans la progression du cycle cellulaire et en particulier dans la signalisation permettant le passage de la phase G1 à la phase S (Acquaviva et al., 2009). La déplétion de FOP dans les cellules DT40 de poulet provoque un arrêt du cycle cellulaire en G1 et l'apoptose des cellules (Acquaviva et al., 2009). FOP est également impliquée dans la ciliogénèse (Lee and Stearns, 2013). Des souris mutantes homozygotes exprimant une version tronquée correspondant au tiers N-terminal de FOP meurent *in utero* et présentent des défauts similaires aux défauts de formation des cils primaires.



FOR20 et OFD1 sont localisées au centrosome et aux satellites centriolaires (Andersen et al., 2003; Sedjai et al., 2010) et sont impliquées dans la ciliogénèse (Ferrante et al., 2006; Sedjai et al., 2010; Aubusson-Fleury et al., 2012). La mutation du gène OFD1 chez l'homme est responsable d'une ciliopathie et provoque un syndrome oral-facial-digital (OFD) (Lopes et al., 2011) avec des malformations de la bouche, du visage et des doigts (Ferrante et al., 2001). Les études génétiques des patients humains ont révélé que plusieurs mutations délétères sont situées dans la région N-terminale de la protéine, y compris dans le motif LisH, suggérant que, comme pour TON1, la dimérisation de la protéine est nécessaire à sa fonction. FOR20 est une protéine essentielle à la progression de la phase S du cycle cellulaire et au recrutement au centrosome de la polo-like kinase 1, régulateur clé de la mitose lors de la transition G2/M (Shen et al., 2013).

En ce qui concerne les protéines TRMs, trois motifs (M2, M3 et M4) ont été identifiés chez CAP350 (ou CEP350, Centrosomal Protein 350 kDa), disposés dans le même ordre que chez les TRMs végétales (M3-M4-M2), sans qu'il y ait de similarité de séquence entre CAP350 et l'une des protéines TRM en dehors de ces trois motifs. La CAP350 humaine est impliquée dans le recrutement de FOP au centrosome (figure 1D). La région C-terminale de CAP350 impliquée dans l'interaction avec FOP coïncide avec le motif M2, qui est responsable de l'interaction des protéines TRMs avec TON1 chez *Arabidopsis thaliana* (Drevensek et al., 2012). Ce domaine C-terminal de CAP350 est nécessaire et suffisant pour le recrutement de FOP au centrosome (Yan et al., 2006; Drevensek et al., 2012). Fait remarquable, malgré une absence de similarité globale entre CAP250 et les TRMs, le mode d'interaction entre les protéines TRM1 et TON1 et CAP350 et FOP fait appel aux mêmes motifs protéiques.

Il a été proposé que FOP et CAP350 sont impliquées dans l'ancrage des microtubules au centrosome dans les cellules humaines en recrutant la protéine EB1 (Yan et al., 2006). EB1 est une protéine qui se lie aux extrémités (+) des microtubules et participe à leur stabilisation (Tirnauer and Bierer, 2000; Nakamura et al., 2001). Indépendamment de ce rôle, EB1 est également localisée au centrosome où elle est impliquée dans l'ancrage des extrémités (-) des microtubules cytoplasmiques aux centrioles (Askham et al., 2002; Louie et al., 2004). FOP serait responsable du recrutement d'EB1 au centrosome.



**Figure 2 : Représentation schématique de la chaîne de recrutement du complexe PP2A-RSA au centrosome chez *C. elegans*.** Le complexe PP2A composé des sous-unités RSA-1, PAA-1 et LET-92 est recruté au centrosome par l'intermédiaire de RSA-2 et de SPD-5, protéines centrosomales impliquées dans la formation du fuseau. D'après (Schlitz et al., 2007).

Ainsi, la déplétion de FOP ou de CAP350 provoque la perte d'ancrage des microtubules au centrosome dans les cellules cancéreuses HeLa (Yan et al., 2006). CAP350 a également été localisée au Golgi (Yan et al., 2006; Hoppeler-Lebel et al., 2007). Une autre fonction proposée pour CAP350 est la stabilisation spécifique des microtubules associés au Golgi, permettant le maintien d'un réseau de Golgi continu (Hoppeler-Lebel et al., 2007). Il a été montré que le domaine de dimérisation LisH de FOP est nécessaire à son interaction avec CAP350 et sa localisation au centrosome (Mikolajka et al., 2006; Yan et al., 2006).

Tout comme CAP350 est responsable du recrutement de FOP au centrosome, la protéine FORIN1 (**FOR20 interacting protein 1**) est responsable du recrutement de FOR20 au centrosome (Olivier Rosnet, comm. pers.). FOP, CAP350 et FORIN1 sont des protéines phosphorylées pendant la mitose (Yan et al., 2006; Santamaria et al., 2011). En effet, CAP350 et FORIN1 ont été identifiées dans le phosphoprotéome de la kinase polo-like 1 (plk1) (Santamaria et al., 2011), suggérant que Plk1 pourrait être impliquée dans la phosphorylation de ces protéines. On peut supposer que FOR20 recruterait plk1 au centrosome, permettant ainsi la phosphorylation de CAP350 et FORIN1 pendant la mitose.

FASS est une sous-unité régulatrice de phosphatase PP2A qui possède des homologues chez les vertébrés et chez *C. elegans* qui sont respectivement G5PR et RSA-1 (**Regulator of Spindle Assembly-1**) (figure 1C) (Camilleri et al., 2002). FASS et G5PR partagent 57% de similarité (Camilleri et al., 2002).

RSA-1 interagit *in vivo* avec les sous-unités catalytique et structurale de PP2A, respectivement LET-92 et PAA-1 (Schlaitz et al., 2007). Chez *C. elegans*, une chaîne de recrutement est responsable de la localisation du complexe PP2A, RSA-1/LET-92/PAA-1, au centrosome. Pendant la mitose, RSA-1 interagit avec RSA-2, qui, elle-même, interagit avec une petite protéine centrosomale, SPD-5 (figure 2) (Hamill et al., 2002; Schlaitz et al., 2007). Le complexe PP2A/RSA-1 est nécessaire à la croissance des microtubules à partir du centrosome (Schlaitz et al., 2007). Son activité au centrosome permettrait de coordonner la dynamique des microtubules, notamment leur croissance et leur longueur, lors de la formation du fuseau (Schlaitz et al., 2007). En effet, lorsque *RSA-1* est inactivé, les microtubules centrosomaux sont plus courts, et lors de la division cellulaire, les deux centrosomes étant très rapprochés, la formation du fuseau mitotique est perturbée (Schlaitz et al., 2007).



Le complexe PP2A/RSA-1 régulerait, par déphosphorylation, l'activité catalytique de KLP-7, protéine déstabilisatrice de microtubules. En limitant l'activité de KLP-7, le complexe assurerait une quantité suffisante de microtubules en croissance au centrosome pour la formation du fuseau. En parallèle, le complexe PP2A/RSA-1 recrute TPXL-1, protéine stabilisatrice des microtubules kinétochoriens. La déphosphorylation de TPXL-1 permettrait sa liaison aux microtubules. La déphosphorylation de TPXL-1 par PP2A-RSA au centrosome stabiliserait une partie des microtubules capturés par les kinétochores.

Aucun homologue de FOP ni de CAP350 n'a été identifié chez *C. elegans*.

G5PR (encore appelée PP2A-B'' gamma ou PPP2R3C chez l'homme) est capable de s'associer aux sous-unités PP2A-A et PP2A-C des complexes PP2A et aux complexes phosphatases PP5 (Kono et al., 2002). G5PR fait partie d'un complexe phosphatase qui régulerait, au cours du cycle cellulaire, la phosphorylation du complexe GANP/MCM3 (germinal centre-associated nuclear protein/minichromosome maintenance 3), impliqué dans la réplication de l'ADN des lymphocytes B (Kono et al., 2002). Elle est aussi impliquée dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose des lymphocytes B chez la souris (Xing et al., 2005; Chiang et al., 2011). G5PR est présente au noyau lors de la prophase, autour de la chromatine en mitose et dans le cytoplasme après la division (Kono et al., 2002).

Ainsi, tous les partenaires du complexe TTP, TON1, FASS ou TRMs, montrent des homologies de séquences plus ou moins étendues (de simples motifs jusqu'à des similarités globales de séquences) avec des protéines animales présentes au centrosome. Bien que la conservation de séquence soit limitée entre TON1 et FOP, et encore plus subtile entre les TRMs et CAP350, ces résultats suggèrent que le réseau d'interaction du complexe TTP est conservé, au moins en partie, entre les animaux et les plantes. Cela a été confirmé par l'identification d'un complexe comprenant FOP, G5PR (PPP2R3C) et CAP350 chez l'homme par une approche protéomique (Hutchins et al., 2010). Cependant, la fonction de ce complexe n'a jamais été étudiée chez les mammifères et aucune interaction directe, en dehors de celle entre FOP et CAP350, n'a été identifiée entre ces différents partenaires.



Nom de l'amorce	Séquence 5'-3'	description
FOP-GW1	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TAC ATG GCG GCG ACG GCG GCC GCA	Clonage de la séquence entière de FOP
FOP-GW2	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT CTA TGC AAC ATC TTC CAG AT	
FOP-GW3	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTAGTGGTTG GCCCTTTTCTT	Clonage de FOP <sup>1-144</sup>
M2CAP350-GW1	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TGG GAG GAG GCA CAG TGG GTG	Clonage du motif M2 de CAP350
M2CAP350-GW2	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT TCA CAC AAG TAG CAT TCT CC	
M3CAP350-GW1	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCA GAA ATT TTA AAA GAA AAG	Clonage du motif M3 de CAP350
M3CAP350-GW2	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT TCA AAA ATC ATC TTC ATA TGA AA	
G5PR-GW1	GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCC ATG GAC TGG AAA GAC GTG CTT	Clonage de G5PR
G5PR-GW2	GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GT TCA TGT GTC ATC AAG ATC TGC	

**Figure 3 : Liste des amorces utilisées**

Au cours de ce projet, j'ai cherché à savoir si les interactions directes identifiées entre les protéines végétales TON1, FASS et TRM1 existent entre les protéines animales FOP, G5PR et CAP350, en me basant sur les interactions du complexe TTP. Pour cela, j'ai choisi le système double-hydrure de la levure qui permet d'identifier des interactions directes entre protéines.

## 2 Matériel et méthodes

Souche de levure et conditions de culture : La souche de levure *Saccharomyces cerevisiae* L40Δgal4 (MATa trp1 leu2 his3 ade2 LYS2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ) a été utilisée. Elle est cultivée à 28°C dans un milieu YPD (Yeast Extract 10g/L, Bactopeptone 20g/L, glucose 20g/L, pH 6-7, 10g/L agar). Les levures sont également cultivées sur milieu minimum SD (Yeast Nitrogen Base sans acide aminé 6,7g/L, glucose 20g/L, agar 20g/L, pH 5,6) additionné d'acides aminés selon les besoins des levures transformées. Un milieu SD sans leucine, tryptophane ni histidine est noté SD-L-W-H.

Les vecteurs d'entrée : Plusieurs vecteurs d'entrée ont été utilisés. Les vecteurs suivants étaient déjà disponibles au laboratoire et recombinaison dans les vecteurs de destination : TON1a (séquence entière TON1<sup>1-260</sup> et tronquée TON1<sup>1-145</sup>, FASS, le motif M2 de TRM1, TRM<sup>871-905</sup> et le motif M3 de TRM1, TRM<sup>587-698</sup>). Les séquences codantes de FOP (séquence entière FOP<sup>1-399</sup> et tronquée FOP<sup>1-144</sup>), G5PR, les motifs M2 et M3 de CAP350 (respectivement CAP350<sup>3070-3117</sup> et CAP350<sup>1010-1110</sup>) ont été amplifiées par PCR à partir de cDNA de HsG5PR (imaGenes), de CAP350 (A.M. Tassin, Institut Curie, Orsay) et de FOP (O. Rosnet, Centre de Recherche en Cancérologie, Marseille) avec des amorces spécifiques (figure 3) auxquelles ont été ajoutées les séquences de recombinaison AttB1 et AttB2. La liste des amorces utilisées est indiquée dans la figure 3. Les séquences codantes ont été introduites dans le plasmide pDONR207 (Invitrogen) par recombinaison BP (Invitrogen) et les vecteurs d'entrée obtenus ont été séquencés.

Vecteurs pLexA (BD)	Milieu test autoactivation	Milieu test interaction
CAP350 <sup>3070-3117</sup> (M2)	-	SD-L-W-H
CAP350 <sup>1010-1110</sup> (M3)	SD-W-H + 10mM 3 AT	SD-L-W-H + 20mM 3AT
FOP <sup>1-399</sup>	-	SD-L-W-H
FOP <sup>1-144</sup>	-	SD-L-W-H
G5PR	SD-W-H + 2mM 3 AT	SD-L-W-H + 5mM 3AT
TRM <sup>871-905</sup> (M2)	-	SD-L-W-H
TRM <sup>587-698</sup> (M3)	-	SD-L-W-H
TON1 <sup>1-260</sup>	-	SD-L-W-H
TON1 <sup>1-145</sup>	-	SD-L-W-H
FASS	SD-W-H	SD-L-W-H + 2mM 3AT

**Figure 4 : Tests d'autoactivation des vecteurs BD utilisés lors des tests d'interaction dans le système double-hybride de la levure.** La première colonne indique le nom des différents vecteurs BD utilisés. La deuxième colonne indique la composition du milieu utilisé pour tester les interactions avec la concentration de 3AT à ajouter pour ne pas observer d'autoactivation. Quand il n'y a pas d'auto-activation, les tests d'interaction se font sur milieu sans 3AT (SD-L-W-H).

Les vecteurs destination : Le plasmide pGADT7GW est le vecteur pGADT7 modifié et adapté à la technologie Gateway par introduction de la cassette Gateway (attR1-Cmr-ccdB-attR2) en fusion avec le domaine d'activation (AD) du facteur de transcription GAL4. Ce vecteur contient le gène marqueur d'auxotrophie *LEU2*. Le vecteur pLexA est dérivé du vecteur pLex10 dans lequel la cassette Gateway (attR1-Cmr-ccdB-attR2) a été clonée au site EcoRI du domaine de liaison à l'ADN (BD) du facteur de transcription LexA. Ce vecteur contient le gène marqueur d'auxotrophie *TRP1*. Ces deux vecteurs ont été utilisés dans les réactions LR (Invitrogen) avec chaque vecteur d'entrée précédemment cité.

Transformation de levures : Une culture liquide de 10 mL a été cultivée sur la nuit à 28°C dans un milieu YPD. 2 mL de cette culture sont ensuite dilués dans 100 mL de milieu 2 x YPAD (Yeast Extract 20 g/L, Bactopeptone 40 g/L, glucose 40 g/L, adénine 80 mg/L, pH 6-7) jusqu'à obtention d'une  $DO_{260}$  de 0.5. Les levures sont ensuite centrifugées 5 min à 5000 rpm à température ambiante puis resuspendues dans 2 mL d'eau stérile (1/50<sup>ème</sup> du volume de culture). 100 µL de cette solution de levures sont répartis dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL à l'intérieur desquels auront lieu les différentes transformations. Les tubes sont centrifugés à 13000 rpm pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, les levures sont resuspendues dans 360 µL du mix suivant : 240 µL de PEG4000 50%, 0,1 M LiAc, 10 µg de DNA carrier préalablement incubé pendant 5 min à 100°C puis placé sur glace, 150ng de plasmide dans le cas d'une simple transformation et 2x1 µg de plasmides dans le cas d'une double transformation. Après avoir été vortexés, les tubes sont incubés pendant 15 min à température ambiante. Les levures subissent ensuite un choc thermique à 42°C pendant 20 min et sont centrifugées pendant 5 min à 5000 rpm à température ambiante. Dans le cas d'une simple ou d'une double transformation, les levures sont resuspendues dans respectivement 500 et 300 µL d'eau stérile, puis respectivement 150 et 300 µL de levures sont étalées sur milieu sélectif. Après transformation, les levures sont sélectionnées sur milieu SD minimum.

BD / AD	CAP350 <sup>3070-3117</sup> (M2)	CAP350 <sup>1010-1110</sup> (M3)	FOP	FOP 1-144	G5PR	TRM <sup>871-905</sup> (M2)	TRM <sup>587-698</sup> (M3)	TON1	TON1 <sup>1-145</sup>	FASS
CAP350 <sup>3070-3117</sup> (M2)			+					+		
CAP350 <sup>1010-1110</sup> (M3)					-					-
FOP					-	+				-
FOP 1-144					-	+				+
G5PR										
TRM <sup>871-905</sup> (M2)										
TRM <sup>587-698</sup> (M3)										
TON1										
TON1 <sup>1-145</sup>										
FASS										

**Figure 5 : interactions testées en double hybride entre protéines animales et entre protéines animales et végétales.** Les interactions positives sont notées « + » et les interactions négatives sont notées « - ». Les interactions en bleu représentent certaines interactions identifiées avant mon arrivée dans l'équipe. Les interactions en orange sont celles que j'ai identifiées. Les cases grises représentent les interactions que je n'ai pas testées.

Tests d'interaction double-hybride chez la levure : Chacune des constructions a été introduite dans la souche de levure *S. cerevisiae* L40Δgal4 qui porte le gène rapporteur de l'interaction *HIS3* possédant dans son promoteur les séquences de liaison du facteur LexA. Afin de déterminer le niveau d'autoactivation du gène rapporteur de l'interaction *HIS3*, les levures issues de chaque simple transformation avec les vecteurs BD et AD ont été cultivées sur des milieux SD-W et SD-L sans histidine (H) (respectivement SD-W-H et SD-L-H) contenant des concentrations croissantes (0-5-10-20 mM) de 3-amino-1,2,4-triazole (3AT), un inhibiteur compétitif du produit du gène *HIS3*. La concentration de 3AT à ajouter pour supprimer une autoactivation éventuelle dépend de chaque protéine appât. 10 clones issus de chaque double transformation sont sélectionnés sur un milieu SD-L-W puis cultivées sur un milieu SD-L-W-H contenant des concentrations croissantes de 3AT afin de déterminer la force de l'interaction entre les deux protéines. En cas d'autoactivation, le test d'interaction a été réalisé sur un milieu contenant une concentration en 3AT ne permettant pas d'autoactivation.

### **3 Résultats : Des interactions conservées entre protéines animales et végétales**

J'ai testé des interactions directes entre les trois protéines animales FOP, CAP350 et G5PR et des interactions deux à deux entre les protéines du complexe TTP d'*Arabidopsis* et celles présentes chez l'homme.

Comme il a été montré que la protéine TON1 entière n'interagit pas avec FASS chez la levure alors que le fragment TON1<sup>1-145</sup> interagit (Spinner et al., 2013), j'ai utilisé deux constructions pour FOP dans mes tests d'interaction, la séquence codante entière de FOP, FOP<sup>1-399</sup>, et la partie N-terminal de la séquence, FOP<sup>1-144</sup>.

Les vecteurs AD ne montrent aucune autoactivation. Les résultats des tests d'autoactivation des différents vecteurs BD et les milieux utilisés pour tester les interactions sont résumés dans la figure 4.

Toutes les interactions testées et leur résultat sont représentés dans la figure 5.

AD \ BD	∅	TON1	CAP350 <sup>3070-3117</sup> (M2)
∅		■ (-)	■ (-)
TON1	■ (-)		■ (+)
CAP350 <sup>3070-3117</sup> (M2)	■ (-)	■ (+)	

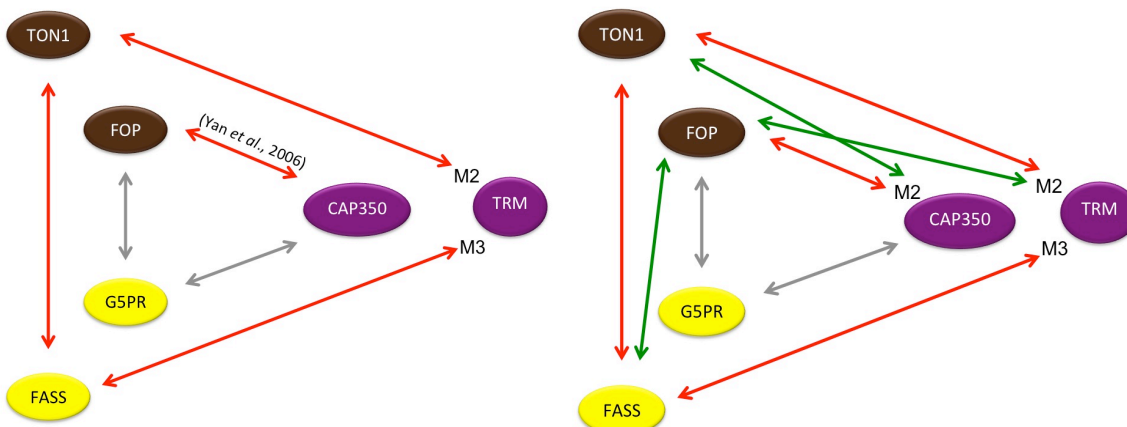
  

AD \ BD	∅	FASS	FOP <sup>1-144</sup>
∅		■ (-)	■ (-)
FASS	■ (-)		■ (-)
FOP <sup>1-144</sup>	■ (-)	■ (+)	

AD \ BD	∅	TRM <sup>871-905</sup> (M2)	FOP <sup>1-144</sup>
∅		■ (-)	■ (-)
TRM <sup>871-905</sup> (M2)	■ (-)		■ (+)
FOP	■ (-)	■ (+)	

**Figure 6 : Interactions entre protéines animales et végétales en système double-hybride.** Le motif M2 de CAP350 correspond aux 48 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine. Le motif M2 de TRM1 correspond aux 34 derniers résidus (871-905). La partie N-terminale de FOP correspond aux 144 premiers acides aminés. AD correspond au domaine d'activation et BD au domaine de liaison. Les interactions en gris n'ont pas été testées.



**Figure 7 : Les interactions de complexe TTP sont conservées entre partenaires animaux et végétaux.** Les flèches rouges représentent les interactions déjà publiées, les flèches grises représentent des interactions hypothétiques et les flèches vertes correspondent aux interactions entre protéines animales et végétales identifiées dans ce projet.

J'ai ainsi pu confirmer l'interaction entre FOP et CAP350<sup>3070-3117</sup> décrite en 2006 (Yan et al., 2006). J'ai également montré que ce même fragment de CAP350 est capable d'interagir avec TON1. Ceci suggère que les 48 acides aminés C-terminaux de CAP350 ont le même rôle que le motif M2 des TRMs dans l'interaction avec, respectivement, FOP et TON1. De plus, j'ai montré que le motif M2 de TRM1 interagit avec FOP, ce qui confirme que les motifs M2 de CAP350 et de TRM1 sont interchangeables et assurent la même fonction d'interaction avec FOP ou TON1. Enfin, j'ai montré une interaction entre la protéine FASS et FOP<sup>1-144</sup> mais pas avec la protéine FOP entière, comme c'est le cas pour TON1 en double-hybride. Ces résultats sont présentés dans les figures 6 et 7.

On pouvait s'attendre à ce que G5PR interagisse avec FOP et avec le motif M3 de CAP350 comme c'est le cas pour FASS, qui interagit avec TON1 et TRM1 en double-hybride. Cependant, le système double-hybride et les constructions que nous avons utilisés n'ont pas permis de mettre en évidence ces interactions.

## 4 Discussion

En plus des interactions déjà publiées (TON1- TRM<sup>871-905</sup> et FOP- CAP350<sup>3070-3117</sup>), ce travail a permis de mettre en évidence des interactions entre : (1) TON1 et le motif M2 de CAP350, (2) FOP et le motif M2 de TRM1, (3) FOP et FASS (figure 7).

L'interaction entre FASS et FOP montre que FOP est bien capable d'interagir avec une sous-unité régulatrice de PP2A même si nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction entre FOP et G5PR. Cette absence d'interaction révèle sous doute une des limites des tests d'interaction en double-hybride : un mauvais repliement ou une mauvaise conformation de la protéine d'intérêt exprimée chez la levure peut empêcher l'interaction avec une protéine partenaire. Probablement pour les mêmes raisons, nous n'avons pas été en mesure de montrer que le motif M3 de CAP350 est impliqué dans l'interaction avec G5PR alors qu'on pouvait s'y attendre d'après les interactions mises en jeu au sein du complexe TTP.

En revanche, les motifs M2 de TRM1 et de CAP350 interagissent à la fois avec FOP et avec TON1. L'existence d'interactions croisées entre protéines des règnes animal et végétal renforce l'idée que ce réseau d'interactions est ancien chez les eucaryotes et que sa fonction ancestrale est en lien avec la régulation du cytosquelette microtubulaire.





TON1/FOP, FASS/G5PR et les autres sous-unités PP2A ont clairement des origines communes. En revanche, l'absence de similarités détectable entre les TRMs et CAP350, en dehors des trois courts motifs identifiés, ne permet pas de conclure à une origine évolutive commune entre ces protéines pour le moment. Les motifs partagés pourraient résulter d'une convergence entre protéines assurant le recrutement de l'ensemble (TON1/FOP)-(FASS/G5PR)-(PP2A) à des structures cellulaires différentes, en lien avec des modes de nucléation et de régulation du cytosquelette très divergents entre cellules animales et végétales. Ce résultat a été intégré à l'article Drevensek *et al.* (2012) qui décrivait l'identification de la famille des protéines TRMs (Drevensek et al., 2012).

Afin de déterminer si la fonction de ces protéines a été conservée dans les deux règnes, il sera intéressant de réaliser des tests de complémentations croisés. Il faudra, par exemple, exprimer la protéine G5PR dans un fond mutant *fass* d'*Arabidopsis*, ou les protéines FOP ou FOR20 ou des protéines chimériques FOP/TON1 dans un fond mutant *ton1*. L'étude des plantes obtenues permettra de déterminer si les protéines humaines sont capables de compléter tout ou une partie du phénotype des mutants *ton1* ou *fass*.

Le complexe FOP/CAP350/G5PR n'a été que récemment mis en évidence (Hutchins et al., 2010) et n'a pas encore été étudié en tant que tel chez l'homme. En particulier, la fonction de G5PR au centrosome n'a encore jamais été caractérisée dans les cellules humaines. Il est probable que les recherches menées sur le complexe dans les cellules végétales orienteront les travaux menés chez l'homme et réciproquement. Ces données nous permettront de savoir si les cibles de l'activité phosphatase PP2A sont équivalentes chez les deux complexes et si le mode de régulation de l'activité PP2A est conservé entre le règne animal et le règne végétal.



Il est frappant de constater qu'alors qu'il n'existe qu'une seule protéine CAP350 chez l'homme, chez les végétaux, la famille TRM compte une trentaine de membres. L'hypothèse de travail de l'équipe est que cette diversité rend compte de la diversité de fonction de TON1/FASS-PP2A chez *Arabidopsis* au cours de la vie de la cellule et du développement. En revanche, trois protéines humaines montrent des similarités partielles, mais fortes avec TON1 qui elle, est unique chez les angiospermes (ou parfois récemment dupliquée comme chez les Brassicacées) : FOP, FOR20 et OFD1. L'identification des protéines FOR20 et FORIN1 suggère déjà l'existence d'un autre complexe composé de FOR20-FORIN1-G5PR, où FORIN1 aurait une fonction similaire à celle de CAP350. Le complexe protéique FOR20-FORIN1-G5PR pourrait assurer d'autres fonctions que celles décrites par FOP et CAP350, spécifiques de certains types ou certaines activités cellulaires.

Enfin, un troisième motif TRM encore non caractérisé, le motif M4, est commun à la fois à CAP350 et aux TRMs (Drevensek et al., 2012). Il est possible que ce motif, comme les motifs M2 et M3, constitue un motif d'interaction avec un partenaire. Un crible double-hybride utilisant ce motif comme appât pourra permettre d'identifier les protéines d'*Arabidopsis* capables de se lier aux TRMs grâce au motif M4 et de donner des pistes pour les recherches menées chez l'homme pour identifier de nouveaux partenaires de CAP350 et du complexe FOP/CAP350/G5PR.



## Conclusion générale

---



Les objectifs de mon travail de thèse étaient d'identifier, si elles existent, une ou plusieurs protéines TRMs spécifiquement impliquées dans la formation de la PPB. L'ensemble de ma thèse s'est appuyé sur l'hypothèse selon laquelle les TRMs dont l'expression augmente lors de la transition G2/M puissent jouer un rôle dans la formation de la PPB. C'est pourquoi, au début de ce travail, nous avons choisi les gènes *TRM7*, *TRM19* et *TRM29*, potentiellement surexprimés en phase G2/M en cultures cellulaires et nous nous sommes focalisés sur l'étude de leur expression *in planta*. Cette approche qui reposait sur un *a priori* assez fort a néanmoins permis de sélectionner assez rapidement le gène *TRM7* pour une caractérisation approfondie. Nous avons pu montrer que la protéine TRM7 n'est exprimée que lors de la transition G2/M où elle marque spécifiquement la PPB. L'analyse génétique du sous-groupe auquel appartient TRM7, *i.e.* le groupe TRM6-TRM7-TRM8, a montré que ces protéines ont un rôle majeur dans la formation de la PPB. Ce travail offre donc de nombreuses perspectives de recherche.

## 5 Quel est le rôle de TRM7 au sein du complexe TTP ?

Une des hypothèses privilégiées de l'équipe est que les TRMs pourraient être des adaptateurs moléculaires nécessaires au recrutement du complexe TTP vers différentes structures ou compartiments subcellulaires comme les microtubules. Ceci a été suggéré par la capacité de TRM1, TRM8 ou TRM7 à recruter TON1/FASS/PP2A aux microtubules dans un contexte d'expression transitoire dans les cellules épidermiques de feuilles de *N. benthamiana*, ainsi que par la diversité de localisation des membres de la famille étudiés jusqu'alors (Drevensek et al., 2012). Pour démontrer formellement que TRM7 est impliquée dans le recrutement d'un complexe TTP nécessaire à la formation de la PPB, il sera tout d'abord important de préciser à quel moment du cycle cellulaire la protéine TRM7 apparaît au cortex. Même si techniquement cela sera difficile au vu de la faiblesse du signal TRM7-3xYpet, il sera essentiel de suivre l'apparition de TRM7 conjointement à la formation de la PPB, du stade précoce quand la PPB commence à se former jusqu'au stade ultime de rétrécissement de la PPB. Ensuite, une analyse simultanée de la localisation de TRM7 avec celle de FASS ou TON1 dans des cellules en division permettra également de déterminer le rôle de TRM7 dans le recrutement du complexe TTP. Etudier la localisation de TON1 et FASS dans un contexte *trm7* ou *trm6 trm7 trm8* pourra également permettre de savoir dans





quelle mesure leur recrutement à la PPB dépend du sous-groupe TRM6-TRM7-TRM8; néanmoins, on peut anticiper qu'il sera difficile d'en tirer des conclusions puisque l'absence du sous-groupe TRM6-TRM7-TRM8 empêche la formation de la structure sur laquelle on souhaite observer le recrutement de TON1 et FASS. Afin de confirmer que l'interaction entre TRM7 et TON1 est déterminante pour la formation de la PPB, il sera intéressant d'exprimer une forme de TRM7 déléetée de son motif M2 d'interaction avec TON1 dans le triple mutant *trm6 trm7 trm8*.

Une autre fonction de TRM7 pourrait être de recruter la protéine kinase du cycle cellulaire CDKA;1 à la PPB. CDKA;1 est localisée à la PPB mature (Mineyuki et al., 1991a; Weingartner et al., 2001) et serait nécessaire à la dépolymérisation de la PPB lors de l'entrée en mitose. En effet, l'injection de CDKA;1 active dans les cellules végétales avant l'entrée en mitose provoque la dépolymérisation prématurée de la PPB (Hush et al., 1996) alors que l'application d'inhibiteur de CDK retarde la dépolymérisation de la PPB (Binarova et al., 1998). Une approche protéomique a montré que CDKA;1 co-purifie avec TON1 en TAP-TAG lorsque CDKA;1 est exprimée sous contrôle de son propre promoteur (Van Leene et al., 2007), et au moins une protéine TRM est capable de recruter CDKA ;1 aux microtubules via TON1 dans les cellules de *N. benthamiana* (TRM1, Duroc, résultat non publié). Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que TRM7 contribue au recrutement de CDKA;1 à la PPB via TON1.

Ce travail de thèse a également permis de révéler pour la première fois une interaction entre TRMs. Ce résultat, qui devra être confirmé avec des approches indépendantes, peut suggérer une coopération entre les protéines de cette famille pour recruter le complexe TTP. Par exemple, il est possible que TRM7, bien que ne possédant pas de motif de liaison avec FASS, recrute FASS au cortex par l'intermédiaire d'une autre TRM. De plus, TON1 grâce à sa capacité à interagir à la fois avec TRM7 et FASS joue certainement un rôle dans el recrutement de FASS au cortex.



## 6 Quelle(s) fonction(s) pour la super famille des TRMs ?

La diversité existant au sein de la super-famille des protéines TRM tant du point de vue de leur séquence primaire, de leur patron d'expression que de leur localisation subcellulaire quand elle est connue, est intrigante. Afin de déterminer la fonction de ses différents membres, il sera important d'entreprendre une étude systématique de cette famille. Cela permettra de préciser si d'autres TRMs que celles du sous-groupe TRM6-TRM7-TRM8 jouent un rôle lors de la transition G2/M mais aussi plus globalement de préciser l'ensemble des fonctions du complexe TTP au sein de la cellule dont on sait déjà qu'il intervient à la fois dans l'organisation du cytosquelette cortical, en interphase et en préprophase, et dans le gravitropisme (Spinner et al., 2010; Drevensek et al., 2012; Spinner et al., 2013).

L'étude de la localisation subcellulaire d'un représentant de chaque sous-groupe grâce à des approches d'étiquetage de gène dans un contexte génomique pourra permettre d'obtenir de bonnes indications sur les fonctions éventuelles de ces protéines. L'extinction de l'expression d'un sous-groupe entier de TRMs (par approche génétique ou par RNAi pour s'affranchir de la redondance fonctionnelle) et l'analyse des mutants obtenus complètera cette étude. Cette approche de longue haleine pourrait être appliquée en priorité à TRM19 et TRM29 pour comprendre en quoi leur expression accrue en G2/M, notamment pour TRM29, est importante pour la fonction du complexe TTP.

## 7 Pourquoi des boîtes de dégradation dans les séquences des protéines TRM ?

De nombreuses TRMs possèdent des signaux de dégradation potentiels. Ainsi, parmi les 34 TRMs, 12 protéines possèdent des séquences consensus D-box et 9 des KEN-box. La présence de ces signaux pourrait être un critère de sélection pour choisir les sous-groupes de TRMs à étudier en priorité. Par exemple, le sous-groupe 6 (TRM23-TRM24-TRM25) paraît particulièrement intéressant puisque les trois protéines de ce sous-groupe contiennent à la fois une D-box et une KEN box potentielles et qu'elles sont vraisemblablement capables de se lier aux microtubules.



Plus généralement, si ces signaux sont bien impliqués dans la dégradation des protéines en mitose, leur présence interroge : pourquoi la cellule aurait-elle besoin de dégrader les protéines TRMs pendant la mitose ? Pour répondre à cette question, il sera nécessaire d'étudier les mécanismes de dégradation des protéines TRMs, et en particulier de la protéine TRM7. La mutagenèse des boîtes de dégradation potentielles de TRM7 permettra dans un premier temps de montrer si ces séquences sont bien impliquées dans la disparition de TRM7 en métaphase. Si tel est le cas, que se passera-t-il si on exprime dans un contexte triple mutant *trm6 trm7 trm8* une forme mutante de la protéine TRM7 non dégradée ? La mitose sera-t-elle affectée ?

## 8 TRM7, un marqueur spécifique de la PPB

L'identification de TRM7 comme marqueur spécifique de la PPB constitue un outil de choix pour déterminer pour la première fois, la composition du complexe TTP lors de la transition G2/M. L'utilisation de TRM7 sous contrôle de son propre promoteur comme appât dans des expériences de TAP-TAG sur des cellules synchronisées (soit des cellules d'*Arabidopsis* en culture (Menges and Murray, 2002), soit des pointes racinaires synchronisées (Cools et al., 2010)) permettra de connaître finement la composition du complexe TTP lors de la formation de la PPB. Cela pourra permettre également d'identifier de nouveaux partenaires impliqués dans ce processus, voire d'identifier les cibles, encore inconnues, de l'activité phosphatase PP2A lors de la transition G2/M.

## 9 Le triple mutant *trm6 trm7 trm8*, un nouvel outil pour l'étude du rôle de la PPB dans la position du plan de division

Depuis de nombreuses années, il est généralement admis que la PPB détermine la position du futur plan de division puisqu'il y a une corrélation parfaite entre la position de ces deux structures dans toutes les cellules/espèces où cette question a été étudiée (Brown and Lemmon, 2001; Van Damme and Geelen, 2008; Muller et al., 2009; Duroc et al., 2010).

Le triple mutant *trm6 trm7 trm8* que nous avons obtenu au cours de ce travail permettra d'étudier sous un nouvel angle le rôle de la PPB dans la détermination du plan de division chez les plantes. En effet, bien que ce mutant soit incapable de former de PPB, son



phénotype cellulaire et développemental est peu affecté en comparaison du phénotype sévère des mutants *ton1* et *fass*. Il semble donc que nous ayons réussi à découpler les fonctions interphasiques des fonctions en préprophase du complexe TTP, les mutants *ton1* et *fass* pouvant être interprétés comme la somme de défauts en interphase et de défauts en G2/M. Ce nouveau matériel génétique permet ainsi d'aborder spécifiquement le rôle de la PPB dans le positionnement du plan de division.

Alors que la position des plans de division chez les mutant *ton1* ou *fass* est aléatoire, l'orientation des divisions dans le triple mutant - en particulier dans la racine - est assez bien conservée. L'orientation globale des divisions est bien transverse par rapport à l'axe d'élongation de la racine, même si de nombreux plans oscillent autour de cette position. Ceci montre que bien d'autres mécanismes sont impliqués dans la position du plan de division. Ce mutant permettra ainsi dans le futur d'évaluer, par exemple, la contribution respective du cytosquelette d'interphase, de la polarité, de la géométrie de la cellule, des hormones ou des stress mécaniques dans l'orientation générale de la division.

De plus, le fait que les plans de division soient plus ou moins affectés par l'absence de PPB selon les tissus et le contexte cellulaire indique que des mécanismes propres à chaque tissu sont impliquée dans l'orientation du plan de division. Il est possible qu'au sein de tissus ayant moins de contraintes physiques comme dans l'embryon, la PPB joue un rôle beaucoup plus important dans la détermination du plan de division que dans la racine. Grâce à nos résultats, une analyse inédite cherchant à quantifier la contribution relative de la PPB et des signaux internes (polarité, géométrie) et externes (hormones, stress mécaniques, organisation tissulaire) à la cellule dans chaque tissu peut maintenant être envisagée.





# Bibliographie

---



- Abrash, E.B., and Bergmann, D.C.** (2009). Asymmetric cell divisions: a view from plant development. *Developmental cell* **16**, 783-796.
- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T., and Genschik, P.** (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Current biology : CB* **19**, 1188-1193.
- Acquaviva, C., Chevrier, V., Chauvin, J.P., Fournier, G., Birnbaum, D., and Rosnet, O.** (2009). The centrosomal FOP protein is required for cell cycle progression and survival. *Cell cycle* **8**, 1217-1227.
- Aida, M., Beis, D., Heidstra, R., Willemsen, V., Blilou, I., Galinha, C., Nussaume, L., Noh, Y.S., Amasino, R., and Scheres, B.** (2004). The PLETHORA genes mediate patterning of the *Arabidopsis* root stem cell niche. *Cell* **119**, 109-120.
- Aloni, R., Langhans, M., Aloni, E., and Ullrich, C.I.** (2004). Role of cytokinin in the regulation of root gravitropism. *Planta* **220**, 177-182.
- Ambrose, C., Allard, J.F., Cytrynbaum, E.N., and Wasteneys, G.O.** (2011). A CLASP-modulated cell edge barrier mechanism drives cell-wide cortical microtubule organization in *Arabidopsis*. *Nature communications* **2**, 430.
- Ambrose, J.C., and Cyr, R.** (2008). Mitotic spindle organization by the preprophase band. *Mol Plant* **1**, 950-960.
- Ambrose, J.C., and Wasteneys, G.O.** (2008). CLASP modulates microtubule-cortex interaction during self-organization of acentrosomal microtubules. *Mol Biol Cell* **19**, 4730-4737.
- Ambrose, J.C., Li, W., Marcus, A., Ma, H., and Cyr, R.** (2005). A minus-end-directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Mol Biol Cell* **16**, 1584-1592.
- 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.
- Amon, A.** (1998). Controlling cell cycle and cell fate: common strategies in prokaryotes and eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 85-86.
- Anders, A., and Sawin, K.E.** (2011). Microtubule stabilization in vivo by nucleation- incompetent gamma-tubulin complex. *Journal of cell science* **124**, 1207-1213.
- Andersen, J.S., Wilkinson, C.J., Mayor, T., Mortensen, P., Nigg, E.A., and Mann, M.** (2003). Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570-574.
- Araki, S., Ito, M., Soyano, T., Nishihama, R., and Machida, Y.** (2004). Mitotic cyclins stimulate the activity of c-Myb-like factors for transactivation of G2/M phase-specific genes in tobacco. *The Journal of biological chemistry* **279**, 32979-32988.
- Askham, J.M., Vaughan, K.T., Goodson, H.V., and Morrison, E.E.** (2002). Evidence that an interaction between EB1 and p150(Glued) is required for the formation and maintenance of a radial microtubule array anchored at the centrosome. *Mol Biol Cell* **13**, 3627-3645.
- Aubusson-Fleury, A., Lemullois, M., de Loubresse, N.G., Laligne, C., Cohen, J., Rosnet, O., Jerka-Dziadosz, M., Beisson, J., and Koll, F.** (2012). The conserved centrosomal protein FOR20 is required for assembly of the transition zone and basal body docking at the cell surface. *Journal of cell science* **125**, 4395-4404.

- Austin, J.R., 2nd, Segui-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.
- Ayaydin, F., Vissi, E., Meszaros, T., Miskolczi, P., Kovacs, I., Feher, A., Dombradi, V., Erdodi, F., Gergely, P., and Dudits, D.** (2000). Inhibition of serine/threonine-specific protein phosphatases causes premature activation of cdc2MsF kinase at G2/M transition and early mitotic microtubule organisation in alfalfa. *Plant J.* **23**, 85-96.
- Azimzadeh, J., and Bornens, M.** (2007). Structure and duplication of the centrosome. *Journal of cell science* **120**, 2139-2142.
- Azimzadeh, J., Nacry, P., Christodoulidou, A., Drevensek, S., Camilleri, C., Amieur, N., Parcy, F., Pastuglia, M., and Bouchez, D.** (2008). *Arabidopsis* TONNEAU1 proteins are essential for preprophase band formation and interact with centrin. *Plant Cell* **20**, 2146-2159.
- Bailly, E., Pines, J., Hunter, T., and Bornens, M.** (1992). Cytoplasmic accumulation of cyclin B1 in human cells: association with a detergent-resistant compartment and with the centrosome. *Journal of cell science* **101 ( Pt 3)**, 529-545.
- Ballesteros, I., Dominguez, T., Sauer, M., Paredes, P., Duprat, A., Rojo, E., Sanmartin, M., and Sanchez-Serrano, J.J.** (2013). Specialized functions of the PP2A subfamily II catalytic subunits PP2A-C3 and PP2A-C4 in the distribution of auxin fluxes and development in *Arabidopsis*. *Plant J* **73**, 862-872.
- 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 Motility and the Cytoskeleton* **65**, 1-11.
- Barenz, F., Mayilo, D., and Gruss, O.J.** (2011). Centriolar satellites: busy orbits around the centrosome. *European journal of cell biology* **90**, 983-989.
- Barr, F.A., and Gruneberg, U.** (2007). Cytokinesis: placing and making the final cut. *Cell* **131**, 847-860.
- Baskin, T.I.** (2001). On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* **215**, 150-171.
- Baum, S.F., Dubrovsky, J.G., and Rost, T.L.** (2002). Apical organization and maturation of the cortex and vascular cylinder in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) roots. *American journal of botany* **89**, 908-920.
- Beemster, G., and Baskin, T.** (1998). Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **116**, 1515-1526.
- Benfey, P.N., Linstead, P.J., Roberts, K., Schiefelbein, J.W., Hauser, M.T., and Aeschbacher, R.A.** (1993). Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* **119**, 57-70.
- Benkova, E., and Hejatko, J.** (2009). Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant molecular biology* **69**, 383-396.
- Benschop, J.J., Mohammed, S., O'Flaherty, M., Heck, A.J., Slijper, M., and Menke, F.L.** (2007). Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics* **6**, 1198-1214.
- Besson, S., and Dumais, J.** (2011). Universal rule for the symmetric division of plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 6294-6299.

- Bichet, A., Desnos, T., Turner, S., Grandjean, O., and Hofte, H.** (2001). BOTERO1 is required for normal orientation of cortical microtubules and anisotropic cell expansion in *Arabidopsis*. *Plant J* **25**, 137-148.
- Binarova, P., Dolezel, J., Draber, P., Heberle-Bors, E., Strnad, M., and Bogre, L.** (1998). Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. *Plant J* **16**, 697-707.
- Binarova, P., Cenklova, V., Prochazkova, J., Duskocilova, A., Volc, J., Vrlik, M., and Bogre, L.** (2006). Gamma-tubulin is essential for acentrosomal microtubule nucleation and coordination of late mitotic events in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1199-1212.
- Blackman, L.M., Harper, J.D., and Overall, R.L.** (1999). Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *Eur J Cell Biol* **78**, 297-304.
- Blakeslee, J.J., Peer, W.A., and Murphy, A.S.** (2005). Auxin transport. *Curr Opin Plant Biol* **8**, 494-500.
- Blilou, I., Xu, J., Wildwater, M., Willemsen, V., Paponov, I., Friml, J., Heidstra, R., Aida, M., Palme, K., and Scheres, B.** (2005). The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**, 39-44.
- Bloom, G.S.** (1992). Motor proteins for cytoplasmic microtubules. *Current opinion in cell biology* **4**, 66-73.
- Booher, R.N., Deshaies, R.J., and Kirschner, M.W.** (1993). Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *The EMBO journal* **12**, 3417-3426.
- Bornens, M.** (2002). Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol* **14**, 25-34.
- Bornens, M.** (2012). The centrosome in cells and organisms. *Science* **335**, 422-426.
- Borowska-Wykret, D., Elsner, J., De Veylder, L., and Kwiatkowska, D.** (2013). Defects in leaf epidermis of *Arabidopsis thaliana* plants with CDKA;1 activity reduced in the shoot apical meristem. *Protoplasma* **250**, 955-961.
- Boruc, J., Mylle, E., Duda, M., De Clercq, R., Rombauts, S., Geelen, D., Hilson, P., Inze, D., Van Damme, D., and Russinova, E.** (2010). Systematic localization of the *Arabidopsis* core cell cycle proteins reveals novel cell division complexes. *Plant Physiol.* **152**, 553-565.
- Boudolf, V., Inze, D., and De Veylder, L.** (2006). What if higher plants lack a CDC25 phosphatase? *Trends Plant Sci* **11**, 474-479.
- Boudolf, V., Barroco, R., Engler, J.D., Verkest, A., Beeckman, T., Naudts, M., Inze, D., and De Veylder, L.** (2004). B1-type cyclin-dependent kinases are essential for the formation of stomatal complexes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **16**, 945-955.
- Bouquin, T., Mattsson, O., Naested, H., Foster, R., and Mundy, J.** (2003). The *Arabidopsis* lue1 mutant defines a katanin p60 ortholog involved in hormonal control of microtubule orientation during cell growth. *J Cell Sci* **116**, 791-801.
- Bringmann, M., Li, E., Sampathkumar, A., Kocabek, T., Hauser, M.T., and Persson, S.** (2012a). POM-POM2/cellulose synthase interacting1 is essential for the functional association of cellulose synthase and microtubules in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **24**, 163-177.
- Bringmann, M., Landrein, B., Schudoma, C., Hamant, O., Hauser, M.T., and Persson, S.** (2012b). Cracking the elusive alignment hypothesis: the microtubule-cellulose synthase nexus unraveled. *Trends in plant science* **17**, 666-674.

- Brouhard, G.J., Stear, J.H., Noetzel, T.L., Al-Bassam, J., Kinoshita, K., Harrison, S.C., Howard, J., and Hyman, A.A.** (2008). XMAP215 is a processive microtubule polymerase. *Cell* **132**, 79-88.
- Brown, R.C., and Lemmon, B.E.** (2001). The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. *Protoplasma* **215**, 35-49.
- Burk, D.H., Liu, B., Zhong, R., Morrison, W.H., and Ye, Z.H.** (2001). A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *Plant Cell* **13**, 807-827.
- Burssens, S., de Almeida Engler, J., Beeckman, T., Richard, C., Shaul, O., Ferreira, P., Van Montagu, M., and Inze, D.** (2000). Developmental expression of the *Arabidopsis thaliana* *CycA2;1* gene. *Planta* **211**, 623-631.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O., and Bouchez, D.** (2002). The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel PP2A regulatory subunit essential for the control of cortical cytoskeleton. *Plant Cell* **14**, 833-845.
- Campilho, A., Garcia, B., Toorn, H.V., Wijk, H.V., and Scheres, B.** (2006). Time-lapse analysis of stem-cell divisions in the *Arabidopsis thaliana* root meristem. *Plant J* **48**, 619-627.
- Chan, J., Calder, G.M., Doonan, J.H., and Lloyd, C.W.** (2003). EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nature cell biology* **5**, 967-971.
- 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, J., Sambade, A., Calder, G., and Lloyd, C.** (2009). *Arabidopsis* cortical microtubules are initiated along, as well as branching from, existing microtubules. *The Plant cell* **21**, 2298-2306.
- Chan, J., Jensen, C.G., Jensen, L.C., Bush, M., and Lloyd, C.W.** (1999). 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., Crowell, E., Eder, M., Calder, G., Bunnewell, S., Findlay, K., Vernhettes, S., Hofte, H., and Lloyd, C.** (2010). The rotation of cellulose synthase trajectories is microtubule dependent and influences the texture of epidermal cell walls in *Arabidopsis* hypocotyls. *Journal of cell science* **123**, 3490-3495.
- Chiang, C.W., Liu, W.K., and Chou, C.K.** (2011). Phosphorylation-dependent association of the G4-1/G5PR regulatory subunit with IKKbeta negatively modulates NF-kappaB activation through recruitment of protein phosphatase 5. *The Biochemical journal* **433**, 187-196.
- Cleary, A.L., and Smith, L.G.** (1998). The Tangled1 gene is required for spatial control of cytoskeletal arrays associated with cell division during maize leaf development. *Plant Cell* **10**, 1875-1888.
- Cleary, A.L., Gunning, B.E.S., Wasteneys, G.O., and Hepler, P.K.** (1992). Microtubule and F-actin dynamics at the division site in living *Tradescantia* stamen hair cells. *Journal of Cell Science* **103**, 977-988.
- Clouse, S.D., and Sasse, J.M.** (1998). BRASSINOSTEROIDS: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **49**, 427-451.
- Colasanti, J., Cho, S.O., Wick, S., and Sundaresan, V.** (1993). Localization of the functional p34cdc2 homolog of maize in root tip and stomatal complex cells: Association with predicted division sites. *Plant Cell* **5**, 1101-1111.

- Cook, G.S., Gronlund, A.L., Siciliano, I., Spadafora, N., Amini, M., Herbert, R.J., Bitonti, M.B., Graumann, K., Francis, D., and Rogers, H.J.** (2013). Plant WEE1 kinase is cell cycle regulated and removed at mitosis via the 26S proteasome machinery. *J Exp Bot* **64**, 2093-2106.
- Cools, T., Iantcheva, A., Maes, S., Van den Daele, H., and De Veylder, L.** (2010). A replication stress-induced synchronization method for *Arabidopsis thaliana* root meristems. *Plant J* **64**, 705-714.
- Cruz-Ramirez, A., Diaz-Trivino, S., Blilou, I., Grieneisen, V.A., Sozzani, R., Zamioudis, C., Miskolczi, P., Nieuwland, J., Benjamins, R., Dhonukshe, P., Caballero-Perez, J., Horvath, B., Long, Y., Mahonen, A.P., Zhang, H., Xu, J., Murray, J.A., Benfey, P.N., Bako, L., Maree, A.F., and Scheres, B.** (2012). A bistable circuit involving SCARECROW-RETINOBLASTOMA integrates cues to inform asymmetric stem cell division. *Cell* **150**, 1002-1015.
- Cui, H., Levesque, M.P., Vernoux, T., Jung, J.W., Paquette, A.J., Gallagher, K.L., Wang, J.Y., Blilou, I., Scheres, B., and Benfey, P.N.** (2007). An evolutionarily conserved mechanism delimiting SHR movement defines a single layer of endodermis in plants. *Science* **316**, 421-425.
- De Smet, I., and Beekman, T.** (2011). Asymmetric cell division in land plants and algae: the driving force for differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 177-188.
- De Tullio, M.C., Jiang, K., and Feldman, L.J.** (2010). Redox regulation of root apical meristem organization: connecting root development to its environment. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* **48**, 328-336.
- De Veylder, L., Beekman, T., Beemster, G.T., Krols, L., Terras, F., Landrieu, I., van der Schueren, E., Maes, S., Naudts, M., and Inze, D.** (2001). Functional analysis of cyclin-dependent kinase inhibitors of *Arabidopsis*. *The Plant cell* **13**, 1653-1668.
- Delaval, B., Letard, S., Lelievre, H., Chevrier, V., Daviet, L., Dubreuil, P., and Birnbaum, D.** (2005). Oncogenic tyrosine kinase of malignant hemopathy targets the centrosome. *Cancer Res* **65**, 7231-7240.
- Delay, C., Imin, N., and Djordjevic, M.A.** (2013). Regulation of root development by small signaling peptides. *Frontiers in plant science* **4**, 352.
- Dello Ioio, R., Linhares, F.S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., and Sabatini, S.** (2007). Cytokinins determine *Arabidopsis* root-meristem size by controlling cell differentiation. *Current biology : CB* **17**, 678-682.
- DelVecchio, A.J., Harper, J.D.I., Vaughn, K.C., Baron, A.T., Salisbury, J.L., and Overall, R.L.** (1997). Centrin homologues in higher plants are prominently associated with the developing cell plate. *Protoplasma* **196**, 224-234.
- Depuydt, S., and Hardtke, C.S.** (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current biology : CB* **21**, R365-373.
- Dewitte, W., and Murray, J.A.** (2003). The plant cell cycle. *Annu Rev Plant Biol* **54**, 235-264.
- Dhonukshe, P., and Gadella, T.W., Jr.** (2003). Alteration of microtubule dynamic instability during preprophase band formation revealed by yellow fluorescent protein-CLIP170 microtubule plus-end labeling. *Plant Cell* **15**, 597-611.
- Dhonukshe, P., Mathur, J., Hulskamp, M., and Gadella, T.W., Jr.** (2005). Microtubule plus-ends reveal essential links between intracellular polarization and localized modulation of endocytosis during division-plane establishment in plant cells. *BMC Biol* **3**, 11.



- Dhonukshe, P., Baluska, F., Schlicht, M., Hlavacka, A., Samaj, J., Friml, J., and Gadella, T.W., Jr.** (2006). Endocytosis of cell surface material mediates cell plate formation during plant cytokinesis. *Dev Cell* **10**, 137-150.
- Di Laurenzio, L., Wysocka-Diller, J., Malamy, J.E., Pysh, L., Helariutta, Y., Freshour, G., Hahn, M.G., Feldmann, K.A., and Benfey, P.N.** (1996). The SCARECROW gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the Arabidopsis root. *Cell* **86**, 423-433.
- Ding, Z., and Friml, J.** (2010). Auxin regulates distal stem cell differentiation in Arabidopsis roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 12046-12051.
- Dixit, R., and Cyr, R.J.** (2002). Spatio-temporal relationship between nuclear-envelope breakdown and preprophase band disappearance in cultured tobacco cells. *Protoplasma* **219**, 116-121.
- Dixit, R., and Cyr, R.** (2004). The cortical microtubule array: from dynamics to organization. *Plant Cell* **16**, 2546-2552.
- Doerner, P., Jorgensen, J.E., You, R., Steppuhn, J., and Lamb, C.** (1996). Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380**, 520-523.
- Dolan, L., Janmaat, K., Willemsen, V., Linstead, P., Poethig, S., Roberts, K., and Scheres, B.** (1993). Cellular organisation of the Arabidopsis thaliana root. *Development* **119**, 71-84.
- Doonan, J.H., and Sablowski, R.** (2010). Walls around tumours - why plants do not develop cancer. *Nature reviews. Cancer* **10**, 794-802.
- Doonan, J.H., Cove, D.J., and Lloyd, C.W.** (1985). Immunofluorescence microscopy of microtubules in intact cell lineages of the moss, *Physcomitrella patens*. I. Normal and CIPC-treated tip cells. *Journal of cell science* **75**, 131-147.
- Drevensek, S., Gousot, M., Duroc, Y., Christodoulidou, A., Steyaert, S., Schaefer, E., Duvernois, E., Grandjean, O., Vantard, M., Bouchez, D., and Pastuglia, M.** (2012). The Arabidopsis TRM1-TON1 Interaction Reveals a Recruitment Network Common to Plant Cortical Microtubule Arrays and Eukaryotic Centrosomes. *Plant Cell* **24**, 178-191.
- Drykova, D., Cenklova, V., Sulimenko, V., Volc, J., Draber, P., and Binarova, P.** (2003). Plant gamma-tubulin interacts with alpha beta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *Plant Cell* **15**, 465-480.
- Du, J., Yin, H., Zhang, S., Wei, Z., Zhao, B., Zhang, J., Gou, X., Lin, H., and Li, J.** (2012). Somatic embryogenesis receptor kinases control root development mainly via brassinosteroid-independent actions in Arabidopsis thaliana. *Journal of integrative plant biology* **54**, 388-399.
- Duroc, Y., Bouchez, D., and Pastuglia, M.** (2010). The preprophase band and division site determination in land plants. In *The Plant Cytoskeleton*, B. Liu, ed (New York: Springer USA), pp. 145-185.
- Eggert, U.S., Mitchison, T.J., and Field, C.M.** (2006). Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annual review of biochemistry* **75**, 543-566.
- Eleftheriou, E.P., and Palevitz, B.A.** (1992). The effect of cytochalasin D on preprophase band organization in root tip cells of *Allium*. *Journal of Cell Science* **103**, 989-998.
- Eleftheriou, E.P., Baskin, T.I., and Hepler, P.K.** (2005). Aberrant cell plate formation in the Arabidopsis thaliana microtubule organization 1 mutant. *Plant Cell Physiol* **46**, 671-675.

- Emes, R.D., and Ponting, C.P.** (2001). A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubule dynamics and cell migration. *Human molecular genetics* **10**, 2813-2820.
- Erhardt, M., Stoppin-Mellet, V., Campagne, S., Canaday, J., Mutterer, J., Fabian, T., Sauter, M., Muller, T., Peter, C., Lambert, A.M., and Schmit, A.C.** (2002). The plant Spc98p homologue colocalizes with gamma-tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *J Cell Sci* **115**, 2423-2431.
- 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. *The Plant cell* **22**, 3804-3815.
- Ferrante, M.I., Zullo, A., Barra, A., Bimonte, S., Messaddeq, N., Studer, M., Dolle, P., and Franco, B.** (2006). Oral-facial-digital type I protein is required for primary cilia formation and left-right axis specification. *Nature genetics* **38**, 112-117.
- Ferrante, M.I., Giorgio, G., Feather, S.A., Bulfone, A., Wright, V., Ghiani, M., Selicorni, A., Gamaro, L., Scolari, F., Woolf, A.S., Sylvie, O., Bernard, L., Malcolm, S., Winter, R., Ballabio, A., and Franco, B.** (2001). Identification of the gene for oral-facial-digital type I syndrome. *Am J Hum Genet* **68**, 569-576.
- Ferreira, P.C., Hemerly, A.S., Engler, J.D., van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D.** (1994). Developmental expression of the arabidopsis cyclin gene *cyc1At*. *The Plant cell* **6**, 1763-1774.
- Fishel, E.A., and Dixit, R.** (2013). Role of nucleation in cortical microtubule array organization: variations on a theme. *Plant J* **75**, 270-277.
- Flanders, D.J., Rawlins, D.J., Shaw, P.J., and Lloyd, C.W.** (1990). Nucleus-associated microtubules help determine the division plane of plant epidermal cells: avoidance of four-way junctions and the role of cell geometry. *J Cell Biol* **110**, 1111-1122.
- Fobert, P.R., Coen, E.S., Murphy, G.J., and Doonan, J.H.** (1994). Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. *The EMBO journal* **13**, 616-624.
- Francis, D.** (2007). The plant cell cycle--15 years on. *New Phytol* **174**, 261-278.
- Francis, D.** (2011). A commentary on the G(2)/M transition of the plant cell cycle. *Annals of botany* **107**, 1065-1070.
- Fu, X., and Harberd, N.P.** (2003). Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response. *Nature* **421**, 740-743.
- Fulop, K., Tarayre, S., Kelemen, Z., Horvath, G., Kevei, Z., Nikovics, K., Bako, L., Brown, S., Kondorosi, A., and Kondorosi, E.** (2005). Arabidopsis anaphase-promoting complexes - Multiple activators and wide range of substrates might keep APC perpetually busy. *Cell Cycle* **4**, 1084-1092.
- Gaillard, J., Neumann, E., Van Damme, D., Stoppin-Mellet, V., Ebel, C., Barbier, E., Geelen, D., and Vantard, M.** (2008). Two Microtubule-associated Proteins of Arabidopsis MAP65s Promote Antiparallel Microtubule Bundling. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 4534-4544.
- Galatis, B., and Mitrakos, K.** (1979). On the differential divisions and preprophase microtubule bands involved in the development of stomata of *Vigna sinensis* L. *Journal of cell science* **37**, 11-37.
- Galinha, C., Bilsborough, G., and Tsiantis, M.** (2009). Hormonal input in plant meristems: A balancing act. *Seminars in cell & developmental biology* **20**, 1149-1156.

- Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Bilou, I., Heidstra, R., and Scheres, B.** (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* **449**, 1053-1057.
- Gallagher, K., and Smith, L.G.** (1999). discordia mutations specifically misorient asymmetric cell divisions during development of the maize leaf epidermis. *Development* **126**, 4623-4633.
- Gallagher, K.L., Paquette, A.J., Nakajima, K., and Benfey, P.N.** (2004). Mechanisms regulating SHORT-ROOT intercellular movement. *Current biology : CB* **14**, 1847-1851.
- Garay-Arroyo, A., De La Paz Sanchez, M., Garcia-Ponce, B., Azpeitia, E., and Alvarez-Buylla, E.R.** (2012). Hormone symphony during root growth and development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **241**, 1867-1885.
- Gauthier, N.P., Larsen, M.E., Wernersson, R., de Lichtenberg, U., Jensen, L.J., Brunak, S., and Jensen, T.S.** (2008). Cyclebase.org--a comprehensive multi-organism online database of cell-cycle experiments. *Nucleic acids research* **36**, D854-859.
- Glotzer, M., Murray, A.W., and Kirschner, M.W.** (1991). Cyclin is degraded by the ubiquitin pathway. *Nature* **349**, 132-138.
- Goetz, S.C., and Anderson, K.V.** (2010). The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature reviews. Genetics* **11**, 331-344.
- Goldstein, L.S., and Philp, A.V.** (1999). The road less traveled: emerging principles of kinesin motor utilization. *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 141-183.
- Gonzalez-Garcia, M.P., Vilarrasa-Blasi, J., Zhiponova, M., Divol, F., Mora-Garcia, S., Russinova, E., and Cano-Delgado, A.I.** (2011). Brassinosteroids control meristem size by promoting cell cycle progression in Arabidopsis roots. *Development* **138**, 849-859.
- Granger, C., and Cyr, R.** (2001). Use of abnormal preprophase bands to decipher division plane determination. *J Cell Sci* **114**, 599-607.
- Grieneisen, V.A., Xu, J., Maree, A.F., Hogeweg, P., and Scheres, B.** (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* **449**, 1008-1013.
- Guertin, D.A., Trautmann, S., and McCollum, D.** (2002). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* **66**, 155-178.
- Gunawardane, R.N., Lizarraga, S.B., Wiese, C., Wilde, A., and Zheng, Y.** (2000). gamma-Tubulin complexes and their role in microtubule nucleation. *Current topics in developmental biology* **49**, 55-73.
- Gutierrez, C.** (2009). The Arabidopsis cell division cycle. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists* **7**, e0120.
- Hacham, Y., Holland, N., Butterfield, C., Ubeda-Tomas, S., Bennett, M.J., Chory, J., and Savaldi-Goldstein, S.** (2011). Brassinosteroid perception in the epidermis controls root meristem size. *Development* **138**, 839-848.
- Haecker, A., Gross-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., and Laux, T.** (2004). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in Arabidopsis thaliana. *Development* **131**, 657-668.
- Haga, N., Kato, K., Murase, M., Araki, S., Kubo, M., Demura, T., Suzuki, K., Muller, I., Voss, U., Jurgens, G., and Ito, M.** (2007). R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in Arabidopsis thaliana. *Development* **134**, 1101-1110.

- Hagting, A., Karlsson, C., Clute, P., Jackman, M., and Pines, J.** (1998). MPF localization is controlled by nuclear export. *The EMBO journal* **17**, 4127-4138.
- Hagting, A., Den Elzen, N., Vodermaier, H.C., Waizenegger, I.C., Peters, J.M., and Pines, J.** (2002). Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. *J Cell Biol* **157**, 1125-1137.
- Hahne, G., and Hoffmann, F.** (1984). Dimethyl sulfoxide can initiate cell divisions of arrested callus protoplasts by promoting cortical microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 5449-5453.
- Hamada, T.** (2007). Microtubule-associated proteins in higher plants. *J Plant Res* **120**, 79-98.
- Hamada, T., Igarashi, H., Itoh, T.J., Shimmen, T., and Sonobe, S.** (2004). Characterization of a 200 kDa microtubule-associated protein of tobacco BY-2 cells, a member of the XMAP215/MOR1 family. *Plant Cell Physiol* **45**, 1233-1242.
- Hamill, D.R., Severson, A.F., Carter, J.C., and Bowerman, B.** (2002). Centrosome maturation and mitotic spindle assembly in *C. elegans* require SPD-5, a protein with multiple coiled-coil domains. *Developmental cell* **3**, 673-684.
- Hardham, A.R., and Gunning, B.E.** (1978). Structure of cortical microtubule arrays in plant cells. *J Cell Biol* **77**, 14-34.
- Haren, L., Remy, M.H., Bazin, I., Callebaut, I., Wright, M., and Merdes, A.** (2006). NEDD1-dependent recruitment of the gamma-tubulin ring complex to the centrosome is necessary for centriole duplication and spindle assembly. *J Cell Biol* **172**, 505-515.
- Harper, J.D.I., Fowke, L.C., Gilmer, S., Overall, R.L., and Marc, J.** (2000). A centrin homologue is localised across the developing cell plate in gymnosperms and angiosperms. *Protoplasma* **211**, 207-216.
- Harrison, H.F., Peterson, J.K., Snook, M.E., Bohac, J.R., and Jackson, D.M.** (2003). Quantity and potential biological activity of caffeic acid in sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] storage root periderm. *Journal of agricultural and food chemistry* **51**, 2943-2948.
- Hashimoto, T.** (2013). A ring for all: gamma-tubulin-containing nucleation complexes in acentrosomal plant microtubule arrays. *Curr Opin Plant Biol*.
- Heidstra, R., Welch, D., and Scheres, B.** (2004). Mosaic analyses using marked activation and deletion clones dissect Arabidopsis SCARECROW action in asymmetric cell division. *Genes Dev* **18**, 1964-1969.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-Diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M.T., and Benfey, P.N.** (2000). The SHORT-ROOT gene controls radial patterning of the Arabidopsis root through radial signaling. *Cell* **101**, 555-567.
- Hemerly, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Inze, D., and Ferreira, P.** (1992). Genes regulating the plant cell cycle: isolation of a mitotic-like cyclin from Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 3295-3299.
- Hemerly, A., Engler Jde, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inze, D., and Ferreira, P.** (1995). Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *The EMBO journal* **14**, 3925-3936.
- Hepler, P.K., and Palevitz, B.A.** (1986). Metabolic inhibitors block anaphase A in vivo. *J Cell Biol* **102**, 1995-2005.
- Heyman, J., and De Veylder, L.** (2012). The anaphase-promoting complex/cyclosome in control of plant development. *Molecular plant* **5**, 1182-1194.

- Hoppeler-Lebel, A., Celati, C., Bellett, G., Mogensen, M.M., Klein-Hitpass, L., Bornens, M., and Tassin, A.M.** (2007). Centrosomal CAP350 protein stabilises microtubules associated with the Golgi complex. *J Cell Sci* **120**, 3299-3308.
- Hoshino, H., Yoneda, A., Kumagai, F., and Hasezawa, S.** (2003). Roles of actin-depleted zone and preprophase band in determining the division site of higher-plant cells, a tobacco BY-2 cell line expressing GFP-tubulin. *Protoplasma* **222**, 157-165.
- Hush, J., Wu, L.P., John, P.C.L., Hepler, L.H., and Hepler, P.K.** (1996). Plant mitosis promoting factor disassembles the microtubule preprophase band and accelerates prophase progression in *Tradescantia*. *Cell Biology International* **20**, 275-287.
- 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.
- Hutchins, J.R., Toyoda, Y., Hegemann, B., Poser, I., Heriche, J.K., Sykora, M.M., Augsburg, M., Hudecz, O., Buschhorn, B.A., Bulkescher, J., Conrad, C., Comartin, D., Schleiffer, A., Sarov, M., Pozniakovsky, A., Slabicki, M.M., Schloissnig, S., Steinmacher, I., Leuschner, M., Ssykor, A., Lawo, S., Pelletier, L., Stark, H., Nasmyth, K., Ellenberg, J., Durbin, R., Buchholz, F., Mechtler, K., Hyman, A.A., and Peters, J.M.** (2010). Systematic analysis of human protein complexes identifies chromosome segregation proteins. *Science* **328**, 593-599.
- Inze, D., and De Veylder, L.** (2006). Cell cycle regulation in plant development. *Annu Rev Genet* **40**, 77-105.
- Ito, M., Iwase, M., Kodama, H., Lavis, P., Komamine, A., Nishihama, R., Machida, Y., and Watanabe, A.** (1998). A novel cis-acting element in promoters of plant B-type cyclin genes activates M phase-specific transcription. *The Plant cell* **10**, 331-341.
- Ito, M., Araki, S., Matsunaga, S., Itoh, T., Nishihama, R., Machida, Y., Doonan, J.H., and Watanabe, A.** (2001). G2/M-phase-specific transcription during the plant cell cycle is mediated by c-Myb-like transcription factors. *The Plant cell* **13**, 1891-1905.
- Ito, M., Marie-Claire, C., Sakabe, M., Ohno, T., Hata, S., Kouchi, H., Hashimoto, J., Fukuda, H., Komamine, A., and Watanabe, A.** (1997). Cell-cycle-regulated transcription of A- and B-type plant cyclin genes in synchronous cultures. *Plant J* **11**, 983-992.
- Janski, N., Masoud, K., Batzenschlager, M., Herzog, E., Evrard, J.L., Houlne, G., Bourge, M., Chaboute, M.E., and Schmit, A.C.** (2012). The GCP3-interacting proteins GIP1 and GIP2 are required for gamma-tubulin complex protein localization, spindle integrity, and chromosomal stability. *The Plant cell* **24**, 1171-1187.
- Janssens, V., Longin, S., and Goris, J.** (2008). PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail). *Trends Biochem. Sci.* **33**, 113-121.
- Jiang, C.J., and Sonobe, S.** (1993). Identification and preliminary characterization of a 65-Kda higher-plant microtubule-associated protein. *J Cell Sci* **105**, 891-901.
- Jiang, K., and Akhmanova, A.** (2011). Microtubule tip-interacting proteins: a view from both ends. *Current opinion in cell biology* **23**, 94-101.
- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inze, D., Umeda, M., and Renaudin, J.P.** (2000). CDK-related protein kinases in plants. *Plant molecular biology* **43**, 607-620.
- Jurgens, G.** (1995). Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. *Cell* **81**, 467-470.
- Jurgens, G., Torres Ruiz, R.A., and Berleth, T.** (1994). Embryonic pattern formation in flowering plants. *Annual review of genetics* **28**, 351-371.

- Kato, K., Galis, I., Suzuki, S., Araki, S., Demura, T., Criqui, M.C., Potuschak, T., Genschik, P., Fukuda, H., Matsuoka, K., and Ito, M.** (2009). Preferential up-regulation of G2/M phase-specific genes by overexpression of the hyperactive form of NtmybA2 lacking its negative regulation domain in tobacco BY-2 cells. *Plant physiology* **149**, 1945-1957.
- Kawamura, E., and Wasteneys, G.O.** (2008). MOR1, the Arabidopsis thaliana homologue of Xenopus MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules in vivo. *J Cell Sci* **121**, 4114-4123.
- 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.
- 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.
- Kidner, C., Sundaresan, V., Roberts, K., and Dolan, L.** (2000). Clonal analysis of the Arabidopsis root confirms that position, not lineage, determines cell fate. *Planta* **211**, 191-199.
- Kirik, A., Ehrhardt, D.W., and Kirik, V.** (2012). TONNEAU2/FASS regulates the geometry of microtubule nucleation and cortical array organization in interphase Arabidopsis cells. *The Plant cell* **24**, 1158-1170.
- Kirik, V., Herrmann, U., Parupalli, C., Sedbrook, J.C., Ehrhardt, D.W., and Hulskamp, M.** (2007). CLASP localizes in two discrete patterns on cortical microtubules and is required for cell morphogenesis and cell division in Arabidopsis. *J Cell Sci* **120**, 4416-4425.
- Kollman, J.M., Merdes, A., Mourey, L., and Agard, D.A.** (2011). Microtubule nucleation by gamma-tubulin complexes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **12**, 709-721.
- Kong, Z., Hotta, T., Lee, Y.R., Horio, T., and Liu, B.** (2010). The Gamma-tubulin complex protein GCP4 Is required for organizing functional microtubule arrays in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 191-204.
- Konishi, M., and Sugiyama, M.** (2003). Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Development* **130**, 5637-5647.
- Kono, Y., Maeda, K., Kuwahara, K., Yamamoto, H., Miyamoto, E., Yonezawa, K., Takagi, K., and Sakaguchi, N.** (2002). MCM3-binding GANP DNA-primase is associated with a novel phosphatase component G5PR. *Genes Cells* **7**, 821-834.
- Kouchi, H., Sekine, M., and Hata, S.** (1995). Distinct classes of mitotic cyclins are differentially expressed in the soybean shoot apex during the cell cycle. *The Plant cell* **7**, 1143-1155.
- Krek, W., and Nigg, E.A.** (1991). Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *The EMBO journal* **10**, 305-316.
- Kyozuka, J.** (2007). Control of shoot and root meristem function by cytokinin. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 442-446.
- Lechner, B., Rashbrooke, M.C., Collings, D.A., Eng, R.C., Kawamura, E., Whittington, A.T., and Wasteneys, G.O.** (2012). The N-terminal TOG domain of Arabidopsis MOR1 modulates affinity for microtubule polymers. *Journal of cell science* **125**, 4812-4821.

- Lee, J.Y., and Stearns, T.** (2013). FOP is a centriolar satellite protein involved in ciliogenesis. *PLoS one* **8**, e58589.
- Lee, J.Y., Lee, H.S., Wi, S.J., Park, K.Y., Schmit, A.C., and Pai, H.S.** (2009). Dual functions of *Nicotiana benthamiana* Rae1 in interphase and mitosis. *Plant J* **59**, 278-291.
- Lee, Y.K., Kim, G.T., Kim, I.J., Park, J., Kwak, S.S., Choi, G., and Chung, W.I.** (2006). *LONGIFOLIA1* and *LONGIFOLIA2*, two homologous genes, regulate longitudinal cell elongation in *Arabidopsis*. *Development* **133**, 4305-4314.
- Lee, Y.R., and Liu, B.** (2000). Identification of a phragmoplast-associated kinesin-related protein in higher plants. *Curr Biol* **10**, 797-800.
- Lee, Y.R., and Liu, B.** (2004). Cytoskeletal motors in *Arabidopsis*. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiol* **136**, 3877-3883.
- Lelievre, H., Chevrier, V., Tassin, A.M., and Birnbaum, D.** (2008). Myeloproliferative disorder FOP-FGFR1 fusion kinase recruits phosphoinositide-3 kinase and phospholipase Cgamma at the centrosome. *Mol Cancer* **7**, 30.
- Levesque, M.P., Vernoux, T., Busch, W., Cui, H., Wang, J.Y., Blilou, I., Hassan, H., Nakajima, K., Matsumoto, N., Lohmann, J.U., Scheres, B., and Benfey, P.N.** (2006). Whole-genome analysis of the SHORT-ROOT developmental pathway in *Arabidopsis*. *PLoS biology* **4**, e143.
- Li, J., Meyer, A.N., and Donoghue, D.J.** (1997). Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 502-507.
- Li, S., Lei, L., Somerville, C.R., and Gu, Y.** (2012). Cellulose synthase interactive protein 1 (CSI1) links microtubules and cellulose synthase complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 185-190.
- Lindeboom, J.J., Nakamura, M., Hibbel, A., Shundyak, K., Gutierrez, R., Ketelaar, T., Emons, A.M., Mulder, B.M., Kirik, V., and Ehrhardt, D.W.** (2013). A mechanism for reorientation of cortical microtubule arrays driven by microtubule severing. *Science* **342**, 1245533.
- Liu, B., Marc, J., Joshi, H.C., and Palevitz, B.A.** (1993). A gamma-tubulin-related protein associated with the microtubule arrays of higher plants in a cell cycle-dependent manner. *J. Cell Sci.* **104**, 1217-1228.
- Liu, B., Joshi, H.C., Wilson, T.J., Silflow, C.D., Palevitz, B.A., and Snustad, D.P.** (1994). gamma-Tubulin in *Arabidopsis*: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* **6**, 303-314.
- Ljung, K., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G.** (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J* **28**, 465-474.
- Ljung, K., Hull, A.K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., and Sandberg, G.** (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *The Plant cell* **17**, 1090-1104.
- Lloyd, C.** (1991). Cytoskeletal elements of the phragmosome establish the division plane in vacuolated higher plant cells. In *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*, C. Lloyd, ed (London: Academic Press), pp. 245-257.
- Lloyd, C.** (2006). Plant science. Microtubules make tracks for cellulose. *Science* **312**, 1482-1483.
- 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.

- Lopes, C.A., Prosser, S.L., Romio, L., Hirst, R.A., O'Callaghan, C., Woolf, A.S., and Fry, A.M.** (2011). Centriolar satellites are assembly points for proteins implicated in human ciliopathies, including oral-facial-digital syndrome 1. *Journal of cell science* **124**, 600-612.
- Lorca, T., Castro, A., Martinez, A.M., Vigneron, S., Morin, N., Sigrist, S., Lehner, C., Doree, M., and Labbe, J.C.** (1998). Fizzy is required for activation of the APC/cyclosome in *Xenopus* egg extracts. *The EMBO journal* **17**, 3565-3575.
- Louie, R.K., Bahmanyar, S., Siemers, K.A., Votin, V., Chang, P., Stearns, T., Nelson, W.J., and Barth, A.I.** (2004). Adenomatous polyposis coli and EB1 localize in close proximity of the mother centriole and EB1 is a functional component of centrosomes. *Journal of cell science* **117**, 1117-1128.
- Luders, J., and Stearns, T.** (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 161-167.
- Luders, J., Patel, U.K., and Stearns, T.** (2006). GCP-WD is a gamma-tubulin targeting factor required for centrosomal and chromatin-mediated microtubule nucleation. *Nature cell biology* **8**, 137-147.
- Malcos, J.L., and Cyr, R.J.** (2011). An ungrouped plant kinesin accumulates at the preprophase band in a cell cycle-dependent manner. *Cytoskeleton* **68**, 247-258.
- Mandelkow, E.M., Mandelkow, E., and Milligan, R.A.** (1991). Microtubule dynamics and microtubule caps: a time-resolved cryo-electron microscopy study. *J Cell Biol* **114**, 977-991.
- Mao, T., Jin, L., Li, H., Liu, B., and Yuan, M.** (2005). Two microtubule-associated proteins of the Arabidopsis MAP65 family function differently on microtubules. *Plant Physiol* **138**, 654-662.
- Marcus, A.I., Dixit, R., and Cyr, R.J.** (2005). Narrowing of the preprophase microtubule band is not required for cell division plane determination in cultured plant cells. *Protoplasma* **226**, 169-174.
- Masuda, H., Mori, R., Yukawa, M., and Toda, T.** (2013). Fission yeast MOZART1/Mzt1 is an essential gamma-tubulin complex component required for complex recruitment to the microtubule organizing center, but not its assembly. *Molecular biology of the cell* **24**, 2894-2906.
- Matsuzaki, Y., Ogawa-Ohnishi, M., Mori, A., and Matsubayashi, Y.** (2010). Secreted peptide signals required for maintenance of root stem cell niche in Arabidopsis. *Science* **329**, 1065-1067.
- Mayer, Y., Torres Ruiz, R.A., Berleth, T., Misera, S., and Jurgens, G.** (1991). Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. *Nature* **353**, 402-407.
- McClinton, R.S., and Sung, Z.R.** (1997). Organization of cortical microtubules at the plasma membrane in Arabidopsis. *Planta* **201**, 252-260.
- McClinton, R.S., Chandler, J.S., and Callis, J.** (2001). Isolation, characterization, and intracellular localization of a katanin-like p60 subunit from Arabidopsis thaliana. *Protoplasma*, in press.
- Mei, Y., Gao, H.B., Yuan, M., and Xue, H.W.** (2012). The Arabidopsis ARCP protein, CSI1, which is required for microtubule stability, is necessary for root and anther development. *The Plant cell* **24**, 1066-1080.
- Melki, R., Carrier, M.F., Pantaloni, D., and Timasheff, S.N.** (1989). Cold depolymerization of microtubules to double rings: geometric stabilization of assemblies. *Biochemistry* **28**, 9143-9152.



- Menges, M., and Murray, J.A.** (2002). Synchronous Arabidopsis suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J* **30**, 203-212.
- Menges, M., Hennig, L., Gruissem, W., and Murray, J.A.** (2003). Genome-wide gene expression in an Arabidopsis cell suspension. *Plant Mol Biol* **53**, 423-442.
- Menges, M., de Jager, S.M., Gruissem, W., and Murray, J.A.** (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.
- Metzinger, C.A., and Bergmann, D.C.** (2010). Plant asymmetric cell division regulators: pinch-hitting for PARs? *F1000 biology reports* **2**.
- Mews, M., Sek, F.J., Moore, R., Volkmann, D., Gunning, B.E.S., and John, P.C.L.** (1997). Mitotic cyclin distribution during maize cell division: implications for the sequence diversity and function of cyclins in plants. *Protoplasma* **200**, 128-145.
- Meyerowitz, E.M.** (2002). Plants compared to animals: the broadest comparative study of development. *Science* **295**, 1482-1485.
- Michaud, E.J., and Yoder, B.K.** (2006). The primary cilium in cell signaling and cancer. *Cancer research* **66**, 6463-6467.
- Miki, H., Okada, Y., and Hirokawa, N.** (2005). Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends in cell biology* **15**, 467-476.
- Mikolajka, A., Yan, X., Popowicz, G.M., Smialowski, P., Nigg, E.A., and Holak, T.A.** (2006). Structure of the N-terminal domain of the FOP (FGFR1OP) protein and implications for its dimerization and centrosomal localization. *J. Mol. Biol.* **359**, 863-875.
- Minc, N., and Piel, M.** (2012). Predicting division plane position and orientation. *Trends in cell biology* **22**, 193-200.
- Minc, N., Burgess, D., and Chang, F.** (2011). Influence of cell geometry on division-plane positioning. *Cell* **144**, 414-426.
- Mineyuki, Y.** (1999). The preprophase band of microtubules : its function as a cytokinetic apparatus in higher plants. *Int. Rev. Cytol.* **187**, 1-49.
- Mineyuki, Y., and Gunning, B.E.S.** (1990). A role for preprophase bands of microtubules in maturation of new cell walls, and a general proposal on the function of preprophase band sites in cell division in higher plants. *Journal of Cell Science* **97**, 527-537.
- Mineyuki, Y., and Palevitz, B.A.** (1990). Relationship between preprophase band organization, F-actin and the division site in *Allium*. *Journal of Cell Science* **97**, 283-295.
- Mineyuki, Y., Wick, S.M., and Gunning, B.E.S.** (1988). Preprophase Bands of Microtubules and the Cell-Cycle - Kinetics and Experimental Uncoupling of Their Formation from the Nuclear-Cycle in Onion Root-Tip Cells. *Planta* **174**, 518-526.
- Mineyuki, Y., Yamashita, M., and Nagahama, Y.** (1991a). P34cdc2 Kinase Homolog in the Preprophase Band. *Protoplasma* **162**, 182-186.
- Mineyuki, Y., Marc, J., and Palevitz, B.A.** (1991b). Relationship between the preprophase band, nucleus and spindle in dividing *Allium* cotyledon cells. *Journal of Plant Physiology* **138**, 640-649.
- Mironov, V.V., De Veylder, L., Van Montagu, M., and Inze, D.** (1999). Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *The Plant cell* **11**, 509-522.
- Mitchison, T., and Kirschner, M.** (1984). Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* **312**, 237-242.

- Mitchison, T.J.** (1995). Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **349**, 299-304.
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., and Kakimoto, T.** (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant J* **37**, 128-138.
- Morita, M.T.** (2010). Directional gravity sensing in gravitropism. *Annu Rev Plant Biol* **61**, 705-720.
- Moritz, M., Zheng, Y., Alberts, B.M., and Oegema, K.** (1998). Recruitment of the gamma-tubulin ring complex to *Drosophila* salt-stripped centrosome scaffolds. *J Cell Biol* **142**, 775-786.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B., and Agard, D.A.** (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* **378**, 638-640.
- Moubayidin, L., Perilli, S., Dello Ioio, R., Di Mambro, R., Costantino, P., and Sabatini, S.** (2010). The rate of cell differentiation controls the *Arabidopsis* root meristem growth phase. *Current biology : CB* **20**, 1138-1143.
- Mravec, J., Kubes, M., Bielach, A., Gaykova, V., Petrasek, J., Skupa, P., Chand, S., Benkova, E., Zazimalova, E., and Friml, J.** (2008). Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development* **135**, 3345-3354.
- Muller, S., Han, S.C., and Smith, L.G.** (2006). Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology* **16**, 888-894.
- Muller, 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., and Wada, M.** (1991). Effects of centrifugation on preprophase band formation in *Adiantum protonemata*. *Planta* **183**, 391-398.
- Murata, T., and Hasebe, M.** (2007). Microtubule-dependent microtubule nucleation in plant cells. *J Plant Res* **120**, 73-78.
- 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.
- Murphy, S.M., Preble, A.M., Patel, U.K., O'Connell, K.L., Dias, D.P., Moritz, M., Agard, D., Stults, J.T., and Stearns, T.** (2001). GCP5 and GCP6: two new members of the human gamma-tubulin complex. *Molecular biology of the cell* **12**, 3340-3352.
- Nacry, P., Camilleri, C., Courtial, B., Caboche, M., and Bouchez, D.** (1998). Major chromosomal rearrangements induced by T-DNA transformation in *Arabidopsis*. *Genetics* **149**, 641-650.
- Nakajima, K., Sena, G., Nawy, T., and Benfey, P.N.** (2001). Intercellular movement of the putative transcription factor SHR in root patterning. *Nature* **413**, 307-311.
- Nakamura, M., and Hashimoto, T.** (2009). A mutation in the *Arabidopsis* gamma-tubulin-containing complex causes helical growth and abnormal microtubule branching. *J Cell Sci* **122**, 2208-2217.
- Nakamura, M., Zhou, X.Z., and Lu, K.P.** (2001). Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Current biology : CB* **11**, 1062-1067.
- Nakamura, M., Ehrhardt, D.W., and Hashimoto, T.** (2010). Microtubule and katanin-dependent dynamics of microtubule nucleation complexes in the acentrosomal *Arabidopsis* cortical array. *Nat Cell Biol* **12**, 1064-1070.

- Nakamura, M., Yagi, N., Kato, T., Fujita, S., Kawashima, N., Ehrhardt, D.W., and Hashimoto, T.** (2012). Arabidopsis GCP3-interacting protein 1/MOZART 1 is an integral component of the gamma-tubulin-containing microtubule nucleating complex. *Plant J* **71**, 216-225.
- Nebenfuhr, A., and Staehelin, L.A.** (2001). Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends in plant science* **6**, 160-167.
- Nebenfuhr, A., Frohlick, J.A., and Staehelin, L.A.** (2000). Redistribution of Golgi stacks and other organelles during mitosis and cytokinesis in plant cells. *Plant Physiology* **124**, 135-151.
- Neuwald, A.F., and Hirano, T.** (2000). HEAT repeats associated with condensins, cohesins, and other complexes involved in chromosome-related functions. *Genome research* **10**, 1445-1452.
- Nigg, E.A.** (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **17**, 471-480.
- Nogales, E.** (1999). A structural view of microtubule dynamics. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **56**, 133-142.
- Nogami, A., Suzaki, T., Shigenaka, Y., Nagahama, Y., and Mineyuki, Y.** (1996). Effects of cycloheximide on preprophase bands and prophase spindles in onion (*Allium cepa* L) root tip cells. *Protoplasma* **192**, 109-121.
- Nurse, P.** (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344**, 503-508.
- Nurse, P.** (1997). Regulation of the eukaryotic cell cycle. *European journal of cancer* **33**, 1002-1004.
- Oegema, K., Wiese, C., Martin, O.C., Milligan, R.A., Iwamatsu, A., Mitchison, T.J., and Zheng, Y.** (1999). Characterization of two related *Drosophila* gamma-tubulin complexes that differ in their ability to nucleate microtubules. *J Cell Biol* **144**, 721-733.
- Ortega-Martinez, O., Pernas, M., Carol, R.J., and Dolan, L.** (2007). Ethylene modulates stem cell division in the *Arabidopsis thaliana* root. *Science* **317**, 507-510.
- Ostin, A., Kowalczyk, M., Bhalerao, R.P., and Sandberg, G.** (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant physiology* **118**, 285-296.
- Palevitz, B.A.** (1987). Actin in the preprophase band of *Allium cepa*. *J Cell Biol* **104**, 1515-1519.
- Panteris, E., Apostolakis, P., and Galatis, B.** (2006). Cytoskeletal asymmetry in *Zea mays* subsidiary cell mother cells: A monopolar prophase microtubule half-spindle anchors the nucleus to its polar position. *Cell Motility and the Cytoskeleton* **63**, 696-709.
- Panteris, E., Apostolakis, P., Graf, R., and Galatis, B.** (2000). Gamma-tubulin colocalizes with microtubule arrays and tubulin paracrystals in dividing vegetative cells of higher plants. *Protoplasma* **210**, 179-187.
- Panteris, E., Adamakis, I.D., Voulgari, G., and Papadopoulou, G.** (2011). A role for katanin in plant cell division: microtubule organization in dividing root cells of *fra2* and *lue1* *Arabidopsis thaliana* mutants. *Cytoskeleton* **68**, 401-413.
- Paponov, I.A., Teale, W.D., Trebar, M., Blilou, I., and Palme, K.** (2005). The PIN auxin efflux facilitators: evolutionary and functional perspectives. *Trends in plant science* **10**, 170-177.

- Paredez, A.R., Somerville, C.R., and Ehrhardt, D.W.** (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* **312**, 1491-1495.
- Pastuglia, M., and Bouchez, D.** (2007). Molecular encounters at microtubule ends in the plant cell cortex. *Curr Opin Plant Biol* **10**, 557-563.
- Pastuglia, M., Azimzadeh, J., Goussot, M., Camilleri, C., Belcram, K., Evrard, J.-L., Schmidt A-C, Guerche P, and Bouchez, D.** (2006). Gamma-tubulin is essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1412-1425.
- Perilli, S., Di Mambro, R., and Sabatini, S.** (2012). Growth and development of the root apical meristem. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 17-23.
- Perry, J.A., and Kornbluth, S.** (2007). Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell division* **2**, 12.
- Pesin, J.A., and Orr-Weaver, T.L.** (2008). Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Annual review of cell and developmental biology* **24**, 475-499.
- Peters, J.M.** (2002). The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Molecular cell* **9**, 931-943.
- Peters, J.M.** (2006). The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature reviews. Molecular cell biology* **7**, 644-656.
- Petersson, S.V., Johansson, A.I., Kowalczyk, M., Makoveychuk, A., Wang, J.Y., Moritz, T., Grebe, M., Benfey, P.N., Sandberg, G., and Ljung, K.** (2009). An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *The Plant cell* **21**, 1659-1668.
- Petrasek, J., and Friml, J.** (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development* **136**, 2675-2688.
- Petrasek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J.J., Abas, M., Seifertova, D., Wisniewska, J., Tadele, Z., Kubes, M., Covanova, M., Dhonukshe, P., Skupa, P., Benkova, E., Perry, L., Krecek, P., Lee, O.R., Fink, G.R., Geisler, M., Murphy, A.S., Luschig, C., Zazimalova, E., and Friml, J.** (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* **312**, 914-918.
- Petricka, J.J., Winter, C.M., and Benfey, P.N.** (2012). Control of *Arabidopsis* root development. *Annu Rev Plant Biol* **63**, 563-590.
- 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.
- Pickett-Heaps, J.D.** (1969). Preprophase microtubules and stomatal differentiation; some effects of centrifugation on symmetrical and asymmetrical cell division. *Journal of ultrastructure research* **27**, 24-44.
- Pickett-Heaps, J.D., and Northcote, D.H.** (1966). Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. *J. Cell Sci.* **1**, 109-120.
- Pignocchi, C., Minns, G.E., Nesi, N., Koumproglou, R., Kitsios, G., Benning, C., Lloyd, C.W., Doonan, J.H., and Hills, M.J.** (2009). ENDOSPERM DEFECTIVE1 Is a Novel Microtubule-Associated Protein Essential for Seed Development in *Arabidopsis*. *The Plant cell* **21**, 90-105.
- Pines, J.** (1996). Cyclin from sea urchins to HeLas: making the human cell cycle. *Biochemical Society transactions* **24**, 15-33.
- Pines, J., and Hunter, T.** (1991). Cyclin-dependent kinases: a new cell cycle motif? *Trends in cell biology* **1**, 117-121.

- Popovici, C., Zhang, B., Gregoire, M.J., Jonveaux, P., Lafage-Pochitaloff, M., Birnbaum, D., and Pebusque, M.J.** (1999). The t(6;8)(q27;p11) translocation in a stem cell myeloproliferative disorder fuses a novel gene, FOP, to fibroblast growth factor receptor 1. *Blood* **93**, 1381-1389.
- Rasmussen, C.G., Humphries, J.A., and Smith, L.G.** (2011a). Determination of symmetric and asymmetric division planes in plant cells. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**, 387-409.
- Rasmussen, C.G., Sun, B., and Smith, L.G.** (2011b). Tangled localization at the cortical division site of plant cells occurs by several mechanisms. *Journal of cell science* **124**, 270-279.
- Reddy, A.S.** (2001). Molecular motors and their functions in plants. *Int Rev Cytol* **204**, 97-178.
- Reed, R.C., Brady, S.R., and Muday, G.K.** (1998). Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis. *Plant physiology* **118**, 1369-1378.
- Renaudin, J.P., Doonan, J.H., Freeman, D., Hashimoto, J., Hirt, H., Inze, D., Jacobs, T., Kouchi, H., Rouze, P., Sauter, M., Savoure, A., Sorrell, D.A., Sundaresan, V., and Murray, J.A.** (1996). Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant molecular biology* **32**, 1003-1018.
- Rogers, S., Wells, R., and Rechsteiner, M.** (1986). Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science* **234**, 364-368.
- Romio, L., Wright, V., Price, K., Winyard, P.J., Donnai, D., Porteous, M.E., Franco, B., Giorgio, G., Malcolm, S., Woolf, A.S., and Feather, S.A.** (2003). OFD1, the gene mutated in oral-facial-digital syndrome type 1, is expressed in the metanephros and in human embryonic renal mesenchymal cells. *J Am Soc Nephrol* **14**, 680-689.
- Roovers, K., and Assoian, R.K.** (2000). Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **22**, 818-826.
- Roppolo, D., De Rybel, B., Tendon, V.D., Pfister, A., Alassimone, J., Vermeer, J.E., Yamazaki, M., Stierhof, Y.D., Beekman, T., Geldner, N.** (2011). A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* **473**, 380-383
- Russo, A.A., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P.** (1996). Structural basis of cyclin-dependent kinase activation by phosphorylation. *Nature structural biology* **3**, 696-700.
- Sabatini, S., Heidstra, R., Wildwater, M., and Scheres, B.** (2003). SCARECROW is involved in positioning the stem cell niche in the Arabidopsis root meristem. *Genes Dev* **17**, 354-358.
- Sabatini, S., Beis, D., Wolkenfelt, H., Murfett, J., Guilfoyle, T., Malamy, J., Benfey, P., Leyser, O., Bechtold, N., Weisbeek, P., and Scheres, B.** (1999). An auxin-dependent distal organizer of pattern and polarity in the Arabidopsis root. *Cell* **99**, 463-472.
- Sakai, T., Honing, H., Nishioka, M., Uehara, Y., Takahashi, M., Fujisawa, N., Saji, K., Seki, M., Shinozaki, K., Jones, M.A., Smirnov, N., Okada, K., and Wasteneys, G.O.** (2008). Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in Arabidopsis. *Plant J* **53**, 157-171.
- Salisbury, J.L.** (1995). Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr Opin Cell Biol* **7**, 39-45.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual.* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Samuels, A.L., Giddings, T.H., Jr., and Staehelin, L.A.** (1995). Cytokinesis in tobacco BY-2 and root tip cells: a new model of cell plate formation in higher plants. *J Cell Biol* **130**, 1345-1357.
- Sanchez-Calderon, L., Lopez-Bucio, J., Chacon-Lopez, A., Cruz-Ramirez, A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky, J.G., and Herrera-Estrella, L.** (2005). Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant & cell physiology* **46**, 174-184.
- Sano, T., Higaki, T., Oda, Y., Hayashi, T., and Hasezawa, S.** (2005). Appearance of actin microfilament 'twin peaks' in mitosis and their function in cell plate formation, as visualized in tobacco BY-2 cells expressing GFP-fimbrin. *Plant Journal* **44**, 595-605.
- Santamaria, A., Wang, B., Elowe, S., Malik, R., Zhang, F., Bauer, M., Schmidt, A., Sillje, H.H., Korner, R., and Nigg, E.A.** (2011). The Plk1-dependent phosphoproteome of the early mitotic spindle. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **10**, M110 004457.
- Santner, A., and Estelle, M.** (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**, 1071-1078.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I., and Estelle, M.** (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature chemical biology* **5**, 301-307.
- Sarkar, A.K., Luijten, M., Miyashima, S., Lenhard, M., Hashimoto, T., Nakajima, K., Scheres, B., Heidstra, R., and Laux, T.** (2007). Conserved factors regulate signalling in *Arabidopsis thaliana* shoot and root stem cell organizers. *Nature* **446**, 811-814.
- Schatten, H.** (2008). The mammalian centrosome and its functional significance. *Histochemistry and cell biology* **129**, 667-686.
- Scheres, B., and Benfey, P.N.** (1999). Asymmetric cell division in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 505-537.
- Scheres, B., di Laurenzio, L., Willemsen, V., Hauser, M.T., Janmaat, K., Weisbeek, P., and Benfey, P.N.** (1995). Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development (Cambridge)* **121**, 53-62.
- Schlaitz, A.L., Srayko, M., Dammermann, A., Quintin, S., Wielsch, N., MacLeod, I., de Robillard, Q., Zinke, A., Yates, J.R., 3rd, Muller-Reichert, T., Shevchenko, A., Oegema, K., and Hyman, A.A.** (2007). The *C. elegans* RSA complex localizes protein phosphatase 2A to centrosomes and regulates mitotic spindle assembly. *Cell* **128**, 115-127.
- Schmit, A.** (2002). Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *Int Rev Cytol* **220**, 257-289.
- Sedbrook, J.C., and Kaloriti, D.** (2008). Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. *Trends in plant science* **13**, 303-310.
- Sedjai, F., Acquaviva, C., Chevrier, V., Chauvin, J.P., Coppin, E., Aouane, A., Coulier, F., Tolun, A., Pierres, M., Birnbaum, D., and Rosnet, O.** (2010). Control of ciliogenesis by FOR20, a novel centrosome and pericentriolar satellite protein. *J. Cell Sci.* **123**, 2391-2401.
- Segui-Simarro, J.M., and Staehelin, L.A.** (2006). Cell cycle-dependent changes in Golgi stacks, vacuoles, clathrin-coated vesicles and multivesicular bodies in meristematic cells of *Arabidopsis thaliana*: a quantitative and spatial analysis. *Planta* **223**, 223-236.
- 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.

- Seltzer, V., Pawlowski, T., Campagne, S., Canaday, J., Erhardt, M., Evrard, J.L., Herzog, E., and Schmit, A.C. (2003). Multiple microtubule nucleation sites in higher plants. *Cell Biol Int* **27**, 267-269.
- Shaw, R.K., Smollett, K., Cleary, J., Garmendia, J., Straatman-Iwanowska, A., Frankel, G., and Knutton, S. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. *Infection and immunity* **73**, 4385-4390.
- Shaw, S.L., Kamyar, R., and Ehrhardt, D.W. (2003). Sustained microtubule treadmilling in *Arabidopsis* cortical arrays. *Science* **300**, 1715-1718.
- Shen, M., Cai, Y., Yang, Y., Yan, X., Liu, X., and Zhou, T. (2013). Centrosomal protein FOR20 is essential for S-phase progression by recruiting Plk1 to centrosomes. *Cell research* **23**, 1284-1295.
- Siller, K.H., and Doe, C.Q. (2009). Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nature cell biology* **11**, 365-374.
- Sinnott, E.W., and Bloch, R. (1940). Cytoplasmic Behavior during Division of Vacuolate Plant Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **26**, 223-227.
- Slep, K.C. (2009). The role of TOG domains in microtubule plus end dynamics. *Biochem Soc Trans* **37**, 1002-1006.
- Smertenko, A., Saleh, N., Igarashi, H., Mori, H., Hauser-Hahn, I., Jiang, C.J., Sonobe, S., Lloyd, C.W., and Hussey, P.J. (2000). A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nat Cell Biol* **2**, 750-753.
- 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.
- Smith, L.G. (2003). Cytoskeletal control of plant cell shape: getting the fine points. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 63-73.
- Smith, L.G., Hake, S., and Sylvester, A.W. (1996). The tangled-1 mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development* **122**, 481-489.
- Smith, L.G., Gerttula, S.M., Han, S.C., and Levy, J. (2001). TANGLED1: A microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *Journal of Cell Biology* **152**, 231-236.
- Smolarkiewicz, M., and Dhonukshe, P. (2013). Formative cell divisions: principal determinants of plant morphogenesis. *Plant & cell physiology* **54**, 333-342.
- Sorrell, D.A., Marchbank, A., McMahon, K., Dickinson, J.R., Rogers, H.J., and Francis, D. (2002). A WEE1 homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **215**, 518-522.
- Sozzani, R., Cui, H., Moreno-Risueno, M.A., Busch, W., Van Norman, J.M., Vernoux, T., Brady, S.M., Dewitte, W., Murray, J.A., and Benfey, P.N. (2010). Spatiotemporal regulation of cell-cycle genes by SHORTROOT links patterning and growth. *Nature* **466**, 128-132.
- Spadafora, N.D., Doonan, J.H., Herbert, R.J., Bitonti, M.B., Wallace, E., Rogers, H.J., and Francis, D. (2011). *Arabidopsis* T-DNA insertional lines for CDC25 are hypersensitive to hydroxyurea but not to zeocin or salt stress. *Annals of botany* **107**, 1183-1192.
- Spinner, L., Pastuglia, M., Belcram, K., Pegoraro, M., Goussot, M., Bouchez, D., and Schaefer, D. (2010). The function of TONNEAU1 in moss reveals ancient mechanisms

- of division plane specification and cell elongation in land plants. *Development* **137**, 2733-2742.
- Spinner, L., Gadeyne, A., Belcram, K., Goussot, M., Moison, M., Duroc, Y., Eeckhout, D., De Winne, N., Schaefer, E., Van De Slijke, E., Persiau, G., Witters, E., Gevaert, K., De Jaeger, G., Bouchez, D., Van Damme, D., and Pastuglia, M.** (2013). A protein phosphatase 2A complex spatially controls plant cell division. *Nature communications* **4**, 1863.
- Staelin, L.A., and Hepler, P.K.** (1996). Cytokinesis in higher plants. *Cell* **84**, 821-824.
- Stals, H., and Inze, D.** (2001). When plant cells decide to divide. *Trends in plant science* **6**, 359-364.
- Stals, H., Bauwens, S., Traas, J., Van Montagu, M., Engler, G., and Inze, D.** (1997). Plant CDC2 is not only targeted to the pre-prophase band, but also co-localizes with the spindle, phragmoplast, and chromosomes. *FEBS Lett* **418**, 229-234.
- Stoppin, V., Vantard, M., Schmit, A.C., and Lambert, A.M.** (1994). Isolated plant nuclei nucleate microtubule assembly: The nuclear surface in higher plants has centrosome-like activity. *Plant Cell* **6**, 1099-1106.
- Stoppin-Mellet, V., Canaday, J., and Lambert, A.M.** (1999). Characterization of microsome-associated tobacco BY-2 centrioles. *Eur J Cell Biol* **78**, 842-848.
- Struk, S., and Dhonukshe, P.** (2013). MAPs: cellular navigators for microtubule array orientations in *Arabidopsis*. *Plant cell reports*.
- Sullivan, M., and Morgan, D.O.** (2007). Finishing mitosis, one step at a time. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 894-903.
- Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., Lowe, K.S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J., and Larkins, B.A.** (1999). Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 4180-4185.
- Teixido-Travesa, N., Roig, J., and Luders, J.** (2012). The where, when and how of microtubule nucleation - one ring to rule them all. *Journal of cell science* **125**, 4445-4456.
- Teixido-Travesa, N., Villen, J., Lacasa, C., Bertran, M.T., Archinti, M., Gygi, S.P., Caelles, C., Roig, J., and Luders, J.** (2010). The gammaTuRC revisited: a comparative analysis of interphase and mitotic human gammaTuRC redefines the set of core components and identifies the novel subunit GCP8. *Molecular biology of the cell* **21**, 3963-3972.
- Tian, G.W., Smith, D., Gluck, S., and Baskin, T.I.** (2004). Higher plant cortical microtubule array analyzed in vitro in the presence of the cell wall. *Cell motility and the cytoskeleton* **57**, 26-36.
- Tirnauer, J.S., and Bierer, B.E.** (2000). EB1 proteins regulate microtubule dynamics, cell polarity, and chromosome stability. *J Cell Biol* **149**, 761-766.
- Torres-Ruiz, R.A., and Jürgens, G.** (1994). Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* **120**, 2967-2978.
- Toyoshima, F., Moriguchi, T., Wada, A., Fukuda, M., and Nishida, E.** (1998). Nuclear export of cyclin B1 and its possible role in the DNA damage-induced G2 checkpoint. *The EMBO journal* **17**, 2728-2735.
- Traas, J., Bellini, C., Nacry, P., Kronenberger, J., Bouchez, D., and Caboche, M.** (1995a). Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* **375**, 676-677.



- Traas, J., Nacry, P., Gendreau, E., Bellini, C., Kronenberger, J., Bouchez, D., Hofte, H., and Caboche, M. (1995b). The Cytoskeleton in Cell Elongation and Division - a Mutational Approach. *Journal of Cellular Biochemistry*, 437-437.
- Twell, D., Park, S.K., Hawkins, T.J., Schubert, D., Schmidt, R., Smertenko, A., and Hussey, P.J. (2002). MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nat. Cell Biol.* **4**, 711-714.
- Ubeda-Tomas, S., Federici, F., Casimiro, I., Beemster, G.T., Bhalerao, R., Swarup, R., Doerner, P., Haseloff, J., and Bennett, M.J. (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls Arabidopsis root meristem size. *Current biology : CB* **19**, 1194-1199.
- Umeda, M., Shimotohno, A., and Yamaguchi, M. (2005). Control of cell division and transcription by cyclin-dependent kinase-activating kinases in plants. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1437-1442.
- Umeda, M., Bhalerao, R.P., Schell, J., Uchimiya, H., and Koncz, C. (1998). A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 5021-5026.
- 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., Van Poucke, K., Boutant, E., Ritzenthaler, C., Inze, D., and Geelen, D. (2004). In vivo dynamics and differential microtubule-binding activities of MAP65 proteins. *Plant Physiol.* **136**, 3956-3967.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1995). Cell fate in the Arabidopsis root meristem determined by directional signalling. *Nature* **378**, 62-65.
- van den Berg, C., Willemsen, V., Hendriks, G., Weisbeek, P., and Scheres, B. (1997). Short-range control of cell differentiation in the Arabidopsis root meristem. *Nature* **390**, 287-289.
- Van Leene, J., Stals, H., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Van Isterdael, G., De Clercq, A., Bonnet, E., Laukens, K., Remmerie, N., Henderickx, K., De Vijlder, T., Abdelkrim, A., Pharazyn, A., Van Onckelen, H., Inze, D., Witters, E., and De Jaeger, G. (2007). A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in Arabidopsis thaliana. *Mol. Cell Proteomics* **6**, 1226-1238.
- Van Leene, J., Hollunder, J., Eeckhout, D., Persiau, G., Van De Slijke, E., Stals, H., Van Isterdael, G., Verkest, A., Neiryneck, S., Buffel, Y., De Bodt, S., Maere, S., Laukens, K., Pharazyn, A., Ferreira, P.C., Eloy, N., Renne, C., Meyer, C., Faure, J.D., Steinbrenner, J., Beynon, J., Larkin, J.C., Van de Peer, Y., Hilson, P., Kuiper, M., De Veylder, L., Van Onckelen, H., Inze, D., Witters, E., and De Jaeger, G. (2010). Targeted interactomics reveals a complex core cell cycle machinery in Arabidopsis thaliana. *Mol. Syst. Biol.* **6**, 397.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouze, P., Rombauts, S., and Inze, D. (2002). Genome-wide analysis of core cell cycle genes in Arabidopsis. *The Plant cell* **14**, 903-916.
- Vanneste, S., and Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **136**, 1005-1016.
- Vanstraelen, M., Torres Acosta, J.A., De Veylder, L., Inze, D., and Geelen, D. (2004). A plant-specific subclass of C-terminal kinesins contains a conserved a-type cyclin-dependent kinase site implicated in folding and dimerization. *Plant Physiol* **135**, 1417-1429.

- Vanstraelen, M., Van Damme, D., De Rycke, R., Mylle, E., Inze, D., and Geelen, D.** (2006). Cell cycle-dependent targeting of a kinesin at the plasma membrane demarcates the division site in plant cells. *Current Biology* **16**, 308-314.
- Vaughan, K.T.** (2004). Surfing, regulating and capturing: are all microtubule-tip-tracking proteins created equal? *Trends in cell biology* **14**, 491-496.
- Venverloo, C.J., and Libbenga, K.R.** (1987). Regulation of the plane of cell division in vacuolated cells. I. The function of nuclear positioning and phragmosome formation. *J Plant Physiol* **131**, 267-284.
- Verbelen, J.P., De Cnodder, T., Le, J., Vissenberg, K., and Baluska, F.** (2006). The Root Apex of *Arabidopsis thaliana* Consists of Four Distinct Zones of Growth Activities: Meristematic Zone, Transition Zone, Fast Elongation Zone and Growth Terminating Zone. *Plant Signal Behav* **1**, 296-304.
- Verma, D.P.** (2001). Cytokinesis and Building of the Cell Plate in Plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* **52**, 751-784.
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P.B., and Friml, J.** (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in plant science* **12**, 160-168.
- Vos, J.W., Dogterom, M., and Emons, A.M.** (2004). Microtubules become more dynamic but not shorter during preprophase band formation: a possible "search-and-capture" mechanism for microtubule translocation. *Cell Motil Cytoskeleton* **57**, 246-258.
- Walker, K.L., Muller, S., Moss, D., Ehrhardt, D.W., and Smith, L.G.** (2007). *Arabidopsis* TANGLED Identifies the Division Plane throughout Mitosis and Cytokinesis. *Curr Biol* **17**, 1827-1836.
- Wang, F., Shi, D.Q., Liu, J., and Yang, W.C.** (2008). Novel nuclear protein ALC-INTERACTING PROTEIN1 is expressed in vascular and mesocarp cells in *Arabidopsis*. *Journal of integrative plant biology* **50**, 918-927.
- Wang, G., Kong, H., Sun, Y., Zhang, X., Zhang, W., Altman, N., DePamphilis, C.W., and Ma, H.** (2004). Genome-wide analysis of the cyclin family in *Arabidopsis* and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant physiology* **135**, 1084-1099.
- Wang, H., Fowke, L.C., and Crosby, W.L.** (1997). A plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* **386**, 451-452.
- Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A.J., Crosby, W.L., and Fowke, L.C.** (1998). ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant J* **15**, 501-510.
- Weingartner, M., Binarova, P., Drykova, D., Schweighofer, A., David, J.P., Heberle-Bors, E., Doonan, J., and Bogre, L.** (2001). Dynamic recruitment of Cdc2 to specific microtubule structures during mitosis. *Plant Cell* **13**, 1929-1943.
- Weingartner, M., Criqui, M.C., Meszaros, T., Binarova, P., Schmit, A.C., Helfer, A., Derevier, A., Erhardt, M., Bogre, L., and Genschik, P.** (2004). Expression of a nondegradable cyclin B1 affects plant development and leads to endomitosis by inhibiting the formation of a phragmoplast. *Plant Cell* **16**, 643-657.
- Whittington, A.T., Vugrek, O., Wei, K.J., Hasenbein, N.G., Sugimoto, K., Rashbrooke, M.C., and Wasteneys, G.O.** (2001). MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* **411**, 610-613.
- Wick, S.M.** (1991). Spatial aspects of cytokinesis in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology* **3**, 253-260.

- Wick, S.M., and Duniec, J.** (1983a). Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. I. Preprophase band development and concomitant appearance of nuclear envelope-associated tubulin. *J Cell Biol* **97**, 235-243.
- Wick, S.M., and Duniec, J.** (1983b). Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells.  
II. Transition between the pre-prophase band and the mitotic. *Protolasma* **122**, 45-55.
- Wiese, C., and Zheng, Y.** (2000). A new function for the gamma-tubulin ring complex as a microtubule minus-end cap. *Nature cell biology* **2**, 358-364.
- Winter, D., Vinegar, B., Nahal, H., Ammar, R., Wilson, G.V., and Provart, N.J.** (2007). An "Electronic Fluorescent Pictograph" browser for exploring and analyzing large-scale biological data sets. *PloS one* **2**, e718.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertova, D., Brewer, P.B., Ruzicka, K., Blilou, I., Rouquie, D., Benkova, E., Scheres, B., and Friml, J.** (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**, 883.
- Wolters, H., and Jurgens, G.** (2009). Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature reviews. Genetics* **10**, 305-317.
- Woodward, A.W., and Bartel, B.** (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany* **95**, 707-735.
- Wright, A.J., Gallagher, K., and Smith, L.G.** (2009). *discordia1* and *alternative discordia1* function redundantly at the cortical division site to promote preprophase band formation and orient division planes in maize. *Plant Cell* **21**, 234-247.
- Xie, Y., Rubenstein, E.M., Matt, T., and Hochstrasser, M.** (2010). SUMO-independent in vivo activity of a SUMO-targeted ubiquitin ligase toward a short-lived transcription factor. *Genes Dev* **24**, 893-903.
- Xing, Y., Igarashi, H., Wang, X., and Sakaguchi, N.** (2005). Protein phosphatase subunit G5PR is needed for inhibition of B cell receptor-induced apoptosis. *The Journal of experimental medicine* **202**, 707-719.
- Xu, X.F.M., Zhao, Q., Rodrigo-Peirís, T., Brkljacic, J., He, C.S., Muller, S., and Meier, I.** (2008). RanGAP1 is a continuous marker of the Arabidopsis cell division plane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 18637-18642.
- Yamaguchi, M., Umeda, M., and Uchimiya, H.** (1998). A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Plant J* **16**, 613-619.
- Yan, X., Habedanck, R., and Nigg, E.A.** (2006). A complex of two centrosomal proteins, CAP350 and FOP, cooperates with EB1 in microtubule anchoring. *Mol. Biol. Cell* **17**, 634-644.
- Yasuhara, H., Muraoka, M., Shogaki, H., Mori, H., and Sonobe, S.** (2002). TMBP200, a microtubule bundling polypeptide isolated from telophase tobacco BY-2 cells is a MOR1 homologue. *Plant Cell Physiol* **43**, 595-603.
- 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 and Cell Physiology* **46**, 531-538.
- Zazimalova, E., Krecek, P., Skupa, P., Hoyerova, K., and Petrasek, J.** (2007). Polar transport of the plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **64**, 1621-1637.

- Zeng, C.J., Lee, Y.R., 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, K., Letham, D.S., and John, P.C.** (1996). Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* **200**, 2-12.
- Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., and Mitchison, T.** (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* **378**, 578-583.
- Zhou, Y., Fowke, L.C., and Wang, H.** (2002). Plant CDK inhibitors: studies of interactions with cell cycle regulators in the yeast two-hybrid system and functional comparisons in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant Cell Reports* **20**, 967-975.
- Zhu, C., and Dixit, R.** (2012). Functions of the *Arabidopsis* kinesin superfamily of microtubule-based motor proteins. *Protoplasma* **249**, 887-899.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Grissem, W.** (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* **136**, 2621-2632.