



UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Caractérisation d'une nouvelle famille de protéines impliquées dans l'assemblage du fuseau mitotique des plantes supérieures

Thèse présentée pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Strasbourg

par

Laurent PIEUCHOT

Discipline : Sciences du Vivant
Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Membres du Jury

Rapporteur externe	Dr. Denis CHRETIEN, Université de Rennes
Rapporteur externe	Dr. David BOUCHEZ, INRA - Versailles
Rapporteur interne	Dr. Christophe RITZENTHALER, IBMP - Strasbourg
Examineur	Dr. Béatrice SATIAT-JEUNEMAÎTRE, ISV - Gif sur Yvette
Co-Directeur de thèse	Dr. Kokou Dodzi (Honorât) DORKENOO, IPCMS - Strasbourg
Directeur de thèse	Pr. Anne-Catherine SCHMIT, IBMP - Strasbourg

Soutenue publiquement le 23 Octobre 2009



Institut de Biologie Moléculaire des Plantes

CNRS UPR 2357



Remerciements

Comme le veut la tradition, je commence cette thèse par le difficile exercice des remerciements. Je remercie par avance ceux dont le nom n'apparaît pas et qui m'ont aidé d'une manière ou d'une autre, ils se reconnaîtront.

Tout d'abord, je voudrais remercier les membres du jury d'avoir bien voulu lire et juger ce travail : Dr. Béatrice Satiat-Jeunemaître, Dr. Denis Chrétien, Dr. David Bouchez et Dr. Christophe Ritzenthaler. J'espère que la lecture de ce manuscrit vous sera agréable.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à Anne-Catherine qui m'a fait confiance et a su me laisser une grande liberté, tout en gardant un œil critique et avisé sur mes travaux. Mille mercis pour ta disponibilité et ta patience, ainsi que pour les corrections estivales qui je l'espère n'ont pas trop empiété sur tes vacances. Un grand merci à Jean-Luc, alias John Boring, avec qui j'ai eu le plaisir de travailler durant ces trois années de thèse. Merci d'avoir partagé ton expérience avec générosité et humour, tes blagues et contrepèteries en tout genre me manqueront. J'en profite pour faire un peu de publicité pour ton inquiétant roman « Un monde sous influence » ainsi que pour le site qui y est consacré : <http://john.boring.free.fr>. Merci à Etienne pour sa gentillesse, ses conseils et ses commentaires précieux. J'espère que l'aventure « GIP » se conclura avec toute « l'excellence » qu'elle mérite. Je souhaite plein de réussite à Kinda qui a la chance d'effectuer sa thèse dans une merveilleuse équipe. Au-delà de l'encadrement dont j'avais besoin, ces personnes ont été pour moi de véritables amis qui ont fait preuve d'une grande humanité et ont toujours été disponibles et à l'écoute.

Un grand merci à...

...Honorât et toute l'équipe de physiciens qui m'ont accueilli chaleureusement et permis de découvrir un univers passionnant.

...Jan qui m'a reçu avec hospitalité à Wageningen et a largement contribué à la progression des recherches.

...Marie-Edith & Guy, ainsi qu'à toutes celles et ceux qui ont transité par le labo 512. Ce fût un plaisir d'avoir de si sympathiques voisins.

...Jérôme & Matthieu, maîtres incontestés de la microscopie, pour leurs précieux conseils, leur disponibilité et leur humour.

...Gag qui représente à mes yeux un modèle d'honnêteté et de rigueur scientifique. Merci de m'avoir permis de contribuer modestement à tes recherches.

...Richard et l'équipe des jardiniers qui, avec efficacité et bonne humeur, ont pris soin de mes plantes.

Merci à Sarah qui a su m'épauler à distance dans les moments de doute. Plus que quelques semaines à tenir...

Merci à mon frère, grâce à qui j'ai pu terminer l'écriture de cette thèse au son des cigales. Enfin, je voudrais exprimer toute ma reconnaissance et mon affection à mes parents, qui m'ont supporté et soutenu tout au long de mon parcours, et qui m'ont permis de suivre les études que je voulais.

Table des matières

Introduction	7
La cellule et son cytosquelette	7
Le cytosquelette procaryotique	7
La cellule eucaryote	7
Les filaments d'actine	8
Les filaments intermédiaires	9
Les microtubules	12
Caractéristiques génomique et structurale des tubulines	12
Structure et polarité des microtubules	12
Complexes protéiques de nucléation	15
Centres organisateurs animaux	17
Centres organisateurs des plantes	19
Facteurs régulant la dynamique	22
Le cycle de division cellulaire	27
Le fuseau mitotique animal	28
Anatomie et étapes d'assemblage	28
Gradient de phosphorylation	34
Voies de signalisation impliquant Ran-GTP	34
Rôle de TPX2	39
Le fuseau mitotique des plantes à fleur	44
Assemblage et structure	44
Facteurs régulant la dynamique	47
Mécanismes d'assemblage	50
Objectifs de thèse	52
Résultats	53
Caractérisation d'AtTPX2	53
Article 1 : The Plant TPX2 Protein Regulates Prospindle Assembly before Nuclear Envelope Breakdown	53
Résultats complémentaires	79
Autres TPX2 like d'Arabidopsis thaliana	85
Article 2 : Plant TPX2 and related proteins	85
Identification de protéines similaires à AtTPX2	90
Discussion	101
Conclusion générale	107
Matériel et Méthodes	108
Matériel	109
Micro-organismes	109
Plantes et cultures cellulaires végétales	110
Vecteurs	111
Oligonucléotides	114
Méthodes	115
Manipulation d'acides nucléiques	115
Production et analyse de protéines	119
Techniques de marquage	121
Transformation de matériel végétal	122
Observations microscopiques	123
Logiciels	124
Microscopie confocale biphotonique	125
Article 3 : Multiphotonic microscopy as a processing tool for optical data storage and imaging in biophysics	129
Appendice	133
Bibliographie	135

La cellule et son cytosquelette

La cellule peut être considérée comme l'unité structurale de la vie. Son fonctionnement nécessite la mise en place de mécanismes de transports organisés. Le cytosquelette y joue un rôle clé.

Le cytosquelette procaryotique

La découverte de protéines polymérisées dynamiques dans la cellule bactérienne a permis de mettre en évidence l'origine ancestrale des constituants du cytosquelette eucaryotique (Carballido-Lopez et Errington 2003). En effet, des protéines homologues à la tubuline (FtsZ, BtubA, BtubB), à l'actine (MreB, ParM, AlfA, MamK) et aux filaments intermédiaires (CreS) ont été identifiées (Gitai 2007) et participent à de nombreux processus physiologiques. FtsZ et MreB forment des filaments hautement dynamiques et interagissent avec des protéines impliquées dans la ségrégation chromosomique et plasmidiale et le maintien de la morphologie cellulaire. FtsZ forme un anneau au milieu de la cellule et recrute des protéines impliquées dans la formation du divisome (Vishniakov et Borkhsenius 2007). ParM, AlfA et MamK jouent un rôle dans la polarité de la cellule, la ségrégation des plasmides ainsi que dans la formation de structures spécialisées (magnétosomes) ressemblant aux organelles eucaryotes (Graumann 2007).

La cellule eucaryote

Les cellules eucaryotes possèdent, par opposition aux cellules procaryotes, un noyau délimité par une double membrane qui contient les chromosomes et les machineries de transcription et de réplication associées (Figure 1).

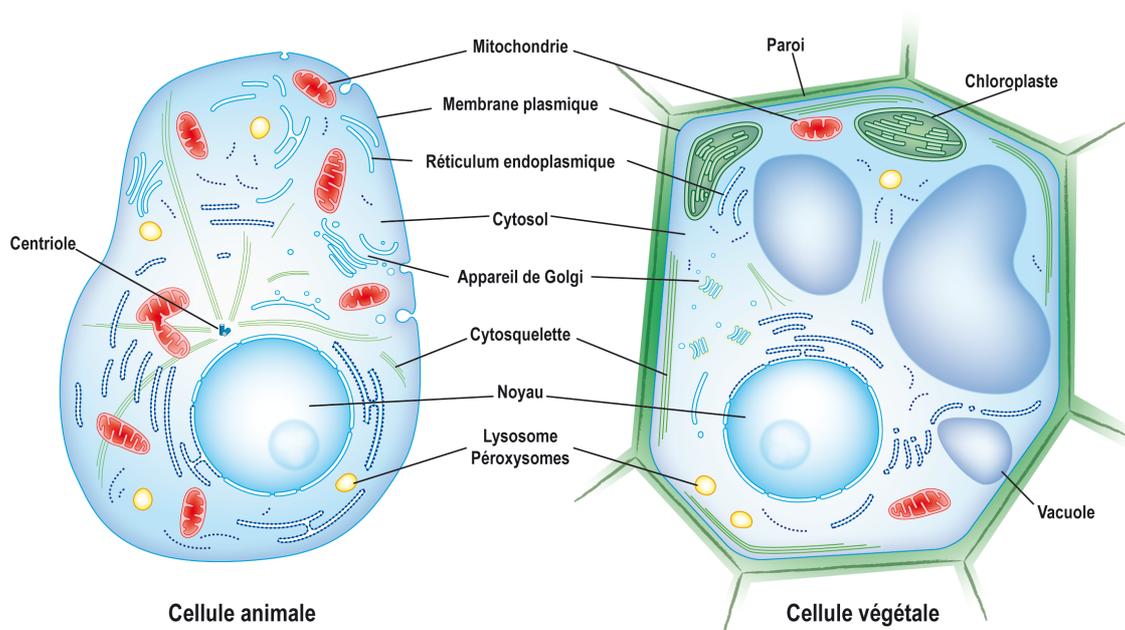


Figure 1 : Organisation générale des cellules eucaryotes. Inspiré de (Alberts 1994).

Elles contiennent également des organites cellulaires spécialisés parmi lesquels on peut distinguer les mitochondries, le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, les lysosomes et les péroxysomes. Les cellules végétales ont la particularité de posséder des chloroplastes,

siège de la photosynthèse, des vacuoles, contrôlant l'équilibre homéostatique de la cellule, et une paroi pectocellulosique qui entoure et protège la cellule. L'ensemble des organites cellulaires est contenu dans une phase aqueuse appelée le cytosol.

Le positionnement et le maintien de la structure de ces organites sont assurés par un squelette interne, le cytosquelette, qui est composé d'un réseau de protéines polymérisées comprenant les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Il est à l'origine des principales forces motrices de la cellule.

Les filaments d'actine

Les filaments d'actine, ou microfilaments (actine-F), sont composés de polymères d'actine, une protéine globulaire de 42 kDa (actine-G). Le génome de la plupart des métazoaires contient moins d'une dizaine de gènes codant pour l'actine (6 chez l'homme), et de nombreux champignons et protistes n'ont qu'un ou quelques exemplaires. Chez les plantes en revanche, on dénombre de quelques dizaines (10 chez *Arabidopsis*) à plus d'une centaine de gènes (*Pé-tunia*). L'actine est cependant une protéine bien conservée au sein des organismes eucaryotes (plus de 80 % d'identité entre les actines de plantes et la plupart des actines animales). Les nombreux variants d'actine observés chez les plantes sont fréquemment exprimés spécifiquement dans certains tissus ou stades développementaux (McDowell et al. 1996).

Les filaments de F-actine s'assemblent en une structure à double hélice d'un diamètre d'environ 7 nm (Figure 2). Ils ont une structure polaire, avec une extrémité (+) à échanges rapides (de l'ordre de 1000 monomères par seconde) et une extrémité (-) à échanges lents. La polymérisation spontanée ou nucléation *in vitro* est amorcée par l'association de trois monomères de G-actine/ATP (nucleus) et l'ajout d'ions Mg^{++} , K^+ ou Na^+ . Le processus est réversible, le filament se dépolymérise après hydrolyse de l'ATP d'une extrémité ou lorsqu'on abaisse la force ionique de la solution.

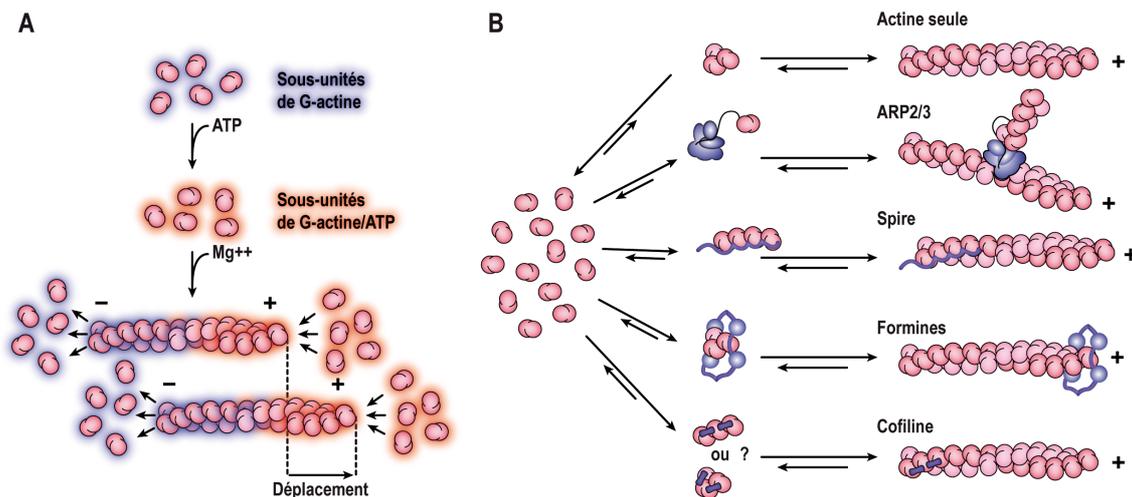


Figure 2 : Mécanismes de polymérisation de l'actine. A : Phénomène de tapis roulant mettant en jeu l'hydrolyse d'ATP. **B :** Protéines impliquées dans la nucléation des filaments d'actine.

Dans la cellule, l'assemblage est régulé par des protéines associées à l'actine selon des mécanismes variés (Figure 2B). En présence d'un catalyseur tel que le complexe ARP2/3 mimant un nucléus, les monomères associés à l'ATP ont tendance à polymériser et forment des filaments branchés (Goley et Welch 2006). La protéine spire, conservée chez les métazoaires, favorise une association longitudinale de quatre sous-unités d'actine par l'intermédiaire du do-

maine WH2 (Wiskott–Aldrich syndrome protein (WASP)-homology-2) et sert d’amorce à l’assemblage de filaments non branchés. Le maintien de spire à l’extrémité (-) empêcherait la dépolymérisation du filament. Les formines, conservées chez les eucaryotes stabilisent un dimère ou trimère de G-actine et facilitent la nucléation. Contrairement à spire et ARP2/3, les formines restent associées à l’extrémité (+) et leurs association/dissociation séquentielles leur permet de se maintenir à cette extrémité du filament en polymérisation. Enfin, la cofiline, souvent montrée comme facteur générateur d’extrémités (+) par coupure de F-actine, pourrait aussi participer à la nucléation du polymère dans les cellules migrantes (Pak et al. 2008). Ces différents mécanismes d’assemblage permettent une flexibilité de nucléation de filaments à géométrie ou fonctions variées. Une fois polymérisée, l’actine a tendance à hydrolyser son ATP et finit par se désolidariser du filament. On peut souvent distinguer les deux extrémités par leurs propriétés distinctes. L’extrémité (+) du filament, riche en ATP-actine, a tendance à polymériser alors que l’extrémité (-) qui est majoritairement constituée d’ADP-actine a tendance à dépolymériser. Le filament dans son ensemble est donc en perpétuel renouvellement. Il découle de ces propriétés un phénomène dit de « treadmilling » ou tapis roulant, qui va induire un déplacement du filament (Figure 2A).

Les filaments d’actine jouent un rôle dans de nombreuses fonctions biologiques dont notamment les contractions des cellules musculaires striées, la cytodierèse, l’expansion cellulaire, le trafic vésiculaire ou bien encore le déplacement des chloroplastes en fonction de la lumière (mouvements de cyclose) dans les cellules végétales. Des études récentes (Kunda et Baum 2009) suggèrent que le cytosquelette cortical d’actine jouerait également un rôle important dans le positionnement et l’assemblage du fuseau mitotique (Figure 3).

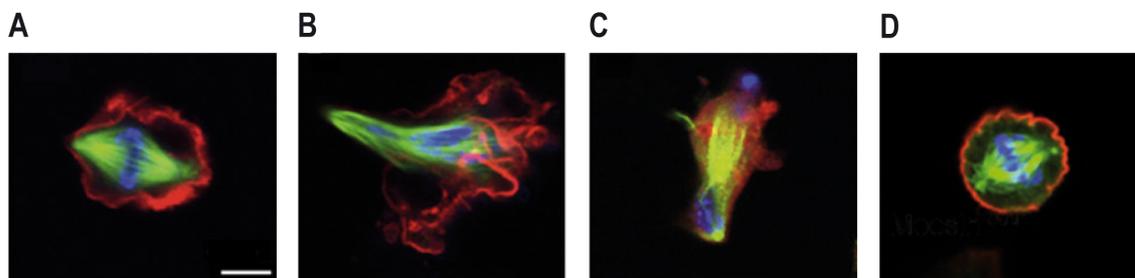


Figure 3 : Importance du cytosquelette d’actine dans l’assemblage du fuseau mitotique de cellules de drosophile. **A à D** : Cellules S2R+ de drosophile, cultivées en milieu liquide, préparées pour observer l’actine (rouge), les microtubules (vert) et l’ADN (bleu) **A** : Contrôle négatif de RNAi. **B** : RNAi dirigé contre la Moesine, une protéine impliquée dans l’ancrage de l’actine au cortex de la cellule. Les cellules sont incapables de maintenir leur fuseau mitotique en place. Le fuseau déforme le cortex cellulaire et les chromosomes ne sont plus alignés correctement. **C** : Le traitement des cellules avec 1µM de Latrunculine, une drogue qui empêche la polymérisation de l’actine, induit des effets similaires. **D** : Le phénotype n’est plus observé lorsque de la concanavale A, une lectine tétravalente, est ajoutée au milieu de culture. L’ajout de ce composé augmente la rigidité du cortex des cellules. Cette expérience montre que la restitution de la rigidité du cortex suffit pour retrouver un fuseau mitotique normal dans les cellules « silencées ». Barre d’échelle : 10µm. D’après (Kunda et al. 2008).

Les filaments intermédiaires

Ce sont des polymères d’environ 10 nm de diamètre, constitués de tétramères de protéines fibrillaires assemblées de façon hélicoïdale (Figure 4). Toutes les protéines de filaments intermédiaires (FI) présentent des structures similaires comprenant un domaine central conservé en hélice α et des domaines N et C-terminaux variables en taille et en séquence, contribuant à la diversité des FI. Au cours de l’étape d’assemblage, deux dimères s’associent de manière antiparallèle pour former une sous-unité tétramérique. Deux tétramères s’assemblent pour constituer un octamère puis quatre octamères s’associent pour former un protofilament.

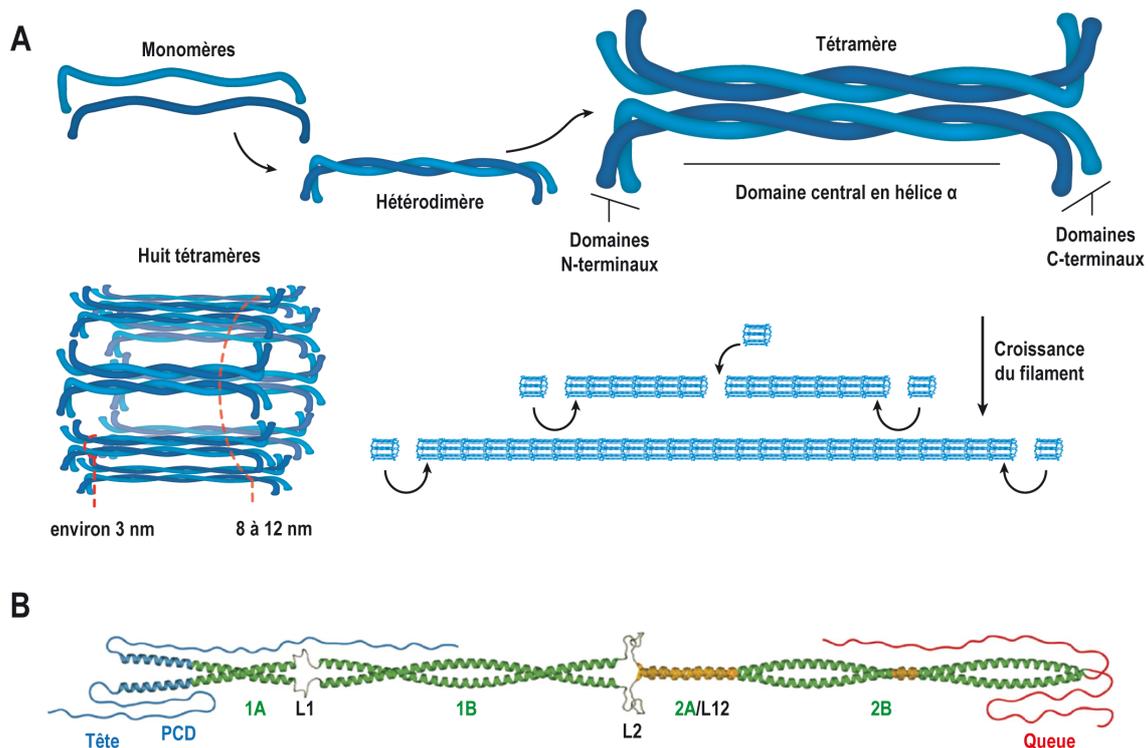


Figure 4 : Structure générale et assemblage d'un filament intermédiaire. A : L'assemblage de deux hétérodimères forme un tétramère. Huit tétramères s'assemblent pour former un protofilament qui va participer à la croissance du FI. Adapté de www.ulyse.u-bordeaux.fr **B :** Structure d'un homodimère de vimentine, une protéine de FI de type III. Les régions coiled-coil 1A, 1B, 2A et 2B sont interconnectées par les domaines de liaison L1, L2 et L12. Ce domaine central en hélice α est bordé par des domaines N- et C-terminaux respectivement nommés « tête » et « queue ». Le domaine pré-coil (PCD) est retrouvé dans les types III et IV des protéines de FI. Sa séquence d'acides aminés est compatible avec une structure de type hélice α , similaire à celle du domaine L2. Adapté de (Parry et al. 2007).

Cette structure de base va s'assembler bout à bout pour former un filament intermédiaire ou contribuer à l'élongation d'un filament existant.

A la différence des microfilaments et des microtubules, l'assemblage des protéines est spontané et ne fait pas intervenir d'échange de nucléotide. D'autre part, le filament formé ne présente pas de polarité. La structure du filament est cependant dynamique et est régulée par phosphorylation. Ces structures sont souvent associées à des moteurs protéiques permettant leur translocation dans l'espace cellulaire.

On peut en distinguer au moins 6 catégories suivant le type de protéines qui constitue le filament. Les types I et II sont constitués d'hétérodimères de kératines acides ou basiques. On retrouve ces filaments dans les cellules épithéliales, les ongles et les cheveux. Le type III comprend quatre sortes de protéines formant des homo ou hétéropolymères, incluant notamment la vimentine qui est le plus répandu des filaments intermédiaires (présent dans les fibroblastes, les leucocytes et les cellules endothéliales). Les neurofilaments (type IV) sont retrouvés en haute concentration dans les axones des neurones de vertébrés. Les lamines (type V) jouent un rôle essentiel dans la formation de l'enveloppe nucléaire et le fonctionnement du noyau. Les nestines (Type VI) sont présentes dans les cellules souches neuroépithéliales. Enfin, on retrouve dans le cristallin des FI spécifiques n'appartenant à aucun des groupes précédents, les filensine et phakinine.

Aucun homologue aux FI animaux n'a été trouvé dans les séquences génomiques de plantes disponibles. Cependant, des observations en microscopie électronique de la membrane

interne de noyaux de cellules BY-2 de tabac ont révélé la présence structures filamenteuses très similaires à celles observées chez les animaux (Figure 5).

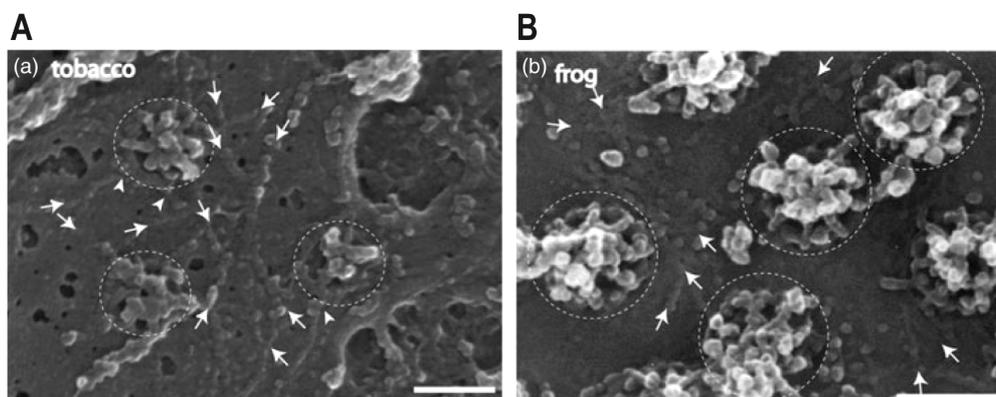


Figure 5 : Structure de la membrane interne du noyau. A : Membrane interne d'un noyau de cellule BY-2 de tabac. **B :** Membrane interne du noyau d'une cellule de xénope. Les pores nucléaires sont marqués par des cercles en pointillés. Les flèches indiquent les structures filamenteuses. Barre d'échelle : 100 nm. D'après (Fiserova et al. 2009)

De plus, des recherches récentes ont permis d'identifier des candidats potentiels à la fonction de lamine chez les plantes. NMPC1 (Nuclear Matrix Constituant 1) de carotte et son homologue LINC (Little NuClei) d'*Arabidopsis*, sont des protéines contenant des régions coiled-coil et présentant une localisation nucléaire (Masuda et al. 1997; Dittmer et al. 2007). Les noyaux des doubles mutants d'*Arabidopsis linc1 ; linc2*, 2 à 5 fois plus petits que ceux des plantes sauvages, présentent une morphologie altérée et une distribution anormale du degré de ploïdie.

Aux réseaux de polymères formés par les filaments d'actine et les filaments intermédiaires, s'ajoutent les microtubules, également essentiels à l'activité cellulaire.

Les microtubules

Les microtubules sont des structures tubulaires constitués d'hétérodimères de tubuline α et β . Chaque sous-unité est une protéine globulaire d'environ 55 kDa. Ils forment des réseaux complexes impliqués dans de nombreux processus physiologiques essentiels au fonctionnement des cellules eucaryotes. Ce sont les composants majeurs du fuseau mitotique qui jouent un rôle essentiel dans la division cellulaire. En plus de leur rôle évident dans la ségrégation des chromosomes, ils sont impliqués dans des processus aussi variés que le maintien de la forme de la cellule, le transport de macromolécules et d'organelles et la transduction de signaux.

Caractéristiques génomique et structurale des tubulines

Huit familles distinctes de tubulines ont été identifiées à ce jour. Les tubulines α et β sont les composants structuraux majeurs des microtubules. La Y-tubuline joue un rôle essentiel dans la nucléation de l'assemblage des polymères. Ces trois isoformes sont conservées chez les eucaryotes. Elles sont issues de l'expression de plusieurs familles de gènes. Par exemple chez l'homme, on ne compte pas moins de 15 gènes d' α -tubuline, 21 de β -tubuline et 3 de Y-tubuline. Le génome d'*Arabidopsis* comporte au moins 6 gènes d' α -tubuline, 7 gènes de β -tubuline, et 2 gènes de Y-tubuline. Les autres familles de tubulines ne sont pas ubiquitaires, mais spécifiques à certains organismes, en général flagellés. Les tubulines δ (delta) et ϵ (epsilon) sont notamment impliquées dans la structure et le fonctionnement du centrosome et du corps basal du flagelle. Les tubulines η (eta), ζ (zeta) et ι (iota) ne sont retrouvées que chez certains protozoaires, associées aux corps basaux et jouent un rôle dans leur duplication (Vaughan et al. 2000; Dutcher 2003). Enfin, les tubulines κ (kappa) et θ (theta) de *Paramecium* seraient des homologues des tubulines α et β , respectivement (Dutcher 2001, 2003).

Structure et polarité des microtubules

Les hétérodimères d' $\alpha\beta$ -tubuline s'assemblent en orientation « tête-queue » pour former des protofilaments (Figure 6). *In vivo*, un microtubule typique est composé de 13 protofilaments formant un tubule creux et rigide d'environ 25 nm de diamètre. L'orientation des dimères de tubuline a pour conséquence de conférer une polarité intrinsèque au microtubule.

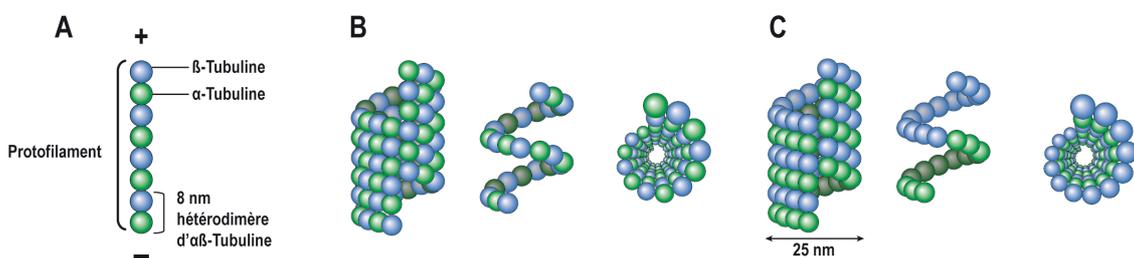


Figure 6 : Structure des microtubules. **A** : L'interaction « tête-queue » de dimères d' $\alpha\beta$ -tubuline forme un protofilament linéaire. Treize protofilaments s'assemblent latéralement pour former un microtubule. **B** : Structure théorique d'une matrice de type A où les interactions entre tubuline α et β se font latéralement. **C** : Structure d'un microtubule assemblé suivant la matrice de type B, le modèle d'assemblage le plus en accord avec les données expérimentales. Les interactions latérales entre sous-unités se font entre tubulines α et β sauf entre les 2 protofilaments de jointure montrant des interactions entre tubulines α et β . A la droite des modèles figurent une des trois hélices de tubuline formant le microtubule, ainsi qu'une vue de dessus de la structure. On observe un décalage de 3 monomères à chaque tour d'hélice. Adapté de (Wade et Chretien 1993; Desai et Mitchison 1997).

In vitro, selon les conditions expérimentales, il est possible d'obtenir des microtubules de 10 à 16 protofilaments ou même des feuillets plans. Ces variations sont exceptionnelles *in vivo*. C'est le cas, par exemple, des microtubules de neurones de *Caenorhabditis elegans* qui sont formés de 15 protofilaments (Dutcher 2003).

La tubuline peut également polymériser en formant des doublets (13 + 11 protofilaments) et des triplets (13 + 11 + 11 protofilaments) de microtubules. On retrouve ces configurations particulières dans le corps basal des cils et des flagelles et dans les centrosomes.

Dynamique d'assemblage des dimères de tubuline $\alpha\beta$

Les constantes d'association/dissociation des deux extrémités des microtubules diffèrent. A l'extrémité nommée (+) où se situe la β -tubuline, les échanges sont plus rapides qu'à l'extrémité (-) correspondant aux sous-unités d' α -tubuline. L'extrémité (-) est souvent ancrée au site de nucléation qui limite ou inhibe les échanges.

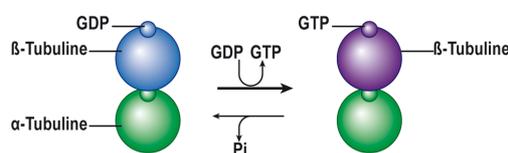


Figure 7 : Equation d'équilibre entre dimères d' $\alpha\beta$ -tubuline GDP et GTP. L'équilibre est déplacé vers la droite, favorisant l'association du dimère au GTP.

Les tubulines α et β s'associent à une molécule de GTP (Figure 7). Lorsque l'hétérodimère se forme, le GTP de l' α -tubuline se retrouve piégé à l'interface des deux protéines et n'est pas hydrolysable. En revanche, lors de l'assemblage de nouveaux dimères, le GTP associé à la β -tubuline est rapidement hydrolysé par l'activité catalytique de l' α -tubuline. L'extrémité (+) d'un microtubule en croissance est donc caractérisée par une coiffe d' $\alpha\beta$ -tubuline/GTP formée par les dimères fraîchement polymérisés, l'extrémité (-) étant constituée d' $\alpha\beta$ -tubuline/GDP.

Instabilité dynamique des microtubules

Au sein du microtubule, les interactions entre hétérodimères se font latéralement et longitudinalement. La polymérisation longitudinale permet la croissance des protofilaments, formant un feuillet de tubuline. Les interactions latérales entre protofilaments favorisent la fermeture de ce feuillet en un cylindre creux relativement rigide. L'hydrolyse du GTP de la β -tubuline entraîne une courbure dans le monomère, ce qui a pour effet d'introduire des tensions dans le protofilament. Lorsque tout le GTP des β -tubulines formant la coiffe est hydrolysé, les liaisons entre protofilaments se déstabilisent, entraînant la dépolymérisation rapide du microtubule (Erickson et O'Brien 1992). Une fois libérée du polymère, la sous-unité de β -tubuline va pouvoir réincorporer une molécule de GTP et le dimère ainsi activé sera à nouveau apte à intégrer un polymère en croissance (Figure 8). On considère trois états dans l'instabilité dynamique : la phase de catastrophe illustrant la dépolymérisation, la phase de pause où le microtubule reste stable et la phase de sauvetage qui se traduit par l'élongation du polymère.

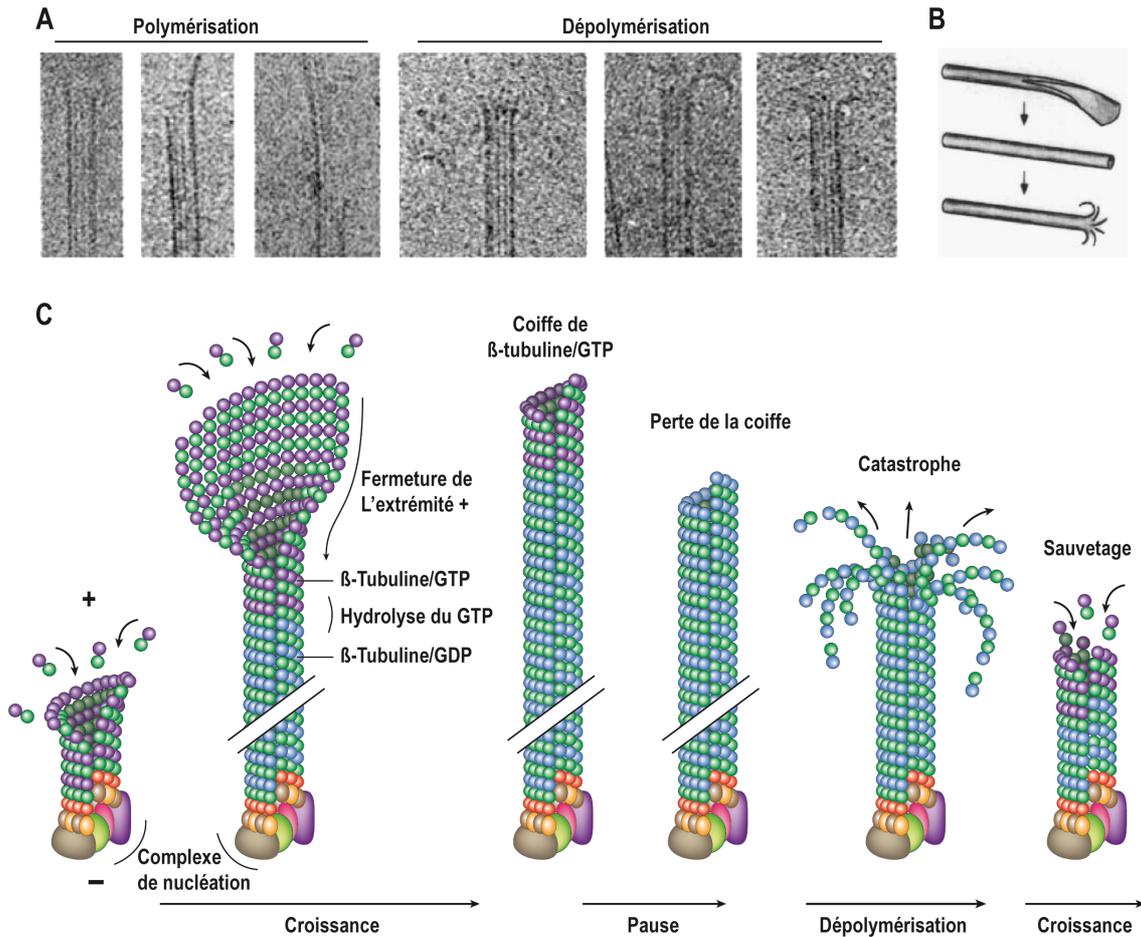


Figure 8 : Instabilité dynamique des microtubules. **A** : Microscopie électronique de microtubules en cours de polymérisation ou dépolymérisation. Les microtubules en croissance forment un feuillet alors que les microtubules qui dépolymérisent forment des protofilaments recourbés (Chretien et al. 1995). **B** : Représentation schématique de microtubules en cours de polymérisation (en haut) ou dépolymérisation (en bas). La fermeture complète du feuillet (au niveau de la couture) est proposée comme mécanisme structural pouvant conduire à la dépolymérisation (Desai et Mitchison 1997). **C** : Le microtubule, stabilisé à son extrémité (-) par un complexe de nucléation, croît par addition de dimères d' $\alpha\beta$ -tubuline/GTP. La perte de la coiffe de tubuline/GTP entraîne une dépolymérisation rapide du polymère, appelée événement de « catastrophe ». La phase de polymérisation succédant à cet événement est appelée « sauvetage ».

Treadmilling des microtubules

Lorsqu'un microtubule n'est pas stabilisé à son extrémité (-) par un complexe de nucléation ou d'ancrage, l'assemblage à l'extrémité (+) peut être associé à une dépolymérisation équivalente de dimères à l'extrémité (-) (Figure 9).

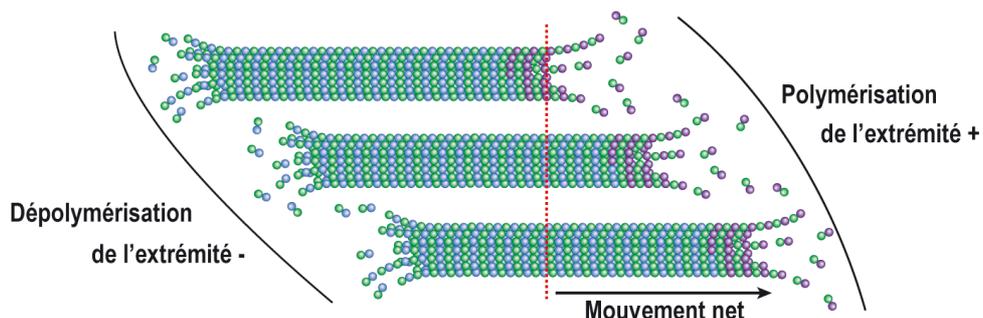


Figure 9 : Phénomène de « treadmilling » ou tapis roulant. Les dimères de tubuline polymérisent du côté (+) et après hydrolyse du GTP de la β -tubuline, se séparent du côté (-) du microtubule. Il en résulte un déplacement net du polymère.

Le microtubule garde alors une taille constante et se déplace dans le milieu selon un mécanisme de tapis roulant similaire à celui observé avec l'actine (Rodionov et Borisy 1997).

Complexes protéiques de nucléation

L'assemblage spontané de microtubules *in vitro* à partir de tubuline purifiée est possible mais la concentration minimale de tubuline requise, appelée concentration critique d'assemblage (de l'ordre de $18 \pm 2 \mu\text{M}$) serait bien supérieure aux concentrations rencontrées *in vivo* (Chatterjee et al. 2001), suggérant des mécanismes catalyseurs de l'assemblage ou nucléateurs. *In vivo*, cette nucléation pourrait s'initier par la formation d'oligomères de tubuline composés d'une dizaine de dimères associés latéralement (Job et al. 2003). D'autre part, des complexes protéiques de nucléation permettent à la cellule d'amorcer la formation des microtubules (Figure 10) aux concentrations physiologiques de tubuline c.à.d. $\leq 15 \mu\text{M}$ (Moritz et al. 1995; Zheng et al. 1995; Morita-Fujimura et al. 1996).

Composition des complexes de nucléation

Des complexes de nucléation des microtubules ont été identifiés à partir d'extraits d'œuf de xénope, d'embryons de drosophile, et de cellules humaines. Des expériences de microscopie électronique ont montré que ces complexes s'organisent en une structure circulaire appelée « Y-Tubulin Ring Complex » (Y-TuRC) (Moritz et al. 1995; Zheng et al. 1995; Murphy et al. 2001). Ils sont composés de Y-tubuline associée à d'autres composants protéiques, nommés GCPs pour « Gamma-tubulin Complex Proteins » (GCP1 correspondant à la Y-tubuline). La Y-tubuline reste l'élément clé de l'activité de nucléation (Moritz et Agard 2001). On la trouve associée avec GCP2 et GCP3 dans des petits complexes appelés « Y-Tubulin Small Complexes » (Y-TuSCs).

Chez la levure, ce complexe minimum initiateur de la nucléation est composé d'un dimère de Y-tubuline, et de deux autres protéines appelées Spc97 et Spc98, homologues aux GCP2 et 3 humaines (Geissler et al. 1996; Knop et al. 1997; Knop et Schiebel 1997). Ces deux protéines sont, avec la Y-tubuline, les protéines les mieux conservées au sein du complexe.

Les Y-TuRCs humains se composent de six GCPs dont les homologues sont retrouvés dans le génome de nombreux organismes dont la drosophile et le xénope (Tableau 1).

	Complexe Y-TuSC					
	GCP1	GCP2	GCP3	GCP4	GCP5	GCP6
<i>Homo sapiens</i>	Y-tubuline	hGCP2	hGCP3	hGCP4	hGCP5	hGCP6
<i>Xenopus laevis</i>	Y-tubuline	XGrip110	XGrip109	XGrip75	XGrip133	XGrip210
<i>Drosophila melanogaster</i>	Y-tubuline	DGrip84	DGrip91	DGrip75	DGrip128	DGrip163
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Y-tubuline	AtGCP2	AtGCP3	AtGCP4	AtGCP5	AtGCP6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Tub4p	Spc97p	Spc98p			
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Tug1p	Alp4	Alp6	Gfh1p		Alp16

Tableau 1 : Récapitulatif des protéines des complexes de nucléation de microtubules codées par des gènes orthologues de différents organismes. Y-TuSC pour Y-Tubulin Small Complex : complexe minimal de nucléation des microtubules.

Arabidopsis possède deux gènes codant pour la Y-tubuline, dont le rôle essentiel dans l'organisation des différents réseaux de microtubules et le développement de la plante a récemment été mis en évidence (Pastuglia et al. 2006). Des homologues de l'ensemble des GCPs animales sont également retrouvés dans le génome d'*Arabidopsis* (AtGCP2 à 6). Les protéines AtGCP2 et 3 sont les seules à avoir été caractérisées à ce jour. Ces protéines ont été identifiées avec la Y-tubuline dans un même complexe membranaire de haut poids moléculaire, suggérant l'existence de complexes Y-TuRC chez les plantes (Drykova et al. 2003; Seltzer et al. 2007).

Structure des complexes Y-TuRCs

Les complexes Y-TuRCs agissent en stabilisant l'extrémité (-) des microtubules. Deux modèles de nucléation faisant intervenir ces complexes ont été proposés (Moritz et Agard 2001; Job et al. 2003; Pastuglia et Bouchez 2007) (Figure 10).

Dans le modèle en matrice, basé sur des immunomarquages en microscopie électronique, les complexes Y-TuSCs s'associent latéralement et forment un anneau sur lequel vont s'ancrer les dimères d' $\alpha\beta$ -tubuline. Chaque protofilament est alors aligné sur une des 13 molécules de Y-tubuline du complexe. Les autres GCPs se positionnent du côté des GCP2 et 3, participant à la stabilité de la structure.

Dans le modèle en béquille ou protofilament, basé sur des expériences *in vitro*, les Y-tubulines s'associent les unes aux autres pour former le premier protofilament du microtubule qui va ensuite interagir latéralement avec les dimères d' $\alpha\beta$ -tubuline. Cette interaction stabiliserait les deux premiers protofilaments du microtubule en formation. Les GCPs 4, 5 et 6 seraient associées au coude du polymère de Y-TuSC.

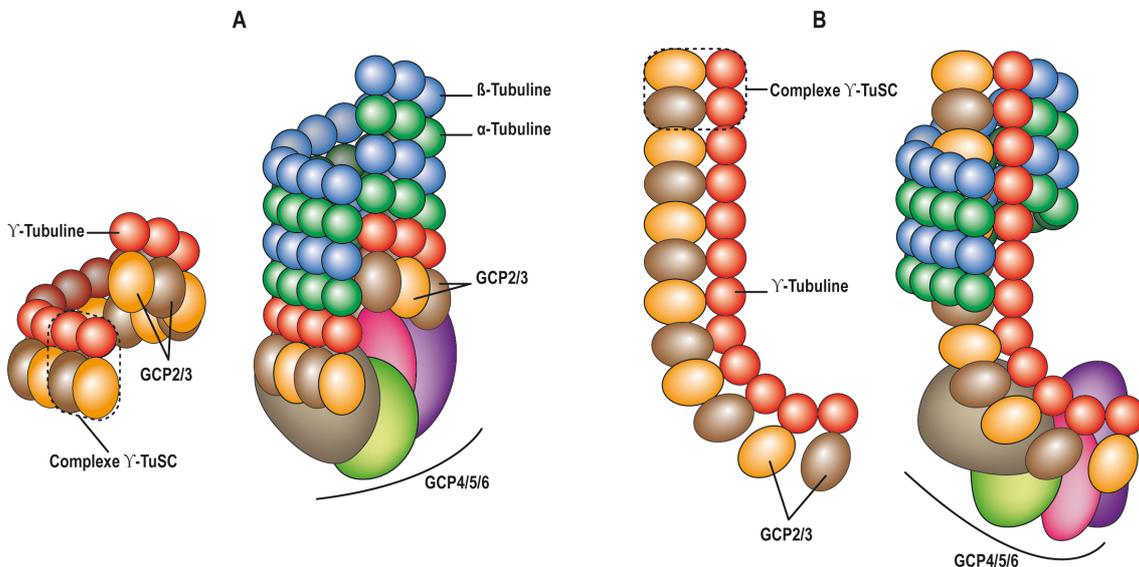


Figure 10 : Complexes de nucléation des microtubules. A : Modèle en matrice. Les Y-tubulines des complexes Y-TuSCs interagissent latéralement pour former un anneau qui va servir de matrice. **B :** Modèle en protofilament. Les Y-tubulines s'associent verticalement pour former une béquille qui va stabiliser les protofilaments adjacents.

Le complexe Y-TuSC est suffisant pour nucléer la formation de microtubules *in vitro*. Cependant, le complexe complet (Y-TuRC) présente une activité 25 fois supérieure au Y-TuSC seul (Gunawardane et al. 2001). Ces données suggèrent que les autres GCPs contribuent fortement à l'efficacité de nucléation du complexe.

Des études récentes ont révélé des fonctions additionnelles pour les GCP5 et 6. GCP5 serait impliquée dans la localisation du complexe γ -TuRCs aux pôles du fuseau mitotique. Cette fonction serait régulée par la Glycogène Synthase Kinase GSK-3 β (Izumi et al. 2008). GCP6 participerait à l'ancrage des complexes de nucléation au niveau de F1 de kératine et à la formation du réseau cortical des cellules épithéliales. Des expériences réalisées *in vitro* montrent que la phosphorylation de GCP6 par la kinase Cdk1 inhibe son interaction avec la kératine (Oriolo et al. 2007).

Centres organisateurs animaux

Dans la plupart des types cellulaires, les microtubules forment des réseaux organisés et polarisés dont la structure évolue au cours du cycle cellulaire. La formation de ces réseaux est contrôlée par des centres organisateurs (MTOC pour « Microtubule Organizing Centers ») qui permettent à la cellule de réguler leur morphologie dans l'espace et dans le temps.

Le centrosome

Dans la plupart des cellules animales, la formation et l'organisation des réseaux de microtubules est largement dépendante d'organites particuliers, les centrosomes (Figure 11).

Le centrosome est composé d'une paire de centrioles, généralement orientés perpendiculairement l'un à l'autre. Chaque centriole est composé de neuf triplets de microtubules arrangés en cercle, formant un cylindre parfaitement symétrique. Le centrosome est entouré d'une matrice protéique amorphe contenant les complexes de nucléation γ -TuRCs. Ces complexes initient la formation de microtubules qui vont rayonner dans l'espace cellulaire. Le maintien de cette matrice protéique au niveau des centrosomes requiert la présence d'une protéine particulière, la centrosomine (Lucas et Raff 2007).

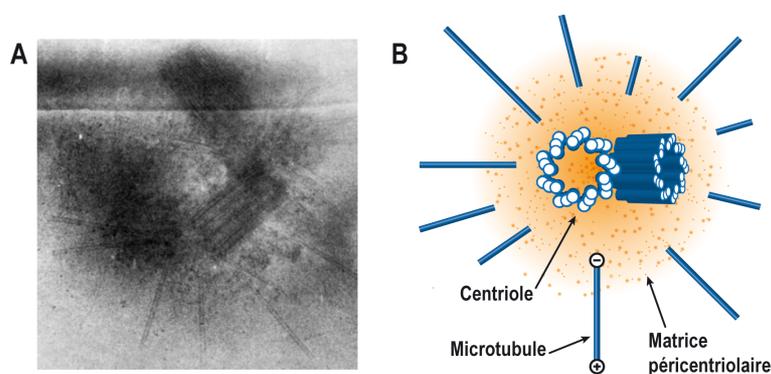


Figure 11 : Structure du centrosome. A : Centrosome observé en microscopie électronique (Chretien et al. 1995). B : Les deux centrioles du centrosome et la matrice péri-centriolaire où sont nucléés les microtubules.

Le centrosome a été longtemps considéré comme la structure responsable de l'assemblage du fuseau mitotique. Cependant, de nombreux eucaryotes, incluant entre autres les plantes supérieures, assemblent correctement leur fuseau en l'absence de centrosome, relativisant son importance dans l'organisation du cytosquelette microtubulaire.

Par exemple, les premières divisions de l'embryon de souris se réalisent sans centrosome. Ceux-ci sont ensuite assemblés *de novo* au stade blastocyste (Schatten et Schatten 1986). D'autre part, lorsque les centrosomes de cellules animales sont enlevés par microchirurgie ou détruits par rayonnement laser, le fuseau s'assemble correctement et la cellule se divise

normalement (Khodjakov et al. 2000; Hinchcliffe et al. 2001). Enfin, des mutants de drosophile dépourvus de centrosomes ont un développement quasiment normal mais présentent des dysfonctionnements associés à la perte de cils et de flagelles (Basto et al. 2006).

En considérant ces données, la fonction essentielle dépendant du centrosome serait donc plutôt de former les cils ou les flagelles de cellules spécialisées que d'organiser le réseau de microtubules, dans la mesure où des mécanismes alternatifs sont possibles.

Le corps polaire des levures (Spindle Pole Body ou SPB)

Chez la plupart des champignons, le SPB est une structure trans-membranaire composée de trois plaques protéiques disposées de part et d'autre de l'enveloppe nucléaire. Les plaques interne et externe permettent de nucléer respectivement les microtubules nucléaires lors de la formation du fuseau de division et les microtubules cytoplasmiques. Ces plaques protéiques sont reliées entre elles par une plaque centrale. Le SPB est impliqué dans de multiples fonctions cellulaires dont la formation du fuseau de division, le positionnement du noyau et la cytokinèse.

Autres centres organisateurs associés au noyau

Au cours de l'évolution, la structure des centres organisateurs a divergé selon les organismes tout en préservant les fonctions de nucléation microtubulaire et de ségrégation génomique (Schmit et Nick 2008). Le rhizoplaste d'*Ochromonas* et l'attractophore de *Filobasidiella* par exemple, sont des masses denses plus ou moins sphériques localisées dans une dépression de la surface externe du noyau.

La membrane apicale des cellules épithéliales

Les cellules animales qui possèdent des centrosomes ou des structures équivalentes possèdent également des centres organisateurs secondaires qui peuvent avoir des rôles importants dans l'organisation des microtubules. Les cellules épithéliales polarisées ont un réseau de microtubules très développé dont une grande part n'est pas en relation directe avec le centrosome (Yvon et Wadsworth 1997). Les microtubules du réseau apico-basal de ces cellules sont nucléés au niveau de la membrane apicale. Dans ces cellules, la Y-tubuline est retrouvée au niveau du cortex.

Autres sites de nucléation

Une grande partie des fibres kinétochoriennes du fuseau mitotique est formée à partir des kinétochores. Les extrémités (-) des microtubules formant ces fibres sont capturées et guidées par des protéines motrices le long des microtubules astraux vers les pôles du fuseau. Lorsque ces fibres sont coupées par microchirurgie laser, elles se reforment à partir de leurs extrémités (+) localisées au niveau des kinétochores (Maiato et al. 2004). Le fuseau mitotique lui-même semble être également une source de nucléation de microtubules (Mahoney et al. 2006). L'appareil de Golgi est également capable d'assembler et de stabiliser des microtubules par un mécanisme impliquant les complexes à Y-tubuline (Chabin-Brion et al. 2001; Rios et al. 2004).

Centres organisateurs des plantes

Toutes les cellules végétales immobiles possèdent des centres organisateurs dispersés. En revanche, dans le cas de cellules végétales mobiles comme les gamètes flagellés des algues, Lycophytes, Bryophytes, Ptéridophytes... jusqu'au Gingko dont la reproduction reste dépendante du milieu aqueux, un corps basal, structure analogue au centriole impliquée dans la formation du flagelle, est présent. Les cellules des plantes supérieures (Pinophytes et Angiospermes) ne possèdent ni gamètes flagellés, ni centriole ou structure y ressemblant. En l'absence de MTOC structurellement bien défini, divers réseaux de microtubules s'organisent dans le cytoplasme, suggérant l'existence de sites de nucléation diffus dont l'activité est finement régulée dans l'espace et dans le temps.

MTOCs à la membrane plasmique et le long des microtubules

Dans les cellules végétales, les microtubules sont majoritairement corticaux, associés à la face interne de la membrane plasmique. Ils forment un réseau de microtubules parallèles entre eux et associés en faisceaux perpendiculaires à l'axe d'élongation de la cellule.

Des expériences d'immunodétection montrent que la Y-tubuline est répartie de manière ponctuée le long des microtubules, suggérant l'existence de sites de nucléation multiples (Figure 12). L'expression d'une fusion GFP de la protéine AtEB1 (End Binding protein 1) qui marque les extrémités des microtubules, révèle que ces sites ne sont pas statiques mais se déplacent dans le cortex (Chan et al. 2003). Les complexes à Y-tubuline effectueraient des navettes entre le cortex et le cytoplasme, initiant de nouveaux microtubules sur le réseau préexistant. Ce mécanisme de nucléation particulier conduit à la formation d'un réseau branché de microtubules (Murata et al. 2005). Ce mécanisme pourrait aussi contribuer à la formation de microtubules fusoriaux (Murata et Hasebe 2007).

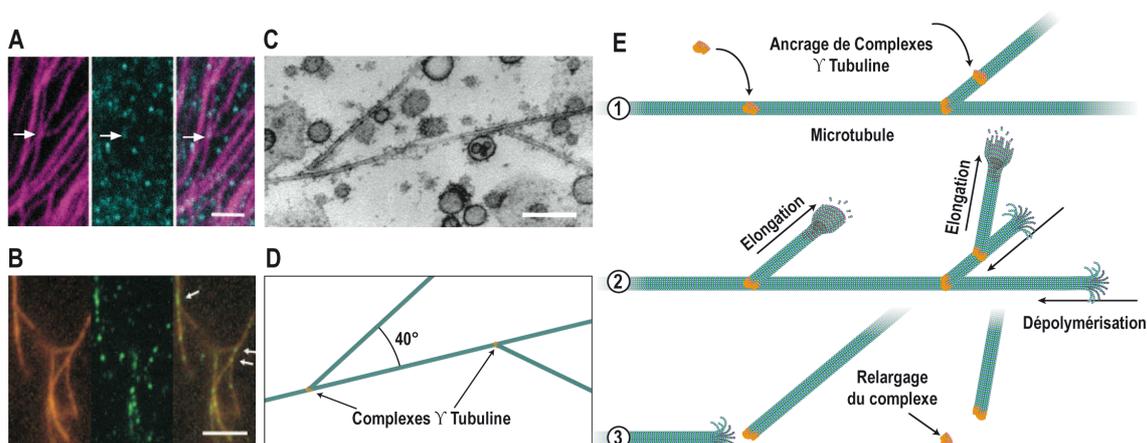


Figure 12 : Mécanisme de nucléation dépendant des microtubules. **A et B** : Images confocales du cortex d'une cellule de tabac BY-2 (A) ou de microtubules nucléés à partir d'extraits cytosoliques (B) montrant l' α -tubuline (à gauche), la Y-tubuline (au centre) et une superposition des deux (à droite). Les deux signaux co-localisent au niveau des branchements de microtubules (flèches). **C** : Micrographie électronique à transmission d'une cellule BY-2. On observe des microtubules nucléés sur un microtubule préexistant. **D** : Schéma d'interprétation : la Y-tubuline est localisée à la base des microtubules branchés. Des complexes γ -TuRCs présents le long des microtubules initieraient de nouveaux polymères avec un angle de 40° . **E** : Modèle de nucléation des microtubules corticaux des plantes. Des complexes γ -TuRCs cytosoliques se lient le long de microtubules existant (1) et initient de nouveaux microtubules (2). Les complexes de nucléation ne sont libérés qu'après dépolymérisation du microtubule qu'ils ont initié. Barres d'échelles : 10 μm (A), 200 nm (C). D'après (Murata et al. 2005).

MTOCs à la surface du noyau

Des essais *in vitro* ont montré que des noyaux isolés de maïs sont capables de nucléer des microtubules à des concentrations de tubuline inférieures à celles requises pour un assemblage spontané (Stoppin et al. 1994), suggérant la présence de complexes de nucléation à la surface du noyau des cellules végétales. Des noyaux, capables de nucléer des microtubules *in vitro*, montrent à leur surface la présence de Y-tubuline et GCP3 (Figure 13). Lorsque ces noyaux sont incubés avec des anticorps dirigés contre la Y-tubuline ou contre AtGCP3, la nucléation de microtubules est inhibée (Erhardt et al. 2002). De plus, des expériences d'immuno-détection et d'expression de fusion GFP montrent qu'AtGCP3 est localisée au niveau de l'enveloppe nucléaire et au cortex. Des complexes de type Y-TuRC pourraient donc être à l'origine de cette activité de nucléation.

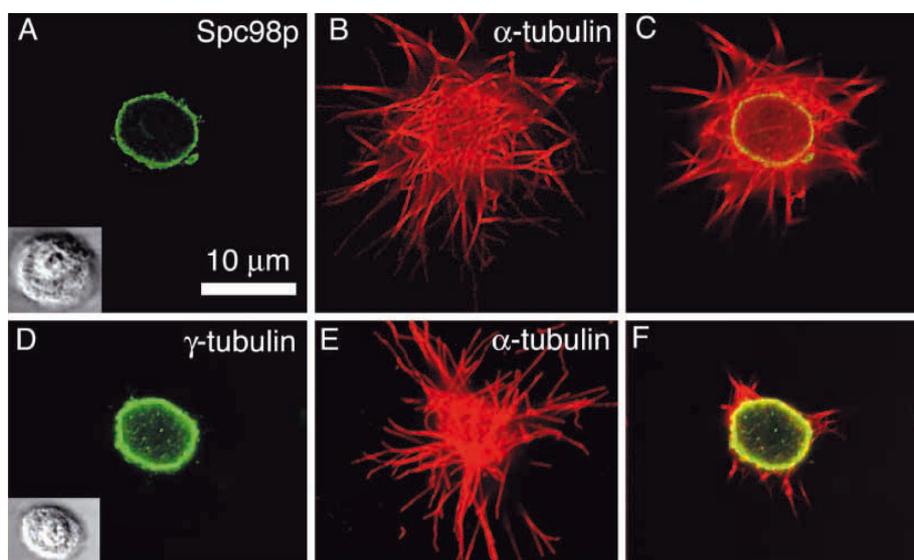


Figure 13 : SPC98p et la Y-tubuline sont présents à la surface de noyaux isolés de cellules de tabac BY-2 ayant nucléé des microtubules. A : Coupe confocale d'un noyau marqué avec un anticorps anti-Spc98p (GCP3 de levure). B : Reconstitution de la surface du même noyau marqué avec un anticorps anti- α -tubuline. C : Superposition des images A et B. D : Coupe confocale d'un noyau marqué avec un anticorps anti-Y-tubuline. E : Marquage du même noyau avec un anti- α -tubuline. F : Superposition des images D et E. Insert : noyau en DIC. D'après (Erhardt et al. 2002).

Organisateurs polaires acentriolaires et plastes

Les mousses et les hépatiques du groupe des Bryophytes possèdent une grande variété de MTOCs révélés par un marquage de la Y-tubuline : des centrioles dans les cellules spermatogènes, des éléments acentriolaires sphériques décrits comme « organisateurs polaires », un système associé à la membrane plastidiale et un système diffus. Ces structures représenteraient des formes évolutives intermédiaires, entre les algues vertes (qui ont un centrosome) et les plantes supérieures (qui n'ont pas de MTOC structuré).

Chez les Bryophytes à méiose monoplastidique, des microtubules irradient de la surface du plaste et participent à sa propre division et à la répartition des 4 plastes résultants vers les pôles des spores. Puis les plastes servent de MTOCs et organisent un système microtubulaire quadripolaire (QMS).

Les capacités nucléatrices des plastes isolés ont été démontrées *in vitro*, mais l'implication fonctionnelle de la Y-tubuline, bien que conservée dans ces organismes et présente de

façon ponctuelle en surface des plastes, n'est pas encore démontrée (Shimamura et al. 2004). On peut donc considérer que, d'une manière générale, les MTOCs animaux et végétaux peuvent être distribués soit de manière diffuse au niveau des membranes, soit concentrés au niveau d'organites particuliers ou le long de microtubules préexistants. Quelque soit leur localisation, les protéines des complexes de nucléation passent par une étape de recrutement au site actif, d'ancrage et enfin d'activation de la nucléation.

L'ensemble des MTOCs décrits chez les eucaryotes est résumé dans le tableau 2.

Structure (Organismes)	Composition	Fonction
Centrosomes (cellules animales, cellules végétales primitives)	Matrice Protéique	Nucléation et ancrage des microtubules à leur extrémité (-), dépendant de la Y-tubuline
Corps basaux (cellules ciliées ou flagellées)	Matrice Protéique	Présence de Y-tubuline mais l'activité de nucléation n'a pas été démontrée
Membrane plasmique corticale (cellules végétales)	Membrane	Nucléation et ancrage de microtubules due à l'association latérale de Y-tubuline à des microtubules préexistants
Membrane basale des cellules épithéliales (cellules animales)	Membrane	Présence de Y-tubuline mais l'activité de nucléation n'a pas été démontrée
Centrosome et membrane apicale des cellules épithéliales (cellules animales)	Matrice Protéique, membrane	Au niveau des centrosomes, nucléation et ancrage des microtubules, dépendant de la Y-tubuline ; ancrage de l'extrémité (-) des microtubules au niveau de la membrane apicale
Enveloppe nucléaire (cellules végétales) ; enveloppe nucléaire des myotubes (cellules animales)	Membrane	Nucléation et ancrage des microtubules à leur extrémité (-), dépendant de la Y-tubuline
Appareil de Golgi (cellules animales)	Membrane	Nucléation et ancrage des microtubules, présence de Y-tubuline
MTOCs interphasiques au niveau de la membrane nucléaire et le long des microtubules (levure)	Membrane, protéines	Nucléation et ancrage des microtubules à leur extrémité (-) au niveau de l'enveloppe nucléaire et à partir de microtubules préexistants, dépendant de la Y-tubuline
Phragmoplaste (cellules végétales) ; Midbody (cellules animales) ; MTOCs équatoriaux (levure)	Matrice Protéique	Nucléation et ancrage des microtubules à leur extrémité (-) pendant la cytokinèse, dépendant de la Y-tubuline
Fuseau mitotique (cellules animales) et microtubules corticaux (cellules végétales)	Matrice Protéique	Nucléation des microtubules, ancrage latéral et au niveau des extrémités des microtubules
Chromosomes (cellules animales)	ADN, protéines	Nucléation et ancrage des microtubules à leur extrémité (+) par les kinétochores, dépendant de la Y-tubuline

Tableau 2 : Récapitulatifs des centres organisateurs potentiels et connus, de leur structure et de leur rôle dans l'organisation du réseau de microtubules. D'après (Luders et Stearns 2007).

Facteurs régulant la dynamique

Modifications post-traductionnelles de la tubuline

La tubuline peut subir un grand nombre de modifications post-traductionnelles. Certaines d'entre elles ne lui sont pas spécifiques, comme la phosphorylation ou l'acétylation, mais d'autres n'ont pas à ce jour été décrites sur d'autres protéines, comme le cycle de détyrosylation, la polyglutamylation ou la polyglycylation (Figure 14). Ces changements se font de préférence sur de la tubuline non polymérisée, et sont davantage présents sur les microtubules peu dynamiques. Ces modifications peuvent agir directement en modifiant la structure des microtubules ou indirectement en influençant le recrutement de protéines associées (Hammond et al. 2008).

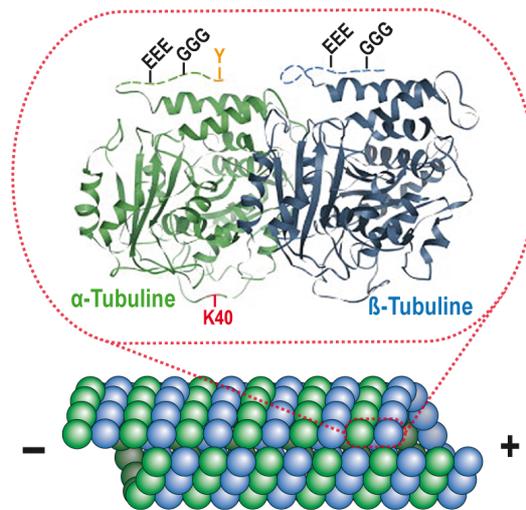


Figure 14 : Modifications post-traductionnelles de la tubuline. Détyrosination du résidu C-terminal de tyrosine (Y) de l' α -tubuline. Polyglutamylation (EEE) et polyglycylation (GGG) de la partie C-terminale des tubulines α et β . Acétylation la lysine 40 de l' α -tubuline (K40). Adapté de (Hammond et al. 2008)

Facteurs stabilisateurs

Les MAPs (Microtubule Associated Proteins) sont des protéines associées aux microtubules qui les stabilisent en diminuant la fréquence des événements de catastrophe, augmentant le taux de sauvetage ou leur vitesse de polymérisation. Cette activité stabilisatrice réduit le taux de renouvellement des microtubules et augmente la fraction de tubuline polymérisée. La phosphorylation est une voie privilégiée de régulation de l'activité des MAPs, modulant leur affinité pour les microtubules (McNally 1996).

XMAP215, identifiée chez le xénope, et son homologue humain TOGp augmentent jusqu'à 10 fois la vitesse de polymérisation de la tubuline purifiée (Ohkura et al. 2001). MOR1/GEM1 est l'homologue végétal de cette MAP. L'analyse de mutants thermosensibles montre que cette protéine joue un rôle important dans l'organisation des microtubules corticaux et fusoriaux ainsi que dans l'asymétrie des divisions lors de la gamétogenèse pollinique (Kawamura et al. 2006; Kawamura et Wasteney 2008).

XMAP230 et XMAP310 sont deux autres MAPs de xénope impliquées dans l'assemblage du fuseau mitotique. La première agit en diminuant la fréquence de catastrophe et la seconde en augmentant la fréquence de sauvetage (Andersen 2000).

Récemment, une nouvelle classe de protéines se liant spécifiquement à l'extrémité (+) des microtubules (+TIPs) a été découverte. CLIP170 et EB1, identifiées chez l'homme, sont impliquées dans l'ancrage des kinétochores aux extrémités (+) des microtubules (Schuyler et Pellman 2001). Il existe trois homologues d'EB1 dans le génome d'*Arabidopsis* (AtEB1a, b et c). Ces protéines s'associent à l'extrémité (+) mais peuvent également révéler les extrémités (-) des microtubules. La fusion AtEB1a-GFP a en effet été utilisée pour suivre la localisation des sites de nucléation au cours du cycle cellulaire (Chan et al. 2003; Chan et al. 2005). Des mutants d'insertion des gènes EB1 présentent une déviation de la croissance racinaire suggérant des problèmes de perception de la gravité (Bisgrove et al. 2008). L'affinité de EB1 pour l'extrémité (+) est réduite dans les mutants *mor1*, suggérant une interaction possible entre les deux protéines (Kawamura et Wasteneys 2008).

Chez *Arabidopsis*, les gènes de la famille SPIRAL codent pour des +TIPs impliquées dans l'organisation des microtubules corticaux des cellules en expansion. Selon le type cellulaire, ces protéines ont également été localisées le long des microtubules, mais probablement via une MAP intermédiaire (Hamada 2006). Le mutant *spr1* présente un étiolement de l'hypocotyle et une croissance des racines en vrille fortement inclinée vers la droite (Nakajima et al. 2004; Sedbrook et al. 2004).

Des MAPs spécifiquement végétales comme les MAPs 65 sont présentes dans différents types de faisceaux microtubulaires antiparallèles. Leur hyperphosphorylation en mitose réduit leur affinité pour les microtubules fusoriaux. Le mutant *pléiade*, correspondant à une inactivation de la MAP 65-3, montre des cellules multinuclées, suggérant un rôle de cette MAP en liaison avec les microtubules du phragmoplaste lors de la cytokinèse (Muller et al. 2004). Ce type de MAPs agirait en diminuant les temps de pause des microtubules, favorisant ainsi leur croissance. (Yao et al. 2008).

TANGLED1 (TAN1), une MAP identifiée initialement chez le maïs, joue un rôle important dans le contrôle de l'orientation spatiale des divisions (Smith et al. 1996). Le mutant *tan1* présente des défauts de positionnement du phragmoplaste et d'orientation des parois cellulaires. L'homologue d'*Arabidopsis* marque l'anneau préprophasique et reste associé à son site de formation jusqu'en fin de division, servant de guide aux microtubules lors de la mise en place du phragmoplaste (Walker et al. 2007). Un criblage double hybride a montré que TAN1 est capable d'interagir avec les kinésines POK1 et POK2 (Müller et al. 2006). Le double mutant *pok1; pok2* présente un phénotype similaire au mutant *tan1* de maïs, suggérant une action conjointe des kinésines et de TAN1 dans le contrôle spatial des divisions.

La protéine d'*Arabidopsis* WAVE-DAMPENED 2 (WVD2), identifiée au cours d'un crible génétique (Yuen et al. 2003), est une MAP que l'on retrouve associée aux microtubules corticaux en interphase (Perrin et al. 2007). L'extinction ou la surexpression de WVD2, ou d'autres paralogues de la même famille (WV2-like ou WDL), entraînent des défauts d'élongation anisotrope des cellules ainsi qu'une désorganisation des réseaux de microtubules corticaux. Ces protéines partagent des similarités de séquence avec la partie C-terminale de TPX2 (Targeting Protein for Xklp2), une MAP essentielle au fonctionnement du fuseau de division animal. Les auteurs suggèrent un parallèle possible entre les fonctions des deux protéines (Perrin et al. 2007).

Facteurs déstabilisant les microtubules

Le haut taux de catastrophe rencontré *in vivo* suggère l'existence de facteurs déstabilisant les microtubules. S'opposant à l'activité stabilisatrice des MAPs, ces facteurs de catastrophe permettent des modulations rapides de la dynamique des microtubules au cours du cycle cellulaire (Figure 15).

La protéine Op18/stathmine est une protéine animale (pas d'homologue de plante ou de levure) capable d'induire la dépolymérisation des microtubules. L'activité de la stathmine est contrôlée négativement par de nombreuses kinases. En mitose, son hyperphosphorylation est nécessaire à la progression normale du cycle cellulaire (Belmont et Mitchison 1996).

La Katanine est une protéine hétérodimérique composée de deux sous-unités de 60 et 80 kDa (p60 et p80). La sous-unité p60, qui appartient à la famille des ATPases AAA, est capable de couper les microtubules et de générer ainsi des extrémités (+) dépourvues de coiffe de tubuline-GTP, entraînant des événements de dépolymérisation. La sous-unité p80 est impliquée dans la régulation et la localisation de la p60 au centrosome (Hartman et al. 1998). Des gènes codant pour les deux sous-unités de la Katanine sont retrouvés chez *Arabidopsis*. L'analyse de mutants révèle leur importance dans l'organisation et la dynamique des microtubules corticaux et périnucléaires, notamment lors de l'élongation cellulaire (Burk et al. 2001; Bouquin et al. 2003).

Des protéines de la famille des kinésines intermédiaires (non motrices) forment une deuxième classe de protéines déstabilisatrices. XKCM1, une kinésine identifiée chez le xénope, est capable de se fixer directement aux extrémités des microtubules et de les dépolymériser. Cette protéine et son homologue de mammifère (MCAK) sont localisés sur les kinétochores en mitose et pourraient jouer un rôle dans le mouvement des chromosomes (Walczak et al. 1996).

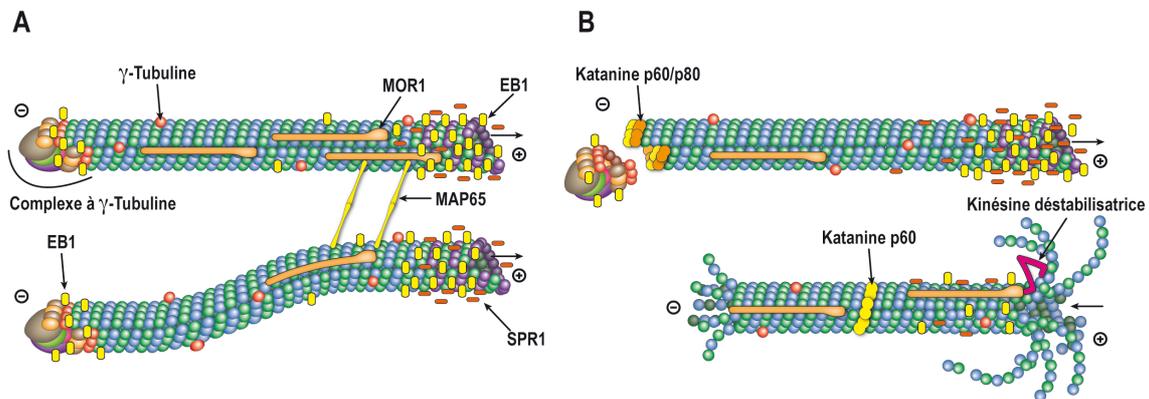


Figure 15 : MAPs en relation avec les microtubules corticaux de plante. A : Deux microtubules en phase de croissance, ancrés à leur extrémité (-) par des complexes de nucléation. EB1 se retrouve à la fois aux centres de nucléation et aux extrémités (+) des microtubules, jouant un rôle stabilisateur et recrutant d'autres protéines. La γ -tubuline joue son rôle nucléateur à l'extrémité (-) mais se retrouve également de manière ponctuelle le long des microtubules. Les MAPs 65 forment des dimères qui vont ponter les microtubules entre eux. MOR1 s'associe le long des microtubules et les stabilise. SPR1 s'associerait de manière indirecte à l'extrémité (+) des microtubules. **B :** Le premier microtubule est séparé du complexe de nucléation par un complexe hexamérique de katanine p60/p80 (hypothétique). Le deuxième microtubule est en cours de dépolymérisation par ces deux extrémités (l'extrémité (+) dépolymérise plus vite). Des sous-unités p60 de katanine pourraient se retrouver également le long du microtubule. Une kinésine hypothétique s'associerait avec MOR1 pour accélérer la dépolymérisation du microtubule (processus connu avec l'homologue animal de MOR1).

Moteurs protéiques associés aux microtubules

Les protéines motrices associées aux microtubules utilisent l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer le long de ces polymères. Les kinésines sont des protéines motrices qui se déplacent en grande majorité vers l'extrémité (+) des microtubules. Les dynéines se déplacent vers l'extrémité (-).

Les kinésines ont en commun un domaine moteur conservé responsable de leur liaison aux microtubules et de l'hydrolyse de l'ATP. Une nomenclature standardisée (tableau 3) permet de distinguer 14 familles de kinésines suivant leur groupe phylogénétique (Lawrence et al. 2004).

Nom standardisé	Membres représentatifs	Fonctions communes et caractéristiques spécifiques	Nombre de représentants				
			Hu	Dr	Ce	Ar	Di
Kinésine 1	KIF5B, KHC, NKin, DdK3, DdK5	Transport vésiculaire, kinésine conventionnelle	3	1	1	4	3
Kinésine 2	KIF3A/3B, KIF17, Krp85/95, Osm3, Fla10	Transport vésiculaire au sein du flagelle, kinésine hétérotrimérique	4	3	3	0	0
Kinésine 3	KIF1A, KIF1B, KIF13A, UNC104, DdUnc104	Transport d'organelles, kinésine monomérique	8	4	2	0	1
Kinésine 4	KIF4A, FIF21A/B, Xklp1, Chromokinésine	Transport d'organelles, mouvement des chromosomes	5	3	2	3	1
Kinésine 5	KIF11, Eg5, BimC, Cin18, Kip1, Cut7	Formation du fuseau, homotétramère, mouvement bipolaire	1	1	1	4	0
Kinésine 6	KIF20, KIF23, Rab6Kinesin, CHO1, MKLP1	Cytocinèse, polarité du fuseau	5	2	1	0	1
Kinésine 7	KIF10, CENP-E, CMET, CANA, KIP2	Capture des microtubules kinétochoriens	1	2	0	14	2
Kinésine 8	KIF18B, KIF19A, KLP67A, KIP3	Migration du noyau, transport mitochondrial	3	2	1	2	0
Kinésine 9	CrKLP1, KIF6, KIF9, KRP3	Indéterminé	2	0	0	0	0
Kinésine 10	KIF22, KID, Xkid, Nod	Ségrégation des chromosomes, possède un motif de liaison à l'ADN	1	1	0	1	0
Kinésine 11	KIF26A, KIF26B, VAB8, SMY1	Transduction de signal, coeurs catalytiques divergents	2	1	1	2	0
Kinésine 12	KIF12, KIF15, HKLP2, KLP54D, Xklp2, PAKRPd	Transport d'organelles, domaines C-terminaux homologues	2	1	0	6	0
Kinésine 13	KIF2A, MCAK, XKMC1, KinI	Dépolymérisation des microtubules, moteur central	4	3	2	1	1
Kinésine 14A	KIFC1, CHO2, Ncd, Kar3, KatA	Ségrégation des chromosomes, moteur C-terminal	1	1	4	4	1
Kinésine 14B	KIFC2, KIFC3, KatD, KCBP, KIF25	Transport d'organelles, Moteur C-terminal	3	0	1	16	0
Orphans	CeKLP10, CeKLP18, DdK9		0	0	2	2	1
			Total : 45 25 21 59 11				
			Total publié par (Miki et al. 2005) : 45 25 19 60 10				

Tableau 3 : Nomenclature standardisée regroupant les membres de la superfamille des kinésines. A droite Figure le nombre de représentants chez l'humain (Hu), la drosophile (Dr), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Arabidopsis* (Ar) et *Dictyostelium* (Di). D'après (Miki et al. 2005).

Parmi les kinésines intervenant dans l'assemblage du fuseau mitotique, certaines interagissent avec le centrosome (Xklp2, une kinésine 12) ou les chromosomes (Xklp1, une kinésine 4). Les protéines de la famille des kinésines 5 comme BimC ou Eg5, sont des tétramères avec deux paires de domaines moteurs à chaque extrémité. Ces protéines sont capables de ponter

deux microtubules et de les déplacer l'un par rapport à l'autre en rapprochant leurs extrémités (+). Les kinésines de type 14 possèdent un domaine moteur dans leur partie C-terminale, qui leur permet de se déplacer vers l'extrémité (-) des microtubules. La majorité d'entre elles sont également capables de s'associer aux microtubules grâce à un domaine de liaison N-terminal permettant de les ponter et de les déplacer l'un par rapport à l'autre. Elles sont essentielles à l'organisation et au fonctionnement du fuseau (Goshima et Vale 2003; Xiang et Plamann 2003; Zhu et al. 2005). Elles permettent de focaliser les pôles du fuseau et de faire glisser entre eux les microtubules antiparallèles interpolaire. La kinésine NCD (pour NonClaret Disjunctional) est le premier membre de cette famille à avoir été identifié. La perte de fonction du gène provoque chez la drosophile l'élargissement des pôles du fuseau et la non-disjonction des chromosomes (Hatsumi et Endow 1992; Matthies et al. 1996).

La dynéine cytoplasmique est un large complexe protéique formé de deux chaînes lourdes qui contiennent chacune un domaine moteur, associées à deux chaînes légères et des chaînes intermédiaires. Au cours de la mitose, la dynéine intervient notamment dans la formation des deux pôles du fuseau, une fonction qui nécessite son interaction avec d'autres protéines comme le complexe de dynactines. Aucun homologue de chaîne lourde de dynéine n'a été trouvé dans le génome d'*Arabidopsis*, suggérant que des kinésines non conventionnelles, se déplaçant vers l'extrémité (-), sont à l'origine de ce type de mouvements chez les plantes supérieures.

Le cycle de division cellulaire

Le cycle de division cellulaire (cycle cellulaire) est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne naissance à 2 cellules filles identiques entre elles et à celle dont elles dérivent. Chez les organismes unicellulaires, chaque cycle de division produit deux nouveaux individus. Chez les organismes multicellulaires, le zygote subit de nombreux cycles avant d'aboutir à la formation d'un nouvel organisme. Des divisions cellulaires sont également nécessaires pour renouveler les cellules mortes et maintenir l'intégrité de l'organisme.

Le cycle cellulaire se subdivise en phases au cours desquelles les chromosomes vont être répliqués en deux copies identiques puis répartis équitablement dans les deux cellules filles (Tableau 4). Ce processus est largement dépendant de la dynamique du réseau de microtubules.

Interphase	G1 (Growth 1 ou Gap 1)	La cellule croît jusqu'à atteindre un volume final défini et effectue les fonctions pour lesquelles elle est programmée.
	S (Synthesis)	Le matériel génétique se réplique et, s'il est présent, le centrosome se duplique.
	G2 (Growth 2 ou Gap 2)	Chaque chromosome est présent en deux copies parfaitement identiques.
Mitose	Prophase	La chromatine, diffuse en interphase, se condense en chromosomes. Le cytosquelette microtubulaire interphasique se désassemble et un pré-fuseau (prospindle) se met en place.
	Prométaphase	L'enveloppe nucléaire se rompt. Les microtubules pénètrent dans le noyau et participent à la formation du fuseau mitotique. Des complexes protéiques spécialisés appelés kinétochores se forment au niveau des régions centromériques de chaque chromosome et capturent quelques microtubules. Les chromosomes oscillent entre les pôles jusqu'à atteindre un équilibre de forces entre les 2 fibres kinétochoriennes des chromatides soeurs reliant les pôles opposés.
	Métaphase	Des fibres microtubulaires kinétochoriennes relient chaque chromosome aux pôles opposés du fuseau bipolaire. Les chromosomes s'alignent sur un même plan appelé plaque métaphasique.
	Anaphase	L'anaphase débute par une séparation synchrone des chromatides soeurs au niveau des kinétochores et leur ascension vers les pôles opposés du fuseau (anaphase A). Des microtubules interpolaire s'allongent, renforçant la séparation des chromosomes (anaphase B).
	Télophase	L'enveloppe nucléaire se reforme autour de chaque groupe de chromatides. Des microtubules polymérisés à l'équateur et des filaments d'actine participent à la séparation des deux cellules filles (midbody et phragmoplaste).
Cytocinèse		Un mécanisme centripète (constriction) ou centrifuge (fusion de vésicules golgiennes du phragmoplaste) permet la séparation des deux cellules filles.

Tableau 4 : Etapes du cycle cellulaire et fonctions du cytosquelette associées à la ségrégation du génome et la cytokinèse.

Le fuseau mitotique animal

Les microtubules jouent un rôle essentiel lors de la division cellulaire. Leur organisation se modifie en début de mitose pour former un fuseau bipolaire complexe et dynamique. Le fuseau est constitué de deux réseaux de microtubules symétriques et antiparallèles associés à de nombreuses autres protéines régulatrices. Certaines vont agir en amont de la formation du fuseau, en stimulant la nucléation notamment. D'autres vont permettre d'organiser les microtubules en un fuseau bien structuré et de le stabiliser.

Anatomie et étapes d'assemblage

Dans les cellules somatiques animales (Figure 16), l'assemblage du fuseau est orchestré par un centre organisateur, le centrosome, qui se duplique au cours de l'interphase. La réplication complète du matériel génétique conduit à la condensation des chromosomes.

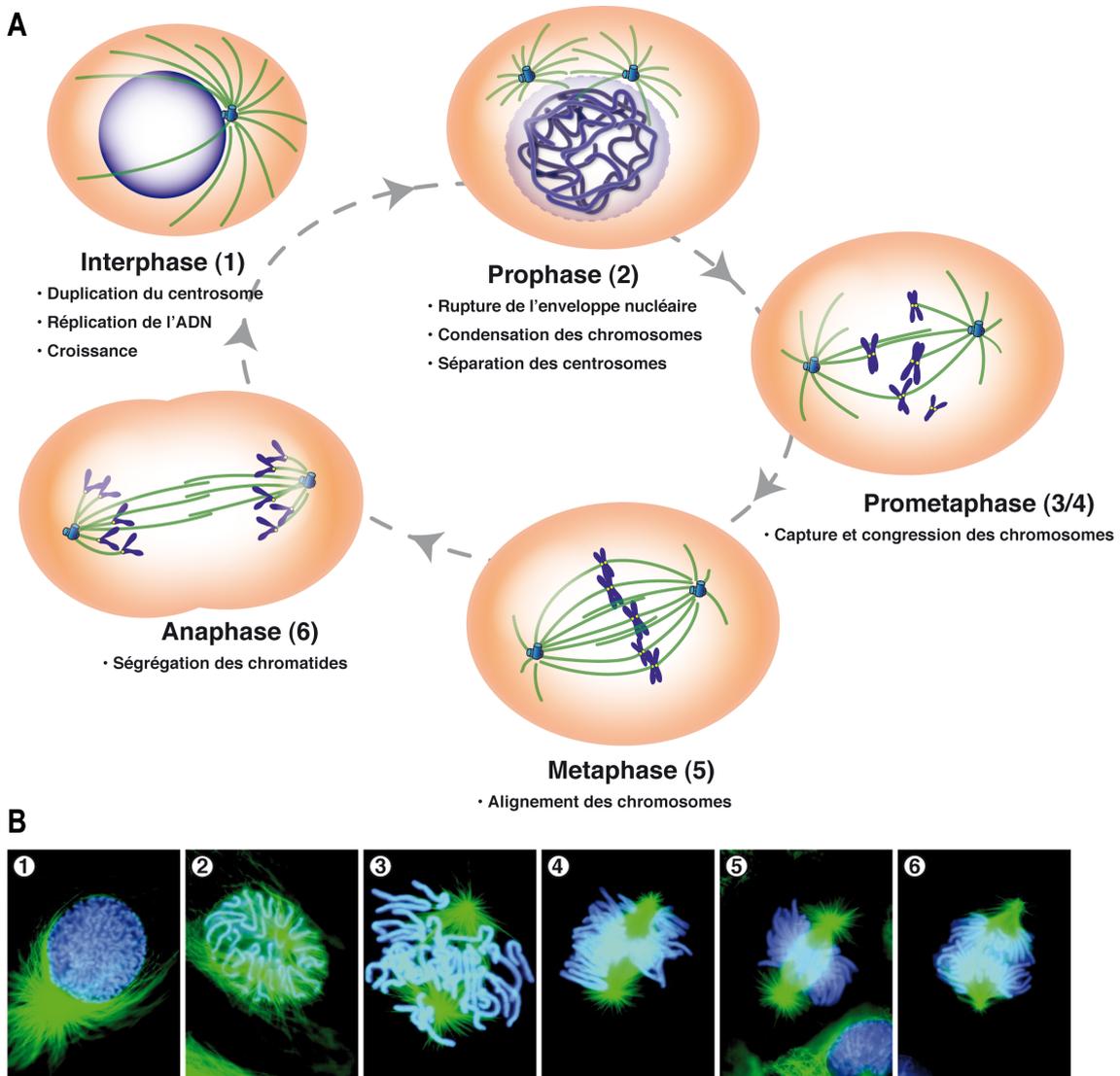


Figure 16 : Dynamique des microtubules au cours de la division d'une cellule somatique animale. A et B : Représentation schématisée (A) et images obtenues en microscopie à fluorescence (B) illustrant la dynamique du réseau de microtubules (vert) et des chromosomes (bleu) au cours du cycle cellulaire. Les numéros figurant entre parenthèses sur le schéma correspondent à ceux associés aux images de microscopie.

Les centrosomes migrent alors de part et d'autre du noyau et initient de longs microtubules astraux. Puis l'activité de nucléation des centrosomes augmente, multipliant le nombre de microtubules. Dans un même temps, l'augmentation du taux de catastrophe et la diminution du taux de sauvetage contribuent au démantèlement du réseau interphasique et au raccourcissement des microtubules astraux.

La migration d'un des centrosomes à l'opposé du premier initie la formation d'un fuseau bipolaire. L'enveloppe nucléaire se rompt et quelques microtubules s'attachent aux kinétochores des chromatides soeurs. Leur extrémité (+) est orientée vers les chromosomes et leur extrémité (-) est focalisée aux pôles, au niveau des centrosomes. Le réseau devient plus dense et forme un fuseau bipolaire caractéristique. Les forces appliquées de chaque côté des chromosomes par les microtubules kinétochoriens vont induire leur congression puis leur alignement au centre du fuseau.

En plus des microtubules kinétochoriens, le fuseau contient également des microtubules interpolaire qui partent des pôles et s'entrecroisent dans la région centrale du fuseau, et des microtubules astraux qui vont interagir avec le cortex cellulaire (Figure 17). Les chromosomes forment alors la «plaque métaphasique», à l'équateur de la cellule.

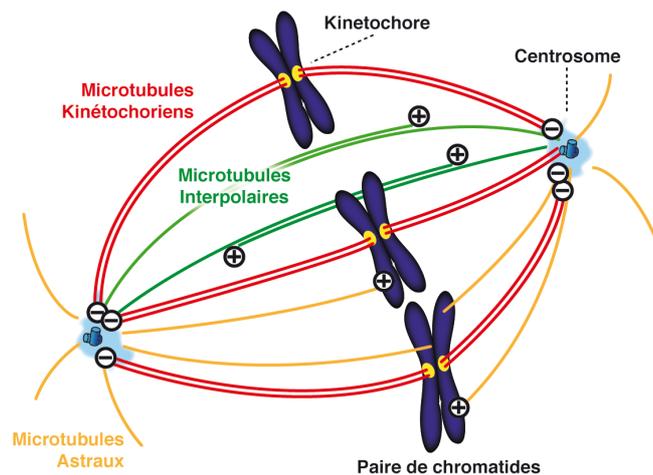


Figure 17 : Différents types de microtubules composent le fuseau mitotique. Ils se différencient par les protéines ou complexes avec lesquels ils interagissent.

A ce stade, la cellule passe un point de contrôle d'attachement des fibres kinétochoriennes. Ce point de contrôle mitotique régule l'activation du complexe APC/cdc20, E3 ubiquitine ligase impliquée dans l'ubiquitination de la sécurine avant sa dégradation par le protéasome. Tant qu'un seul kinétochore n'est pas associé à des microtubules, Mad2 y séquestre cdc20. Des kinases des familles Bub, Polo-like kinase (Plk1) et Aurora régulent l'interaction Mad2/cdc20 et libèrent cdc20 dès complétion du fuseau. Le complexe APC/cdc20 se forme et est lui-même activé par phosphorylation par le complexe CDK1/cycline B. La dégradation de la sécurine libère la séparase. Cette enzyme est activée par phosphorylation par CDK1/cycline B puis dégrade la cohésine phosphorylée sur sa sous-unité Scc1 par la kinase Plk1, libérant ainsi les chromatides soeurs. La cellule entre alors en anaphase. Les chromatides soeurs migrent vers les pôles opposés du fuseau.

Recherche et capture des kinétochores

Différents modèles d'assemblage du fuseau sont décrits dans la littérature. Dans un premier modèle appelé «recherche et capture», les microtubules nucléés au niveau des centrosomes alternent des phases de croissance et dépolymérisation dans toutes les directions, explorant l'espace cellulaire (Figure 18A). Une fois capturés par les kinétochores, ils se stabilisent et guident les autres microtubules.

Dans ce modèle, les chromosomes jouent un rôle passif et l'assemblage du fuseau repose intégralement sur la dynamique des microtubules. Les centrosomes sont les seuls centres organisateurs. Ce modèle d'assemblage ne peut pas être généralisé du fait de l'existence de fuseaux acentrosomaux.

Importance de la chromatine

De nombreuses expériences réalisées *in vitro* ont mis en évidence l'existence de mécanismes d'assemblage et d'organisation des microtubules dépendant de la chromatine. L'injection de noyaux dans des œufs de xénope, naturellement dépourvus de centrosome, stimule la nucléation de microtubules autour de la chromatine condensée (Karsenti et al. 1984). Des chromosomes bivalents placés dans le cytoplasme de spermatocytes de drosophile induisent la formation de mini fuseaux de microtubules (Church et al. 1986). Par ailleurs, l'ajout de billes enrobées de chromatine entraîne la formation de microtubules mimant un fuseau dans des extraits d'œufs de xénope (Heald et al. 1996).

Ces données montrent que la formation du fuseau est possible en l'absence de kinétochore et de centrosome. La capture et la stabilisation des microtubules par les kinétochores n'est donc pas la seule voie d'assemblage du fuseau mitotique ou méiotique.

Stabilisation locale autour de la chromatine

Un deuxième modèle, appelé «stabilisation locale», a été élaboré sur la base de ces observations et complète le modèle «recherche et capture» décrit précédemment. Ce modèle propose que la chromatine modifie la nature du cytoplasme alentour et induit une stabilisation locale de l'extrémité (+) des microtubules (Hyman et Karsenti 1996). Cette propriété favoriserait la croissance des microtubules centrosomaux ou astériens en direction des chromosomes. De nombreux résultats expérimentaux confortent cette idée. Des expériences réalisées *in vitro* montrent que le taux de sauvetage des microtubules augmente à proximité de la chromatine, alors que le taux de catastrophe est corrélé avec la longueur des microtubules en provenance du centrosome (Dogterom et al. 1996). La chromatine semble donc annuler l'effet déstabilisateur du cytoplasme, favorisant ainsi une croissance orientée des microtubules.

Assemblage périchromosomique et polarisation par des moteurs protéiques

La modulation des propriétés dynamiques des microtubules n'est cependant pas suffisante pour expliquer la formation et la stabilisation d'un fuseau bipolaire. Dans les oocytes de xénope, les microtubules sont nucléés de manière aléatoire autour de la chromatine (Figure 18B). Des moteurs protéiques associés aux microtubules vont permettre leur organisation en un fuseau bipolaire. Des kinésines tétramériques de type BimC/Eg5 induisent la formation de faisceaux de microtubules et les réarrangent en un réseau ordonné et antiparallèle, centré sur la chromatine (Sawin et al. 1992; Sharp et al. 1999). La kinésine Xklp1, liée à la chromatine, repousse l'extrémité (-) des microtubules vers le cortex. Son action conduit à la formation d'un lot

de microtubules orientés (Vernos et al. 1995). La dynéine va permettre la focalisation des extrémités (-) des microtubules en deux pôles opposés (Sawin et Endow 1993; Heald et al. 1996). Une combinaison de forces motrices opposées est donc à l'origine de la morphogénèse du fuseau. Ce mécanisme d'assemblage n'est pas limité aux cellules dépourvues de centrosomes. Dans les cellules somatiques de vertébrés, le fuseau mitotique s'assemble correctement après l'ablation par impulsion laser ou par microchirurgie des centrosomes (Khodjakov et al. 2000; Hinchcliffe et al. 2001). Il est également vraisemblable que les deux modèles de nucléation microtubulaire puissent coexister dans une même cellule (Figure 18C).

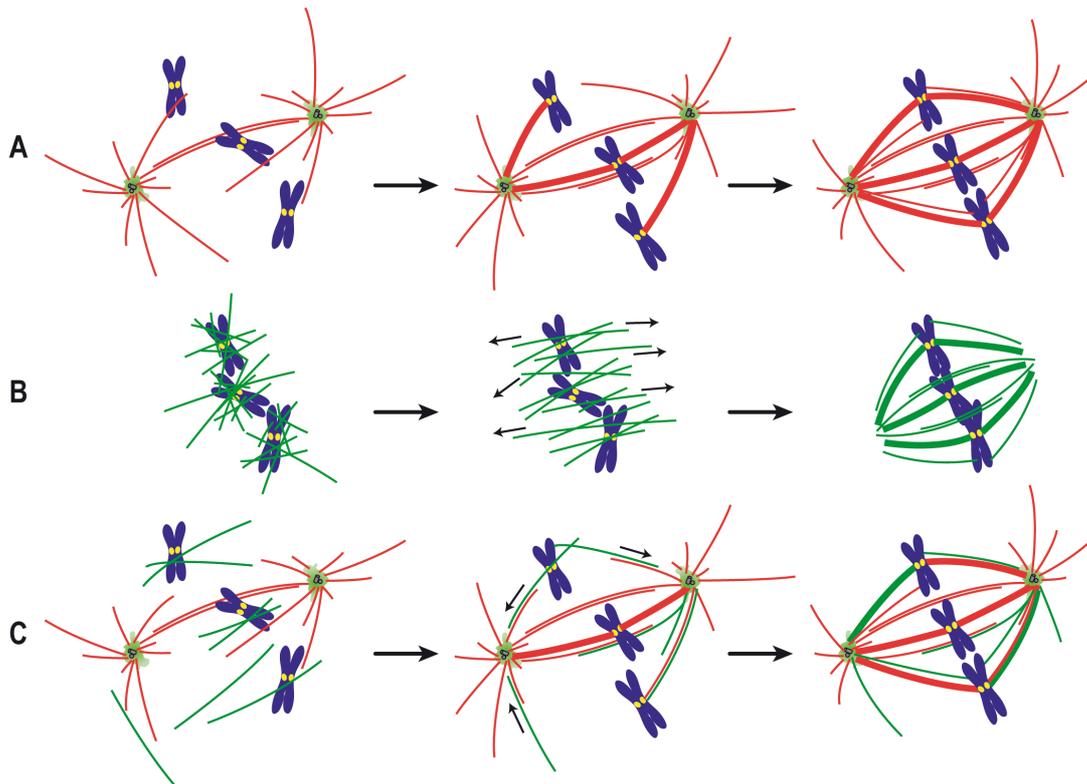


Figure 18 : Modèles d'assemblage du fuseau mitotique animal. A : Mécanisme de recherche et capture des kinétochores par les microtubules nucléés au niveau des centrosomes. **B :** Mécanisme d'autoassemblage des microtubules nucléés autour de la chromatine. **C :** Combinaison des deux mécanismes. Les microtubules nucléés au niveau des centrosomes apparaissent en rouge, ceux en provenance de la chromatine en vert. Adapté de (Walczak et Heald 2008).

Activités motrices liées à la ségrégation du génome

D'importants changements dans la balance des forces motrices contribuent à la ségrégation des chromosomes en anaphase et à l'écartement des pôles (Figure 19).

La séparation des chromatides se traduit par un raccourcissement des microtubules kinétochoriens. Des forces de traction appliquées au kinétochore entraînent chaque chromatide soeur vers les pôles opposés du fuseau. De nombreux moteurs à orientation (+) sont capables de générer des mouvements entre les microtubules antiparallèles et pourraient être impliqués dans le mouvement d'écartement des pôles fusoriaux (anaphase B).

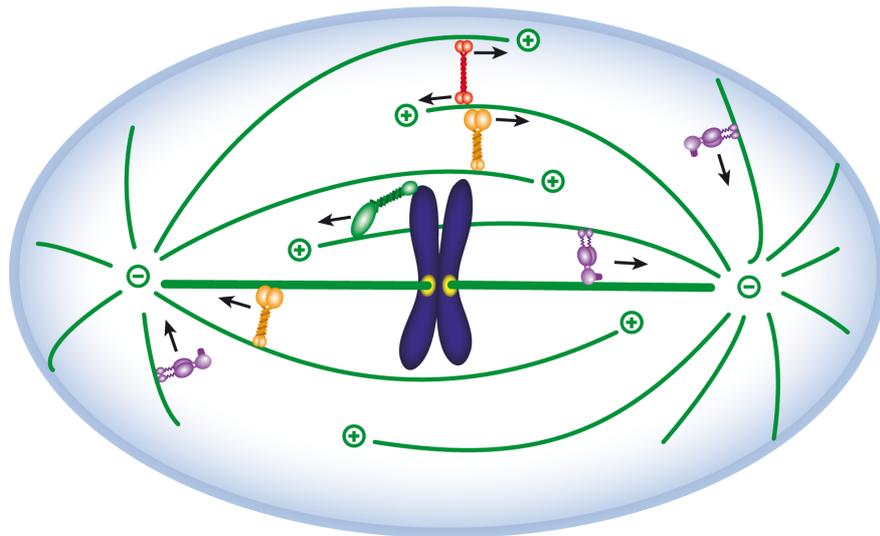


Figure 19 : Activités motrices participant à la formation et au fonctionnement du fuseau. Des moteurs protéiques à orientation (+) (en rouge), et orientation (-) (en orange), permettent aux microtubules interpolaire antiparallèles d'interagir et de coulisser les uns par rapport aux autres, éloignant les pôles l'un de l'autre. La dynéine cytoplasmique (violet) permet de repousser les microtubules astraux et de focaliser les extrémités (-) aux pôles. Des chromokinésines (vert) induisent le mouvement des chromosomes vers l'extrémité (+) des microtubules.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Dans un premier modèle, les microtubules dépolymérisent à leur extrémité (-) tout en restant ancrés aux pôles. Il en résulte une force de traction qui entraîne les chromatides vers les pôles du fuseau (Figure 20 A). Dans un deuxième modèle appelé «pacman» (Figure 20 B), il est proposé que les kinétochores induisent une dépolymérisation des fibres tout en restant attachés aux microtubules, «grignotant» ainsi l'extrémité (+) des polymères en direction de l'extrémité (-). Ces modèles ne sont pas mutuellement exclusifs ; en effet, différentes techniques de marquage des microtubules et des kinétochores ont montré que, chez le xénope et la drosophile, les deux mécanismes fonctionnaient de concert pour dépolymériser les microtubules kinétochoriens.

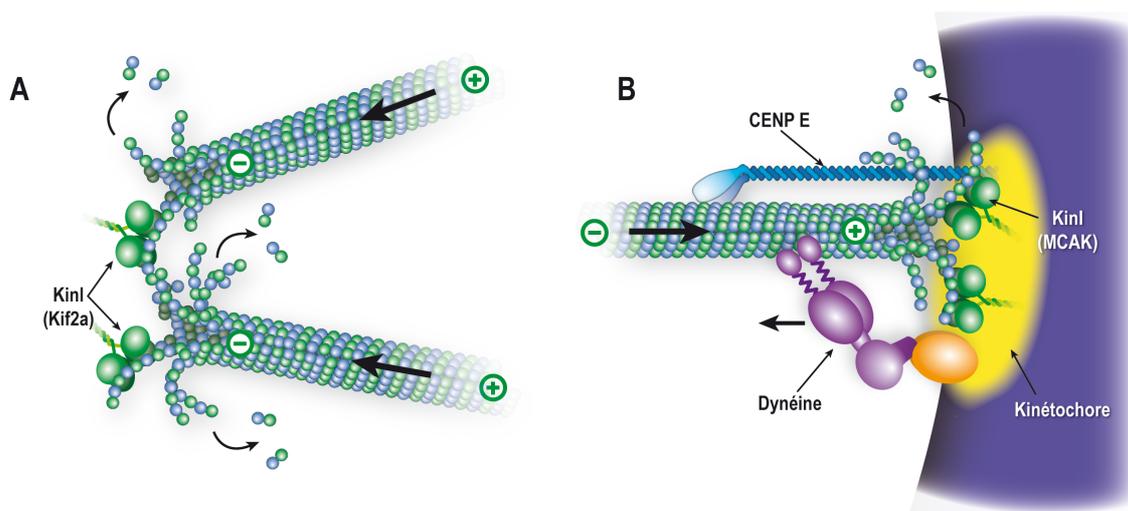


Figure 20 : Forces motrices associées à la dépolymérisation des microtubules kinétochoriens. **A :** Dépolymérisation de l'extrémité (-) des microtubules dépendante de l'activité de kinésines déstabilisatrices de la famille KinI. **B :** Dépolymérisation de l'extrémité (+), au niveau du kinétochore, par l'action conjointe de la dynéine qui va tirer le microtubule et d'une kinésine de type KinI qui va induire sa dépolymérisation. Le moteur à orientation (+) CENPE est également représenté.

MAPs impliquées dans la dynamique des microtubules fusoriaux

Comme évoqué précédemment (page 24), de nombreuses MAPs motrices participent également à la régulation de la dynamique du fuseau (Figure 21). Des MAPs structurales (MAP1, MAP4, etc.) aident à la stabilisation du fuseau. Des +TIPs, telles que EB1 ou CLIP170, participent à la croissance ou au raccourcissement des microtubules. En association avec d'autres protéines (Adenomatous Polyposis Coli, CLASPs, etc.), elles pourraient servir d'ancrage à l'extrémité (+) des microtubules kinétochoriens, ou de ceux associés au cortex (Schuyler et Pellman 2001). La Katanine serait capable de libérer les microtubules en les coupant à proximité du centrosome, permettant la nucléation de nouveaux polymères (Baas et al. 2005). Ce mécanisme permettrait entre autre d'augmenter le nombre de microtubules émanant du centrosome en début de division (McNally et al. 2006). Les kinésines déstabilisatrices de la famille de KinI, telles que XKCM1 et MCAK, participent à la dépolymérisation des microtubules au niveau des kinétochores et des pôles du fuseau en déformant la structure des polymères (Walczak 2003). Leur action est contrecarrée par ch-TOG/XMAP215, qui stabilise le fuseau et stimule la polymérisation des microtubules (Gergely et al. 2003).

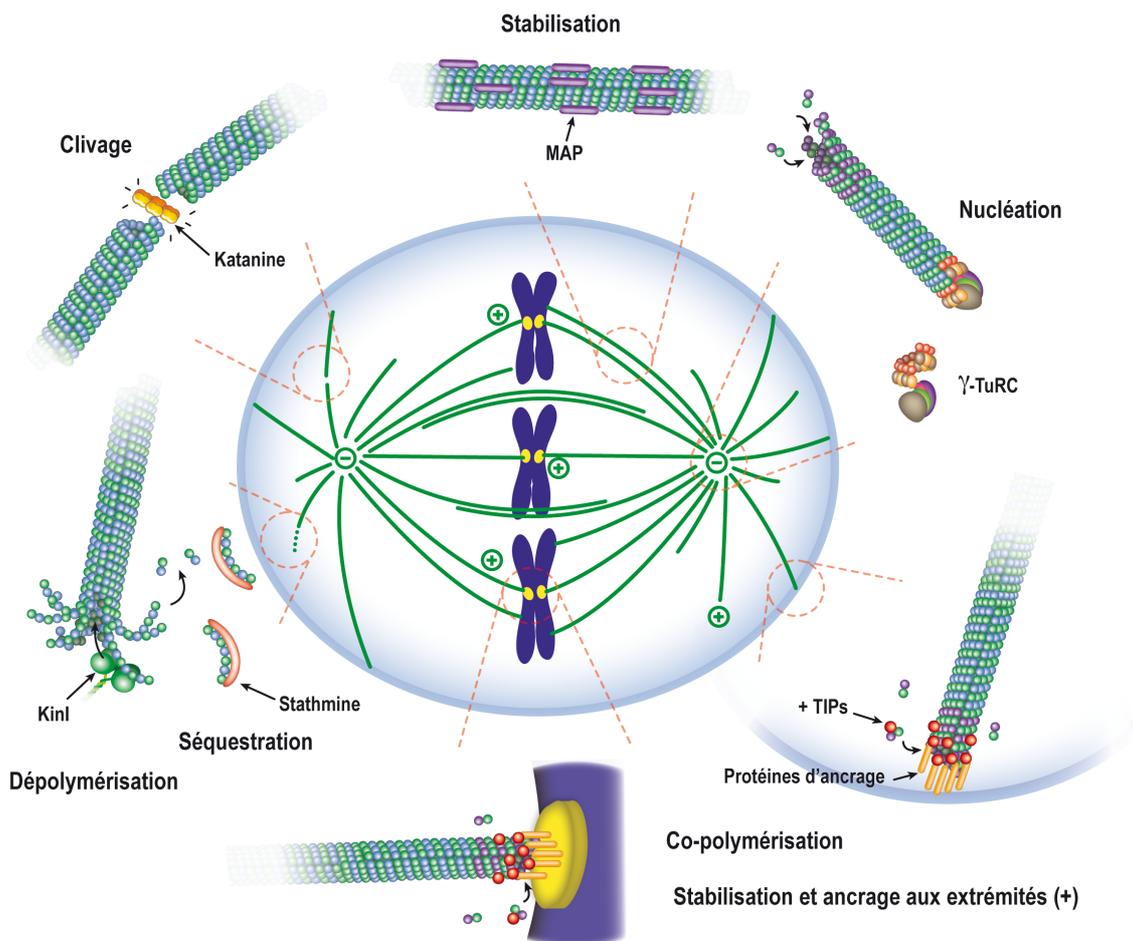


Figure 21 : Régulation de la dynamique des microtubules fusoriaux. La dynamique des microtubules qui composent le fuseau est régulée par différentes classes de protéines impliquées dans la nucléation (γ -Tubulin Ring Complexes), leur capture (MAPs (+) et leurs partenaires), leur stabilisation (MAPs) ou déstabilisation (Kinésines de type KinI et stathmine) et leur sectionnement (Katanine).

Ces observations suggèrent qu'une multitude de mécanismes agissent de concert pour former correctement le fuseau de division. L'activation des facteurs impliqués dans la nucléation et l'assemblage du fuseau est finement régulée par des voies de régulation complexes. Des gradients de signalisation générés autour de la chromatine contrôlent ces cascades d'activation.

Gradient de phosphorylation

La phosphorylation est un mode majeur de régulation de l'activité des protéines. De nombreuses kinases dont l'activité est régulée au cours du cycle cellulaire contrôlent différents aspects de l'assemblage du fuseau. Il a été proposé que des gradients de phosphorylation autour de la chromatine pourraient réguler la dynamique des microtubules.

Des études récentes ont montré que l'inhibition de la stathmine en début de mitose est régulée par une activité localisée de la kinase chromosomique Plk1. L'inhibition de sa phosphorylation provoque des perturbations majeures de l'assemblage du fuseau (Andersen 2000; Budde et al. 2001; Sumara et al. 2004). Un gradient de stathmine phosphorylée autour des chromosomes a pu être visualisé dans des extraits mitotiques d'œuf de xénope (Niethammer et al. 2004).

Un gradient de phosphorylation généré par la kinase Aurora B, ayant pour origine la zone centrale du fuseau mitotique, est également observé en début d'anaphase sur cellules HeLa (Fuller et al. 2008). Des données récentes montrent également que Plk1 et Aurora A régulent de manière antagoniste l'activité et la localisation de KIF2a, une kinésine déstabilisatrice de la famille de KinI (Jang et al. 2009).

Voies de signalisation impliquant Ran-GTP

Ran appartient à la superfamille des protéines Ras (Rho, Rac, Cdc42...), de petites GTPases impliquées dans la régulation de nombreux processus physiologiques tels que la croissance cellulaire, le transport nucléo-cytoplasmique ou l'assemblage du cytosquelette.

Mode d'action des Ras-GTPases

Ces GTPases sont soit liées à une molécule de GTP, soit une molécule de GDP. L'hydrolyse intrinsèque du GTP, très lente, est accélérée par deux autres enzymes : une « GTPase activating protein » (GAP, ou RanGAP pour Ran) qui va hydrolyser le GTP et un « Guanine-nucleotide Exchange Factor » (GEF, ou RCC1 pour Ran) qui va échanger le GDP en GTP. La forme active, associée au GTP, va interagir avec des effecteurs protéiques et activer spécifiquement certains processus cellulaires.

Rôle de Ran en interphase

Ran joue un rôle essentiel dans le transport directionnel de macromolécules entre le noyau et le cytoplasme (Figure 22). Elle interagit avec des karyophérines, des récepteurs capables de transporter des protéines cargo du cytoplasme vers le noyau (importines) ou du noyau vers le cytoplasme (exportines) au travers des pores nucléaires. Ces protéines vont reconnaître des séquences spécifiques présentes sur les protéines cargo. Les importines s'associent à des séquences riches en acides aminés basiques comme la lysine et l'arginine formant des signaux de localisation nucléaire (Nuclear Localization Signal ou NLS) alors que les exportines recon-

naissent des séquences hydrophobes souvent riches en leucine constituant des signaux d'export nucléaire (Nuclear Export Signal ou NES).

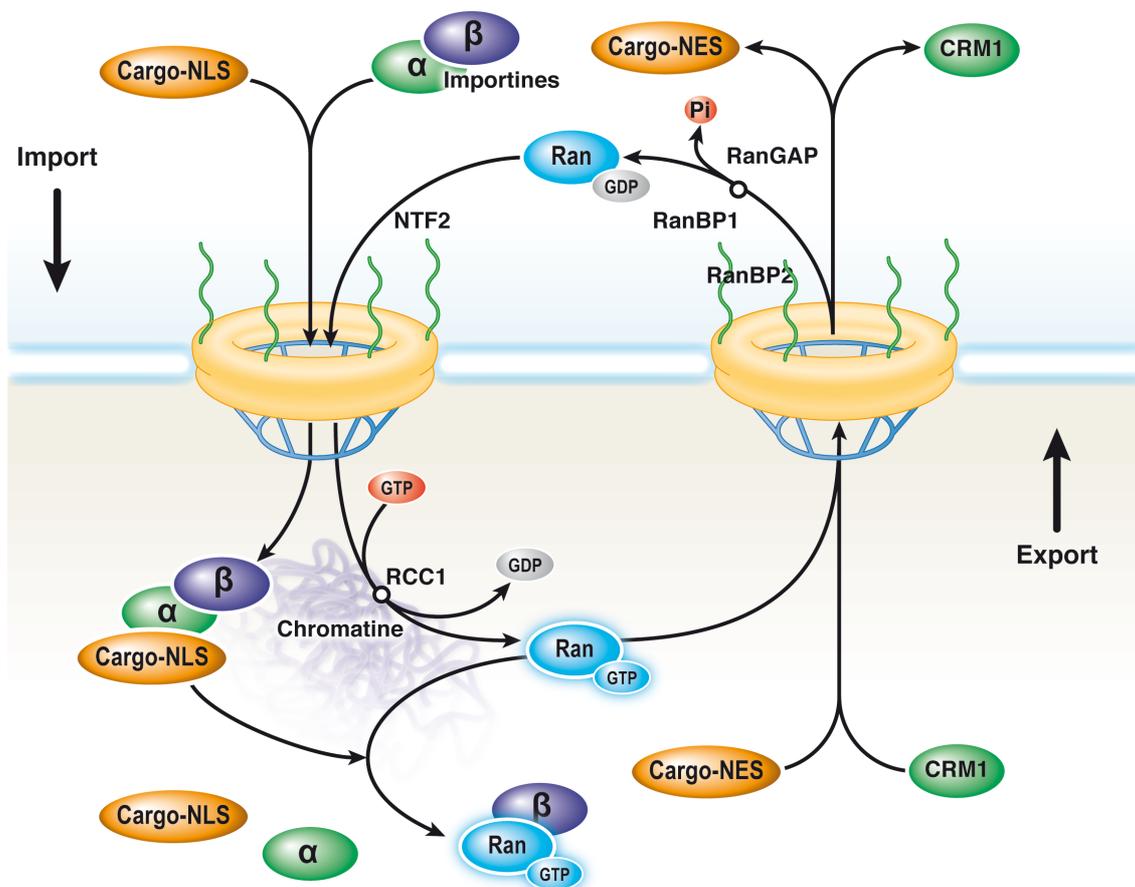


Figure 22 : Implication de Ran dans les échanges nucléo-cytoplasmiques en interphase. Ran navigue entre le noyau et le cytoplasme au travers des pores nucléaires. RanGDP est importée dans le noyau par NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) puis est convertie en RanGTP par RCC1, un facteur d'échange associé à la chromatine. RanGTP entraîne la libération de protéines à NLS véhiculées par les importines en s'associant à l'importine β. RanGTP peut également s'associer à CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1) et promouvoir ainsi la formation de complexes d'export avec des protéines à NES. L'hydrolyse de RanGTP dans le cytoplasme par RanGAP, assistée par RanBP1 ou 2, entraîne la dissociation des complexes d'export. Adapté de (Clarke et Zhang 2008)

Le facteur d'échange RCC1, associé à la chromatine, va catalyser la formation de RanGTP. La présence de GTP va modifier la conformation de Ran, qui va devenir plus affine pour l'importine β, libérant ainsi les protéines à NLS qui y sont associées. RanGTP va également promouvoir la formation de complexes d'export en modifiant la conformation de l'exportine CRM1 (Chromosomal Region Maintenance 1), favorisant son association avec des protéines à NES. Une fois exportée dans le cytoplasme, RanGTP se dissocie du complexe d'export puis est hydrolysée en RanGDP par RanGAP. RanGTP est ensuite réimportée dans le noyau par l'intermédiaire de NTF2 (Nuclear Transport Factor 2).

RanGTP peut également s'associer aux karyophérines dans le cytoplasme. Cette interaction protège RanGTP de son hydrolyse par RanGAP jusqu'à ce qu'elle se lie à RanBP1 ou RanBP2 (également appelée Nucléoporine 358 ou Nup358). RanBP1 est majoritairement cytoplasmique alors que RanBP2 est localisée du côté cytoplasmique des pores nucléaires. Ces protéines, qui contiennent des motifs RBD (Ran Binding Domain), vont dissocier RanGTP des karyophérines et la présenter à RanGAP, stimulant ainsi l'hydrolyse du GTP. La libération du GTP de Ran est également possible dans le noyau par l'intermédiaire du facteur d'échange Mog1 (Steggerda et Paschal 2000).

La formation de RanGTP au niveau de la chromatine et son hydrolyse dans le cytoplasme créent un gradient de concentration qui contrôle les échanges nucléo-cytoplasmiques en interphase.

RanGTP en mitose

Des études récentes ont montré que RanGTP joue un rôle essentiel en mitose, en activant sélectivement des protéines cargo impliquées dans l'assemblage du fuseau (Figure 23). Les mécanismes par lesquels RanGTP active ces facteurs sont similaires à ceux mis en jeu dans le transport nucléo-cytoplasmique. Des expériences réalisées sur des extraits d'œufs de xénope en phase M ont montré que RanGTP stimule la formation du fuseau en libérant des protéines cargos associées aux importines (Gruss et al. 2001; Nachury et al. 2001; Wiese et al. 2001). Son rôle dans l'assemblage du fuseau a également été démontré *in vivo* (Askjaer et al. 2002; Bamba et al. 2002). Ran est également impliquée dans d'autres événements du cycle cellulaire tels que l'assemblage de l'enveloppe nucléaire en télophase (Hetzer et al. 2000; Zhang et Clarke 2001) ou le fonctionnement des kinétochores (Arnautov et Dasso 2003).

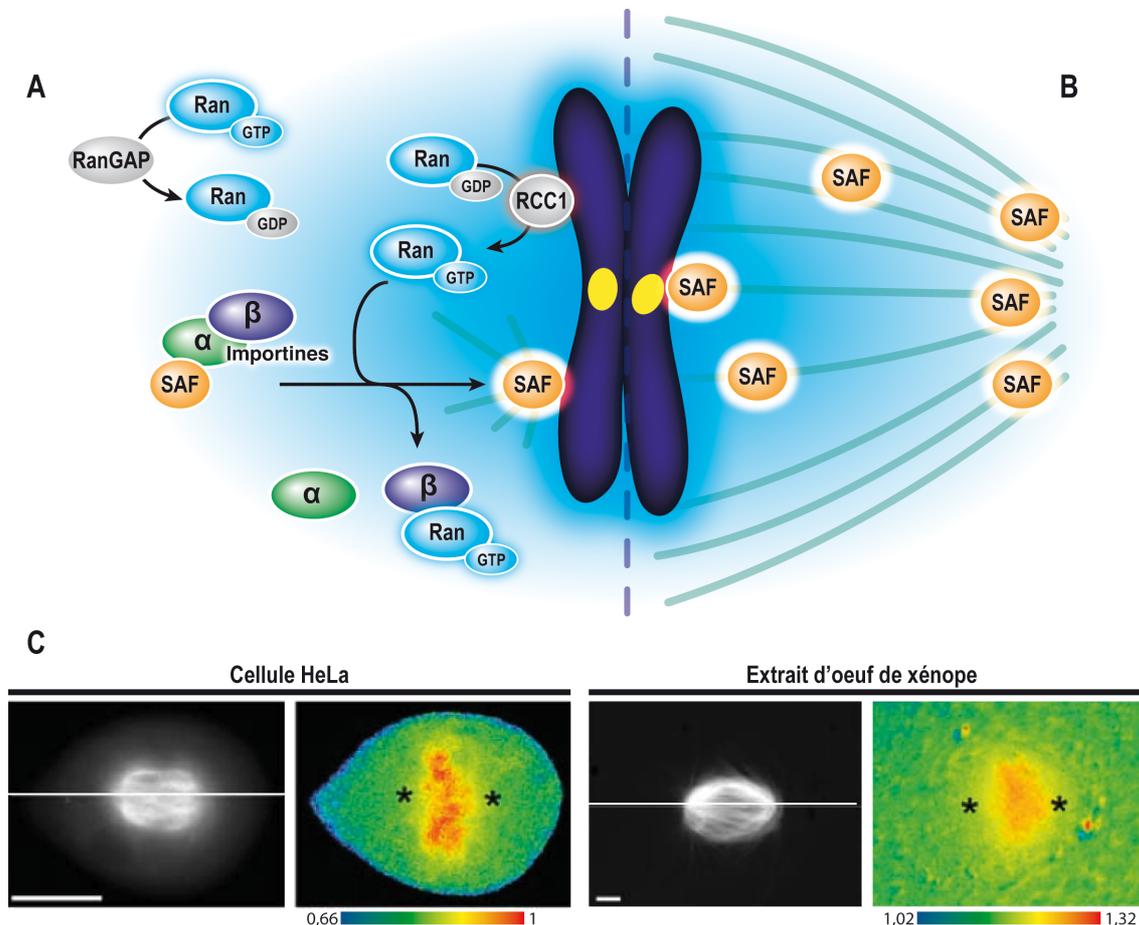


Figure 23 : Gradient de RanGTP généré autour de la chromatine. A et B : RanGTP, produit par RCC1 à proximité de la chromatine, est hydrolysée par RanGAP dans le cytoplasme. Il se forme un gradient de concentration (bleu ciel) de RanGTP. L'association de RanGTP à l'importine β libère le facteur d'assemblage (SAF pour « Spindle Assembly Factor ») qui y était associé. Ce facteur peut soit initier la nucléation de microtubules autour de la chromatine (A), soit participer à l'assemblage et l'organisation du fuseau (B). **C :** Visualisation du fuseau mitotique (en niveau de gris, à gauche) et du gradient d'importine libérée par RanGTP dans des cellules HeLa ou des extraits d'œufs de xénope (gradient bleu/vert/jaune/rouge, à droite). L'image en couleurs artificielles correspondant au signal de FRET émis par la sonde Rango lorsque celle-ci est libérée par RanGTP de l'importine β . Les astérisques correspondent aux centrosomes. L'axe de symétrie du fuseau est marqué par un trait blanc horizontal. Les plus fortes intensités de FRET correspondent à la position des chromosomes. La correspondance couleur-intensité du signal est figurée en dessous de l'image. D'après (Kaláb et al. 2006).

Gradient de RanGTP

En interphase, ces facteurs d'assemblage sont importés dans le noyau et s'accumulent sous une forme inactive, liée aux importines. Lorsque la cellule entre en mitose et que l'enveloppe nucléaire se rompt, le nucléoplasme et le cytoplasme se mélangent, diluant la forte concentration de RanGTP présente dans le noyau. Cependant, RCC1 continue à produire RanGTP autour de la chromatine, créant ainsi un gradient de concentration. Ce gradient permettrait un contrôle à distance de la chromatine sur des facteurs d'assemblage du fuseau. La forte concentration locale en RanGTP autour de la chromatine activerait des facteurs impliqués dans la nucléation, alors que de plus faibles concentrations pourraient stimuler d'autres facteurs impliqués dans l'élongation et la stabilisation des microtubules, ainsi que leur focalisation au niveau des pôles. L'existence de ce gradient a été confirmée dans des extraits d'œuf de xénope (Kalab et al. 2002; Kaláb et al. 2006) et dans des cellules somatiques (Li et Zheng 2004; Kaláb et al. 2006).

Action localisée de RanGTP

RanGTP pourrait également contrôler l'assemblage et la dissociation de complexes protéiques à des sites spécifiques de la cellule, comme les kinétochores, les centrosomes ou des zones spécifiques de la membrane plasmique. La localisation particulière de certains partenaires de RanGTP dans des cellules somatiques conforte ce modèle.

L'importine β est en effet retrouvée aux pôles du fuseau mitotique dans des cellules de mammifère en culture (Ciciarello et al. 2004). Sa surexpression provoque des défauts de localisation aux pôles du fuseau de protéines cargo régulées par RanGTP (Fan et al. 2007). L'importine β est également impliquée dans l'importation puis la localisation au niveau de la chromatine de la chromokinésine Kid, par l'intermédiaire de l'importine α (Trieselmann et al. 2003). L'association avec les importines inhibe la liaison de Kid aux microtubules. L'action localisée de RanGTP à la surface des chromosomes va libérer et activer la kinésine (Tahara et al. 2008).

L'importine β peut interagir directement avec les protéines cargo, ou par l'intermédiaire d'adaptateurs tel que l'importine α , l'importine 7 ou bien encore la nucléoporine Nup98. Nup98 stabilise l'interaction de l'importine β avec Rae1, un facteur d'export d'ARN messager (ARNm). Rae1 est essentiel à l'assemblage du fuseau mitotique. Il est associé à de grands complexes ribo-nucléo-protéiques capables de stabiliser les microtubules *in vitro*. Cette activité est régulée par RanGTP, l'importine β , et de manière surprenante, requiert également la présence d'ARNm (Blower et al. 2005).

Une fraction de RanBP1 est également retrouvée au niveau des centrosomes. La surexpression de RanBP1 induit la formation de fuseaux multipolaires en altérant notamment le fonctionnement des centrosomes, et la localisation de facteurs essentiels à l'organisation des pôles, comme la kinésine Eg5 (Di Fiore et al. 2003). L'extinction de RanBP1 par ARN interférence entrave l'entrée en mitose et provoque des défauts dans la ségrégation des chromosomes et dans la localisation de certaines protéines comme la cycline B1 et HURP (Hepatoma Up-Regulated Protein) (Tedeschi et al. 2007).

Des travaux récents montrent qu'une accumulation localisée de RanGTP, associée à une délocalisation de RanGAP1, permettent la nucléation de microtubules au niveau des kinétochores (Torosantucci et al. 2008).

Cibles de RanGTP

Le tableau 5 propose un récapitulatif des cibles régulées par RanGTP.

Cargo	Type de protéine	Transporteur	Interactions connues	Fonctions régulées par Ran
TPX2	MAP (fuseau)	Importine $\alpha 1 / \beta$	Microtubules, Xklp2, Aurora A, BRCA1, BARD1, RHAMM, Eg5, XMAP215, HURP, lamine B	Nucléation de microtubules, activation de la kinase Aurora A, liaison à la kinésine Eg5
NuSAP	MAP (fuseau)	Importine $\alpha 1 / \beta$ Importine 7	Chromosomes, Microtubules	Stabilisation des microtubules, liaison à la chromatine
NuMA	MAP (pôles du fuseau)	Importine $\alpha 1 / \beta$	Dynéine, BRCA1/BARD1, Rae1	Inconnue
Xnf7	MAP	Importine $\alpha 1 / \beta$	Microtubules, Anaphase Promoting Complex	Inconnue
HURP	MAP	Importine β	TPX2, Aurora-A, XMAP215, Eg5	contrôle de la dynamique des microtubules fusoriaux, stabilisation des fibres kinétochoriennes en diminuant leur turn over, bipolarisation du fuseau
Maskin (TACC, Alp7)	MAP (pôles du fuseau)	Importine β	XMAP215 (TOG), Aurora A, Rae1, TPX2, Eg5	Phosphorylation par Aurora-A, import nucléaire en mitose de Alp7 chez <i>S. pombe</i>
XCTK2	Kinésine (fuseau)	Importine $\alpha 1 / \beta$	Microtubules	Liaison aux microtubules
Kid	Chromo-kinésine	Importine $\alpha 1 / \beta$	Chromosomes, Microtubules	Liaison aux microtubules, association aux chromosomes
Lamine B	FI nucléaire	Importine $\alpha 1 / \beta$	Fuseau mitotique, NuMA, TPX2, Eg5, PAR	Association au fuseau mitotique
Rae1	Nucléoporine	Importine β , Nup98	RNP, Maskin, NuMa	Polymérisation des microtubules (indirecte)
CRB3-CLP1	Protéine membranaire	Importine β par un adaptateur	Inconnu	Adressage aux pôles du fuseau (dépendant de l'importine β)
RCC1	RanGEF	Importine $\alpha 3 / \beta$	Histones H2A et H2B, ADN, Ran	permet l'activation de Ran en RanGTP. Liaison aux histones
RanBP2 RanGAP-SUMO	Multifonction	Exportine 1	Kinétochores, complexe Nup107-Nup160	Formation des fibres kinétochoriennes
Cdk11	Kinase (cycline)	Importine α / β	Inconnu	Stabilisation des microtubules, interaction des kinétochores avec les microtubules
NPM1	Multifonction	Exportine 1	Centrosome	Intégrité du centrosome
Survivin	Facteur anti-apoptotique	Exportine 1	Aurora-B, INCENP	Recrutement de CPC, polymérisation des microtubules (indirecte)

Tableau 5 : Fonctions et interactions de protéines cargo régulées par RanGTP. En rouge Figurent les interactions directes protéine cargo/interactant. Adapté de (Kalab et Heald 2008).

TPX2 (Targeting Protein for Xklp2), une des cibles les mieux caractérisées de RanGTP, est capable à la fois de stimuler la nucléation des microtubules autour de la chromatine et d'interagir avec de nombreux partenaires afin d'organiser un fuseau bipolaire (Figure 24).

Rôle de TPX2

En interphase, TPX2 est importée dans le noyau et s'accumule sous une forme inactive, associée aux importines. Ce complexe est dissocié en début de mitose par RanGTP. Une fois libérée, TPX2 va contribuer à la nucléation de microtubules autour de la chromatine et participer à la formation du fuseau en régulant l'activité de nombreuses protéines.

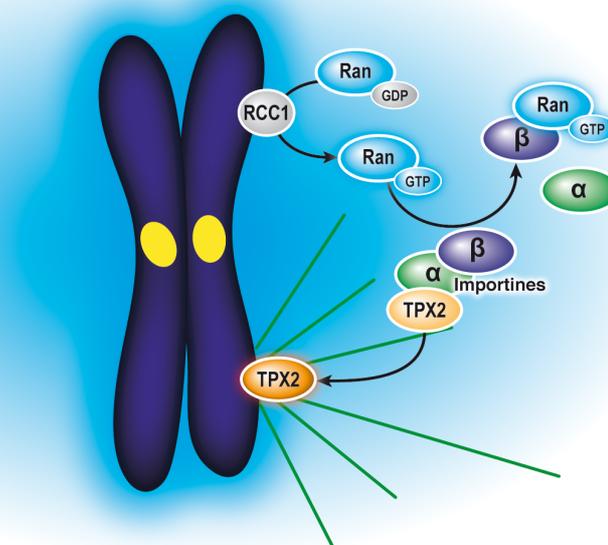


Figure 24 : Nucléation Ran-GTP-dépendante de microtubules autour de la chromatine par TPX2.

Découverte

TPX2 a tout d'abord été identifiée dans des cellules humaines en culture (L428) sous le nom de p100, une protéine d'environ 100 kDa localisée dans le noyau en interphase et sur le fuseau en mitose (Heidebrecht et al. 1997). TPX2 a ensuite été caractérisée comme partenaire de Xklp2 (Xenopus kinesin like protein 2), par son domaine C-terminal consensuel (PFAM06886). TPX2 permet l'interaction de l'extrémité C-terminale de Xklp2 avec les microtubules, ainsi que son association avec le complexe dynéine-dynactine, qui permet la localisation de la kinésine aux pôles du fuseau (Wittmann et al. 1998).

Activité de nucléatrice de TPX2

TPX2 est une MAP que l'on retrouve associée aux microtubules fusoriaux, que ce soit sur des fuseaux assemblés *in vitro* dans des extraits mitotiques de xénope, ou *in vivo* dans différents types cellulaires (Gruss et al. 2001; Garrett et al. 2002; Gruss et al. 2002). Cependant, elle n'agit pas uniquement en stabilisant les microtubules comme le font d'autres MAPs structurales, mais joue probablement un rôle dans les étapes précoces de nucléation par un mécanisme encore mal compris, peut-être associée aux γ -TuRCs.

L'ajout de TPX2 produit dans des bactéries à une solution de tubuline est suffisant pour initier la polymérisation de microtubules *in vitro*, une activité inhibée par l'addition d'importine α . L'ajout de TPX2 à des microtubules stabilisés au taxol induit la formation de faisceaux. Cette activité n'est pas inhibée en présence d'importine α , suggérant un double rôle de TPX2, contrôlé par deux domaines protéiques différents (Schatz et al. 2003). Un large domaine N-terminal est en effet suffisant pour induire la nucléation de microtubules *in vitro*. Cependant, il ne peut

pas se substituer au TPX2 sauvage dans des extraits de xénopie. Un large domaine C-terminal, qui ne lie pas directement les microtubules *in vitro*, est en revanche suffisant pour restaurer la nucléation de microtubules dans des extraits de xénopes dépourvus de TPX2 endogène (Brunet et al. 2004). TPX2 initierait par son activité nucléatrice de petits microtubules amorces ou «seeds» qu'elle relierait entre eux tout en les stabilisant, conduisant à la formation de faisceaux de microtubules (Schatz et al. 2003).

Un mutant de TPX2 (K284A, position centrale d'un NLS potentiel) qui ne peut plus interagir avec l'importine présente une activité de nucléation constitutive. Des tests *in vitro* sur extraits de xénopie montrent que l'activité du mutant n'est plus dépendante de la présence de RanGTP. TPX2 est donc capable d'induire la nucléation de microtubules sans la participation de Ran et de l'importine (Schatz et al. 2003).

Cependant, des études récentes réalisées sur extraits mitotiques de xénopie suggèrent que d'autres facteurs sont nécessaires à la nucléation de microtubules autour de la chromatine.

La suppression de TPX2 est partiellement compensée par l'addition en excès de XMAP215 ou EB1, ou par l'inhibition de la kinésine déstabilisatrice MCAK. De plus, la suppression de Y-tubuline ou de XMAP215 n'est pas compensée par un excès de TPX2, ce qui révèle l'importance de ces facteurs dans le mécanisme de nucléation dépendant de la chromatine (Wilde et Zheng 1999; Groen et al. 2009). HURP est également essentielle à la nucléation et à l'organisation du fuseau acentrosomal (Silljé et al. 2006). L'inhibition de MCAK ne compense pas la déplétion de HURP. Cependant, aucune interaction directe entre HURP et TPX2 n'a pu être démontrée (Casanova et al. 2008).

Ces données suggèrent que la nucléation acentrosomale de microtubules nécessite l'intervention de nombreux facteurs protéiques dont les fonctions ne sont pas redondantes.

Implication de TPX2 dans l'organisation d'un fuseau bipolaire

Outre son importance dans la nucléation des microtubules, TPX2 est également essentielle à l'intégrité des pôles du fuseau (Figure 25). L'immunosuppression de TPX2 dans des extraits de xénopie provoque la désintégration des pôles et une diminution de la densité de microtubules. L'addition en excès de TPX2 induit la formation de fuseaux monopolaires avec des pôles élargis (Wittmann et al. 2000).

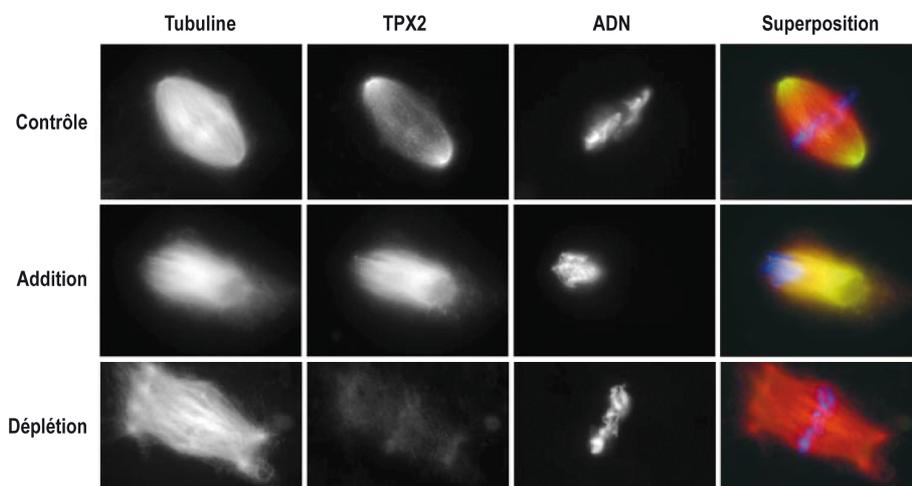


Figure 25 : Défauts d'organisation du fuseau métaphasique induits par l'addition en excès ou la déplétion de TPX2. (Wittmann et al. 2000)

Ces phénotypes pourraient découler de l'implication de TPX2 dans l'adressage et l'activation de certains facteurs aux pôles du fuseau (Figure 26)

TPX2 permet en effet la localisation de la kinésine Xklp2 aux pôles (Wittmann et al. 1998). Cette localisation requiert l'activité du complexe dynéine-dynactine, mais n'est pas dépendante de RanGTP. L'interaction directe de TPX2 avec ce complexe n'a toutefois pas été démontrée.

TPX2 est également impliquée dans la localisation polaire de la kinase Aurora A (Kufer et al. 2002). Les sérine-thréonine kinases Aurora ont de multiples fonctions au cours du cycle cellulaire. Elles participent à la duplication et la séparation des centrosomes, la condensation des chromosomes, l'assemblage et le fonctionnement du fuseau ou bien encore à la cytokinèse. La partie N-terminale de TPX2 (résidus 1 à 43) interagit avec l'extrémité C-terminale du domaine catalytique de la kinase, induisant son activation par autophosphorylation. La kinase activée phosphoryle à son tour TPX2 (Bayliss et al. 2003; Evers et Maller 2004). L'activation de Aurora A par TPX2 est notamment requise pour la phosphorylation de p53 (Pascreau et al. 2009) et de HURP (Yu et al. 2005). Aurora A activée est également impliquée dans le recrutement de γ -tubuline au niveau des centrosomes (Barr et Gergely 2007; Sardon et al. 2008). Elle phosphoryle BRCA1 en début de mitose, participant ainsi à la transition G2/M du cycle cellulaire (Ouchi et al. 2004).

Comme on l'a vu précédemment, TPX2 associée à un complexe comprenant HURP, XMAP215, Eg5 et Aurora A participe aussi à la focalisation des pôles du fuseau dans un mécanisme Ran-dépendant (Koffa et al. 2006).

Fonctions de complexes associés à TPX2

L'hétérodimère BRCA1/BARD1, qui présente une activité E3 ubiquitine ligase, est impliqué dans la prolifération cellulaire et la stabilité chromosomique. Il est nécessaire à l'accumulation de TPX2 aux pôles, où il forme un grand complexe comprenant TPX2, NuMA et RHAMM (Joukov et al. 2006).

RHAMM, une protéine multifonctionnelle notamment impliquée dans la focalisation des pôles de fuseaux astraux et anastraux, interagit par sa partie N-terminale avec les microtubules (Assmann et al. 1999). Elle facilite la nucléation microtubulaire autour des chromosomes, interagit avec le γ -TuRC et concentre TPX2 aux pôles fusoriaux chez le xénope (Groen et al 2004).

NuMA est une protéine impliquée dans la maintenance de la structure de l'enveloppe nucléaire et dans l'assemblage du fuseau mitotique. Le complexe NuMA/dynéine/dynactine est nécessaire à la focalisation des pôles fusoriaux en métaphase (Fant et al. 2004). La phosphorylation de NuMA par la CDK1/Cycline B entraîne sa dissociation de la matrice nucléaire et son association avec le fuseau. Sa déphosphorylation, après dégradation de la Cycline B en anaphase, entraîne sa dissociation du fuseau (Gehrmlich et al. 2004). Des données récentes suggèrent également un rôle de cette protéine dans la stabilisation des fibres kinétochoriennes (Haren et al. 2009). La surexpression de NuMA délocalise la dynéine du fuseau et induit la formation de pôles multiples.

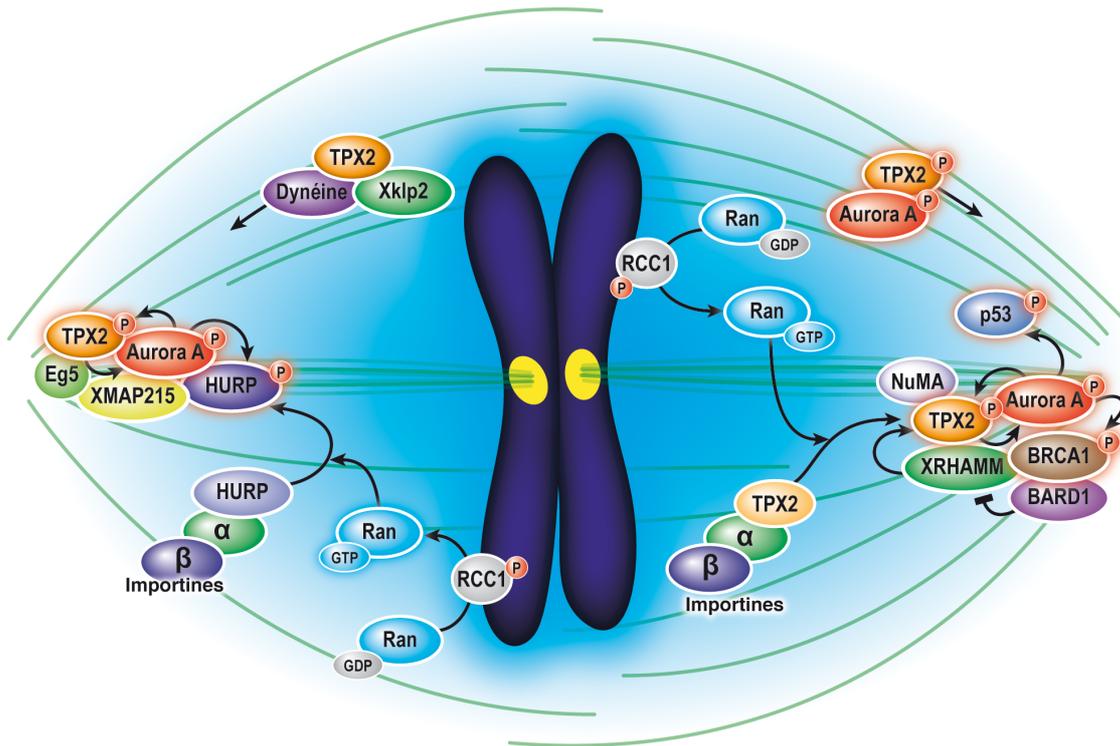


Figure 26 : Interactions entre TPX2 et ses partenaires au cours de la formation du fuseau. TPX2 est impliquée dans la localisation de Xklp2 et Aurora A aux pôles. Elle permet l'activation de la kinase par autophosphorylation, qui va phosphoryler TPX2 en retour. TPX2 est également retrouvée au sein de grands complexes localisés aux pôles du fuseau.

Régulation de TPX2 au cours du cycle

Une étude réalisée sur des cellules HeLa montre que la quantité de TPX2 varie au cours du cycle cellulaire (Stewart et Fang 2005). La quantité de protéine, relativement faible en phases G1/S augmente en G2, puis diminue rapidement en fin de mitose. Cette dégradation rapide de la protéine est due à l'activité d'un complexe enzymatique, le protéasome.

Le protéasome est impliqué dans la régulation de nombreux processus physiologiques et développementaux. Sa fonction principale est de dégrader les protéines défectueuses ou obsolètes par protéolyse. Les protéines cibles sont marquées pour la dégradation par les molécules d'ubiquitine. Cette ubiquitination est contrôlée par trois enzymes qui vont activer l'ubiquitine (enzyme d'activation E1), reconnaître le substrat (ligase E3) et former une liaison thioester entre le substrat et l'ubiquitine (enzyme de conjugaison E2).

L'APC (Anaphase-Promoting Complex) est l'E3 ubiquitine ligase qui va reconnaître TPX2. Son activité est essentielle à la dégradation de nombreux régulateurs du cycle cellulaire (par exemple : Cdc20, Cycline B, Aurora A, Plk1 et Kid). Chez les animaux, l'activité de l'APC est stimulée par son association avec Cdc20 en début d'anaphase, puis avec Cdh1 du début de télophase jusqu'en fin de phase G1. L'APC reconnaît principalement deux types de motifs : les « KEN Boxes » (K-E-N) et les « destruction boxes » ou « D boxes » (R-X-X-L où X correspond à n'importe quel acide aminé). L'APC reconnaît également une séquence spécifique présente dans Aurora A, appelée « A box » (RXLXPSN). Les « D boxes » sont reconnues à la fois par l'APC^{Cdh1} et l'APC^{Cdc20}. Les « KEN Boxes » et la « A box » ne sont reconnues que par l'APC^{Cdh1}.

Deux domaines identifiés dans la séquence protéique de TPX2 semblent nécessaires pour sa reconnaissance par l'APC : un motif « KEN box » (résidus 87 à 90) et une séquence originale dans la partie N-terminale de la protéine (résidus 1 à 86) (Stewart et Fang 2005). TPX2 possède également trois « D boxes » qui ne sont pas essentielles à sa dégradation.

Rôle de TPX2 dans l'apoptose

Lors de l'induction de mort cellulaire programmée ou apoptose, le réseau microtubulaire interphasique est démantelé et remplacé par un réseau acentrosomal qui va assurer la redistribution des fragments nucléaires apoptotiques. Des données récentes ont montré que, dans des cellules de drosophile, la formation de ce réseau dépend de TPX2 et de l'export de RanGTP vers le cytoplasme (Moss et al. 2009).

TPX2 comme cible anti-cancéreuse

TPX2 est une protéine oncogène dont l'expression est perturbée dans de nombreux cas de cancer. On la retrouve surexprimée dans des carcinomes du poumons (Lin et al. 2006), des glandes salivaires (Shigeishi et al. 2009) et des ovaires (Scharer et al. 2008), ainsi que dans des tumeurs osseuses (Smith et al. 2006). Sa surexpression entraîne des défauts de régulation de ses partenaires, notamment une hyperactivité de la kinase Aurora A, qui conduisent à la prolifération cellulaire et à l'inhibition de l'apoptose. Le rôle central de TPX2 dans la division cellulaire en fait une cible de choix pour lutter contre de nombreux types de cancer.

Le fuseau mitotique des plantes à fleur

Le fuseau mitotique des plantes à fleur est assemblé en l'absence de centrosome, par des mécanismes encore mal compris. La morphologie du fuseau végétal présente des différences majeures au niveau des pôles du fuseau : les microtubules semblent se focaliser en multiples points, correspondant probablement à chaque kinétochore. Chacun de ces points pourrait fonctionner comme un pôle organisateur, comme si le fuseau était organisé par de multiples centrosomes. Le concept d'un centrosome flexible a ainsi été développé et s'est largement imposé pour expliquer l'assemblage et l'organisation du fuseau végétal (Mazia 1984). Cependant, le défrichage des voies d'assemblage dépendant de la chromatine, et la remise en question du rôle essentiel du centrosome dans l'assemblage du fuseau animal, a permis d'émettre de nouvelles hypothèses et d'imaginer de nouveaux concepts expliquant les mécanismes d'assemblage du fuseau végétal.

Assemblage et structure

L'organisation générale des fibres kinétochoriennes et interpolaires formant le fuseau mitotique s'est maintenue au cours de l'évolution, qu'il s'agisse de mitose close comme chez les champignons ou ouverte comme chez les animaux et les plantes à fleurs. Cependant, les mécanismes mis en jeu dans le fonctionnement et le contrôle de l'appareil fusorial sont plus ou moins conservés chez les Angiospermes. On peut noter certaines particularités importantes en prophase, lorsque le fuseau s'assemble, ainsi qu'en fin de mitose, lorsque les deux cellules filles s'individualisent (Figure 27).

Migration du noyau

Une indication fiable de l'entrée en mitose d'une cellule végétale est la migration du noyau durant les phases S/G2 vers le futur plan de division. La migration du noyau est dépendante de câbles d'actine et de microtubules émanants du noyau et ancrés dans le cortex. La contribution respective des microfilaments d'actine ou des microtubules varie suivant l'espèce et le type cellulaire.

Anneau préprophasique

Avant l'entrée en prophase, les microtubules corticaux se réorganisent et forment un anneau dense entourant le noyau, l'anneau préprophasique. Cet anneau se condense pour former une bande très fine, d'environ 2 μm de large (PreProphase Band ou PPB). Malgré son démantèlement en prométaphase, le PPB marque précisément la position de la future plaque cellulaire qui séparera les deux cellules filles en fin de mitose. Des expériences de centrifugation cellulaire ont montré un lien entre le positionnement du noyau et celui du PPB. Après déplacement du noyau par force centrifuge, une cellule en préprophase reforme un second PPB dans le cortex entourant le noyau à sa nouvelle position. Il semble donc que se soit la position du noyau qui génère celle du PPB (Murata et Wada 1993).

Un réseau de microfilaments d'actine est également présent lors de la formation du PPB et pourrait jouer un rôle dans sa condensation (Palevitz 1987). Au cours des étapes ultérieures de la division, le réseau d'actine est exclu de la zone de formation du PPB, ainsi que la kinésine KCA1, migrant du cytoplasme vers la membrane plasmique et constituant des marqueurs négatifs de la future zone de division. Plus récemment, la MAP AtTAN (déjà évoquée p25), est le

premier marqueur positif mis en évidence à l'équateur, qui guide l'expansion du phragmoplaste et se désassemble après la cytokinèse (Walker et al. 2007).

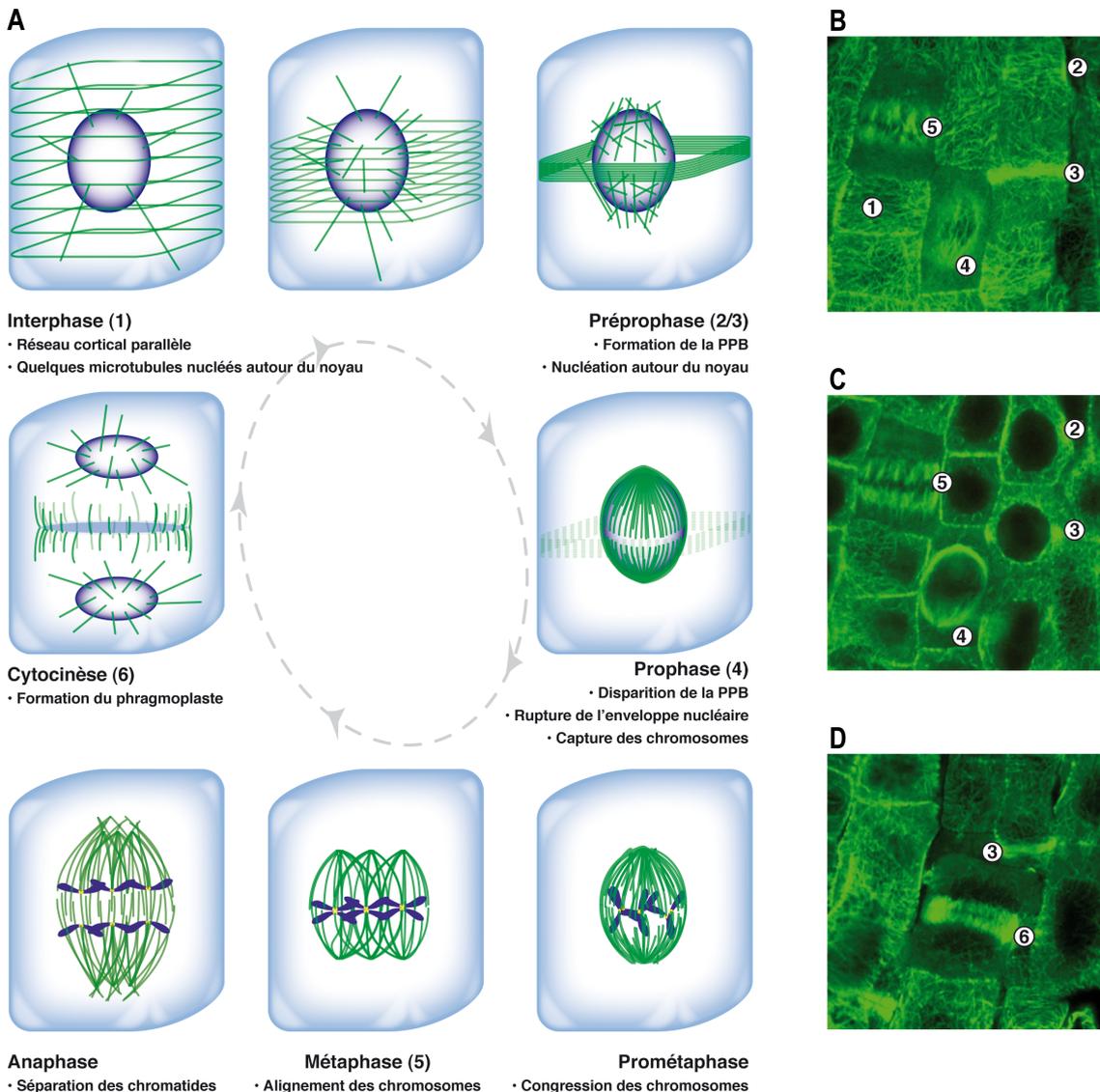


Figure 27 : Dynamique des microtubules au cours de la division d'une cellule végétale. A : Représentation schématique des étapes du cycle de division. **B, C et D :** Différentes coupes confocales d'une même zone.

Fuseau prophasique

En interphase, on observe quelques microtubules nucléés au niveau de la surface de l'enveloppe nucléaire qui irradient le cytoplasme, formant un aster ayant le noyau pour origine. En prophase, la densité des microtubules nucléés autour du noyau augmente. Les microtubules s'orientent tangentiellement à l'enveloppe et se réorganisent en formant deux coiffes disposées de part et d'autre du noyau (coiffes polaires), prémices des pôles du fuseau naissant. Cette structure caractéristique, appelée fuseau prophasique, apparaît comme une zone cytoplasmique moins dense (clear zone) en microscopie. Dans un même temps, l'anneau préprophasique se désagrège progressivement. A l'opposé des pôles élargis du fuseau mature, le fuseau prophasique a des pôles focalisés bien définis et compacts. Les microtubules tentent de pénétrer à l'intérieur du noyau, provoquant des invaginations de l'enveloppe nucléaire. Après la rupture de

l'enveloppe, des microtubules entrent dans l'espace nucléaire et capturent les chromosomes. Il a été montré récemment que quelques microtubules pénètrent le noyau avant même la rupture de l'enveloppe (Dhonukshe et al. 2006). Les pôles du fuseau prophasique vont ensuite se fragmenter et s'élargir, donnant lieu au fuseau métaphasique caractéristique des plantes.

Formation du fuseau métaphasique

La prométaphase est une étape de transition qui commence après la rupture de l'enveloppe nucléaire et se termine lorsque la plaque métaphasique est clairement visible. Pendant la prométaphase, les microtubules convergent des pôles vers l'équateur et se connectent aux kinétochores (fibres kinétochoriennes) ou aux microtubules du pôle opposé (microtubules interpolaire). Les fibres kinétochoriennes induisent la congression des chromosomes au niveau de la plaque métaphasique, puis la séparation des chromatides soeurs en anaphase. Les microtubules interpolaire stabilisent le fuseau et permettent l'élongation des pôles en anaphase. Dans la majorité des cas, le fuseau de métaphase possède des pôles diffus ce qui lui donne un aspect de tonneau, à l'opposé des fuseaux animaux qui ont 2 pôles focalisés tout au long de la division, même en l'absence de centrosome. La Y-tubuline est retrouvée tout au long du fuseau, suggérant qu'une partie des microtubules pourrait être nucléée au sein même des fibres kinétochoriennes.

Du réticulum endoplasmique est retrouvé le long du fuseau, formant des structures tubulaires allongées parallèles aux microtubules. Il pourrait jouer un rôle dans la stabilisation ou la nucléation de microtubules, faisant partie d'une sorte de « matrice fusoriale » servant de charpente à l'organisation du fuseau. Le réticulum endoplasmique est également un réservoir de Ca^{++} , dont l'effet déstabilisant des microtubules pourrait permettre de moduler la dynamique microtubulaire en mitose soit directement soit indirectement via une MAP calmoduline-dépendante (Vantard et al. 1985).

Séparation des chromatides en anaphase

Le mouvement des kinétochores vers les pôles et l'élongation du fuseau sont à l'origine de la ségrégation des chromosomes chez les plantes. Ces deux mécanismes qui correspondent respectivement à l'anaphase A et B chez les animaux, peuvent être mis en oeuvre chez les plantes de manière plus ou moins concomitante suivant les espèces. Au cours de l'anaphase, les fibres kinétochoriennes se raccourcissent et les pôles se focalisent à nouveau. En même temps, les fibres du centre du fuseau deviennent mieux organisées et se regroupent, puis glissent les unes par rapport aux autres, entraînant la séparation des pôles fusoriaux.

Formation du phragmoplaste

Les cellules végétales se divisent par cloisonnement interne. En fin de mitose, les microtubules du centre du fuseau d'anaphase persistent et se densifient, donnant lieu au phragmoplaste qui va permettre la mise en place d'une nouvelle paroi. Les microtubules du phragmoplaste sont organisés en deux lots cylindriques opposés dont les extrémités (+) se terminent au niveau du plan de division de la cellule. Ce réseau va permettre le transport de vésicules qui vont fusionner pour former la nouvelle plaque cellulaire. Le phragmoplaste va s'étendre de manière centrifuge vers le cortex, jusqu'au cloisonnement total des deux cellules filles. La nouvelle paroi sera ensuite synthétisée entre les 2 membranes plasmiques ainsi générées

L'assemblage du fuseau des plantes requiert, comme pour le fuseau animal, l'action conjointe de protéines motrices et structurales, notamment lors de la réorganisation des microtubules à la surface du noyau en un fuseau prophasique, ou bien lors de la capture puis de la ségrégation des chromosomes.

Facteurs régulant la dynamique

Moteurs protéiques

Les dynéines cytoplasmiques et ciliaires ont été perdues au cours de l'évolution des plantes. Les kinésines végétales ont évolué et se sont diversifiées, contribuant ainsi à compenser cette perte. On dénombre pas moins de 61 kinésines dans le génome d'*Arabidopsis*, suggérant de potentielles spécialisations fonctionnelles (Reddy et Day 2001; Lee et Liu 2004). 23 d'entre elles sont surexprimées pendant la mitose (Vanstraelen et al. 2006). Deux membres des kinésines 12, nommés POK1 et 2 (pour phragmoplaste oriented kinesin1 et 2), ont des fonctions redondantes et sont impliquées dans l'orientation du phragmoplaste (Müller et al. 2006). Seules les kinésines appartenant aux familles 5 et 14 semblent être impliquées dans le fonctionnement du fuseau.

Kinésines 14

ATK1 (AtKIN14a) et ATK5 (AtKIN14b) sont deux kinésines 14 identifiées chez *Arabidopsis* jouant un rôle dans l'assemblage du fuseau mitotique. Elles sont capables d'induire un déplacement vers l'extrémité (-) et de ponter des microtubules parallèles et antiparallèles *in vitro* (Marcus et al. 2002; Ambrose et al. 2005; Ambrose et Cyr 2007).

Le mutant *atk5* est affecté dès les étapes précoces de l'assemblage du fuseau (Ambrose et Cyr 2007). En début de prophase jusqu'en fin de prométaphase, les fuseaux sont anormalement allongés et souvent vrillés. On observe également un élargissement des pôles en métaphase. La protéine de fusion YFP:ATK5 s'associe aux microtubules périnucléaires avant la rupture de l'enveloppe, puis se concentre sur les microtubules du centre du fuseau. Elle s'associe à l'extrémité (+) des microtubules mais son activité motrice induit un déplacement vers l'extrémité (-) (Ambrose et al. 2005). Les auteurs proposent qu'ATK5 est adressée au centre du fuseau puis se déplace vers l'extrémité (-) tout en associant les microtubules parallèles entre eux, participant ainsi à la focalisation des pôles. Un mode d'action similaire a été proposé pour Ncd de drosophile (Matthies et al. 1996).

Le mutant *atk1* forme des fuseaux de prophase peu denses en microtubules et présente des défauts de polarité du fuseau en prométaphase (Marcus et al. 2003). Cependant, ces erreurs d'assemblage sont rectifiées en anaphase et la ségrégation des chromosomes semble normale, suggérant la mise en place de mécanismes de correction au cours de la division. En revanche, *atk1* semble être affecté davantage dans la gamétogénèse mâle (Chen et al. 2002). On observe des fuseaux déformés aux pôles multiples et non focalisés, conduisant à la formation de microspores peu nombreuses et de taille variable. Il en découle une réduction de la fertilité mâle. L'absence d'anneau préprophasique dans les cellules méiotiques pourrait être un facteur aggravant pour le mutant, expliquant la sévérité du phénotype observé.

Les mutants double hétérozygotes *ATK1/atk1* ; *ATK5/atk5* sont affectés à la fois dans la gamétogénèse mâle et femelle. Les mutants homozygotes pour les deux gènes ainsi que ceux qui ne possèdent qu'un allèle sauvage de l'un des deux gènes sont embryo-létaux, suggérant

qu'un niveau d'activité minimal de ces deux protéines est essentiel au bon déroulement de la méiose et au développement gamétophytique (Quan et al. 2008).

Les gènes codants pour les kinésines ATK1 et ATK5, ainsi que pour les autres kinésines 14 d'*Arabidopsis* ont comme ancêtre commun un seul et même gène présent en copie unique dans le génome de la drosophile (NCD), de la levure (KAR3), et de *Chlamydomonas* (CrKIN14a), organismes qui possèdent un gène codant pour la dynéine. Ces données suggérant que la radiation évolutive des kinésines 14 chez *Arabidopsis* est la conséquence de la disparition de la dynéine, seul autre moteur moléculaire se déplaçant vers l'extrémité (-) des microtubules.

Kinésines 5

Les kinésines 5 permettent d'associer entre eux les microtubules antiparallèles en provenance des pôles opposés au niveau de la zone centrale du fuseau, et de les faire coulisser les uns par rapport aux autres en anaphase. Ces moteurs protéiques génèrent ainsi les forces principales responsables de l'écartement des pôles, s'opposant à celles générées par les kinésines 14. Au contraire de la plupart des organismes animaux, les plantes possèdent dans leur génomes plusieurs gènes codant pour des kinésines de type 5. On en dénombre quatre chez *Arabidopsis*, nommées AtKRP125a, b et c, et AtF16L2 (Reddy et Day 2001). Le rôle essentiel d'AtKRP125c dans le fonctionnement du fuseau a récemment été mis en évidence au travers du phénotype observé chez le mutant *radially swollen 7* (Figure 28).

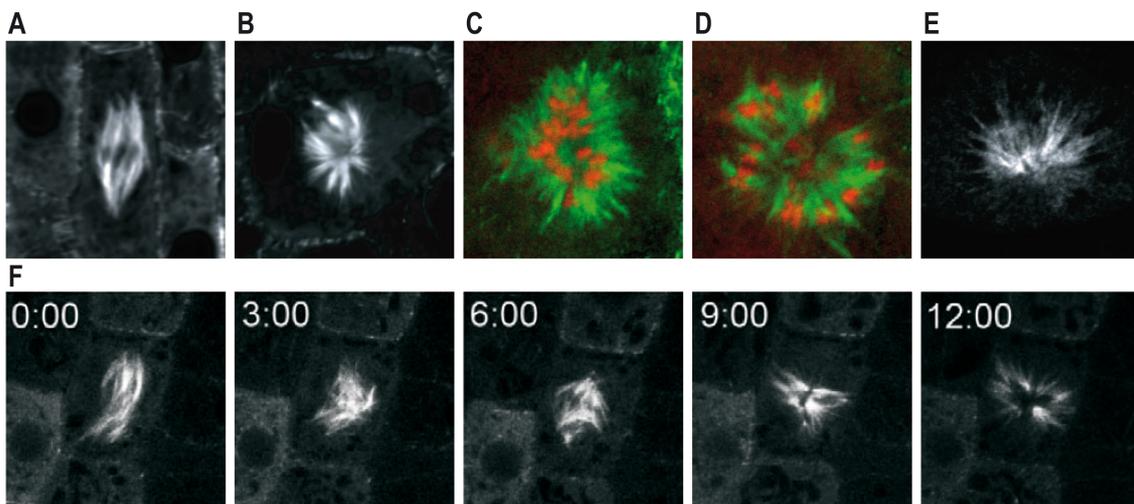


Figure 28 : Images confocales de fuseaux mitotiques. A : Fuseau de métaphase d'une cellule de racine d'*Arabidopsis* sauvage. B, C, D : Fuseau monopolaire (niveaux de gris ou vert) observé chez le mutant *rsw7* après plusieurs heures d'exposition à une température restrictive de 30 °C. C et D : Le co-marquage des microtubules (vert) et de l'ADN (rouge) révèle que les chromosomes se positionnent au centre du fuseau (C) ou à sa périphérie (D). E : Fuseau monopolaire observé dans une cellule épithéliale de porc après un traitement au monastrol, une drogue qui cible spécifiquement les kinésines de type Eg5. F : Séquence d'images montrant la formation d'un fuseau défectueux d'une cellule de *rsw7*. Le fuseau, à peu près bipolaire en début de division, voit ses pôles se désagréger et les microtubules migrer en périphérie, laissant les chromosomes au centre (comme en C). D'après (Bannigan et al. 2008).

Le mutant *rsw7* contient une mutation ponctuelle dans le domaine moteur de la kinésine, qui la rend sensible à l'élévation de température (Wiedemeier et al. 2002). Après une exposition prolongée à une température restrictive de 30 °C, les fuseaux formés ont une morphologie aberrante, sont souvent monopolaires, reflétant des problèmes de stabilisation des microtubules antiparallèles de la zone centrale (Bannigan et al. 2007). Ce phénotype ressemble fortement à ceux observés chez les mutants de kinésines 5 animaux, suggérant une fonction conservée de cette famille de protéines chez *Arabidopsis*. AtKRP125c exprimée par transfect-

tion dans des cellules épithéliales animales décore les microtubules tout au long du cycle, mais ne complète pas des mutants perte de fonction de kinésine 5 (Eg5).

MAPs

Des MAPs structurales impliquées dans la régulation de la dynamique des microtubules semblent jouer un rôle important dans l'assemblage et le fonctionnement du fuseau végétal.

MAP65

Les MAP65 partagent des homologies de séquence avec des protéines humaine (PRC1) et de levure (Ase1p) impliquées dans le pontage et la stabilisation des microtubules de la région centrale du fuseau (Mollinari et al. 2002; Schuyler et al. 2003). Plusieurs membres de la famille des MAP65 décorent les microtubules corticaux en interphase et se localisent également au centre du fuseau mitotique, suggérant des fonctions similaires (Muller et al. 2004; Chang et al. 2005; Mao et al. 2005). AtMAP65-4-GFP ne décore cependant ni les microtubules corticaux, ni ceux de l'anneau préprophasique. La protéine ne montre pas d'enrichissement spécifique dans la région centrale comme d'autres MAP65, mais s'associe spécifiquement aux microtubules fusoriaux polaires (Van Damme, Van Poucke et al. 2004). AtMAP65-4 est fortement exprimée en début de mitose et la présence d'une « D-Box » suggère une dégradation de la protéine par le protéasome en fin de division. Les différences de localisation observées au sein des MAP65 pourraient être dues à la présence de sites de phosphorylation particuliers. La mutation du site de phosphorylation par CDK dans la MAP65-1 entraîne une accumulation prématurée de la protéine au niveau de la zone centrale en prométaphase, alors que la protéine sauvage ne s'y localise qu'en cours d'anaphase (Mao et al. 2005).

TON1 et TON2

Les mutants *tonneau1* (*ton1*) et *fass/tonneau2* d'*Arabidopsis* sont fortement affectés dans leur développement. Les organes se différencient mais la plante reste naine. Ces mutants sont incapables d'organiser un PPB mais forment un fuseau et un phragmoplaste.

Le gène *FASS* code pour une sous-unité régulatrice responsable de la localisation de la phosphatase PP2A. *FASS* est impliquée dans l'orientation du plan de division (Camilleri et al. 2002), et est requise pour la bonne localisation de TANGLED (Walker et al. 2007). L'homologue de *FASS* chez *Caenorhabditis* (*RSA*) (Schlitz et al. 2007) est impliqué dans l'adressage de PP2A au centrosome lors de l'assemblage du fuseau.

Le phénotype du mutant *ton1* est dû à l'extinction de deux gènes disposés en tandem, *TON1a* et *TON1b*, dont les fonctions sont totalement redondantes (Azimzadeh et al. 2008). L'observation de la fusion TON1a-GFP montre un marquage des microtubules corticaux, puis de l'anneau préprophasique en fin de G2. La protéine de fusion ne décore en revanche ni le fuseau, ni le phragmoplaste. Ces observations suggèrent un rôle spécifique de TON1 dans la formation du PPB. TON1b est par ailleurs capable d'interagir *in vivo* avec CDKA;1 (Van Leene et al. 2007), une kinase cycline-dépendante qui se retrouve également associée à l'anneau préprophasique de cellules BY-2 (Weingartner et al. 2001). Un rôle possible de TON1 pourrait être de recruter et de réguler l'activité de kinases et phosphatases afin de contrôler l'assemblage ou le désassemblage du réseau cortical et du PPB (Azimzadeh et al. 2008).

De manière intéressante, TON1 interagit avec les centrines CEN1 et 2 d'*Arabidopsis* (plus probablement CEN1 en conditions physiologiques *in planta*) (Azimzadeh et al. 2008). Les

centrines, composants essentiels des MTOCs de nombreux organismes, sont notamment impliquées dans le contrôle de la duplication du centrosome (Salisbury 2007). Par ailleurs, TON1, qui est fortement conservée chez les plantes terrestres, partage des similarités de séquence avec FOP (FGFR1 Oncogene Partner) et OFD1 (Oral Facial Digital 1), protéines localisées au niveau du centrosome des cellules humaines (Romio et al. 2003; Yan et al. 2006). Ces données suggèrent que les fonctions mises en jeu au niveau des centrosomes ont été conservées au cours de l'évolution, malgré les divergences évolutives entre animaux et plantes.

Autres MAPs

MOR1 semble être impliquée dans les étapes précoces de formation du fuseau. Les mutants *mor1* présentent des défauts de formation du PPB entraînant une orientation aberrante du fuseau et du phragmoplaste (Eleftheriou et al. 2005; Kawamura et al. 2006). TANGLED, EB1, SPIRAL, MAP70 et MAP190 s'associent également au fuseau mitotique mais leurs rôles réciproques dans les étapes d'assemblage et d'organisation restent à déterminer.

Mécanismes d'assemblage

Le PPB comme centre organisateur

Dans la majorité des cellules végétales, l'axe du fuseau de prophase est défini avec précision. De nombreuses observations suggèrent l'existence d'un lien entre la position du PPB et l'orientation du fuseau de prophase. Sur la base d'observations de cellules de tabac BY-2, il a été proposé que le PPB inhibe localement la polymérisation de microtubules au niveau de la surface de l'enveloppe nucléaire. Cet anneau d'inhibition supprimerait les microtubules au niveau de l'équateur du noyau, encourageant ainsi la formation d'un fuseau bipolaire (Granger et Cyr 2001). Certaines cellules BY-2 (i.e. souches BY-GT16 et BD2-5) possèdent deux PPBs, séparés d'une distance correspondant approximativement au diamètre d'un noyau. Dans ces cellules, le fuseau prophasique formé est multipolaire, et la plupart des pôles sont formés à l'équateur du noyau, la zone la plus éloignée des PPBs (Granger et Cyr 2001; Yoneda et al. 2005) (Figure 29).

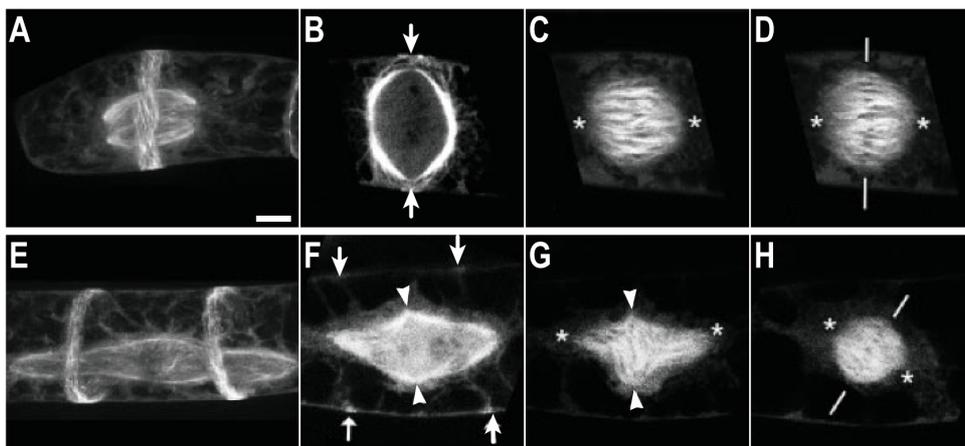


Figure 29 : Anneau préprophasiques et fuseaux mitotiques de cellules de tabac BY-GT16. A,B,C et D : Assemblage du fuseau mitotique lorsqu'un seul PPB est présent. **E, F, G et H :** Assemblage du fuseau dans une cellule possédant deux PPB. Le fuseau formé, qui possède quatre pôles en prophase (F), acquiert une bipolarité en métaphase (H). Les pôles anormaux sont marqués par deux triangles. Les pôles du fuseau sont marqués par des astérisques. Les flèches permettent de repérer la position du PPB après sa disparition. L'axe de la plaque métaphasique est mise en évidence par deux traits (D et H). D'après (Yoneda et al. 2005). Barre d'échelle : 10µm.

Assemblage du fuseau en l'absence de PPB

Lors de la formation des graines, les cellules triploïdes de l'albumen subissent des vagues de karyocinèse dans un cytoplasme syncytial avant leur cellularisation. Ces mitoses se réalisent naturellement en l'absence de PPB. Dans le modèle cellulaire d'*Haemanthus katharinae* (*Scadoxus multiflorus ssp katharinae*), il a pu être montré une réorganisation progressive des microtubules périnucléaires en fuseau prophasique bipolaire avant rupture de l'enveloppe nucléaire (Schmit et al. 1982). Un certain type de cellules en culture d'*Arabidopsis*, incapable de former un PPB, ne met pas en place de fuseau prophasique. Ces cellules forment pourtant un fuseau fonctionnel directement après la rupture de l'enveloppe nucléaire. Les fuseaux mis en place ont des orientations variées et possèdent des microtubules astraux, normalement absent des cellules pourvues d'un fuseau prophasique. Ces microtubules pourraient aider au positionnement du fuseau et à l'établissement du plan de division en l'absence de PPB (Chan et al. 2005).

Il a récemment été proposé que les cellules végétales, comme les cellules animales, possèdent une voie d'assemblage chromosomique du fuseau qui est toujours présente, mais qui peut être masquée lorsque le fuseau prophasique est présent (Lloyd et Chan 2006). L'anneau préprophasique pourrait jouer un rôle analogue à celui du centrosome des cellules animales. Il permettrait d'imposer une bipolarité axée sur l'équateur du noyau plutôt que sur la position des pôles. Le PPB et le centrosome permettraient d'améliorer l'efficacité d'assemblage du fuseau et la fidélité de la cytokinèse, sans être pour autant essentiels à l'assemblage du fuseau.

La présence du PPB joue cependant un rôle particulièrement important au cours du développement tri-dimensionnel de la plante. Les cellules possèdent en effet une paroi rigide leur interdisant de corriger leur position en migrant, comme peuvent le faire les cellules animales. L'importance de la position du plan de division est moindre dans les tissus non organogènes comme l'albumen, ou dans les cellules en culture.

Voies de signalisation

Peu de données sont disponibles quant aux voies de signalisation mises en jeu lors de l'assemblage du fuseau des plantes. Plusieurs gènes impliqués dans l'assemblage du fuseau animal ont des homologues chez les plantes, suggérant l'existence de mécanismes conservés.

Ran et ses partenaires

Les plantes supérieures, comme les autres organismes eucaryotes, possèdent une superfamille de gènes codant pour de petites GTPases (Terry et al. 1993). Des homologues végétaux de Ran ont été identifiés chez la tomate, le tabac et *Arabidopsis*. La surexpression de ces protéines supprime le phénotype du mutant thermosensible de levure *pim46-1*, qui code pour l'homologue de *RCC1* (Ach et Grissem 1994; Merkle et al. 1994; Haizel et al. 1997). Ces données suggèrent que les fonctions assurées par Ran sont conservées entre la levure et les plantes. Quatre homologues de Ran ont été identifiés chez *Arabidopsis* (AtRan1 à 4). AtRan1, 2 et 3 ont des séquences très conservées (95% d'identité environ) et ne diffèrent que par leur partie C-terminale (Haizel et al. 1997). AtRan4 ne possède que 65% d'identité avec les autres AtRan et sa fonction reste à déterminer.

Les principaux partenaires végétaux de Ran ont également été identifiés. Deux homologues de RanGAP ont été caractérisés chez *Arabidopsis* (Rose et Meier 2001). AtRanGAP1 et 2 sont localisées au niveau de l'enveloppe nucléaire en interphase, au fuseau en anaphase, au

phragmoplaste et au noyaux des cellules filles en télophase (Rose et Meier 2001; Pay et al. 2002). L'extinction par ARNi de AtRanGAP1 provoque des défauts d'orientation du plan de division (Xu et al. 2008). Des expériences de criblage double hybride, utilisant la séquence d'AtRan1 comme appât, ont permis d'identifier les partenaires AtRanBP1a et 1b (Haizel et al. 1997). Seul RCC1 n'a pas d'homologue végétal identifié à ce jour.

Kinases Aurora

Trois kinases Aurora (AtAURORA1 à 3) ont été identifiées chez *Arabidopsis* (Van Damme, Bouget et al. 2004; Demidov et al. 2005; Kawabe et al. 2005). Leur inhibition par l'hésperadine provoque des défauts de ségrégation des chromosomes (Kurihara et al. 2006). Elles seraient impliquées notamment dans l'attachement des microtubules aux kinétochores et dans la dissociation de la cohésine au moment de la ségrégation des chromosomes (Kurihara et al. 2008). Elles sont capables de phosphoryler l'histone centromérique H3 (Kawabe et al. 2005). AtAURORA1 est par ailleurs capable d'autophosphorylation (Demidov et al. 2009). AtAURORA1 et 2 montrent un haut degré de similarité et seraient issues d'un événement de duplication récent. Les deux kinases sont localisées au niveau de l'enveloppe nucléaire en interphase et marquent le fuseau mitotique en mitose, un profil de localisation similaire à celui de Aurora A (Carmena et Earnshaw 2003).

Objectifs de thèse

La division cellulaire chez les végétaux apparaît, au premier abord, sensiblement différente de ce qu'elle est chez les animaux. Les cellules somatiques des plantes supérieures sont acentrosomales et mettent en place un anneau préprophasique. Cette structure joue un rôle essentiel dans l'établissement de la polarité mitotique, phénomène crucial conditionnant la morphogenèse des cellules non migrantes. Les cellules végétales possèdent de plus une paroi qui impose un mode de cytokinèse particulier, basé sur la croissance centrifuge d'une plaque cellulaire naissant à l'intérieur de la cellule.

Malgré ces particularités, les mécanismes d'assemblage du fuseau présentent des analogies avec ceux rencontrés chez les animaux. Par ailleurs, la présence d'homologues de Ran et de la plupart des facteurs qui y sont associés suggère l'existence de voies de signalisation similaires. Dans ce contexte, il semblait intéressant de rechercher l'existence d'un mécanisme faisant intervenir un homologue végétal de la protéine TPX2, acteur central de l'assemblage du fuseau méiotique acentrosomal largement étudié chez le xénope.

L'objectif principal de cette thèse a été de rechercher l'existence d'homologues de TPX2 chez *Arabidopsis* et de caractériser leurs fonctions. Les résultats s'articulent en deux grandes parties :

- La caractérisation d'AtTPX2 que l'on considère à ce jour comme l'homologue véritable de TPX2 animal.
- L'identification de gènes d'*Arabidopsis* apparentés à AtTPX2 et possédant certains de ses domaines fonctionnels.

Caractérisation d'AtTPX2

Article 1 : The Plant TPX2 Protein Regulates Prospindle Assembly before Nuclear Envelope Breakdown

Cet article présente la caractérisation fonctionnelle d'AtTPX2, la protéine d'*Arabidopsis* homologue de TPX2 animal. Les résultats publiés dans cet article sont le fruit de collaborations entreprises avec deux autres équipes, celle de Jan Vos de l'Université de Wageningen et celle d'Isabelle Vernos du Centre de Régulation Génomique de Barcelone. Ces collaborations ont permis d'aborder l'étude de la protéine sous différents aspects, en mettant à profit les compétences de chaque équipe.

Jan Vos a réalisé des expériences de microinjection d'anticorps dirigés contre AtTPX2 dans des cellules de *Tradescantia*. Les résultats de ses travaux ont permis de démontrer le rôle de la protéine *in vivo* et son implication dans les étapes précoces de la formation du fuseau. L'injection de ces anticorps bloque en effet la formation du fuseau de prophase.

Les travaux d'Isabelle Vernos sont à l'origine de la découverte et la caractérisation de TPX2 de xénope. Son équipe a pu mettre en évidence l'activité de nucléation d'AtTPX2 et sa capacité à se substituer à TPX2 animal dans des extraits de xénope. Ils ont pu montrer qu'AtTPX2 est capable d'interagir avec Ran et l'importine

J'ai, pour ma part, travaillé essentiellement sur la localisation de la protéine au cours du cycle cellulaire, ainsi que sur l'identification des domaines fonctionnels présents dans AtTPX2. Mes travaux, ainsi que ceux d'Anne-Catherine et de Jean-Luc, ont permis de mettre en évidence le comportement dynamique original de la protéine. AtTPX2 est nucléaire en interphase comme son homologue animal, puis, de manière surprenante, est exportée juste avant la rupture de l'enveloppe nucléaire pour se retrouver sur le fuseau prophasique. AtTPX2 se localise au niveau du fuseau mitotique mais ne marque pas la zone centrale en anaphase. AtTPX2 est rapidement dégradée en fin d'anaphase. J'ai pu identifier des séquences protéiques permettant l'import/export de la protéine et son association aux microtubules. Jean-Luc, avec qui j'ai eu le plaisir de partager la paillasse durant ces trois années de thèse, a travaillé avec obstination sur la production d'AtTPX2 ainsi que la génération d'anticorps spécifiques. La protéine étant très instable, le travail c'est avéré particulièrement délicat et Jean-Luc a dû se résoudre à produire les anticorps à partir d'un fragment stable correspondant à la région centrale de la protéine.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

The Plant TPX2 Protein Regulates Prospindle Assembly before Nuclear Envelope Breakdown[W]

Jan W. VOS, Laurent PIEUCHOT , Jean-Luc EVRARD , Natacha JANSKI , Marc BERGDOLL , Dryas DE RONDE , Laurent H. PEREZ , Teresa SARDON , Isabelle VERNOS , and Anne-Catherine SCHMIT

The Plant Cell, 2008, vol. 20, n° 10, pages 2783-2797

Article 1 : pages 54-78 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1105/tpc.107.056796>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

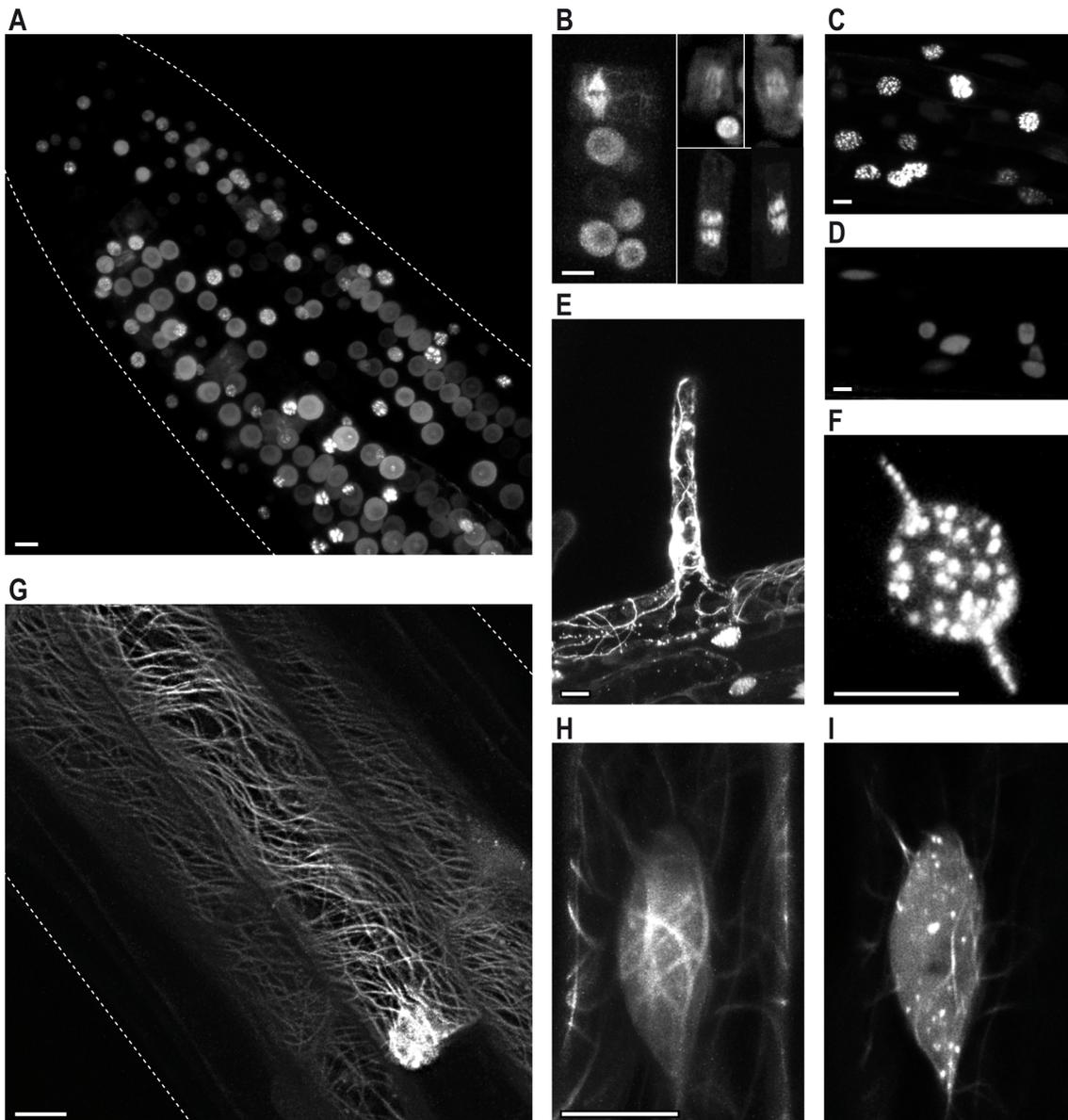


Figure 33 : Localisation de la fusion GFP-AtTPX2-6His dans des racines d'*Arabidopsis*.

A et B : Projection de coupes confocales d'un apex racinaire. La protéine de fusion est localisée dans le noyau des cellules en interphase et marque le fuseau mitotique des cellules en division (B). Quelques cellules présentent des ponctuations dans le nucléoplasme. **C :** Des ponctuations sont présentes dans le nucléoplasme des cellules différenciées. **D :** Niveau de fluorescence observé avec la construction 35S:GFP-AtTPX2 en utilisant la même sensibilité qu'en C. **E :** Câbles formés dans un poil absorbant. **F :** Ponctuations et structures en forme d'aiguille disposées de part et d'autre du noyau. **G :** Zone différenciée de la racine dont l'apex est présenté en A. On observe des agrégats dans le noyau, accompagnés de câbles cytoplasmiques. **H :** Rendu surfacique du noyau d'une cellule de la zone différenciée, obtenu à partir de coupes confocales. On observe des filaments à la surface du noyau et dans le cortex. **I :** Coupe confocale correspondant au centre du même noyau. On observe des filaments et des ponctuations dans le nucléoplasme. La protéine est exprimée sous la dépendance d'un promoteur inducible à l'oestradiol. Les observations ont été réalisées sur des plantules âgées de deux semaines, après 4 jours d'induction sur milieu de culture solide contenant du 17- β oestradiol. Barres d'échelle : 10 μ m.

GFP-AtTPX2 est dégradée par le protéasome en fin d'anaphase

L'analyse de la dynamique d'AtTPX2 au cours du cycle révèle une dégradation de la protéine en fin d'anaphase (Figures 3J et 3K de l'article 1, Figure 34A ci-dessous). Afin d'évaluer l'implication du protéasome dans la dégradation de la protéine, des plantules âgées de 10 jours exprimant la protéine de fusion GFP-AtTPX2 ont été traitées avec un inhibiteur spécifique, le MG132 (N-benzyloxycarbonyl (Cbz)-Leu-Leu-leucinal), puis la fluorescence a été observée en microscopie confocale. Le MG132 est un peptide qui se lie spécifiquement et de manière réversible au cœur catalytique 20S du protéasome et inhibe son activité.

Après une heure de traitement, on observe une légère augmentation de la fluorescence globale de l'apex racinaire associée à des défauts d'organisation du fuseau révélés par une localisation anormale de GFP-AtTPX2. Ces défauts peuvent être des conséquences indirectes de l'inhibition du protéasome, qui pourraient entraîner l'accumulation de protéines normalement dégradées à ce stade de la mitose.

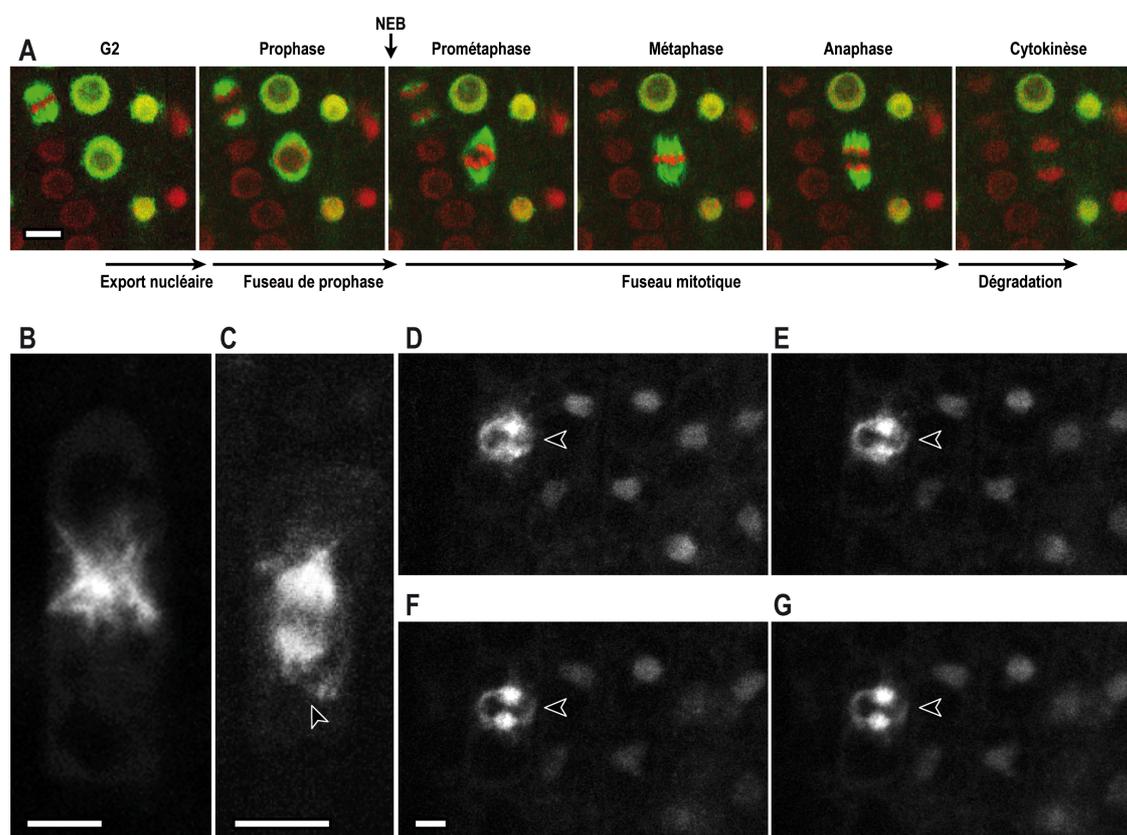


Figure 34 : La dégradation de GFP-AtTPX2 est inhibée par un traitement au MG132.

A : Dynamique des protéines de fusion GFP-AtTPX2 (vert) et H2AX-RFP (rouge) au cours du cycle cellulaire. GFP-AtTPX2 est rapidement dégradée en fin d'anaphase. **B, C et D** : Localisation de la protéine GFP-AtTPX2 dans des cellules en division après une heure de traitement au MG132 (10µM). On observe la formation de fuseau prométaphasiques et anaphasiques anormaux (B et C) et une accumulation nucléaire de la protéine en télophase (D). La protéine se retrouve également au niveau de microtubules résiduels du phragmoplaste (flèche). Les observations ont été réalisées sur des plantules âgées de 10 jours. Barres d'échelle : 10µm.

De manière intéressante, on remarque que l'ensemble des cellules du méristème ont un noyau fluorescent. On observe également l'association inhabituelle de TPX2 avec les microtubules du phragmoplaste. GFP-AtTPX2 est normalement absente à ce stade du cycle. La protéine n'est donc plus dégradée en fin d'anaphase et se retrouve dans les noyaux fils refor-

més dès la fin de télophase. Ces données suggèrent que la dégradation d'AtTPX2 en fin d'anaphase est due à l'action du protéasome.

Analyse de l'activité du promoteur d'AtTPX2

Une construction chimérique composée du gène rapporteur codant pour la β -glucuronidase (GUS) sous le contrôle de la région promotrice d'AtTPX2 a été introduite dans des plantes d'*Arabidopsis*. La région clonée comprends l'ATG et les 2000 paires de bases en amont. L'analyse de l'activité GUS des plantes transgéniques montre que le promoteur est nettement plus actif au niveau des apex racinaires et caulinaires, ainsi qu'à la base des jeunes feuilles (Figure 35), suggérant une expression spécifique d'AtTPX2 dans les tissus méristématiques. Le patron d'expression est identique dans les 10 lignées indépendantes qui ont été analysées.

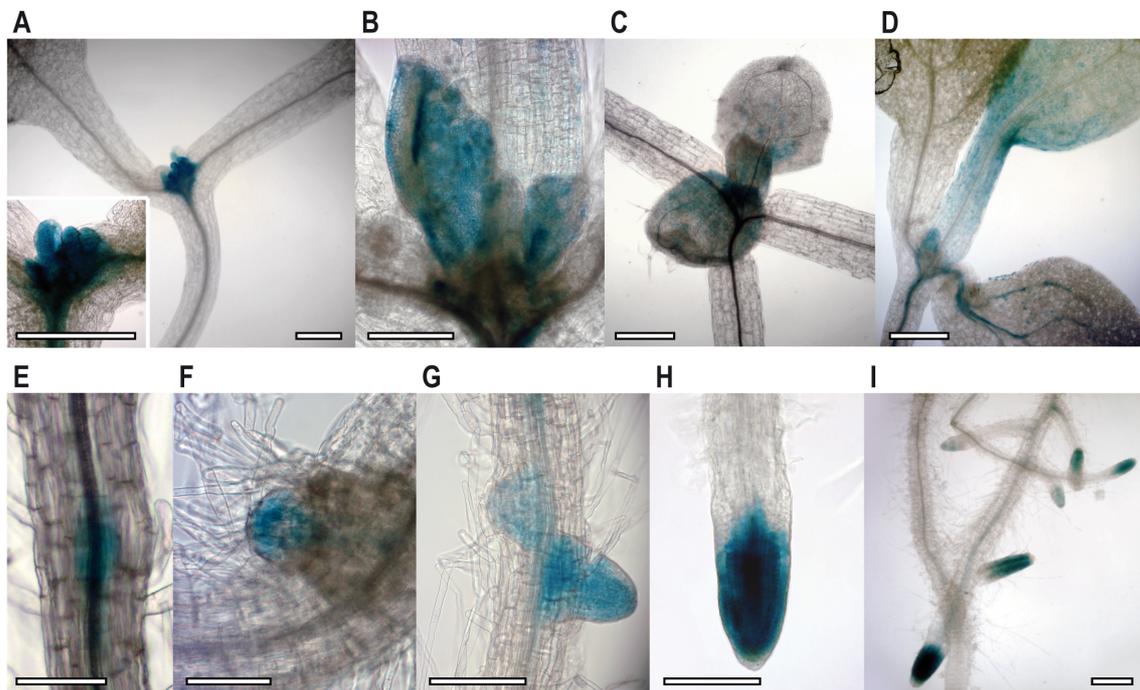


Figure 35 : Localisation histochimique de l'activité GUS dans des plantules d'*Arabidopsis* exprimant la fusion traductionnelle du promoteur d'AtTPX2 avec le gène rapporteur GUS. A : Apex caulinaires et primordia foliaires. B, C et D : Jeunes feuilles à différents stades de développement. E à I : Primordia et apex racinaires secondaires en cours de développement. Barres d'échelle : 200 μ m.

Autres TPX2 like d'*Arabidopsis thaliana*

Article 2 : Plant TPX2 and related proteins

Cet article est paru en janvier 2009, sur invitation du journal *Plant Signaling and Behavior*. Il a pour objet de compléter les données présentées dans l'article 1.

Les analyses présentées dans cet article ont permis de mettre en évidence des domaines conservés au sein d'AtTPX2, que l'on retrouve différenciellement répartis dans d'autres protéines de plantes. L'article propose des séquences consensus permettant d'identifier ces domaines clés.

Des données complémentaires présentant l'ensemble des protéines d'*Arabidopsis* apparentées à AtTPX2, ainsi que la caractérisation de certaines d'entre elles, seront présentées en fin de chapitre.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Plant TPX2 and related proteins

Jean-Luc EVRARD, Laurent PIEUCHOT, Jan W. VOS, Isabelle VERNOS and Anne-Catherine SCHMIT

Plant Signaling & Behavior, 2009, vol. 4, n° 1, pages 69-72

Article 2 : pages 86-89 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://www.landesbioscience.com/journals/psb>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Identification de protéines similaires à AtTPX2

Les expériences d'expression transitoire de domaines d'AtTPX2 fusionnés à la GFP présentées dans l'article 1 ont permis d'identifier des séquences d'acides aminés probablement impliquées dans la dynamique de la protéine au cours du cycle cellulaire. Parmi ces domaines, on peut distinguer deux NLSs et un NES certainement impliqués dans le transit nucléo-cytoplasmique de la protéine, et dans son export juste avant la rupture de l'enveloppe nucléaire. Deux domaines de liaison aux microtubules (MBD ou Microtubule Binding Domain) ont également été identifiés. Ces résultats expérimentaux ont été complétés par des analyses bioinformatiques qui ont permis d'identifier un domaine d'interaction avec les kinases AtAURORA 1 ou 2 ainsi que trois signaux de dégradation de type « KEN Box » et un de type « D Box », potentiellement impliqués dans la dégradation de la protéine en anaphase. Une carte récapitulative de l'ensemble des domaines identifiés est proposée figure 36A.

Des recherches dans les bases de données d'*Arabidopsis* ont permis d'identifier des protéines présentant des similarités avec AtTPX2. Bien que le pourcentage d'identité global ne soit pas très important (de 17 à 22 %), quatre d'entre elles possèdent des régions fortement conservées qui correspondent à certains des domaines caractérisés précédemment. Une analyse plus complète de l'ensemble des protéines identifiées est présentée en fin de chapitre.

N° d'accèsion du gène	N° d'accèsion de la protéine	Nom d'usage	Longueur de la protéine	PM	% d'identité avec AtTPX2	% d'identité entre elles
At4g22860	NP_194017	AtTLP1a	509 aa	58 kDa	22	60
At4g11990	NP_192936	AtTLP1b	501 aa	57 kDa	21	
At5g15510	NP_186749	AtTLP2a	488 aa	56 kDa	18	65
At3g01015	NP_197055	AtTLP2b	497 aa	56 kDa	17	

Tableau 6 : Comparaison des quatre protéines de type AtTPX2-Like identifiées dans les bases de données.

AtTLP1a et b possèdent les caractéristiques structurales essentielles d'AtTPX2

Les gènes *AtTLP1a* et *AtTLP1b* (TLP pour TPX2 Like Protein) codent pour des protéines de respectivement 509 et 501 acides aminés qui partagent 22 et 21 % d'identité avec AtTPX2 et 60 % d'identité entre elles. Elles possèdent cinq régions fortement similaires avec AtTPX2 (régions 1, 3, 4, 5 et 7 ; Figure 36).

La région 1 comprend deux séquences particulièrement bien conservées qui correspondent aux domaines de liaison aux kinases Aurora. Les régions 3, 4 et 5 sont également bien conservées et couvrent le premier domaine de liaison aux microtubules. AtTPX2 possède un NLS dans sa région 3 qui est présent dans AtTLP1a et b. On y retrouve une lysine et une arginine qui sont essentielles à l'activité du signal d'import d'AtTPX2. La zone de la région 5 correspondant au NES est également bien conservée et la présence de plusieurs leucines et autres résidus hydrophobes suggère que le signal d'export est fonctionnel. Le NLS 2, les « KEN boxes » 1 et 2 ainsi que le motif de liaison à Xklp2 ne sont pas présents dans AtTLP1a/b. La région 7 contenant le deuxième MBD n'est pas non plus bien conservée, à l'exception de la « KEN box » 3 et des acides aminés voisins.

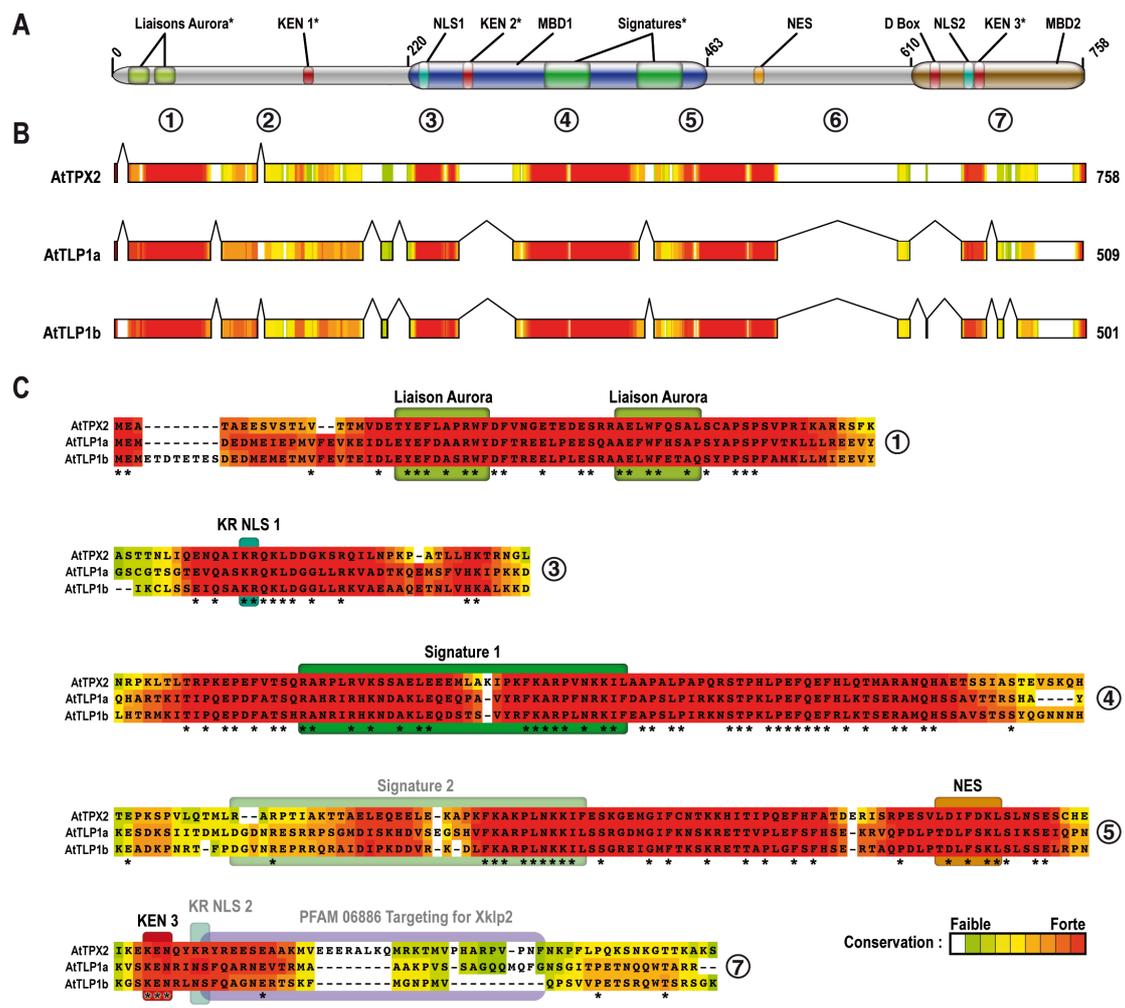


Figure 36 : Comparaison de la séquence protéique d'AtTPX2 avec celles d'AtTLP1a et b. **A** : Représentation schématique des différents domaines identifiés au sein d'AtTPX2. Les domaines marqués d'un astérisque ont été identifiés par analyse informatique. Les autres domaines ont été identifiés expérimentalement, en exprimant de manière transitoire des versions tronquées d'AtTPX2 fusionnées à la GFP dans des cellules BY-2 de tabac (voir article 1). AtTPX2 a été découpée arbitrairement en sept grandes régions afin de faciliter la comparaison avec les autres protéines. **B** : Alignement global faisant apparaître le degré de conservation des trois protéines. **C** : Alignement des séquences protéiques des zones les mieux conservées entre les trois protéines. Les numéros figurés à gauche des alignements correspondent aux régions définies précédemment. Les alignements ont été réalisés à l'aide du programme Tcoffee disponible sur le site «www.tcoffee.org» (Poiret et al. 2003).

AtTLP1a présente la même localisation subcellulaire qu'AtTPX2

Afin d'étudier la localisation subcellulaire d'AtTLP1a, la séquence codante du gène a été amplifiée par PCR puis fusionnée à la partie C-terminale de la GFP, sous le contrôle du promoteur 35S. La protéine de fusion a ensuite été exprimée par agroinfection dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana*.

Dans ce système, GFP-AtTLP1a présente une localisation nucléaire avec un net enrichissement au niveau de l'enveloppe (Figure 37A). On observe également un marquage des microtubules corticaux en augmentant la sensibilité de détection du microscope (Figure 37B). Certaines cellules présentent des structures nucléaires similaires à celles rencontrées avec AtTPX2. On observe en effet des ponctuations (Figure 37C) ou des filaments (Figure 37D), ainsi que de grosses structures arrondies de plusieurs µm de diamètre (Figure 37E).

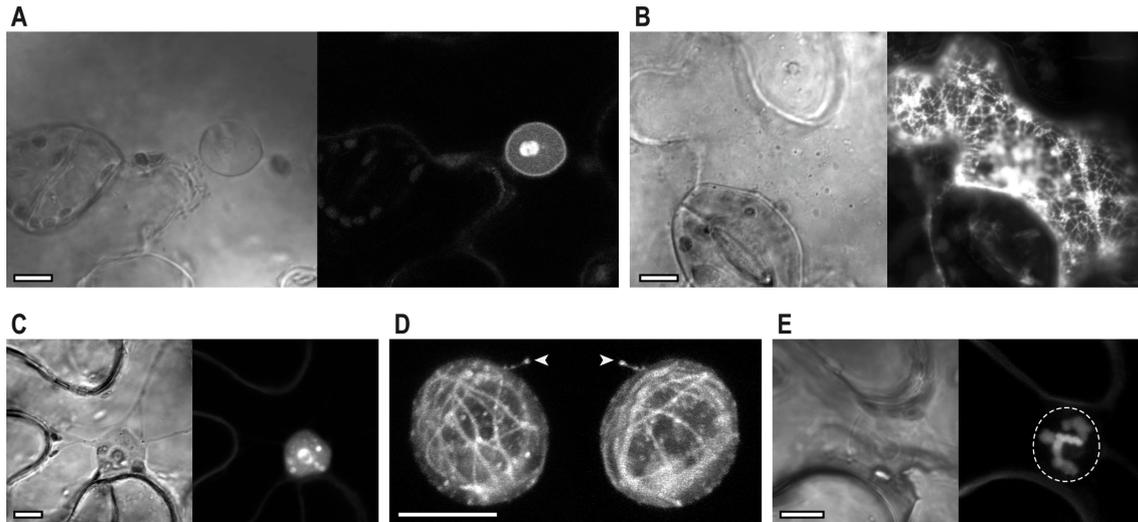


Figure 37 : Expression transitoire d'AtTLP1a par agroinfiltration de feuilles de *Nicotiana benthamiana*. A, C, D et E : Noyaux présentant un enrichissement du signal au niveau de l'enveloppe (A), des ponctuations (C), des filaments (D) ou de grosses structures arrondies (E). La flèche de l'image D montre un filament sortant de l'espace nucléaire. Il s'agit d'une reconstitution volumique montrant deux vues opposées d'un même noyau. B : Observation de la zone corticale montrant un marquage des microtubules. Barres d'échelle : 10 μ m.

Ces données suggèrent que les domaines conservés retrouvés par alignement de séquences sont fonctionnels dans la protéine GFP-AtTLP1a.

Les anticorps dirigés contre AtTPX2 reconnaissent également AtTLP1a

Les anticorps générés contre AtTPX2 ont été produits à partir du domaine central de la protéine. Ces anticorps révèlent une bande de haut poids moléculaire (PM) en Western blot, que ce soit sur extraits d'*Arabidopsis* (Figure 38A, flèche N°1) ou de *Pichia pastoris* produisant AtTPX2 (Figure 38B, flèche N°1). Une bande majeure correspondant à un PM de 60 kDa environ est également détectée sur extraits d'*Arabidopsis* (Figure 38A, flèche N°2).

Nous avons initialement interprété cette bande comme étant un produit de clivage d'AtTPX2. Cependant, le domaine d'AtTPX2 qui a servi à générer les anticorps est particulièrement bien conservé dans la séquence d'AtTLP1. Il a alors été testé si la bande de 60 kDa révélée en Western blot pouvait correspondre à AtTLP1.

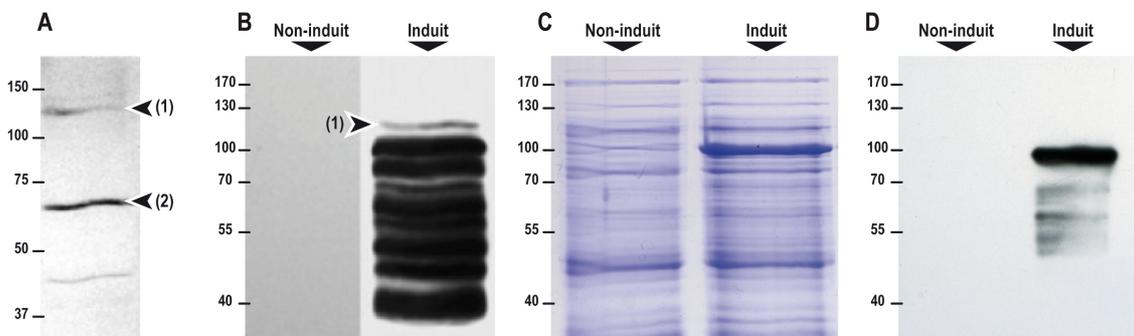


Figure 38 : Les anticorps anti-AtTPX2 reconnaissent AtTLP1a. A et B : Western blots réalisés à partir d'extraits totaux d'*Arabidopsis* (A) ou *Pichia pastoris* produisant AtTPX2 (B), en utilisant les anticorps anti-AtTPX2. Les anticorps reconnaissent une bande de 120 kDa (1) ainsi qu'une bande de 60 kDa (2). C et D : Expression bactérienne d'AtTLP1a avant ou après induction, analysée par coloration au bleu de Coomassie après transfert sur membrane (C) ou par Western blot en utilisant les anticorps anti-AtTPX2 (D).

Nous avons produit AtTLP1a fusionnée à la thiorédoxine dans *E. coli*, puis analysé l'extrait bactérien en Western blot en utilisant les anticorps anti-AtTPX2. Après induction, on observe l'apparition d'une bande nette à environ 100 kDa (Figure 38C). Cette bande est révélée par l'anticorps anti-AtTPX2 (Figure 38D). Aucun signal n'est détecté dans les extraits non-induits.

Ces résultats suggèrent que les anticorps anti-AtTPX2 reconnaissent AtTLP1a. Un contrôle de Western blot avec la thiorédoxine ou AtTLP1a seule sera cependant nécessaire pour le confirmer définitivement. Le même protocole pourra être suivi pour tester AtTLP1b.

AtTLP2a et b possèdent un domaine C-terminal similaire au MBD d'AtTPX2

AtTLP2a et AtTLP2b sont des protéines de 488 et 497 acides aminés partageant respectivement 18 et 17 % d'identité avec AtTPX2. Elles possèdent quatre régions présentant des similarités avec AtTPX2 dont deux qui sont particulièrement bien conservées (régions 6 et 7, Figure 39).

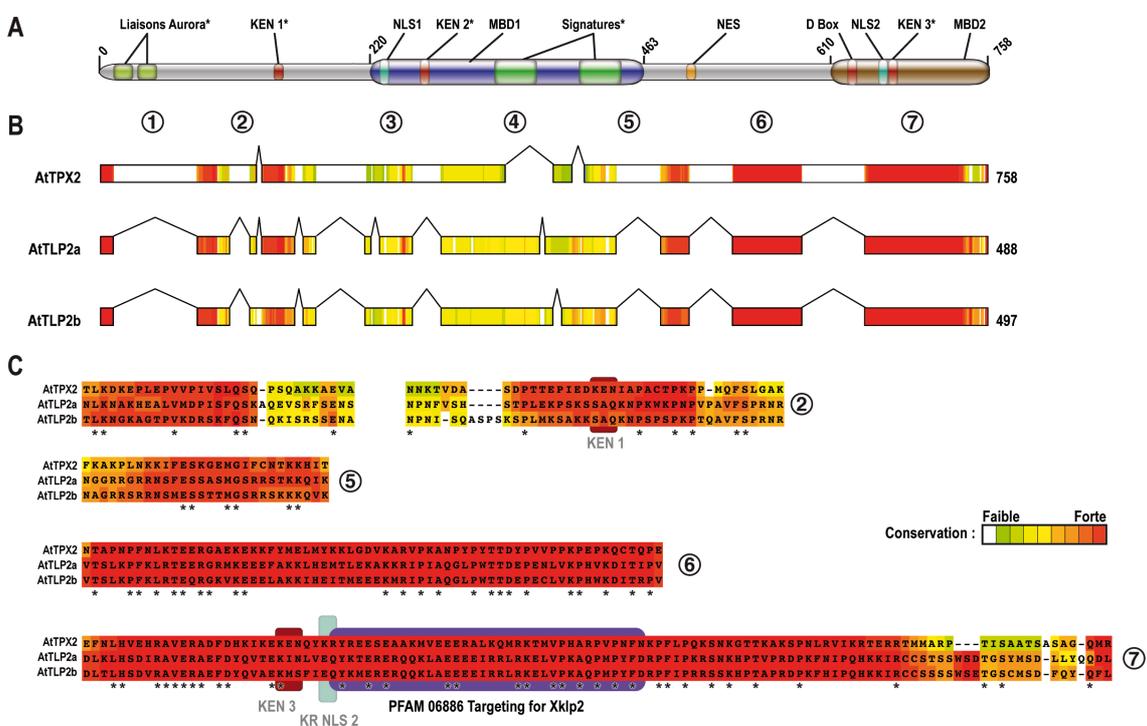


Figure 39 : Comparaison des séquences protéiques d'AtTPX2 et d'AtTLP2a et b. **A** : Représentation schématique des différents domaines identifiés au sein d'AtTPX2. **B** : Alignement global faisant apparaître le degré de conservation des trois protéines. **C** : Alignement des séquences protéiques des zones les mieux conservées entre les trois protéines. * : acides aminés identiques.

Les régions 2, 5 et 6 d'AtTPX2 dont la fonction est inconnue présentent des similarités avec les séquences d'AtTLP2a et b. La région 7, qui correspond au MBD d'AtTPX2, est également bien conservée. On retrouve dans cette zone une séquence consensus correspondant au domaine de liaison à Xklp2 (Pfam06886). La zone de la région 5 contenant le NES n'est pas présente dans AtTLP2a/b. Les « KEN boxes » 1 et 3, ainsi que les acides aminés K et R, essentiels à l'activité du NLS 2, ne sont pas conservés. Ces protéines ne possèdent par ailleurs ni le domaine de liaison à Aurora, ni le MBD central d'AtTPX2.

Le domaine C-terminal d'AtTPX2 et des AtTLP2a/b est également fortement similaire à la séquence de PttMAP20, une petite MAP de peuplier, et à son homologue d'*Arabidopsis* WVD2. La zone conservée recouvre la quasi totalité de la protéine de peuplier (Figure 40).

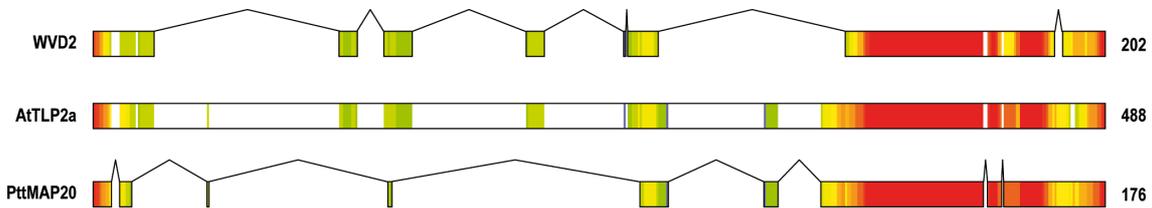


Figure 40 : Alignement global des séquences de WVD2, d'AtTLP2a et de PttMAP20 faisant apparaître le haut degré de conservation du domaine C-terminal des trois protéines.

AtTLP2a et b s'associent aux microtubules et forment des filaments intranucléaires

Afin d'analyser la localisation subcellulaire d'AtTLP2a et b, les séquences codantes des gènes ont été fusionnées à la partie C-terminale de la GFP, sous le contrôle du promoteur 35S. Les protéines de fusion ont ensuite été exprimées par bombardement dans des cellules BY-2 de tabac.

GFP-AtTLP2a et b semblent marquer les microtubules corticaux (Figures 41A et B) et fusoriaux (Figure 41C), suggérant que le domaine similaire au MBD2 d'*Arabidopsis* est fonctionnel. Ces protéines forment également des filaments intranucléaires, tout comme AtTPX2 et AtTLP1a. Dans certaines cellules, on observe la présence de ponctuations d'où semble émaner des câbles qui s'étendent vers le cytoplasme (Figures 41E et F).

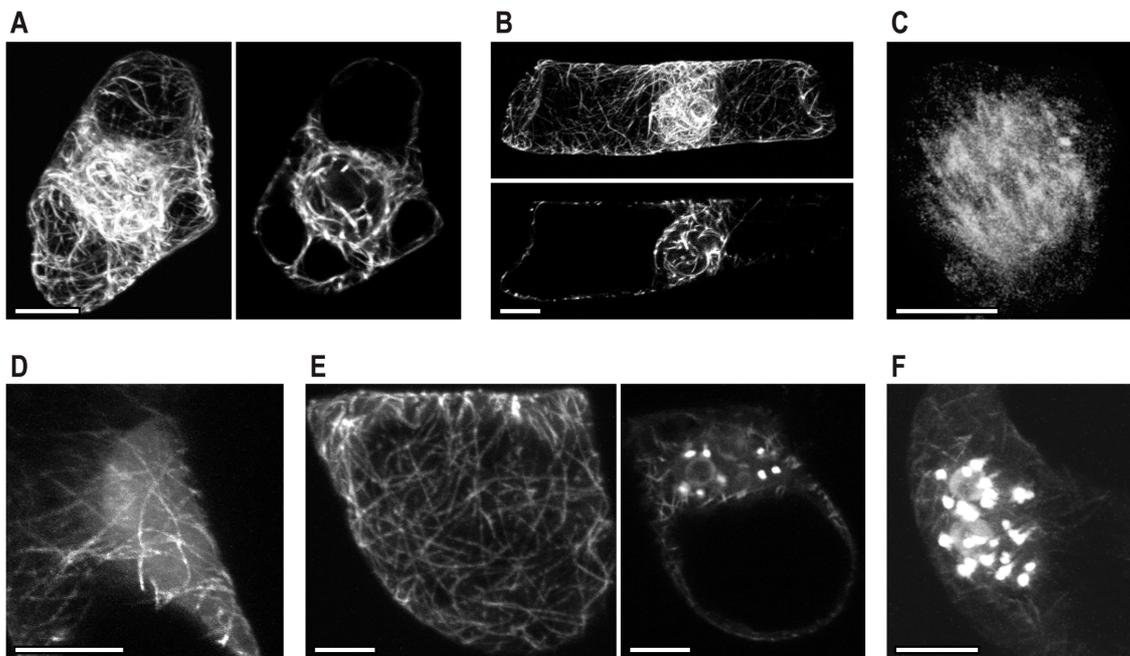


Figure 41 : Expression transitoire d'AtTLP2a et b par bombardement de cellule BY-2 de tabac. A et B : Projection (A/gauche et B/haut) et coupe confocale (A/droite et B/bas) de cellules exprimant soit GFP-AtTLP2a (A) soit GFP-AtTLP2b (B). On observe un marquage des microtubules corticaux et la formation de filaments intranucléaires. C : fuseau mitotique décoré par AtTLP2a. D, E, F : Projections (D, E/gauche) et coupes confocales (E/droite et F) de cellules exprimant AtTLP1a. Barres d'échelle : 10 μ m.

La protéine de fusion, d'une taille d'environ 85 kDa, devrait normalement être exclue de l'espace intranucléaire. Ceci suggère que, malgré l'absence de signaux d'adressage identifiables, la protéine est capable de transiter par le noyau. La GFP étant positionnée en N-terminal, il est également possible que la protéine de fusion que l'on observe ne soit qu'une version tronquée de la protéine sauvage, d'une taille suffisamment petite pour entrer dans le noyau par diffusion.

AtTLP2a et b transitent par le noyau

Afin de déterminer si AtTLP2a et b transitent activement par le noyau, des expériences d'expression transitoire ont été couplées à un traitement par la leptomycine B. Des cellules BY-2 bombardées exprimant AtTLP2a ou b ont été incubées dans du milieu contenant 100 nM de leptomycine B, puis observées en microscopie confocale.

On constate une diminution drastique du signal cytoplasmique et une augmentation significative du niveau de fluorescence dans le noyau (Figure 42). Il est toutefois possible de détecter un faible marquage des microtubules corticaux en augmentant la sensibilité de détection du microscope (Figure 42A, image de droite). On observe également une forte augmentation de la densité des structures nucléaires (Figure 42B). Ces données suggèrent que les protéines AtTLP2 transitent par le noyau.

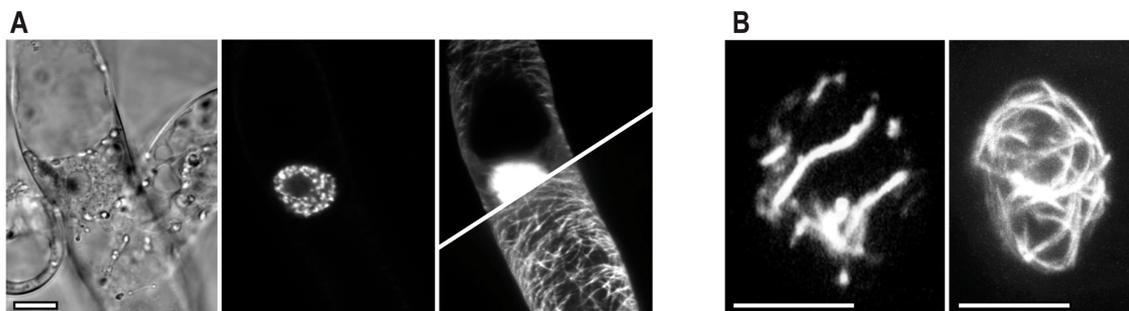


Figure 42 : L'inhibition de l'exportine augmente le rapport nucléo/cytoplasmique de GFP-AtTLP2a et b
A : Cellule BY-2 exprimant GFP-AtTLP2a observée après traitement à la leptomycine 100nM. On observe une diminution drastique du marquage des microtubules corticaux. L'image de droite montre qu'il est possible de révéler le marquage cortical en augmentant la sensibilité de détection du microscope. **B** : Noyau de cellules exprimant GFP-AtTLP2b traitées à la leptomycine montrant des structures filamenteuses. Barres d'échelle : 10 μ m.

Les filaments intranucléaires résistent au traitement à l'oryzaline

Les expériences de microscopie électronique réalisées sur BY-2 montrant ces filaments intranucléaires suggèrent que les câbles observés pourraient être des microtubules enrobés d'AtTPX2. Nous avons réalisés une série d'expériences, à la fois avec AtTPX2 et AtTLP2a/b, afin de déterminer si ces structures étaient microtubulaires ou d'une autre nature.

Nous avons traité des cellules BY-2 bombardées exprimant ces protéines avec de l'oryzaline, une drogue qui bloque la polymérisation des microtubules. Nous avons également réalisé des essais sur des cellules exprimant AtTLP2a/b traitées à la leptomycine B, afin d'augmenter le nombre de noyau montrant ces structures dans la population observée.

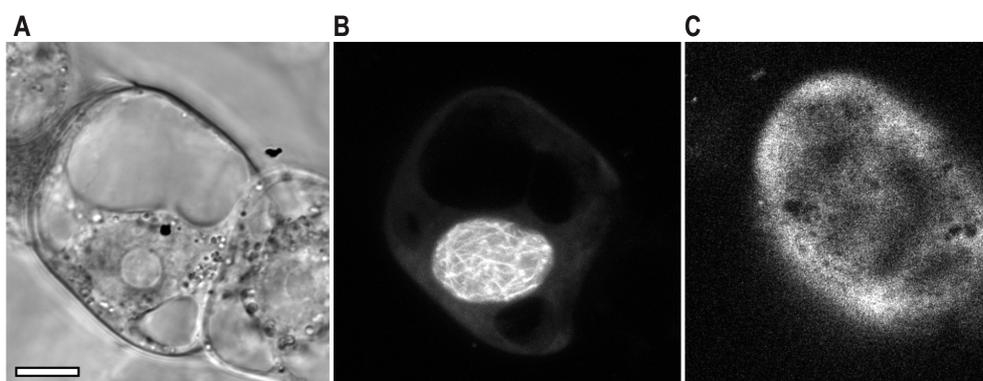


Figure 43 : Les filaments intranucléaires résistent au traitement à l'oryzaline. Cellule BY-2 exprimant AtTLP2a traitée avec de la leptomycine 100 nM et de l'oryzaline 10 μ M. **A** : Observation en DIC. **B** : Projection de coupes confocales. On observe des filaments intranucléaires. **C** : Projection de coupes correspondant à la zone corticale de la même cellule, après avoir augmenté la sensibilité de détection. Le signal cytoplasmique diffus que l'on observe démontre l'efficacité du traitement à l'oryzaline. Barre d'échelle : 10 μ m.

Dans tous les cas, le marquage cortical est remplacé par un signal cytoplasmique diffus, montrant d'une part que le traitement est efficace, et d'autre part que le marquage observé dans le cortex résultait bien de l'association des protéines avec les microtubules (Figure 43C). En revanche, les filaments nucléaires sont toujours présents, suggérant que ces structures ne sont pas microtubulaires (Figure 43B).

L'activité MAP des protéines surexprimées pourrait cependant affecter l'efficacité du traitement à l'oryzaline en stabilisant les filaments. Il se peut également que l'oryzaline ne pénètre pas efficacement dans le noyau. Des traitements prolongés ou avec des concentrations supérieures en oryzaline sont à prévoir.

D'autres protéines d'Arabidopsis possèdent des domaines d'AtTPX2

Au cours des recherches par comparaison de séquences, de nombreuses autres protéines présentant des degrés de similarité variables avec AtTPX2 ont été identifiées (Tableau 7).

N° d'accèsion du gène	N° d'accèsion de la protéine	Nom d'usage	Longueur	PM
At4g22860	NP_194017	AtTLP1a	509 aa	58 kDa
At4g11990	NP_192936	AtTLP1b	501 aa	57 kDa
At5g15510	NP_186749	AtTLP2a	488 aa	56 kDa
At3g01015	NP_197055	AtTLP2b	497 aa	56 kDa
At5g07170	NP_196334	AtTLP3a	394 aa	45 kDa
At5g62240	NP_201030	AtTLP3b	377 aa	43 kDa
At5g28646	NP_680247	WVD2	202 aa	23 kDa
At3g04630	NP_566233	WDL1	287 aa	32 kDa
At1g54460	NP_564659	WDL2	338 aa	37 kDa
At3g23090	NP_188950	WDL3	338 aa	38 kDa
At2g35880	NP_565829	WDL4	432 aa	47 kDa
At4g32330	NP_974659	WDL5	436 aa	47 kDa
At2g25480	NP_180118	WDL6	403 aa	44 kDa
At1g70950	NP_177251	WDL7	478 aa	53 kDa
At1g70100	NP_564984	-	467 aa	52 kDa
At1g24160	NP_173826	-	540 aa	60 kDa
At5g40700	NP_198886	-	302 aa	34 kDa
At3g27350	NP_566147	-	391 aa	44 kDa
At3g26050	NP_189234	-	533 aa	59 kDa
At1g23060	NP_564188	-	367 aa	41 kDa

Tableau 7 : Récapitulatif des protéines d'Arabidopsis partageant des similarités avec AtTPX2.

L'arbre relationnel présenté figure 44 a été obtenu à partir de l'alignement de différentes TPX2s animales et des protéines d'Arabidopsis qui y sont apparentées. Il fait apparaître différents groupes de protéines.

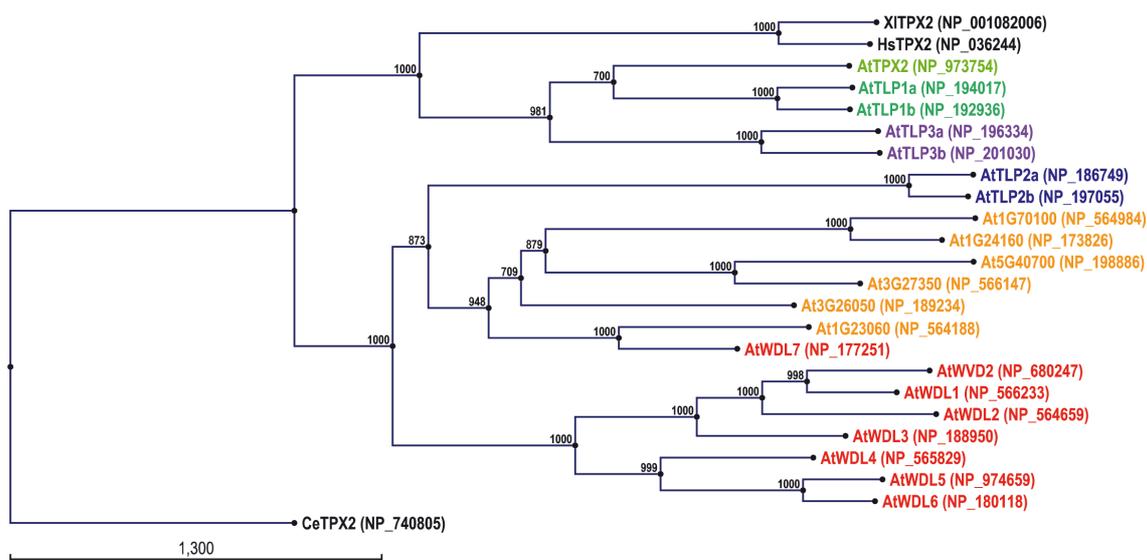


Figure 44 : Arbre relationnel réalisé à partir de l'alignement des TPX2 like d'Arabidopsis, des TPX2s de xénope et humaine, ainsi que le TPX2 like de Caenorhabditis. L'arbre a été réalisé avec le programme CLC Main Workbench en utilisant un algorithme de type «Neighbor Joining» (Saitou et Nei 1987). La robustesse des noeuds de l'arbre a été testée avec un «bootstrap» de 1000.

Sur cet arbre, AtTPX2 est la protéine d'*Arabidopsis* la plus proche des TPX2s de xénope et humaine. Les protéines AtTLP1a et b se retrouvent associées à deux nouvelles protéines, AtTLP3a et b, qui partagent des similarités avec les régions N-terminale et centrale d'AtTPX2 (Figure 45).

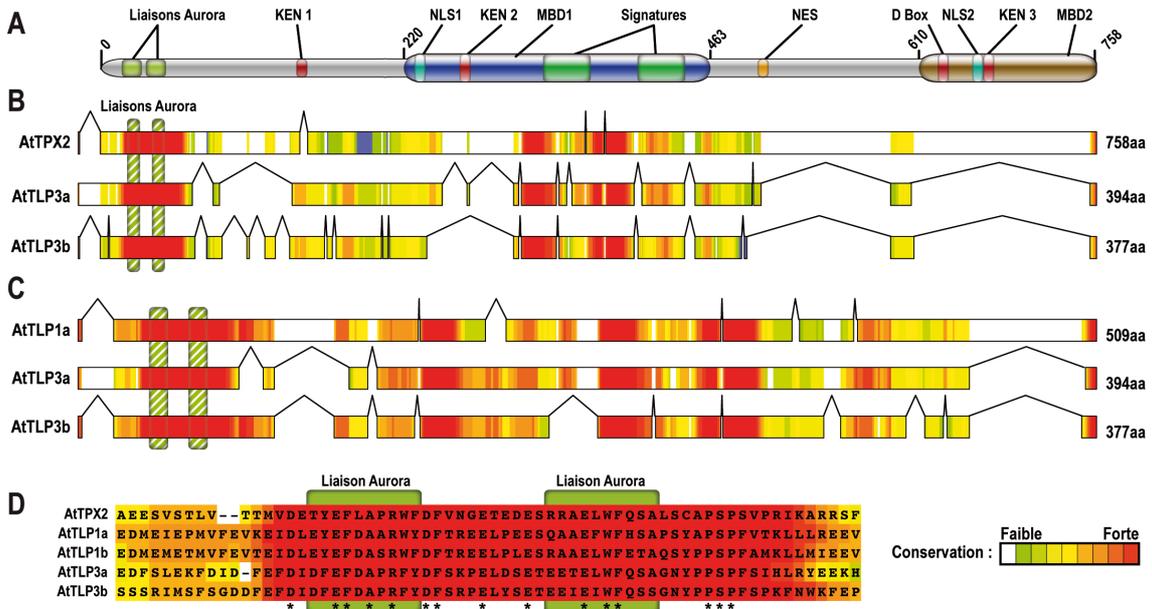


Figure 45 : AtTLP3a et AtTLP3b possèdent un domaine de liaison aux kinases Aurora A.
A : Structure d'AtTPX2. **B et C :** Zone conservées entre AtTLP3a/b et AtTPX2 (B) ou AtTLP3a/b et AtTLP1a (C). **D :** Alignement des domaines de liaisons à Aurora A commun aux différentes protéines.

Ces protéines possèdent le domaine de liaison à Aurora, mais les « signatures » sont en revanche absentes et le MBD1 est moins bien conservé. On retrouve une « KEN Box », mais qui est positionnée différemment, dans une zone peu conservée. Bien que ne possédant pas le NLS d'AtTPX2, les deux protéines sont cependant prédites pour être nucléaires et possèdent de plus un NES putatif dans leurs séquences C-terminales. Elles se rapprochent davantage, de part leur petite taille et leur structure, des protéines AtTLP1s que d'AtTPX2.

AtTLP2a et b semblent plus proches d'un autre groupe incluant les membres de la famille des WDLs, ainsi que six autres protéines de fonction inconnue.

Les protéines WDLs possèdent toutes un domaine de type Pfam06886 (domaine de liaison à Xklp2) incluant la séquence plante-spécifique « KLEEK » (Yuen et al. 2003). Ces protéines, ainsi qu'AtTLP2a et b, ne possèdent ni le premier MBD, ni le domaine de liaison aux kinases Aurora. WDL7 possède en plus dans sa région N-terminale un domaine de fonction inconnue qui se retrouve dans six autres protéines d'*Arabidopsis*, ainsi que dans d'autres protéines de plante. Une représentation schématique de la structure des différents TPX2 like d'*Arabidopsis* est proposée Figure 46.

Analyse comparative *in silico* de l'expression d'AtTPX2 et des AtTLPs

Nous ne disposons que de peu de données sur le rôle des AtTPX2 like *in planta*. Les outils d'analyse *in silico* disponibles sur internet permettent d'avoir des informations préliminaires qui peuvent parfois donner des pistes intéressantes. Nous avons comparé, à l'aide des outils disponibles sur le site « <https://www.genevestigator.com/> », le profil d'expression des différentes TPX2 like identifiées ainsi que celui d'autres MAPs connus.

L'expression d'AtTPX2 est en partie corrélée avec celle d'AtTLP1a. On note une plus forte expression au niveau des tissus méristématiques, ce qui concorde avec l'analyse du promoteur d'AtTPX2. Aucune donnée d'expression n'était disponible pour AtTLP1b. AtTLP2a et b sont fortement exprimées dans les cellules spermatiques. Bien que d'autres MAPs telles que MOR1 ou la MAP65-5 soient également surexprimées dans ces cellules, AtTLP1a est la seule dont l'expression est réellement spécifique. L'intensité du signal d'hybridation est par ailleurs près de 10 fois supérieure à celle des autres MAPs.

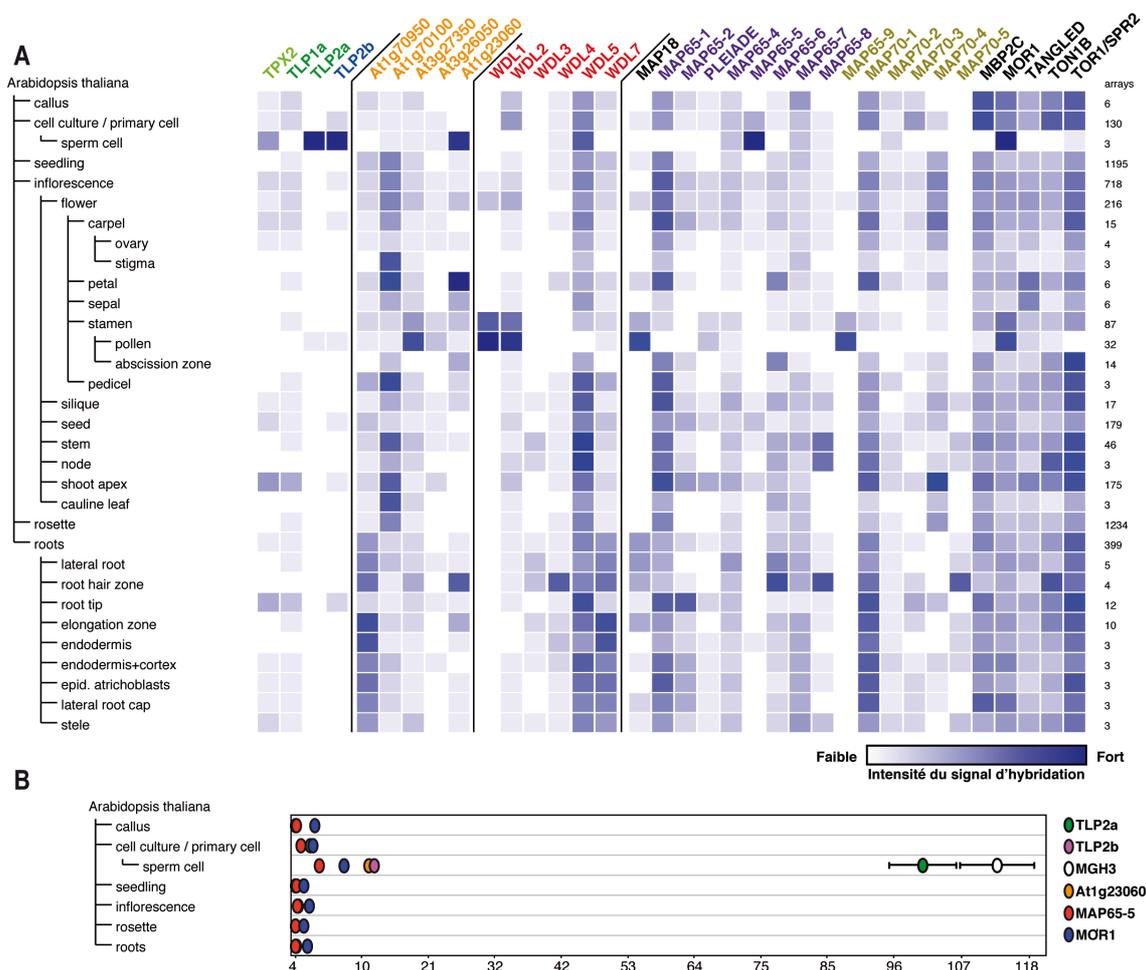


Figure 47 : Profils d'expression obtenus *in silico* comparant l'expression d'AtTPX2, des gènes codant pour les AtTPX2s like et quelques autres MAPs dans différents tissus d'Arabidopsis. A : Comparaison des profils d'expression de l'ensemble des TPX2 like et d'autres MAPs pour lesquelles des données d'hybridation étaient disponibles. La densité du bleu est proportionnelle à l'intensité du signal d'hybridation. **B :** Expression comparée de protéines surexprimées dans les cellules spermatiques. TLP2a présente un fort signal d'expression comparable à MGH3, une histone fortement exprimée dans les cellules spermatiques. Ces analyses ont été réalisées à l'aide des outils disponibles sur le site « <https://www.genevestigator.com/> ».

L'assemblage du fuseau mitotique des plantes supérieures est orchestré par des voies de signalisation complexes qui sont encore mal comprises. TPX2 est un des acteurs clé des voies d'assemblages animales. Nous avons identifié la protéine d'*Arabidopsis* homologue à TPX2 et au travers de différentes expériences présentées dans la première partie de la thèse, nous avons démontré qu'AtTPX2 présentait les caractéristiques fonctionnelles essentielles de la protéine animale.

AtTPX2 : l'orthologue de TPX2 animal ?

Le comportement dynamique d'AtTPX2 est en grande partie similaire à celui de la protéine animale (Figure 48). En interphase, AtTPX2 est localisée au niveau du noyau. On observe un enrichissement significatif au niveau de l'enveloppe qui peut s'étendre au niveau des microtubules entourant le noyau. De manière intéressante, AtTPX2 est exportée avant la rupture de l'enveloppe et marque le fuseau prophasique. Puis AtTPX2 se retrouve associée aux microtubules du fuseau métaphasique mais ne marque pas les microtubules interpolaire du centre du fuseau en anaphase. La protéine est ensuite rapidement dégradée.

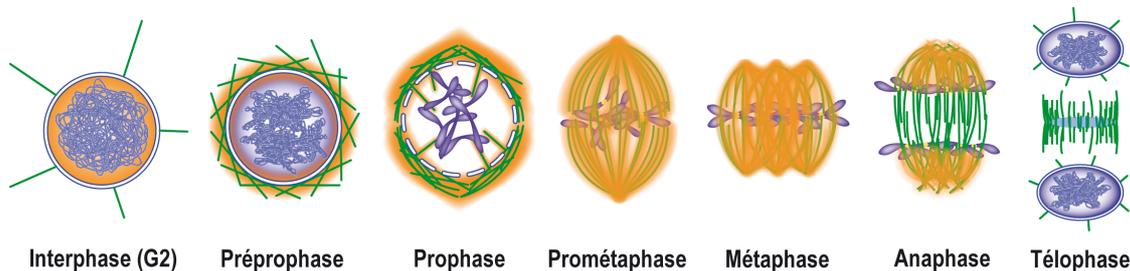


Figure 48 : Dynamique d'AtTPX2 au cours du cycle.

Code couleur : AtTPX2 en orange, ADN en bleu, microtubules en vert.

Nous avons démontré qu'AtTPX2 est capable de nucléer des microtubules dans des extraits d'œuf de xénope dépourvus de TPX2 endogène. Une plus forte concentration de protéine est cependant requise. AtTPX2 est également capable de nucléer des microtubules *in vitro* en présence de tubuline et de GTP, et présente dans ce système une activité équivalente à celle de la protéine animale. AtTPX2 est de plus capable d'interagir avec l'importine α de xénope. Cette interaction est régulée par RanGTP, tout comme la protéine animale, suggérant l'existence de modes de régulation conservés.

L'injection d'anticorps anti-TPX2 (contre la protéine humaine ou celle d'*Arabidopsis*) dans le cytoplasme de cellules cyclantes inhibe la formation du fuseau prophasique. Les anticorps reconnaissent et séquestrent AtTPX2, bloquant *de facto* sa fonction dans la nucléation des microtubules et la formation du fuseau prophasique. La protéine possède un NES qui lui permet d'être exportée et d'agir à l'extérieur du noyau avant la rupture de l'enveloppe. Cette dynamique particulière est une spécificité végétale.

Différents niveaux de régulation contrôlent la protéine

La dégradation d'AtTPX2 en anaphase est inhibée par le MG132, ce qui démontre l'intervention du protéasome et par conséquent la nécessité pour AtTPX2 d'être ubiquitinée avant d'être dégradée. L'ubiquitination de TPX2 animal se fait par l'intermédiaire de l'APC^{Cdh1} qui reconnaît deux motifs présents dans la région N-terminale de TPX2 : une « KEN box » et un motif original propre à TPX2 (Stewart et Fang 2005). Aucune de ces deux séquences n'est retrouvée dans la région N-terminale d'AtTPX2. Cependant, la présence de trois « KEN Boxes » et d'une « D box » à d'autres positions dans la protéine suggère que sa dégradation par le protéasome pourrait être également contrôlée par l'APC.

Dans ce contexte, des versions de GFP-AtTPX2 mutantes pour chacune des trois « KEN Boxes » ont été générées. Ces protéines mutantes ont été exprimées de manière transitoire dans *N. benthamiana* et présentent la même localisation que GFP-AtTPX2 (données non présentées). Cependant, l'expression transitoire ne permet pas d'avoir d'information sur la dynamique des protéines au cours du cycle. Des plantes stables sont en cours d'obtention afin d'évaluer si l'une des trois protéines mutantes n'est plus dégradée en fin de division. Plusieurs « KEN Boxes » sont peut-être reconnues par l'APC et des combinaisons de double ou triple mutants sont à prévoir. D'autres signaux non identifiables par analyse bioinformatique pourraient également être impliqués, comme c'est le cas pour TPX2 animal.

Le promoteur d'AtTPX2, nettement plus actif dans les tissus méristématiques, impose une restriction spatiale de l'expression du gène aux cellules susceptibles de se diviser. Il serait intéressant d'étendre l'analyse de l'activité du promoteur à d'autres stades développementaux, notamment lors de la formation des organes floraux, ou bien à des stades plus précoces du développement de la plante.

AtTPX2 est donc régulée finement, à la fois au niveau de l'activité de son promoteur et par dégradation *via* le protéasome. Cette combinaison permet un contrôle spatio-temporel précis de la présence de la protéine. L'instabilité intrinsèque d'AtTPX2 pourrait être également une caractéristique importante de son mode de régulation, permettant une disparition rapide de la protéine lorsque le gène n'est plus transcrit. L'existence d'autres niveaux de régulation pourrait être envisagée, comme la stabilité de l'ARNm ou des modifications post-traductionnelles régulant l'activité de la protéine.

Interaction possible avec Aurora ?

L'activation de TPX2 animal se fait par phosphorylation via la kinase Aurora A qui est activée par TPX2 en retour (Eyers et Maller 2004). AtTPX2 n'interagit pas avec Aurora A de xénope. Cependant, des analyses comparatives basées sur les données cristallographiques du domaine d'interaction TPX2/Aurora A suggèrent qu'AtTPX2 pourrait interagir avec les kinases AtAURORA 1 ou 2 par son domaine N-terminal. Les séquences codantes de ces kinases ont été clonées et des essais de production sont en cours. Des expériences de phosphorylation *in vitro* d'AtTPX2 par ces kinases ont été envisagées. Les difficultés inhérentes à l'instabilité de la protéine ne permettent pas de produire efficacement AtTPX2 dans sa totalité. Ces essais pourraient être réalisés avec la partie N-terminale d'AtTPX2.

Afin d'identifier des partenaires possibles pour AtTPX2, un criblage double hybride avec la protéine pleine longueur a été tenté. Les levures transformées avec la construction présentaient des problèmes de croissance probablement dus à une toxicité de la protéine. Le crible n'a

pas apporté de résultat concluant. Des essais avec les parties N- ou C-terminales de la protéine seront tentés. Si ces constructions n'altèrent pas la croissance des levures, elles devraient également permettre de tester l'interaction de ces domaines avec les kinases Aurora ou d'autres partenaires.

D'autres TPX2 chez Arabidopsis ?

Des recherches par comparaison de séquences nous ont permis d'identifier des protéines possédant des domaines communs avec AtTPX2.

AtTLP2a/b possèdent des similarités avec le MBD de la partie C-terminale d'AtTPX2. L'expression transitoire de ces protéines fusionnées à la GFP montre qu'elles sont capables de se lier aux microtubules. Elles semblent par ailleurs posséder des signaux d'import/export permettant leur transit nucléo-cytoplasmique. Le MBD C-terminal se retrouve également au sein des membres de la famille WDL, d'autres MAPs d'*Arabidopsis*. WDL7 présente par ailleurs un domaine N-terminal retrouvé dans un groupe de protéine de fonction inconnue. La surexpression de WVD2 ou WDL1 entraîne des problèmes développementaux sévères associés à des défauts d'organisation du cytosquelette cortical (Yuen et al. 2003; Perrin et al. 2007). PttMAP20, une petite protéine de peuplier dont la séquence est très similaire au MBD C-terminal, semble être impliquée dans la synthèse de la paroi secondaire (Rajangam et al. 2008). La surexpression de la protéine chez *Arabidopsis* provoque une torsion hélicoïdale des cellules épidermiques. Selon les auteurs, la protéine pourrait agir en guidant les fibrilles de cellulose au niveau du cortex microtubulaire. Le domaine C-terminal d'AtTPX2 semble être utilisé par ces protéines pour assurer des fonctions essentielles dans l'organisation du réseau de microtubule interphasique.

AtTLP1a et b possèdent le domaine de liaison aux kinases Aurora, le domaine central de liaison aux microtubules et les signaux d'import/export nucléaire. La localisation de la protéine de fusion GFP-AtTLP1a suggère que l'activité de ces domaines est la même que celle de ceux présents dans AtTPX2. GFP-AtTLP1a s'accumule au niveau de l'enveloppe, ce qui, pour AtTPX2, résulte d'un import/export constant de la protéine (ce marquage disparaît après traitement à la leptomycine). La protéine est de plus capable de s'associer aux microtubules corticaux. La « KEN box » 3 d'AtTPX2 est également conservée dans ces protéines et pourrait jouer un rôle important. Ces protéines ne possèdent en revanche pas de séquence de type « D box ». Des plantes exprimant de manière stable GFP-AtTLP1a sont en préparation. Si GFP-AtTLP1 est également dégradée en fin d'anaphase, il serait intéressant d'étudier sa régulation par l'APC en mutant la seule « KEN box » présente dans la protéine. La production d'AtTLP1a étant plus aisée que celle d'AtTPX2, des essais *in vitro* d'ubiquitination par l'APC de versions sauvage et mutée seraient plus simples à réaliser et permettraient d'obtenir une réponse significative. Des essais de phosphorylation par les kinases Aurora seront également réalisés.

AtTLP3a et b possèdent, elles aussi, le domaine de liaison à Aurora présent dans AtTPX2, mais ont une structure d'ensemble différente. Dans le monde animal, ce domaine particulier n'est présent que dans les TPX2s, suggérant à nouveau une diversification spécifique aux plantes.

Nucléation de microtubules dans le noyau ?

Des expériences d'expression transitoire utilisant différents systèmes biologiques ont montré qu'AtTPX2 et les AtTLPs 1 et 2 étaient capables de former des ponctuations et des câ-

bles intranucléaires. La nature exacte de ces structures n'est pas encore déterminée. Bien que l'analyse en microscopie électronique suggère une nature microtubulaire, les filaments résistent au traitement à l'oryzaline. La fonction stabilisatrice de ces MAPs pourrait cependant empêcher la dépolymérisation des microtubules en contrecarrant l'effet de l'oryzaline. Le fait que ces câbles soient à l'intérieur du noyau pourrait également réduire l'efficacité du traitement en limitant la diffusion de la drogue. Ces protéines, qui possèdent de grandes régions « coiled coil », pourraient également polymériser entre elles comme peuvent le faire les filaments intermédiaires animaux. La surexpression de TPX2 en système animal conduit également à l'apparition de structures intranucléaires assez semblables à celles que nous avons observées dans les cellules végétales (Wittmann et al. 2000) (Figure 49). Il est fortement probable que ces structures soient uniquement liées au taux anormalement important de TPX2 dû à l'expression massive de protéines transgéniques.

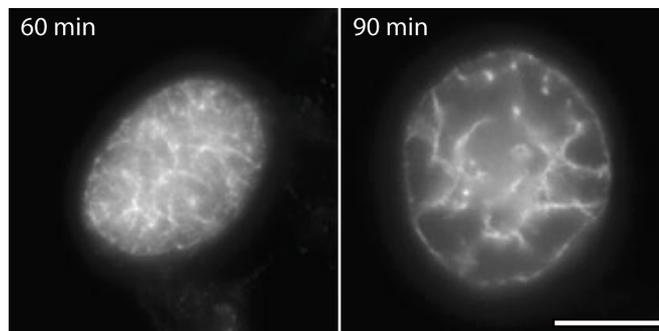


Figure 49 : Structure nucléaires formées par TPX2 animale (Wittmann et al. 2000). Barre d'échelle : 10 μ m.

En supposant que ces filaments soient effectivement des microtubules, on peut imaginer un mécanisme de nucléation similaire à ce qui est connu pour TPX2 animal. On voit en effet, en plus des câbles, de petites sphères et des filaments courts qui pourraient correspondre à des étapes de nucléation intermédiaires. Le mécanisme de nucléation proposé pour TPX2 animale passe en effet par la formation d'amorces ou « seeds », suivie par la croissance de petits microtubules puis par leur association en faisceaux (Schatz et al. 2003). Les différentes conditions physiologiques rencontrées au sein des cellules bombardées pourraient favoriser la formation de « seeds » puis leur agrégation, ou leur évolution rapide en filaments puis en faisceaux (Figure 50).

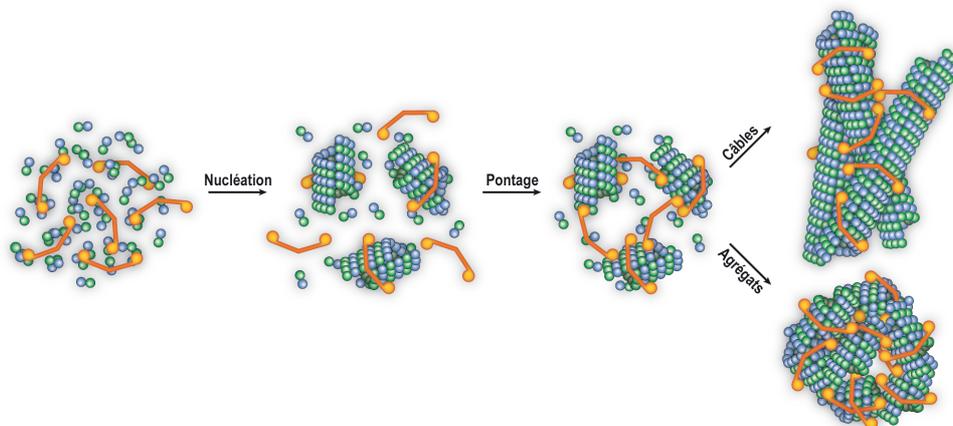


Figure 50 : Modèle de nucléation possible expliquant la formation des différentes structures nucléaires après surexpression d'AtTPX2. Inspiré de (Schatz et al. 2003).

Bien que la tubuline soit normalement absente du noyau, on sait que dans certaines conditions, notamment lors de stress au froid, elle s'y retrouve en abondance. De plus, les tubulines α/β possèdent des séquences NES qui permettent leur export (Schwarzerova et al. 2006; Akoumianaki et al. 2009). Il est possible qu'en conditions physiologiques, la tubuline soit importée et exportée en continu. L'activité de nucléation d'AtTPX2 et des AtTLPs, associée à une forte concentration intranucléaire de ces protéines, pourrait entraîner la polymérisation de la tubuline qui transite par le noyau.

Les protéines AtTLP 1 et 2 ont des structures différentes et ne possèdent pas le même domaine de liaison aux microtubules. On est en droit de supposer que, si ces protéines sont effectivement capables de nucléation, elles agissent par des mécanismes différents. On sait par ailleurs que les domaines N- et C-terminaux de TPX2 de xénope sont tous deux capables de nucléer des microtubules (Brunet et al. 2004). Le domaine N-terminal est capable de nucléer des microtubules *in vitro* et de s'y lier directement, mais n'est cependant pas suffisant pour restaurer la fonction de nucléation d'AtTPX2 dans des extraits de xénope. Le domaine C-terminal, qui ne se lie pas directement à la tubuline, est en revanche capable d'induire la formation du fuseau dans des extraits de xénope. AtTLP1 et 2, qui présentent des similarités avec soit la partie N- ou C-terminale de TPX2, pourraient avoir des fonctions équivalentes. AtTPX2, qui partage des similarités avec l'intégralité de la protéine animale, est par ailleurs capable d'à la fois stimuler la nucléation de microtubules à partir de tubuline pure, et d'induire la formation d'asters dans des extraits de xénope.

Redondance fonctionnelle des TPX2 like d'Arabidopsis ?

Les TPX2s animales ne sont présentes qu'en un seul exemplaire par organisme. Si la protéine pleine longueur n'est également présente qu'en une seule copie, on observe une diversification des TPX2s like chez les plantes (voir l'arbre présenté Figure 51). Ces protéines, qui possèdent des homologies de séquence avec les parties N- ou C-terminales, pourraient être codées par des gènes paralogues dérivant d'un même gène ancestral dont les TPX2s végétaux seraient les « héritiers directs », possédant l'ensemble des domaines fonctionnels. Une certaine redondance pourrait toutefois exister entre ces protéines.

AtTLP1a et b, qui possèdent le plus haut degré d'homologie avec AtTPX2, présentent de plus un profil d'expression très similaire (déterminé *in silico*) et la même localisation subcellulaire. Ces protéines sont toutes deux reconnues par les anti-AtTPX2. Ces données suggèrent que lors des expériences de microinjection, les anticorps ont pu bloquer à la fois TPX2 et les deux TLPs (si toutefois ces protéines existent chez *Tradescantia*). L'effet observé pourrait donc provenir du blocage cumulé de ces trois protéines.

Une stratégie d'ARN interférence (ARNi) ciblant AtTPX2 ou AtTLP1a et b a été initiée. Les séquences codantes pour les AtTLP1s possèdent en effet des blocs de nucléotides conservés qui devraient permettre d'éteindre simultanément l'expression des deux gènes. Les constructions ARNi ont été clonées sous la dépendance d'un promoteur inductible, ce qui permettra de déclencher l'extinction du gène après le développement de la plante. La caractérisation de mutants d'insertion d'ADN-T pour chaque gène est également en cours. Des croisements entre différents mutants et/ou plantes ARNi sont prévus. L'analyse de ces plantes devrait permettre de déterminer le rôle et l'importance relative de chaque protéine.

Des analyses réalisées *in silico* suggèrent que les AtTLP2s sont surexprimées au niveau des cellules spermatiques. L'expression restreinte d'AtTLP2a laisse supposer un rôle spécifique de la protéine dans l'organisation du cytosquelette de ces cellules particulières.

Les promoteurs des deux gènes possèdent des boîtes « W-boxes », séquences reconues par les facteurs de transcription de type WRKY. Des expériences de pull-down ont montré que ces séquences étaient capables d'interagir avec le facteur WRKY53 qui est notamment impliqué dans la régulation du processus de sénescence des feuilles (Miao et al. 2004). Cette interaction n'a toutefois pas pu être confirmée par gel retard.

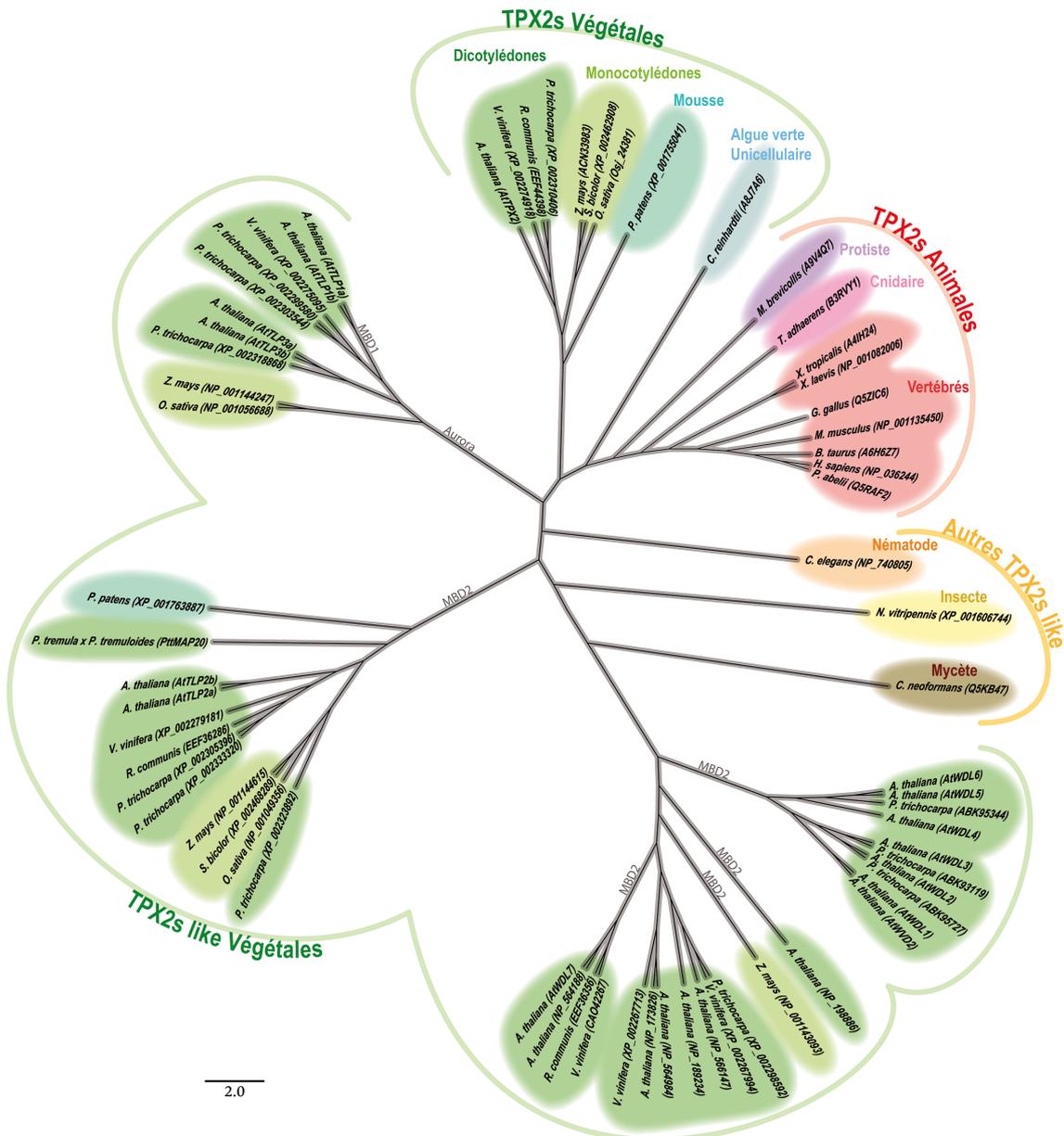


Figure 51 : Cladogramme faisant figurer les différentes protéines TPX2s animales et végétales, ainsi que l'ensemble des TPX2s like identifiées au cours de ce travail. L'alignement et l'arbre initial ont été réalisés en utilisant le logiciel CLC Main Workbench. Puis l'arbre a été édité dans le logiciel FigTree et mis en couleurs dans Adobe Illustrator.

Conclusion générale

L'ensemble des données structurales et fonctionnelles que nous avons établi pour AtTPX2 suggère qu'il s'agit de l'orthologue véritable de la protéine animale. La dynamique d'export, propre à la protéine végétale, permet à AtTPX2 d'agir à l'extérieur du noyau et de nucléer le fuseau prophasique avant la rupture de l'enveloppe.

Le détournement de certains domaines fonctionnels présents dans TPX2 originelle a conduit à la création de nouvelles protéines végétales aux fonctions encore inconnues. Les protéines AtTLP1s et AtTLP2s ne possèdent en effet qu'une partie des domaines de TPX2. D'autres régions encore non caractérisées pourraient conférer des fonctions particulières à ces protéines.

Ainsi, mes recherches axées au départ sur l'analyse fonctionnelle d'une protéine unique impliquée dans la formation du fuseau mitotique ont permis de découvrir d'une part des spécificités fonctionnelles de son activité dans les cellules végétales, et d'autre part un grand nombre de paralogues insoupçonnés montrant la grande variation évolutive développée chez les plantes.

Matériel et Méthodes

Matériel

1. Micro-organismes

1.1. Souches d'*Escherichia coli* utilisées pour le clonage

Nom de la souche	Génotype
DH5- α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-arg-F)U169, hsdR17($r_K^- m_K^+$), λ^-
TOP10 (Invitrogen)	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ^-
NEB turbo (New England Biolabs)	F' proA ⁺ B ⁺ lacI ^Q Δ lacZM15/ fhuA2 Δ (lac-proAB) glnV gal R(zgb-210::Tn10) Tet ^S endA1 thi-1 Δ (hsdS-mcrB)5

Les souches DH5- α et TOP10 sont porteuses d'une mutation dans le gène codant pour la recombinase recA. L'enzyme mutée n'est plus fonctionnelle, ce qui réduit les risques de recombinaison entre le plasmide cloné et l'ADN bactérien. La souche TOP 10 a été utilisée pour l'ensemble des clonages faisant intervenir la technologie Gateway®.

1.2. Souches d'*Agrobacterium tumefaciens* utilisées pour la transformation de matériel végétal

Nom de la souche	Description
GV3101	Cette souche est utilisée pour les agroinfiltrations et les transformations d' <i>Arabidopsis</i> par « floral dip ». Elle porte le plasmide Ti désarmé pMP90 portant les gènes Vir nécessaires au transfert du T-DNA dans le génome végétal. Elle est résistante à la gentamicine (plasmide Ti pMP90) et la rifampicine (résistance chromosomique).
LBA4404	Cette souche a les mêmes caractéristiques que la GV3101 mais est moins virulente. Elle est utilisée pour les transformations de cellules BY-2 de tabac. Elle est résistante à la rifampicine (chromosomique), la spectinomycine et la streptomycine (plasmidique).

1.3. Souches utilisées pour la production de protéines

Nom de la souche	Génotype
<i>E. coli</i> BL21 Star™ (DE3) One Shot® (Invitrogen)	F - ompT hsdS B (r B - m B -) gal dcm rne131 (DE3) BL21 Star™
<i>E. coli</i> LMG194 (Invitrogen)	F- Δ lacX74 gal E thi rpsL Δ phoA (Pvu II) Δ ara714 leu::Tn10
<i>Pichia pastoris</i> X33 (Invitrogen)	Souche sauvage, sensible à la Zéocine.

Milieux et antibiotiques

Les souches bactériennes utilisées pour le clonage et la transformation de matériel végétal ont été cultivées dans du milieu LB (Luria Bertani) additionné d'antibiotiques adéquats. Les souches de bactérie et de levure utilisées pour la production de protéine ont été cultivées selon les recommandations du fabricant (Invitrogen).

Milieu LB	Bacto-Tryptone 1 % ; extraits de levure 0,5 % ; NaCl 0,5 % ; pH 7,4
Antibiotiques	Ampicilline : 100 μ g/mL ; Chloramphénicol : 30 μ g/mL ; Gentamicine : 100 μ g/mL ; Hygromycin B : 30 μ g/mL ; Kanamycine : 50 μ g/mL ; Rifampicine : 20 μ g/mL ; Spectinomycine : 100 μ g/mL ; Streptomycine Sulfate : 10 μ g/ml ; Tétracycline : 20 μ g/mL ; Zéocine : 50 μ g (bactéries) / 150 μ g (levures)

2. Plantes et cultures cellulaires végétales

2.1. *Arabidopsis thaliana*

Les plantes transgéniques élaborées au cours de ce travail de thèse ont été produites à partir de l'espèce *Arabidopsis thaliana* de l'écotype Col 0. Les plantes ont été cultivées dans les serres de l'IBMP en suivant les conditions suivantes : photopériode jour/nuit de 12/12H, température de 20/18 °C, 80 % d'humidité, luminosité de 10 kilolux minimum.

2.2. *Nicotiana benthamiana*

Les expériences d'expression transitoire ont été réalisées sur des plantes de *N. benthamiana* âgées de 15 jours. Les plantes ont été cultivées dans les serres de l'IBMP en suivant les conditions suivantes : photopériode jour/nuit de 12/12H, température de 20 °C, 50 % d'humidité, luminosité de 10 kilolux minimum.

2.3. Culture *in vitro* de plantules d'*Arabidopsis*

Les graines sont stérilisées puis déposées sur boîte de Pétri contenant le milieu Mursahige et Skoog (MS). Pour la sélection de lignées transgéniques, le milieu est supplémenté d'antibiotiques adaptés. Après une étape de vernalisation de 3 jours à 4 °C et à l'obscurité, les boîtes sont placées en chambre de culture en suivant les conditions suivantes : photopériode jour/nuit de 16/8H, température de 20/22 °C, 80 % d'humidité, luminosité de 10 kilolux minimum.

2.4. Cellules de tabac *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow-2* (BY-2)

Les cellules de tabac BY-2 sont cultivées à 27 °C sous agitation (172 rpm) à l'obscurité dans un incubateur New Brunswick. Elles sont repiquées chaque semaine à raison de 1,5 mL pour 80 mL de milieu frais (Nagata *et al.*, 1992). Pour le maintien de lignées transgéniques, le milieu de culture est supplémenté d'antibiotiques adaptés.

2.5. Milieux, antibiotiques et méthode de stérilisation

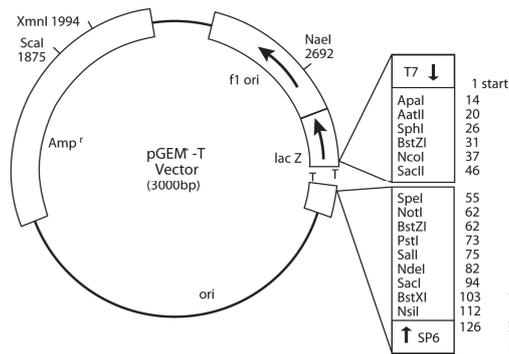
Milieu MS	Duchefa Biochemie MO255 supplémenté en vitamines et préparé dans du tampon MES 0,5 g/L ; 10 g/L de saccharose ; pH 5,8 ; pour milieu solide : 8 g/L d'agar (Agar-Agar Merck) ; autoclave : 121 °C, 20 min.
Milieu BY-2	Murashige et Skoog 4,3 g/L ; thiamine 1 mg/L ; KH ₂ PO ₄ 200 mg/L ; 2-4D 0,2 mg/L ; myoinositol 100 mg/L ; saccharose 30 g/L ; pH 5,8 ; autoclave : 121 °C, 20 min.
Antibiotiques	Kanamycine : 50 µg/mL ; Hygromycine : 15 µg/mL ; Basta : 5 µg/mL ; Sulfadiazine : 5 µg/mL ; Carbenicilline : 100 µg/mL ; Céfotaxime : 250 µg/mL.
Stérilisation des graines	Traitement à l'alcool 90 % additionné de chlore (acide dichlorocyanurique 6,5 mg/mL) pendant 10 min, puis rinçage à l'alcool 70 %, puis à l'alcool 100 %. Séchage sous hotte à flux laminaire.

3. Vecteurs

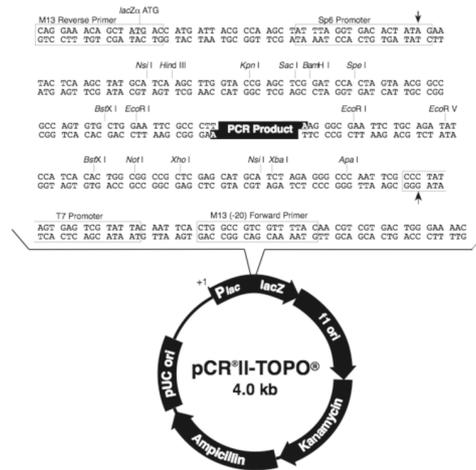
3.1. Vecteurs de clonage

Ces vecteurs sont utilisés pour le clonage et l'amplification de séquences d'ADN. Ils ne permettent pas l'expression en système eucaryote. Leur petite taille et leur fort taux de réplication en font des outils idéaux pour la manipulation d'ADN.

pGEM-T

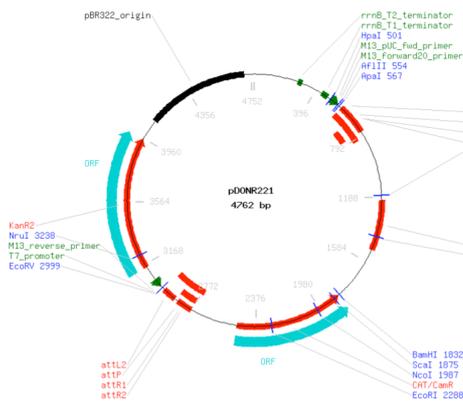


pCRII-TOPO

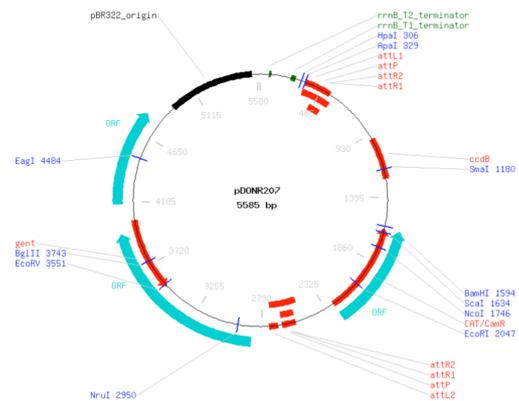


Ces vecteurs permettent le clonage rapide de produits de PCR par ligation classique pour le pGEMT, ou par réaction de recombinaison pour le pCRII-TOPO. Ils confèrent aux bactéries la résistance à l'ampicilline. Le site de clonage positionné dans le gène LacZ permet la sélection des clones d'intérêt.

pDONR221



pDONR207



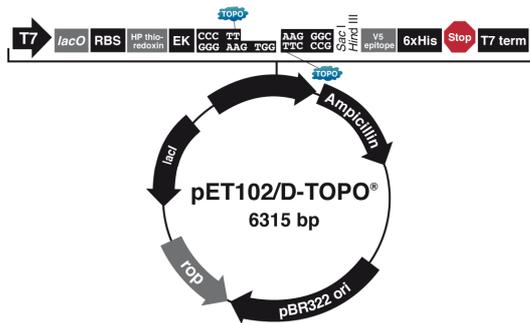
Vecteur d'entrée utilisé pour la première étape du clonage Gateway® (réaction BP). Confère aux bactéries transformées la résistance à la kanamycine.

Vecteur d'entrée utilisé pour la première étape du clonage Gateway® (réaction BP). Confère aux bactéries transformées la résistance à la gentamycine.

3.2. Vecteurs d'expression

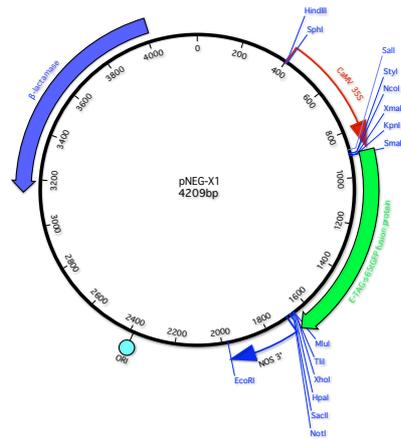
Le vecteur pET102 a été utilisé pour l'expression bactérienne d'AtTLP1a. Le vecteur pNEGX1 a été utilisé pour l'expression transitoire par bombardement de particules. Les autres plasmides sont prévus pour la transformation de plantes par les agrobactéries. Ils peuvent être utilisés, par exemple, en expression transitoire par agroinfiltration, ou pour transformation stable de plantes par «floral dip». Ils contiennent une région ADN-T et une cassette de clonage, flanquées des bordures droite et gauche délimitants la séquence de l'ADN qui sera transférée.

pET102/D-TOPO



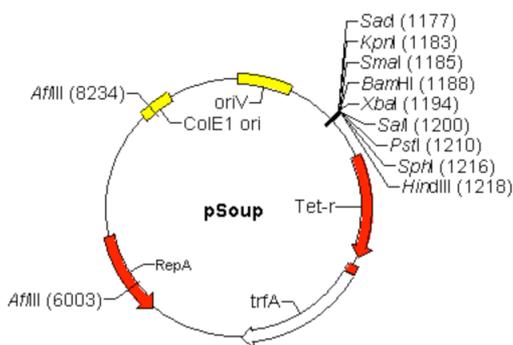
Ce vecteur permet de cloner par recombinaison une séquence d'intérêt en phase avec différents tags de purification et de l'exprimer dans des bactéries. Il confère la résistance à l'ampicilline aux bactéries ayant intégré le plasmide.

pNEGX1



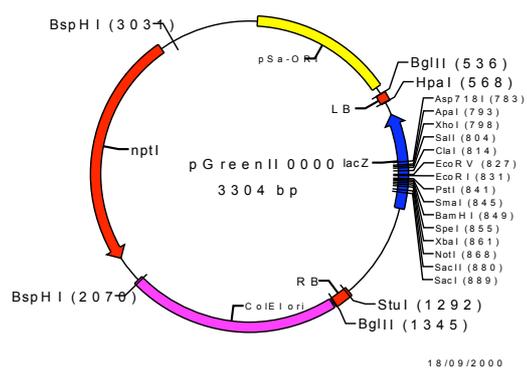
Ce vecteur est utilisé pour l'expression transitoire par bombardement de particules sur cellules de tabac. Il permet de fusionner une séquence codante d'intérêt à la GFP, en N- ou C-terminal. Il contient une séquence codant pour l'E-Tag en N-terminal de la GFP.

pSoup



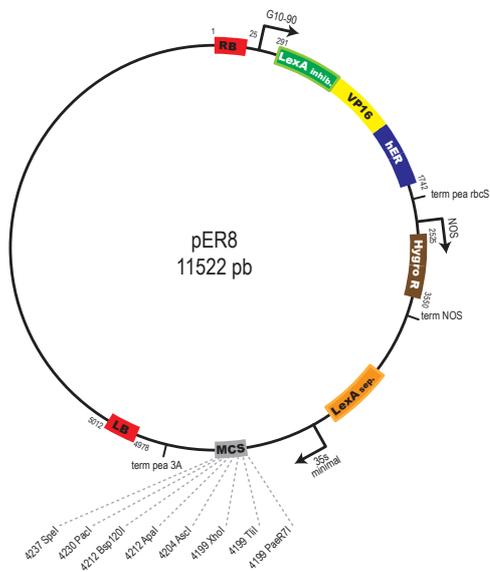
Ce vecteur permet l'expression d'une séquence d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur inducible à l'oestradiol. Il confère la résistance à la kanamycine aux bactéries et à l'hygromycine aux plantes.

pGreen II 0000

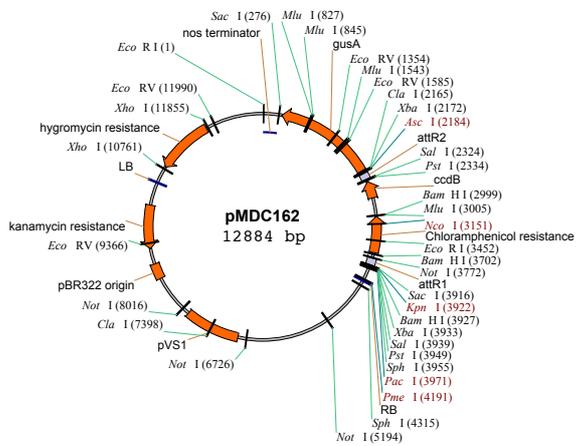


La version du vecteur utilisée confère la résistance à la kanamycine aux bactéries et aux plantes (pGreenII 0039). Il requiert la présence du vecteur pSoup pour sa propagation dans Agrobacterium.

pER8



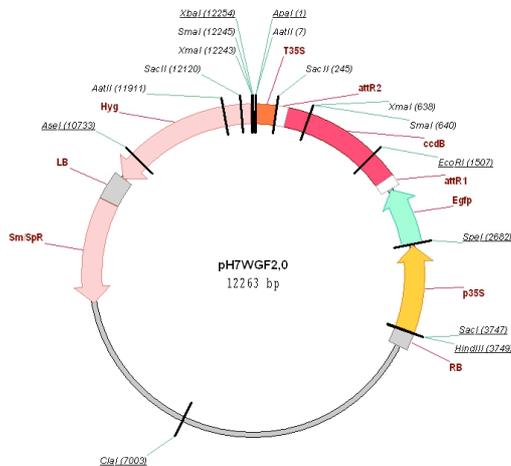
pMDC162



Ce vecteur permet l'expression d'une séquence d'intérêt sous la dépendance d'un promoteur inducible à l'oestradiol. Il confère la résistance à la kanamycine aux bactéries et à l'hygromycine aux plantes.

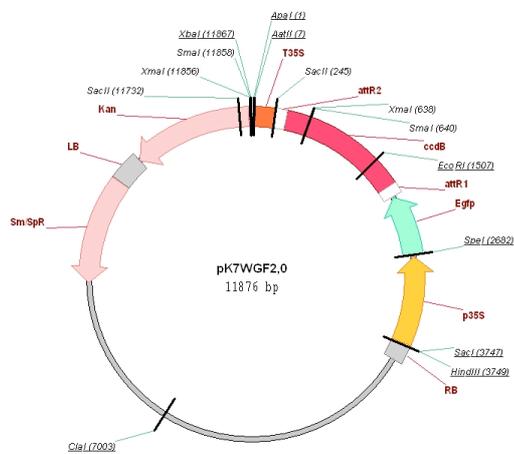
Ce vecteur permet de cloner le promoteur d'un gène en amont du gène rapporteur GUS. Il confère la résistance à la kanamycine aux bactéries et à l'hygromycine aux plantes.

pH7WGF2



Permet de cloner un fragment en C-terminal de la GFP. Il confère la résistance à la spectinomycine aux bactéries et à l'hygromycine aux plantes.

pK7WGF2



Permet de cloner un fragment en C-terminal de la GFP. Il confère la résistance à la spectinomycine aux bactéries et à la kanamycine aux plantes.

4. Oligonucléotides

Clonage de domaines d'AtTPX2 dans le pNEG-X1. Ces constructions ont été utilisées dans le cadre de l'analyse des domaines d'adressage d'AtTPX2.

Domaine	Oligo sens (amorce en 5' de la séquence à amplifier)	Oligo antisens (amorce en 3' de la séquence à amplifier)	Restriction
1-758	ACGCGTATGGAAGCAACGGCGGAGGAA	GCGGCCGCTATTATCTCATCTGACCAGCAGA	MluI/NotI
463-758	GTCTCGAGTAAAAGTAAAGGAGAAATG	GCGGCCGCTATTATCTCATCTGACCAGC	XhoI/NotI
1-579	GTCTCGAGTATGGAAGCAACGGCGGAG	GCGGCCGCAAGTCTGGTTTTGGTGG	XhoI/NotI
1-463	GTCTCGAGTATGGAAGCAACGGCGGAG	GCGGCCGCAAATATCTTTTTGTTCAA	XhoI/NotI
1-303	GTCTCGAGTATGGAAGCAACGGCGGAG	GCGGCCGCGCTTGTGGAACTTCTT	XhoI/NotI
1-104	GTCTCGAGTATGGAAGCAACGGCGGAG	GCGGCCGCAAGGCTGCGATTGTA	XhoI/NotI
1-403	GTCTCGAGTATGGAAGCAACGGCGGAG	GCGGCCGCTGAAGCTATTGAAGATGT	XhoI/NotI
163-463	GTCTCGAGTCCCAACCACCAATGCAG	GCGGCCGCAAATATCTTTTTGTTCAA	XhoI/NotI
220-463	GTCTCGAGTACTACCAATCTGATTCAA	GCGGCCGCAAATATCTTTTTGTTCAA	XhoI/NotI
303-463	GTCTCGAGTAGCACGCGAGACCTATTC	GCGGCCGCAAATATCTTTTTGTTCAA	XhoI/NotI
463-758	GTCTCGAGTTTTGAAAGTAAAGGAGAA	GCGGCCGCTTATCTCATCTGACCAGC	XhoI/NotI
220-303	GTCTCGAGTACTACCAATCTGATTCAA	GCGGCCGCGCTTGTGGAACTTCTT	XhoI/NotI
610-758	GTCTCGAGTATGAGACAGAGAAGGCC	GCGGCCGCTTATCTCATCTGACCAGC	XhoI/NotI
303-610	GTCTCGAGTAGCACGCGAGACCTATTC	GCGGCCGCTCTCCTCCTCTCTTCCCT	XhoI/NotI
463-610	CACGCGTTTTGAAAGTAAAGGAGAA	GCGGCCGCTCTCCTCCTCTCTTCCCT	XhoI/NotI
550-630	GTCTCGAGTAAATTAGGAGATGTAAG	GCGGCCGCTGGGCTCTTTTATAAC	XhoI/NotI
684-758	GTCTCGAGTATGTTGGAGGAAGAGAGA	GCGGCCGCTTATCTCATCTGACCAGC	XhoI/NotI

Clonage de domaines d'AtTPX2 dans le pKC-EGFP-CHS. Pour une description du vecteur, voir (Guerra-Peraza et al. 2005).

Domaine	Sens (5')	Antisens (3')	Restriction
ChS/1-72	CACGCGTGGGGCGGAGGGGGATGGAAGCAACGGCGGAG	TCTAGATTATTAGGCCTCTACCTTGAACGA	MluI/XbaI
ChS/59-72	CACGCGTGGGGCGGAGGGGGCTAGAATCAAAGCAAGG	TCTAGATTATTAGGCCTCTACCTTGAACGA	MluI/XbaI
ChS/220-303	CACGCGTGGGGCGGAGGGGGTCAAGCCATCAAAGGCC	TCTAGATTATTACAGTGTGAGCTTAGGTCTG	MluI/XbaI

Mutagenèse des séquences NES/NLS d'AtTPX2.

Domaine	Sens (5')	Antisens (3')
NLS1	CAAGCCATCAAAATGGCAAAAGCTAG	CTAGCTTTTGCaaTTGATGGCTTG
NLS2	GAACCAGTACAAtgGATACCGTGAAG	CTTACGCTATCaTTGACTGGTTC
NES	CTGTCTTIGATATATTCGACAAGITCTCACTG	CAGTGAGAACTTGTGCAATATATCaAAGACAG

Clonage d'AtTPX2 dans le pER8 avec Tag 6 histidines

Sens	Antisens (3')	Restriction
GTCTCGAGTCAUACCAUCACCAUCACATGGAAGCAACGGCGGAGG	ACTCGAGACTTATCTCATCTGACCAGC	XhoI/XhoI

Clonage du fragment 303-463 dans le pBAD/TOPO. Le fragment produit à l'aide de cette construction a servi à générer les anticorps anti-AtTPX2.

Domaine	Sens (5')	Antisens (3')
303-463	AGCACGCGAGACCTATTCTGTC	TATCTTTTTGTTCAAAGGTTT

Clonage d'AtTPX2 dans le pPICZ-A. (Expression dans Pichia pastoris)

Sens (5')	Antisens (3')	Restriction
GAATTCAAAAATGTCTCATCATCATCATCTCGAGGCAACGGCGGAGGA	GCGGCCGCTATTATCTCATCTGACCAGCAGA	EcoRI/NotI

Clonage du promoteur d'AtTPX2 dans le vecteur pMDC162.

AttB1 + séquence spécifique (5')	AttB2 + séquence spécifique (3')
GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATCCCTCGGACTATAGG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTACTAAAAACACAGAGAGAGC

Clonage d'AtTPX2 dans le pK7WGF2 (sous-clonage dans pENTR/SD/D-TOPO). Construction utilisée pour la transformation stable de BY-2.

Sens (5')	Antisens (3')
CACCATGGAAGCAACGGCGGAG	CTATCTCATCTGACCAGCAGAGGC

Clonages d'AtTLP1/2 dans le pB7WGF2 (sous-clonage dans le pDONR221)

AttB1 + séquence spécifique (5')	AttB2 + séquence spécifique (3')
At5G15510 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGGAGTCGTTGACATTG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTATTAGAGGCTTTGTTGGTA
At3G01015 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGGAGTCGACGAATTTG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTATTAGAGGCTTTGTTGGTA
At4G22860 GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTATATGAAGATATGGAATTCG	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGTATCAGCGAATGCCTAAGTT

Clonages d'AtTLP1 dans pET102/D-TOPO. Construction utilisée pour produire la protéine dans E. coli.

CACC + séquence spécifique (5')	séquence spécifique avec codon stop (3')
CACCATGAAGATATGGAATTCG	TCAGCGAATGCCTAAGTTTC

4.1. Méthodes

4.1.1. Manipulation d'acides nucléiques

Les plasmides recombinants sont les outils de base de toute expérimentation en biologie moléculaire et cellulaire. Les techniques de clonage décrites dans cette partie ont servi à l'obtention de l'ensemble des combinaisons vecteurs/séquences d'intérêt utilisées lors de ma thèse.

4.1. Amplification de fragments d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Cette technique permet l'amplification exponentielle de fragments d'ADN (Sambrook et al. 1989). L'amplification se fait *in vitro* grâce à l'utilisation d'ADN polymérase thermostables et de deux amorces oligonucléotidiques capables de s'hybrider à des régions flanquant la séquence à amplifier. Les amorces peuvent contenir à leur extrémité 5' des séquences additionnelles correspondant à des sites de restriction. L'ajout de ces sites permet l'insertion ultérieure des fragments de PCR dans le vecteur de clonage. Les clonages d'ADNc ont été réalisés à partir d'une banque de plantules d'*Arabidopsis* de 3 semaines générée avec le kit SMART cDNA Synthesis Kit de Clontech, selon les recommandations du fabricant.

Conditions générales de PCR :

	Génotypage et criblage de colonies : Utilisation du Kit GoTaq de Proméga		Clonage : Utilisation du Kit Phusion Master Mix de FinnZymes	
	Volumes pour 20 µL de réaction	Concentration/ quantité finale	Volumes pour 20 µL de réaction	Concentration/ quantité finale
Matrice d'ADN	2 µL	150 ng	2 µL	150 ng
Oligo sens (100 µM)	0.1 µL	0.5 µM	0.1 µL	0.5 µM
Oligo antisens (100 µM)	0.1 µL	0.5 µM	0.1 µL	0.5 µM
MgCl ₂ (25 mM)	2 µL	2.5 mM	Phusion Master Mix 2x 10 µL	
dNTP (10 mM)	2µL	1 mM		
Tampon x5	4 µL	1x		
ADN polymérase	0.1 µL	1 U		

Programmes de PCR

	GoTaq Criblage de colonies	GoTaq Génotypage	Phusion Master Mix	Cycle répété n fois en fonction de l'expérience considérée
Dénaturation	4 min à 95°C	2 min à 95°C	2 min à 98°C	
Dénaturation	10 sec à 95°C	30 sec à 95°C	10 sec à 98°C	
Hybridation	10 sec à T _m	30 sec à T _m	10 sec à T _m + 3°C	
Elongation	72°C ,1 min par kb			
Elongation finale	72°C ,2 min par kb			

L'hybridation se fait à une température T_m calculée en fonction du nombre de paires A/T et G/C de l'amorce selon la formule :

$$T_m = 69,3 + 0,41 \times (\%GC) - (650 / \text{taille de l'amorce en bases})$$

L'étape d'élongation dépend de la taille du fragment à amplifier et du type de polymérase utilisé (1kb/min en moyenne). Pour une amplification optimale des fragments d'ADN, 25 à 30 cycles de PCR sont généralement suffisants.

4.2. Sous-clonage

Les sous-clonages de produits de PCR sont réalisés soit dans le vecteur pCRII-TOPO (Invitrogen) soit dans le vecteur pGEM®-T (Promega) suivant les recommandations des fabricants.

4.3. Digestion de l'ADN par des endonucléases de restriction

Les enzymes de restriction coupent les molécules d'ADN (produits de PCR et vecteurs) au niveau de sites spécifiques, et génèrent des fragments à extrémités cohésives 5' ou 3' sortantes ou à extrémités franches.

Les digestions sont généralement réalisées dans un volume réactionnel de 20 µL contenant 1 à 2 µg d'ADN, 2 µL de tampon 10x adapté et 1 à 3 unités d'enzyme. Le mélange est incubé deux heures à 37 °C. Dans le cas de double digestions, les conditions, notamment le type de tampon, sont choisies pour être optimales pour l'activité des deux enzymes. Le vecteur digéré peut être traité à la phosphatase alcaline (CIP 0,2 U pour 1 µg d'ADN) qui déphosphoryle les groupements 5' phosphate libres, afin d'empêcher la ligation du vecteur sur lui-même. Les réactions sont stoppées par une incubation de 10 min à 65 °C.

4.4. Analyse des fragments d'ADN sur gel d'agarose et purification

Les fragments d'ADN obtenus sont mis en suspension dans du tampon de charge et analysés par électrophorèse (100 volts) en gel d'agarose préparé dans du tampon TAE. Le gel contient du bromure d'éthidium qui s'intercale entre les bases et émet une fluorescence lorsqu'il est excité par un rayonnement ultraviolet (UV). Le gel est analysé sous lumière UV dans un transilluminateur (gelDoc 1000, Biorad). Les zones contenant les fragments d'intérêt sont excisées au scalpel puis l'ADN est purifié à l'aide du kit NucleoSpin® ExtractII QuickPur de la société Macherey-Nagel, selon les recommandations du fabricant.

Tampon de charge Glycérol 50 %, SDS 1 %, EDTA 1 mM, cyanol xylène 0,1 %, bleu de bromophénol 0,1 %

gel d'agarose 0,8 à 2 % selon la taille des fragments à analyser

tampon TAE Tris-base / acide acétique glacial 40 mM pH 8, EDTA 1 mM, bromure d'éthidium 0,2 µg/mL

4.5. Ligation d'un fragment d'intérêt dans un vecteur

Le vecteur et l'insert purifiés sont ligués grâce à la T4 DNA ligase qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités libres 3' hydroxyle et 5' phosphate des molécules d'ADN.

La ligation s'effectue 10 min à température ambiante (20-25 °C) à l'aide du kit Rapid DNA ligation (Fermentas). Le milieu réactionnel (20 µL final) contient environ 50 ng de vecteur et 150 ng d'insert dans le tampon de ligation du kit en présence de 5 U de T4 DNA ligase.

4.6. Système de clonage Gateway®

Les fragments d'ADN sont amplifiés à l'aide d'amorces possédant des sites spécifiques permettant leur insertion par recombinaison dans un vecteur d'entrée (réaction BP). Une deuxième réaction de recombinaison permet de transférer l'insert contenu dans le vecteur d'entrée dans un vecteur de destination (réaction LR). Les réactions de recombinaison sont réalisées selon les recommandations du fabricant (Invitrogen).

4.7. Préparation et transformation de bactéries compétentes

Transformation par choc thermique

- Préparation des bactéries

Afin de pouvoir intégrer un plasmide, les bactéries utilisées doivent être préalablement rendues compétentes. Le traitement consiste à perméabiliser les membranes bactériennes grâce à une combinaison de DMSO (DiMethyl SulfOxide) et de calcium. Des colonies fraîches de bactéries sont mises à pousser sous agitation vigoureuse à température ambiante dans 200 mL de milieu SOB. Lorsque la densité optique (D.O.) de la culture atteint 0,45 (pour $\lambda = 600$ nm), la prolifération des cellules est stoppée en plaçant les bactéries dans la glace (10 min). La culture est ensuite centrifugée (2 500 *g*, 15 min) à température ambiante et le culot est lavé à deux reprises dans 64 mL de tampon HTB froid (4 °C). Le culot de cellule est repris dans 16 mL de tampon HTB auquel sont ajoutés 1,2 mL de DMSO. Les bactéries compétentes sont alors aliquotées, congelées dans l'azote liquide et conservées à - 80 °C jusqu'à utilisation.

Milieu SOB Bacto-tryptone 20 g/L ; Bacto-yeast extract 5 g/L ; NaCl 0,5 g/L, KCl 250 mM ; ajusté à pH 7 avec du NaOH ; additionné après autoclavage de MgCl₂ 10 mM et MgSO₄ 10mM.

Tampon HTB Tampon Hépès 10 mM ; CaCl₂ 15 mM ; KCl 250 mM ; H₂O, ajusté à pH 6,7 avec du KOH ; MnCl₂ 55 mM ; stérilisé par filtration sur membrane Millipore 0,22 µm

- Choc thermique

Une partie du milieu de ligation (5 µL) est ajoutée à 80 µL de bactéries compétentes. Le mélange est incubé 5 min sur glace puis placé 1 min 30 à 42 °C. Les bactéries sont ensuite mises 5 min sur glace. Après addition de 500 µL de LB, les bactéries sont incubées pendant 30 min à 37 °C (permet l'expression du gène de résistance), puis étalées sur milieu sélectif gélosé. Après une nuit de croissance à 37 °C, les colonies sont analysées comme décrit ci-après.

Transformation par électroporation

- Préparation des bactéries

Les bactéries sont cultivées dans 10 mL de LB sur une nuit. Un mL de cette préculture permet d'inoculer 1 L de LB frais. La culture se fait à 37 °C sous agitation jusqu'à l'obtention d'une D.O._{600nm} de 0,5 à 0,8. Les bactéries sont placées 30 min sur la glace puis centrifugées 15 min à froid à 4000 *g*. Le culot est lavé deux fois dans 500 mL d'eau stérile froide et centrifugé à nouveau 15 min. Les bactéries sont remises en suspension dans 20 mL de glycérol 10 %, centrifugées 10 min et finalement reprises dans 3 mL de glycérol 10 % avant d'être aliquotées, plongées dans l'azote liquide et conservées à - 80 °C.

- Electroporation

Une partie du milieu de ligation (1 μ L) est ajouté à 40 μ L de cellules compétentes. Le mélange est incubé une minute sur glace puis transféré dans une cuve à électroporation. L'électroporateur est réglé à 25 μ F, 2,5 kV et 200 Ω . Une fois la décharge produite, les bactéries sont reprises dans 1 mL de milieu LB et incubées 1h à 37 °C avant d'être étalées sur milieu de sélection.

4.8. Sélection des clones d'intérêt

Par criblage PCR sur colonies

Cette technique permet de détecter la présence de l'insert et de vérifier son orientation directement à partir de colonies bactériennes.

Des bactéries d'une colonie sont prélevées avec une cœuse et resuspendues dans 30 μ L d'eau. 1 μ L de cette solution est utilisée comme matrice dans une réaction de PCR. L'étape de dénaturation de la PCR suffit à lyser les bactéries et libérer l'ADN. Les résultats de la PCR sont analysés sur gel d'agarose.

Par digestion enzymatique

L'ADN plasmidique des bactéries est extrait par la méthode décrite ci-dessous, puis digéré par une ou plusieurs enzymes de restrictions appropriées. La taille des produits de digestion est analysée sur gel d'agarose.

4.9. Obtention de l'ADN recombinant

Les vecteurs recombinants sont extraits des clones bactériens par la méthode de lyse alcaline. Cette méthode permet de récupérer sélectivement l'ADN du plasmide contenu dans les bactéries, tout en éliminant l'ADN du chromosome bactérien. Les mini ou midi préparations d'ADN sont réalisées respectivement à partir de 2 mL ou 50 mL de culture bactérienne saturée, avec les kits NucleoSpin® Plasmid QuickPure ou NucleoBond® PC100 (Macherey-Nagel), suivant les recommandations du fabricant.

4.10. Séquençage

Le séquençage, effectué par Malek Alioua au service de séquençage automatisé de l'IBMP (séquenceur Applied Biosystems 3100 à électrophorèse capillaire), repose sur la méthode de Sanger (Sanger et al. 1977).

5. Production et analyse de protéines

5.1. Extraction totale de protéines

- A partir de cultures cellulaires

Un à deux mL de culture cellulaire (BY-2 ou bactéries) sont soumis à centrifugation pour éliminer le milieu de culture. L'ensemble est repris dans 50 µL de tampon de charge et chauffé pendant 2 min à 95 °C avant d'être placé sur la glace. Les débris sont précipités par centrifugation et 10 à 20 µL du surnageant sont déposés sur gel.

- A partir de tissus végétaux

Le matériel végétal est réduit en poudre à l'aide d'un mortier dans de l'azote liquide. 100 mg de poudre sont repris dans 2 volumes de tampon de charge. Les extraits sont ensuite traités de la même manière que pour les cultures cellulaires.

Tampon de charge Tris-HCl 80 mM, glycérol 10 %, SDS 2 %, bleu de bromophénol 0,1 %, DTT 100 mM, urée 4 M, pH 6,8

5.2. Production de protéine

Le kit Champion™ pET Directional TOPO® d'Invitrogen a été utilisé pour la production d'AtTLP1a. L'ADNc d'AtTLP1a a été amplifié par PCR en utilisant des amorces spécifiques (cf. liste des oligos), à partir d'une banque d'ADNc provenant de plantules d'*Arabidopsis* de 3 semaines, puis cloné par recombinaison dans le vecteur pET102/D-TOPO. Le plasmide recombinant, après amplification bactérienne et séquençage, a été transféré par choc thermique dans la souche d'expression BL21 Star™(DE3) One Shot® d'Invitrogen. L'expression et la purification de la protéine ont été réalisées en suivant le protocole décrit par le fabricant.

L'expression d'AtTPX2 dans *Pichia pastoris* a été réalisée avec le kit d'expression Easy Select d'Invitrogen. L'ADNc a été amplifié par PCR (cf. liste des oligos) puis cloné par restriction dans le vecteur pPICZ-A, entre les sites EcoRI et NotI. L'expression a été réalisée selon les recommandations du fabricant.

Les anticorps dirigés contre AtTPX2 ont été générés contre la région centrale de la protéine (303 à 463). Le fragment a été amplifié par PCR (cf. liste des oligos) et cloné dans le vecteur d'expression pBAD/TOPO ThioFusion d'Invitrogen. Le peptide a été exprimé dans la souche LMG194 d'Invitrogen et purifié comme décrit par le fabricant.

5.3. Protocole d'immunisation des lapins

Les lapins utilisés sont des femelles de souche Néo-Zélandaise de 2 à 2,5 kg (âgées de deux mois). Un premier prélèvement de sang sert de sérum pré-immun (témoin négatif). Puis, une émulsion d'antigène (200µg) et d'adjuvant de Freund complet est injectée par voie intradermique. Un mois plus tard, le sang du lapin est prélevé à raison de 30 mL chaque semaine pendant un mois. Ensuite, une émulsion des deux tiers de la quantité initiale d'antigène et d'adjuvant de Freund incomplet est injecté au lapin par voie sous-cutanée. Environ douze jours plus tard, le lapin est anesthésié puis sacrifié. Un volume de 130 à 150 mL de sang est prélevé par voie intracardiaque, soit 70 à 80 mL de sérum.

5.4. Analyse d'extraits protéiques par Western blot

Préparation du gel

Gel de concentration		Gel de séparation (12 %)	
40% acryl/bis-acrylamide 37.5:1	0,4 mL	40% acryl/bis-acrylamide 37.5:1	3 mL
1.5M TrisHCl pH 8.8	1 mL	1.5M TrisHCl pH 8.8	2,5 mL
H ₂ O	2,6 mL	H ₂ O	4,5 mL
APS 10%	70 µL	APS 10%	130 µL
Temed	3,5 µL	Temed	8,5 µL

Migration, transfert et révélation des protéines

5 à 20 µL d'extrait de protéine sont chargés par puits. La migration se fait à une intensité de 10 mA dans du tampon de migration. La concentration en acrylamide et bisacrylamide du gel de séparation peut varier suivant la taille des protéines à analyser. Pour visualiser directement les protéines, le gel est coloré par une solution de bleu de Coomassie. L'excédent de colorant est enlevé par une solution de décoloration puis le gel est réhydraté à l'eau.

Le gel peut également, après migration, être soumis à transfert pour analyse par Western blot. Le transfert se fait sur membrane de type Immobilon™ (Millipore) traitée au méthanol puis à l'eau, dans une solution de transfert avec un appareillage de type Bio-Rad, soumis à un champ électrique de 80 mA (0.8 mA/cm²) pendant 1 h.

Après transfert, la membrane est mise à saturer dans du tampon PBS-lait pendant 15 min. L'incubation avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine étudiée (la dilution varie en fonction de l'anticorps) se fait pendant une nuit à 4 °C dans le tampon PBS-lait. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 min dans du tampon PBS-Tween (PBS x1, Tween 0,2 %). Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase de raifort (IgG Goat Anti-Rabbit, Molecular Probes) sont dilués au 10000^{ème} dans le tampon PBS-lait et incubés 1 h à température ambiante. Trois lavages de 10 min dans du tampon PBS-Tween sont suivis de la révélation de l'activité enzymatique de la peroxydase. La membrane est égouttée et la face où sont les protéines est immergée 1 min dans la solution de révélation ECL™ (Amersham). La luminescence indiquant la présence des complexes est révélée sur film (X-Ray Film Fuji Medical, Fujifilm). Après révélation, la membrane est colorée au de bleu de Coomassie.

Tampon de migration Tris-base 3,02 g/L ; glycine 14,49 g/L ; SDS 1 g/L ; pH 8,3.

Solution de bleu de Coomassie bleu de coomassie-R250 Sigma 2,5 g/L ; méthanol 454 mL/L ; H₂O 454 mL/L ; acide acétique 92 mL/L.

Solution de décoloration éthanol 300 mL/L ; acide acétique 100 mL/L.

Solution de transfert Tris 25 mM ; glycérine 192 mM ; méthanol 15% ; pH 8,3.

PBS X10 NaCl 80 g/L, KCl 2g, Na₂HPO₄ 14,4 g/L, KH₂PO₄ 2,4 g/L

Tampon PBS-lait lait 5% dans du PBS 1x, pH 7,4

6. Techniques de marquage

6.1. Révélation de l'activité GUS

Les plantules sont immergées dans une solution d'acétone 90% 4 h à -20°C, lavées dans une solution de phosphate de sodium (100mM, pH7) puis incubées dans le même tampon additionné de X-Gluc (5 mg/mL) de ferrocyanide de potassium (5mM) et de ferricyanide de potassium (5mM) à 37°C pendant 3h. Le temps d'incubation à 37°C a été optimisé pour obtenir une intensité de marquage adéquat. Il peut varier suivant le type de promoteur utilisé et la position de l'insertion de l'ADN-T contenant la fusion GUS. Les plantules sont ensuite rincées dans de l'éthanol 95% et peuvent être observées immédiatement ou conservées dans cette solution.

6.2. Immunomarquage sur cellules BY-2

Préparation des cellules

Les cellules culotées (environ 0,5 mL de cellules) sont fixées 40 min sur plateau agitant dans 5 mL de PEMT contenant 1,5% de paraformaldéhyde et 0,5% de glutaraldéhyde. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans du PEMT simple. Un traitement au méthanol déshydraté froid pendant 10 min sur glace permet également de fixer les cellules, tout en favorisant les prochaines étapes d'immunomarquage. L'ensemble est réhydraté 10 min dans du PBS puis traité 20 min au borohydrure de sodium (1 mg/mL dans du PBS). Le borohydrure permet de perméabiliser les membranes, de réduire l'autofluorescence du glutaraldéhyde et de neutraliser les résidus de fixateur. Puis les cellules sont déposées sur les lamelles qui ont été préalablement recouvertes de polylysine (1 mg/mL) (permet l'adhérence des cellules). La digestion se fait sur lamelle dans 250 µL d'enzymes diluées au 10^{ème} dans le tampon de digestion, pendant 10 min. Après la digestion, les lamelles sont lavées 3 fois avec 400 µL de PBS-glycine (glycine 50 mM).

Immunomarquage

Les lamelles sont d'abord incubées 20 min à température ambiante dans un mélange de saturation, puis une nuit à 4 °C dans du PBS-glycine en présence des anticorps primaires (dirigés contre la protéine d'intérêt). Ensuite, les lamelles sont lavées 2 fois 5 min dans du PBS-glycine, puis incubées avec les anticorps secondaires (Molecular probes, Goat anti-Rabbit ou Goat anti-Mouse) couplés à un fluorochrome vert (Alexa 488) ou rouge (Alexa 568) dilués au 1000^{ème} dans du PBS-glycine, 1h à température ambiante. Deux lavages sont alors effectués avec du PBS. Les cellules peuvent être marquées au DAPI pour révéler l'ADN (5 min à température ambiante ; 0,1 µg/mL) avant un dernier lavage au PBS. Le montage des lames se fait dans une goutte de milieu de montage contenant du Mowiol et du DABCO pour limiter les pertes de fluorescence pendant l'observation.

PEMT	PIPES 50 mM ; EGTA 2 mM ; MgSO ₄ 2 mM ; Triton X-100 0,05% ; pH ajusté à 7,2 avec du KOH
Mélange d'enzymes de digestion	pectolyase 0,2% ; macérozyme 1% ; caylase 3%
Tampon de digestion	MES pH 5,5 25 mM ; CaCl ₂ 8 mM ; mannitol 600 mM
Mélange de saturation	5% Normal Goat Serum ; 0,1% BSA ; PBS
Milieu de montage	Glycérol 6g ; Mowiol 4-88 2,5g ; H ₂ O 6mL ; DABCO 100mg/mL à ajouter juste avant utilisation

7. Transformation de matériel végétal

7.1. Transformation par agroinfection

Culture des Agrobactéries

Les agrobactéries (souche GV3101 ou LBA4404) préalablement transformées avec le vecteur d'intérêt sont cultivées à 28°C dans du milieu LB additionné de 10mM de MgSO₄ et d'antibiotiques adéquats. Les cultures utilisées pour les transformations sont lancées à partir de 2 mL de pré-culture saturées.

Transformation d'*Arabidopsis thaliana* par la méthode de floral dip

Le «floral dip» est réalisé sur des plants d'*Arabidopsis thaliana* d'écotype Col 0. Ce sont les ovules qui subissent la transformation par les agrobactéries. Les hampes florales primaires peuvent être coupées pour permettre aux hampes secondaires de pousser, augmentant ainsi le nombre de boutons floraux. Les fleurs matures et les siliques sont éliminées.

Une culture de 250 mL d'agrobactéries GV3101 d'une D.O. de 0,8 est centrifugée puis remise en suspension dans le même volume d'une solution de trempage. Les hampes florales sont entièrement trempées dans le mélange d'agrobactéries puis sont placées en mini-serres à l'obscurité pendant 48H. Les plantes sont ensuite cultivées normalement. Les graines sont récoltées puis stérilisées. Les transformants sont sélectionnés sur milieu MS additionné d'antibiotiques. L'ajout de céfotaxime ou de carbénicilline limite la pousse des agrobactéries encore présentes sur les graines. Les transformants exprimant des protéines de fusion fluorescentes sont analysés en microscopie à épifluorescence ou confocale.

Solution de trempage Milieu MS additionné de 400µL/L de détergent SILWETT L-77

Transformation stable de BY-2

Une culture de 250 mL d'agrobactéries de souche LBA4404 d'une D.O. de 0,8 est centrifugée puis remise en suspension dans 100 mL de milieu BY-2. Pour chaque transformation, 5 mL d'une culture de BY-2 âgée de 3 jours sont déposés dans une boîte de Pétri (6 cm de diamètre), puis additionnés de 5 µL d'acétosyringone (20 mM dans de l'éthanol). Les agrobactéries sont ajoutées aux BY-2 afin d'obtenir 3 concentrations différentes (25, 50 et 100 µL de bactérie). Le mélange est agité doucement, scellé avec du Parafilm®, puis incubé à 25 °C à l'obscurité et sans agitation pendant 2 jours. Les cellules sont ensuite transférées dans des tubes de 50 mL en utilisant une pipette à bout large. Les cellules sont rincées 3 fois avec du milieu BY-2 (sédimentation « naturelle » sans centrifugation), puis déposées sur milieu BY-2 solide (boîtes de 10 cm de diamètre au minimum) additionné de carbénicilline et d'antibiotique(s) adéquat(s) (résistance des BY-2 apportée par l'ADN-T). Un contrôle avec de la carbénicilline seulement est réalisé afin d'évaluer l'efficacité de la sélection. Les cals, visibles 10 à 14 jours après transformation, sont transférés sur milieu BY-2 frais, additionné des mêmes antibiotiques. Les cals sont sélectionnés en microscopie à fluorescence une semaine après repiquage.

Agro-infiltration de *Nicotiana benthamiana*

Une culture de GV3101 d'une D.O. 600 nm de 0,8 est centrifugée puis remise en suspension dans le même volume d'une solution de MgSO₄ 10 mM. Ce mélange est utilisé pour infiltrer les feuilles de plants de *N. benthamiana* âgés de 15 jours maximum (1 mL environ par

feuille). Un trou d'aiguille réalisé sur les jeunes feuilles facilite l'infiltration. Des explants de ces feuilles sont analysés en microscopie confocale, 2 jours après l'agroinfiltration.

7.2. Bombardement de cellules BY-2

La transformation des cellules BY-2 de tabac est réalisée par une technique biolistique adaptée de celle développée par Sanford (Sanford et al. 1993). L'ADN exogène est introduit dans le noyau des cellules végétales via des particules de tungstène ou d'or projetées grâce à un système à gaz comprimé. L'expression des constructions plasmidiques permet d'étudier la localisation de protéines de fusion fluorescentes.

Préparation des particules

60 mg de particules sont stérilisées dans de l'éthanol 100 %, rincées à l'eau puis reprises dans 500 µL de glycérol 50 %. À 50 µL de billes de ce mélange sont ajoutés séquentiellement 4 µg d'ADN, 10 µL de CaCl₂ 2,5 mM et 10 µL de spermidine 1 M. Le mélange est vortexé entre chaque étape. Les particules ainsi enrobées sont ensuite lavées successivement à l'éthanol 70 % et 100 %, puis reprises dans l'éthanol absolu.

Préparation des cellules et bombardement

5 mL de suspension cellulaire de BY-2 âgées de 3 jours sont déposés sur un disque de papier-filtre. Celui-ci est ensuite posé sur une boîte de Pétri contenant du milieu de culture BY-2 solide. 10 µL de particules sont bombardés sur ces cellules à l'aide d'un canon à hélium. Les boîtes de cellules sont ensuite placées à l'obscurité. Lors de l'utilisation de drogues, les cellules sont prélevées 1 h après bombardement. La fluorescence des cellules est analysée par microscopie confocale de 3 à 8 h après bombardement.

8. Observations microscopiques

Les observations de protéines fluorescentes ont été réalisées sur un microscope confocal Zeiss LSM510-META équipé des filtres standards en utilisant les sources laser suivantes :

Laser	Longueurs d'onde émises	Fluorochromes excités
Diode	405	DAPI
Argon	458, 477, 488, 514	FITC, Alexa 488, GFP, eGFP
He/Ne	543	Alexa 543 / 568, RFP

Différentes combinaisons de filtres et de miroirs positionnés le long du trajet optique du microscope permettent de ne laisser passer que la fluorescence du fluorochrome observé. Dans le cas d'utilisation simultanée de plusieurs marqueurs fluorescents, le confocal a été utilisé en mode multipiste, ce qui permet d'exciter séparément chaque fluorochrome et d'éviter ainsi un recouvrement des spectres d'émission. Une configuration permettant de détecter simultanément la RFP, la GFP et le DAPI est présentée figure 52.

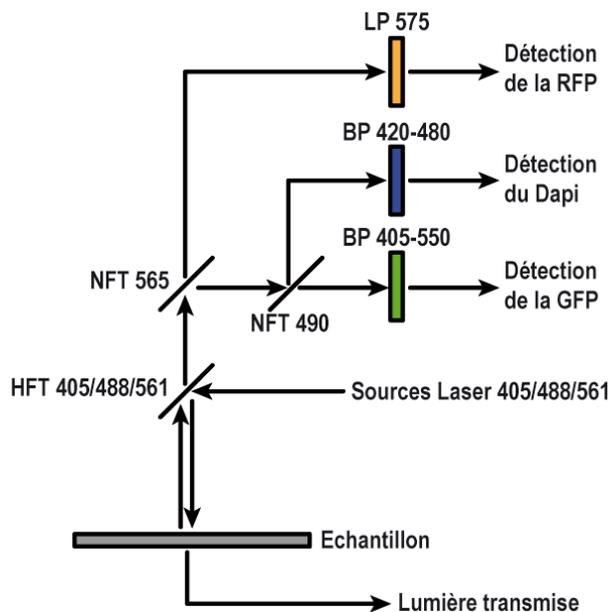


Figure 52 : Configuration permettant la détection simultanée du DAPI, de la GFP et de la RFP.
 NFT et HFT : miroirs dichroïques. LP et BP : filtres « Long Pass » et « Band Pass ».

Les images de microscopie électronique ont été réalisées avec un microscope électronique à transmission HITACHI H600 utilisant une tension de 75 Kvolts, équipé d'une camera hamamatsu Orca HR générant des images d'une résolution de 1024x1024 pixels.

9. Logiciels

Les recherches dans les bases de données de séquences ont été réalisées avec le logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) disponible sur le site du NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Les alignements présentés dans cette thèse ont été réalisés avec le logiciel Tcoffee (version 8.06, www.tcoffee.org) en utilisant les paramètres standards (Poirot et al. 2003). Les arbres ont été réalisés dans le logiciel CLC Main Workbench (version 5.1) et édités dans le programme FigTree (version 1.2.2). Les analyses comparatives d'expression *in silico* ont été réalisées à l'aide du programme Genevestigator (www.genevestigator.com) en utilisant des données d'hybridation générées avec les puces ATH1 d'Affimetrix (données haute qualité, toutes sources). La conception des clones et la vérification des séquences ont été réalisées avec le logiciel MacVector (version 10.6). Les images de microscopie ont été traitées avec les logiciels ImageJ (version 1.42q 64-bit) et Osirix (version 3.5.1 32-bit).

L'intégralité des illustrations et des figures présentées dans cette thèse a été réalisée en dessin vectoriel à l'aide du logiciel Adobe Illustrator © (version CS4 14.0.0) puis converties en images « bitmap » à l'aide du logiciel Adobe Photoshop © (version CS4 11.0.1). Le manuscrit a été écrit avec le programme Pages (version 4.0.2) de la société Apple © et les références bibliographiques gérées avec le logiciel EndNote (version X2) de la société Thomson ©.

10. Microscopie confocale biphotonique

Mon projet de thèse initial comprenait une collaboration étroite avec le groupe d'Optique Non-Linéaire et d'Optoélectronique (GONLO) de l'Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg (IPCMS). Le projet, qui était axé sur le développement et l'exploitation d'un microscope biphotonique à cadence vidéo, ne s'est malheureusement développé qu'à une cadence modérée et la construction du microscope n'a pu être achevée. Nous avons donc convenu avec le comité de thèse que mon travail se focaliserait sur l'étude de TPX2 tout en acquérant des connaissances de base d'optique non linéaire et de microscopie confocale à deux photons. Les pages qui suivent présentent une brève introduction de cette technique, suivie d'un article écrit en collaboration avec l'équipe de physiciens de l'IPCMS.

10.1. Absorption à un ou deux photons

Une molécule fluorescente possède la propriété de pouvoir absorber de l'énergie lumineuse (lumière d'excitation). Une fois l'énergie absorbée, la molécule passe d'un état électronique S_0 à un état électronique excité S_2 qui est immédiatement suivi d'une perte d'énergie par « conversion interne », amenant la molécule à un état excité S_1 . La molécule peut ensuite revenir à son état fondamental en émettant un photon. On parle d'émission de lumière fluorescente. Pour qu'il y ait émission de fluorescence, l'énergie lumineuse d'excitation doit au minimum correspondre à la différence entre les états fondamentaux et excités de la molécule. Cette énergie peut être apportée soit par l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$, soit par l'absorption simultanée de deux photons d'énergie $h\nu/2$. Ce principe peut se généraliser à l'absorption simultanée de plusieurs photons. Dans le cas de l'ADP, la lumière d'excitation a une énergie moindre, et par conséquent une longueur d'onde plus grande que la lumière de fluorescence.

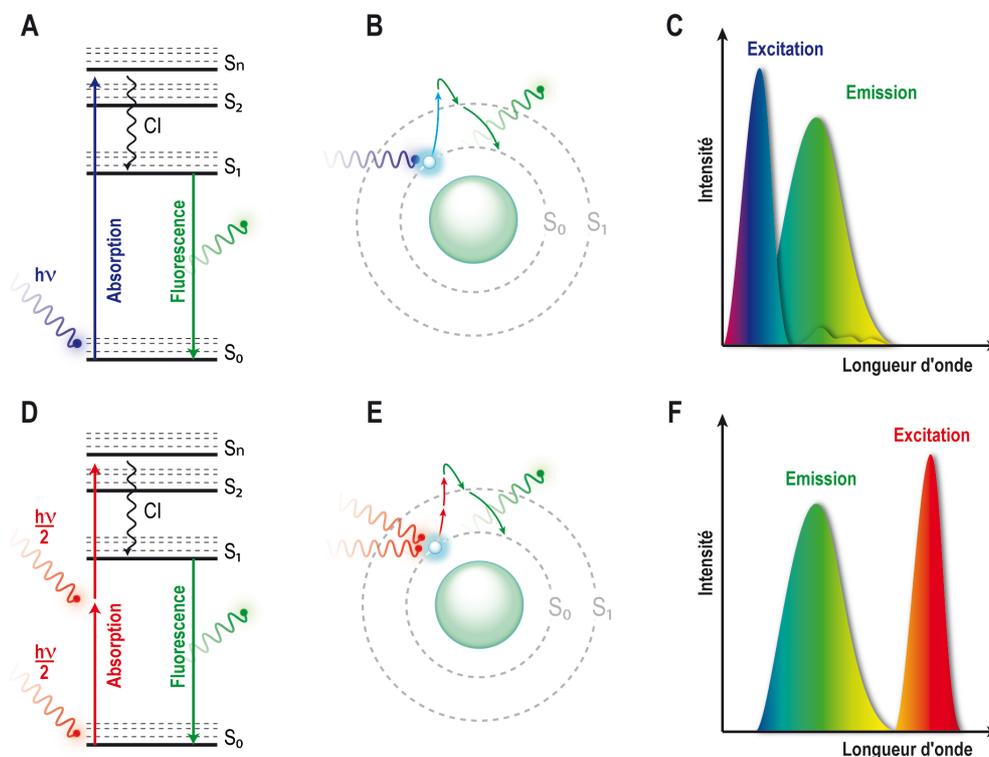


Figure 53 : Phénomène d'absorption à un ou deux photons. A et D : Diagrammes énergétiques pour l'absorption d'un (A) ou de deux photons (D). S_0 , S_1 , S_2 et S_n : états électroniques. CI : perte d'énergie par conversion interne. **B et E** : représentations schématiques des deux phénomènes. **C et F** : Spectres des lumières d'émission et d'excitation rencontrées dans le cas d'un processus à un photon (C) ou deux photons (F).

10.2. Sources laser utilisées

La faible probabilité que deux photons rencontrent simultanément la même molécule fluorescente rend le processus d'ADP très peu efficace. Il est donc nécessaire d'induire une très grande densité spatiale et temporelle de photon en focalisant à l'aide d'un objectif de microscope un faisceau laser impulsionnel.

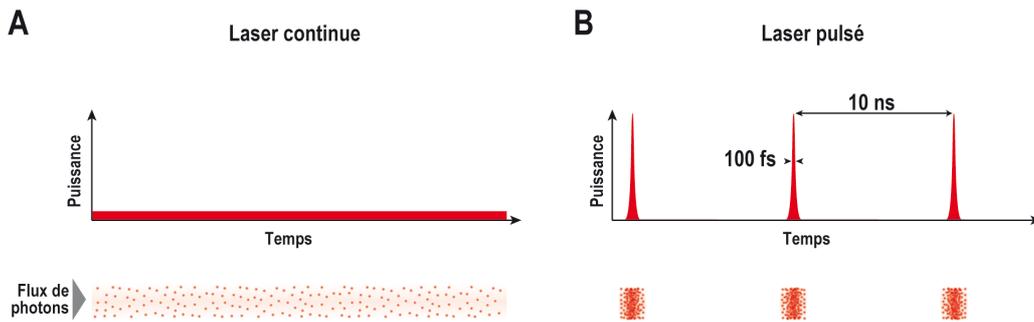


Figure 54 : Comparaison du flux de photons généré par un laser continu (A) et un laser pulsé (B).

Ce type de laser génère de très brèves impulsions contenant de grandes quantités de photons. La courte durée des impulsions (de l'ordre de 100 fs) évite de produire des phénomènes thermiques indésirables qui pourraient endommager le matériel biologique. Un flux continu d'une même densité détruirait très rapidement l'échantillon. Le flux moyen généré, si l'on considère l'intervalle de temps écoulé entre les maxima de deux impulsions, est équivalent à celui produit par un laser continu. La forte densité de photons rencontrée au niveau du volume d'excitation entraîne cependant la photodégradation des fluorophores du plan confocal observé.

10.3. Volumes d'excitation

Seule la région avoisinant le point focal présente une densité de photon suffisante pour induire l'ADP. Il est donc possible, avec ce procédé, d'exciter des volumes très restreints. Dans le cas de l'absorption à un photon, le volume excité correspond à l'ensemble du cône de lumière qui pénètre l'échantillon, ce qui génère une grande quantité de lumière parasite.

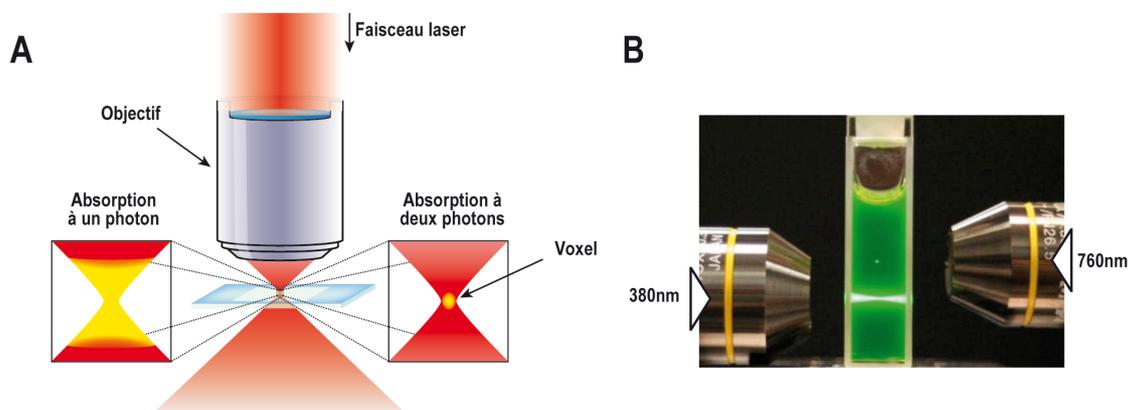


Figure 55 : Comparaison des cônes d'excitation générés par l'absorption d'un ou de deux photons. A : Schéma illustrant les cônes d'excitation induits par les deux types d'absorption. Dans le cas de l'ADP, le volume d'excitation généré est appelé voxel. B : cuve de fluorescéine excitée à 380 nm (absorption à un photon) ou 760 nm (absorption à deux photons).

Il est alors nécessaire d'utiliser un trou de filtrage (ou pinhole en anglais) placé avant le détecteur afin d'éliminer la lumière émise hors du plan focal (Figure 56). L'utilisation de longueurs d'onde plus grandes permet par ailleurs une meilleure pénétration des tissus.

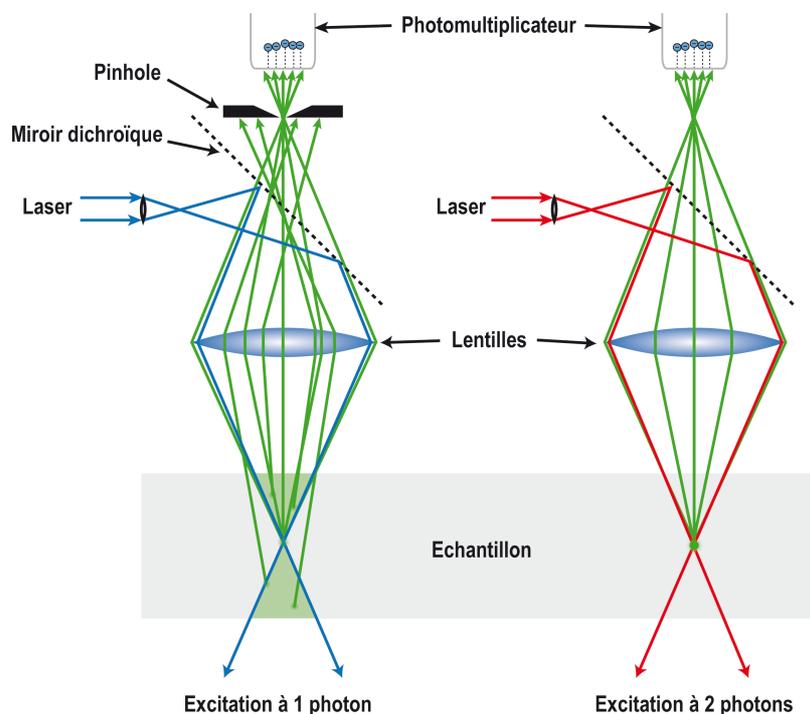


Figure 56 : Schéma comparatif illustrant de manière simplifiée le trajet de la lumière dans le cas d'une excitation à un ou deux photons.

La résolution ω_0 en optique peut être exprimée par une formule la définissant en fonction de la longueur d'onde d'excitation λ et de l'ouverture numérique O.N. de l'objectif utilisé :

$$\omega_0 = \frac{0.61\lambda}{\text{O.N.}}$$

L'ouverture numérique est l'angle maximal que peut former un rayon avec l'axe optique de la lentille, au-delà duquel il ne peut plus entrer dans l'objectif. Plus l'O.N. d'un objectif est grand, plus il peut capter la lumière. A première vue, la résolution de la microscopie par ADP semble être inférieure d'un facteur deux par rapport à la microscopie monophotonique confocale, puisque la longueur d'onde d'excitation est sensiblement le double.

Cependant, ces remarques se basent sur une comparaison avec un microscope confocal parfait, qui aurait un « pinhole » de taille infinitésimale. Aussi, la différence effective de résolution est bien moindre que la prédiction qui provient uniquement de la différence en longueur d'onde.

10.4. Avantages et inconvénients du biphotonique

Ci-dessous, un récapitulatif des avantages et inconvénients de l'ADP :

Avantages

Absorption limitée au plan focal

- Pas de déflouage nécessaire
- Photodégradation limitée au plan focal

Diaphragme ouvert

- Efficacité de détection maximale de la fluorescence
- Quantification de la fluorescence

Utilisation de longueurs d'onde proche IR

- Meilleure pénétration des tissus
- Moins de nuisances pour les cellules vivantes que l'UV

Inconvénients

Résolution inférieure

Photodégradation du plan focal

Effets thermiques liés au rayonnement IR

Article 3 : Multiphotonic microscopy as a processing tool for optical data storage and imaging in biophysics

L'article 3 présente deux applications de la microscopie à deux photons : le stockage de données sur support optique et l'imagerie en biologie. Il est basé sur les travaux menés par l'équipe de physiciens de l'IPCMS dirigée par Alain Fort, auxquels j'ai eu la chance de contribuer modestement. J'ai réalisé l'acquisition de l'image présentée figure 3, qui montre une cellule de BY-2 marquée au DAPI. Le système de balayage n'étant pas fonctionnel à ce stade, l'acquisition de l'image a été réalisée en déplaçant la platine par l'action de petits moteurs pilotés par un logiciel spécifique. L'image obtenue a une résolution de 512X512 pixels et a nécessité un temps d'acquisition de 10 minutes environ. Le système devrait permettre, à terme, d'atteindre une cadence de 30 images par seconde.

Signalement bibliographique ajouté par le :

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
Service Commun de Documentation

Multiphotonic microscopy as a processing tool for optical data storage and imaging in biophysics

E. SUNGUR, G. TAUPIER, O. CREGUT, D. GINDRE, L. PIEUCHOT, J.-L. EVRARD, A.-C. SCHMIT, L. MAGER, K.D. DORKENOO

Annales de Physique, 2007, vol. 32, n° 2-3, pages 147-149

© EDP Sciences

Article 3 : pages 130-132 :

La publication présentée ici dans la thèse est soumise à des droits détenus par un éditeur commercial.

Les utilisateurs de l'UdS peuvent consulter cette publication sur le site de l'éditeur :

<http://dx.doi.org/10.1051/anphys:2008029>

La version imprimée de cette thèse peut être consultée à la bibliothèque ou dans un autre établissement via une demande de prêt entre bibliothèques (PEB) auprès de nos services :

<http://www-sicd.u-strasbg.fr/services/peb/>

Appendice

Abréviations générales

aa	acides aminés	mRFP	monomeric Red Fluorescent Protein
ADN	Acide Désoxyribo Nucléique	MBD	Microtubule Binding Domain
ADNc	ADN complémentaire	MTOC	MicroTubule Organizing Center
APC	Anaphase-Promoting Complex	NES	Nuclear Export Signal
ARN	Acide RiboNucléique	NLS	Nuclear Localization Signal
ARNm	ARN messenger	Spc	Spindle pole body component
ATP	Adénosine TriPhosphate	TIP	Microtubule end Tracking Protein
BY-2	<i>Nicotiana tabacum</i> L. cv Bright Yellow 2	γ-TuC	γ-Tubulin Complex
CDK	Cyclin Dependent Kinase	γ-TuRC	γ-Tubulin Ring Complex
CLASP	Cytoplasmic Linker-Associated Protein	γ-TuSC	γ-Tubulin Small Complex
CLIP	Cytoplasmic Linker Protein	ADP	Absorption à Deux Photons
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole	NEB	Nuclear Envelope Breakdown
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protein	PPB	PreProphase Band
FI	Filament Intermédiaire	Mt	Microtubule
FtsZ	Filamenting temperature-sensitive mutant Z	AAA	ATPases Associated with diverse cellular Activities
GCP	Gamma-tubulin Complex protein	Pfam	Protein family
GDP	Guanosine 5'-DiPhosphate	IR	Infra Rouge
Grip	Gamma ring protein	UV	Ultra Violet
GST	Glutathion S-Transférase	CaMV	Cauliflower Mosaic Virus
GTP	Guanosine 5'-TriPhosphate	Laser	Light Amplification by the Stimulated Emission Radiation
GUS	Glucuronidase	TPA	Two Photon Absorption
MAP	Microtubule Associated Protein		

Unités de mesure

°C	degrés Celcius	M-	méga
Ω	ohm	M	molaire
A	Ampère	min	minute
b	base	mol	mole
c	centi-	n-	nano-
Da	Dalton	N	normal
g	gramme	p-	pico-
g	constante gravitationnelle	pb	paires de base
G-	giga	pH	potentiel Hydrogène
h	heure	PSI	Pound per Square Inch
k-	kilo	rpm	rotation par minute
L	Litre	S	Swedberg, unité de vitesse de sédimentation en gradient
μ-	micro-	sec	seconde
m-	milli-	U	unité enzymatique
m	mètre	V	Volt

Abréviations des principales protéines citées

Alfa	Actin Like Filament	MOR1	MICROTUBULE ORGANIZATION 1
Alp	Altered polarity loci	MreB	Mecillinam resistance (mutant) B
APC	Adenomatous Polyposis Coli	NCD	Non-Claret Disjunctional
ARP2/3	Actin-Related Protein 2/3	NTF2	Nuclear Transport Factor-2
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1	NuMA	Nuclear/Mitotic Apparatus protein
BimC	Bi-polar Motor C	ParM	Plasmid segregation protein (StbA)
BRCA1	BRCA1 Associated RING Domain 1	Plk1	Polo-Like Kinase 1
BtubA	Bacterial tubulin A	POK	Phragmoplast Oriented Kinesin
CDC42	Cell Division Cycle 42	PP2A	Protein Phosphatase 2 A
Cdk1	Cyclin dependent kinase 1	Rac	Ras-related Rho GTPase family member
CEN1	CENtrin 1	Rae1	RNA export 1
ch-TOG	colonic and hepatic tumor over-expressed protein	Ran	Ras-related nuclear protein
ChS	Chalcone Synthase	RanGAP	Ran GTPase-Activating Protein
CKAP5	Cytoskeleton Associated Protein 5	Ras	Rat sarcoma
CLIP170	Cytoplasmic Linker Protein of 170 kDa	RHAMM	Receptor for Hyaluronic Acid-Mediated Motility
CreS	Intermediate filament-like cell shape determinant	Rho	Ras homolog
CRM1	Chromosome Region Maintenance Protein 1	SPC97	Spindle Pole body Component 97
EB1	End Binding protein 1	SPR1	SPIRAL 1
FtsZ	Filamentation Temperature-Sensitive mutant Z	TAN1	TANGLED 1
GCP	Gamma-tubulin Complex Protein	TLP1	AtTPX2 Like Protein 1
GEF	Guanine-nucleotide Exchange Factor	TON1	TONNEAU 1
KAR3	KARYogamy 3	TPX2	Targeting Protein for Xklp2
KCA1	Kinesin Cargo Adaptor 1	TubG1	Tubulin Gamma-1
KinI	Kinesin 1	Tug1p	Tubulin gamma-1 protein
KRP125	Kinase-Related Protein 125	WDL	WVD2-LIKE
LINC	LIttle NUclei	WVD2	WAVE-DAMPENED 2
MAD	Mothers Against Decapentaplegic	XGRIP	Xenopus Gamma tubulin Ring Protein
MamK	Magnetosome protein	XKCM	Xenopus Kinesin Central Motor
MCAK	Mitotic Centromere-Associated Kinesin	XKlp2	Xenopus Kinesin like protein 2
Mog1	Ran guanine nucleotide release factor		

Bibliographie

- Ach, R. A. and Gruissem, W. (1994). "A small nuclear GTP-binding protein from tomato suppresses a *Schizosaccharomyces pombe* cell-cycle mutant." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(13): 5863-7.
- Akoumianaki, T., Kardassis, D., Polioudaki, H., Georgatos, S. D. and Theodoropoulos, P. A. (2009). "Nucleocytoplasmic shuttling of soluble tubulin in mammalian cells." *J Cell Sci* **122**(Pt 8): 1111-8.
- Alberts, Bruce (1994). *Molecular biology of the cell*. New York, Garland Pub.
- Ambrose, J. C. and Cyr, R. (2007). "The kinesin ATK5 functions in early spindle assembly in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **19**(1): 226-36.
- 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**(4): 1584-92.
- Andersen, S. S. (2000). "Spindle assembly and the art of regulating microtubule dynamics by MAPs and Stathmin/Op18." *Trends Cell Biol* **10**(7): 261-7.
- Arnaoutov, A. and Dasso, M. (2003). "The Ran GTPase regulates kinetochore function." *Dev Cell* **5**(1): 99-111.
- Askjaer, P., Galy, V., Hannak, E. and Mattaj, I. W. (2002). "Ran GTPase cycle and importins alpha and beta are essential for spindle formation and nuclear envelope assembly in living *Caenorhabditis elegans* embryos." *Mol Biol Cell* **13**(12): 4355-70.
- Assmann, V., Jenkinson, D., Marshall, J. F. and Hart, I. R. (1999). "The intracellular hyaluronan receptor RHAMM/IHABP interacts with microtubules and actin filaments." *J Cell Sci* **112** (Pt 22): 3943-54.
- 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**(8): 2146-59.
- Baas, P. W., Karabay, A. and Qiang, L. (2005). "Microtubules cut and run." *Trends Cell Biol* **15**(10): 518-24.
- Bamba, C., Bobiniec, Y., Fukuda, M. and Nishida, E. (2002). "The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly in vivo." *Curr Biol* **12**(6): 503-7.
- Bannigan, A., Lizotte-Waniewski, M., Riley, M. and Baskin, T. I. (2008). Emerging molecular mechanisms that power and regulate the anastral mitotic spindle of flowering plants. *Cell Motil Cytoskeleton*. **65**: 1-11.
- Bannigan, A., Scheible, W. R., Lukowitz, W., Fagerstrom, C., Wadsworth, P., Somerville, C. and Baskin, T. I. (2007). "A conserved role for kinesin-5 in plant mitosis." *J Cell Sci* **120**(Pt 16): 2819-27.
- Barr, A. R. and Gergely, F. (2007). "Aurora-A: the maker and breaker of spindle poles." *J Cell Sci* **120**(Pt 17): 2987-96.
- Basto, R., Lau, J., Vinogradova, T., Gardiol, A., Woods, C. G., Khodjakov, A. and Raff, J. W. (2006). "Flies without centrioles." *Cell* **125**(7): 1375-86.
- Bayliss, R., Sardon, T., Vernos, I. and Conti, E. (2003). "Structural basis of Aurora-A activation by TPX2 at the mitotic spindle." *Mol Cell* **12**(4): 851-62.
- Belmont, L. D. and Mitchison, T. J. (1996). "Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules." *Cell* **84**(4): 623-31.
- Bisgrove, S. R., Lee, Y. R., Liu, B., Peters, N. T. and Kropf, D. L. (2008). "The microtubule plus-end binding protein EB1 functions in root responses to touch and gravity signals in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **20**(2): 396-410.
- Blower, M. D., Nachury, M., Heald, R. and Weis, K. (2005). "A Rae1-containing ribonucleoprotein complex is required for mitotic spindle assembly." *Cell* **121**(2): 223-34.
- 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**(Pt 5): 791-801.
- Brunet, S., Sardon, T., Zimmerman, T., Wittmann, T., Pepperkok, R., Karsenti, E. and Vernos, I. (2004). "Characterization of the TPX2 domains involved in microtubule nucleation and spindle assembly in *Xenopus* egg extracts." *Mol Biol Cell* **15**(12): 5318-28.
- Budde, P. P., Kumagai, A., Dunphy, W. G. and Heald, R. (2001). "Regulation of Op18 during spindle assembly in *Xenopus* egg extracts." *J Cell Biol* **153**(1): 149-58.
- 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**(4): 807-27.
- Camilleri, C., Azimzadeh, J., Pastuglia, M., Bellini, C., Grandjean, O. and Bouchez, D. (2002). "The *Arabidopsis* TONNEAU2 gene encodes a putative novel protein phosphatase 2A regulatory subunit essential for the control of the cortical cytoskeleton." *Plant Cell* **14**(4): 833-45.
- Carballido-Lopez, R. and Errington, J. (2003). "A dynamic bacterial cytoskeleton." *Trends Cell Biol* **13**(11): 577-83.
- Carmena, M. and Earnshaw, W. C. (2003). "The cellular geography of aurora kinases." *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**(11): 842-54.
- Casanova, C. M., Rybina, S., Yokoyama, H., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. (2008). "HURP Is Required for Chromatin-induced Microtubule Assembly Independently of TPX2." *Mol Biol Cell*.
- Chabin-Brion, K., Marceiller, J., Perez, F., Settegrana, C., Drechou, A., Durand, G. and Pous, C. (2001). "The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle." *Mol Biol Cell* **12**(7): 2047-60.
- 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**(6): 1737-48.
- Chan, J., Calder, G. M., Doonan, J. H. and Lloyd, C. W. (2003). "EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*." *Nat Cell Biol* **5**(11): 967-71.
- Chang, H. Y., Smertenko, A. P., Igarashi, H., Dixon, D. P. and Hussey, P. J. (2005). "Dynamic interaction of NtMAP65-1a with microtubules in vivo." *J Cell Sci* **118**(Pt 14): 3195-201.
- Chatterjee, S. K., Barron, D. M., Vos, S. and Bane, S. (2001). "Baccatin III induces assembly of purified tubulin into long microtubules." *Biochemistry* **40**(23): 6964-70.
- Chen, C., Marcus, A., Li, W., Hu, Y., Calzada, J. P., Grossniklaus, U., Cyr, R. J. and Ma, H. (2002). "The *Arabidopsis* ATK1 gene is required for spindle morphogenesis in male meiosis." *Development* **129**(10): 2401-9.
- Chretien, D., Fuller, S. D. and Karsenti, E. (1995). "Structure of growing microtubule ends: two-dimensional sheets close into tubes at variable rates." *J Cell Biol* **129**(5): 1311-28.
- Church, K., Nicklas, R. B. and Lin, H. P. (1986). "Micromanipulated bivalents can trigger mini-spindle formation in *Drosophila melanogaster* spermatocyte cytoplasm." *J Cell Biol* **103**(6 Pt 2): 2765-73.
- Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Thibier, C., Guarguaglini, G., Marchetti, E., Di Fiore, B. and Lavia, P. (2004). "Importin beta is transported to spindle poles during mitosis and regulates Ran-dependent spindle assembly factors in mammalian cells." *J Cell Sci* **117**(Pt 26): 6511-22.
- Clarke, P. R. and Zhang, C. (2008). "Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase." *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- Demidov, D., Hesse, S., Tewes, A., Rutten, T., Fuchs, J., Ashtiyani, R. K., Lein, S., Fischer, A., Reuter, G. and Houben, A. (2009). "Aurora1 phosphorylation activity on histone H3 and its cross-talk with other post-translational histone modifications in *Arabidopsis*." *Plant J* **59**(2): 221-30.
- Demidov, D., Van Damme, D., Geelen, D., Blattner, F. R. and Houben, A. (2005). "Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in *Arabidopsis* and other plants." *Plant Cell* **17**(3): 836-48.
- Desai, A. and Mitchison, T. J. (1997). "Microtubule polymerization dynamics." *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**: 83-117.
- Dhonukshe, P., Vischer, N. and Gadella, T. W. (2006). "Contribution of microtubule growth polarity and flux to spindle assembly and functioning in plant cells." *J Cell Sci* **119**(Pt 15): 3193-205.
- Di Fiore, B., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Palena, A., Tassin, A. M., Cundari, E. and Lavia, P. (2003). "Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis." *J Cell Sci* **116**(Pt 16): 3399-411.
- Dittmer, T. A., Stacey, N. J., Sugimoto-Shirasu, K. and Richards, E. J. (2007). "LITTLE NUCLEI genes affecting nuclear morphology in *Arabidopsis thaliana*." *Plant Cell* **19**(9): 2793-803.

- Dogterom, M., Felix, M. A., Guet, C. C. and Leibler, S. (1996). "Influence of M-phase chromatin on the anisotropy of microtubule asters." *J Cell Biol* **133**(1): 125-40.
- Drykova, D., Cenklova, V., Sulimenko, V., Volc, J., Draber, P. and Binarova, P. (2003). "Plant gamma-tubulin interacts with alphabeta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes." *Plant Cell* **15**(2): 465-80.
- Dutcher, S. K. (2001). "The tubulin fraternity: alpha to eta." *Curr Opin Cell Biol* **13**(1): 49-54.
- Dutcher, S. K. (2003). "Long-lost relatives reappear: identification of new members of the tubulin superfamily." *Curr Opin Microbiol* **6**(6): 634-40.
- 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**(4): 671-5.
- 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**(Pt 11): 2423-31.
- Erickson, H. P. and O'Brien, E. T. (1992). "Microtubule dynamic instability and GTP hydrolysis." *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **21**: 145-66.
- Eyers, P. A. and Maller, J. L. (2004). "Regulation of Xenopus Aurora A activation by TPX2." *J Biol Chem* **279**(10): 9008-15.
- Fan, S., Fogg, V., Wang, Q., Chen, X. W., Liu, C. J. and Margolis, B. (2007). "A novel Crumbs3 isoform regulates cell division and ciliogenesis via importin beta interactions." *J Cell Biol* **178**(3): 387-98.
- Fant, X., Merdes, A. and Haren, L. (2004). "Cell and molecular biology of spindle poles and NuMA." *Int Rev Cytol* **238**: 1-57.
- Fiserova, J., Kiseleva, E. and Goldberg, M. W. (2009). "Nuclear envelope and nuclear pore complex structure and organization in tobacco BY-2 cells." *Plant J*.
- Fuller, B. G., Lampson, M. A., Foley, E. A., Rosasco-Nitcher, S., Le, K. V., Tobelmann, P., Brautigam, D. L., Stukenberg, P. T. and Kapoor, T. M. (2008). "Midzone activation of aurora B in anaphase produces an intracellular phosphorylation gradient." *Nature* **453**(7198): 1132-6.
- Garrett, S., Auer, K., Compton, D. A. and Kapoor, T. M. (2002). "hTPX2 is required for normal spindle morphology and centrosome integrity during vertebrate cell division." *Curr Biol* **12**(23): 2055-9.
- Gehmlich, K., Haren, L. and Merdes, A. (2004). "Cyclin B degradation leads to NuMA release from dynein/dynactin and from spindle poles." *EMBO Rep* **5**(1): 97-103.
- Geissler, S., Pereira, G., Spang, A., Knop, M., Soues, S., Kilmartin, J. and Schiebel, E. (1996). "The spindle pole body component Spc98p interacts with the gamma-tubulin-like Tub4p of Saccharomyces cerevisiae at the sites of microtubule attachment." *EMBO J* **15**(15): 3899-911.
- Gergely, F., Draviam, V. M. and Raff, J. W. (2003). "The ch-TOG/XMAP215 protein is essential for spindle pole organization in human somatic cells." *Genes Dev* **17**(3): 336-41.
- Gitai, Z. (2007). "Diversification and specialization of the bacterial cytoskeleton." *Curr Opin Cell Biol* **19**(1): 5-12.
- Goley, E. D. and Welch, M. D. (2006). "The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(10): 713-26.
- Goshima, G. and Vale, R. D. (2003). "The roles of microtubule-based motor proteins in mitosis: comprehensive RNAi analysis in the Drosophila S2 cell line." *J Cell Biol* **162**(6): 1003-16.
- Granger, C. and Cyr, R. (2001). "Use of abnormal preprophase bands to decipher division plane determination." *J Cell Sci* **114**(Pt 3): 599-607.
- Graumann, P. L. (2007). "Cytoskeletal elements in bacteria." *Annu Rev Microbiol* **61**: 589-618.
- Groen, A. C., Maresca, T. J., Gatlin, J. C., Salmon, E. D. and Mitchison, T. J. (2009). "Functional overlap of microtubule assembly factors in chromatin-promoted spindle assembly." *Mol Biol Cell* **20**(11): 2766-73.
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. (2001). "Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity." *Cell* **104**(1): 83-93.
- Gruss, O. J., Wittmann, M., Yokoyama, H., Pepperkok, R., Kufer, T., Silljé, H., Karsenti, E., Mattaj, I. W. and Vernos, I. (2002). "Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells." *Nat Cell Biol* **4**(11): 871-9.
- Guerra-Peraza, O., Kirk, D., Seltzer, V., Veluthambi, K., Schmit, A. C., Hohn, T. and Herzog, E. (2005). "Coat proteins of Rice tungro bacilliform virus and Mungbean yellow mosaic virus contain multiple nuclear-localization signals and interact with importin alpha." *J Gen Virol* **86**(Pt 6): 1815-26.
- Gunawardane, R. N., Zheng, Y., Oegema, K. and Wiese, C. (2001). "Purification and reconstitution of Drosophila gamma-tubulin complexes." *Methods Cell Biol* **67**: 1-25.
- Haizel, T., Merkle, T., Pay, A., Fejes, E. and Nagy, F. (1997). "Characterization of proteins that interact with the GTP-bound form of the regulatory GTPase Ran in Arabidopsis." *Plant J* **11**(1): 93-103.
- Hammond, J. W., Cai, D. and Verhey, K. J. (2008). "Tubulin modifications and their cellular functions." *Curr Opin Cell Biol* **20**(1): 71-6.
- Haren, L., Gnadt, N., Wright, M. and Merdes, A. (2009). "NuMA is required for proper spindle assembly and chromosome alignment in prometaphase." *BMC Res Notes* **2**: 64.
- Hartman, J. J., Mahr, J., McNally, K., Okawa, K., Iwamatsu, A., Thomas, S., Cheesman, S., Heuser, J., Vale, R. D. and McNally, F. J. (1998). "Katanin, a microtubule-severing protein, is a novel AAA ATPase that targets to the centrosome using a WD40-containing subunit." *Cell* **93**(2): 277-87.
- Hatsumi, M. and Endow, S. A. (1992). "Mutants of the microtubule motor protein, nonclaret disjunctional, affect spindle structure and chromosome movement in meiosis and mitosis." *J Cell Sci* **101** (Pt 3): 547-59.
- Heald, R., Tournebise, R., Blank, T., Sandaltzopoulos, R., Becker, P., Hyman, A. and Karsenti, E. (1996). "Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in Xenopus egg extracts." *Nature* **382**(6590): 420-5.
- Heidebrecht, H. J., Buck, F., Steinmann, J., Sprenger, R., Wacker, H. H. and Parwaresch, R. (1997). "p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M." *Blood* **90**(1): 226-33.
- Hetzer, M., Bilbao-Cortes, D., Walther, T. C., Gruss, O. J. and Mattaj, I. W. (2000). "GTP hydrolysis by Ran is required for nuclear envelope assembly." *Mol Cell* **5**(6): 1013-24.
- Hinchcliffe, E. H., Miller, F. J., Cham, M., Khodjakov, A. and Sluder, G. (2001). "Requirement of a centrosomal activity for cell cycle progression through G1 into S phase." *Science* **291**(5508): 1547-50.
- Hyman, A. A. and Karsenti, E. (1996). "Morphogenetic properties of microtubules and mitotic spindle assembly." *Cell* **84**(3): 401-10.
- Izumi, N., Fumoto, K., Izumi, S. and Kikuchi, A. (2008). "GSK-3beta regulates proper mitotic spindle formation in cooperation with a component of the gamma-tubulin ring complex, GCP5." *J Biol Chem* **283**(19): 12981-91.
- Jang, C. Y., Coppinger, J. A., Seki, A., Yates, J. R., 3rd and Fang, G. (2009). "Plk1 and Aurora A regulate the depolymerase activity and the cellular localization of Kif2a." *J Cell Sci* **122**(Pt 9): 1334-41.
- Job, D., Valiron, O. and Oakley, B. (2003). "Microtubule nucleation." *Curr Opin Cell Biol* **15**(1): 111-7.
- Joukov, V., Groen, A. C., Prokhorova, T., Gerson, R., White, E., Rodriguez, A., Walter, J. C. and Livingston, D. M. (2006). "The BRCA1/BARD1 heterodimer modulates ran-dependent mitotic spindle assembly." *Cell* **127**(3): 539-52.
- Kalab, P. and Heald, R. (2008). "The RanGTP gradient - a GPS for the mitotic spindle." *J Cell Sci* **121**(Pt 10): 1577-86.
- Kaláb, P., Pralle, A., Isacoff, E. Y., Heald, R. and Weis, K. (2006). "Analysis of a RanGTP-regulated gradient in mitotic somatic cells." *Nature* **440**(7084): 697-701.
- Kalab, P., Weis, K. and Heald, R. (2002). "Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic Xenopus egg extracts." *Science* **295**(5564): 2452-6.
- Karsenti, E., Newport, J., Hubble, R. and Kirschner, M. (1984). "Interconversion of metaphase and interphase microtubule arrays, as studied by the injection of centrosomes and nuclei into Xenopus eggs." *J Cell Biol* **98**(5): 1730-45.
- Kawabe, A., Matsunaga, S., Nakagawa, K., Kurihara, D., Yoneda, A., Hasezawa, S., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2005). "Characterization of plant Aurora kinases during mitosis." *Plant Mol Biol* **58**(1): 1-13.
- Kawamura, E., Himmelspach, R., Rashbrooke, M. C., Whittington, A. T., Gale, K. R., Collings, D. A. and Wasteneys, G. O. (2006). "MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the Arabidopsis root." *Plant Physiol* **140**(1): 102-14.

- 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**(Pt 24): 4114-23.
- Khodjakov, A., Cole, R. W., Oakley, B. R. and Rieder, C. L. (2000). "Centrosome-independent mitotic spindle formation in vertebrates." *Curr Biol* **10**(2): 59-67.
- Knop, M., Pereira, G., Geissler, S., Grein, K. and Schiebel, E. (1997). "The spindle pole body component Spc97p interacts with the gamma-tubulin of *Saccharomyces cerevisiae* and functions in microtubule organization and spindle pole body duplication." *EMBO J* **16**(7): 1550-64.
- Knop, M. and Schiebel, E. (1997). "Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p." *EMBO J* **16**(23): 6985-95.
- Koffa, M. D., Casanova, C. M., Santarella, R., Kocher, T., Wilm, M. and Mattaj, I. W. (2006). "HURP is part of a Ran-dependent complex involved in spindle formation." *Curr Biol* **16**(8): 743-54.
- Kufer, T. A., Silljé, H. H., Körner, R., Gruss, O. J., Meraldi, P. and Nigg, E. A. (2002). "Human TPX2 is required for targeting Aurora-A kinase to the spindle." *J Cell Biol* **158**(4): 617-23.
- Kunda, P. and Baum, B. (2009). "The actin cytoskeleton in spindle assembly and positioning." *Trends Cell Biol* **19**(4): 174-9.
- Kunda, P., Pelling, A. E., Liu, T. and Baum, B. (2008). "Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis." *Curr Biol* **18**(2): 91-101.
- Kurihara, D., Matsunaga, S., Kawabe, A., Fujimoto, S., Noda, M., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2006). "Aurora kinase is required for chromosome segregation in tobacco BY-2 cells." *Plant J* **48**(4): 572-80.
- Kurihara, D., Matsunaga, S., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2008). "Live cell imaging reveals plant aurora kinase has dual roles during mitosis." *Plant Cell Physiol* **49**(8): 1256-61.
- Lawrence, C. J., Dawe, R. K., Christie, K. R., Cleveland, D. W., Dawson, S. C., Endow, S. A., Goldstein, L. S., Goodson, H. V., Hirokawa, N., Howard, J., Malmberg, R. L., McIntosh, J. R., Miki, H., Mitchison, T. J., Okada, Y., Reddy, A. S., Saxton, W. M., Schliwa, M., Scholey, J. M., Vale, R. D., Walczak, C. E. and Wordeman, L. (2004). "A standardized kinesin nomenclature." *J Cell Biol* **167**(1): 19-22.
- Lee, Y. R. and Liu, B. (2004). "Cytoskeletal motors in Arabidopsis. Sixty-one kinesins and seventeen myosins." *Plant Physiol* **136**(4): 3877-83.
- Li, H. Y. and Zheng, Y. (2004). "The production and localization of GTP-bound Ran in mitotic mammalian tissue culture cells." *Cell Cycle* **3**(8): 993-5.
- Lin, D. M., Ma, Y., Xiao, T., Guo, S. P., Han, N. J., Su, K., Yi, S. Z., Fang, J., Cheng, S. J. and Gao, Y. N. (2006). "[TPX2 expression and its significance in squamous cell carcinoma of lung]." *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* **35**(9): 540-4.
- Lloyd, C. and Chan, J. (2006). "Not so divided: the common basis of plant and animal cell division." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(2): 147-52.
- Lucas, E. P. and Raff, J. W. (2007). "Maintaining the proper connection between the centrioles and the pericentriolar matrix requires *Drosophila* centrosomin." *J Cell Biol* **178**(5): 725-32.
- Luders, J. and Stearns, T. (2007). "Microtubule-organizing centres: a re-evaluation." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(2): 161-7.
- Mahoney, N. M., Goshima, G., Douglass, A. D. and Vale, R. D. (2006). "Making microtubules and mitotic spindles in cells without functional centrosomes." *Curr Biol* **16**(6): 564-9.
- Maiato, H., Rieder, C. L. and Khodjakov, A. (2004). "Kinetochore-driven formation of kinetochore fibers contributes to spindle assembly during animal mitosis." *J Cell Biol* **167**(5): 831-40.
- Mao, G., Chan, J., Calder, G., Doonan, J. H. and Lloyd, C. W. (2005). "Modulated targeting of GFP-AtMAP65-1 to central spindle microtubules during division." *Plant J* **43**(4): 469-78.
- Marcus, A. I., Ambrose, J. C., Blickey, L., Hancock, W. O. and Cyr, R. J. (2002). "Arabidopsis thaliana protein, ATK1, is a minus-end directed kinesin that exhibits non-processive movement." *Cell Motil Cytoskeleton* **52**(3): 144-50.
- Marcus, A. I., Li, W., Ma, H. and Cyr, R. J. (2003). "A kinesin mutant with an atypical bipolar spindle undergoes normal mitosis." *Mol Biol Cell* **14**(4): 1717-26.
- Masuda, K., Xu, Z. J., Takahashi, S., Ito, A., Ono, M., Nomura, K. and Inoue, M. (1997). "Peripheral framework of carrot cell nucleus contains a novel protein predicted to exhibit a long alpha-helical domain." *Exp Cell Res* **232**(1): 173-81.
- Matthies, H. J., McDonald, H. B., Goldstein, L. S. and Theurkauf, W. E. (1996). "Anastral meiotic spindle morphogenesis: role of the non-claret disjunctional kinesin-like protein." *J Cell Biol* **134**(2): 455-64.
- Mazia, D. (1984). "Centrosomes and mitotic poles." *Exp Cell Res* **153**(1): 1-15.
- McDowell, J. M., Huang, S., McKinney, E. C., An, Y. Q. and Meagher, R. B. (1996). "Structure and evolution of the actin gene family in Arabidopsis thaliana." *Genetics* **142**(2): 587-602.
- McNally, F. J. (1996). "Modulation of microtubule dynamics during the cell cycle." *Curr Opin Cell Biol* **8**(1): 23-9.
- McNally, K., Audhya, A., Oegema, K. and McNally, F. J. (2006). "Katanin controls mitotic and meiotic spindle length." *J Cell Biol* **175**(6): 881-91.
- Merkle, T., Haizel, T., Matsumoto, T., Harter, K., Dallmann, G. and Nagy, F. (1994). "Phenotype of the fission yeast cell cycle regulatory mutant pim1-46 is suppressed by a tobacco cDNA encoding a small, Ran-like GTP-binding protein." *Plant J* **6**(4): 555-65.
- Miao, Y., Laun, T., Zimmermann, P. and Zentgraf, U. (2004). "Targets of the WRKY53 transcription factor and its role during leaf senescence in Arabidopsis." *Plant Mol Biol* **55**(6): 853-67.
- Miki, H., Okada, Y. and Hirokawa, N. (2005). "Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function." *Trends Cell Biol* **15**(9): 467-76.
- Mollinari, C., Kleman, J. P., Jiang, W., Schoehn, G., Hunter, T. and Margolis, R. L. (2002). "PRC1 is a microtubule binding and bundling protein essential to maintain the mitotic spindle midzone." *J Cell Biol* **157**(7): 1175-86.
- Morita-Fujimura, Y., Kurachi, M., Tashiro, H., Komiya, Y. and Tashiro, T. (1996). "Reduced microtubule-nucleation activity of tau after dephosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun* **225**(2): 462-8.
- Moritz, M. and Agard, D. A. (2001). "Gamma-tubulin complexes and microtubule nucleation." *Curr Opin Struct Biol* **11**(2): 174-81.
- 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**(6557): 638-40.
- Moss, D. K., Wilde, A. and Lane, J. D. (2009). "Dynamic release of nuclear RanGTP triggers TPX2-dependent microtubule assembly during the apoptotic execution phase." *J Cell Sci* **122**(Pt 5): 644-55.
- Müller, S., Han, S. and Smith, L. G. (2006). "Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in Arabidopsis thaliana." *Curr Biol* **16**(9): 888-94.
- Muller, S., Smertenko, A., Wagner, V., Heinrich, M., Hussey, P. J. and Hauser, M. T. (2004). "The plant microtubule-associated protein AtMAP65-3/PLE is essential for cytokinetic phragmoplast function." *Curr Biol* **14**(5): 412-7.
- Murata, T. and Hasebe, M. (2007). "Microtubule-dependent microtubule nucleation in plant cells." *J Plant Res* **120**(1): 73-8.
- 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**(10): 961-8.
- 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." *Mol Biol Cell* **12**(11): 3340-52.
- Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R. and Weis, K. (2001). "Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly." *Cell* **104**(1): 95-106.
- Nakajima, K., Furutani, I., Tachimoto, H., Matsubara, H. and Hashimoto, T. (2004). "SPIRAL1 encodes a plant-specific microtubule-localized protein required for directional control of rapidly expanding Arabidopsis cells." *Plant Cell* **16**(5): 1178-90.
- Niethammer, P., Bastiaens, P. and Karsenti, E. (2004). "Stathmin-tubulin interaction gradients in motile and mitotic cells." *Science* **303**(5665): 1862-6.
- Ohkura, H., Garcia, M. A. and Toda, T. (2001). "Dis1/TOG universal microtubule adaptors - one MAP for all?" *J Cell Sci* **114**(Pt 21): 3805-12.
- Oriolo, A. S., Wald, F. A., Canessa, G. and Salas, P. J. (2007). "GCP6 binds to intermediate filaments: a novel function of keratins in the organization of microtubules in epithelial cells." *Mol Biol Cell* **18**(3): 781-94.
- Ouchi, M., Fujiuchi, N., Sasai, K., Katayama, H., Minamishima, Y. A., Ongusaha, P. P., Deng, C., Sen, S., Lee, S. W. and Ouchi, T. (2004). "BRCA1 phosphorylation by Aurora-A in the regulation of G2 to M transition." *J Biol Chem* **279**(19): 19643-8.

- Pak, C. W., Flynn, K. C. and Bamberg, J. R. (2008). "Actin-binding proteins take the reins in growth cones." *Nat Rev Neurosci* **9**(2): 136-47.
- Palevitz, B. A. (1987). "Actin in the preprophase band of *Allium cepa*." *J Cell Biol* **104**(6): 1515-9.
- Parry, D. A., Strelkov, S. V., Burkhard, P., Aebi, U. and Herrmann, H. (2007). "Towards a molecular description of intermediate filament structure and assembly." *Exp Cell Res* **313**(10): 2204-16.
- Pascreau, G., Eckerdt, F., Lewellyn, A. L., Prigent, C. and Maller, J. L. (2009). "Phosphorylation of p53 is regulated by TPX2-Aurora A in xenopus oocytes." *J Biol Chem* **284**(9): 5497-505.
- Pastuglia, M., Azimzadeh, J., Goussot, M., Camilleri, C., Belcram, K., Evrard, J. L., Schmit, A. C., Guerche, P. and Bouchez, D. (2006). "Gamma-tubulin is essential for microtubule organization and development in *Arabidopsis*." *Plant Cell* **18**(6): 1412-25.
- Pastuglia, M. and Bouchez, D. (2007). "Molecular encounters at microtubule ends in the plant cell cortex." *Curr Opin Plant Biol* **10**(6): 557-63.
- Pay, A., Resch, K., Frohnmeyer, H., Fejes, E., Nagy, F. and Nick, P. (2002). "Plant RanGAPs are localized at the nuclear envelope in interphase and associated with microtubules in mitotic cells." *Plant J* **30**(6): 699-709.
- Perrin, R. M., Wang, Y., Yuen, C. Y., Will, J. and Masson, P. H. (2007). "WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*." *Plant J* **49**(6): 961-71.
- Poirot, O., O'Toole, E. and Notredame, C. (2003). "Tcoffe@igs: A web server for computing, evaluating and combining multiple sequence alignments." *Nucleic Acids Res* **31**(13): 3503-6.
- Quan, L., Xiao, R., Li, W., Oh, S. A., Kong, H., Ambrose, J. C., Malcos, J. L., Cyr, R., Twell, D. and Ma, H. (2008). "Functional divergence of the duplicated AtKIN14a and AtKIN14b genes: critical roles in *Arabidopsis* meiosis and gametophyte development." *Plant J* **53**(6): 1013-26.
- Rajangam, A. S., Kumar, M., Aspeborg, H., Guerriero, G., Arvestad, L., Pansri, P., Brown, C. J., Hober, S., Blomqvist, K., Divine, C., Ezcurra, I., Mellerowicz, E., Sundberg, B., Bulone, V. and Teeri, T. T. (2008). "MAP20, a microtubule-associated protein in the secondary cell walls of *Populus tremula* L. x *tremuloides* Michx is a target of the cellulose synthesis inhibitor, 2,6-dichlorobenzonitrile." *Plant Physiol*.
- Reddy, A. S. and Day, I. S. (2001). "Kinesins in the *Arabidopsis* genome: a comparative analysis among eukaryotes." *BMC Genomics* **2**(1): 2.
- Rios, R. M., Sanchis, A., Tassin, A. M., Fedriani, C. and Bornens, M. (2004). "GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation." *Cell* **118**(3): 323-35.
- Rodionov, V. I. and Borisy, G. G. (1997). "Microtubule treadmilling in vivo." *Science* **275**(5297): 215-8.
- 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**(3): 680-9.
- Rose, A. and Meier, I. (2001). "A domain unique to plant RanGAP is responsible for its targeting to the plant nuclear rim." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15377-82.
- Saitou, N. and Nei, M. (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." *Mol Biol Evol* **4**(4): 406-25.
- Salisbury, J. L. (2007). "A mechanistic view on the evolutionary origin for centrion-based control of centriole duplication." *J Cell Physiol* **213**(2): 420-8.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). "Molecular cloning. A laboratory manual." *Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, New York 2nd edition*.
- Sanford, J. C., Smith, F. D. and Russell, J. A. (1993). "Optimizing the biologic process for different biological applications." *Methods Enzymol* **217**: 483-509.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**(12): 5463-7.
- Sardon, T., Peset, I., Petrova, B. and Vernos, I. (2008). "Dissecting the role of Aurora A during spindle assembly." *EMBO J* **27**(19): 2567-79.
- Sawin, K. E. and Endow, S. A. (1993). "Meiosis, mitosis and microtubule motors." *Bioessays* **15**(6): 399-407.
- Sawin, K. E., LeGuellec, K., Philippe, M. and Mitchison, T. J. (1992). "Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor." *Nature* **359**(6395): 540-3.
- Scharer, C. D., Laycock, N., Osunkoya, A. O., Logani, S., McDonald, J. F., Benigno, B. B. and Moreno, C. S. (2008). "Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells." *J Transl Med* **6**: 79.
- Schatten, H. and Schatten, G. (1986). "Motility and centrosomal organization during sea urchin and mouse fertilization." *Cell Motil Cytoskeleton* **6**(2): 163-75.
- Schatz, C. A., Santarella, R., Hoenger, A., Karsenti, E., Mattaj, J. W., Gruss, O. J. and Carazo-Salas, R. E. (2003). "Importin alpha-regulated nucleation of microtubules by TPX2." *EMBO J* **22**(9): 2060-70.
- 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**(1): 115-27.
- Schmit, A. C. and Nick, P. (2008). Microtubules and the Evolution of Mitosis. *Plant Cell Monographs*. P. Nick. Heidelberg, Springer-Verlag: 33.
- Schuyler, S. C., Liu, J. Y. and Pellman, D. (2003). "The molecular function of Ase1p: evidence for a MAP-dependent midzone-specific spindle matrix. Microtubule-associated proteins." *J Cell Biol* **160**(4): 517-28.
- Schuyler, S. C. and Pellman, D. (2001). "Microtubule plus-end-tracking proteins": The end is just the beginning." *Cell* **105**(4): 421-4.
- Schwarzerova, K., Petrasek, J., Panigrahi, K. C., Zelenkova, S., Opatrný, Z. and Nick, P. (2006). "Intranuclear accumulation of plant tubulin in response to low temperature." *Protoplasma* **227**(2-4): 185-96.
- Sedbrook, J. C., Ehrhardt, D. W., Fisher, S. E., Scheible, W. R. and Somerville, C. R. (2004). "The *Arabidopsis* sku6/spiral1 gene encodes a plus end-localized microtubule-interacting protein involved in directional cell expansion." *Plant Cell* **16**(6): 1506-20.
- 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**(2): 322-31.
- Sharp, D. J., McDonald, K. L., Brown, H. M., Matthies, H. J., Walczak, C., Vale, R. D., Mitchison, T. J. and Scholey, J. M. (1999). "The bipolar kinesin, KLP61F, cross-links microtubules within inter-polar microtubule bundles of *Drosophila* embryonic mitotic spindles." *J Cell Biol* **144**(1): 125-38.
- Shigeishi, H., Ohta, K., Hiraoka, M., Fujimoto, S., Minami, M., Higashikawa, K. and Kamata, N. (2009). "Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas." *Oncol Rep* **21**(2): 341-4.
- Shimamura, M., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Akashi, T., Mizuno, K., Nishihara, N., Tomizawa, K., Yoshimoto, K., Deguchi, H., Hosoya, H., Horio, T. and Mineyuki, Y. (2004). "Gamma-tubulin in basal land plants: characterization, localization, and implication in the evolution of acentrional microtubule organizing centers." *Plant Cell* **16**(1): 45-59.
- Silljé, H. H., Nagel, S., Körner, R. and Nigg, E. A. (2006). "HURP is a Ran-importin beta-regulated protein that stabilizes kinetochore microtubules in the vicinity of chromosomes." *Curr Biol* **16**(8): 731-42.
- 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**(2): 481-9.
- Smith, L. T., Mayerson, J., Nowak, N. J., Suster, D., Mohammed, N., Long, S., Auer, H., Jones, S., McKeegan, C., Young, G., Bos, G., Plass, C. and Morrison, C. (2006). "20q11.1 amplification in giant-cell tumor of bone: Array CGH, FISH, and association with outcome." *Genes Chromosomes Cancer* **45**(10): 957-66.
- Steggerda, S. M. and Paschal, B. M. (2000). "The mammalian Mog1 protein is a guanine nucleotide release factor for Ran." *J Biol Chem* **275**(30): 23175-80.
- Stewart, S. and Fang, G. (2005). "Anaphase-promoting complex/cyclosome controls the stability of TPX2 during mitotic exit." *Mol Cell Biol* **25**(23): 10516-27.
- 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**(8): 1099-1106.
- Sumara, I., Gimenez-Abian, J. F., Gerlich, D., Hirota, T., Kraft, C., de la Torre, C., Ellenberg, J. and Peters, J. M. (2004). "Roles of polo-like kinase 1 in the assembly of functional mitotic spindles." *Curr Biol* **14**(19): 1712-22.

- Tahara, K., Takagi, M., Ohsugi, M., Sone, T., Nishiumi, F., Maeshima, K., Horiuchi, Y., Tokai-Nishizumi, N., Imamoto, F., Yamamoto, T., Kose, S. and Imamoto, N. (2008). "Importin-beta and the small guanosine triphosphatase Ran mediate chromosome loading of the human chromokinesin Kid." *J Cell Biol* **180**(3): 493-506.
- Tedeschi, A., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Roscioli, E., Rensen, W. M. and Lavia, P. (2007). "RANBP1 localizes a subset of mitotic regulatory factors on spindle microtubules and regulates chromosome segregation in human cells." *J Cell Sci* **120**(Pt 21): 3748-61.
- Terryn, N., Van Montagu, M. and Inze, D. (1993). "GTP-binding proteins in plants." *Plant Mol Biol* **22**(1): 143-52.
- Torosantucci, L., De Luca, M., Guarguaglini, G., Lavia, P. and Degrossi, F. (2008). "Localized RanGTP accumulation promotes microtubule nucleation at kinetochores in somatic mammalian cells." *Mol Biol Cell* **19**(5): 1873-82.
- Trieselmann, N., Armstrong, S., Rauw, J. and Wilde, A. (2003). "Ran modulates spindle assembly by regulating a subset of TPX2 and Kid activities including Aurora A activation." *J Cell Sci* **116**(Pt 23): 4791-8.
- Van Damme, D., Bouget, F. Y., Van Poucke, K., Inzé, D. and Geelen, D. (2004). "Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagged proteins." *Plant J* **40**(3): 386-98.
- 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**(4): 3956-67.
- 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., Pharezyn, 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**(7): 1226-38.
- Vanstraelen, M., Inze, D. and Geelen, D. (2006). "Mitosis-specific kinesins in Arabidopsis." *Trends Plant Sci* **11**(4): 167-75.
- Vantard, M., Lambert, A. M., De Mey, J., Picquot, P. and Van Eldik, L. J. (1985). "Characterization and immunocytochemical distribution of calmodulin in higher plant endosperm cells: localization in the mitotic apparatus." *J Cell Biol* **101**(2): 488-99.
- Vaughan, S., Attwood, T., Navarro, M., Scott, V., McKean, P. and Gull, K. (2000). "New tubulins in protozoal parasites." *Curr Biol* **10**(7): R258-9.
- Vernos, I., Raats, J., Hirano, T., Heasman, J., Karsenti, E. and Wylie, C. (1995). "Xklp1, a chromosomal Xenopus kinesin-like protein essential for spindle organization and chromosome positioning." *Cell* **81**(1): 117-27.
- Vishniakov, I. E. and Borkhsenius, S. N. (2007). "[FtsZ and the division of bacterial cell]." *Tsitologija* **49**(5): 421-9.
- Wade, R. H. and Chretien, D. (1993). "Cryoelectron microscopy of microtubules." *J Struct Biol* **110**(1): 1-27.
- Walczak, C. E. (2003). "The Kin I kinesins are microtubule end-stimulated ATPases." *Mol Cell* **11**(2): 286-8.
- Walczak, C. E. and Heald, R. (2008). "Mechanisms of mitotic spindle assembly and function." *Int Rev Cytol* **265**: 111-58.
- Walczak, C. E., Mitchison, T. J. and Desai, A. (1996). "XKCM1: a Xenopus kinesin-related protein that regulates microtubule dynamics during mitotic spindle assembly." *Cell* **84**(1): 37-47.
- Walker, K. L., Müller, S., Moss, D., Ehrhardt, D. W. and Smith, L. G. (2007). "Arabidopsis TANGLED identifies the division plane throughout mitosis and cytokinesis." *Curr Biol* **17**(21): 1827-36.
- 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**(8): 1929-43.
- Wiedemeier, A. M., Judy-March, J. E., Hocart, C. H., Wasteneys, G. O., Williamson, R. E. and Baskin, T. I. (2002). "Mutant alleles of Arabidopsis RADially SWOLLEN 4 and 7 reduce growth anisotropy without altering the transverse orientation of cortical microtubules or cellulose microfibrils." *Development* **129**(20): 4821-30.
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Merdes, A. and Zheng, Y. (2001). "Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly." *Science* **291**(5504): 653-6.
- Wilde, A. and Zheng, Y. (1999). "Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran." *Science* **284**(5418): 1359-62.
- Wittmann, T., Boleti, H., Antony, C., Karsenti, E. and Vernos, I. (1998). "Localization of the kinesin-like protein Xklp2 to spindle poles requires a leucine zipper, a microtubule-associated protein, and dynein." *J Cell Biol* **143**(3): 673-85.
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. and Vernos, I. (2000). "TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization." *J Cell Biol* **149**(7): 1405-18.
- Xiang, X. and Plamann, M. (2003). "Cytoskeleton and motor proteins in filamentous fungi." *Curr Opin Microbiol* **6**(6): 628-33.
- Xu, X. 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." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(47): 18637-42.
- 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**(2): 634-44.
- Yao, M., Wakamatsu, Y., Itoh, T. J., Shoji, T. and Hashimoto, T. (2008). "Arabidopsis SPIRAL2 promotes uninterrupted microtubule growth by suppressing the pause state of microtubule dynamics." *J Cell Sci* **121**(Pt 14): 2372-81.
- Yoneda, A., Akatsuka, M., Hoshino, H., Kumagai, F. and Hasezawa, S. (2005). "Decision of spindle poles and division plane by double preprophase bands in a BY-2 cell line expressing GFP-tubulin." *Plant Cell Physiol* **46**(3): 531-8.
- Yu, C. T., Hsu, J. M., Lee, Y. C., Tsou, A. P., Chou, C. K. and Huang, C. Y. (2005). "Phosphorylation and stabilization of HURP by Aurora-A: implication of HURP as a transforming target of Aurora-A." *Mol Cell Biol* **25**(14): 5789-800.
- Yuen, C. Y., Pearlman, R. S., Silo-Suh, L., Hilsen, P., Carroll, K. L. and Masson, P. H. (2003). "WVD2 and WDL1 modulate helical organ growth and anisotropic cell expansion in Arabidopsis." *Plant Physiol* **131**(2): 493-506.
- Yvon, A. M. and Wadsworth, P. (1997). "Non-centrosomal microtubule formation and measurement of minus end microtubule dynamics in A498 cells." *J Cell Sci* **110** (Pt 19): 2391-401.
- Zhang, C. and Clarke, P. R. (2001). "Roles of Ran-GTP and Ran-GDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system." *Curr Biol* **11**(3): 208-12.
- Zheng, Y., Wong, M. L., Alberts, B. and Mitchison, T. (1995). "Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex." *Nature* **378**(6557): 578-83.
- Zhu, C., Zhao, J., Bibikova, M., Levenson, J. D., Bossy-Wetzell, E., Fan, J. B., Abraham, R. T. and Jiang, W. (2005). "Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference." *Mol Biol Cell* **16**(7): 3187-99.
- Zuo, J., Niu, Q. W. and Chua, N. H. (2000). "Technical advance: An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants." *Plant J* **24**(2): 265-73.

Résumé

Dans les cellules eucaryotes, la division cellulaire nécessite l'assemblage d'une structure bipolaire complexe appelée fuseau mitotique. L'assemblage de ce fuseau est initié par la nucléation de microtubules.

Dans les cellules méiotiques de vertébrés, les microtubules sont nucléés autour de la chromatine et forment un fuseau en l'absence de centrosome. Cette voie de signalisation dépendante de la chromatine fait intervenir un gradient de Ran GTPase activée (Ran-GTP). Un des effecteurs protéiques impliqués dans cette voie est TPX2 (pour Targeting Protein for Xklp2). En interphase, TPX2 est localisée dans le noyau sous une forme inactive, associée aux importines. En début de mitose, TPX2 est libérée des importines par Ran-GTP et induit la nucléation de microtubules autour de la chromatine. Outre son importance dans la nucléation des microtubules, elle est nécessaire à la localisation de la kinase Aurora A aux pôles fusoriaux et à son activation par autophosphorylation. Une fois activée, la kinase va phosphoryler TPX2 et de nombreux autres facteurs impliqués dans différents aspects de la division cellulaire.

Les plantes supérieures assemblent leur fuseau en l'absence de centrosome. Un pré-fuseau prophasique est formé avant rupture de l'enveloppe nucléaire par convergence de microtubules nucléés au niveau de la membrane externe. Des études récentes suggèrent que les mécanismes impliqués dans la formation de ce fuseau pourraient faire intervenir des voies de signalisation proches de celles rencontrées dans les cellules méiotiques animales. En effet, de nombreux gènes impliqués dans la formation du fuseau animal ont des homologues chez les plantes, codant notamment pour des kinases de type AURORA ainsi que pour Ran et ses principaux partenaires.

Au cours de mon travail de thèse, j'ai cherché à identifier et caractériser l'orthologue végétal de TPX2 et à évaluer son implication dans l'assemblage du fuseau mitotique des plantes. Des recherches par comparaison de séquences ont permis d'identifier une protéine d'*Arabidopsis* encodée par un gène unique (AT1G03780), baptisée AtTPX2. Les données présentées dans cette thèse décrivent les caractéristiques structurales et fonctionnelles d'AtTPX2 et démontrent que cette protéine est l'orthologue des TPX2 animales. La dynamique particulière d'AtTPX2 qui précède la rupture de l'enveloppe nucléaire suggère que les plantes ont développé un système d'export de la protéine afin d'assembler correctement leur fuseau mitotique en l'absence de centrosome. D'autre part, cette étude a permis d'identifier d'autres protéines végétales possédant certains domaines d'AtTPX2, suggérant, au cours de l'évolution, des remaniements géniques spécifiques à la lignée verte.

Abstract

Higher plant cells are characterized by dispersed microtubule organizing centers. During interphase, they were identified at the nuclear surface, close to the cortex and along pre-existing microtubules. However, the mechanisms of spindle microtubule assembly remain largely unknown. In acentrosomal animal cells like *Xenopus* oocytes, the Targeting Protein for Xklp2 (TPX2) was characterized as an essential player in perichromosomal spindle assembly, suggesting that it may be a central regulator of spindle formation without centrosomes. The aim of this work was first to identify and then to functionally characterize the *Arabidopsis* orthologue of TPX2.

The best candidate corresponded to a single gene referred as AT1G03780. Stable transformants of *Arabidopsis* plants and tobacco BY-2 cells expressing GFP-AtTPX2 fusions were obtained. The fusion protein was targeted within the nucleus in interphase and actively exported shortly before nuclear envelope breakdown (NEB), probably participating in prospindle formation around the prophase nucleus. This behaviour differs from animal cells in which TPX2 nucleates microtubules only after NEB. In prometaphase, AtTPX2 colocalizes with spindle fibers and is rapidly degraded in telophase, like in vertebrates, suggesting that the protein is involved in early steps of mitosis. We characterized two nuclear localization signals, one nuclear export signal and two microtubule binding domains specific for the *Arabidopsis* protein, arguing in favor of its intracellular targeting and dynamics we followed. Furthermore, AtTPX2 was shown to rescue microtubule nucleation in a TPX2-depleted *Xenopus* extract, indicating that this function is conserved in the plant protein. In addition, the injection of anti-TPX2 antibodies in *Tradescantia* stamen hair cells inhibited cell division just before NEB. We identified by BLAST analysis several other proteins sharing similarities with AtTPX2 domains. Subcellular analysis has shown that these AtTPX2 like proteins have the property to bind microtubules and to shuttle between nucleoplasm and cytoplasm.

All together, our data provide new insights into plant cell division, suggesting that throughout evolution, TPX2 has conserved essential functions in spindle assembly. Furthermore, this work revealed that a large number of AtTPX2 paralogs does exist, suggesting a wide plant specific evolutionary radiation.