

Université de Montréal

**Rôle des MKKK19, 20 et 21 dans le développement  
d'*Arabidopsis thaliana***

par

Rachid Benhamman

Institut de recherche en biologie végétale. Département de sciences biologiques  
Faculté des Arts et des Sciences

Thèse présentée à la Faculté des Arts et des Sciences  
en vue de l'obtention du grade de Ph. D  
en Sciences Biologiques  
option biologie moléculaire et cellulaire

Août 2016

© Benhamman, 2016

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée

**Rôle des MKKK19, 20 et 21 dans le développement d'*Arabidopsis thaliana***

Présentée par:  
Rachid Benhamman

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

David Morse, président-rapporteur  
Daniel P. Matton, directeur de recherche  
Johannes Stratmann, examinateur externe  
Sophie Breton, membre du jury  
Hélène Lebel, représentante de la doyenne

## Résumé

La phosphorylation des protéines constitue la modification post-traductionnelle la plus importante chez les eucaryotes. Réalisée par des protéines kinases, elle intervient dans plusieurs processus cellulaires et en particulier dans la signalisation. La grande famille des kinases est subdivisée en plusieurs groupes dont les MAPKs qui sont caractérisées par un relais de phosphorylation comprenant trois niveaux (MAPKKK-MAPKK-MAPK). Le rôle des MAPKs a été démontré chez un grand nombre d'organismes et est lié fonctionnellement à plusieurs processus biologiques. Dans ce projet, nous avons essayé de mettre en évidence la fonction de trois MAPKKK (MKKK19, MKKK20 et MKKK21) chez *Arabidopsis thaliana*, une plante modèle dont le génome a été entièrement séquencé en 2000. Ces trois kinases sont similaires aux kinases FRK1 et FRK2 qui sont impliquées dans le développement des gamètes mâles et femelles chez la pomme de terre sauvage *Solanum chacoense*. Les *MKKK19-21* sont fortement exprimées au niveau de la fleur et plus précisément dans le pollen. L'analyse des lignées de plantes simples mutants pour ces trois kinases ne montre aucun défaut développemental évident en conditions normales suggérant fortement une redondance fonctionnelle entre ces gènes. Par contre, les plantes sous-exprimant les *MKKK19-21* produisent un grand nombre de grains de pollen déformé et non viable. La croissance des tubes polliniques est aussi affectée dans ces mutants. Les observations microscopiques ont montré que c'est au stade tricellulaire de la microsporogénèse que ces lignées mutantes sont affectées. Ainsi, ces trois kinases joueraient un rôle important dans la phase tardive du développement pollinique chez *Arabidopsis*.

De façon à déterminer les protéines pouvant agir tant en amont qu'en aval des MKKK19-21, un criblage par la méthode de double hybride chez la levure a été réalisé à partir d'une banque d'ADNc des transcrits d'*A.thaliana*. Ceci nous a permis d'identifier un grand nombre d'interactants, dont plusieurs protéines kinases pouvant former des voies de signalisation avec les trois MKKK19-21. C'est le cas de la MPK18 qui interagit spécifiquement avec la MKKK20 et pour laquelle un rôle dans la régulation des microtubules corticaux (MTC) avait été démontré. Les résultats de l'analyse des mutants *MKKK20* ainsi que les essais kinases nous ont permis de placer la MKKK20 en amont de la MPK18 dans la

régulation des MTC. De plus, nous avons pu montrer que la MKK3 interagit spécifiquement avec la MKKK20 parmi les dix MKKs d'*Arabidopsis* et que ces deux kinases peuvent former un module MAPK aussi lié fonctionnellement aux MTC. L'analyse des doubles mutants (*mkkk20/mpk18* et *mkk3/mpk18*) ainsi que les essais kinases et les observations microscopiques des polymères microtubulaires nous ont permis de caractériser deux voies impliquées dans la régulation des MTC. La première voie, celle de la MKKK20 et de la MPK18 est non canonique, ne nécessitant pas la présence d'une MKK entre les deux, alors que la deuxième voie serait canonique et comprend la MKKK20, MKK3 et possiblement d'autre(s) MPK(s) en aval. Nos résultats suggèrent que ces deux voies sont indépendantes et non synergiques jouant un rôle dans l'instabilité dynamique des MT chez *Arabidopsis*.

**Mots-clés** : *Arabidopsis*, phosphorylation, signalisation, MAPK, MKKKs, microtubules, microsporogénèse, racine, pollen.

## Abstract

Protein phosphorylation is the major post-translational molecular mechanism through which many eukaryotic proteins are regulated. Phosphorylation is involved in several biological processes and is carried out by kinase enzymes. The very large family of kinases is divided into many subgroups including MAPKs which function as a canonical module of three stepwise phosphorylation events (MAPKKK-MAPKK-MAPK). In this project, we aimed to study the function of three MAPKKK, MKKK19, 20 and 21 in *Arabidopsis thaliana*, as it has been shown that two of their potential orthologues, FRK1 and 2 in *Solanum chacoense* are involved in male (pollen) and female (embryo sac) gametophyte development. We found that the *MKKK19-21* were highly expressed in reproductive organs, more specifically inside pollen grains. *MKKK19-21* single mutants showed WT phenotype under normal conditions, suggesting a possible functional redundancy from these genes. To overcome this, down-regulation of endogenous *MKKK19-21* expression via transformation of WT *A. thaliana* with an artificial microRNA (amiRNA) construct was made. This led to the production of plants exhibiting a high number of dead pollen grains, as well as with defects in pollen tube growth for the viable ones. Microscopic observations of microsporogenesis showed that pollen developmental defects occurred at the tricellular stage. Consequently, the three *MKKK19-21* are functionally important for the late stage of pollen development in *A. thaliana*.

In order to find proteins acting both upstream and downstream of MKKK20, a yeast two-hybrid screen was performed against an *Arabidopsis* cDNA library. This led to the identification of a large number of interacting proteins. These proteins belong to several functional categories with some that could act in signaling pathways with MKKK19-21. Among them, MAPK18 that was demonstrated to regulate cortical microtubules (CMT) and that was found to interact specifically with MKKK20. The results of *MKKK20* mutant plants analyses and kinase assays indicate that MKKK20 would act upstream of MPK18 in regulating CMT. The MKK3 was also found from a directed Y2H screen, and was shown to specifically interact with MKKK20 among the 10 *Arabidopsis* MKKs. *MKK3* mutant analysis showed that both kinases could form a MAPK signaling pathway functionally linked to CMT. Furthermore, double mutants (*mkkk20/mpk18* and *mkk3/mpk18*) analysis and kinase assays as

well as microscopic observations of microtubule polymers allowed us to postulate that two different signaling pathways are involved in the regulation of CMT. The first one, considered as non-canonical MAPK pathway consists of MKK20 and MPK18, bypassing the need of an MKK, while the second one is a canonical pathway that comprises MKKK20, MKK3 and possibly other MPK(s). We concluded from these results that the two pathways are independent and do not work synergistically in MT dynamic instability in *Arabidopsis* cells.

**Keywords** : *Arabidopsis*, phosphorylation, signalisation, MAPK, MKKKs, microtubules, microsporogenesis, root, pollen.

# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvii
I. Introduction générale.....	19
1.1 La signalisation moléculaire.....	19
1.2 Les modifications post-traductionnelles.....	20
1.3 La phosphorylation.....	21
1.3.a La définition.....	21
1.3.b Les classes des protéines kinases.....	23
1.3.c La voie ‘MAPKs’.....	24
1.4 L’évolution et propriété des kinases dans la cascade MAPK.....	27
1.4.a Les MAPKs.....	27
1.4.b Les MAPKKs.....	27
1.4.c Les MAPKKKs.....	28
1.5 Rôle de la voie MAPK chez les plantes ;.....	36
1.5.a L’implication de la voie MAPK dans le stress abiotique.....	37
1.5.b L’implication des voies MAPK dans la signalisation hormonale.....	39
1.5.c L’implication de la voie MAPK dans le système immunitaire.....	41
1.5.d L’implication de la voie MAPK dans le cycle cellulaire.....	43
1.5.e L’implication de la voie MAPK dans le développement embryonnaire.....	44
1.5.f L’implication de la voie MAPK dans le développement de pollen.....	45
1.6 Le cytosquelette et les microtubules.....	46

1.7	La structure et la dynamique des microtubules.....	49
1.7.a	La nucléation des microtubules.....	49
1.7.b	Les microtubules du fuseau mitotique.....	50
1.7.c	Les microtubules du fuseau cortical.....	52
1.7.d	Les protéines associées et régulatrices des microtubules (MAPs).....	54
1.7.e	Les ‘Mitogen-activated Protein Kinases’ et l’organisation des microtubules .....	57
1.8	Le développement des gamétophytes femelles et mâles chez les Angiospermes.....	58
1.8.a	Développement floral.....	58
1.8.b	Développement des étamines.....	59
1.8.c	Développement du pollen et du gamétophyte mâle .....	62
1.8.d	Analyse transcriptomique au cours du développement du gamétophyte mâle .....	64
1.8.e	Analyse protéomique au cours du développement du gamétophyte mâle .....	65
1.8.f	Mutants liés au développement du pollen .....	66
	Problématique et projet de recherche.....	68
II.	Le rôle des Kinases MKKK20, MKK3 et MPK18 dans la régulation des microtubules corticaux dans la racine d’ <i>Arabidopsis</i> .....	70
	<i>Arabidopsis</i> Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 20 (MKKK20) modulates cortical microtubules through two independent MAPK signaling cascades .....	71
2.1	Abstract.....	72
2.2	Introduction.....	73
2.2	Materials and methods.....	76
2.2.1	Plant materials, growth conditions and inhibitor treatments .....	76
2.2.2	Yeast two-hybrid screening.....	77
2.2.3	GUS staining and microscopic observations .....	77
2.2.4	RNA isolation for RT-PCR.....	78
2.2.5	GFP and Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay.....	78
2.2.6	In vitro kinase assays .....	79
2.2.7	Complementation test and transgenic transformation.....	79
2.2.8	Immunofluorescence microscopy .....	80
2.3	Results.....	80



2.3.1	MKKK20 Y2H screen .....	80
2.3.2	MKKK20 interacts directly with MKK3 and MPK18.....	81
2.3.3	Expression pattern of MKKK20, MKK3 and MPK18 .....	84
2.3.4	MKKK20 phosphorylate both MKK3 and MPK18 in vitro .....	86
2.3.5	Single mkkk20 and mkk3 mutant are sensitive to microtubule-disrupting drugs	88
2.3.6	Cortical microtubule orientation and organization are affected in mkkk20 and mkk3 roots .....	90
2.3.7	Double mutants were differentially sensitive to oryzalin .....	90
2.3.8	Microtubule density and alignment in the absence of MKKK20, MKK3 and MPK18.....	93
2.4	Discussion .....	95
2.5	Supplementary data.....	101
III.	Les MKKK19, 20 et 21 sont impliquées dans le développement du pollen et la fertilité chez <i>Arabidopsis</i> .....	109
	The <i>Arabidopsis</i> MAPKinase Kinase Kinase 19, 20 and 21 are involved in pollen development.....	111
3.1	Abstract.....	112
3.2	Introduction.....	113
3.3	Materials and methods .....	117
3.3.1	Plant materials and growth conditions.....	117
3.3.2	RNA isolation and RT-PCR .....	117
3.3.3	GUS staining.....	117
3.3.4	GFP localisation.....	118
3.3.5	amiRNA construction and plant transformation .....	118
3.3.6	Pollen viability assays and SEM analysis.....	119
3.3.7	In-vitro germination test and siliques cleaning.....	119
3.3.8	Yeast two-hybrid cDNAs screening .....	119
3.4	Results.....	120
3.4.1	<i>AtMKKK19</i> , <i>20</i> and <i>21</i> are expressed in pollen .....	120
3.4.2	Mutations in both MKKK20 and 21 affect plant development .....	124

3.4.3	Generation of amiRNA transgenic plants .....	124
3.4.4	amiRNA kinase knockdown affects plant reproduction .....	126
3.4.5	The triple amiRNA knockdown caused pollen lethality and affected late stages of pollen development .....	126
3.4.6	MKKK19-21 amiRNA affects male gametogenesis exclusively .....	130
3.4.7	Pollen tube growth is affected in simple, double and triple mutants .....	131
3.4.8	Yeast two hybrid and possible targets .....	131
3.5	Discussion .....	132
3.6	Supplementary data.....	136
IV.	Discussion générale et perspective .....	147
V.	Conclusion .....	159
VI.	Bibliographie .....	161

## Liste des tableaux

Tableau 1.1. Exemples des mutations du pollen chez <i>A. thaliana</i> .....	67
Supplemental Table 2.I. T-DNA insertion lines.....	107
Supplemental Table 2.II. Primers used for T-DNA lines genotyping.....	107
Supplemental Table 2.III. Primers used for promoter-GUS constructs and RT-PCR analyses. ....	107
Supplemental Table 2.IV. Primers used for protein expression constructs. ....	108
Supplemental Table 2.V. Primers used for <i>mkkk20</i> and <i>mkk3</i> complementation constructs. ....	108
Table 3.1. Pollen viability in wild type, control and amiRNA plants.....	128
Supplemental Table 3.I. Primers used for T-DNA insertion mutants. ....	139
Supplemental Table 3.II. Primers used for RT-PCR.....	139
Supplemental Table 3.III. Primers used for GUS staining experience construct.....	139
Supplemental Table 3.IV. Primers used for intracellular localization construct by GFP..	140
Supplemental Table 3.V. Pollen viability of single and double mutants vs. wild type.....	140
Supplemental Table 3.VI. List of MKKK19-21 interactants.....	141

## Liste des figures

Figure 1.1. Représentation schématique de la phosphorylation et la déphosphorylation...	22
Figure 1.2. Représentation schématique du principe d'une cascade MAPK.....	26
Figure 1.3. L'arbre phylogénétique et domaines structuraux des MKKKs des plantes.....	32
Figure 1.4. Arbre phylogénétique du groupe des MEKKs chez <i>A. thaliana</i> .....	35
Figure 1.5. Structure d'un microtubule et ses sous-unités.....	48
Figure 1.6. La structure des microtubules au cours du cycle cellulaire.....	51
Figure 1.7. Les fuseaux des microtubules corticaux dans la cellule d' <i>A. thaliana</i> .....	53
Figure 1.8. Différentes phases du développement des anthères de type sauvage chez <i>A. thaliana</i> .....	61
Figure 1.9. Le développement de gamétophyte mâle chez <i>A. thaliana</i> .....	63
Figure 2.1. MKKK20/AtMKKs and MKK3/MPK18 interactions tests.....	82
Figure 2.2. BiFC Kinases interaction assays .....	83
Figure 2.3. MKKK20 expression pattern by GUS reporter gene .....	85
Figure 2.4. MKKK20 function upstream of both MAPK18 and MKK3.....	87
Figure 2.5. Absence of MKKK20 and MKK3 affects microtubule-related function in plant cell.....	89
Figure 2.6. Microtubule structure by Immunolocalization of $\alpha$ -tubulin was affected.....	92
Figure 2.7. Microtubule density and alignment in the absence of MKKK20, MKK3 and MPK18. ....	94
Figure 2.8. Hypothetical MAPK pathways.....	100
Figure S2.1. MKKK20 interactants GO terms.....	101
Figure S2.2. Kinases expression pattern by RT-PCR.....	101
Figure S2.3. Kinases subcellular localization.....	102

Figure S2.4. MKKK20 phosphorylation In bacteria.....	103
Figure S2.5. Two MKKK20 T-DNA insertional mutant lines.....	104
Figure S2.6. Cell width at root elongation zone.....	105
Figure S2.7. MKKK20 and MKK3 complementation.....	106
Figure 3.1. RT-PCR for MKKK19, 20 and 21 expression pattern.....	122
Figure 3. 2. Histochemical analysis of the GUS reporter gene expression driven by the three MKKKs promoter. ....	123
Figure 3.2. <i>mkkk20/mkkk21</i> double mutant phenotype. ....	125
Figure 3.4. In vitro germination assays. ....	125
Figure 3.5. RT-PCR analysis of amiRNA plants. ....	126
Figure 3.6. amiRNA affects plant growth rate.....	127
Figure 3.7. MKKK19-21 amiRNA silencing affects plant growth rate.....	128
Figure 3.8. Quantitative analysis of microspores and pollen grains from amiRNA P1/P2 and WT plants.....	129
Figure 3.9. Co-segregation of abnormal pollen with the amiRNA construct.....	130
Figure S3.1. MKKK19-21 In silico gene expression analysis.....	136
Figure S3.2. MKKK19-21 subcellular localization .....	137
Figure S3.4. <i>mkkk19-21</i> knockout mutants .....	137
Figure S3.5. Diagram of reciprocal crosses. ....	138

## Liste des abréviations

%	pourcentage
°C	degré Celsius
ABA	acide abscisique
ACC	acide 1-aminocyclopropane-1-carboxylique
ADN	acide désoxyribonucléique
amiRNA	artificial microRNA
ANOVA	analysis of variance
ARNm	acide ribonucléique messenger
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	adénosine triphosphatase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	base pair
BSA	bovine serum albumin
Ca <sup>2+</sup>	ion calcium
CDK	cyclin dependent kinases
cDNA	complementary DNA
CDPK	calcium dependent protein kinase
cm	centimètre
CTR1	Le gène CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1
d(T)/ dT	deoxythymidine
dATP	déoxyadénosine triphosphate
dCTP	déoxycytidine triphosphate
DMSO	dimethylsulfoxyde
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	deoxyribonucleotide triphosphate/désoxyribonucléotide triphosphate
Dr.	Docteur
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid

EMB	Le gène EMBRYO-DEFECTIVE
EMS	Ethyl Methhyl Sulfonate
EMS1	Le gène EXCESS MICROSPOROCTES 1
EST	expressed sequence tag
EXS	Le gène EXTRA SPOROGENOUS
FAA	Formaldehyde-Acid Alcohol
Fig.	Figure
FLS2	Flagellin Sensing 2 2
FRK1	Le gène FERTILIZATION RELATED KINASE 1 chez S. chacoense
FRK2	Le gène FERTILIZATION RELATED KINASE 2 chez S. chacoense
g/ml	grammes par millilitres
GFP	Green fluorescent protein
GSK	Glycogen Synthase Kinase
GTP	guanosine triphosphate
GUS	Le gène beta-glucuronidase
IRBV	Institut de Recherche en Biologie Végétale
K3Fe(CN)6	ferricyanure de potassium
K4Fe(CN)6	ferrocyanure de potassium
kb	kilobase
kDa	kiloDalton
LRR	leucine-rich repeat
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MAPKKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase Kinase
MBP	myelin basic protein
MeJA	methyle jasmonate
MEKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase

MgCl <sub>2</sub>	chlorure de magnésium
MgSO <sub>4</sub>	sulfate de magnésium
MKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
ml	millilitre
mm	millimètre
mM	milliomolaire
<i>MPK18</i>	Le gène MITOGEN ACTIVATED KINASE 18
<i>MPK3</i>	Le gène MITOGEN ACTIVATED KINASE 3
<i>MPK4</i>	Le gène MITOGEN ACTIVATED KINASE 4
<i>MPK6</i>	Le gène MITOGEN ACTIVATED KINASE 6
mRNA	messenger RNA
MS	Murashige and Skoog medium
MT	Microtubule
MTC	Microtubules corticaux
MW	molecular weight
NTF2	Nuclear transport factor 2
p-value	valeur statistique
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentiel hydrogène
Ph.D	Philosophiæ doctor
QC	Québec
RNA	ribonucleic acid
RNAi	ARN d'interférence
Rpm	rotation par minute
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
ScFRK1	Solanum chacoense fertilization related kinase 1
ScFRK2	Solanum chacoense fertilization related kinase 2



SD	standard deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
Ser	sérine
SERK	Le gène somatic embryogenesis receptor kinase
T	thréonine
TAIR	The Arabidopsis Information Resource
Thr	thréonine
WT	wild type (type sauvage)
x-Gluc	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronic acid
Y	tyrosine
Y2H	yeast two hybrids
YDA	Le gène YODA
μ	micromolaire
μg	microlitre
μl	microgramme
μm	micromètre

*Je dédie cette thèse d'abord à mes parents  
pour leur soutien et encouragement continus.  
Pour ma conjointe, Meryem.  
Et pour mes adorables Anwar et Razane*

*Rachid Benhamman*

## Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur, le Dr. Daniel Philippe Matton, qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a encadré durant les années de mon doctorat. Merci pour son soutien académique, sa compréhension et pour les opportunités qu'il m'a offertes tant dans la participation aux congrès scientifiques que dans le cadre de l'enseignement à UdeM, ce qui m'a permis d'obtenir une formation des plus complètes que possible. Merci pour tout Daniel.

Merci au professeur Brian Ellis pour le matériel fourni pour bien accomplir ma thèse. Merci aussi au professeur Stephen Michnick de m'avoir accueilli pour un stage au sein de son laboratoire.

Je tiens également à remercier Audrey Loubert-Hudon pour son aide dans tout ce qui est image et microscopie, et également pour sa contribution à mes deux articles. Un grand merci aussi pour le futur médecin Samuel Bernard Drory pour ses grands efforts pour la partie kinase de ma thèse. Merci aussi à Juliana Pérez pour son aide dans la partie pollen de mes travaux.

Un merci spécial à l'une des anciennes doctorantes de notre laboratoire, Faiza Tebji, avec qui j'ai entrepris mes premières expériences et qui a grandement facilité mon intégration au groupe Matton. Également, un grand merci à Mohammed Sabar pour ses conseils et sa contribution dans mes travaux surtout sur le travail avec les protéines. Merci évidemment à Rabah Zerzour pour les conseils pour bien planifier les protocoles dans la partie phosphoprotéine. Merci aussi à Éric chevalier pour ses conseils et discussions scientifiques.

Un grand merci au jury de cette thèse qui a accepté et donné son temps pour évaluer ma thèse.

Un grand merci à tous les membres du laboratoire et les stagiaires, merci à Édith, Josée, Mohammed, Pierre, Olivier, Fangwen, Yang, Caroline, Valentin.

*Merci à tous mes collègues de laboratoires à l'IRBV et au centre de biodiversité, surtout l'équipe de David Morse. Merci à tous les gens qui ont gardé nos plantes dans les serres.*

*Un merci si spécial à mes parents qui ont toujours cru en moi, merci pour leur confiance, soutien et amour. Un grand merci à toute ma famille, mon frère Mohammed et toutes mes sœurs.*

*De même, un merci particulier à ma conjointe Meryem, qui a été toujours à mon côté surtout aux moments difficiles de mon doctorat. Merci pour tes encouragements et ta confiance.*

# I. Introduction générale

## 1.1 La signalisation moléculaire

La signalisation moléculaire constitue un système très complexe de communication qui contrôle la majorité des fonctions fondamentales d'être vivant. Elle intervient dans le contrôle du système immunitaire, la perception de la lumière, la gestion du stress, les rythmes circadiens, la division cellulaire, le contrôle hormonal, l'organisation du développement embryonnaire, etc. Les signaux moléculaires peuvent être émis et reçus au sein de la même cellule, ce qu'on appelle une communication autocrine. Elle peut de plus s'effectuer aussi entre deux cellules voisines, par la communication paracrine, ou même entre des cellules très éloignées mettant en œuvre des hormones qui voyagent sur des longues distances, ce que nous appelons la communication endocrine. La communication cellulaire nécessite principalement deux biomolécules, une molécule informative (signal) et la molécule de réception (récepteur du message). La molécule messagère est générée par la cellule suite à une perception d'un signal qui peut être endogène ou exogène. Cette molécule signal qu'on peut qualifier de ligand va se positionner sur une autre biomolécule réceptrice du message qui va déclencher tout l'arsenal moléculaire nécessaire pour répondre au signal d'origine. Les molécules impliquées dans la communication cellulaire sont pour la majorité hydrophiles et sont alors incapables de traverser les membranes où résident habituellement les récepteurs (ex. membrane plasmique) (Molecular biology of cell. 4<sup>ème</sup> édition Figure 15.3). En effet, il existe plusieurs types de récepteurs pour différent type de molécules signaux; par exemple les récepteurs transmembranaires et les récepteurs intracellulaires qui sont activés respectivement par des petites molécules ou des hormones peptidiques pour les premiers et les hormones stéroïdiennes pour les derniers (Meng et al. 2009).

Ces différents intervenants moléculaires dans la signalisation cellulaire requièrent une coordination et une intervention harmonieuse au niveau de plusieurs processus biologiques tels que le développement embryonnaire chez les métazoaires qui constitue, de loin, l'exemple par excellence. Plusieurs gènes interviennent pour mettre en place les principales structures qui définiront la qualité physiologique et moléculaire de la future plante. Au cours de ce processus, les voies de signalisation jouent un rôle capital pour maintenir l'équilibre entre la

division et la différenciation cellulaire qui déterminera l'identité embryonnaire ainsi que l'intégrité de l'embryon ou de la plante adulte. Plusieurs intervenants au cours d'un tel processus dont les protéines du cycle cellulaire deviennent actives après avoir subi des changements chimiques médiés par les mécanismes complexes connus sous le nom des modifications post-traductionnelles (Jurgens et al. 1994).

## **1.2 Les modifications post-traductionnelles**

Une fois l'ARN transcrit et traduit, de nombreuses modifications post-traductionnelles pourront s'ajouter sur la protéine, entraînant un changement fonctionnel de la protéine considérée, que ce soit au niveau de son action, de sa demi-vie, de ses capacités d'interaction, ou de sa localisation cellulaire. Chez l'humain par exemple, on compte environ 30 000 gènes, alors que le nombre de protéines est plutôt de l'ordre d'un million (Walsh et al. 2005). Cette diversité protéique repose principalement sur deux mécanismes fondamentaux; l'épissage alternatif des ARNm et les modifications post-traductionnelles des protéines (MPTs ; ou PTMs en anglais) (Black 2003). Les MPTs participent à plusieurs processus vitaux pour la dynamique de la cellule. Elles sont variées et nombreuses (environ 300 modifications connues) et sont catégorisées en deux classes selon leur mode d'action (Walsh et al. 2005). Dans la première classe, les réactions impliquées dans les MPTs permettent de lier covalamment à une chaîne latérale de certains acides aminés un groupement chimique qui peut être de nature très variées tel que les groupements glucidiques (glycosylation), peptidiques (ubiquitination, sumoylation...), lipidiques (lipidation, myristoylation...), hydrocarbonés (acétylation...) ou minéraux (phosphorylation, sulfonation...). La seconde classe des réactions des MPTs permet de cliver la protéine, soit par l'action des protéases ou moins fréquemment par un clivage autocatalytique (Walsh et al. 2005). Les MPTs peuvent changer la conformation de la protéine cible pour créer de nouvelles interactions protéine-protéine, activer ou désactiver une protéine, modifier sa localisation ou conduire une protéine vers la dégradation, comme dans le cas de l'ubiquitination. Plusieurs MPTs peuvent coopérer ou compétitionner pour agir sur des protéines, simultanément ou consécutivement. Parmi les MPTs les plus versatiles, et intervenant dans plusieurs systèmes de signalisation cellulaire, on note la modification par phosphorylation qui est de loin la plus importante et la plus étudiée jusqu'à présent (Cohen 2002; Manning et al. 2002a).

## 1.3 La phosphorylation

### 1.3.a La définition

La phosphorylation est l'un des mécanismes de régulation cellulaire le plus important et le plus fréquent chez les eucaryotes, pouvant entraîner l'activation ou l'inactivation d'une enzyme ou d'un récepteur. La phosphorylation est importante aussi chez les procaryotes et plus spécifiquement les kinases qui catalysent la phosphorylation de résidus histidines (Laub and Goulian 2007). L'activité enzymatique de la phosphorylation fut démontrée pour la première fois en 1954 avec la caséine comme substrat (Burnett and Kennedy 1954), mais c'est la découverte du mécanisme de la phosphorylation qui a valu le prix Nobel de physiologie ou médecine à Edmond Fischer et Edwin Krebs en 1992. La phosphorylation est réalisée par des protéines kinases qui catalysent le transfert du groupement phosphate  $\gamma$  de l'ATP sur le groupement hydroxyle ou imidazole de la chaîne latérale de certains acides aminés. Parmi ces acides aminés, on compte la serine, la thréonine et la tyrosine (groupement hydroxyle) et finalement l'histidine (groupement imidazole). La phosphorylation est une réaction rapide et réversible suite à l'action d'une phosphatase; dans ce cas on parle de la déphosphorylation (l'hydrolyse du lien phosphodiester) (Figure 1.1).

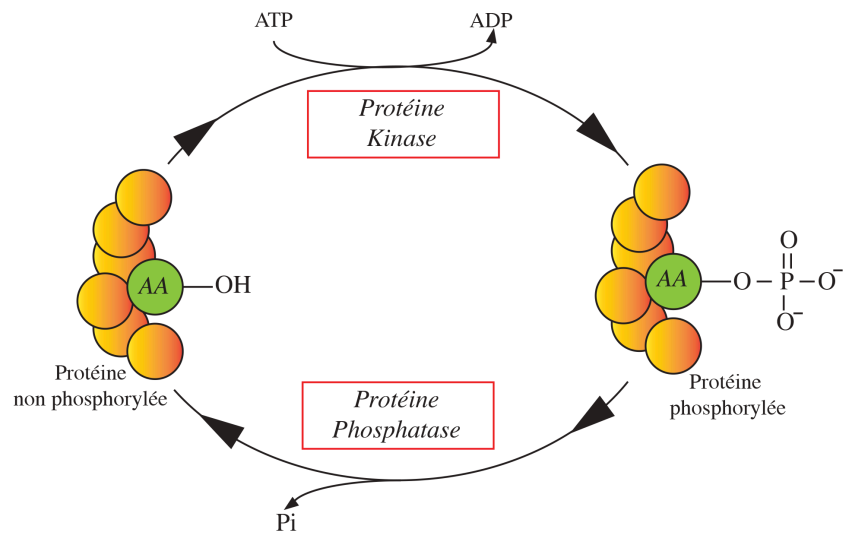


Figure 1.1. Représentation schématique de la phosphorylation et la déphosphorylation. Image : R. Benhamman, 2016)

À part pour la phosphorylation des sucres lors de la glycolyse, la quasi-totalité de la phosphorylation chez les eucaryotes met en jeu les acides aminés hydroxylés, mais selon une proportion très variée en fonction des règnes. Environ 95% de la phosphorylation s'effectue au niveau du résidu -OH de la sérine. La phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine ne constitue qu'un faible pourcentage soient de 4% et 1% respectivement chez les mammifères (Clark et al. 2005). Chez les bactéries et les champignons, l'histidine et l'aspartate peuvent être phosphorylés (Morgan et al. 1995). L'omniprésence de la phosphorylation nous amène à se demander pourquoi est-elle si importante pour la cellule et pourquoi le phosphate a été privilégié parmi tous les autres éléments chimiques pour modifier les protéines? Certainement, l'analyse moléculaire et chimique du phosphate ainsi que l'étude de son parcours évolutif, peut amener à une réponse rationnelle à cette question. Tony Hunter a essayé de regrouper les éléments et les explications logiques dans sa revue intitulée 'Why nature chose phosphate to modify proteins' (Hunter 2012). En effet, le phosphore appartient au groupe 15 des éléments chimiques, pouvant former cinq liaisons covalentes après avoir cédé ses électrons. De plus, le phosphate possède trois valeurs de pKa possibles (2.2, 5.8, et 12.4). Il est très soluble dans l'eau et très abondant dans la nature. Il peut former des liaisons mono, di et tri-ester avec les



groupes hydroxyl, alkyl et aryl, ainsi qu'avec les anhydrides. Cette flexibilité réactionnelle chimique couplée à une capacité d'établir des liaisons stables à une température ambiante permet au phosphore de générer des molécules biologiques très nombreuses et variées (Hunter 2012).

L'une des caractéristiques remarquables de la phosphorylation est la capacité de créer des nouvelles propriétés chimiques chez les acides aminés phosphorylés et leur conférer une entité spéciale, inexistante chez les autres acides aminés, augmentant ainsi la diversité chimique à la surface des protéines et favorisant des nouvelles interactions entre protéines. De plus, la phosphorylation peut aussi provoquer un changement de conformation réversible de certains domaines, jouant ainsi un rôle commutateur entre deux cas opposés, par exemple, une forme active et une forme inactive de la protéine cible (Johnson and Lewis 2001).

Il est estimé que 30% des protéines des eucaryotes sont phosphorylées. La catalyse de cette phosphorylation protéique est médiée par les kinases codées par 4% (environ 1000 gènes) du génome d'*A. thaliana* (Champion et al. 2004). Environ 10% de toutes les kinases chez les plantes font partie de la superfamille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Colcombet and Hirt 2008). Les protéines kinases sont des enzymes qui catalysent le transfert du groupe phosphate terminal de l'ATP ou de la GTP sur certains acides aminés de la protéine substrat, principalement sur les résidus sérine, thréonine ou tyrosine mentionnés ci-dessus. Ces enzymes présentent des spécificités différentes pour les acides aminés accepteurs, permettant ainsi leur classification.

### **1.3.b Les classes des protéines kinases**

Les protéines kinases eucaryotes phosphorylent des acides aminés hydroxylés ou hétérocycliques (histidine) et sont regroupées par homologie de leur domaine catalytique (Hanks and Hunter 1995). La taille du domaine catalytique est généralement de 250 à 300 acides aminés subdivisée en 11 sous-domaines fortement conservés (Hanks et al. 1988). Le premier séquençage du génome chez les plantes (celui d'*A. thaliana*) a révélé un nombre surprenant des protéines kinases; plus de 1000 protéines ont été identifiées (Champion et al. 2004). À titre de comparaison; l'analyse du génome humain a montré la présence de 518 protéines kinases (Manning et al. 2002b). Ainsi, on estime entre 1-2% approximativement du

génomique code pour des kinases chez les plantes et les animaux (Lehti-Shiu and Shiu 2012). Les protéines kinases sont classées selon les acides aminés qu'elles phosphorylent et sont regroupées en quatre familles: les protéines sérine/thréonine (Ser/Thr) kinases (représentant 67% du total), les tyrosines kinases (18%), les kinases 'tyrosine-like' (8%) et les kinases atypiques (8%) (Arena et al. 2005). La famille des sérine/thréonine kinases est aussi subdivisée en plusieurs sous-familles (Stone and Walker 1995). Parmi ces sous-familles, on trouve le groupe CMGC, qui inclut les familles CDK, MAPK, GSK-3, et CKII, et le groupe STE, qui inclut les MAPKK et les MAPKKK.

### **1.3.c La voie 'MAPKs'**

La voie de signalisation des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) joue un rôle important dans la transmission de stimuli extracellulaires vers le compartiment intracellulaire chez plusieurs organismes (Ligterink and Hirt 2001). C'est la protéine kinase MAP-2 qui a été caractérisée comme la première MAP Kinase par sa capacité de phosphoryler la 'microtubule-associated protein 2' (Ray and Sturgill 1987). La MAP-2 kinase a été renommée 'mitogen-activated protein kinase' suite à la mise en évidence de la tyrosine phosphorylée au niveau de la séquence primaire de la protéine après stimulation des cellules mammifères par une variété des mitogènes (y compris; le facteur de croissance épidermique, 'platelet-derived growth factor', le phorbol 12-myristate 13-acétate, la thrombine, et 'insulin-like growth factor II' (Rossomando et al. 1989; Cooper et al. 1982). Des homologues de cette protéine ont aussi été caractérisés chez la levure, soit FUS3 et KSS1 (Boulton et al. 1990; Courchesne et al. 1989; Elion et al. 1990). La même kinase pouvant être activé par d'autres stimuli que les mitogènes, son nom fut changé pour devenir ERK 'Extracellular signal-Regulated Kinase 1' (Boulton et al. 1990). À noter également que ces protéines sont capables de phosphoryler la MBP (Myelin Basic Protein), d'où le nom de « MBP kinase » donné à ce groupe. Par la suite, deux protéines pouvant activer les MBP-MAPK ont été identifiées (Ahn et al. 1991). Cette activation est réalisée via une phosphorylation des MBP-MAPK ce qui suggère l'existence d'un système d'activation en amont de ces kinases (Seeger et al. 1992). L'une de ces kinases activatrices nommée MEK1 (MAPK/ERK Kinase 1) est activée également par une phosphorylation (Crews et al. 1992). Par la suite, les protéines activatrices des MEKs nommées 'MEK activators' ou 'Raf- et MEKK1' ont été identifiées (Kyriakis et al. 1992; Lange-Carter et al.

1993). L'existence d'une telle conservation d'une cascade de phosphorylation entre les kinases de la voie MAPK a été mise en évidence par des comparaisons des kinases MEKK1 et MEK des mammifères à celles identifiées auparavant chez la levure, soit STE1 et STE7, les deux groupes partageant une très forte homologie (Lange-Carter et al. 1993). La conservation de ce modèle canonique d'activation des MAPK a été bien documentée. Une MAPKKK phosphoryle et active une MAPKK qui, à son tour, phosphoryle et active une MAPK. Cette cascade d'activation (MAPKKK-MAPKK-MAPK) (Figure 1.2) est conservée chez tous les organismes eucaryotiques, quel qu'en soit leur degré d'évolution (Widmann et al. 1999). Ce modèle linéaire et simple d'activation dans la cascade MAPK est loin de faire unanimité pour tous les membres appartenant à cette famille. Cependant, il a été démontré biochimiquement et génétiquement qu'une organisation plus complexe au sein de cette cascade peut avoir lieu. Peu importe à quel niveau de la voie nous nous situons, la phosphorylation de la prochaine protéine cible peut-être déclenchée par plusieurs effecteurs et par la suite diriger l'activation vers des cibles différentes en impliquant une composante d'une voie MAPK (Cardinale et al. 2002). De plus, la complexité de cette cascade est grandement amplifiée par l'implication/interaction de la voie de base avec d'autres protéines telles que les phosphatases (Gupta et al. 1998) et les protéines modificatrices comme les protéines d'échafaudage ou 'Scaffolds' (Pearson et al. 2001; Nakagami et al. 2004). La caractérisation fonctionnelle des MAPKs a fait l'objet de plusieurs articles scientifiques récents, ainsi, nous assistons à une forte émergence de l'implication de plusieurs voies MAPKs dans plusieurs processus biologiques chez presque tous les organismes notamment dans le monde végétal.

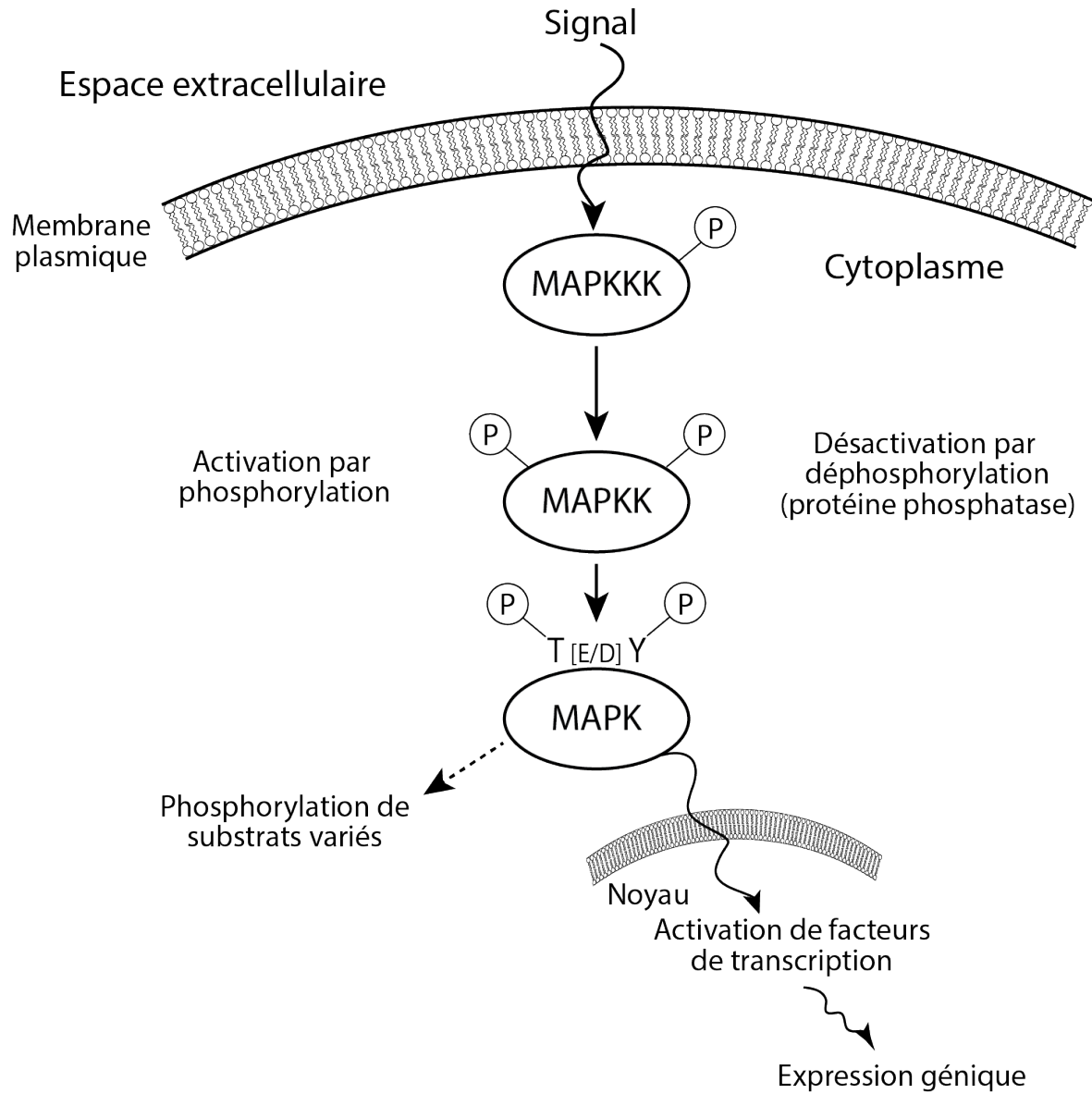


Figure 1.2. Représentation schématique du principe d'une cascade MAPK qui comprend; une MAPKKK, MAPKK et MAPK. (P) représente la phosphorylation. (T) (Y) font référence à des résidus thréonine et tyrosine respectivement. Image : D. P. Matton, 2016.

## 1.4 L'évolution et propriété des kinases dans la cascade MAPK

### 1.4.a Les MAPKs

L'activation de la MAP Kinase (MAPK ou MPK) s'effectue suite à la phosphorylation des résidus thréonine et tyrosine du motif T-[D/E]-Y présent entre les sous-domaines VII et VIII par une MAPK Kinase (MAPKK ou MKK). Chez les animaux, 30 MAPKs ont été caractérisées et groupées en trois grands groupes selon des critères structuraux et fonctionnels: (i) les «ERKs» (pour extracellular signal-regulated protein kinases) (ii) les « p38 MAPKs » et (iii) les « JNKs» (pour c-Jun-terminal kinases) (Cohen 1997). Les kinases de la famille des ERK présentent un motif conservé au niveau du site d'activation soit TEY ou TDY (Morrison and Davis 2003). Ce motif est aussi conservé chez les MAPKs des plantes mais, jusqu'à présent, aucune MAPK végétale ne contient le motif TGY des p38 animales ou de Hog1 chez la levure, de même pour le motif TPY que l'on trouve chez les membres du groupe JNK des MAPK animales (Ichimura et al. 2002). Chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), cinq MAPKs ont été identifiées, soit Fus3, Kss1, Stl2, Hog1 et Smk1. Les trois premières possèdent le motif conservé TEY (Chen and Thorner 2007). Par contre, la MAPK Hog1 conserve le motif TGY typique des p38 MAPKs (Yaakov et al. 2009).

Chez *A. thaliana*, vingt MAPKs ont été identifiées et répertoriées en quatre groupes. Les classes A à C possèdent le motif TEY alors que le groupe D contient plutôt un motif TDY (Ichimura et al. 2002). Ce dernier groupe est également caractérisé par un domaine de fixation au niveau de la séquence C-terminal protéique pouvant agir comme un site de liaison des MAPKKs (Yoo et al. 2008).

### 1.4.b Les MAPKKs

L'activation des MAPKKs (connues aussi sous le nom des MKKs) est réalisée par la phosphorylation de la sérine et la thréonine au niveau du résidu [S/T]-X<sub>3-5</sub>-[S/T] (X=3 chez la levure et les animaux; X=5 chez les plantes) par une MAPKK Kinase (Zheng and Guan 1994). L'analyse phylogénétique des MAPKKs montre quatre groupes distincts. Le groupe A englobe la MKK1 et la MKK2 qui sont fonctionnellement lié à la MAPK4 (Ichimura et al. 1998) de même que la MKK6 qui est placée en amont de la MAPK13 (Melikant et al. 2004). Le Groupe

B présente une grande exception structurale par rapport à toutes les autres MKKs. En effet, la seule représentante de ce groupe, la MAPKK3, possède un domaine NTF2 (Nuclear transport factor 2) (Hamel et al. 2006). Des protéines possédant le domaine NTF2 ont été caractérisées chez *A. thaliana*, cependant, uniquement le groupe B des MAPKKs (MKK3) contient ce domaine (Steggerda and Paschal 2002). AtMKK3 participe à plusieurs cascades, par exemple, celle qui est impliquée dans la signalisation activée par une invasion pathogénique par *Pseudomonas syringae* (Doczi et al. 2007), la voie de transduction du signal par les jasmonates (Takahashi et al. 2007) ou l'acide abscissique (Danquah et al. 2015). Cependant, la caractérisation fonctionnelle du domaine NTF2 de l'AtMKK3 demeure nébuleuse. On sait toutefois que le domaine NTF2 joue un rôle important dans le trafic des macromolécules, d'ions, ainsi que des petites molécules entre le cytoplasme et le noyau (Stewart 2000). Par ailleurs, le groupe C contient les MKK4 et MKK5 alors que le groupe D regroupe le reste des MAPKKs (Rodriguez et al. 2010).

### **1.4.c Les MAPKKKs**

#### **1.4.c.i Généralités**

Chez *A. thaliana*, la famille des MAPKKKs (connues aussi comme MAP3Ks, MKKKs ou MEKKs) constitue le groupe le plus volumineux des MAPKs et peut-être divisé en deux sous-groupes majeurs (j'utiliserai les deux acronymes MKKKs et MAPKKKs car ils sont les plus répondus dans la littérature). Le premier sous-groupe contient des kinases semblables aux MEKK des animaux et aux MAPKKKs de la levure. Il répertorie 21 MEKK-like et 11 ZR-interacting kinases (ZIKs) (Jonak et al. 2002). Le second groupe quant à lui, contient 48 gènes codant pour des 'Raf-like kinases' dont CTR1 (Constitutive Triple Response 1) et EDR1 (Enhanced Disease Resistance1) (Frye et al. 2001). Alternativement le groupe des MKKKs peut être divisé en trois sous-groupes; groupe A, B et C (Figure 1.3) (Ichimura et al. 2002).

L'activation des MKKKs est réalisée soit par une phosphorylation de l'un ou plusieurs résidus serine ou thréonine, ou soit par l'autophosphorylation suivant le déplacement d'un domaine N-terminale auto-inhibiteur (Widmann et al. 1999; Soyano et al. 2003). D'autres études ont démontré que les MKKKs peuvent être activées suite à une interaction avec les différents types de protéines, dont la protéine G (Luttrell and Luttrell 2003), la protéine kinase

C (Garcia-Rodriguez et al. 2005), la 'small GTPase' (Minden et al. 1995), des récepteurs kinases (Irie et al. 1994) et des MAPKKKK (Elion 2000). Chez les plantes, il a été démontré que l'interaction entre les kinésines de tabac (NACK1 et NACK2) avec la MKKK *NtNPK*, empêche l'auto-inhibition de cette dernière kinase permettant ainsi son activation (Nishihama et al. 2002). Même si d'autres éléments intervenant potentiellement en amont des MKKKs ont été identifiés chez les plantes par des études d'homologie de séquence, l'activation directe d'une MKKK spécifique chez les plantes par ces éléments n'a pas encore été rapportée jusqu'à ce jour (Nakagami et al. 2005; Pedley and Martin 2005), à l'exception de quelques exemples rares. C'est le cas du 'Calcium/calmodulin-regulated receptor-like kinase CRLK1' qui interagit avec la MEKK1 pour réguler la voie MAPK impliquée dans la réponse au stress induit par le froid dont la MEKK1 fait partie (Yang et al. 2010).

Malgré le grand nombre des kinases impliquées dans le module des MAPKs chez les plantes (*A. thaliana* compte 20 MAPKs, 10 MAPKKs, ~80 MKKKs et 10 MAKKKKs) (Pitzschke et al. 2009), nous ne disposons actuellement que de peu de données concernant leurs rôles dans les mécanismes développementaux de même que les cascades de signalisation auxquelles elles participent. Les kinases ayant été les plus étudiées sont MEKK1, CTR1 et YODA. La MEKK1 (MAPKKK8) est impliquée dans plusieurs rôles physiologiques chez les plantes et a fait l'objet de la première démonstration de l'existence possible d'une voie MAPK canonique complète, MKKK→MKK→MPK, basée sur leur interaction dans le système de double-hybride (Mizoguchi et al. 1998). La MEKK1 est aussi impliquée dans la réponse immunitaire chez *A. thaliana* et agit en aval du récepteur kinase FLS2 suite à son activation par le peptide flg22 de la flagelline (Asai et al. 2002). Ce travail a d'ailleurs révélé pour la première fois une voie complète dans le monde végétal, tant par des analyses d'épistasie suite à l'utilisation de mutants, que par des analyses fonctionnelles de phosphorylations des trois partenaires, de même qu'avec des substrats en aval (MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6-WRKY22/WRKY29). La MEKK1 participe également dans le module MKK2-MPK4/MPK6 lors de la réponse au stress salin et thermique (Teige et al. 2004). De plus, la MEKK1 est aussi impliquée dans la réponse à la blessure (Hadiarto et al. 2006) et a été démontrée interagir directement sur le facteur de transcription WRKY53 qui participe à la sénescence foliaire chez *Arabidopsis* (Miao et al. 2007). Ainsi, il a été démontré *in vitro* que la MEKK1 phosphoryle WRKY53 menant à une

augmentation de sa liaison à l'ADN. Surprenamment, la MEKK1 se lie aussi à une séquence promotrice du gène WRKY53 et augmenterait son niveau d'expression. Ceci suggère que les modes d'action des MKKKs végétales pourraient aussi agir selon d'autres mécanismes autres qu'uniquement par une cascade de phosphorylation sur des MKKs (Miao et al. 2007).

Une autre MKKK bien caractérisée est CTR1 (*constitutive triple response 1*), qui interagit avec les récepteurs de l'éthylène ETR1 et ERS (Clark et al. 1998). Cette kinase est considérée comme un régulateur négatif de la MAPKK SIMKK (Salt-Induced MAPKK/MMK3) chez la luzerne et les MPK6/13 chez *A. thaliana* (Ouaked et al. 2003). CTR1 est aussi impliquée dans la voie de signalisation de l'éthylène fort probablement par un module MAPK. Cette idée est supportée par le fait que suite au traitement avec l'ACC (précurseur de l'éthylène), MKK9 est relocalisée du cytoplasme vers le noyau pour activer la MPK3 et la MPK6 qui sont alors capables de phosphoryler le facteur de transcription EIN3 lié à la voie de signalisation de l'éthylène (Yoo et al. 2008). Cependant, la caractérisation de la MKKK qui agirait en amont de la MKK9 est controversée. Les données génétiques montrent que la CTR1 est un régulateur négatif de la signalisation de l'éthylène, mais il reste à prouver l'existence d'interaction directe entre la CTR1 et la MKK9 (Colcombet and Hirt 2008). À noter que la CTR1 et une autre MKKK EDR1 (*Enhanced Disease Resistance 1*) ont été montrés fonctionner à travers d'autres mécanismes en dehors de celui du module MAPK, ainsi leur appartenance au groupe des MKKKs est aujourd'hui discutable (Xu and Zhang 2015).

Une autre MKKK qui a fait l'objet de nombreuses études est la MKKK4, mieux connue par son nom de YODA (YDA). Elle a été caractérisée comme étant un élément nécessaire à la première division asymétrique de l'embryon chez *A. thaliana*, contribuant ainsi à la formation de deux types de cellules complètement distinctes. Une petite cellule apicale qui donnera naissance aux deux cotylédons de l'embryon et une grande cellule basale qui formera le suspenseur (Lukowitz et al. 2004; Costa et al. 2014). YODA est également impliquée dans la régulation du développement et du modelage (*patterning*) des stomates chez *A. thaliana* (Wang et al. 2007). Le facteur de transcription bHLH SPEECHLESS (SPCH) est phosphorylé par MPK3 et MPK6 activées par YODA, ce qui provoque l'inactivation de SPCH et la suppression de la voie de signalisation. Cette voie régule négativement la formation des



lignées cellulaires des stomates au niveau de l'épiderme foliaire (équilibre entre le nombre de cellules de garde et de cellules du mésophile) (Meng and Yao 2015).

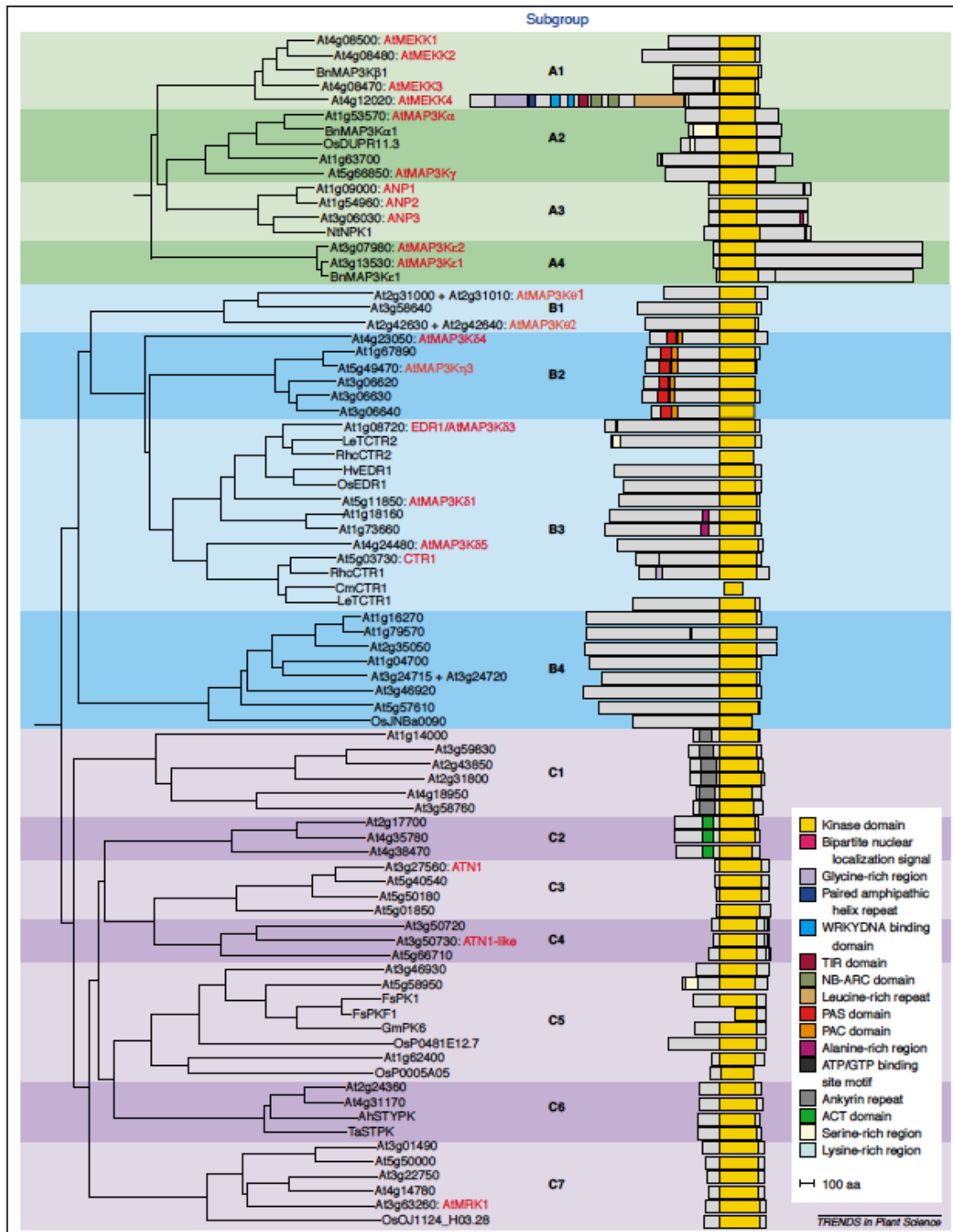


Figure 1.3. L'arbre phylogénétique et domaines structuraux des MKKKs des plantes, d'après Ichimura et al. 2002

Dans ce groupe des MEKK, on trouve les MKKK1, 2 et 12 (ANP1, 2 et 3, respectivement) qui présentent une grande similarité de séquence avec la MKKK NPK1 (Nicotiana Protein Kinase 1) du tabac qui est impliquée dans la prolifération cellulaire chez le tabac (Nishihama et al. 1997). Les ANP1, 2 et 3 régulent positivement la division cellulaire et la croissance chez *A. thaliana* (Krysan et al. 2002).

Bien que la signalisation d'un module MAPK passe nécessairement verticalement d'une MKKK vers une MAPKK puis vers une MAPK, quelques exceptions à cette règle ont été rapportées dans la littérature scientifique. En effet, il a été démontré que les MKKKs *NbMAPKKK $\beta$* , *NbMAPKKK $\gamma$* , et *NbMAPKKK $\epsilon$ 2* chez *Nicotiana benthamiana*, forment une voie de signalisation linéaire qui provoque la mort cellulaire programmée suite à une infection virale (Hashimoto et al. 2012). Un autre exemple est la MKKK OMTK1 (*Oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1*) chez la luzerne (*Medicago sativa*) qui interagit directement et spécifiquement avec la MAPK MMK3 (Nakagami et al. 2004). Les auteurs proposent un modèle dans lequel cette MKKK peut servir comme protéine d'échafaudage (*scaffold*) intervenant dans l'activation de la mort cellulaire induite par le peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

#### **1.4.c.ii Les MKKK19, 20 et 21**

Les MKKK19, 20 et 21 appartiennent à la grande sous-famille des MEKKs. La figure 1.4 montre la relation phylogénétique entre les différents constituants de ce groupe. Il n'existe que très peu de citations dans la littérature scientifique portant sur les MKKK19, 20 et 21, qui ont fait l'objet de mes recherches de thèse de doctorat. Les toutes premières datent de 2009 avec la mention de la MKKK19 et 20 dans le travail de Menges *et al.* 2008, dans lequel les auteurs ont analysé les données d'expression de 114 gènes de la voie des MAPK représentées dans les biopuces ATH1 Affymetrix chez *A. thaliana* (Menges et al. 2008). On y retrouve la MKKK19 comme faisant partie des kinases dont l'expression est différentiellement régulée suite à l'exposition aux UV-B. De même, l'infection par le pathogène *Botrytis cinerea* induit une transcription rapide de la MKKK19, tandis que l'infection par *Pseudomonas syringae* cause une augmentation tardive (6 heures après inoculation) de l'expression des *MKKK19* et *20*. La même étude a montré que l'expression de ces deux kinases est augmentée suite au traitement

avec certaines phytohormones telles que le jasmonate, l'auxine et les cytokinines, suggérant une forte possibilité d'implication de ces kinases dans plusieurs processus biologiques.

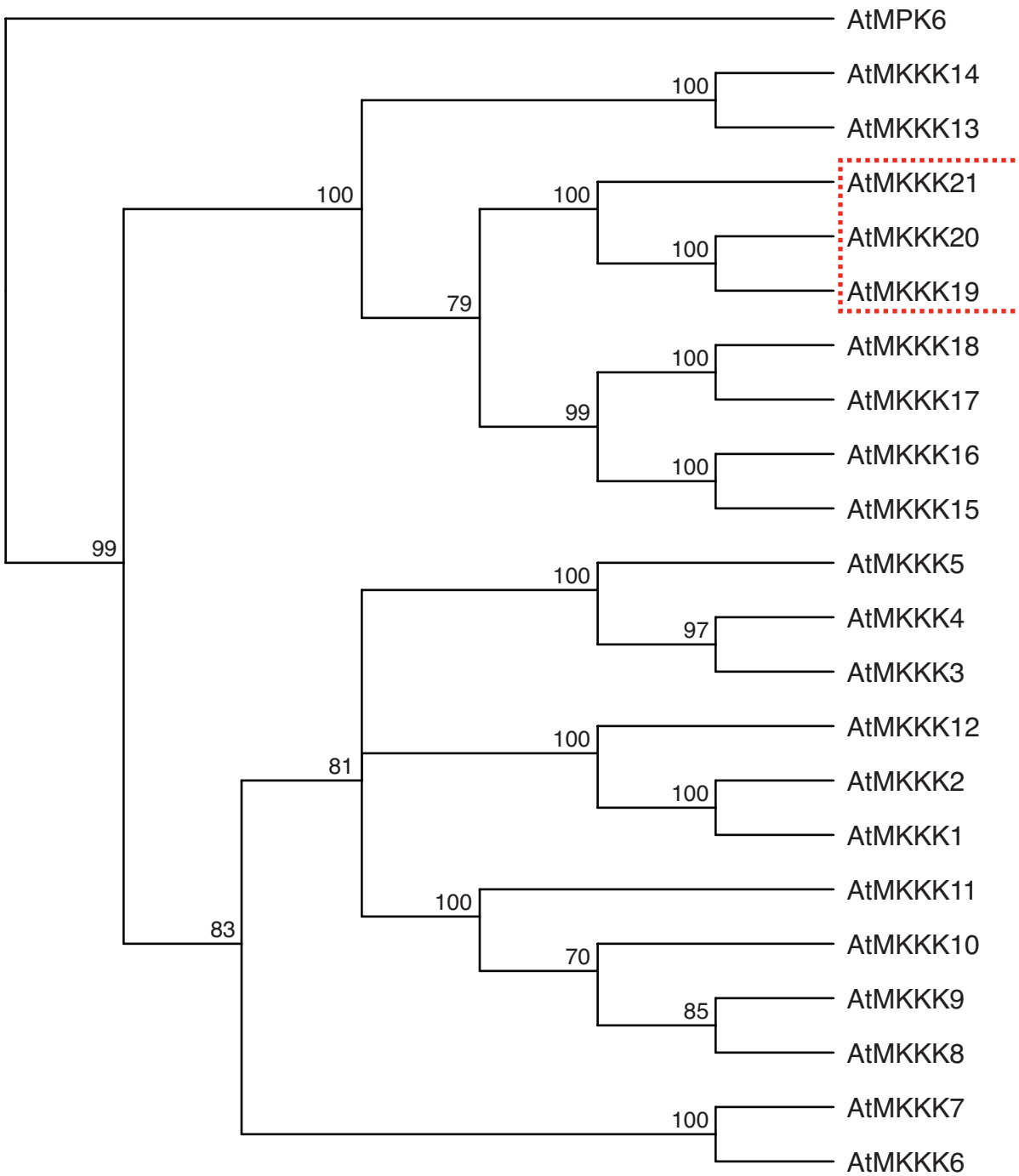


Figure 1.4. Arbre phylogénétique du groupe des MEKKs chez *A. thaliana*. Les séquences protéiques complètes ont été obtenues de TAIR (<https://www.arabidopsis.org>). La phylogénie est basée sur les domaines kinases de chaque protéine, avec la *AtMPK6* comme 'outgroup'. Les MKKK19, 20 et 21 sont encadrées. Méthode : *Neighbour-Joining*; *bootstrap* :1000

Par ailleurs, le transcriptome comparatif réalisé au niveau des cellules spermatiques d'*A. thaliana* (Borges et al. 2008) a révélé une forte expression des deux *MKKK19* et *20* dans les cellules spermatiques alors qu'elles ne sont pas détectées dans le pollen. À noter que la seule MKK qui a été détectée dans les cellules spermatiques est la *MKK3* (Borges et al. 2008). Une éventuelle implication de la *MKKK20* dans la gamétogenèse mâle est également possible suite à l'étude du facteur de transcription POLLEN DUO1 (*DUO1*) qui appartient à la famille des R2B3 MYB. *DUO1* joue un rôle essentiel dans le programme de la différenciation cellulaire au sein des cellules spermatiques mâles chez *A. thaliana* (Durbarry et al. 2005; Rotman et al. 2005). Borg et ses collègues (2011) ont démontré que l'expression de la *MKKK20* est régulée par *DUO1* car l'expression de la kinase est 3 fois plus importante dans les plantules exprimant de manière ectopique *DUO1*.

La *MKKK20* interagit aussi avec des calmodulines variées. Les calmodulines (CaMs) sont des protéines capables de s'associer au calcium et permettent par la suite l'activation de nombreuses protéines et voies de signalisation en réponse à ce signal. Une large étude des biopuces protéiques chez *A. thaliana* a permis de démontrer que la *MKKK20* interagit avec les CaMs 1, 6 et 7, ainsi qu'avec les CaMs-Like; CML8, 9, 10 (CLM) et la BtCam (Bovine CaM) (Popescu et al. 2007). Certaines de ces interactions ont de plus été confirmées par les essais en co-immunoprecipitation notamment l'interaction avec les CaM1-6 et CML9.

Il a aussi été démontré qu'un mutant T-DNA de la *mapkkk20* est sensible à une forte concentration en sels (NaCl) et accumule fortement l'anion superoxyde en comparaison avec le type sauvage (Kim et al. 2012). Des essais *in-gel* de l'activité kinase ont montré que la *MKKK20* régule l'activité de la MPK6 suite à plusieurs traitements, dont le froid et une forte concentration en chlorure. La *MKKK20* joue donc un rôle dans la régulation du stress osmotique et abiotique à travers sa régulation de la MPK6 (Kim et al. 2012).

## **1.5 Rôle de la voie MAPK chez les plantes ;**

Il est bien évident que nos connaissances liées à la signalisation moléculaire en général et les voies MAPK en particulier chez les plantes sont beaucoup moins avancées que celles acquises chez les cellules de mammifères et la levure. Cependant, plusieurs études ont démontré que la structure MAPK est aussi conservée chez les plantes et plusieurs composantes

de cette famille ont été caractérisées. Plusieurs classes des protéines kinases ou protéines phosphatases, dont des récepteurs kinases, des phospholipides et des homologues de la protéine G ont été identifiées. Des familles de MAPKKK, MAPKK et MAPK ont également été caractérisées, dont plusieurs membres liés aux différents aspects du développement et à la réponse physiologique aux stress biotiques et/ou abiotiques (Mizoguchi et al. 1997; Zhang and Klessig 2001).

### **1.5.a. L'implication de la voie MAPK dans le stress abiotique**

Contrairement aux animaux, les plantes sont immobiles dans leurs habitats ce qui les oblige à faire face, tout au long de leurs cycles de vie, aux conditions environnementales régnantes qui sont souvent rigoureuses, incluant le froid, la chaleur, les attaques pathogènes, la sécheresse, etc. Cette destinée suscite une adaptation métabolique sophistiquée qui est orchestrée par des régulations protéo-génomiques flexibles et complexes pour relever le défi de survie contre ces stress en permanence. Les stress abiotiques provoquent souvent une série de changements morphologiques, moléculaires, physiologiques et biochimiques qui affectent considérablement la croissance de la plante, son développement et sa productivité. Parmi les stress infligés aux plantes et qui sont les plus étudiés, on note le stress oxydatif, le stress thermique, le stress hydrique et celui induit par les blessures.

#### **1.5.a.i. Le stress oxydatif**

Le stress oxydatif est un phénomène physiologique et chimique complexe qui accompagne presque la quasi-totalité de tous les stress biotiques et abiotiques. Il est défini comme étant le résultat d'une production massive de dérivés de l'oxygène (ROS : Reactive Oxygen Species) qui sont hautement réactifs et toxiques, provoquant ainsi des dommages considérables à la cellule suite à une attaque de phytopathogènes (Mehdy 1994). Les 'ROS' sont aussi impliqués dans l'activation de la réponse adaptative chez les plantes sous un stress abiotique incluant la blessure, l'exposition à l'ozone, l'irradiation aux rayons ultraviolets ou suite à un choc osmotique (Kovtun et al. 2000; Cazale et al. 1999). Plusieurs travaux ont fait l'objet d'implication des MAPKs dans la réponse au stress oxydatif, par exemple, les kinases suivantes sont activées par le peroxyde d'oxygène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>): la MKKK OMTK1 chez la luzerne

(Nakagami et al. 2004), les MPK3 et MPK6 chez *A. thaliana* (Kovtun et al. 2000), et la Ntf4-like chez le tabac (Cazale et al. 1999).

#### **1.5.a.ii. Le stress thermique**

Les réponses au stress thermique induit par une basse température peuvent également induire l'expression des gènes appartenant aux voies des MAPK. Par exemple, une forte accumulation des transcrits de membres de la famille des MAPKs a été observée suite à une exposition au froid chez plusieurs espèces. Parmi ces gènes de MAPKs où la transcription est régulée à la hausse, on note *ZmMPK5* chez le maïs, *MEKK1* et *MPK3* chez *A. thaliana*, *MMK4* chez la luzerne, *CbMAPK3* chez *Chorispora bungeana* et *OsMSRMK2* chez le riz (Berberich et al. 1999; Mizoguchi et al. 1996; Jonak et al. 1996; Zhang et al. 2006b).

#### **1.5.a.iii Le stress hydrique**

Suite à l'exposition à la sécheresse pour une durée déterminée, plusieurs MAP kinase sont activées, dont les MAPKKs OsMKK4, OsMKK6 et OsMKK10-2, et la MAPKKK DSM (Drought-hypersensitive mutant1) chez le riz (Kumar et al. 2008; Ning et al. 2010). L'expression de la *ZmMPK5* (MAPK) est également augmentée au niveau des feuilles sénescences chez le maïs (Berberich et al. 1999). Récemment, la MKKK YODA a été identifiée comme un joueur positif dans la tolérance à la sécheresse via son implication directe dans la régulation fonctionnelle des stomates (Meng and Yao 2015).

#### **1.5.a.iv Le stress induit par blessure**

Le stress par la blessure chez une plante peut avoir plusieurs origines dont un contact physique ou une agression par un pathogène, ce qui induit l'activation de certains gènes de défense et certains gènes appartenant aux voies MAPKs. Ainsi, la blessure des feuilles de la luzerne induit l'activation spécifique et transitoire de la MAPK *MMK4* (Bogre et al. 1997). Chez le tabac, la transcription de la MAPK *WIPK* (Wounded-Induced Protein Kinase) est fortement induite suite aux blessures et accompagnée d'une forte activité kinase, ce qui démontre que la *WIPK* peut jouer un rôle précoce pour répondre à un stress lié à la blessure (Seo et al. 1995; Seo et al. 1999). Chez la même espèce, l'activité kinase d'une protéine de 46 kDa est induite par la blessure au niveau des feuilles (Usami et al. 1995). Puisque la protéine



est phosphorylée sur ses résidus sérine/thréonine et tyrosine, en plus d'être capable de phosphoryler le substrat générique MBP et d'être inactivée par déphosphorylation, elle est classée dans les MAPK. Chez la tomate (var. *Bonny Best*) la MAPKK MEK2 joue un rôle important dans l'interaction des voies de transduction de signaux qui assurent la médiation des réponses aux stress à la fois biotiques et abiotiques (i.e stress causé par la blessure) (Xing et al. 2001).

### **1.5.b L'implication des voies MAPK dans la signalisation hormonale**

Les phytohormones jouent un rôle important dans la physiologie des plantes durant toutes les étapes de leurs cycles de vie incluant la pollinisation, le développement embryonnaire, le développement végétatif, la floraison, la fructification et la sénescence. Plusieurs voies MAPK ont été caractérisées comme étant des joueurs clés dans la signalisation hormonale. Parmi les exemples les plus étudiés et répertoriés dans la littérature, on cite, des études sur l'éthylène, l'auxine, l'acide abscissique, l'acide salicylique et l'acide jasmonique.

#### **1.5.b.i L'éthylène**

L'analyse génétique de la voie de signalisation de l'éthylène chez *A. thaliana* démontre l'implication d'un module MAPK dans cette voie. Des mutants présentant une réponse constitutive triple en absence d'éthylène (CTR, pour Constitutive Triple Response) ont été isolés et parmi les gènes reliés au phénotype, CTR1, une MAPKKK de la famille des Raf a été caractérisée. Les mutants *ctr1* montrent une courte racine, un hypocotyle court et épais, ainsi qu'une crosse exagérément courbée (Kieber et al. 1993; Yue et al. 2006).

À noter que cinq protéines kinase activées par l'éthylène ont été déjà identifiées, soit une MAPKK (SIMKK) et deux MAPKs (SIMK et MKK3) chez la luzerne et les MAPKs MPK6 et MPK13 chez *A. thaliana* (Ouaked et al. 2003). Ouaked *et al.* ont proposé un modèle de cascade impliquant ces MAPKs qui doivent être en aval de CTR1, tenant compte de plusieurs évidences. D'abord les plantes transgéniques d'*A. thaliana* surexprimant la *SIMKK* montrent également une activation constitutive de la MPK6 d'une part, et le phénotype de triple réponse constitutive, d'autre part. Ce phénotype est similaire à celui observé dans le mutant *ctr-1* en absence d'un précurseur de la biosynthèse de l'éthylène l'acide

aminocyclopropane-l-carboxylique (ACC). De plus, MMK3 et SIMK sont rapidement activées après un traitement avec l'ACC (moins de 5 min). Contrairement à cette hypothèse, Liu *et al.* ont clairement démontré que la MAPK *AtMPK6* est impliquée dans la biosynthèse de l'éthylène et non pas dans sa signalisation. En effet, la phosphorylation de l'ACC synthase (ACS2 et ACS6) par *AtMPK6* induit une forte accumulation de ces enzymes et par conséquent favorise la production de l'éthylène (Liu and Zhang 2004).

### **1.5.b.ii L'auxine**

L'auxine est la phytohormone la plus universelle impliquée dans le contrôle de la croissance et du développement chez les plantes. Des études moléculaires poussées ont identifié un grand nombre de gènes inductibles par l'auxine et les approches génétiques ont permis d'isoler des gènes impliqués dans les réponses à l'auxine dont des membres appartenant à la famille des MAPK. La MAPKKK NPK1 chez le tabac active une cascade MAPK qui conduit à la suppression précoce de la transcription des gènes liés à la réponse à l'auxine (Kovtun et al. 1998). Les versions constitutivement actives des MAPKKKs ANP1, ANP2 et ANP3 dans les protoplastes d'*A. thaliana* participent dans la suppression des gènes de l'auxine suggérant que les ANPs chez *A. thaliana* joueraient le même rôle fonctionnel de leur orthologues NPK1 chez le tabac (Kovtun et al. 2000). Par ailleurs, Lee *et al.* ont postulé que MPK12 est un régulateur négatif dans la signalisation de l'auxine chez *A. thaliana*, alors que Dai *et al.*, ont montré que la MKK7 est un régulateur négatif qui régule le transport polaire d'auxine chez la même plante (Lee et al. 2009; Dai et al. 2006).

### **1.5.b.iii L'acide abscissique**

L'acide abscissique (ABA) a été originellement considéré comme une hormone impliquée dans l'abscission des feuilles et la dormance des bourgeons (Eckardt 2002). Cependant, l'acide abscissique est aussi lié à une grande variété de fonctions vitales, dont la germination, la régulation fonctionnelle des stomates, de même qu'aux réponses aux stress osmotiques et thermiques (de basse température) (Leung and Giraudat 1998). Un grand nombre de preuves indique que l'ABA est associé à l'activité de plusieurs kinases de la famille des MAPK. Le traitement de la plante avec l'ABA active la MAPKs MPK3 chez *A. thaliana* (Lu et al. 2002), la MAPK5 chez le riz (Xiong and Yang 2003), p45MAPK chez le

pois (*Pisum sativum*) (Burnett et al. 2000) et plusieurs isoformes de MAPKs entre 40 et 43 kDa identifiés chez l'orge (*Hordeum vulgare*) (Knetsch et al. 1996). À noter que l'ABA et le peroxyde d'oxygène peuvent, ensemble, activer quelques MAPKs chez *A. thaliana* (Lu et al. 2002) et le pois (Desikan et al. 2004). Aussi, une serine/thréonine kinase nommée AAPK (ABA-activated protein kinase) est impliquée dans la signalisation de l'ABA au niveau des cellules de garde des stomates chez la fève *Vicia faba* (Li and Assmann 1996). Enfin, récemment il a été démontré que l'expression de la MAPKKK18 est induite par l'ABA ainsi qu'une voie comprenant la MKK3 et les MPK1/2/7 chez l'*A. thaliana* (Matsuoka et al. 2015).

#### **1.5.b.vi L'acide salicylique et jasmonique**

Le jasmonate (JA) joue un rôle important dans la régulation de la croissance, du développement, ainsi que dans l'immunité. Chez le tabac, la MAPK WIPK est activée en réponse à la blessure, menant à une augmentation de la synthèse de jasmonate (Seo et al. 1999). Le rôle de l'acide salicylique (SA) dans la signalisation au niveau du système immunitaire a été largement étudié. Plusieurs travaux ont démontré que SA induit l'activation transitoire d'une MAPK nommée SIPK pour 'Salicylic acid-Induced Protein Kinase' chez le tabac (Zhang and Klessig 1997). Les deux orthologues de la SIPK et la WIPK chez *A. thaliana*, MPK6 et MPK3, respectivement, permettent d'équilibrer l'accumulation de l'acide jasmonique et/ou salicylique dans la réponse au stress par la blessure qu'elle soit induite mécaniquement par l'homme ou par des herbivores (Seo et al. 2007).

Par ailleurs, la perturbation d'un seul des niveaux de la cascade MEKK1-MKK1/2-MPK4 provoque une accumulation du SA et entraîne par la suite un nanisme chez les plantes qui peut être partiellement complété par une expression bactérienne de la salicylate hydrolase qui convertit le SA en cathecol (Petersen et al. 2000; Suarez-Rodriguez et al. 2007).

#### **1.5.c L'implication de la voie MAPK dans le système immunitaire**

Le système immunitaire inné chez les plantes comprend deux niveaux de défense contre les agents pathogènes microbiens (Jones and Dangl 2006). Le premier niveau offre une protection à un large spectre, dit reconnaissance non spécifique, contre des motifs structurels conservés issus de biomolécules secrétées par des agents pathogènes (éliciteurs). Cette

reconnaissance est médiée par des récepteurs membranaires au niveau de la cellule végétale nommés 'Pattern recognition receptors' (PRRs) qui détectent ces motifs moléculaires associés aux pathogènes (Pathogen-associated molecular patterns; PAMPs). Parmi ces «PAMPs» on trouve la flagelline (flg22), des lipopolysaccharides bactériens, la chitine ou l'ergostérol fongique. Il est à noter que la flagelline (22 acides aminés) est le PAMP le plus étudié chez les plantes, les animaux et la drosophile. Le génome d'*A. thaliana* code un récepteur like-kinase (RLK) appelé FLS2 (Flagellin-sensing locus 2) qui interagit avec la flg22 (Gomez-Gomez and Boller 2000). La voie d'activation de la réponse liée à la flagelline fut la première voie MAPK complètement caractérisée chez les plantes (Asai et al. 2002). La perception du signal commence par la liaison de flg22 au récepteur FLS2, ce qui active une réaction en chaîne en aval activant la MKKK AtMEKK1, puis les MAPKK AtMAPKK4/5 et, finalement, les MAPKs AtMPK6/3. Par la suite, les facteurs de transcription WRKY22/29 ciblés par cette voie activent des gènes spécifiques responsables de la défense. En effet, les deux MAPKKs MKK4/MKK5 ont été placées en amont des MAPKs MPK3/MPK6 dans une étude séparée (Ren et al. 2002). En plus, Li et ses collaborateurs ont identifié une nouvelle MAPKK chez le coton, la GhMKK4, qui est activée suite à l'application d'une variété de molécules stimulatrices. La surexpression de cette kinase dans le tabac conduit à une amélioration de la sensibilité aux agents pathogènes bactériens et fongiques et à une augmentation de la sensibilité à l'acide abscissique et aux gibbérellines (Li et al. 2014).

Pour contourner la réponse immunitaire des plantes, les agents pathogènes produisent des effecteurs de virulence leur permettant ainsi de déjouer les mécanismes de défense met en place par l'organisme. Cependant, les plantes ont établi un deuxième niveau de défense intracellulaire qui détecte spécifiquement certaines molécules des pathogènes via des récepteurs internes reconnus comme récepteurs de résistance (R). Plusieurs études ont lié des cascades MAPKs à ce type de réponse, études réalisées surtout chez le tabac et la tomate (Oh and Martin 2011; Pedley and Martin 2005). Chez le tabac, la MAPK WIPK est activée contre le virus de la mosaïque du tabac (TMV) par le gène de résistance N (Zhang and Klessig 1998). Les MAPKKK $\alpha$  et MAPKKK $\epsilon$  y régulent positivement la résistance médiée par Pto, une protéine kinase Sérine/Tréonine qui interagit avec l'éliciteur bactérien avrPto chez le tabac et la tomate. Deux cascades en aval de la MAPKKK $\alpha$  ont été caractérisées; MEK2-SIPK/WIPK

et MEK1-NTF6 (del Pozo et al. 2004; Melech-Bonfil and Sessa 2010). Chez *A. thaliana*, l'activation de la MPK3 et la MPK6 est prolongée dans le temps suite à l'infection par le pathogène *Pseudomonas syringae* qui porte l'effecteur avrRpt2 (Underwood et al. 2007). La cascade MEKK1/MKK1-MKK2/MPK4 est considérée comme un régulateur négatif pour la défense immunitaire chez *A. thaliana* puisqu'une perturbation de cette cascade provoque une réponse auto-immune constitutive (Ichimura et al. 2006). Par la suite, Zhang et ses collaborateurs ont lié cette réponse à l'activation d'un gène de résistance R par la protéine NB-LRR R (SUMM2) (Zhang et al. 2012).

#### **1.5.d L'implication de la voie MAPK dans le cycle cellulaire**

Il a été clairement démontré que la voie MAPK est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire chez les levures et les animaux. Similairement, dans le règne végétal, des travaux ont permis de caractériser plusieurs MAPKs impliquées dans cette fonction. Par exemple, la MKK3 de la luzerne et la Ntf6 chez le tabac sont activées pendant la mitose (Bogre et al. 1999; Calderini et al. 1998). Dans les cellules en culture BY2 du tabac, Sasabe et ses collègues ont observé que la MAPK NRK1/Ntf6 phosphoryle la NtMAPK65-1a, une protéine associée aux microtubules (MAP, microtubule associated protein) (Sasabe et al. 2006). La MAPKK NAK1/MEK2 et la MAPKKK NPK1 ont été identifiées comme étant les composantes situées en amont de la MAPK NRK1 (Calderini et al. 1998; Nishihama et al. 2001). Auparavant, il avait été démontré que l'expression de la NPK1 et de ses orthologues chez *A. thaliana*, ANP1, 2 et 3, est fortement accrue chez les cellules en division (Nishihama et al. 1997).

L'étude de génomique fonctionnelle des mutants *anp1*, 2 et 3 chez *A. thaliana* montre une redondance fonctionnelle des trois MAPKKKs (Krysan et al. 2002). Cependant, les plantes dépourvues de ces trois kinases ne sont pas viables. Des doubles mutants issus des croisements entre *anp1*, *anp2* et *anp3* peuvent aboutir ou non à des phénotypes variables. Le double mutant *anp1/anp2* a un phénotype normal, comparable au type sauvage, par contre, le double mutant *anp2/anp3* montre un phénotype sévère au plusieurs niveaux du développement. Le double mutant *anp1/anp3* est déficient au niveau des organes floraux, mais arrive tout de même à développer une forme normale par la suite (Krysan et al. 2002). D'autre

part, le niveau des transcrits de la MAPKK SIMKK est faible au cours de la phase G1 du cycle cellulaire de cultures cellulaires de luzerne. Par la suite, ces transcrits s'accumulent et montrent une forte augmentation pendant les phases S et G2. Chez cette même plante, la MMK3 et son homologue Ntf6 du tabac montrent une expression spécifique et préférentielle pendant l'anaphase et la télophase de cycle cellulaire (Calderini et al. 1998; Bogre et al. 1999). Les kinases Ntf6 et MKK3 sont localisées au niveau du phragmoplaste dans les étapes finales de l'anaphase et restent localisées au niveau du plan cellulaire tout au long de la télophase.

### **1.5.e L'implication de la voie MAPK dans le développement embryonnaire**

La MAPKKK YODA a été caractérisée dans un premier temps comme un élément important dans la différenciation des cellules stomatales chez *A. thaliana*. Il agit comme un modulateur de destin pour le type cellulaire organisé au niveau des stomates. En effet, dans le mutant YODA, le nombre de cellules de garde produite devient excessif alors que dans les plantes surexprimant YODA, les stomates sont complètement dépourvus de cellules de garde (Bergmann 2004). Par ailleurs, Lukowitz *et al.* ont démontré que YODA est également impliqué dans la formation du zygote chez *A. thaliana* en jouant un rôle important dans la division asymétrique du zygote dès le début de sa formation, ce qui est nécessaire à la formation de deux cellules initiales (cellule apicale et cellule basale) (Lukowitz et al. 2004).

Deux MAPKKKs ScFRK1 et ScFRK2 (*Solanum chacoense* fertilization-related kinase 1 and 2) ont été identifiées chez la pomme de terre sauvage et sont préférentiellement exprimées dans l'ovule. La surexpression de ScFRK2 affecte le développement de l'ovule et des graines et provoque un dysfonctionnement du pollen (Gray-Mitsumune et al. 2006; O'Brien et al. 2007). Alors que les plantes qui sous-expriment ScFRK1 produisent de petits fruits avec un nombre très réduit de sacs embryonnaires normaux ainsi qu'une nette diminution de pollen viable (Lafleur et al. 2015).

Chez *A. thaliana*, la MPK3 et la MPK6 jouent un rôle primordial dans la promotion de la division cellulaire des téguments, et cela de manière spécifique au cours du développement de l'ovule (Wang et al. 2008a). En plus, l'analyse du mutant et de la version inactive de la MPK6 démontre un rôle dans le développement des organes floraux et de l'embryon, indépendamment de la MPK3 (Bush and Krysan 2007). On remarque que la MPK3 et la

MPK6 sont impliquées dans plusieurs processus de signalisation, ce qui-soulève la question de la spécificité dans les voies MAPK, et principalement, comment ces différentes composantes peuvent-elles être impliquées dans autant de fonctions biologiques diverses?

### **1.5.f L'implication de la voie MAPK dans le développement de pollen**

Plusieurs MAPKs sont impliquées dans le développement du pollen comme dans le cas de la MPK4 chez *A. thaliana*. Les anthères des plantes mutantes *mpk4* peuvent développer des cellules mères de microspore normales (*microspore mother cell*, MMC) avec des tissus périphériques de soutien adéquats, mais les MMCs ne peuvent pas former une paroi de callose normale suite à la méiose provoquant ainsi l'inhibition de la cytokinèse et empêchant la formation de pollen viable (Zeng et al. 2011). Chez la même plante, le facteur de transcription spécifique au pollen WRKY34 est phosphorylé par MPK3/MPK6 pendant le stage précoce de la microsporogénèse. L'analyse du mutant *wrky34* et son homologue *wrky2* ainsi que le double mutant *mpk6/mpk3* a démontré que ces protéines sont importantes pour le développement précoce du pollen (Guan et al. 2014).

Chez le tabac, la MAPK Ntf4 semble jouer un rôle dans le processus de la germination et l'accumulation de son transcrit est restreinte au pollen, plus spécifiquement au niveau de la phase finale de son développement (Voronin et al. 2001). Les mêmes chercheurs ont montré que la MAPK SIPK et Ntf4 sont exprimées préférentiellement dans le pollen. Ces deux kinases peuvent être activées par la MAPKK NtMEK2, pour jouer un rôle important dans la germination du pollen et/ou la croissance du tube pollinique (Voronin et al. 2004).

Chez *Solanum chacoense*, les plantes transgéniques surexprimant la MAPKKK *ScFRK2* produisent un grand nombre de pollen mort ou moins développé à l'anthèse (O'Brien et al. 2007). Lorsqu'on perturbe l'expression d'une autre MKKK de la même famille, *ScFRK1*, par ARN interférent, la microgamétogénèse est affectée, et cette fois le développement des microspores s'arrête à la première mitose pollinique (PMI) (Lafleur et al. 2015).

Par ailleurs, l'auto-incompabilité chez les plantes est un mécanisme important pour éviter l'endogamie par le rejet spécifique du pollen incompatible (pollen du soi), et d'accepter le pollen d'individus moins apparentés génétiquement. Chez certains phyla, ce mécanisme est

contrôlé par le locus S. Lorsque les protéines codées par ce locus au niveau du pollen et du pistil interagissent, le pollen est considéré incompatible si trop proche génétiquement et la croissance du tube pollinique est bloquée. Le rejet du pollen incompatible se manifeste par une forte et rapide augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique suivis d'une dépolymérisation de l'actine-F du cytosquelette ce qui provoque l'arrêt immédiat de l'allongement du tube pollinique (Geitmann et al. 2000). Un autre mécanisme permettant l'auto-incompatibilité s'explique par la destruction du tube pollinique suite à la mort cellulaire programmée (PDC) de celui-ci; ce mécanisme est largement étudié chez les animaux connu sous le nom d'apoptose. Ce mécanisme est beaucoup plus complexe faisant intervenir plusieurs acteurs dont les protéases telles que les « caspases-like- proteins ». Une fois déclenchées, ces protéases permettent de cliver les protéines ciblées après les résidus Asp (Riedl and Shi 2004). Même si plusieurs MAPKs sont liées à la mort cellulaire programmée chez les plantes (Ligterink et al. 1997; Zhang and Klessig 2001; Ren et al. 2002), ce n'est que la MAPK p56 qui est spécifiquement identifiée comme un élément important dans le mécanisme d'auto-incompatibilité induit par la mort cellulaire programmée chez le coquelicot (*Papaver rhoens* L.) (Rudd et al. 2003).

## 1.6 Le cytosquelette et les microtubules

Le cytosquelette est l'assemblage d'un réseau complexe de fibres protéiques qui contribue à l'organisation de toutes les cellules eucaryotes. Il est constitué de trois principales composantes; les microfilaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Ces dernières participent au maintien de la forme de la cellule et sont impliquées dans plusieurs processus biologiques dont le plus important est le processus de la division cellulaire. Lors de ce processus, les microtubules s'organisent en fuseau mitotique et assurent la ségrégation chromosomique.

Les microtubules sont constitués de deux principales sous-unités; les tubulines  $\alpha$  et  $\beta$  qui s'associent en hétérodimères formant ainsi un protofilament linéaire de façon 'tête à queue' (Figure 1.5). Généralement, treize protofilaments s'associent pour former un cylindre creux d'environ 25 nm de diamètre (Evans et al. 1985). En plus des tubulines  $\alpha$  et  $\beta$ , les microtubules contiennent un nombre réduit de la protéine tubuline  $\gamma$  qui participe dans la liaison avec la guanosine triphosphate pour faciliter la nucléation des microtubules (Drykova et al. 2003). La



formation d'un microtubule se déroule en deux étapes distinctes. La première phase est la nucléation, une étape lente suivie de la phase d'élongation qui est relativement rapide. C'est au niveau des deux extrémités des microtubules qu'il y a l'ajout ou la suppression de dimères de tubulines, conférant par conséquent une polarité aux microtubules. La polarité des microtubules provient ainsi du fait qu'à une extrémité nous avons une sous-unité  $\alpha$  et à l'autre une sous-unité  $\beta$ . L'ajout des unités tubulaires se fait plus facilement et efficacement à l'extrémité présentant la sous-unité  $\beta$  liée à la GTP (+ end). Tant que la GTP est lié à la tubuline  $\beta$  on a ce qu'on appelle la coiffe et polymérisation. Mais la GTP de la sous-unité  $\beta$  est éventuellement hydrolysé, ce qui induit une courbure du protofilament. Quand la coiffe diminue et que les  $\beta$ -GTP de l'extrémité sont devenus  $\beta$ -GDP, on a un évènement de catastrophe et le microtubule se dépolymérise (Flyvbjerg et al. 1996; Wang and Nogales 2005). Ce mécanisme génère un flux des tubulines appelé tapis roulant ou 'treadmilling' (Wittmann et al. 2001), qui ressemble au même mécanisme préalablement caractérisé pour les microfilaments d'actine (Wegner 1976).

Les plantes se distinguent des autres eucaryotes par la présence de la paroi cellulaire et des chloroplastes, caractéristiques leur permettant une évolution unique des structures du cytosquelette vis-à-vis aux arrangements microtubulaires. Les microtubules des plantes se distinguent par la présence de l'anneau de préprophase (PreProphase Band ou PPB) et de phragmoplaste en plus des arrangements flexibles des microtubules corticaux (Brown and Lemmon 2001).

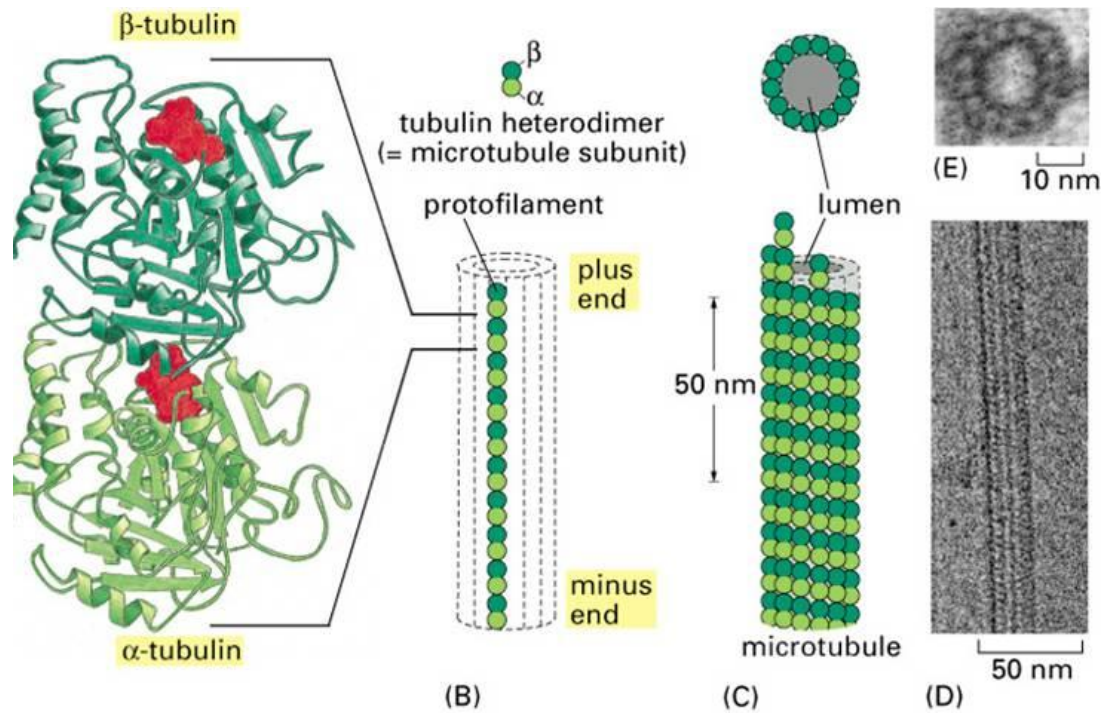


Figure 1.5. Structure d'un microtubule et ses sous-unités. (a) La sous-unité de chaque protofilament est formée d'un hétérodimère de tubuline  $\alpha$  et  $\beta$ . La GTP est montrée en rouge. (b) Représentation schématique d'un hétérodimère et d'un protofilament. (c) Le microtubule est un tube creux rigide formé de 13 protofilaments alignés parallèlement. (d) Court segment de microtubule vu en microscopie électronique. (e) Photographie en microscopie électronique d'une coupe transversale d'un microtubule montrant un anneau de 13 protofilaments distincts. (Biologie de la cellule, 4<sup>ème</sup> édition).

## 1.7 La structure et la dynamique des microtubules

Les microtubules sont des polymères très dynamiques qui se réorganisent continuellement subissant des cycles de croissance, de pause et de raccourcissement. Cette dynamique dépend du type cellulaire et des différentes phases du cycle cellulaire. Un microtubule passe par un cycle alternant la croissance par assemblage ou une contraction par désassemblage qui correspond à la fixation rapide des sous-unités tubulaires dans le premier cas ou le détachement de ces sous-unités dans le deuxième cas (Stoppin-Mellet et al. 2003). On parle dans ces deux cas de sauvegarde ou catastrophe, respectivement, avec une troisième situation dite 'pause' durant laquelle les extrémités restent stables (Tran et al. 1997). Quand les tubulines se polymérisent, préférentiellement à l'une des deux extrémités de microtubule, pendant qu'elles dépolymérisent à l'autre, on parle de 'Treadmilling' des microtubules qui représente une croissance directionnelle des microtubules. L'extrémité microtubulaire qui connaît une croissance rapide est considérée comme '*plus*' alors que celle qui est lente est considérée comme '*moins*' (Bisgrove et al. 2004). Dans ce contexte, le terme 'instabilité dynamique des microtubules' désigne la nature de la dynamique de l'extrémité '*plus*' et comment elle évolue vis-à-vis de l'extrémité '*moins*' au sein de la même population. Chez les plantes, la dynamique des microtubules est différente de celle des animaux, car ils sont en mouvement contenu, même pendant l'interphase de cycle cellulaire, cependant, ils sont en phase '*pause*' qu'environ 10% de temps (Shaw et al. 2003).

### 1.7.a La nucléation des microtubules

Les polypeptides de la tubuline  $\alpha$  et  $\beta$  subissent des modifications après leur traduction par des protéines chaperonnes et des cofacteurs de réaménagement structural avant leur assemblage en dimère (Dhonukshe et al. 2006). La cellule maintient le recyclage des tubulines selon les besoins physiologiques, ainsi un grand nombre des tubulines libres provoque nécessairement une polymérisation en microtubule, si non, le mécanisme de dégradation protéique et/ou de l'ARN va être enclenché (Giani et al. 2002). D'autre part, une balance entre les deux différentes sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  doit être maintenue, car une production artificielle excessive de l'une de ces deux sous-unités est létale pour la cellule qui est incapable de produire adéquatement des microtubules (Anthony et al. 1998; Dhonukshe et al. 2003).

Le mécanisme moléculaire responsable de la nucléation des microtubules chez les plantes n'est pas complètement clair. Chez les autres eucaryotes, la nucléation commence généralement au niveau d'un centrosome. Dans le monde animal, le centrosome représente le centre d'organisation des microtubules (Microtubule Organizing Center; MTOC) (Kirschner and Mitchison 1986). Alors que chez les champignons et la levure, le MTOCs est représenté par le 'Spindle Pole Body' qui est morphologiquement différent du MTOC animal. Les plantes sont dépourvues d'une structure MTOC bien définie, et durant l'interphase, la nucléation des microtubules commence soit d'une manière radiale à partir de l'enveloppe nucléaire ou soit au niveau de la zone corticale (Bartolini and Gundersen 2006). Aussi, les microtubules du réseau cortical peuvent être nucléés à partir des branches microtubulaires préexistantes par le recrutement de la tubuline- $\gamma$  cytosolique (Murata and Hasebe 2007).

### **1.7.b Les microtubules du fuseau mitotique**

Pour s'adapter à un environnement très varié, les cellules végétales doivent avoir une grande plasticité. C'est le dynamisme du cytosquelette en général et des microtubules en particulier qui leur confère ces propriétés. Au cours du cycle cellulaire, les microtubules sont très dynamiques, se rassemblent en réseau complexe stable ou transitoire pour assurer plusieurs fonctions, dont le mouvement d'organites, du trafic intracellulaire, de la ségrégation chromosomique, de l'accomplissement de la cytokinèse et de l'orientation spatiale cellulaire.

Les microtubules des cellules végétales au cours de la mitose se comportent différemment d'autres eucaryotes. L'anneau de préprophase (preprophase band ou PPB) formée au niveau du réseau cortical marque le début de la préprophase ce qui permet à la cellule d'amorcer la mitose. De plus, la PPB détermine la position du site de division cellulaire à travers le positionnement général du phragmoplaste (Brown and Lemmon 2001). Le phragmoplaste est présenté comme un double anneau de filaments de cytosquelette composé de microtubules et d'actine, qui s'accroît d'une manière centrifuge vers le cortex cellulaire. Si la PPB est absente, le plan de division devient aléatoire même si le fuseau mitotique reste fonctionnel (Traas et al. 1995).

Une fois la mitose commence, les PPBs disparaissent et les fuseaux mitotiques se forment par la suite (Wick 1985). La dépolymérisation des microtubules de l'anneau pendant la préprophase entraîne une désorganisation de l'enveloppe nucléaire et la formation par la suite du

fuseau chromatique (Brown and Lemmon 2001). Avec le progrès de la mitose, le phragmoplaste subit une remarquable expansion et la plaque cellulaire fusionne par la suite avec le cortex localisé auparavant par l'anneau de préprophase (Wasteneys 2002).

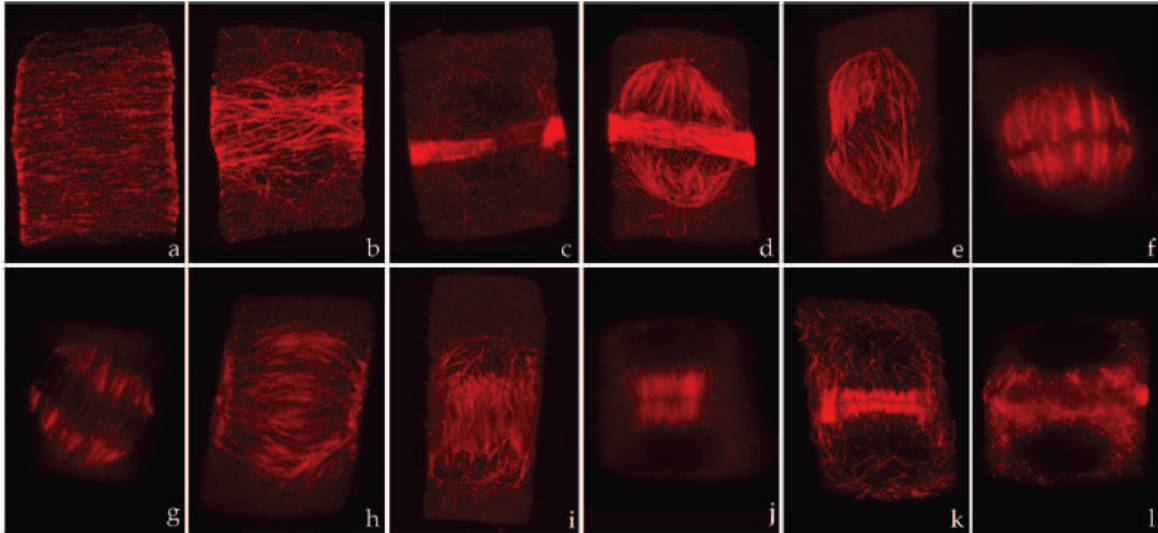


Figure 1.6. La structure des microtubules au cours du cycle cellulaire.

La structure des microtubules au cours du cycle cellulaire de cellules méristématiques de la racine chez le blé tendre (*Triticum aestivum* L.). (a) Faisceaux de microtubules corticaux dans la cellule d'interphase. (b) Développement d'une large PPB au cours de la phase G2. (c) PPB matures dans la cellule de la prophase, (d) de la broche PPB de la prophase, (e) de la prométaphase, (f) de la métaphase, (g) de l'anaphase, et (h) au stade initial de la formation de phragmoplaste à l'anaphase. (i-k) Étapes successives de la formation et le développement de phragmoplaste au cours de l'anaphase-télophase. (k-l) Réseau de microtubules radiaux pendant la transition vers la phase G1. D'après (Smirnova 2012).

### 1.7.c Les microtubules du fuseau cortical

Durant l'interphase, les microtubules des cellules végétales forment habituellement des réseaux parallèles dans le cortex cellulaire (Figure 1.7). L'arrangement des polymères microtubulaires au sein du fuseau cortical varie selon le type cellulaire et le stade de développement. Après la mitose, les microtubules sont arrangés aléatoirement, mais deviennent rapidement organisés en réseau parallèle. Ce réseau peut passer d'une direction transversale à l'axe de la cellule à une direction longitudinale, ou vice versa au fur et à mesure que la cellule atteint sa maturité (Baskin 2001). L'élongation cellulaire est perpendiculaire à l'orientation de ces microtubules corticaux qui sont en concordance avec le mouvement des complexes de cellulose synthase au niveau de la membrane plasmique (Fisher and Cyr 1998). Cette hypothèse est largement soutenue par les travaux de Paredez et al. qui ont démontré que les protéines du complexe de la cellulose synthase (Cellulose Synthase proteins ou CESA) sont associées au mouvement des microtubules, et que la dépolymérisation de ces derniers change complètement la distribution du complexe CESA au niveau de la membrane plasmique (Paredez et al. 2006).

L'orientation du dépôt des microfibrilles de cellulose autour de la paroi cellulaire détermine la direction de l'expansion cellulaire et joue en conséquence un rôle majeur dans la détermination de la forme de la morphologie de la cellule végétale (Baskin 2001). D'autres études ont montré l'existence d'une relation fonctionnelle entre le complexe CESA et les microtubules corticaux (Crowell et al. 2009; Gutierrez et al. 2009). D'autre part, Sugimoto *et al.* ont démontré que la désorganisation des microtubules corticaux par des drogues dépolymérisant les microtubules ou dans le cas du mutant *mor1-1*, le dépôt parallèle des microfibrilles cellulosiques n'est pas affecté (Sugimoto et al. 2003). Le mutant Microtubule Organization 1 ou MOR1, montrant un défaut dans l'organisation des microtubules et l'expansion cellulaire (Whittington et al. 2001). Pour trouver une alternative à la théorie précédente qui peut expliquer les résultats contradictoires entre les différentes études, Wasteneys a présenté un modèle de régulation entre les microtubules et les microfibrilles dans lequel, les microtubules sont impliqués dans la régulation des propriétés chimiques et en conséquence de la longueur des microfibrilles, plutôt qu'être directement liés à leur orientation parallèle (Wasteneys 2004).

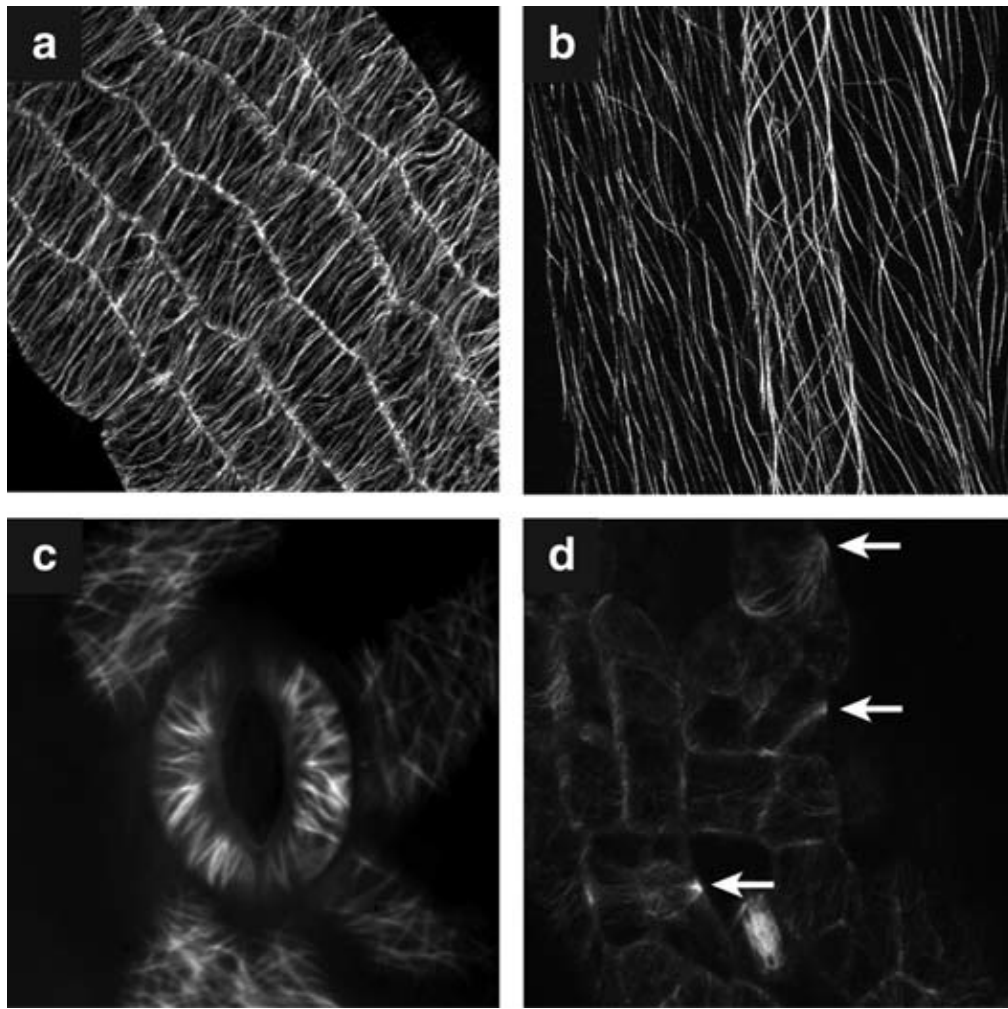


Figure 1.7. Les fuseaux des microtubules corticaux dans la cellule d'*A. thaliana*. Les cellules végétales montrent une diversité de configurations de réseaux corticaux, y compris : (a) les fuseaux transversaux au niveau des cellules en phase d'élongation (cellules épidermiques dans l'hypocotyle); (b) les fuseaux longitudinaux des longs polymères dans les cellules qui ont cessé de croître (cellules épidermiques d'hypocotyle après 6 jours de croissance); (c) les fuseaux hautement parallèles et transversaux dans les cellules de garde matures; et (d) les anneaux de préprophase dans les cellules en division (pétiole des cellules épidermiques, les flèches indiquent PPB) (Ehrhardt and Shaw 2006).

### **1.7.d Les protéines associées et régulatrices des microtubules (MAPs)**

Pour assurer une activité dynamique et rapide, les microtubules ont besoin d'une panoplie de protéines directement ou indirectement associées à cet effet appelées 'Microtubule-Associated Proteins (MAPs)'. Les premières MAPs identifiées co-purifiaient avec la tubuline extraite de cerveaux de porc (Borisy et al. 1975). Chez les plantes, on trouve plusieurs MAPs qui leur sont spécifiques, alors que la majorité des MAPs animales sont absentes du règne végétal (Wasteneys and Galway 2003). Plusieurs approches ont été utilisées pour identifier les MAPs chez les plantes, incluant l'analyse des mutants, la purification biochimique et l'identification des gènes orthologues des animaux par l'analyse des banques de données génomiques. Ces dernières ont permis de caractériser plusieurs familles de MAPs végétales (Hamada 2007; Chuong et al. 2004).

Les MAPs sont classées en plusieurs groupes selon leur mode d'action telles que leurs implications dans la polymérisation/dépolymérisation des microtubules, et leurs liens dans l'organisation de la structure des microtubules.

#### **1.7.d.i Les MAPs associées à l'assemblage et désassemblage des Microtubules**

Jusqu'à maintenant, la seule protéine végétale identifiée comme étant liée à la dépolymérisation des microtubules est la Katanine. Cette protéine hétérodimère hydrolyse l'ATP pour générer l'énergie nécessaire au désassemblage des microtubules (Burk et al. 2001). Cette protéine est essentielle pour l'élongation et l'expansion cellulaire, la formation de la paroi cellulaire et la progression du cycle cellulaire par la dépolymérisation des microtubules du fuseau mitotique (Burk et al. 2001). Chez les animaux, la Katanine fonctionne en hétéromère, les deux sous-unités p80 et p60 formant le complexe qui se lie aux microtubules et favorisant par la suite son clivage. Les homologues des deux sous-unités existent chez *A. thaliana* mais la sous-unité p60 agit seule et aucune activité de la p80 n'a été reportée jusqu'à présent (Stoppin-Mellet et al. 2003). Par homologie, on trouve chez les plantes la Spc98 qui est importante à la nucléation des microtubules chez les animaux. La Spc98 est colocalisée avec la tubuline  $\gamma$  au niveau du site de nucléation microtubulaire, mais la protéine n'est pas distribuée tout au long des microtubules corticaux ce qui suggère que cette MAP est impliquée uniquement dans la nucléation des microtubules (Erhardt et al. 2002).



MOR1 (Microtubule Organization 1) appartient à la famille des MAP215 qui constitue une très grande famille des MAPs conservées qu'on trouve chez tous les eucaryotes. Les membres de ce groupe sont impliqués dans le contrôle de la taille des microtubules soit par l'attachement ou le détachement du dimère de tubulines aux microtubules (Hamada 2007). Il a été reporté que MOR1 joue un rôle capital dans la division et l'expansion cellulaires (Whittington et al. 2001; Twell et al. 2002). MOR1 stabilise la croissance des extrémités récemment formées des microtubules et favorise la progression du cycle cellulaire par la suite (Kawamura et al. 2006). Les cellules du mutant *mor1-1* montrent une aberration du plan cellulaire et un arrangement défectif des chromosomes montrant ainsi l'importance de MOR1 dans la régulation et l'organisation des microtubules (Kawamura et al. 2006). De plus, le taux de la croissance et de retrait des microtubules est réduit dans le mutant *mor1-1*, où les microtubules passent plus de temps dans la phase de la pause, expliquant que la dynamique des microtubules est affectée sévèrement dans ce mutant (Kawamura and Wasteney 2008). Chez *A. thaliana* on trouve trois isoformes de la MAP EB1 (End Binding protein 1) qui sont localisées à l'extrémité '+' des microtubules (Chan et al. 2003; Mathur et al. 2003). Les racines du mutant EB1 sont sensibles au touché et à la gravité et sont également déviées lors de leur croissance horizontale (Bisgrove et al. 2008).

#### **1.7.d.ii Les MAPs associées à l'organisation des microtubules**

Les kinésines forment une superfamille des protéines motrices qui lient les microtubules, et ayant plusieurs rôles au niveau du transport d'organelles ainsi que dans l'organisation de la structure des microtubules. Tous les eucaryotes possèdent des kinésines formées d'un domaine moteur conservé et utilisant l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour se déplacer sur les microtubules (Reddy and Day 2001). La famille des kinésines est la plus importante des MAPs et contribue à un grand nombre de fonctions liées aux microtubules chez les plantes (Richardson et al. 2006). *A. thaliana* possède le plus grand nombre de Kinésine et de 'Kinesin-like protein' parmi tous les eucaryotes dont le génome a été séquencé (Reddy and Day 2001; Dagenbach and Endow 2004). Les membres du groupe 14 des kinésines semblent être impliqués dans l'organisation des filaments des microtubules pour les ajuster chaque protofilament l'un par rapport à l'autre (Ambrose et al. 2005). Chez *A. thaliana*, deux membres de la sous-famille kinésine 12, PHRAGMOPLAST ORIENTING KINESIN 1 et 2 (POK1 et POK2) sont impliqués dans le contrôle spatial de la cytokinèse (Muller et al. 2006).

Une Kinésine du groupe 14 chez le coton, GhKCH2, est impliquée dans la formation de la paroi cellulaire en participant à la dynamique et à l'organisation des microtubules ainsi qu'à l'approvisionnement du matériel nécessaire à la formation de la paroi cellulaire (Xu et al. 2007). Chez le maïs, la MAP TANGLED 1 (TAN1) est impliquée dans le contrôle de la division cellulaire (Smith et al. 1996). Deux protéines de la kinésine POK1 et POK2 sont associées directement à la fonction de la TAN1, le mutant montrant une orientation anormale du plan cellulaire (Smith et al. 2001; Hamada 2007).

SPIRAL 1 et 2 (SPR1, 2) deux MAPs spécifiques aux plantes sont aussi impliquées dans le contrôle de la direction de l'élongation cellulaire via l'interaction avec les microtubules corticaux (Ishida et al. 2007). SPR2 peut agir indépendamment de SPR1 et il a été démontré qu'il est impliqué dans l'organisation des microtubules (Shoji et al. 2004).

Une autre famille de MAPs bien étudiée chez les plantes est celle des MAP65s, qui semble être également spécifique aux plantes. Le génome d'*A. thaliana* code pour neuf gènes des MAP65 (Wasteneys 2002; Hussey et al. 2002). Ce sont des protéines de 54 à 80 kDa qui sont localisées généralement au niveau des microtubules corticaux pendant l'interphase, alors que cette localisation diffère tout au long du cycle cellulaire (Hamada 2007). L'un des rôles importants que les MAP65s peuvent jouer est de maintenir les microtubules en position parallèle et proprement alignés, en évitant leur désassemblage suite aux stress thermiques tels que le froid (Smertenko et al. 2004; Wicker-Planquart et al. 2004). AtMAP65-1 a une activité de regroupement des microtubules (Smertenko et al. 2004), alors qu'AtMAP65-2 joue un rôle d'agent stabilisateur des microtubules (Li et al. 2009). Cette divergence fonctionnelle des différents membres de la famille des MAP65 est liée à une grande variabilité au niveau de la région C-terminale des protéines que codent ces gènes conférant diverses propriétés dynamiques pour l'organisation des microtubules (Smertenko et al. 2008).

### 1.7.e Les ‘Mitogen-activated Protein Kinases’ et l’organisation des microtubules

Les ‘Mitogen-activated Protein Kinases (MAPKs)’ qui peuvent phosphoryler des ‘Microtubules-binding protein (MBPs)’ provoque l’inhibition de l’activité de ces dernières conduisant ainsi à leur déstabilisation des microtubules (Nogales 2001). Les microtubules sont des polyélectrolytes chargés négativement et la plupart des protéines qui se lient aux microtubules, les MBPs, interagissent avec leur surface par un effet de charge électrique. Ces MBPs contiennent des acides aminés chargés positivement qu’on trouve exposés dans des domaines d’interaction (Mandelkow 1995). L’incorporation d’un ou plusieurs fragments d’orthophosphate à l’intérieur de ces domaines pourrait interférer avec la capacité de la liaison des MBPs aux microtubules. Par conséquent, la phosphorylation de ces domaines est considérée comme un régulateur négatif de la liaison des MAPs avec les microtubules (Drewes et al. 1998).

Le rôle des MAPKs dans la régulation de la fonction des microtubules a été bien caractérisé et étudié chez les cellules animales. Des évidences d’une potentielle implication des voies MAPKs dans la régulation des microtubules chez les plantes sont également en train d’émerger. L’une des premières MAPK identifiées jouant un rôle dans la régulation du cytosquelette est la MMK2 chez la luzerne (*Medicago sativa*) (Jonak et al. 1995). La MAPK p43<sup>Ntf6</sup> du tabac et la MKK3 de la luzerne sont aussi activées pendant la fin de l’anaphase et le début de la télophase d’une manière dépendante des microtubules (Calderini et al. 1998; Bogre et al. 1999). Jusqu’aujourd’hui, la voie MAPK NACK-PQR du tabac est la mieux caractérisée (Takahashi et al. 2004), et comprends la MKKK NPK1, la MAPKK NQK1 et la MAPK NRK1 (Nishihama et al. 2001). L’initiation de la voie commence quand deux ‘Kinesin-related protein’, NACK1 et NACK2 interagissent avec la NPK1, ce qui provoque son activation après un état d’autoinhibition et la transporté, par la suite, au niveau de la zone médiane de la phragmoplaste où le complexe NACK-PQR entre en action (Nishihama et al. 2002). Les homologues des membres de la voie NACK-PQR chez *Arabidopsis* ont été identifiés telles que la famille des MKKKs incluant ANP1, ANP2 et ANP3, la MKK ANPQ1/MKK6 et la MPK MPK13 (Nishihama et al. 1997; Nishihama et al. 2002).

Chez *A. thaliana*, la surexpression de l’orthologue de la MAP65-1, la MAP65-1a dans des cellules de tabac, induit son hyperphosphorylation durant la métaphase. L’implication des MPKs dans cette phosphorylation empêche la MAP65-1a de se lier aux microtubules (Smertenko et al.

2006). Deux autres membres de la famille MAP65, les MAP65-2 et MAP65-3/PLEIADE, sont également phosphorylés par la MPK4 qui est activée dans une cascade initiée par l'ANP durant la cytokinèse (Sasabe et al. 2011). La MPK18 joue également un rôle important dans la régulation des microtubules corticaux par son interaction fonctionnelle avec la phosphatase PHS2 (Walia et al. 2009). Le comportement de la racine (la taille et l'angle d'inclinaison) du mutant *mpk18* est différent de celui du type sauvage lors de l'ajout des drogues de la dépolymérisation des microtubules.

## **1.8 Le développement des gamétophytes femelles et mâles chez les Angiospermes**

Le grand succès évolutif des angiospermes (plantes à fleurs) est le résultat direct de leur système reproductif qui est le plus évolué chez les végétaux comptant plus de 250 000 espèces (Bemer and Angenent 2010). Leur cycle biologique comprend deux phases; une phase végétative ou sporophytique diploïde et une phase gamétophytique haploïde. Le sporophyte est issu du zygote, la première cellule formée après fécondation ayant  $2n$  chromosomes. Les gamètes mâles et femelles sont formés après la méiose et forment le pollen et le sac embryonnaire, respectivement. Cette reproduction sexuée est réalisée au sein de la fleur et nécessite l'intervention de plusieurs gènes suite à un programme hautement coordonné qui aboutit au passage de la phase sporophytique à la phase gamétophytique. Plusieurs approches expérimentales ont été exploitées afin de mettre en évidence les différents intervenants et les mécanismes impliqués dans la formation des cellules sporophytiques et gamétophytiques chez les plantes.

### **1.8.a Développement floral**

Chez les angiospermes, la fleur est généralement composée de quatre compartiments. Les organes reproducteurs mâles ou étamines, composés d'un filet servant de support à la partie fertile mâle qu'on appelle anthère, et les tissus générateurs au niveau desquels s'effectue la gamétogénèse mâle. Le pollen mature quiescent se loge dans les sacs polliniques avant la

déhiscence. Ces différentes loges sont séparées par un autre composant qu'on appelle le connectif. L'appareil reproducteur femelle qu'on appelle pistil ou gynécée est constitué d'un stigma, au niveau duquel s'effectue la pollinisation, d'un style où s'effectue le développement du tube pollinique pour le transfert du matériel génétique, et finalement l'ovaire qui abrite les ovules. Ces deux appareils sont entourés par les derniers compartiments soit les pétales et les sépales. Dans ce groupe de plantes supérieures, la plupart des organes dérivent de méristème qui représente la population des cellules indifférenciées. Le développement de la fleur se déroule en plusieurs étapes; d'abord, les gènes d'intégration initient le passage du stade de croissance végétative à la croissance reproductrice de la plante. En suite, le méristème floral acquit son identité grâce à l'activation des gènes spécifiques. En fin, pour spécifier les différents organes de la fleur, les gènes d'identité du méristème activent les gènes d'identité des organes floraux (Coen and Meyerowitz 1991).

L'induction florale est contrôlée aussi par des facteurs environnementaux incluant la température et la lumière tous comme les facteurs internes tels que les hormones (auxine, gibbérelline et cytokine) ou les oscillateurs circadiens (Aya et al. 2009; Bartrina et al. 2011; Heo and Sung 2011; Krizek 2011).

### **1.8.b Développement des étamines**

Le développement des étamines est divisé en deux phases principales subdivisées en 14 étapes basé sur le progrès morphologique et aussi le développement cellulaire et moléculaire (Figure 1.8) (Sanders et al. 1999). Le développement des étamines commence par une croissance du méristème floral, suivi par l'apparition des 'primordia' de sépale puis de pétale. Les stades de 1 à 5 correspondent au début de la formation des étamines proprement dites, dont les anthères adoptent la forme quadrilobée. Chaque 'primodium' contient des cellules archesporiales qui vont se différencier en cellules non reproductrices dans quatre grands lobes. Ces cellules arrondies sont formées de l'épiderme, l'endothecium, la couche moyenne et le tapétum, englobant au centre un futur sac pollinique qui contient des cellules sporogènes ou cellules mère du pollen (CPM).

Les CMP entraînent leur première division de la méiose qui correspond au début de l'étape 6 et 7, pour former ensuite les tétrades qui sont entourées par plusieurs couches cellulaires, la première étant une paroi de callose alors que les autres couches vont constituer un

support nutritif pour les microspores ou futurs grains de pollen (Koltunow et al. 1990). Pour que les cellules gamétophytiques se dissocient entre elles d'une part et des cellules du tapétum d'autre part, ces dernières sécrètent des enzymes nommées callases, ce qui marque le début du stade 8. Cela va créer par la suite, un espace rond encerclé par le tapétum permettant ainsi aux gamètes de se développer librement. Les microspores vont subir deux divisions mitotiques pour commencer leur différenciation en grains de pollen matures au début du stade 9. La dégénérescence du tapétum commence aux stades 10 et 11 qui marquent également la maturité complète du pollen. Les autres couches cellulaires dégèrent aux stades 12 et 14, aboutissant à la déhiscence de l'anthère et la libération des grains du pollen par la suite.

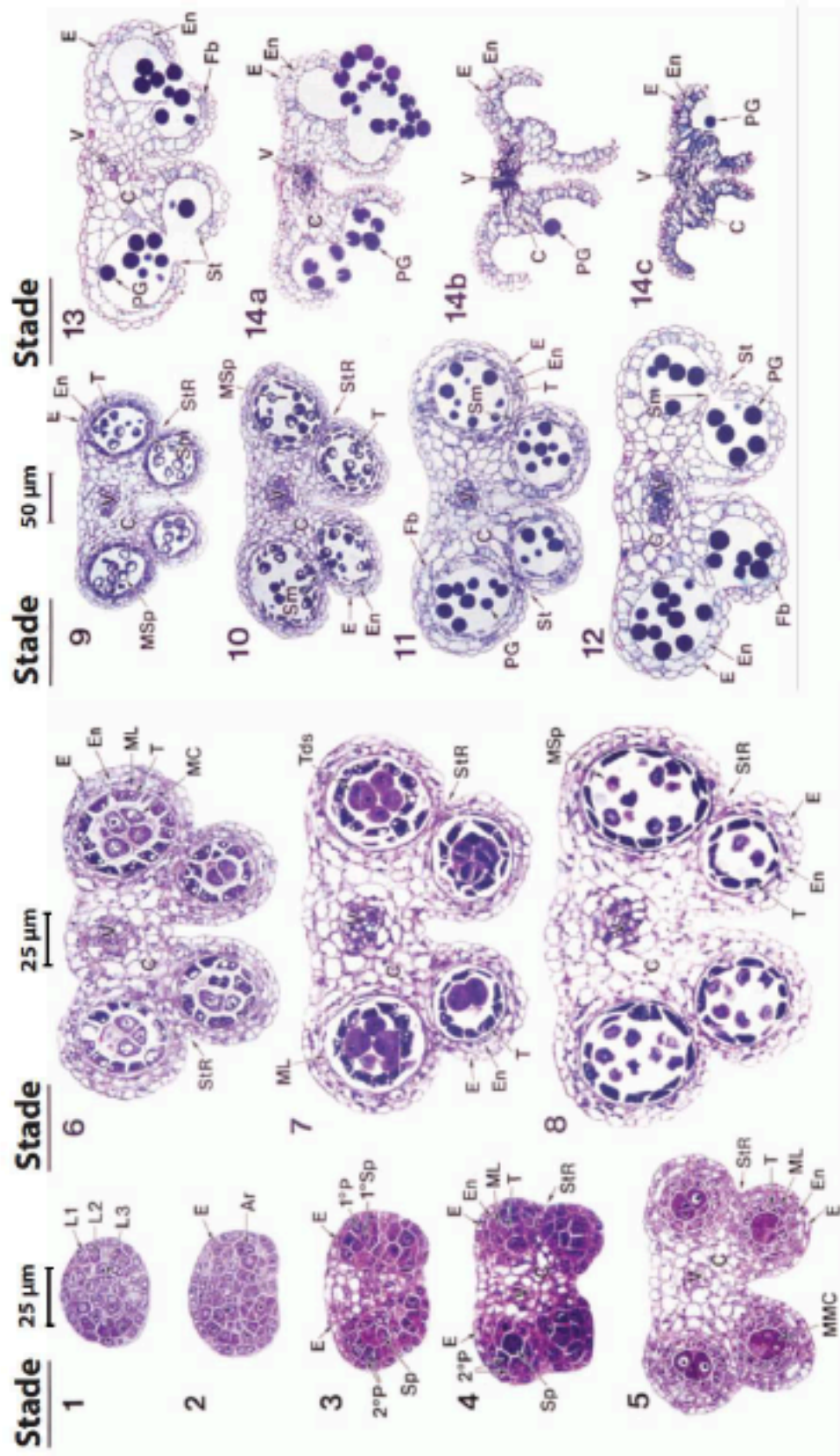


Figure 1.8. Différentes phases du développement des anthères de type sauvage chez *A. thaliana* d'après Sandeers *et al.* 1998. Les stades 1 à 8 représentent les phases précoces de développement de l'anthère alors que les stades 9-14 représentent les phases tardives. Ar: Cellules archesporiales ; C: tissu connectif; E; Épiderme; En: Endothecium; Fb: Bande fibreuse; L1, L2, L3: les trois couches cellulaires de primordia; MC: Cellule méiotique ; ML: Couche moyenne; MMC: Cellule mère du pollen; Msp: Microspores; PG: Grain de pollen; 1°P: Couche primaire pariétale; 2°P: Couche secondaire pariétale; 1°Sp: Couche sporogène primaire; Sp: Cellules sporogènes; Sm: Septum ; St: Stomium; StR: Région du stomium ; T: Tapetum ; Tds: Tétrades ;V: Région vasculaire.

### 1.8.c Développement du pollen et du gamétophyte mâle

Dans le monde animal, les cellules destinées à devenir des cellules germinales sont déterminées au début de l'embryogenèse et resteront comme une population distincte de cellules souches tout au long de la vie (Strome and Lehmann 2007). Par contre, chez les plantes à fleurs on trouve une population diverse de cellules souches, indifférenciées principalement au niveau du méristème. Ces cellules totipotentes peuvent se différencier en tissus végétatifs ou organes reproducteurs. Les étapes de la formation du pollen peuvent être divisées en deux grandes phases; la microsporogenèse et la microgamétogénèse (Figure 1.9). La microsporogenèse commence par la transformation des cellules mères diploïdes du pollen (CMP) en microsporocytes. Les cellules qui relient les CMP, s'élargissent par division mitotique, suivie par la formation d'une paroi de callose.

L'amorçement de programme génétique gamétophytique permet par la suite au microsporocyte d'entamer deux divisions méiotiques pour donner naissance à un tétrade de microspore haploïde qui développent une structure morphologique distincte entourée par une couche de callose (Scott et al. 2004). Ceci est accompagné par la migration du noyau de microspore à une position périphérique contre la paroi de la cellule. La microspore subit par la suite, une division cellulaire asymétrique connue comme la mitose du pollen I (PMI). La petite cellule germinale mâle est englobée dans le cytoplasme de la grande cellule végétative ayant un rôle nutritif, pour créer une nouvelle structure où une cellule est encastrée dans une autre cellule. La division cellulaire asymétrique de la PMI est essentielle pour mettre en place une structure cellulaire correcte du gamétophyte mâle, à savoir que les deux nouvelles cellules filles portent chacune un profil d'expression génétique différent qui confèrent leurs propres structure et destin (Borg et al. 2009).



Après la PMI, la chromatine nucléaire de la grande cellule végétative disperse et quitte le cycle cellulaire en G1. La cellule végétative nourrit les cellules germinales qui sont en développement et donnera lieu, par la suite, au futur tube pollinique après la pollinisation. Alors que la chromatine nucléaire de la cellule germinale devient plus développée et continue la nouvelle série de la mitose connue comme ‘mitose de pollen II’ (PMII), pour produire des cellules spermatiques. Après la PMII, une association physique fonctionnelle entre les cellules spermatiques et le noyau végétatif est établie pour former un pollen tricellulaire ou ce qu’on appelle ‘l’unité germinale mâle’ (MGU) (Lalanne and Twell 2002). Le tapétum, servant de tissus nourricier, dégénère et les grains de pollen se déshydratent et perdent entre 70 à 85 % d’eau. L’anthère devient par la suite biloculaire et entre en déhiscence pour permettre aux gamétophytes mâles, pollen quiescent, de se libérer afin d’assurer la fécondation des organes femelles (Ma 2005).

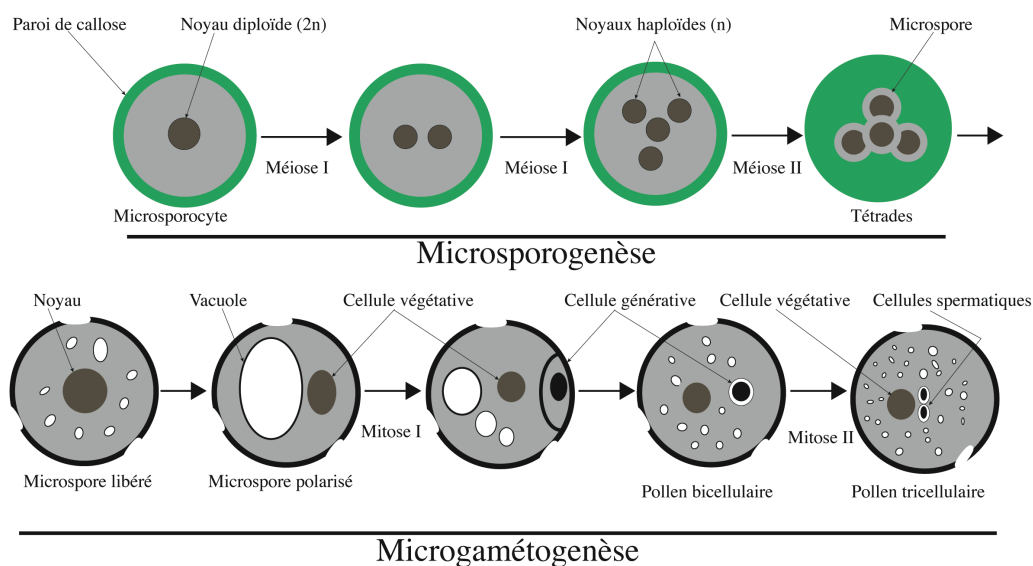


Figure 1.9. Le développement de gamétophyte mâle chez *A. thaliana*. Diagramme schématisant les étapes morphologiques distinctes de sexe masculin. Au cours de la microsporogénèse, les cellules mères se divisent par méiose pour former une tétrade de microspore. La microgamétogénèse commence quand les tétrades de microspores haploïdes sont développées en microspores entourées d’une paroi de callose. Les vésicules polaires se fusionnent pour former la cellule générative à l’intérieur d’une grande cellule végétative. Ce que représente la première division de la mitose du pollen, alors que la deuxième division mitotique est réalisée quand la cellule générative de la microspore bicellulaire donnera naissance aux deux gamètes ou cellules spermatiques. (Adapté du [http://america.pink/microgametogenesis\\_2997211.html](http://america.pink/microgametogenesis_2997211.html))

### 1.8.d Analyse transcriptomique au cours du développement du gamétophyte mâle

Les études sur l'expression des gènes lors de la formation des gamètes mâles ont commencé bien avant l'ère du séquençage à haut débit (Rutley and Twell 2015). Ainsi, les biopuces à ADN (microarray en anglais) ont été utilisées pour mener des études pilotes chez *Arabidopsis thaliana* (Honys and Twell 2004), le riz (Wang et al. 2005) et le blé (Crismani et al. 2006). Ensuite, les études transcriptomiques du gamétophyte mâle se sont étendues vers d'autres espèces comme le tabac (Hafidh et al. 2012b; Hafidh et al. 2012a), le maïs (Ma et al. 2008; Chetoor et al. 2014) et le lis (Lang et al. 2015). Au cours des dernières années, les nouvelles technologies de séquençage ont permis d'analyser en profondeur l'expression des gènes impliqués dans le développement du gamétophyte mâle.

Concernant *Arabidopsis*, la première étude transcriptomique a été réalisée avec les spores isolées de l'anthere sur quatre stades du gamétophyte mâle, soit les microspores uninucléées, le pollen bicellulaire, le pollen tricellulaire et le pollen mature (Honys and Twell 2004). À l'aide de la biopuce ATH1 d'Affymetrix, 13 977 gènes sur un total de 22 597 gènes ont donné un signal positif d'hybridation au moins dans l'un des stades de développement. Le nombre de gènes transcrits est plus important dans la phase précoce (11 565 gènes pour le pollen unicellulaire) qu'à la phase tardive (7 235 gènes pour le pollen mature). Cependant, le nombre de gènes dont l'expression est spécifique au pollen varie entre 857 et 625 alors que la majorité du transcriptome appartient à la catégorie des 'Housekeeping genes'. Deux autres études ont ajouté un stade avancé du gamétophyte mâle à savoir le grain de pollen (Zimmermann et al. 2004; Pina et al. 2005). Entre 5000 et 7000 gènes seraient exprimés dans le gamétophyte mâle mature, tenant compte de ces deux études. L'ajout d'autres étapes de développement du pollen a de plus permis de doubler le nombre potentiellement régulé dans le pollen (Twell et al. 2006).

L'utilisation de FACS (Fluorescence activated cell sorting) a aussi permis d'isoler les cellules spermatiques du pollen chez *Arabidopsis* pour réaliser une étude transcriptomique (biopuces ATH1) (Borges et al. 2008). Par comparaison avec les transcriptomes du pollen et des plantules, un total de 2400 gènes, dont 642 fortement et spécifiquement exprimés dans les cellules spermatiques, ont pu être caractérisés. La classification fonctionnelle des gènes fortement exprimés dans les cellules spermatiques a montré une surreprésentation des catégories

ontologiques (GO term) des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN de même que dans la progression de cycle cellulaire.

### **1.8.e Analyse protéomique au cours du développement du gamétophyte mâle**

Les données d'analyse protéomique peuvent fournir un complément nécessaire aux données transcriptomiques du pollen et sont indispensables pour une compréhension entière des processus de développement du pollen. La première étude protéomique du développement gamétophytique mâle a été réalisée sur des anthères de riz (Imin et al. 2001). Au stade de jeune microspore, plus de 4000 protéines ont été résolues d'une manière reproductible par électrophorèse bidimensionnelle (gels 2D), 62 protéines ont été identifiées par séquençage d'Edman et spectrométrie de masse MALDI-TOF (Imin et al. 2001). Le même groupe a aussi réalisé une comparaison plus détaillée des différents stades du développement gamétophytique mâle incluant les stades suivants : cellule mère de pollen, tétrade, jeune microspore, pollen unicellulaire, pollen bicellulaire et pollen tricellulaire (Kerim et al. 2003). La comparaison entre les différents stades utilisés a permis d'identifier 150 spots de protéines et seulement 33 protéines uniques ont été identifiées. Ces protéines sont principalement impliquées dans le métabolisme des glucides, la paroi cellulaire et le cytosquelette (Kerim et al. 2003).

Chez *A. thaliana*, les études protéomiques du pollen mature ont révélé un total de 135 protéines distinctes, la moitié étant impliquée dans le métabolisme, génération de l'énergie, le métabolisme de la paroi cellulaire et la synthèse des protéines (Holmes-Davis et al. 2005; Noir et al. 2005). Les auteurs ont quantifié les spots protéiques pour ces trois catégories et les volumes de protéines normalisés par rapport à leurs signaux d'ARNm correspondants dans le transcriptome. Les données ont révélé un résultat surprenant que les ARNm fortement représentés correspondent à une abondance protéique faible, tandis que les ARNm qui étaient moins abondants représentaient la partie la plus abondante des protéines, ce qui indique une relation inverse entre les taux de protéine et d'ARNm. Néanmoins, ils ont identifié cinq protéines qui sont spécifiques au pollen dont deux protéines glycosylées de la famille hydrolase (At2g16730), une 'germine-like protein' (GLP8, oxalateoxidase putative, At3g05930), une protéine inhibitrice de la pectine

méthylestérase (At4g24640), l'actine 4 (At5g59370), et des facteurs de dépolymérisation de l'actine (At4g25590, At5g52360).

Une partie protéomique beaucoup moins étudiée chez le pollen des plantes est celle qui est consacrée au phosphoprotéome c.-à-d., les protéines phosphorylées. Néanmoins, Mayank *et al.* ont mené une large étude sur les phosphoprotéines chez *A. thaliana* dans laquelle ils ont identifié 962 peptides phosphorylés correspondant à 598 phosphoprotéines (Mayank *et al.* 2012). Les sites de phosphorylation de 609 peptides confirmés ont été cartographiés avec succès. L'analyse de l'enrichissement des phosphoprotéines montre une surreprésentation des catégories GO (Gene Ontology) cruciales pour la croissance du tube pollinique, suggérant que la phosphorylation régule les processus tardifs du développement pollinique. De plus, des analyses de motif phosphopeptidiques du pollen ont montré une surreprésentation des motifs spécifiques aux  $\text{Ca}^{2+}$ /calmoduline-dépendante protéines kinases (CDPK), aux MAPKs ainsi que protéines possédant des motifs de liaison aux protéines 14-3-3. Cette étude fournit une base solide pour explorer davantage le rôle de la phosphorylation au cours du développement du pollen.

### **1.8.f Mutants liés au développement du pollen**

D'une manière générale, disséquer les éléments d'une voie de développement biologique consiste à isoler des mutants qui perturbent cette voie. Cette approche a été largement utilisée pour mettre en évidence l'implication de plusieurs gènes dans le développement du pollen chez les plantes. De nombreux mutants ont été identifiés pour les différentes phases du développement pollinique. Le gamétophyte mâle présente souvent une distorsion de la ségrégation chromosomique, qui se traduit par une réduction de transmission via le gamète mâle si le gène muté est important pour le développement du pollen (McCormick 2004). Ce qui fait que le stade de développement affecté dans certains mutants ne peut être déterminé que plus tard.

Le premier mutant de gamétophyte mâle chez *A. thaliana*, nommé *sidecar pollen (scp)*, a été isolé suite à un criblage de mutants produit par bombardement de neutron rapide (Chen and McCormick 1996). Une autre analyse des mutants issus d'un programme de mutagenèse par insertion de transposons chez le maïs, a identifié deux mutants du gamétophyte mâle appelé

*male sterile-1* et *-2* (Sari-Gorla et al. 1996). Depuis, un grand nombre de mutants liés au développement du gamétophyte mâle ont été isolés et caractérisés principalement chez *A. thaliana* (résumé au tableau 1.1).

Gene ID	Gene	Mutant	Mutant phenotype	Protein identity	Protein function	References
At1g65470	<i>FAS1</i>	<i>fasciata1</i>	Microspore and male germ cell cycle arrest at G <sub>2</sub> /M	Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1) p150 subunit	Nucleosome/chromatin assembly during replication	Chen <i>et al.</i> , 2007
At5g64630	<i>FAS2</i>	<i>fasciata2</i>	Microspore and male germ cell cycle arrest at G <sub>2</sub> /M	Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1) p60 subunit	Nucleosome/chromatin assembly during replication	Chen <i>et al.</i> , 2007
At3g48750	<i>CDKA;1</i>	<i>cyclin-dependent kinase A;1</i>	Bicellular pollen: S-phase progression inhibited in germ cell	Cyclin-dependent kinase	Germ cell S-phase progression	Nowak <i>et al.</i> , 2005 Iwakawa <i>et al.</i> , 2005
At3g60460	<i>DUO1</i>	<i>duo pollen1</i>	Bicellular pollen: germ cell fails to enter PMII	R2R3 MYB transcription factor (MYB125)	Regulator of germ cell specification and required for G <sub>2</sub> /M transition.	Durbarry <i>et al.</i> , 2005 Rotman <i>et al.</i> , 2005
Unknown	<i>DUO2</i>	<i>duo pollen2</i>	Bicellular pollen: germ cell arrested at prometaphase	Unknown	Unknown	Durbarry <i>et al.</i> , 2005
At3g54650	<i>FBL17</i>	<i>F-box-like 17</i>	Bicellular pollen: S-phase progression inhibited in germ cell	F-Box protein	Targeted proteolysis of CDKA inhibitor KRP6 in male germ line	Kim <i>et al.</i> , 2008
At2g35630	<i>GEM1</i>	<i>gemini pollen1</i>	Twin-celled and binucleate pollen: abnormal divisions at PMI	MOR1/GEM1: Homologous to chTOGp/XMAP215 family of microtubule associated proteins	Microspore polarity and cytokinesis through microtubule organization.	Park <i>et al.</i> , 1998 Park and Twell, 2001 Twell <i>et al.</i> , 2002
At4g14150	<i>Kinesin-12A</i>	<i>kinesin-12a</i>	Microspores fail to complete PMI with phragmoplast defects	Kinesin-12 family	Phragmoplast microtubule organization	Lee <i>et al.</i> , 2007
At3g23670	<i>Kinesin-12B</i>	<i>kinesin-12a</i>	Microspores fail to complete PMI with spindle defects	Kinesin-12 family	Phragmoplast microtubule organization	Lee <i>et al.</i> , 2007
At5g58230	<i>MSI1</i>	<i>multicopy suppressor of IRA1</i>	Microspore and male germ cell cycle arrest at G <sub>2</sub> /M	Chromatin Assembly Factor-1 (CAF-1) p48 subunit/pRbAp48 homologue	Nucleosome/ chromatin assembly during replication	Chen <i>et al.</i> , 2007
Unknown	<i>SCP</i>	<i>sidecar pollen1</i>	Extra-celled pollen: abnormal divisions at PMI	Unknown	Unknown	Chen and McCormick, 1996
At1g50230	<i>TIO</i>	<i>two-in-one</i>	Microspores fail to complete cytokinesis at PMI	Homologous to FUSED-kinases	Signalling role in cell plate/phragmoplast expansion	Oh <i>et al.</i> , 2005
At3g45150	<i>TCP16</i>	<i>tcp16</i>	Microspore nuclear DNA loss and abortion	bHLH protein, TCP PCF-subfamily	Regulator of microspore gene expression	Takeda <i>et al.</i> , 2006

Tableau 1.1. Exemples des mutations du pollen chez *A. thaliana*  
Quelques gènes qui affectent le développement de microspore, division asymétrique et le développement de la lignée germinale mâle d'après (Borg et al. 2009).

## Problématique et projet de recherche

La voie de signalisation des MAPKs joue un rôle prépondérant dans la communication cellulaire permettant la transduction des signaux environnementaux ou développementaux vers une réponse cellulaire adaptée et programmée. Il est donc de première importance d'étudier ces voies de signalisation et d'en caractériser les acteurs majeurs. Dans notre laboratoire, le projet de séquençage des EST (expressed sequence tags) de l'ovule de *Solanum chacoense* (une pomme de terre sauvage) nous a permis d'isoler plusieurs protéines kinases exprimées préférentiellement dans les ovules et lors du développement des embryons. L'analyse de trois de ces protéines kinases, ScFRK1, 2 et 3 (*Solanum chacoense* Fertilization-Related Kinase) a démontré leur rôle dans la formation tant du pollen que des ovules (Gray-Mitsumune et al. 2006; O'Brien et al. 2007; Daigle and Matton 2015; Lafleur et al. 2015), leurs mutations affectant grandement la production des graines et des fruits.

Afin de progresser plus rapidement dans le fonctionnement des cascades de signalisation de ces protéines kinase, nous avons décidé de caractériser la fonction et le rôle de leurs orthologues potentiels chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, soit les kinases MKKK19, 20 et 21, pour lesquels aucune donnée n'était disponible. À l'aide d'analyses génétiques, biochimiques et moléculaires, nous pourrions précisément caractériser plusieurs facettes de ces gènes et de leur protéine correspondante. Des analyses d'expression par la fusion de leur promoteur avec un gène rapporteur (GUS ou GFP) nous permettront de déterminer exactement leur lieu d'expression. L'analyse des mutants simples ou multiples devrait nous permettre de déterminer leur rôle exact lors du développement de la plante. De plus, de nouvelles approches pour muter les trois gènes simultanément seront employées, telle la construction de microRNA artificiel (amiRNA et ARN interférent). L'étude biochimique des interactions de ces protéines s'effectuera dans le système du double-hybride et sera réalisée en deux étapes. Premièrement à petite échelle, avec les MKKK19, 20 et 21 en interaction directe avec les 10 AtMKKs d'*Arabidopsis* afin de caractériser le ou les possibles substrats des trois MKKKs pouvant former une voie MAPK canonique. Puis, à grande échelle à l'aide d'une banque complète d'ADNc d'*Arabidopsis* et construite à partir d'une vaste sélection de tissus de la plante afin de caractériser les interactants possibles des MKKK19, 20 et 21, tant en amont qu'en aval. La nature de ces interactants devrait nous indiquer les contextes biologiques dans lesquels les trois kinases

pourraient être impliquées. La nature de ces résultats nous permettra alors de poursuivre notre investigation dans divers contextes biologiques tels que vous le verrez dans les pages suivantes.

## **II. Le rôle des Kinases MKKK20, MKK3 et MPK18 dans la régulation des microtubules corticaux dans la racine d'*Arabidopsis*.**

### **Résumé**

Ce chapitre est centré sur l'étude et la fonction de la MKKK20 dans la régulation des microtubules corticaux chez *Arabidopsis*. Suite aux résultats du criblage de la banque d'ADNc d'*Arabidopsis* dans le système de double-hybride chez la levure, nous avons identifié la MPK18 parmi les interactants de la MKKK20. Sachant qu'il a été démontré que la MPK18 était impliquée dans la régulation des microtubules corticaux (Walia et al. 2009), nous voulions savoir si la MKKK20 pouvait également être impliquée dans le même processus et si elle avait un lien avec la MPK18. Nous avons montré que la MKKK20 interagit directement avec la MPK18 et avons confirmé cette interaction par complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC). En suite, nous avons démontré que la MKKK20 phosphoryle la MPK18. L'analyse des mutants de la MKKK20 avec des drogues qui désorganisent les microtubules a montré que les racines de ces plantes sont plus courtes en comparaison avec celles du type sauvage. Le même comportement avait été observé chez le mutant *mpk18* (Walia et al. 2009).

Par ailleurs, nous avons vérifié si la voie de signalisation impliquant la MKKK20 pouvait ne pas obligatoirement passer par l'intermédiaire d'une MAPKK. Parmi les dix MAPKK d'*Arabidopsis*, seule la MKK3 interagit spécifiquement avec la MKKK20. Alors que cette interaction est très forte, aucune interaction n'a été observée entre la MKK3 et la MPK18. Les essais kinases ont confirmé les résultats précédents montrant ainsi que la MKKK20 phosphoryle les deux kinases MKK3 et MPK18. Par contre, la MKK3 ne phosphoryle pas la MPK18. La racine du mutant *mkk3* se comporte de la même manière que *mkk20* et *mpk18*, ce qui nous indique que la MKK3 est aussi liée fonctionnellement aux microtubules. De plus, les observations microscopiques de l'organisation des polymères microtubulaires dans les différents mutants (simples et doubles) nous ont permis de conclure que ces kinases peuvent former deux voies de signalisation différentes et non synergiques dans la régulation des microtubules.



# **Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 20 (MKKK20) modulates cortical microtubules through two independent MAPK signaling cascades**

Rachid Benhamman<sup>1</sup>, Audrey Loubert-Hudon<sup>1†</sup>, Samuel Bernard Drory<sup>1†</sup>, Fangwen Bai<sup>1</sup>, Brian Ellis<sup>2</sup> and Daniel P. Matton<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101 rue Sherbrooke est, Montréal, Québec, H1X 2B2, Canada.

<sup>2</sup>Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver, V6T 1Z4 BC, Canada.

† These authors contributed equally to this work.

\*To whom correspondence should be addressed: [dp.matton@umontreal.ca](mailto:dp.matton@umontreal.ca)

Author contributions: B.R. carried out all of the experiments, except for kinase assays, which was performed by B.S. and Immunofluorescence which was carried out by L.A. B.R. interpreted the results and led the writing of this article. D.P.M. oversaw this project and gave critical corrections and improvement to the manuscript.

Preparation for submission

## 2.1 Abstract

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling networks represent important means of signal transduction in plants and other eukaryotes, controlling intracellular signaling by linking perception of environmental or developmental cues to downstream targets. MKKK20 along with MKKK19 and 21 form a highly supported clade with the Solanaceous Fertilization-Related Kinases. In *Arabidopsis*, no function has yet been ascribed to this family except for MKKK20, which is involved in osmotic stress responses via MPK6. Here we combined genetic and biochemical analyses to study the role of MAPK cascades involving MKKK20 in plant development. Using a directed MKKK-MKK yeast two-hybrid (Y2H) screen, MKKK20 was found to interact only with MKK3, while a large-scale Y2H screen with MKKK20 as the bait retrieved MPK18 as a direct interactant. Both interactions were confirmed through bimolecular fluorescence complementation (BiFC) and kinase assays, where MKKK20 phosphorylated both MKK3 and MPK18. Interestingly, when all three kinases were combined, no synergistic effect was observed on MPK18 phosphorylation, suggesting a bypass of MKK3, consistent with the absence of interaction between MKK3 and MPK18. Since *mpk18* mutant plants were previously shown to be defective in microtubule-related functions, phenotypes of *mkkk20* single and *mkkk20/mpk18* double mutants were investigated to determine if *MKKK20* acts upstream of *MPK18*. This was the case, as *mkkk20* root microtubules were hypersensitive to microtubule-disrupting drugs as previously observed for *mpk18* plants. Surprisingly, *mkk3* plants were also similarly affected. This suggests the presence of two non-complementary pathways, which participate in *Arabidopsis* cortical microtubule function, the first including MKKK20, MKK3 and an unknown MPK, while the second is a non-canonical MAPK cascade including MKKK20 and MPK18 that bypasses the need for an MKK intermediate.

KEYWORDS: *Arabidopsis*, MKKK20, MKK3, MPK18, cascade, microtubules organization

## 2.2 Introduction

Microtubules are polymers of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin heterodimers that help form the eukaryotic cytoskeleton. They are involved in many physiological processes such as development, morphogenesis, intracellular transport, cell division and motility. Plant microtubule arrays differ from those in other eukaryotes in that they are dispersed and lack conspicuous organization (Dixit et al. 2006). In addition, plant microtubules are organized into several distinct structures during the cell cycle (Ehrhardt and Shaw 2006). During mitosis and after chromosomal segregation, plant cells build the bipolar phragmoplast array composed mainly of aligned microfilaments and highly dynamic microtubules. These microtubules form parallel arrays in the cell cortex, where they are organized into highly diverse patterns, relying on a variety of mechanisms for orientation, assembly and function. In interphase cells, microtubules form parallel arrays in the cortex. The orientation of these arrays varies according to the cell type and stage of development. Cortical microtubules, for instance, are perpendicularly oriented during cell elongation, yet form parallel arrays during interphase (Lloyd and Chan 2008).

MAPKs were originally shown to phosphorylate the neuronal microtubule-associated protein, MAP2, after stimulation by insulin (Ray and Sturgill 1988, 1987). Since then, MAPKs have been recognized as one of the most important cellular regulators of biological processes such as differentiation, proliferation, cell death, hormone signaling, osmotic stress, etc. (Colcombet and Hirt 2008). Canonical MAPK cascades operate via successive phosphorylation steps starting with an upstream MAPK kinase kinase (MAPKKK or MKKK) that phosphorylates and activates a MAPK kinase (MAPKK or MKK) on one of two serine/threonine residues in a conserved (S/T)-X<sub>5</sub>-(S/T) motif in plants, and (S/T)-X<sub>3</sub>-(S/T) in animals and yeast (Garrington and Johnson 1999; Chang and Karin 2001). The MKK then phosphorylates a MAPK (or MPK) by dual phosphorylation of the conserved -TXY- motif located in its activation loop. Typical MAPK substrates include transcription factors in addition to other cytoplasmic or nuclear proteins (Rodriguez et al. 2010). Activation of the upstream MAPKKK is more complex, and poorly understood in plants. Studies in yeast and animals show that MAPKKK activation can be mediated by MAPKKK kinases (Elion 2000), G proteins (Fanger et al. 1997) and G protein-coupled receptors (Sugden and Clerk 1997) or less frequently by the receiver

domain of a two-component histidine kinase complex (Posas and Saito 1997). The *A. thaliana* genome encodes around 80 MAPKKKs (including 21 from the MEKK subfamily), 10 MAPKKs (MKKs) and 20 MAPKs (MPKs) (Ichimura et al. 2002). These kinases have been implicated in a wide array of plant biological processes ranging from stress responses to development (Rodriguez et al. 2010). To date, however, only a limited number of complete MAPK cascades have been reported in plants, mainly in abiotic stress responses, plant-pathogen interactions and in plant development. For example, the first completely identified MAPK cascade was MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6, which acts upstream of two WRKY transcription factors, WRKY22/WRKY29. This cascade functions downstream from the flagellin receptor, FLS2, a leucine-rich-repeat (LRR) receptor kinase, and protects against multiple bacterial and fungal pathogens (Asai et al. 2002). Recently, a complete abscisic acid-activated MAPK cascade was characterized, composed of MAPKKK17/18-MKK3-MPK1/2/7/14 (Danquah et al. 2015). In plant development, the *A. thaliana* MAPKKK YDA acts upstream of the MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 signaling module, which functions in stomatal patterning and inflorescence development (Meng et al. 2012; Wang et al. 2007). In *Nicotiana benthamiana*, the MAPK cascade NPK1-MEK1-Ntf6 is involved in tobacco mosaic virus (TMV) resistance (Jin et al. 2002; Liu et al. 2004). In biotic and abiotic stress responses, the MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6 cascade mediates cold and salt responses (Teige et al. 2004), whereas MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 functions as a negative regulator in innate immune responses (Gao et al. 2008). Partially characterized cascades include the MKK4/5-MPK3/6-ACS6 module acting in salt stress responses and the MKK1-MPK4 module that regulates stress-responsive gene expression and can be activated under two different stresses: drought and wounding (Teige et al. 2004; Meszaros et al. 2006). Modules involved in hormone signaling include the MKK9-MPK3/MPK6 signaling pathway, involved in ethylene biosynthesis (Liu and Zhang 2004; Xu et al. 2008); the MKK9-MPK3/6 module, which is activated by ethylene in *Arabidopsis* (Takahashi et al. 2007; Yoo et al. 2008); and the MKK3-MPK6 module, proposed to act as a negative regulator of jasmonic acid signaling.

Microtubule activity is modulated by microtubule-associated proteins (MAPs), which are in turn controlled by phosphorylation-dephosphorylation cycles catalyzed by multiple protein kinases and protein phosphatases (Drewes et al. 1998). The role of MAPK signaling in regulating microtubule functions has been widely documented in animals (Hoshi et al. 1992;

Mandelkowitz et al. 1995; Terret et al. 2003; Zhao and Chen 2006; Liu et al. 2007; Verlhac et al. 1996; Sun et al. 2008). Meanwhile, the involvement of MAPK-signaling in the regulation of plant microtubule functions has begun to emerge. In *Arabidopsis*, inhibition of protein tyrosine kinases and tyrosine phosphatases was reported to affect the dynamics and organization of cortical microtubules (Yemets et al. 2008). *AtMPK4* and *AtMPK6* are necessary for cell division and localize to the phragmoplast during cytokinesis (Beck et al. 2011; Komis et al. 2011). Phosphorylation of the tobacco microtubule-associated protein MAP65-1 by the MAPK NRK1/NTF6 down-regulates the microtubule-bundling activity of NtMAP65-1 and positively regulates expansion of the phragmoplast (Sasabe et al. 2006). In addition, its *Arabidopsis* orthologue, *AtMAP65-1*, has been shown to bind microtubule bundles specifically during interphase, anaphase and telophase. When ectopically expressed in tobacco cells, a non-phosphorylatable *AtMAP65-1* version affects mitotic division (Smertenko et al. 2006).

Plant MAPKKs comprise the largest and most heterogeneous group of MAPK-related kinases. They have been classified into two major groups: the MEKKs subgroup that contains kinases similar to animal MEKKs and yeast MAPKKs, and the Raf-like kinases (Rodriguez et al. 2010). Of these, only the MEKKs are involved in MAPK cascades. MAPKKs have also been classified into three groups; A, B, and C, based on phylogenetic analysis of the amino acid sequence of their kinase domain (Ichimura et al. 2002). *Arabidopsis* MKKK20 participates in the osmotic stress response through its regulation of MPK6 (Kim et al. 2012), and was shown to interact with Calmodulins (CaM) and Calmodulin-like proteins (CML) in protein array assays (Popescu et al. 2007).

*Arabidopsis* MAPKKs have been classified into four groups, A to D (Soyano et al. 2003; Teige et al. 2004; Dai et al. 2006), with *AtMKK3* belonging to group B, a single-member clade characterized by the presence of a C-terminal NTF2 domain known to promote nuclear import of cargo proteins (Steggerda and Paschal 2002). MKK3 participates in pathogen signaling and is required for regulation during dark-light transition (Doczi et al. 2007; Lee 2015). *Arabidopsis* root growth inhibition by jasmonate is negatively regulated by the MKK3/MPK6 cascade (Takahashi et al. 2007). This cascade, along with MYC2, is involved in blue light-mediated seedling development in *Arabidopsis* (Sethi et al. 2014). MKK3 also participates in an abscisic acid-activated MAPK cascade (Danquah et al. 2015). Recently, two MKK3 orthologues have been found to regulate seed dormancy in barley (*Hordeum vulgare*

L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) (Nakamura et al. 2016; Torada et al. 2016).

MAPKs are also divided into four groups. *AtMPK18* belongs to group D, whose members harbor a -TDY- motif in their activation loop whereas the three other groups have a -TEY- signature (Ichimura and Group 2002). *AtMPK18* had been reported to interact with the phosphatase propyzamide hypersensitive 1 (PHS1) and is involved in microtubule functions (Walia et al. 2009).

Here we show that *Arabidopsis* MKKK20 physically interacts with both MKK3 and MPK18 and phosphorylates these kinases *in vitro*. Surprisingly, activated MKK3 did not increase MPK18 phosphorylation status when the three kinases were put together. Previous analysis showed that MPK18 is involved in microtubule-related functions in *Arabidopsis* (Walia et al. 2009). When tested in the presence of microtubule depolymerizing drugs, *mkkk20* and *mkk3* mutant plants were found to have shorter roots than wild type, resembling the *mpk18* behavior, and the mutants' roots showed more stable arrays of microtubules. This, combined with the analysis of *mkkk20/mpk18* and *mkk3/mpk18* double mutants suggests that MKKK20 modulates cortical microtubule functions through two independent MAPK signaling cascades, including a non-canonical pathway that bypasses the need for an intermediary MKK.

## 2.2 Materials and methods

### 2.2.1 Plant materials, growth conditions and inhibitor treatments

*Arabidopsis* wild type (Col-0 accession), *MKKK20* (SALK\_021755 and SALK\_124398), *MPK18* (SALK\_069399) and *MKK3* (SALK\_051970) T-DNA mutants were obtained from TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)) (for T-DNA line details, see Supplemental 1 Table I). Seeds were grown in growth cabinets at 21° C with a 16h-light/8h-dark photoperiod. Primers used to screen for homozygous lines are mentioned in Supplemental 1 Table II. For root growth assays (elongation rate and skewing angles), seeds were grown aseptically on Hoagland medium solidified with 1.2% agar. For oryzalin (Sigma-Aldrich) treatments, small volumes of a concentrated stock solution in DMSO were added to the molten agar; controls received the same amount of DMSO. Seeds sown on agar plates with or without oryzalin were kept for at least 7 days and placed vertically in a growth cabinet (21°C, 16 h light/ 8 h dark cycle and 120  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

### 2.2.2 Yeast two-hybrid screening.

For Y2H screening, the normalized universal *Arabidopsis* Mate and Plate Library (Clontech® catalogue n° 630487). was used. The library was transformed into yeast strain Y187 (MAT $\alpha$ ), which can be readily mated to a MATa GAL4 reporter strain. The *MKKK20* cDNA bait was cloned into the pGBKT7 vector (GAL4 DNA-BD) and transformed into the Y2H Gold yeast strain. Mating of the two sexually different strains was carried out at 30°C for 24 hours and the forming zygotes were plated directly on high stringency SD growth medium (–Leu/–Trp/–Ade/–His and with 40  $\mu$ g/ml X- $\alpha$ -Gal and 125 ng/ml Aureobasidin A. DNA from blue yeast colonies that survived this stringent selection were extracted and sequenced using the pGADT7-T 5AD primers. For directed pairwise yeast two-hybrid screen, the ProQuest™ Two-hybrid system from Invitrogen was used. All kinases were cloned and sequence-verified, before being transferred into Gateway-compatible destination vectors (ProQuest™ Two-hybrid system, Invitrogen) to generate the bait vector MKKK20 (in pDEST32) as the GAL4 DNA-Activating-Domain (DBD) and the prey vectors AtMKK1-10 (in pDEST22) as the GAL4-Activating-Domain (AD) and pairwise introduced into the yeast strain MaV203. Controls provided were used according to the manufacturer’s instructions. Interaction strength for HIS3 and URA3 activation assays were scored visually compared to the controls.

### 2.2.3 GUS staining and microscopic observations

For GUS staining, a 1.5 Kb promoter region upstream of the *MKKK20* coding sequence was cloned into the pMDC162 Gateway™ vector harboring the  $\beta$ -glucuronidase gene to generate an N-terminal fusion reporter gene (Curtis and Grossniklaus 2003). Primers for this construct are listed in S1 Table III. The vector was then transformed into *Agrobacterium tumefaciens* C56C1 strain and used to transform wild type *Arabidopsis* (Col-0 accession) plants by the floral dipping method as described (Zhang et al. 2006c). Seeds were collected for M1 transformed plants and were grown in MS media containing hygromycin antibiotic and the selection was done as described (Harrison et al. 2006). The M1 generation was analyzed for gene expression and the true transformant (well grown seedling with long developed and distinguishable hypocotyl) were grown in growth chamber to generate an M2. GUS staining was conducted as described (Weigel and Glazebrook 2002). Freshly harvested tissues from

Independent lines were collected and kept in 80% acetone before performing the  $\beta$ -glucuronidase assays in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7, 0.1% Triton X-100, 5 mM  $K_3Fe(CN)_6$  and 5 mM  $K_4Fe(CN)_6$ . Tissues were then incubated in 2 mM X-Gluc at 37°C for 4 hours. The plant material is then cleared with increasing ethanol concentration starting from 20% to 70% for 30 minutes each. Observations were performed using a ZEISS SteREO Discovery V12 stereomicroscope or Zeiss Axio Imager 1 microscope (under bright or dark field) and images were taken using a Zeiss AxiocamHRc camera (Zeiss, <http://www.zeiss.ca>). Clearing of flowers and seedlings was performed by incubating tissues in 100% ethanol for 1h and then transferred in a methyl salicylate/EtOH solution with increasing ratios of methyl salicylate for 30 min each (1:3, 1:1 and 3:1). The tissues were kept in 100% methyl salicylate (Sigma-Aldrich) at 4°C no more than 24h to avoid discoloration. The slides were mounted with 100% methyl salicylate and the observations were performed using a Zeiss Axio Imager 1 microscope under bright field.

#### **2.2.4 RNA isolation for RT-PCR**

For RT-PCR, total RNA from various plant tissues was isolated using the TRIzol® RNA isolation reagent (Life Technology) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using a first-strand cDNA synthesis M-MLV RT kit (Invitrogen). RT-PCR was conducted with specific gene's primers (Supplemental 1 Table III).

#### **2.2.5 GFP and Bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assay**

*MKKK20*, *MKK3* and *MPK18* full-length cDNAs were PCR amplified and cloned into the gateway entry vector pDONR<sup>tm</sup>/Zeo (Invitrogen) and subcloned either into pMCD83 to generate an N-terminal fusion with the GFP marker, or into modified plant BiFC vectors pUC-SPYCE or pUC-SPYNE (Walter et al. 2004). All GFP and BiFC constructs were sequence-verified and prepared for transient transformation of onion epidermal cells by microparticle bombardment using a BioRad PDS-1000/He bombardment system as described (Germain et al. 2008). *Arabidopsis* bZIP transcription factors were used as positive controls for BiFC (Walter et al. 2004).



### 2.2.6 In vitro kinase assays

*MKKK20*, *MKKK20*-KD (kinase dead) and *MPK18* were expressed as His-tag fusion proteins in the pQLinHD (Addgene®; [www.addgene.org/13668/](http://www.addgene.org/13668/)) and *MKK3* was expressed as a His-GST-tag in the pDEST-565 vector (addgene®; [www.addgene.org/11520/](http://www.addgene.org/11520/)) using recombinant modified primers (Supplemental Table IV). Plasmids were transformed in the Rosetta-gami *E. coli* strain. *MKKK20*-KD was generated by replacing the conserved lysine (K) in the kinase ATP-binding loop by a methionine (M). Bacterial cultures in LB media were induced with 0.1 mM isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) after reaching an OD<sub>600</sub> absorbance of 0.5 and incubated at 37°C for an additional 3 hours (except for *MPK18*; 25°C overnight). Bacterial cells were pelleted at 10,000 rpm for 10 min and purified under denaturing conditions by re-suspending bacteria in 10 mL Lysis Buffer (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM Tris-Cl, 8 M Urea, 1mM PMSF, pH 8.0) per 100 mL. Bacterial cells were disrupted (twice) using a French pressure cell press at 950 psi. The resulting mixture was centrifuged at 10 000 rpm for 10 min and the supernatant collected. Recombinant proteins were purified on HisTrap Ni columns using an ÄKTA Avant FPLC (GE Healthcare). For all kinase assay combinations, 1  $\mu$ g of each His-kinase was incubated for 30 min in 30  $\mu$ l kinase reaction buffer containing (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM ATP, and 0.037 MBq [ $\gamma$  <sup>32</sup>P] ATP. Five  $\mu$ g of MBP was added when indicated and enzymatic reactions were stopped by adding SDS sample buffer and heating for 4 min at 95°C. Assays were then fractionated in an SDS-PAGE gel, stained by Coomassie Brilliant Blue and autoradiographed using a Typhoon Trio phosphorimager (GE Healthcare).

### 2.2.7 Complementation test and transgenic transformation

*MKKK20* and *MKK3* cDNAs were PCR-generated using modified primers (Supplemental Table V) that included a 6x-His tag addition to the protein C-terminal region and cloned in the pDONR<sup>tm</sup>/Zeo vector (Invitrogen). The constructs were then transferred into the Gateway® binary vector pMDC32 (Curtis and Grossniklaus 2003) to produce the *35S:MKKK20-6xHis* and *35S:MKK3-6xHis* vectors. These constructs were used to complement *mkkk20-1* and *mkk3* mutant lines respectively, using the floral dip method as described previously (Zhang et al. 2006c). Positively transformed lines were selected using the above-mentioned protocol

(Harrison et al. 2006), verified by PCR (data not shown) and confirmed by western blotting using an anti-His antibody (Supplemental Figure 7).

### **2.2.8 Immunofluorescence microscopy**

Mutant and wild type seedlings were fixed for immunolabelling as described in (Collings et al. 2006). Briefly, five-day-old seedlings were fixed in PME solution (50 mM Pipes, pH7.2, 2 mM EGTA, 2 mM MgSO<sub>4</sub>) containing 0.1% Triton X-100, 2 mM PMSF and 400 μM maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester (MBS), 4% formaldehyde and 1% glutaraldehyde. Seedlings were washed three times for 20 min with PME solution, incubated for 1 hour in PME with 1% Triton X-100 and washed again with PME solution. Cells were subsequently digested with 0.05% (w/v) Pectolyase Y-23 (Kikkoman, Japan) in PEM buffer in 0.4 M mannitol for 20 min, rinsed in PEM buffer three times, cooled to -20°C in methanol for 10 min, and rehydrated in phosphate-buffered saline (PBS) for 10 min. Seedlings were then incubated for 20 min in 1 mg/ml NaBH<sub>4</sub> in PBS to reduce the autofluorescence caused by glutaraldehyde, followed by 30 min incubation in 50 mM glycine in PBS. Prepared seedlings were incubated with a mouse anti- $\alpha$ -tubulin primary antibody (1/1000; Sigma-Aldrich), and rabbit anti-mouse IgG:Alexa Fluor 488 secondary antibody was used for detection. Roots were mounted in Citifluor AF2 anti-fade (Alltech, Sydney, Australia). Confocal imaging was performed using a 100x NA 1.4 oil-immersion objective with a Zeiss LSM 510 microscope, irradiating with the 488 nm line from an argon laser (505–530 nm emission filter) (Zeiss, Canada).

## **2.3 Results**

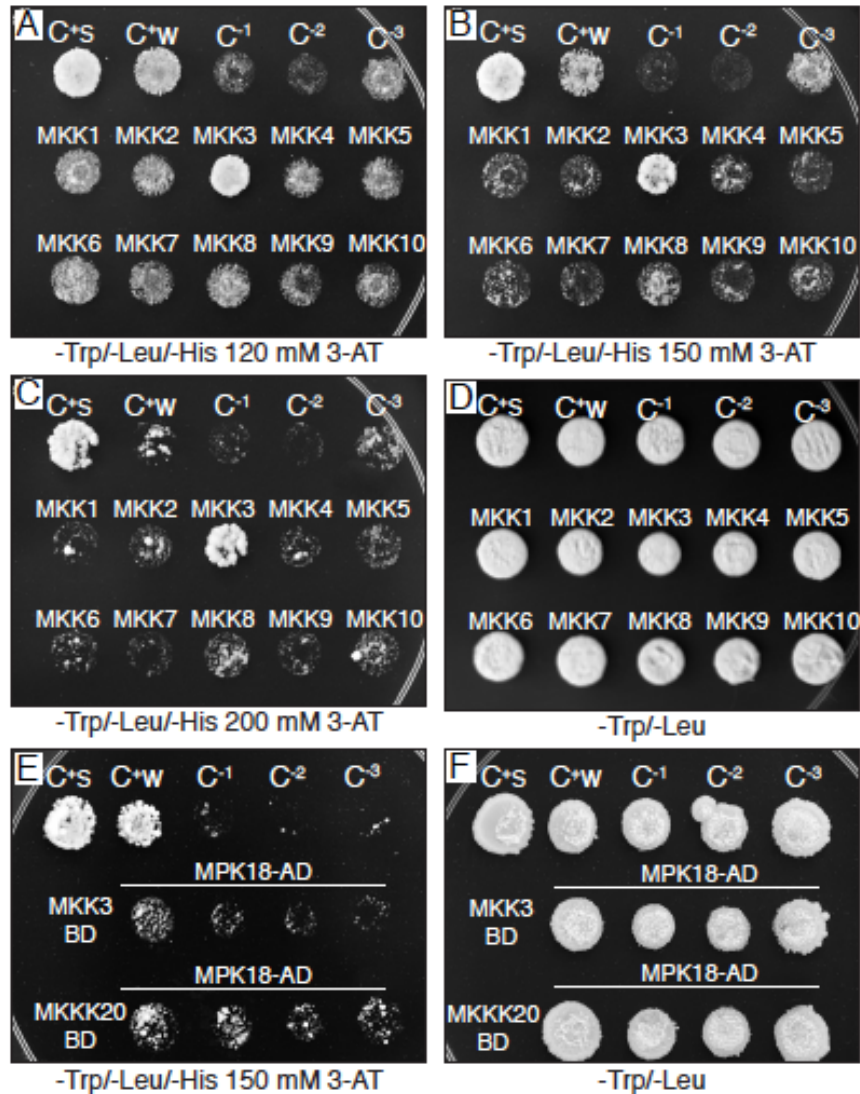
### **2.3.1 MKKK20 Y2H screen**

Two Y2H screens were performed to identify possible MKKK20 interacting proteins and candidate substrates. First, a global Y2H screen was performed using MKKK20 as bait against a normalized *Arabidopsis thaliana* cDNA library (prey library) made from RNAs extracted from 11 tissues, including etiolated seedlings, seedlings with roots, open flowers, flower buds from different stages, pollen, siliques from all stages, stems and leaves. A two-step screen was performed. After mating, diploid yeast cells were selected based on their ability to grow on a -

Leu/-Trp media that also contained Aureobasidine A (AbA), an antibiotic toxic to yeast (*AURI-C* gene reporter) and X- $\alpha$ -Gal (*MEL1* gene reporter). Both reporters are activated in response to two-hybrid interactions. This led to the isolation of 422 blue colonies. These colonies were then grown on a medium that used the four available reporters simultaneously (*HIS3*, *ADE2*, *AURI-C*, *MEL1*). This decreased the number of MKKK20 putative interactants to 72 unique candidates. Interestingly, of these 72 candidates (Supplemental Figure 2.1), 10 were involved in cytoskeletal and cell wall functions; eight were transcription factors; four were linked to reproduction; two were protein phosphatases, and one was a Ca<sup>2+</sup>-binding C2 domain protein. Six protein kinases were also retrieved, including five receptor kinases (four RLKs and one RLCK), as well as one MAPK, MPK18.

### 2.3.2 MKKK20 interacts directly with MKK3 and MPK18

In a canonical MAPK cascade, sequential phosphorylation and activation events activate the kinase members of the module. Thus, the upstream MKKK phosphorylates and activates the MKK, which in turn phosphorylates and activates the MPK. The absence of a MKK interactor in our MKKK20 global screen prompted us to screen all 10 *Arabidopsis* MKKs against MKKK20. In a directed pair-wise yeast two-hybrid screen, only MKK3 was found to strongly interact with MKKK20 under stringent conditions (Figure 2.1A-C). Although MKKK20 physically interacted with MPK18 in the previous Y2H systems, MKK3 might also interact with MPK18, as would be expected in a canonical MAPK cascade. However, the pair-wise Y2H interaction between MKK3 and MPK18 was much weaker than that detected between MKKK20 and MKK3 (Figure 1E). To confirm the pattern of *in vivo* physical association between MKKK20, MKK3 and MPK18, bimolecular fluorescence complementation (BiFC) assays were performed in onion leaf epidermal cells. A clear YFP signal was detected in both the nucleus and the cytoplasm when MKKK20 and MKK3 were bombarded together (Figure 2.2A,B), as well as for MKKK20 and MPK18 (Figure 2.2C,D). However, no signal was detected with the MKK3-MPK18 BiFC assay, consistent with the result obtained from the Y2H screen. The *Arabidopsis* bZIP63 transcription factor was used as a positive control (Figure 2.2E, F) (Walter et al. 2004).

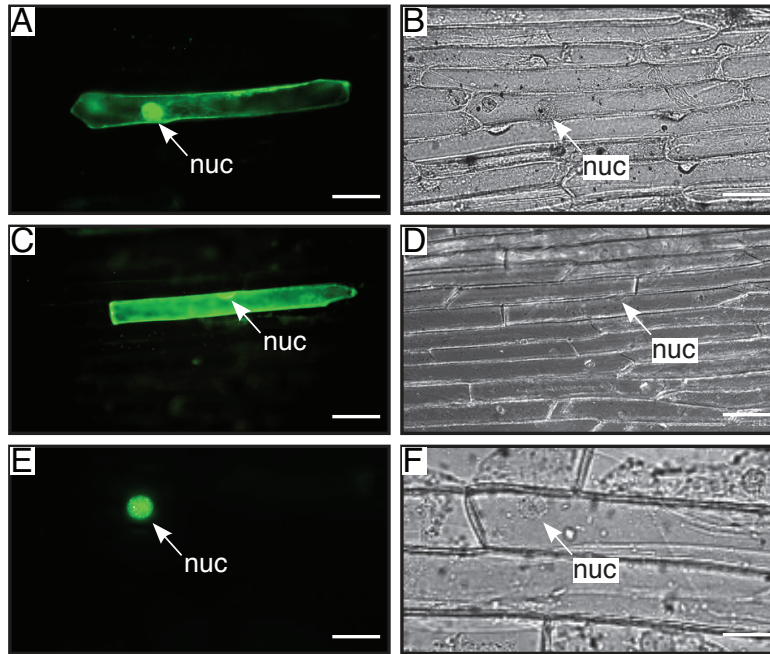


**Figure 2.1. MKKK20/*At*MKKs and MKK3/MPK18 interactions tests.**

A-D; MKKK20/*At*MKKs interaction screen. MEKK20 interacts specially with MKK3. All kinases were cloned and sequence-verified prior to their transfer into Gateway™ yeast two-hybrid bait and prey vectors (pDEST32 and pDEST22 from Invitrogen™). The clones MEKK20 (in pDEST32 vector) as GAL4 DNA-Activating-Domain (DBD) and *At*MKKs (in pDEST22 vector) as GAL4-Activating-Domain (AD) were introduced pairwise into the yeast strain, MaV203. We used interaction controls provided with the kit according to the manufacturer's instructions (ProQuest; Invitrogen). Interaction strength for HIS3 and URA3 activation assays was scored visually comparing to the controls. C<sup>s</sup>: pEXP™32/Krev1/pEXP™22/RalGDS-wt as strong positive interaction control. C<sup>w</sup>: pEXP™32/Krev1/pEXP™22/RalGDS-m1 as weak positive interaction control. C<sup>-1</sup>: pEXP™32/Krev1/pEXP™22/RalGDS-m2 as negative interaction control. C<sup>-2</sup>: pDEST™32/pDEST™22 as negative activation control. C<sup>-3</sup>: pDEST™32/pDEST™22 as negative activation control; baseline.

E-F; MKK3 interacts weakly with MPK18. MKK3 cloned as DBD and MPK18 as AD.

The same controls following the ProQuest (Invitrogen) instruction, we keep the same above controls except C<sup>-2</sup> as negative activation control for MKK3 and C<sup>-2</sup> as negative activation control for MPK18.



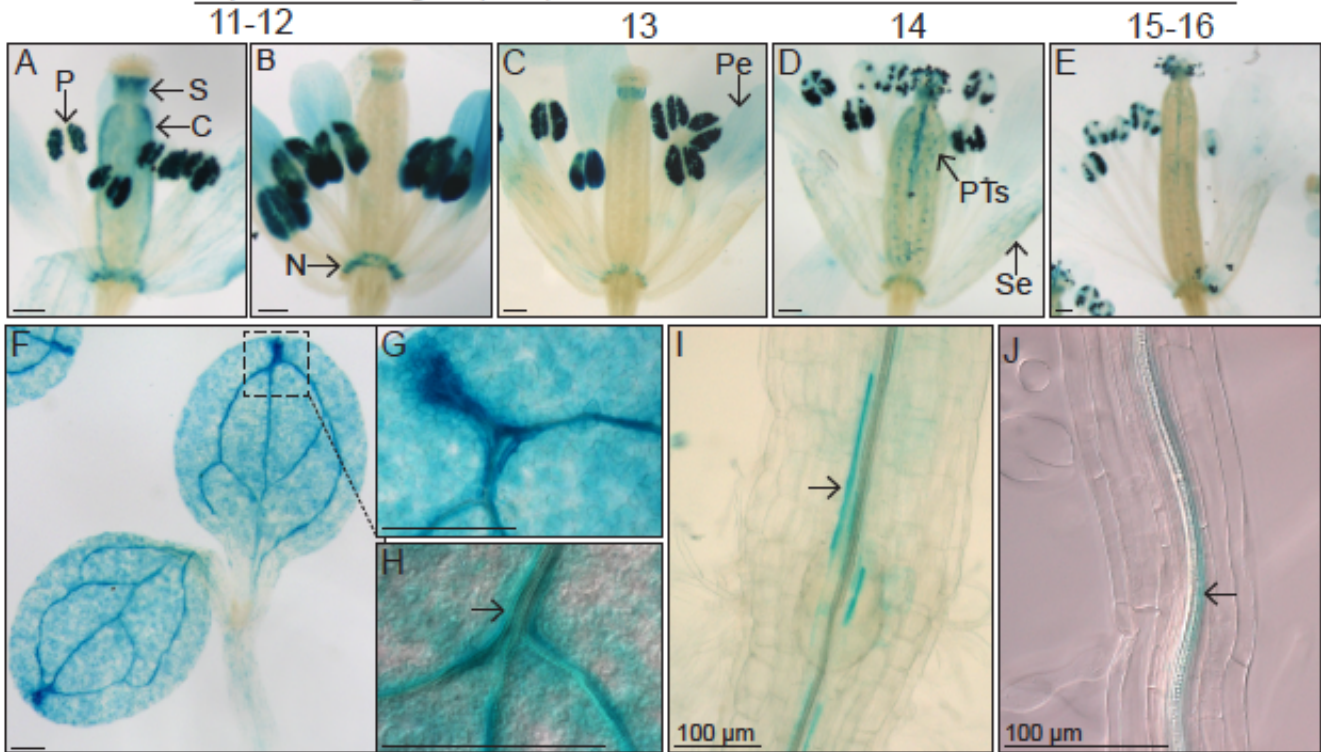
**Figure 2.2. BiFC Kinases interaction assays.**

BiFC visualization of MEKK20, MPK18 and MKK3 dimerization in onion epidermal cells. Fluorescent (A,C,E) and bright field (B,D,F) images of epidermal leaf onion cells cotransformed by vectors harbouring split YFP and different kinase pairs: MKKK20/MKK3 (A,B) and MKKK20/MPK18 (C,D). Microparticle bombardments were observed under fluorescent microscope. The kinases full-length cDNAs were cloned either into BiFC vectors pUC-SPCE or modified BiFC vector pUC-SPNE, which represents the two half of YFP as, described in (Walter et al. 2004). bZIP transcription factors were used as positive controls for BiFC (E,F).

### 2.3.3 Expression pattern of *MK*KK20, *MK*K3 and *MP*K18

RT-PCR analyses from various *Arabidopsis* tissues were conducted to determine the extent of co-expression of *MK*KK20, *MK*K3 and *MP*K18. Supplemental Figure 2.2 shows that all three kinases were ubiquitously expressed in the selected tissues, albeit to different degrees. This was confirmed through bioinformatics analyses from publicly available microarray data resources (<https://genevestigator.com/gv/>; BAR, <http://bbc.botany.utoronto.ca>), which showed that, under normal conditions, all three kinases are weakly expressed in all tissues (data not shown). *MP*K18 and *MK*K3 tissue-specific gene expression was previously investigated using histochemical analysis with the GUS reporter gene under the control of their respective promoters. GUS expression was detected in all major tissue types for *MP*K18 including roots, leaf vasculature, guard cells and stigma (Walia et al. 2009). Likewise, *MK*K3 was detected in all major tissues (stems, leaves, roots, flowers), with higher GUS activity in the vasculature, stipules, nectaries and root tips (Lampard 2006). For *MK*KK20, transgenic plants were generated to express the GUS reporter gene under the control of a 1.5 kbp promoter sequence upstream of the *MK*KK20 translation start site. Identical GUS staining patterns were observed in numerous T0 and T1 transgenic lines. Visualization of GUS expression during flower development revealed strong expression in pollen grains (P) increasing from young buds to later stages of maturation (Figure 2.3A-E), more specifically stages 11 to 16. *MK*KK20 is also expressed to a lesser extent in the gynoecium, particularly in the style (Figure 2.3A-D) and carpel (C) (Figure 3A and D), but not in the stigma regardless of its developmental stage. *MK*KK20 is also expressed in nectaries (N), petals (Pe) and sepals (Se). Expression was also detected in the pollen tube (PT) (Figure 2.3D). Vascular tissue expression was remarkably strong when compared to the weak expression detected in some epidermal cells (Figure 2.3I,J). To further the tissue-specific expression analysis, subcellular localization of the three kinases was also examined. Under control of the CaMV 35S promoter, *MK*KK20, *MK*K3 and *MP*K18 coding sequences were fused at the N-terminal to the GFP reporter gene and examined following transient expression in onion leaf epidermal cells using microparticle bombardment. All three kinases were observed both in the cytoplasm and the nucleus (Supplemental Figure 2.3), a subcellular localization pattern identical to that determined previously through BiFC (Figure 2.2).

### Flower developmental stages (A-E)



**Figure 2.3. MKKK20 expression pattern by GUS reporter gene.**

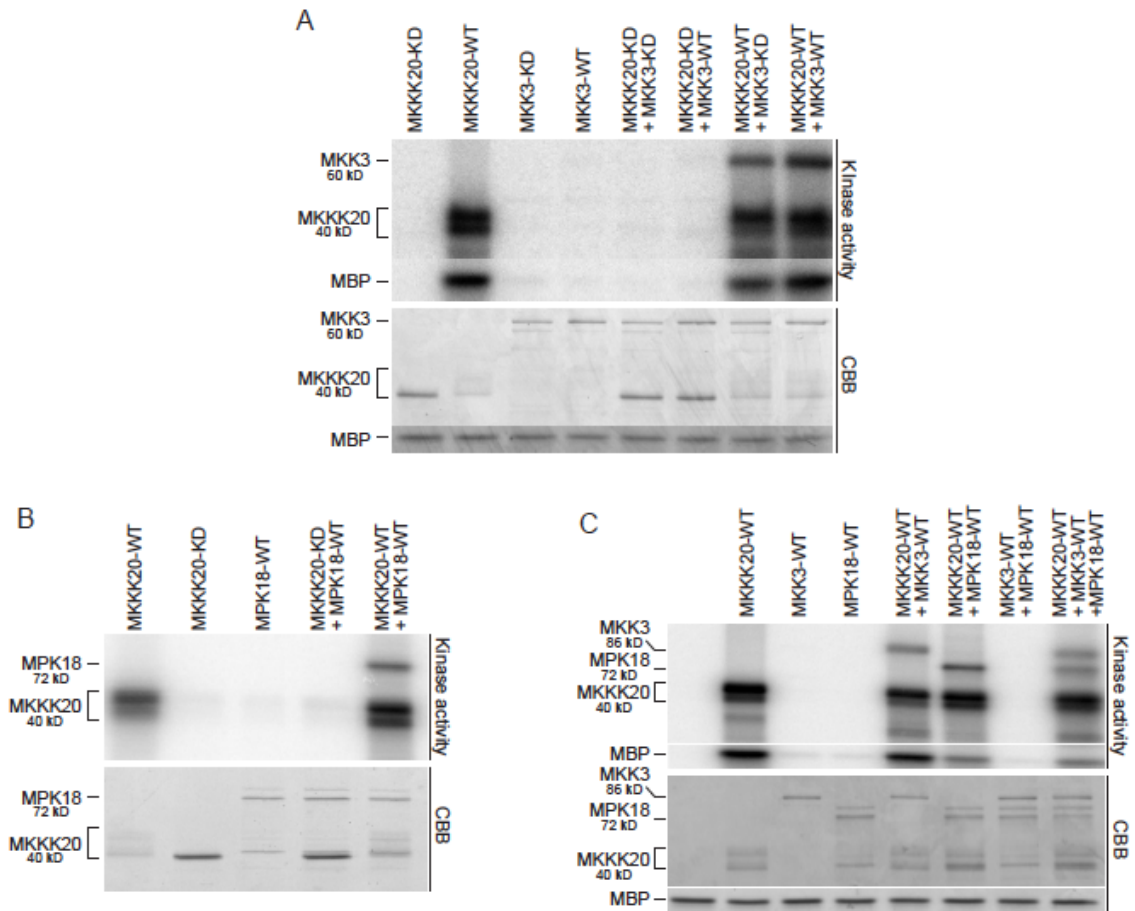
GUS reporter gene expression under the control of the *MKKK20* promoter in flower buds staged according to Smyth et al. (1990), and in seedlings.

Staining is strong in pollen of maturing flower (A to E). This expression tends to become stronger between stage 11 (A) and anthesis (D). Global visualization of flower development, after manual opening, confirmed that pollen grains (P) exhibit a strong expression of *MKKK20*, in addition to carpel (C), style (S), nectaries (N), petals (Pe) and sepals (Se), the two later with less intensity (A-E). While the pollen expression last after pollination in pollen tube (PT), staining decreases in the others flower organs. Weak expression can be detected in some epidermal cells (G, H), but the tissue-specific expression is largely restricted to the vascular tissues. Expressed in companion cells of phloem tissues of leaves and roots (I, J). Scale bar: 200 μm, except where indicated.

### 2.3.4 MKKK20 phosphorylate both MKK3 and MPK18 in vitro

Full-length MKKK20, MKK3 and MPK18 cDNAs were cloned, and the encoded proteins were expressed and purified as recombinant His- or His-GST-tag kinases in an *Escherichia coli* system. Their kinase activity was measured in both in-tube and in-gel kinase assays. Firstly, kinase autophosphorylation activity and ability to phosphorylate the myelin basic protein (MBP) generic substrate were tested. Unlike the MKK3 (Figure 2.4A, C) and MPK18 (Figure 2.4B, C) proteins, MKKK20 strongly autophosphorylates and phosphorylates MBP (Figure 2.4A). Interestingly, migration on SDS-PAGE gels of bacterially expressed MKKK20 revealed the presence of two major MKKK20 isoforms (lower (L) and higher (H)) (Figure 2.4A-C and Supplemental Figure 2.4A). Differences in phosphorylated residues could explain the migration shift of the various MKKK20 phospho-isoforms in SDS PAGE gels (Figure 2.4A-C and Supplemental Figure 2.4A). To test this, LC-MS/MS sequencing of the two major MKKK20 protein bands was conducted. The two major isoforms showed slight differences in total number of phosphorylated sites as well as in their position (Supplemental Figure 2.4B). When the MKKK20 was incubated with the nonspecific calf intestine alkaline phosphatase (CIP), only a single low MW isoform was detected, confirming that the multi-band pattern from the bacterially expressed MKKK20 is due to differential levels of phosphorylation among the isoforms (Supplemental Figure 2.4-C). Furthermore, the bacterially expressed 'kinase dead' version of MKKK20 did not show any signs of autophosphorylation in the kinase domain, and only one phosphorylated residue was found in the C-terminal non-catalytic domain, probably the result of phosphorylation by bacterial kinases (Supplemental Figure 2.4B). MKKK20 kinase activity is also heavily dependent on its phosphorylation status since its dephosphorylation by CIP greatly weakened its activity toward MBP (Supplemental Figure 2.4C). Furthermore, the MKKK20 H isoform consistently exhibits higher autophosphorylation activity (Figure 2.4A-C) and greatly increased activity toward the generic substrate MBP (Supplemental Figure 2.4C).



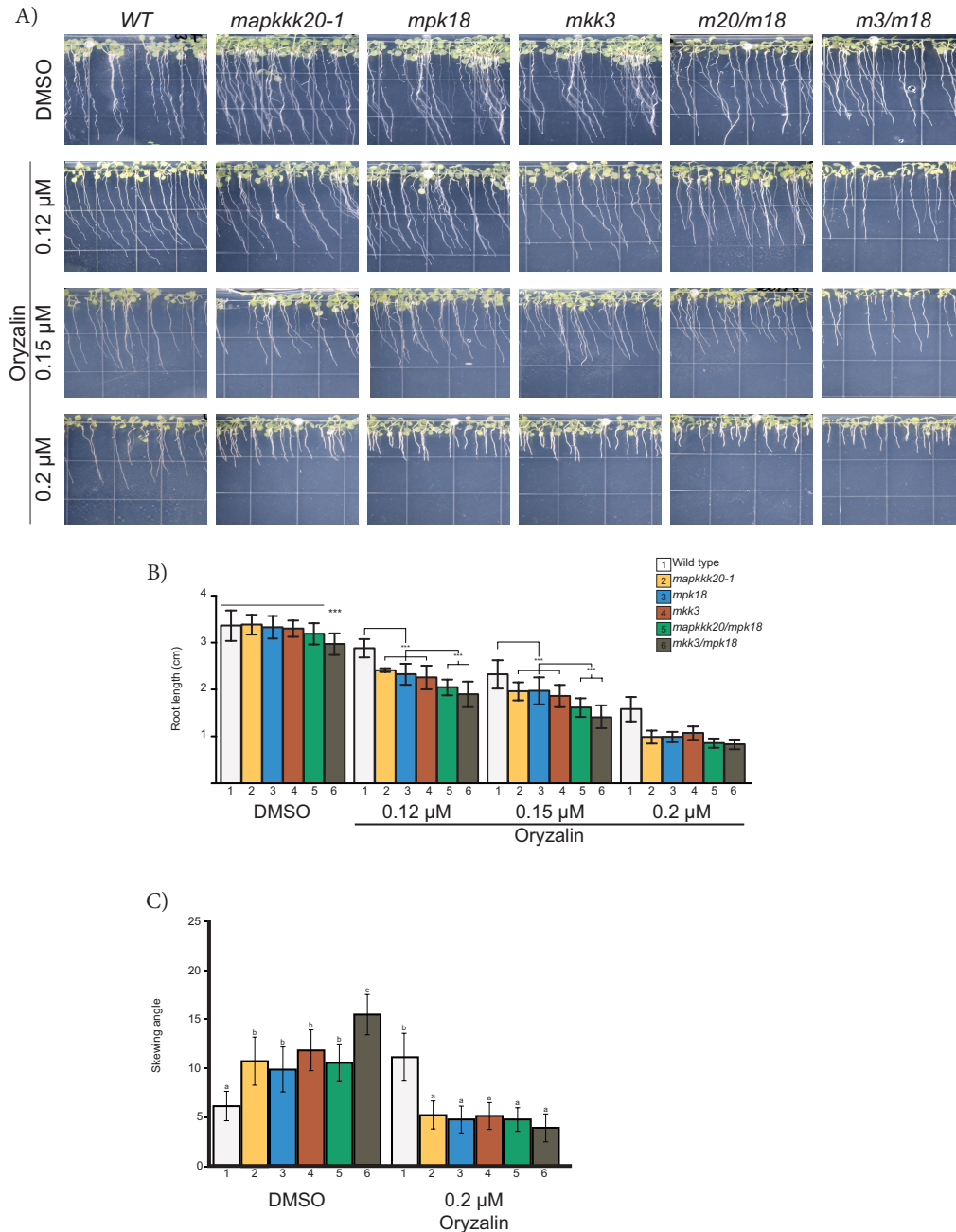


**Figure 2.4. MKKK20 function upstream of both MAPK18 and MKK3.**

*In vitro* kinase assay of recombinant MKKK20/MKKK20<sup>KD</sup> activity with or without MKK3 (A), or MPK18 (B), and with the three kinases combined (C). All 6xHis-tagged proteins were expressed in bacteria and purified on Ni-NTA Sepharose columns. Two MKK3 constructs were used: in (A) 6xHis-MKK3 and in (C) 6xHis-GST-MKK3. Protein mixes were incubated in kinase assay buffer with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP. MBP was used as a universal substrate to assess kinase activity. The bottom panel shows the Coomassie Brilliant Blue-stained SDS/PAGE. WT: wild type kinase, KD: kinase dead, CBB: Coomassie Brilliant Blue.

### 2.3.5 Single *mkkk20* and *mkk3* mutant are sensitive to microtubule-disrupting drugs

Since it had been reported that *mpk18* mutant seedlings showed defects in microtubule-related functions (Walia et al. 2009), we investigated whether *MKkk20* and *Mkk3* could be involved in the same biological process. To do so, we used T-DNA insertional lines for the three designated kinases *mkkk20-1*, *mkkk20-2*, *mkk3-1* and *mpk18-1*. Both *mkkk20* T-DNA insertion lines as well as *mkk3-1* and *mpk18-1* were considered null alleles since no mRNA could be amplified by RT-PCR analyses (data not shown). When all mutant plants were morphologically analyzed and compared to *Arabidopsis* wild-type plants, no obvious defects were observed at any developmental stage under normal growth conditions. However, seedling roots of both mutants were differentially twisted and significantly shorter than wild type when they were grown under low doses of the microtubule-disrupting drug oryzalin (Figure 2.5). Both root twisting (or skewing) and root elongation are generally linked to microtubule organization and stability (Baskin et al. 1994; Thitamadee et al. 2002). A moderate increase in microtubule stability in oryzalin-treated *mpk18* seedlings negatively affects cell elongation, resulting in a shorter root compared to oryzalin-treated WT plants (Walia et al. 2009). The same phenotype was observed for *mkkk20-1* and *mkkk20-2* (Supplemental Figure 2.5; in subsequent experiments only *mkkk20-1* was used), as well as for *mkk3*. Close observations of cell shape at the elongation zone showed that all these mutants had a wider root than does WT (Supplemental Figure 2.6). In addition, we observed a relative reduction of the length of this zone, most obviously for *mkkk20-1*, with or without oryzalin treatment (Supplemental Figure 2.6). Functional complementation of *mkkk20* and *mkk3* plants was accomplished by plant transformation through agro-infiltration of constructs of *MKkk20* and *Mkk3* encoding C-terminal His-tagged proteins in their respective mutant plants (Supplemental Figure 2.7A, B). Wild-type root length was also restored for both complemented mutants in oryzalin tests (Supplemental Figure 2.7C).



**Figure 2. 5. Absence of MKKK20 and MKK3 affects microtubule-related function in plant cell.**

Root length of 8-day-old wild-type, single mutant *mkkk20-1*, *mkk3*, *mpk18* and double mutant *mkkk20/mpk18*, *mkk3/mpk18* seedlings grown on DMSO and various concentrations of oryzalin.

A) Whole seedlings were grown vertically in Hoagland medium solidified with 1.2% Agar with different oryzalin concentrations. Root length and skewing angle are shown.

B) Treatments with 0.12, 0.15 and 0.2 μM oryzalin significantly reduced the length of all mutant roots compared to the wild-type, based on One-Way ANOVA multiple comparison with Tukey's test. \*\*\*p < 0.001 for all treatments. Data represent means ± SD (n ≥ 30). Significant reductions, if any, in root length between single and double mutants are also indicated.

C) Skewing angle of 6-day-old WT and *mkkk20-1*, *mpk18*, *mkk3*, *mkkk20/mpk18* and *mkk3/mpk18* roots. Oryzalin (0.2 μM) treatment induced significantly lower root-skewing angle in all mutants comparing to the wild type. Results are expressed as means ± SD (n ≥ 28).

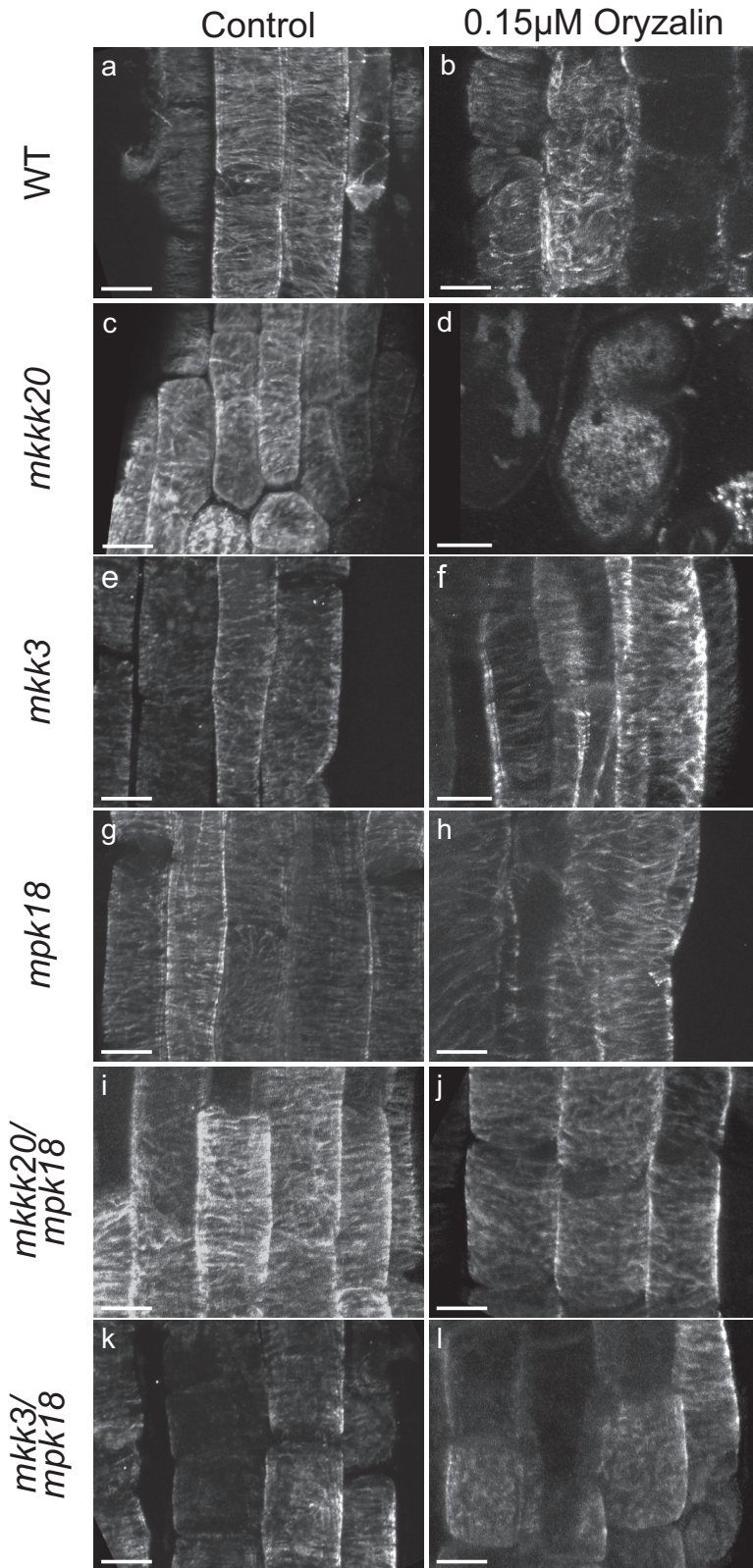
### **2.3.6 Cortical microtubule orientation and organization are affected in *mkkk20* and *mkk3* roots**

In order to verify that the *mkkk20* and *mkk3* root phenotypes are associated with microtubule dysfunction, we examined microtubule organization more closely. Left-handed helical growth is usually related with microtubule instability (Thitamadee et al. 2002). As expected, immunolocalization of  $\alpha$ -tubulin in root epidermal cells around the transition zone (between the division and elongation zones) revealed microtubule stability defects in the different mutants under normal growth conditions when compared to WT plants (Figure 2.6). Cortical microtubules in WT root cells grown in control medium displayed the classical horizontal conformation (perpendicular to the elongation axis) (Figure 2.6A). Optimal cell growth also relies on the homogeneous distribution of microtubules throughout the cell, and WT cortical microtubule bundles were evenly distributed throughout the root cells with little background noise. Overall, cortical microtubules in *mkkk20* and *mkk3* seedlings remained perpendicular to the growth axis when grown on control growth medium. However, more randomly aligned microtubules were also observed. Microtubules in mutant root epidermal cells were also more infrequent and sparse on the cell surface. Addition of oryzalin to growth media is known to disrupt microtubule dynamics by binding to tubulin monomers, thereby inhibiting polymerization (Strachan and Hess 1983). This results in fewer microtubule bundles, as revealed by a less intense and more diffuse fluorescence signal and this was observed in WT cells in the presence of 0.15  $\mu$ M oryzalin (Figure 2.6B). Although we could still detect some polymerized microtubules in WT roots, *mkkk20* cells grown under the same conditions were drastically affected. Indeed, these cells displayed mostly broken and irregular microtubule filaments (Figure 2.5D). On the other hand, *mkk3* and *mpk18* microtubules were less affected since relatively well-aligned microtubules were still visible in roots treated with 0.15  $\mu$ M oryzalin (Figure 2.5F-H).

### **2.3.7 Double mutants were differentially sensitive to oryzalin**

Since *MKkk20*, *MKK3* and *MPK18* single mutants all showed defects in MT organization and

orientation, we undertook analysis of double and triple mutants, to further explore the relationship between these kinases and MT functionality. When all single mutants were reciprocally crossed to each other, only the offspring of the *mkkk20/mkk3* double mutant were unviable. The other two double mutants, *mkkk20/mpk18* and *mkk3/mpk18*, were fully viable. Seeds from the single and double mutants as well as from WT plants were then grown on media with various concentrations of oryzalin and examined for root growth defects. Both double mutants displayed significantly shorter roots compared to all other mutants in the presence of 0.12  $\mu\text{M}$  and 0.15  $\mu\text{M}$  oryzalin, while *mkk3/mpk18* root length was affected even without the drug (Figure 2.5). Cortical microtubule arrays in root cells throughout the transition zone of the double mutants showed a classical horizontal conformation, aligned perpendicular to the elongation axis and well organized (Figure 2.6I, K), although *mkk3/mpk18* microtubule arrays seemed to be slightly more disoriented. The addition of oryzalin revealed differences between the two double mutants. The *mkk3/mpk18* double mutant displayed an immunofluorescence pattern similar to *mkkk20*, in which only broken and irregular microtubules filaments were observed (Figure 2.6J). The *mkkk20/mpk18* double mutant, on the other hand, displayed a pattern more similar to *mpk18* and *mkk3* single mutants (Figure 2.6L).

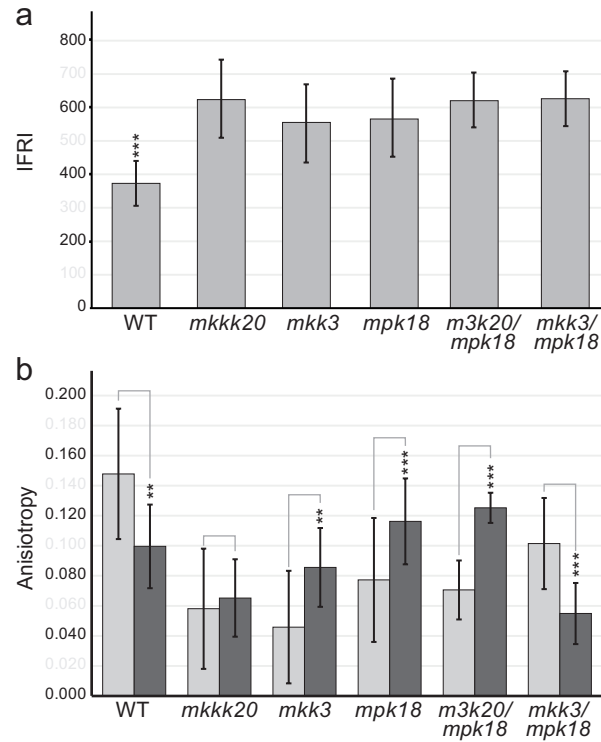


**Figure 2.6. Microtubule structure by Immunolocalization of  $\alpha$ -tubulin .**

Immunolocalization as observed through confocal microscopy of  $\alpha$ -tubulin in root cells around the transition zone of 6-days-old seedlings of wild type (A-B) and mutants; *mkkk20* (C-D), *mkk3* (E-F), *mpk18* (G-H), *mkkk20/mpk18* (I-J) and *mkk3/mpk18* (K-L). Seedlings were grown on 1/2 MS control medium (with 1% DMSO) or on medium containing 0.15 $\mu$ M oryzalin. Identical microscopy parameters were used for all observations (pinhole of 300  $\mu$ m, BP filter 505-530 and wavelength 12,0%). Scale bar: 10 $\mu$ m.

### 2.3.8 Microtubule density and alignment in the absence of MKKK20, MKK3 and MPK18

We used two approaches to further quantify the effects of mutations on microtubule organization. First, in each cell's background we measured the immunofluorescence relative intensity (IFRI), which is proportionally correlated to microtubule polymer density, taking into consideration that all confocal immunolabeling photos were taken under the same conditions (pinhole of 300  $\mu\text{m}$ , BP filter 505-530 and wavelength 12.0%). In addition, we quantified the average orientation or anisotropy of MT arrays using FibrilTool, an ImageJ plug-in (Boudaoud et al. 2014). In 0.15  $\mu\text{M}$  oryzalin-treated material, the MT density calculated by IFRI was less in the WT background ( $374.6 \pm 13.24$ ) than in all other mutants, which ranged from  $560 \pm 21.53$  for *mpk18* to  $630.9 \pm 17.87$  for *mkk3/mpk18* (Figure 2.7A). When microtubule alignment was more closely investigated using FibrilTool, a significantly lower anisotropy was calculated for all mutant genotypes versus WT plants under control conditions. A mean of  $0.148 \pm 0.011$  was calculated for the WT, while mutants were at least two times less well aligned (between  $0.046 \pm 0.008$  and  $0.077 \pm 0.008$ ;  $p < 0.0001$ ) (except *mkk3/mpk18* that is around 30% less,  $0.102 \pm 0.007$ ;  $p < 0.0001$ ) (Figure 2.7B). Alignment values for the microtubules were also affected by the addition of oryzalin to growth media, which resulted in a lower calculated anisotropy ( $0.10 \pm 0.008$ ) for WT cells. While *mkkk20* anisotropy under oryzalin treatment conditions was similar to that seen under control conditions ( $0.065 \pm 0.007$ ), *mkk3* and *mpk18* cells showed longer microtubules and increased homogeneity with oryzalin. Alignment was also greater when compared to control conditions ( $0.085 \pm 0.006$  for *mkk3* and  $0.116 \pm 0.006$  for *mpk18*). Double mutant *mkkk20/mpk18* cells contained relatively long, stable and well-aligned microtubules ( $0.125 \pm 0.002$ ). In contrast, microtubule alignment in the *mkk3/mpk18* mutant was significantly lower in the presence of oryzalin ( $0.054 \pm 0.004$ ).



**Figure 2.7. Microtubule density and alignment in the absence of *MKKK20*, *MKK3* and *MPK18*.**

Microtubule immunofluorescence relative intensity (IFRI) and anisotropy of 6-day-old seedling root epidermal cells (transition zone) grown on 0.15  $\mu\text{M}$  oryzalin medium (dark gray) or control medium (light gray), comparing WT and mutants. .

A) IFRI per  $5 \mu\text{m}^2$  square for all backgrounds with the same confocal microscopy parameters (pinhole of 300  $\mu\text{m}$ , BP filter 505-530 and wavelength 12,0%) was calculated in ImageJ. Data represent means  $\pm$  SD ( $n \geq 25$ ).

B) Anisotropy score's were calculated with FibrilTool (Boudaoud et al. 2014). Scoring follows the convention: 0 for no order and 1 for perfectly ordered fibrils. Data represent means  $\pm$  SD ( $n = 15-30$ ). Student's T test was used to calculate p-value. Grey color for control conditions and dark grey for 0.15  $\mu\text{M}$  oryzalin treatments



## 2.4 Discussion

Among the 21 *Arabidopsis* MEKKs, MKKK19, -20 and -21 form a highly supported clade within the MEKK family. This clade, named the Fertilization-Related Kinases (FRKs) from the first three characterized members (*ScFRK1*, -2 and -3), has expanded considerably in Solanaceous species (Daigle and Matton, 2015) which includes potato and tomato. In these species, the FRK clade represents about 40% of all MEKKs, compared to 14% in *Arabidopsis*. While the role of these three *Arabidopsis* kinases is largely unknown, the three characterized Solanaceous FRKs showed a clear involvement in male and female reproductive development (Gray-Mitsumune et al. 2006; O'Brien et al. 2007; Lafleur et al. 2015; Daigle and Matton 2015). Here, we employed genetic and biochemical tools in order to study the biological significance of the *A. thaliana* MKKK20. Surprisingly, although *MKKK20* is strongly expressed in pollen (Figure 2.3), no obvious reproductive phenotype was observed in the loss-of-function mutant. Instead, *MKKK20* single mutants showed a clear defect in MT functions.

Our screen for MKKK20 interacting partners revealed a strong and robust association with MPK18 a result that suggested the operation of an atypical MAP kinase pathway that bypasses MKKs. Other MKKKs have been shown to interact with proteins other than MKKs. For example, *AtMEKK1* can not only interact with, and phosphorylate, the transcription factor WRKY53, but can also bind to the promoter region of the WRKY53 gene in order to increase its relative expression (Miao et al. 2007). Although not considered a MEKK, the Raf-like Constitutive Triple Response1 MKKK (CTR1) interacts with and directly phosphorylates Ethylene-insensitive 2 (EIN2), which is not a MAPKK (Ju et al. 2012). In alfalfa, the MKKK OMTK1 (oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1), which is activated by hydrogen peroxide, interacts directly with the MMK3 MAPK, thus bypassing the need for an intermediate MKK (Nakagami et al. 2004).

*Arabidopsis* MPK18 had previously been shown to mediate cortical microtubule function (Walia et al. 2009). A loss-of-function mutation in *mpk18* results in more stable microtubule arrays and *mpk18* roots displayed more abundant and better co-aligned microtubule polymers in their elongation zones as a result of MT dynamic instability problems (Walia et al. 2009). When we treated the *mkkk20* mutant with oryzalin, we observed that the seedling root length was significantly diminished compared to the similarly treated wild type. This phenotype was

similar to that of *mpk18*, indicating that both MKKK20 and MPK18 could be participating in a MAPK signaling pathway that mediates cortical microtubule function. We then explored the possible involvement of a MKK in this cascade. A directed pairwise yeast two-hybrid assay revealed that, among the 10 AtMKKs, MKK3 showed by far the strongest interaction with MKKK20. In addition, *mkk3* mutant roots, like *mkkk20* and *mpk18*, were significantly shortened when treated with oryzalin. Thus, our results are consistent with the operation of a signaling cascade involving MKKK20 and MKK3. Interestingly, Sun et al., demonstrated that the *Brassica napus* MKKK20 (*BnaMKKK20*), an orthologue of *AtMKKK20*, interacts strongly with *BnaMKK3*, an orthologue of *AtMKK3* in both two-hybrid analysis and BiFC experiments (Sun et al. 2014). However, when we checked for an interaction between MKK3 and MPK18 in two-hybrid assays, this proved to be very weak compared to the MKKK20-MKK3 interaction (Figure 2.1). An earlier directed two-hybrid screen of all *Arabidopsis* MKKs and MPKs, also detected no interaction between MKK3 and MPK18 (Lee et al. 2008), and the weak interaction we observed between MKK3 and MPK18 was not validated by the BiFC assay or by the phosphorylation assay (Figure 2.4).

Experimental evidence from both genetic and biochemical (pharmacological) studies thus suggests involvement of MKKK20, MKK3 and MPK18 in cortical microtubule function in *Arabidopsis* cells, but how could these three kinases be exerting their influence? Kinase activity assays demonstrated that MKKK20 phosphorylates both MKK3 and MPK18 equally well (Figure 2.4), whereas no phosphorylation was observed when MKK3 and MPK18 were incubated together. When all three kinases are present, MKKK20 phosphorylates MKK3 and MPK18, but the presence of MKK3 does not result in any obvious increase in MPK18 phosphorylation. Thus, the evidence suggests that MPK18 is not a *bona fide* MKK3 target, and that the pattern of activation of these kinases is an exception to the canonical MAPK signaling pathway. As noted above, this is not without precedent. Indeed, three characterized *Nicotiana* MAPKKs (*NbMAPKK $\alpha$* , *NbMAPKK $\beta$*  and *NbMAPKK $\gamma$* ) were found to form a linear cascade leading to programmed cell death in tobacco cells (Hashimoto et al. 2012).

Our results from *mkkk20* and *mkk3* treatments with the microtubule depolymerizing drug oryzalin, combined with microtubule immunolabeling observations, suggest that these kinases may play a role in the stabilization of cortical microtubule arrays. Such a role was earlier

reported for *mpk18* (Walia et al. 2009). It has been repeatedly demonstrated that altering microtubule array formation during cell elongation leads to a root skewing and twisting phenotype (Sedbrook and Kaloriti 2008). Drugs that affect microtubule function (oryzalin, propyzamid) as well as many microtubule-interacting proteins can generate such phenotype (Oliva and Dunand 2007) although the underlying mechanism(s) remain obscure. Observation of microtubule organization in *mkkk20* and *mkk3* seedlings revealed a pattern of hyper-stabilization and increased density, as was earlier seen with *mpk18* (Walia et al. 2009). Microtubule dynamics therefore may be compromised in the absence of *MKkk20* and *MKK3*, resulting in relatively increased root skewing in control media as well as reduced root growth in the presence of oryzalin.

On the other hand, our two-hybrid analysis and kinase assays demonstrate that *MKkk20* interacts with and phosphorylates both *MKK3* and *MPK18*. However, since no interaction or phosphorylation was observed between *MKK3* and *MPK18*, it appears that the three kinases act through two independent pathways. The first might represent a canonical MAPK cascade, consisting of *MKkk20*, *MKK3* and an as yet-unknown MAPK, while the second would be a non-canonical MAPK cascade in which *MKkk20* and *MPK18* interact directly, thus bypassing the need for a *MKK* intermediary. *MKkk20* could therefore activate *MKK3*, which could in turn target downstream MAPKs (other than *MPK18*) that are involved in microtubule function. Alternatively, *MKkk20* could directly interact with *MPK18* and activate other target(s) (e.g. MAPs), which modulate microtubule function. Regarding the first pathway, two MPKs involved in MT function have been found to interact with *MKK3*: *MPK4* and *MPK6* (Popescu et al., 2009). *MPK4* acts downstream from two *MKkk*s (*ANP1-2*; also known as *MKkk1* and *MKkk2*) involved in microtubule organization (Beck et al. 2010; Beck et al. 2011). In addition, *MPK4* phosphorylates the microtubule-associated proteins *AtMAP65-1* and *AtMAP65-2*, which are two structural components of microtubule arrays involved in cell division (Sasabe et al. 2011), and possess canonical serine/threonine-proline MAPK phosphorylation sites. *MPK6* has been functionally linked to MTs since it localizes to the plasma membrane and is involved in root development and cell division control (Muller et al. 2010). *MPK6* has been also shown to interact with  $\gamma$ -tubulin and the MT plus end protein *EB1* (Kohoutova et al. 2015). Thus, both *MPK4* and *MPK6* represent good candidates for completing the proposed *MKkk20/MKK3* module, which is involved in MT regulation. It is

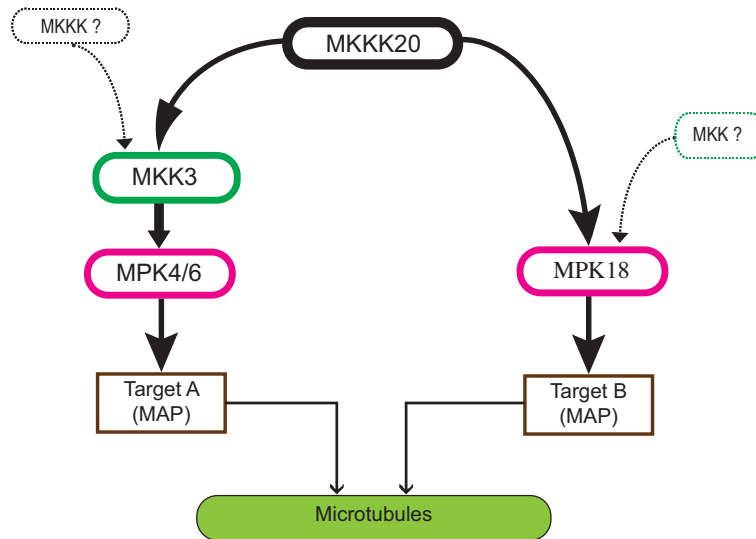
worth to mentioning that *At*MKK3 plays an essential role in the activation of MPK6 by the phytohormone jasmonic acid (JA) (Takahashi et al. 2007). Interestingly, in a large transcriptional analysis of several MAPK signaling genes represented on the ATH1 Affymetrix microarray, jasmonates were found to induce transcription of *At*MKKK20 (Menges et al. 2008). Thus, under the influence of JA, MKKK20 could potentially activate the MKK3/MPK6 cascade thereby affecting MT function, and this hypothesis is currently under investigation. Interestingly, JA treatment induced changes in the orientation of cortical MTs during potato tuberization and cell expansion, consistent with the idea that JA might control the direction of cell expansion by changing the arrangement of MTs (Koda 1997; Cenzano et al. 2003).

Two distinct processes regulate plant organ growth; production of cells and expansion. Root growth rate is determined primarily by expansion, yet is also influenced by cell division and production (Beemster and Baskin 1998). Indeed, it has been reported that the growth of *Arabidopsis* roots was accompanied by increased cell production leading to cell elongation (Baskin et al. 1995). Cortical as well as mitotic microtubules play an essential role in both elongation and division, and a wide range of MAPs (Microtubule Associated Proteins) have been associated with these developmental stages in plant cells (Hamada 2014). It has been shown that the phosphorylation state of MAPs influences microtubule stability (Drechsel et al. 1992; Mandelkow et al. 1995), and phosphorylation of MAPs leads to reduced binding to the microtubule cytoskeleton due to a reduction in MAP-microtubule affinity (Drewes et al. 1998). Our results are consistent with the idea that these potentially convergent phosphorylation-based signaling pathways play a role in controlling microtubule dynamics. The binding of specific MAPs to MTs results in structural regulation via interconnected polymerization/catastrophe events collectively referred to as dynamic instability (Hamada 2014). Some of these MAPs play crucial roles in microtubule orientation or anisotropy. Our results showed that all three mutants have a significant lower anisotropy compared to WT when grown in control media. This could be explained by a model in which some of structural MAPs (downstream of the two possible MKKK20 cascades) would now be less phosphorylated, resulting in their higher affinity for MT polymer chains (Nogales 2000), and perturbation of the normal array alignment. In the presence of oryzalin, all three single mutants showed relatively better MT array alignment, consistent with the idea that dynamic

instability is being suppressed by loss of signaling through the upstream cascades. The increased random alignment seen in the oryzalin-treated *mkk3/mpk18* double mutant could reflect the interaction of two strong elements, the absence of MKKK20 and oryzalin effect.

The two hypothesized MKKK20 pathways, one that includes MPK18, and the other MKK3 (possibly with MPK4 or MPK6), are likely to target different MAPs and exert different influences on MT dynamics and organization (Figure 2.8). Indeed, the phenotype of *mpk18* is not as dramatic as that of *mpk4* (Komis et al. 2011) and MPK4 was found to co-localize with microtubules, unlike MPK18 (Walia et al. 2009). Moreover, inhibition of phosphorylation via the *mkk3* mutation is likely to cause MT hyperstabilization, as seen with *mpk18-1* mutant (Walia et al. 2009). The summation of different pathway disturbances in the *mkkk20* mutant could therefore lead to more drastic perturbation of microtubule dynamics. This is supported by the observation that, in the absence of oryzalin, the *mkk3/mpk18* double mutant root length is significantly shorter than in all other lines (Figure 2.5).

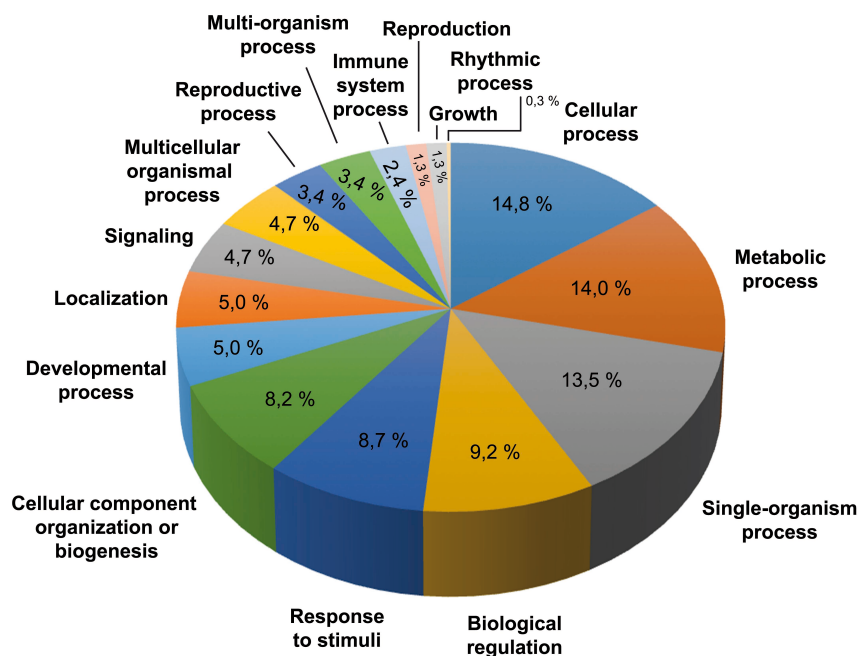
Our understanding of the role played by plant MAPK signaling in regulating microtubule functions still needs to be refined. The involvement of multiple MAPK members in numerous biological processes often compromises a clear understanding of phenotypic specificity. Full characterization of the signaling network, including cross talk between parallel cascades, will ultimately be needed in order to develop a coherent biological picture.



**Figure 2.8. Hypothetical MAPK pathways**

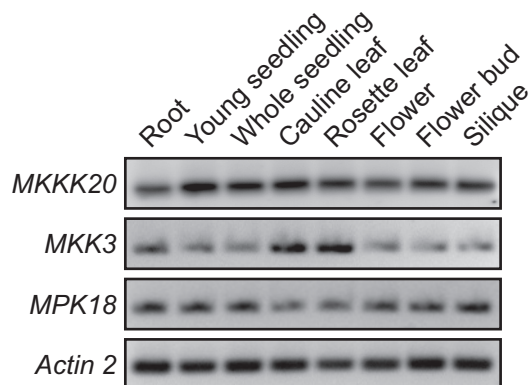
Two possible MKKK20 signaling pathways. The first represents a non-canonical MAPK cascade that includes MKKK20/MPK18. The second corresponds to a prototypical cascade including MKK20/MKK3 and possibly MPK4 or MPK6. Both pathways should target different MAPs and result in different influence on MT dynamic and organization. MKK3 could be a target of other MKKKs that are involved in MT functions as well as MPK18 that should be activated by one of AtMKKs rather than MKK3.

## 2.5 Supplementary data



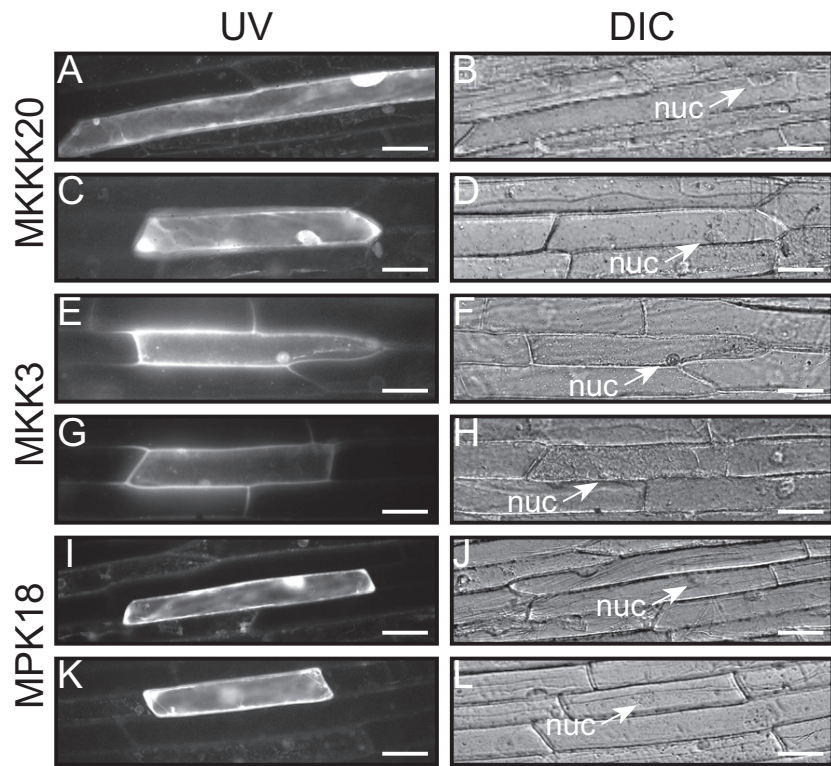
**Figure S2.1. MKKK20 interactants GO terms**

Gene Ontology annotations of all MKKK20 interactants against *Arabidopsis thaliana* using BLAST and Blast2GO. Annotation was completed using InterPro and Enzyme Code Mapping



**Figure S2.2. Kinase expression patterns by RT-PCR**

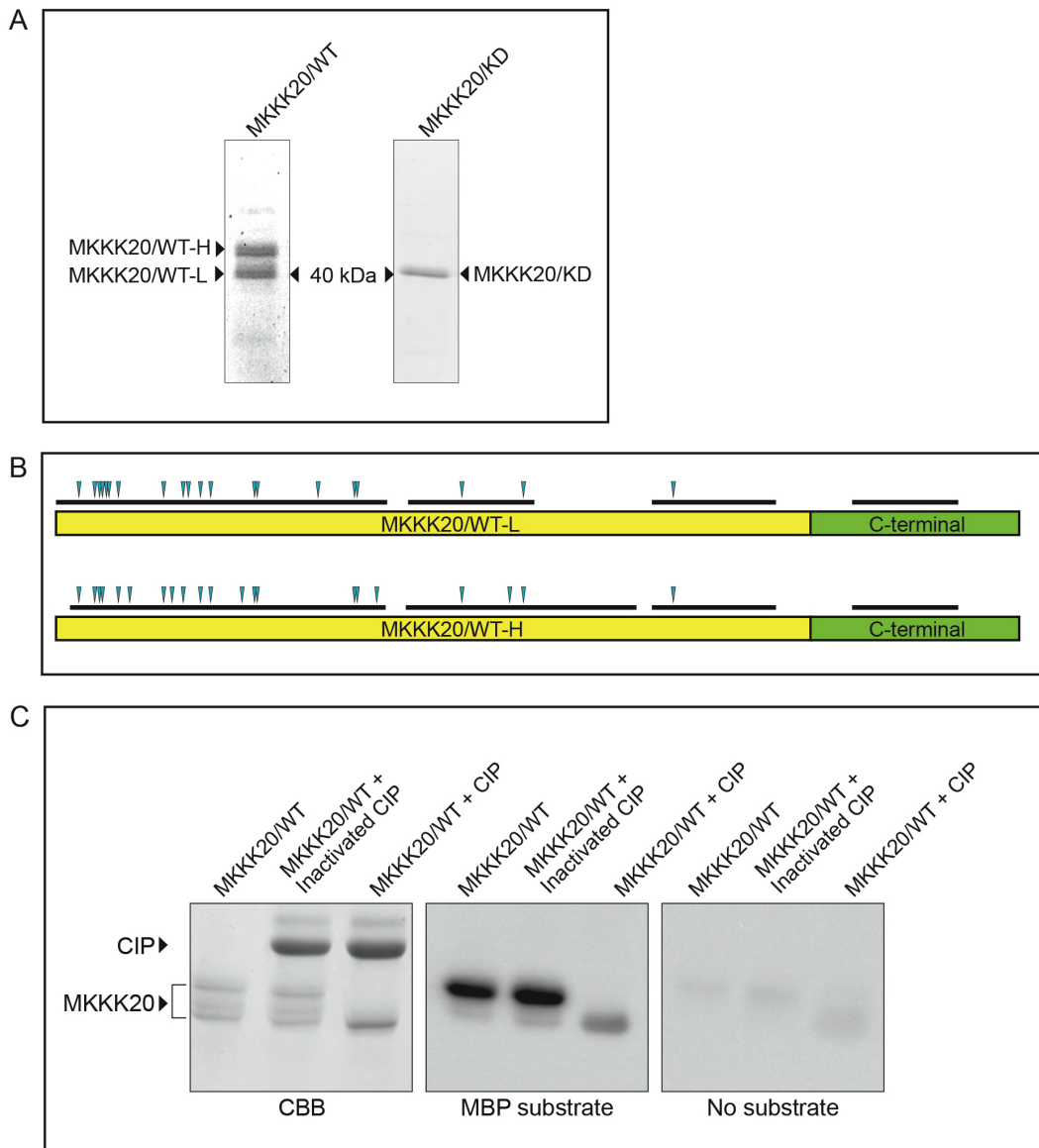
RT-PCR analysis of MEKK20, MKK3 and MAPK18 gene expression in various organs of the *Arabidopsis* plant. Actin 2 gene is used as an internal control for equal loading. Specific gene primers for each gene in supp. table 3. We choose 24 cycle for MKKK20, MKK3, MAPK18 and 20 cycles for Act2.



**Figure S2.3. Kinase subcellular localizations**

Characterization of the MKKK20, MKK3 and MPK18 nuclear and cytosolic localization signal. The three kinases coding regions were fused in-frame to the N-terminus of GFP in pMDC83 vector. Epifluorescence (A,C,E,G,I,K) and bright field (B,D,F,H,J,L) images of epidermal leaf onion cells showing cytosolic and nuclear localization of all kinases.





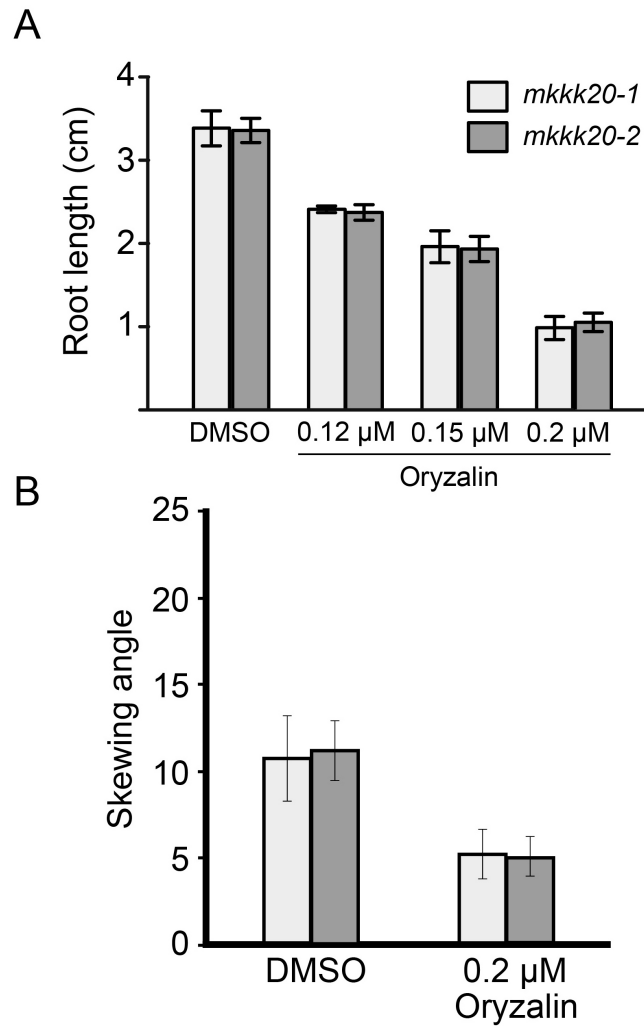
**Figure S2.4. MKKK20 phosphorylation In bacteria**

A) His-tagged recombinant MKKK20 Wild type (Right) and MKKK20 kinase-dead protein (Left) purified from *E. coli*. The two bands (H for High MW and L for Low MW) correspond to MKKK20 protein as confirmed by LC-MS sequencing.

B) Schematic representation of LC-MS sequencing results. Black bars = regions of each protein populations from their respective band(s) shown in (A) that were successfully sequenced. Red circle = phosphorylated residues

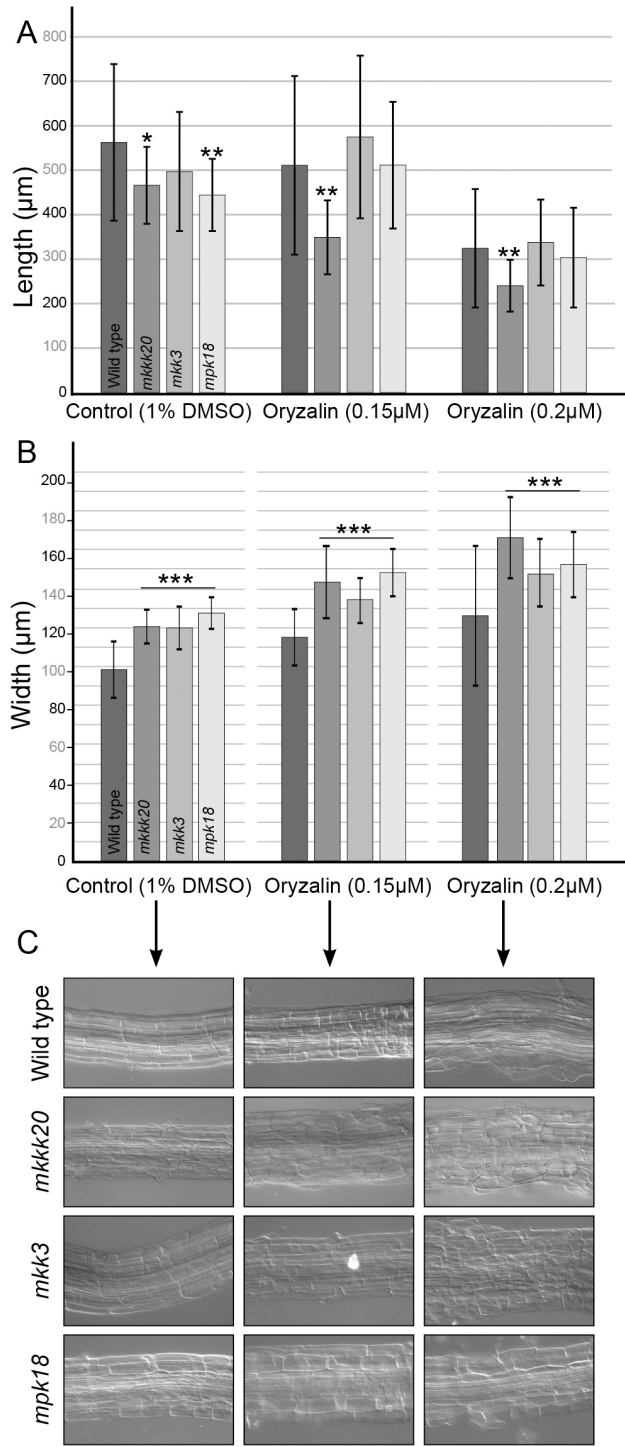
C) MKKK20 autophosphorylation affects SDS-PAGE mobility and kinase activity.

MKCC20 dephosphorylation by Calf Intestinal (CIP). The two distinct major bands represent different phosphorylation states of MKCC20 as one band is seen after CIP treatment.



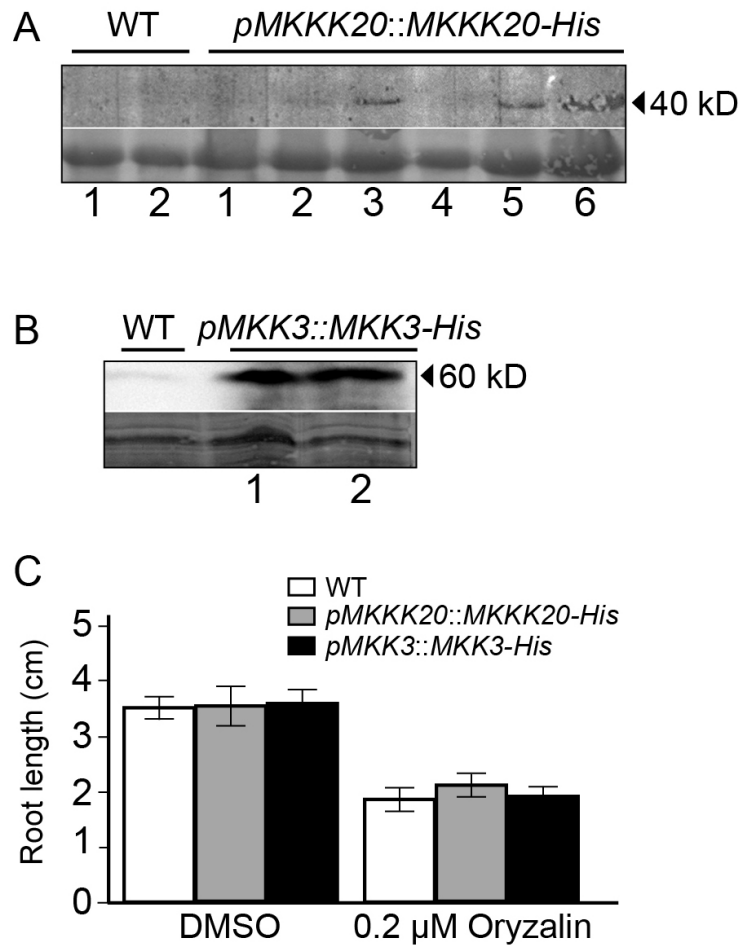
**Figure S2.5. Two MKKK20 T-DNA insertional mutant lines**

Root length (A) and skewing angle (B) of 8-day-old single mutants *mkkk20-1* and *mkkk20-2* seedlings grown on DMSO and various concentrations of oryzalin. Both mutant lines show same behavior therefore we decided to keep *mkkk20-1*.



**Figure S2.6. Cell width at root elongation zone**

**Single mutant affect width of the elongation zone of the root.** A) Average length between division zone and the first lateral root was measured for wild type and the three single mutants ( $n \geq 15$ ). B) Width of the roots was calculated at 3 places in the elongation zone (beginning, middle, end) and reported as mean ( $n \geq 15$ ). A representative observation for each case is presented in C). Data represent mean  $\pm$  SD. Scale bar : 100µm. Student T was used to calculate p value.



**Figure S2.7. MKKK20 and MKK3 complementation**

A) Root length of 6-day-old *mkkk20* and *mkk3* complemented seedlings grown on DMSO and 0,2 μM oryzalin. Data represent means ± SD (n ≥ 28).

B) His-Tag protein western blot showing the recombinant kinases gene expression on the mutant backgrounds (a) MKKK20 and (b) MKK3). We kept samples 1 and 2 for both kinases to carry out further plants analysis. We used a mouse anti-poly-histidine as first antibody followed by a rabbit anti-mouse IgG-HRP as second antibody shown in upper panel and coomassie stain in lower panel.

**Supplemental 2.1 Table I. T-DNA insertion lines.**

Gene	FST-ID	Ecotype	T-DNA insertion
<i>AtMKKK20</i>	SALK_021755	Columbia	Exon 1
	SALK_124398	Columbia	5' UTR
<i>AtMKK3</i>	SALK_051970	Columbia	Exon 7
<i>AtMAPK18</i>	SALK_069399	Columbia	Exon 2

**Supplemental 2.1 Table II. Primers used for T-DNA lines genotyping.**

T-DNA genotyping		
<i>mkkk20-1</i>	LP:5'-TCGGACAACATCTCTGGAATC	RP:5'-AATATCCGCTTTCATCACGTG
<i>mkkk20-2</i>	LP:5'-TAAACATGCAAATTGCAGCTG	RP:5'-TCAGAATTGGAATGGGAATTG
<i>mpk18</i>	LP:5'-TTTTGGTGTGCCAAGAAGATC	RP: ACATATTTCTGATGCGCTTCG
<i>mkk3</i>	LP:5'-GTTTGTGGGGTTTTTCACATG	RP: CTTCACCAACACCACCAAAC
LBmgm	5'-CCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAA	
LBa1	5'-TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	

**Supplemental 2.1 Table III. Primers used for promoter-GUS constructs and RT-PCR analyses.**

Name	Sequence
<b>GUS</b>	
pMKKK20-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTTGCAATCATGCCATTACGACC-3'
pMKKK20-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGAAATTGAAACAAAAGCTTTTAAGA-3'
<b>RT-PCR</b>	
MKKK20-F	5'-GAGAAAACCTTCGTTGTGAAGGTT-3'
MKKK20-R	5'-CAGACCAATCAGGGATCGA-3'
MPK18-F	5'-GTGCTTTAAAGTTCATGCATACA-3'
MPK18-R	5'-CAGTTGAGTGAACCGTAGACCGCG-3'
MKK3-F	5'-CACGGAGCGTTTTATAGTCCAG-3'
MKK3-R	5'-CTCGGTAAATCTCCTGTTAATGT-3'
Actin2-F	5'-GCCATCCCAAGCTGTTCTCTC-3'
Actin2-R	5'-CCCTCGTAGATTGGCACAGT-3'

**Supplemental 2.1 Table IV. Primers used for protein expression constructs.**

Name	Sequence
<b>MKKK20WT</b>	
M20 <sup>W</sup> -F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCGAAGAAGGCAAGGATTTTTTGTGTC-3'
M20 <sup>W</sup> -R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACC GGACTGTAAGCCAACT-3'
<b>MKKK20KD</b>	
PCR1-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGAGTGGGTTCGAGGAGA-3
PCR1-R	5'-ACTCCGGCGACTTTCTGCACTTATCGCTGTGATGTGACGGATGCTTATGGCGCCGCTTCACT-3'
PCR2-F	5'-ACTCCGGCGACTTTCTGCACTTATCGCTGTGATGTGACGGATGCTTATGGCGCCGCTTCACT-3'
PCR2-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACC GGACTGTAAGCCAACT-3'
PCR3-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGAGTGGGTTCGAGGAGA-3
PCR3-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACC GGACTGTAAGCCAACT-3'
<b>MPK18</b>	
M18-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGCAACAAAATCAAGTGAA-3'
M18-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATGATGCTGCGCTGTA ACTAA-3'
<b>MKK3<sup>WT</sup></b>	
M3 <sup>W</sup> -F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGCGGCATTGGAGGAG-3'
M3 <sup>W</sup> -R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAATCTAAGTTTGTAAATAAAAGCTCTTGCTTAGCAA-3'
<b>MKK3<sup>KD</sup></b>	
M3D-F	5'-CATAGAATTTTAGCGTTGATGAAGATTAATATCTTTGAAA-3'
M3D-R	5'TTTCAAAGATATTAATCTTCATCAACGCTAAAATTCTATG-3'

**Supplemental 2.1 Table V. Primers used for *mkkk20* and *mkk3* complementation constructs.**

MKKK20-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGAAGGAGATAGAACCATGGAGTGGGTTCGAGGAG-3'
MKKK20-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAATGATGATGATGATGATGATGTCACCGGACTGTAAGCCAA-3'
MKK3-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACCATGGCGGCATTGGAGGAG-3'
MKK3-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAATGATGATGATGATGATGATGATCTAAGTTTGTAAATAAAAGCTCTTGCTTAGCAA-3'

### III. Les MKKK19, 20 et 21 sont impliquées dans le développement du pollen et la fertilité chez *Arabidopsis*

#### Résumé

Dans notre laboratoire, le projet de séquençage par EST (*expressed sequence tag*) de l'ovule de *Solanum chacoense* nous a permis d'isoler plusieurs protéines kinases exprimées préférentiellement dans les ovules (Germain et al. 2005). Ces EST ont été obtenus à partir de deux banques d'ADNc faites à partir d'ovules couvrant les périodes de la fécondation (48 heures après pollinisation) et les différents stades de l'embryogenèse (2 à 16 jours après pollinisation). Parmi ces protéines kinases, trois appartiennent à la sous-famille des MEKKs, soit *ScFRK1*, 2 et 3 (Fertilization-Related Kinase1-3). Leurs orthologues potentiels chez *Arabidopsis thaliana* sont les MKKK19, MKKK20 et MKKK21 (Lafleur et al. 2015). La surexpression de *ScFRK2* affecte le développement de l'ovule et des graines et provoque un dysfonctionnement du pollen (Gray-Mitsumune et al. 2006; O'Brien et al. 2007). Dans le cas de *ScFRK1*, les plantes sous-exprimant ce gène produisent de petits fruits avec un nombre très réduit de sacs embryonnaires normaux ainsi qu'une nette diminution de pollen viable. Dans ces plantes, la microgamétogenèse est affectée au niveau de la première division mitotique.

Afin de préciser la fonction et le rôle potentiel des gènes *AtMKKK19*, *20* et *21*, nous avons analysé d'abord les mutants insertionnels T-DNA relatifs de chaque kinase. Les mutants simples de chaque kinase n'ont montré aucun défaut développemental, fort probablement dû à une redondance fonctionnelle entre ces gènes. Ainsi nous avons réussi à créer des mutants qui sous-expriment ces trois gènes simultanément par « amiRNA *silencing* » (*artificial micro RNA*). Ces mutants produisent un grand nombre de pollen non viable et un court tube pollinique par rapport au type sauvage. Une analyse détaillée des stades de la microsporogenèse a montré que c'est le stade tricellulaire qui serait affecté.

La localisation intracellulaire de ces trois protéines a été réalisée par transformation biolistique (bombardement de microparticules) en exprimant de façon transitoire chacune de ces kinases fusionnées à la GFP. Alors que la MKKK20 et la MKKK21 sont localisées dans le noyau et le cytosol, la MKKK19 est exclusivement nucléaire. L'analyse de l'expression

génique des MKKK19-21 a été réalisée par la RT-PCR et le gène rapporteur GUS. Les résultats de ces expériences en plus des études des profils d'expression des gènes d'*Arabidopsis* fournis par les bases de données disponibles sur le web sont cohérents. En tout, nous avons trouvé que les trois kinases sont fortement exprimées au niveau des organes reproductifs et plus spécifiquement dans le pollen et le tube pollinique.

L'analyse biochimique dans le système de double hybride chez la levure a aussi été utilisée afin de déterminer l'ensemble des protéines pouvant interagir avec ces trois protéines, suite au criblage d'une banque d'ADNc faite à partir de différents transcrits d'*Arabidopsis*. Plusieurs interactants appartenant à une vaste catégorie fonctionnelle ont été identifiés pour chaque kinase. Ceci permettra ultérieurement de poursuivre nos investigations, car elles donnent une mine d'information sur les cibles immédiates de ces kinases.



## **The Arabidopsis MAPKinase Kinase Kinase 19, 20 and 21 are involved in pollen development**

Rachid Benhamman<sup>1</sup>, Audrey Loubert-Hudon<sup>1</sup>, Juliana Pérez Di Giorgio <sup>2</sup> and Daniel P. Matton<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Institut de Recherche en Biologie Végétale, Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, 4101 rue Sherbrooke Est, Montréal, Québec, H1X 2B2, Canada.

<sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Medicine, Université de Montréal.

Author contributions: B.R carried out all of the experiments, except for *Invitro* assays which was performed by P.J and GUS coloration which was carried out by L.A. B.R interpreted the results and led the writing of this article. D.P.M. oversaw this project and gave critical corrections and improvement to the manuscript.

\*To whom correspondence should be addressed: [dp.matton@umontreal.ca](mailto:dp.matton@umontreal.ca)

Preparation for submission

### 3.1 Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are important mediators of cellular signal transduction for various biotic and abiotic stresses in eukaryotes. We showed previously that *Arabidopsis thaliana* MKKK20 is involved in cortical microtubule organization in plant cells and is highly expressed in pollen grains and tubes. Therefore we were interested in studying its possible implication in male gametogenesis. Single knockout mutants had a normal phenotype under standard growing conditions. We then generated a double knockout mutant by including MKKK21 and then a triple mutant using amiRNA to knockdown *At*MKKK19-21. Bioinformatics data demonstrated that the MKKK19 and 20 are highly expressed in male reproductive tissues, whereas MKKK21 was considered as a pseudogene. In contrast, we found that the MKKK21 is expressed and by using GUS reporter gene and RT-PCR experiments, we showed that the three MAPKKs were expressed in all plant tissues, most highly in male gametophyte. Because of a possible functional redundancy, single knockout mutant *mkkk20/mkkk21* was normal in all plant development except for pollen tube growth/length, which was significantly reduced and was more pronounced for the triple amiRNA knockdowns. In addition, triple knockdowns showed a significantly high percentage of pollen lethality, and a high number of aborted seeds within shorter siliques containing less seeds. The two-hybrid assay identified possible interactants including transcription factors and kinases that are implicated in *Arabidopsis* reproduction. Taken together, our results demonstrate that *At*MKKK19, 20 and 21 are involved in pollen development and thus, in plant fertility

KEYWORDS: *Arabidopsis*, pollen development, sporogenesis, amiRNA, silencing

### 3.2 Introduction

As sessile organisms, plants have developed integrated and complex signaling networks to perceive and respond adequately to developmental processes and environmental cues. Signal transduction often relies on ubiquitous regulatory mechanisms including sensors and receptors, which activate downstream cellular targets. Protein phosphorylation causes many molecular and cellular changes as it affects protein function, stability, activation, interaction, subcellular localization and translocation. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways have been associated with a wide range of developmental and stress responses (Rodriguez et al. 2010). Canonical three-tiered MAPK cascades are typically initiated by the phosphorylation of a MAPK kinase kinase (MKKK, MAPKKK or MEKK) through various activators that can include upstream MAPKKKKs, transmembrane receptor kinases, G protein-coupled receptors and two-component histidine kinase complexes. Once activated, the MAPKKK starts a sequential phosphorylation cascade in which the activated MAPKKK phosphorylates a MAPK kinase (MAPKK or MKK) on a [S/T] - X - [S/T] motif in the activation loop (T-loop). Here X=5 in plants and X=3 in animal and yeast cells (Ichimura et al. 2002; Zheng and Guan 1994). In turn, the activated MKK phosphorylates a MAPK on both threonine and tyrosine residues in the activation loop T-[D/E]-Y motif (Asai et al. 2002). In *Arabidopsis thaliana*, the MAPK superfamily comprises 10 MAPKKKKs, 80 MAPKKKs, 10 MAPKK and 20 MAPKs (<https://www.arabidopsis.org/browse/genefamily>). The 80 MAPKKKs can be further classified into three subfamilies: the MEKK, the Raf and the ZIK (Jonak et al. 2002).

Generation of functional male and female gametophytes is a fundamental event in the reproductive life cycle of a plant. Male gametogenesis occurs inside the anthers and meiotic divisions produce microspores that develop into pollen grains in a process controlled by both sporophytic and gametophytic genes. Many components playing crucial roles in this process have been identified and characterized (Berger and Twell 2011), however, little is known about the involvement of protein kinases, yet some relative works are starting to emerge. The male sterile mutant *gne2* (*gus-negative2*) was originally related to anther development defect, which led to an excess of sporogenous cells (Bhatt et al. 2001; Sorensen et al. 2002), and then designated (*exs*) (Sorensen et al. 2002). This gene has been characterized as a leucine-rich

repeat (LRR) receptor kinase (Sorensen et al. 2002). The EXCESS MICROSPOROXYTES 1/EXTRA SPORONGENOUS CELLS (EMS1/EXS) mutant is specifically linked to an increased cell division in the L2 layer of developing anthers, which provokes a delay in embryo development, smaller cells and significant reduction in seed size (Sorensen et al. 2002). Similar results by Zhao *et al.* 2002 have shown that *ems1/exs* plants lack tapetal cells resulting in meiotic cytokinesis failure and microsporogenesis abortion in *Arabidopsis thaliana* (Zhao et al. 2002). In rice, *msp1*, an orthologue of EMS1, showed a similar phenotype in addition to female sporogenesis defects (Nonomura et al. 2003). Also, the double mutant of two *Arabidopsis* Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinases (*serk1/serk2*) was characterized to be completely male sterile resulting in tapetum specialization failure (Albrecht et al. 2005; Colcombet et al. 2005). SERKs share the canonical structure of LRR-kinases with less number of LRR repeat (Shiu and Bleecker 2001). In addition, two other LRR-RLKs, BARELY ANY MERISTEM 1 and 2 (BAM1, BAM2) are also involved in cell division during early anther development (DeYoung et al. 2006), as the *bam1/bam2* double mutant results in male sterility and reduced female fertility. In addition, mutation of CYCLIN DEPENDENT KINASE A1 (CDKA;1) causes a delay in the S-phase of pollen development, leading to cell cycle progression defects and producing a single sperm cell in *Arabidopsis* (Iwakawa et al. 2006). Finally, in *Solanum chacoense*, two MAPKKKs, FERTILIZATION-RELATED KINASE 1 and 2 (*ScFRK1, 2*), have been shown to play crucial roles in both male and female gametogenesis. Overexpression of *ScFRK2* affected ovule identity, seed and fruit development (Gray-Mitsumune et al. 2006) and disturbed strongly pollen development as a result of sporophytic dysfunction (O'Brien et al. 2007). On the other side, down-regulation of *ScFRK1* leads to the production of small fruit and less normal embryo sacs, with significant decrease of pollen viability as microspores were aborted at first mitotic division (Lafleur et al. 2015).

During male gametogenesis, the first asymmetric mitotic pollen division (PMI) of the haploid microspore produces bicellular pollen grains with a small germ cell engulfed within the cytoplasm of a large vegetative cell. The germ cell elongates and completes a second mitotic division (PMII) to produce twin sperm cells (Berger and Twell 2011). Thereby, male gametogenesis could be divided into two main phases; an early phase that comprises

microspore and bicellular pollen, and a late phase including tricellular and mature pollen. Although specific genes are expressed in each phase, the transcriptomic profile for both is not considerably different (Honys and Twell 2004; Pina et al. 2005; Zhang et al. 2006a). To date, several mutants affecting the first phase have been identified, whereas genes involved in the late phase remain poorly characterized (Borg et al. 2009). Of the best-characterized genes involved in PMII are the duo pollen mutants (*duo*) (Durberry et al. 2005; Rotman et al. 2005; Brownfield et al. 2009). DUO1 encodes a conserved germline-specific R2R3-type MYB transcription factor that is expressed soon after the PMI asymmetric division (Rotman et al. 2005). In the *duo1* mutant, pollen fails to enter mitosis at the G2-M transition, whereas in the *duo2* mutant, generative cells enter PMII but arrest at the prometaphase (Durberry et al. 2005). As for DUO3, it was found to be a positive regulator of germ cell fate under DUO1 target genes and is required also for G2/M transition (Brownfield et al. 2009). Recently, *Arabidopsis* Shaggy-like protein kinases (ASK $\beta$ ) silencing have been shown to cause pollen defects during late pollen development (Dong et al. 2015).

The main subjects of this work, MKKK19 and MKKK20, have been reported to be highly expressed in sperm cells based on an *Arabidopsis* genome-wide transcriptome analysis of isolated sperm cells (Borges et al. 2008). Also, from microarray data, *MKKK19* expression level is rapidly increased (1/2 hour after treatment) following UV-B treatment and after infection by the plant pathogen *Botrytis cinerea*, while *Pseudomonas syringae* infection led to late gene expression of both *MKKK19* and *20* (6 hours after inoculation) (Menges et al. 2008). The same study also showed that expression levels of *MKKK19* and *20* are increased following methyl jasmonate, auxin as well as cytokinin treatments. Interestingly, *MKKK20* was found as an up-regulated gene in seedlings in response to ectopic expression of DUO1. Further analyses showed that *MKKK20* was indeed under the control of DUO1 and was expressed in the pollen sperm cell, suggesting its involvement in male germline development. As for other DUO1 target genes, the promoter of the *MKKK20* gene showed an overrepresentation of MYB binding sites (Borg et al. 2011). Also, three cis-regulatory elements (motif 1, 2 and 3) were found in MKKK20 promoter, for which, motif 1 and 3 are annotated as *POLLENILETAT52* and *MYBIAT* (Dong et al. 2015). MKKK20 was also showed to be involved in osmotic stress response (Kim et al. 2012). Compared to wild-type

plants, *mapkkk20* mutant plants are significantly more sensitive to high NaCl concentration and accumulate elevated level of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. In addition, MKKK20 was found to regulate MPK6 activity. Kinase activity assays showed that MPK6 activity was significantly affected in *mkkk20* mutant plants under cold and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatments, and to a lesser extent in salt drought stress.

Previously, we showed that MKKK20 was involved in cortical microtubules function in *Arabidopsis* cells, mainly affecting roots and was highly expressed in pollen grains and tubes (Benhamman *et al.* 2016). In the present study, we show that the *At*MKKK19, 20 and 21 are all highly expressed in pollen grains and tubes. Contrary to the involvement of MKKK20 in microtubule functions, the three kinases are functionally redundant and their silencing affects plant fertility by producing high pollen lethality. Early male gametophyte development is not compromised whereas bicellular and mainly tricellular pollen produce high abnormal and dead pollen. We conclude that these MKKKs play an essential role in late phase for pollen development and plant fertility.

### **3.3 Materials and methods**

#### **3.3.1 Plant materials and growth conditions**

Wild type (Col) and all *Arabidopsis thaliana* MKKKs mutants were obtained from TAIR ([www.arabidopsis.org](http://www.arabidopsis.org)). We used the following T-DNA insertion lines, CSHL\_GT19223 for *mkkk19*, SALK\_021755 for *mkkk20*, and SALK\_149019 for *mkkk21*. Seeds were grown in chambers at 21° C for a long day photoperiod (16-h-light/8-h-dark cycle). To screen for homozygous lines, specific primer pairs were used (Supplemental Table 3.I). For microspore analysis, bud sizes have been measured from tip to base under the eyepiece of a binocular dissecting microscope.

#### **3.3.2 RNA isolation and RT-PCR**

To conduct RT-PCR for MKKKs gene expression analysis, we isolated total RNA from various plant tissues using TRIzol® RNA isolation reagent (Lifetechnology) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed using a first-strand cDNA synthesis M-MLV RT kit (Invitrogen). Specific primers were used for the RT-PCR analysis, and Actin2 gene was used as an internal control (Supplemental Table 3.II).

#### **3.3.3 GUS staining**

For GUS construction, approximately 1.5 Kb promoter region upstream of MKKK19, 20 and 21 coding sequences were PCR amplified (primers in Supplemental Table 3.III) and cloned into Gateway™ pMDC162 harbouring the  $\beta$ -glucuronidase gene to generate N-terminal fusion reporter genes (Curtis and Grossniklaus 2003). *Agrobacterium tumefaciens* C56C1 strain was used to electro-transform wild type *Arabidopsis thaliana* plants by floral dipping as described (Zhang et al. 2006c). The M0 generation was grown in MS media containing hygromycin antibiotic and the transgenic plants were selected as described in (Harrison et al. 2006). The M1 generation was PCR verified and analysed for gene expression. GUS staining was conducted for selected homozygous M2 generation plants as described (Jefferson et al. 1987). Freshly harvested tissues were collected and kept in 80% acetone before performing the  $\beta$ -glucuronidase assays in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7, 0.1% Triton X-100, 10 mM K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> and 10 mM K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. Tissues were then incubated in 2mM x-Gluc at

37°C for 4 hours. Serial ethanol concentration starting from 20% to 70% for 30 minutes each were used to clean tissues. Tissues were observed in a light microscope and digitally photographed using a Zeiss Axio Imager 1 microscope or a ZEISS SteREO Discovery V12 stereomicroscope.

### 3.3.4 GFP localisation

MKKK19, 20 and 21 full-length cDNAs were amplified by PCR (primers in S2. Table IV) and cloned into Gateway™ entry vector pDONRtm/Zeo (Invitrogen) and subcloned into pMCD83 to generate N-terminal kinase fusions with GFP. The constructs were sequence-verified and prepared for transient transformation by microparticle bombardment (Germain et al. 2008). We used onion epidermal cells to conduct the assays because of minimal cell background fluorescence. The PDS-1000/He bombardment system (BioRad) was used according to manufacturer's instructions to introduce plasmids DNA into onion cells.

### 3.3.5 amiRNA construction and plant transformation

To generate an artificial microRNA constructs, we used Web MicroRNA Designer tool at <http://wmd3.weigelworld.org> (Schwab et al. 2006). The amiRNAs were engineered into a 404 bp fragment containing the MIR319a stem loop cloned into pRS300 which was used as a PCR template. The website provided the following distinct primers for targeting the three MAPKKs: 19, 20 and 21; I miR-s TACCATGCCGTTTTATCGCTA, II miR-a ATAGCGATAAAACGGCATGGTA, III miR\*s TAACGATAAAACGCCATGGT and IV miR\*a gaAACCATGGCGTTTTATCGTTA with the two external primers A: CTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAAC and B: GCGGATAACAATTTACACAGGAAACA. The two former primers were gateway modified for precloning into the Gateway™ entry vector pZeo and then subcloned into the pMDC32 under the 35S promoter. *Agrobacterium tumefaciens* C56C1 was then transformed with this construct or a control empty vector (p32-V) before plants were agro-infiltrated. The selected transformed plants were done as described (Harrison et al. 2006) and PCR confirmed using the A and B primers.



### **3.3.6 Pollen viability assays and SEM analysis**

To evaluate pollen viability, mature pollen was incubated in aceto-carmine and Alexander stain (Alexander 1969) for 30 min and analyzed by differential contrast microscopy. For scanning electron microscopy (SEM), pollen grains were harvested manually and fixed in 2.5% formaldehyde, 2% glutaraldehyde in PIPES (50 mM Pipes, 1mM EGTA, 5mM MgSO<sub>4</sub>, pH7) for 45 min at room temperature. They were then washed 3 times with PIPES and dehydrated with a serial increase in ethanol concentrations (20% to 100%) for 30 min each. Pollen grains were then critical point dried and gold-palladium coated. Observations were done with a FEI Quanta 200 3D microscope operating at 20 kV.

### **3.3.7 In-vitro germination test and siliques cleaning**

*In vitro Arabidopsis* pollen germination experiments were conducted as described by (Boavida and McCormick, 2007). Briefly, pollen from 15 flowers of the same plant was germinated in 80 $\mu$ l of solid PGM (0.01% boric acid, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub> 10% sucrose, 2% low melting agarose, pH 7.6) at 22°C for 3 hours. A pollen grain was classified as germinated if the pollen tube length was equal to or greater than the pollen grain diameter. At least four biological replicates (i.e. sibling plants for each genotype) were used for each assay, and the assays were repeated at least 3 times. 200 pollen grains were scored for pollen germination rates and 100 tubes were measured in each replicate. Wild type and mutant siliques were fixed in ethanol:acetic acid 9:1 under vacuum infiltration for 2 hours. Tissues were then washed 2 times with 90% ethanol for 30 minutes each and incubated in 2.5 g/ml chloral hydrate in 30% glycerol overnight. If necessary, siliques were dissected and mounted under coverslip and analyzed using light microscopy.

### **3.3.8 Yeast two-hybrid cDNAs screening.**

We used the normalized Mate and Plate Library Universal *Arabidopsis* from Clontech® (catalogue n° 630487) as described previously (Benhamman et al. 2016). The commercial cDNA library was transformed into yeast strain Y187 (MAT $\alpha$ ) which can be readily mated to a MAT $\alpha$  GAL4 reporter strain. The MKKK19, MKKK20 and MKKK21 full-cDNAs were cloned into pGBKT7 plasmid as GAL4 DNA-BD fusion using BamH1 and Nco1 restriction enzymes before being transformed into the Y2H Gold yeast strain. The selection was carried

out on a high stringency SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp plates with X- $\alpha$ -Gal and Aureobasidin A. Plasmids from blue well-grown colonies were extracted and sequenced using the pGADT7-T 5AD primers.

### 3.4 Results

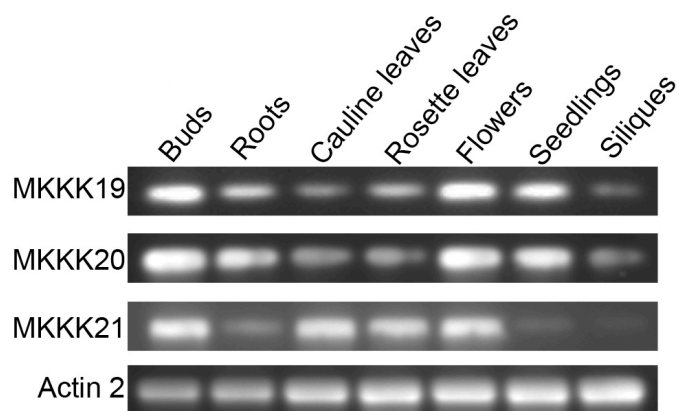
#### 3.4.1 *AtMKKK19, 20 and 21 are expressed in pollen*

To investigate the biological signification of the three MKKK19, 20 and 21, we examined their expression pattern using two approaches: RT-PCR and GUS reporter gene expression. Bioinformatics databases analysis showed that MKKK19-20 were highly expressed of in pollen (Genevestigator) and in floral organs (AtGenexpress) (Figure Supplementary 3.1). Data analysis of available pollen microarrays showed that MKKK19-20 were expressed during pollen development, in tricellular pollen but mainly in mature pollen grains (Honys and Twell 2004) and in mature pollen grains and pollen tubes (Pina et al. 2005; Wang et al. 2008b; Qin et al. 2009). RT-PCR experiments showed that all MKKKs are highly expressed in the reproductive organs (flower and buds). *MKKK20* transcript is more abundant in roots and leaves comparing to *MKKK19* and *MKKK21* (Figure 3.1).

In order to refine the RT-PCR expression analysis, GUS reporter-aided analyses of the *MKKK19, 20 and 21* promoters were performed. For each construct, the  $\beta$ -glucuronidase expression marker (*iudA*; GUS) driven by a 1.5 Kb promoter region, was used. Transgenic plants containing these constructs were then analyzed via a histochemical assay focusing on plant organs that showed the highest expression in the RT-PCR analyses, e. g. buds and flowers (Figure 3.2). Although moderately expressed in mature flower petals, *MKKK19* expression was mostly found in pollen and style throughout development (Figure 3A-D). Expression became stronger as the pollen matured, reaching a maximum around flower stage 11, corresponding to the first pollen mitosis (PMI) (Scott et al., 2004, Smyth et al. 1990). Although GUS staining could not be tracked down to a specific pollen cell, it was clearly observed in pollen tubes during its growth (Figure 3.2E) and traced until pollen tube discharge during fertilization (Figure 3.2F). Similar expression patterns were also observed for the two other *MKKKs*. Expression of *MKKK20* and *MKKK21* seemed to expand to the upper part of the valve at younger stages (Figure 3.2G-L, M-P), while *MKKK20* also showed expression in

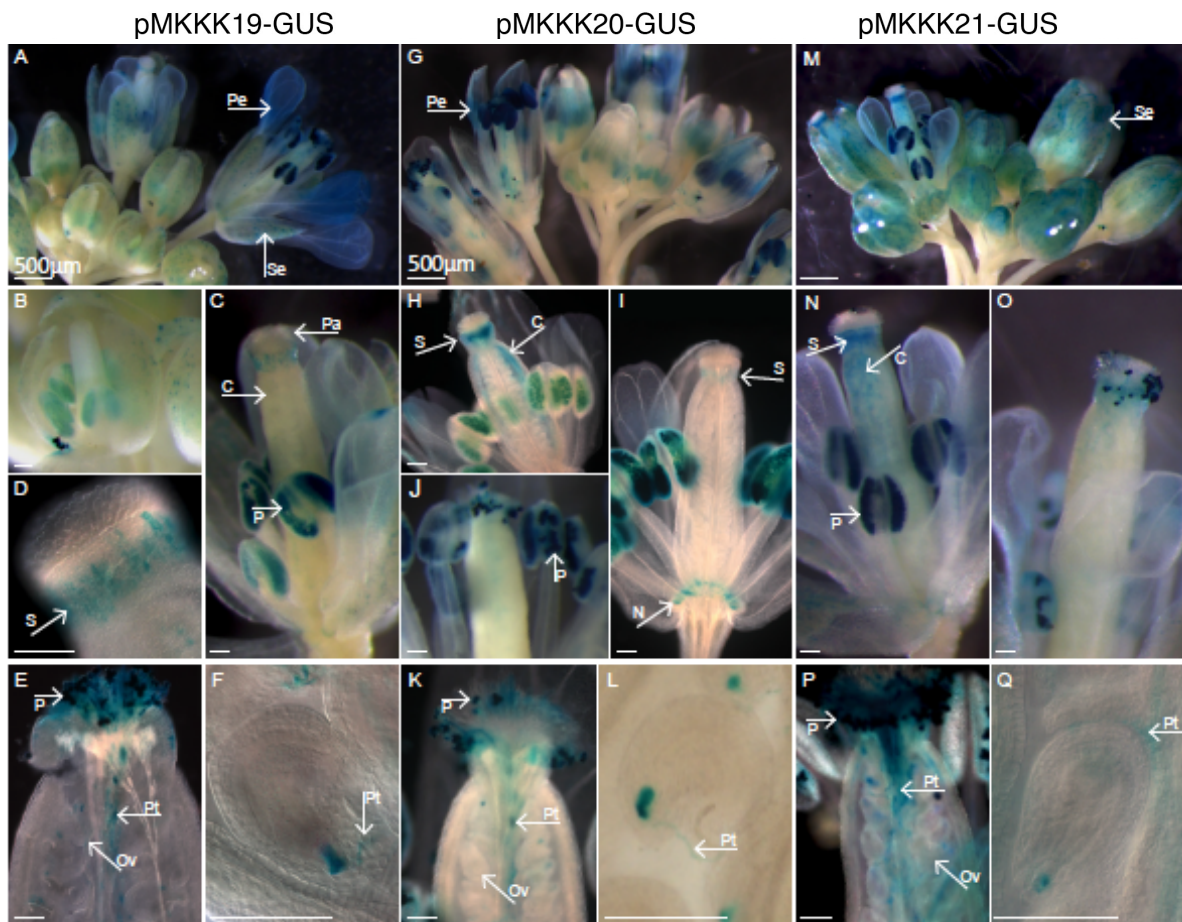
nectaries (Figure 3.2I). Expression is still stronger in pollen throughout its development, up to pollen tube elongation, reaching a maximum in pollen around the PMI stage (Figure 3.2K-L; Q-R).

For further subcellular localisation analysis we used Green fluorescent protein (GFP) fused to MKKKs coding sequences. While MKKK20-21-GFP signal was detected in nucleus and cytoplasm, MKKK19-GFP was exclusively detected inside nucleus (Figure Supplementary 3.2).



**Figure 3.1 RT-PCR for MKKK19, 20 and 21 expressions pattern**

RT-PCR analysis of MKKK19, 20 and 21 gene expression in various organs of the *Arabidopsis* plant. Actin 2 gene is used as an internal control for equal loading.



**Figure 3.2 Histochemical analysis of the GUS reporter gene expression driven by the three MKKKs promoter**

Expression of GUS reporter gene with AtMKKK19 (A-F), AtMKKK20 (G-L) and AtMKKK21 (M-Q) promoters.

The overall observations of the floral apex (A, G and M) allows the visualization of all the stages of flower development. Closer look allows to attest that expression of the kinases is mostly found in pollen (P), staining increasing with development, until around late stage 11. Flowers around that stage were observed for each gene (MKKK19 : B-D; MKKK20 : H-J; MKKK21 : N-O).

Staining lasts in pollen during pollen tube (PT) elongation and can be traced up to bursting for the three kinases (E-F; K-L; P-Q).

Scale bar = 100 µm, except for A, G and M (500µm).

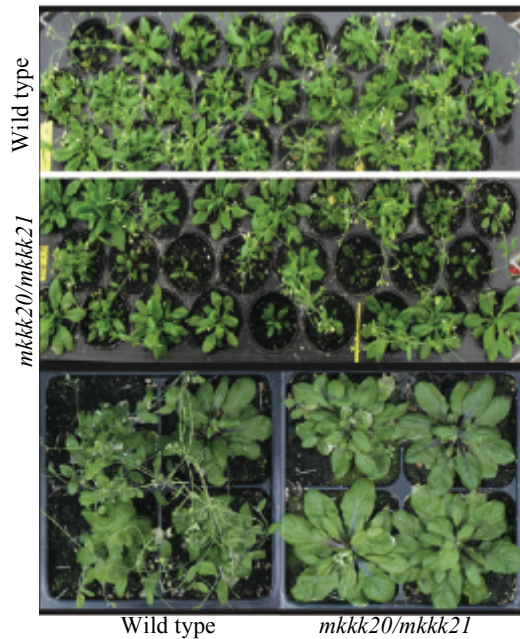
Carpel (C); nectaries (N); ovule (Ov); Papilla, (Pa); Petal, (Pe); pollen, (P); pollen tubes (PT); style, (S); valve (V);

### 3.4.2 Mutations in both MKKK20 and 21 affect plant development

To evaluate the impact of their absence, single T-DNA knockout mutants for MKKK19-21 were analyzed. All homozygous lines were identified by PCRs (Figure Supplementary 3.3) using specific gene primers (Supplementary Table 3.I). Seeds for each mutant line were grown side-by-side with wild type plants for global phenotypic analysis. None of mutants displayed any obvious abnormal phenotype under normal conditions, which could be a result of a functional redundancy of the three kinases. In order to overcome this, we crossed all single mutants reciprocally to generate double and triple mutants. We obtained a double mutant *mkkk20/mkkk21* but failed to get any offspring when *mkkk19* was crossed with *mkkk20* or *mkkk21*. This could be probably a result of T-DNA background differences (*mkkk19* was in *Landsberg Erecta* while *mkkk20-21* were in *Colombia* ecotype). At the time when first inflorescences start to appear, *mkkk20/mkkk21* plants showed a remarkable delay in plant growth compared to WT (Figure 3.3), although they eventually managed to reach the normal size and retained full fertility. We also analysed pollen viability and germination rate. While pollen integrity was not affected (Supplemental Table 3.V), we found that the germination rate of *mkkk20/21* mutant was affected (Figure 3.4-a).

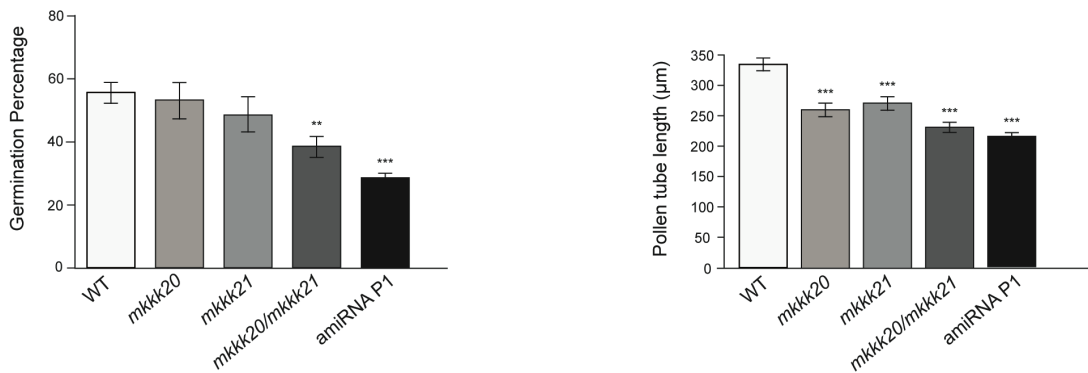
### 3.4.3 Generation of amiRNA transgenic plants

We constructed an artificial microRNA (amiRNA) that would knockdown MKKK19, 20 and 21 based on WMD3 web microRNA designer (Schwab et al. 2006). To check the silencing level of the three kinases expression, we conducted RT-PCR assays from cDNA made from flowers and buds. We selected 2 transgenic plants that displayed the lowest amount of relative transcript for each MKKKs in buds and flowers (Figure 3.5) and these were designated amiRNA P1 and amiRNA P2. These lines are heterozygous for the amiRNA insertion. Noteworthy, the expression of the two related kinases, MKKK14 and 15, was not affected (Figure 3.5).



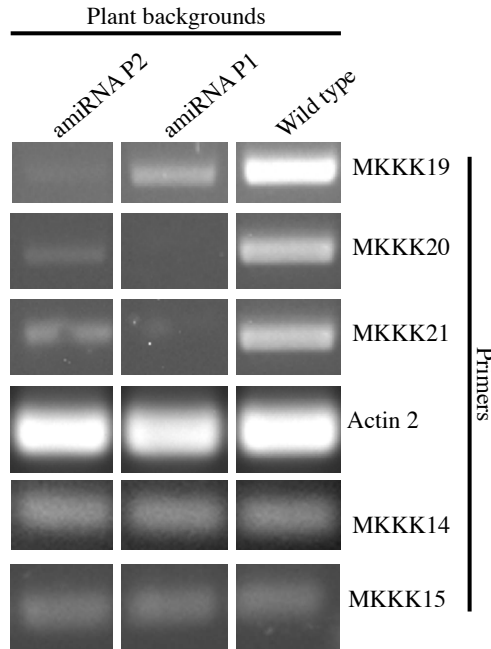
**Figure 3.3. *mkkk20/mkkk21* double mutant phenotype.**

Wild type plants were grown side by side with the double mutant *mkkk20/mkkk21* which showed a general delay in plant development. Still they managed to reach normal size and retained full fertility.



**Figure 3.4. In vitro germination assays.**

(a) Percentage of pollen germination and (b) pollen tube length of wild type (WT), simple mutants *mkkk20* and *mkkk21*, double mutant *mkkk20/21* and triple knockdown amiRNA P1 pollen in solid PGM during 3h. Data represent mean values  $\pm$  SEM of 4-6 replicates for each genotype repeated at least 3 times. We analyzed only repetitions for which we were able to count 200 pollen grains and measure 100 pollen tubes. Asterisks indicate significant difference from wild type with at (a) \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ , One-Way ANOVA with Dunn's Multiple Comparisons Test, (b) \*\*\*  $p < 0.001$ , One-Way ANOVA with Tukey's test.



**Figure 3.5. RT-PCR analysis of amiRNA plants.**

RT-PCR from two different transgenic amiRNA plants. cDNA was made from 3µg ARN extracted from flowers and buds. MKKK19-21 primers were used to evaluate the transcript level of each kinase. We used MKKK14 and MKKK15 to show that silencing is specific to targeted MKKK19, 20 and 21 transcripts.

#### 3.4.4 amiRNA kinase knockdown affects plant reproduction

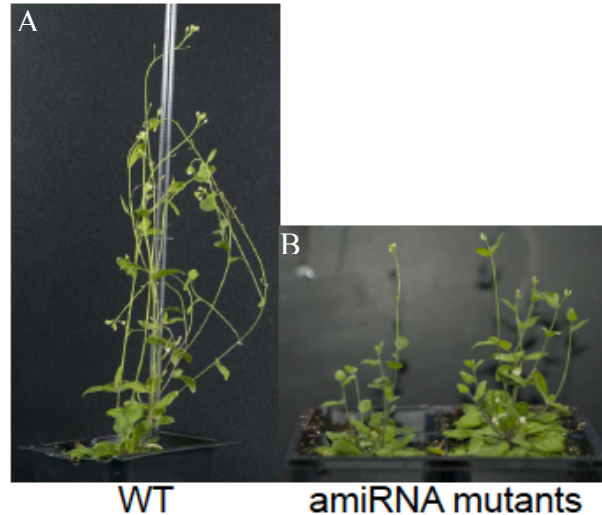
The triple mutant plants were analysed for any abnormal phenotype during all developmental stages. When the first real leaves and flowers started to appear, we observed an obvious growth delay of the amiRNA P1 and amiRNA P2 compared to the wild type (Figure 3.6). The initial dwarf phenotype observed in both double mutant *mkkk20/mkkk21* and the triple amiRNA knockdown plants did not persist and plants were able to recover the full size and shape. However, amiRNA plants showed many non-developed and aborted siliques, harboured less seeds and had a high percentage of aborted seeds compared to wild type plants (Figure 3.7 a-c).

#### 3.4.5 The triple amiRNA knockdown caused pollen lethality and affected late stages of pollen development

We evaluated the pollen viability of triple knockdown amiRNA plants and we found that they

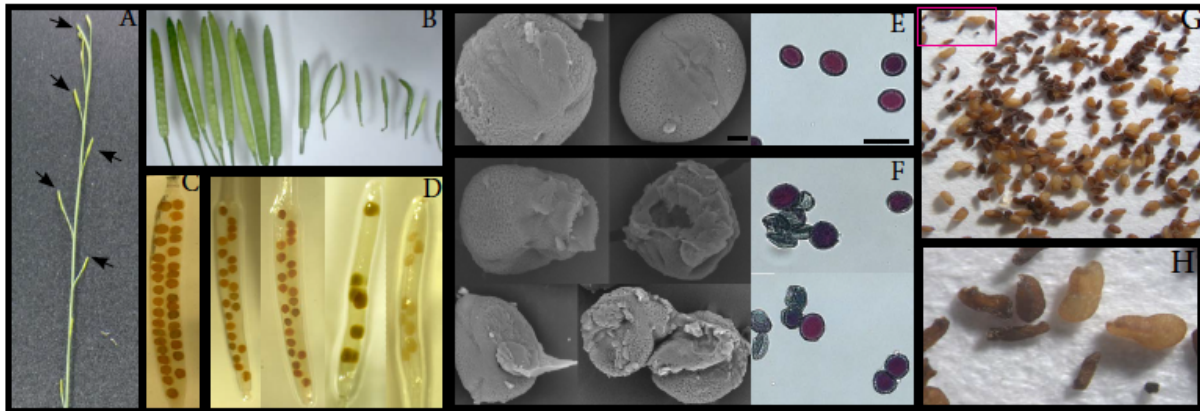


were differentially affected (Table 3.1). Pollen viability was significantly reduced in amiRNA P1 and amiRNA P2 mutants, representing 54.89% and 47.75% of dead pollen respectively. Scanning electron microscopy (SEM) observations revealed that triple knockdown pollen grains displayed different deformed and hollow shapes (Figure 3.7 e-f). To further determine which male gametogenesis stage was affected, we inspected quantitatively the amount of each microspore from different yang buds at various developmental stages (buds < 3mm in length). It turns out that uninucleate (Uni) microspores and bicellular (Bi) pollen grains of amiRNA P1 and amiRNA P2 was not compromised as it contained approximately the same amount of normal cells as wild type, (for uni; 29.6 %, 31.4% and 31.7% for amiRNA P1, amiRNA P2 and WT respectively) and (for Bi; 20.1%, 18% and 29.2% for amiRNA P1, amiRNA P2 and WT respectively) (Figure 3.8). However, the percentage of tricellular (Tri) pollen grain for both amiRNA P1 and amiRNA P2 was considerably reduced (10.2%, 11.8% for amiRNA P1, amiRNA P2 respectively versus 33.5% for WT) (Figure 3.8 ).



**Figure 3.6 amiRNA affects plant growth rate**

One-month-old wild type and some of amiRNA plants grown in the same conditions. A) wild type plant B) amiRNA P1 (left) and P2 (right). The observed dwarf phenotype for mutants did not persist and all mutants succeeded to reach full shape and size.



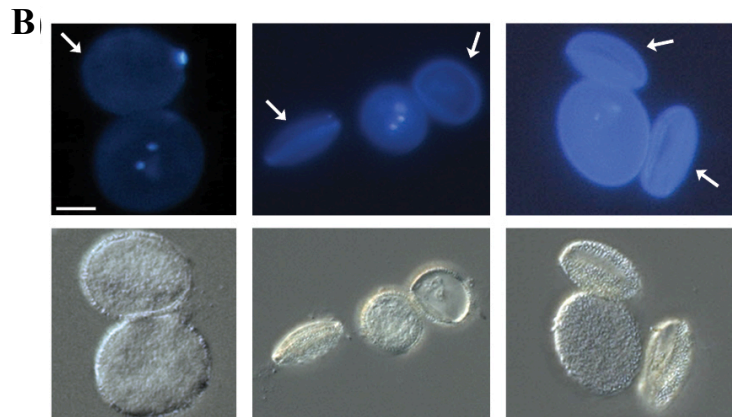
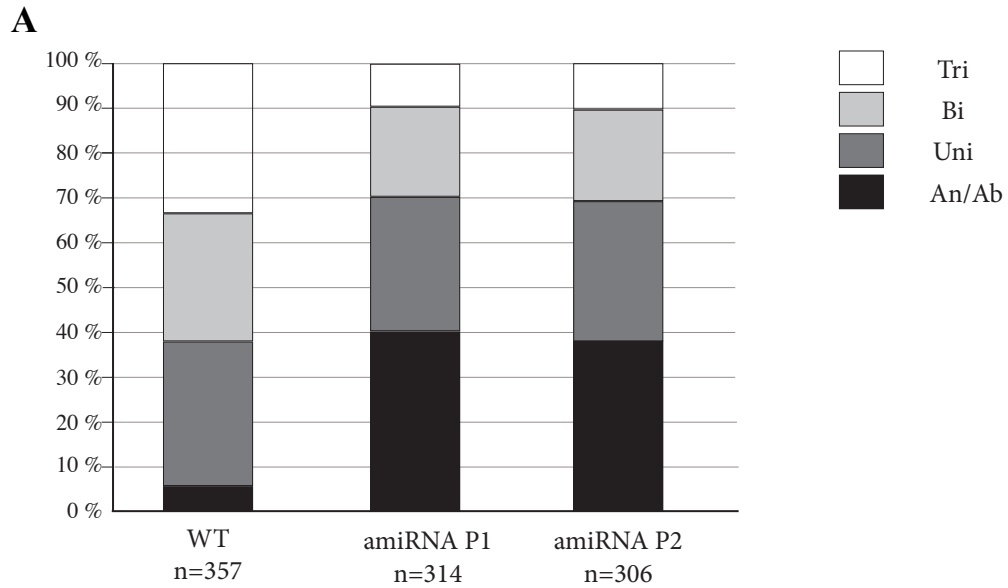
**Figure 3.7. MKKK19-21 amiRNA silencing affects plant growth rate**

(A) One branch side of amiRNA P1 with aborted siliques indicated by black arrows. (B) Comparison of wild type siliques (left) and amiRNA P1 (right). (C) Wild type siliques after cleaning and (D) mutants showing high number of aborted ovules. (e) Wild type Arabidopsis pollen stained with Alexander stain (right), or examination of fresh pollen outer structure through scanning electron microscopy (SEM) under low vacuum conditions (left). Viable pollen grains are round and stained in pink while while dead ones are deformed and colorless. Scale bar=20  $\mu$ m (Alexander stain) and 50  $\mu$ m (SEM). (F) The same observations as in (E) for amiRNA P1 which produced shriveled and collapsed pollen grains. (g) amiRNA produces large amount of dead and abnormal seeds. (H) Zoomed image from boxed area in (G).

Plant genotype	Viable pollen	Dead pollen
Wild Type P1	957 (93,6%)	66 (6,5%)
Wild Type P2	834 (93,1%)	62 (6,9%)
P32-V1	864 (93,1%)	64 (6,9%)
P32-V2	860 (92,2%)	73 (7,8%)
amiRNA P1	507 (45,1%)	617 (54,9%)
amiRNA P2	510 (52,2%)	466 (47,7%)

**Table 3.1. Pollen viability in wild type, control and amiRNA plants**

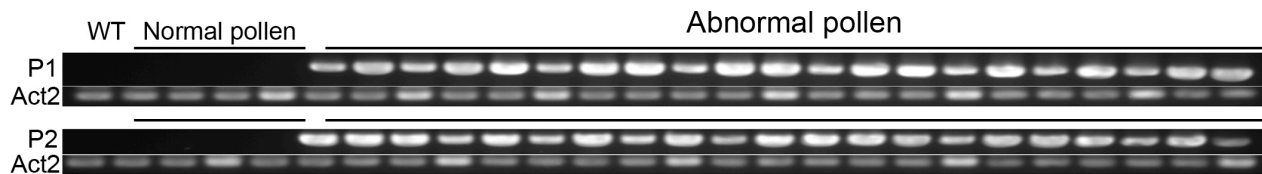
Pollen was stained with 1% aceto-carmin. Viable pollen grains were stained in pink and dead pollen cells were empty, unstained and shriveled shells. High Pollen lethality was observed in amiRNA P1/P2 mutants comparing to wild type and plant transformed with empty vector (p32 V1/V2).



**Figure 3.8. Quantitative analysis of microspores and pollen grains from amiRNA P1/P2 and WT plants.** Microspores were isolated from young buds at various developmental stages of a wild type and amiRNA P1-P2 plants and then stained with DAPI. a) The histogram shows the population of uninucleate (Uni) microspores, bicellular (Bi) and tricellular (Tri) pollen grains for triple mutant versus wild type. An=unstained, Ab=Abnormal b) Some of abnormal and unstained pollen grains at tricellular stage were designed by white arrows. Scale bar=20  $\mu$ m

### 3.4.6 MKKK19-21 amiRNA affects male gametogenesis exclusively

Transgenic amiRNA T1 plants were heterozygous for T-DNA insertion harbouring a single T-DNA insertion, and as expected approximately half of produced pollen was dead. It seemed likely that the lethal pollen phenotype might be transmitted through the female. To confirm that amiRNA does not affect female gametogenesis, we examined the transmission of silencing effects through male or female gametophytes. For this end, we performed reciprocal crosses between amiRNA P1/amiRNA P2 and wild type plants. When amiRNA P1/P2 were used as male parents, all the F1 offspring plants tested (90 plants for each cross) showed normal pollen phenotype, as the plants have a wild type genotype (data not shown). In contrast, when wild type plants were used as male parents, 42 out of 90 F1 plants (46.7%) from amiRNA P1 and 39 out of 90 F1 (43.3%) from amiRNA P2 showed an abnormal pollen grain phenotype (Supplementary 3.4). The dead pollen represents around half of pollen population for each plant. The cosegregation of amiRNA construct with affected pollen was examined by selecting randomly 21 plants from each reciprocal cross for PCR genotyping (Figure 3.9). All selected plant with dead pollen carries the amiRNA construct in both reciprocal crosses suggesting a clear cosegregation of amiRNA construct with the abnormal pollen phenotype. Therefore, we conclude that exclusively male but not female gametophyte development was affected by silencing of the three MKKKs.



**Figure 3.9. Co-segregation of abnormal pollen with the amiRNA construct.**

PCR was made from DNA extracted from F1 plants of reciprocal crosses of wild type Col (male parent) and amiRNA P1 and P2 (female parent) using amiRNA specific vector primers. Actin 2 was used to check DNA presence. 21 and 4 plants showing abnormal pollen phenotype and normal phenotype, respectively, were tested in this analysis.

### 3.4.7 Pollen tube growth is affected in simple, double and triple mutants

Since our results revealed that all the three kinases are highly expressed in pollen tubes, it was important to assess whether the reduced fertility of triple knockdown plants was caused by a deficiency in pollen germination and/or pollen tube growth. We performed in vitro pollen tube growth assays in solid PGM for 3h. Double mutant *mkkk20/mkkk21* and triple knockdown amiRNA P1 pollen showed reduced germination percentages (Figure 3.4-a). Also, both simple mutants *mkkk20* and *mkkk21* and double mutant *mkkk20/mkkk21* had shorter pollen tubes, and the effect was more pronounced in triple knockdown amiRNA P1 when compared to wild type pollen (Figure 3.4-b).

### 3.4.8 Yeast two hybrid and possible targets

In order to characterize possible downstream target proteins of the three MKKK19, MKKK20 and MKKK21, we conducted a yeast two-hybrid analysis to screen an *Arabidopsis* cDNAs library. For MKKK19, 26 interactants were identified including EMBRYO DEFECTIVE 3119 (AT3G04790), Spermidine synthase1 (AT1G23820), Aldose reductase (AT5G01670), Arabidopsis Trithorax-Related7 (AT5G42400) and Accelerated Cell Death 11 (AT2G34690). Many more interactants were found in MKKK20 screen with 64 genes including ANXUR2 (AT5G28680), FIMBRIN 1 (AT4G26700), Embryo Sac Development Arrest 3 and 14 (AT2G34860, AT3G60360), MAP kinase 18 (AT1G53510) and kinase like protein (AT2G05940). MKKK21 was found to interact with 43 proteins including Regulatory associated protein of mTOR (RAPTOR1) (AT3G08850), Actin 4 (AT5G59370), ANNEXIN1 (AT1G35720), Serine/Threonine-Protein Phosphatase 7 (AT5G63870), Homolog of Yeast NAR1 (AT4G16440), and Actin 4 (AT5G59370). A full list of all interactants is listed in Supplementary 2. Table VI.

### 3.5 Discussion

Molecular signaling via mitogen-activated protein kinase (MAPK) cascades are involved in many biological processes and also during various biotic and abiotic stresses. We have demonstrated that the *A. thaliana* MKKK20 is involved in cortical microtubules function (Benhamman et al. 2016). Analysis of expression patterns for this kinase revealed a remarkable and strong expression in pollen grains and tubes, therefore, we studied its possible role in reproduction process knowing that two of its orthologues in *Solanum chacoense* species, Fertilization-Related Kinase 1 and 2 (*ScFRK1* and *ScFRK2*), are involved in ovule, pollen and seed developments (Gray-Mitsumune et al. 2006; O'Brien et al. 2007; ). These two kinases belong to the MEKK subfamily and their phylogenetic analysis showed that they share a high similarity to *Arabidopsis* MKKK19, MKKK20 and MKKK21 (Gray-Mitsumune et al. 2006). Even though we found that the three *MKKKs* were expressed in all plant organs, the expression pattern is mostly abundant in reproductive tissues (buds and flower) and in pollen grains and tubes (Figure 3.1 and 3.2). Unlike *ScFRK2*, GUS expressions were not consistently detected in ovules. Therefore expression patterns of *AtMKKK19-21* were neither completely similar to *ScFRK2*, which has been reported to be expressed in fertilized ovules (O'Brien et al. 2007) nor to *ScFRK1* which was detected in ovaries (Lafleur et al. 2015). All *mkkk19-21* single mutants showed no obvious defect possibly due to functional redundancy of these kinases. Function redundancy has been reported among some *AtMEKKs* subgroup members (Krysan et al. 2002; Hashimoto et al. 2012; Chaiwongsar et al. 2006). Consequently, observed growth delay in double mutant *mkkk20/mkkk21* could be complemented by MKKK19 full function. In order to overcome this, we constructed an amiRNA plasmid and we transformed wild type plants. The silencing sequence was expressed under the control of the CaMV 35S promoter, which has been reported to be expressed in pollen (Wilkinson et al. 1997; de Mesa et al. 2004; Coimbra et al. 2009). The differential decrease level of mRNA for different MKKKs transgenic plants depends on the expression strength of amiRNA construct and the T-DNA insertion background of each transformed line. However, many selected plants showed a significant reduction of expression levels for the three kinases. The WMD3 web microRNA designer system for gene silencing seems to be specific to MKKK19-21 targets since expression levels of their closest ATMAPKKs, MKKK14 and MKKK15, were not affected.

The amiRNA plants showed many abnormal developmental aspects starting from the growth delay, similar to double mutant *mkkk20/mkkk21*, which imply the possible involvement of these kinases in plant development processes other than reproduction. In fact, GUS reporter showed the expression of these kinases in vegetative tissues (roots and leaves), and *AtMKKK20* has been shown to be involved in osmotic stress via regulation of MPK6 activity (Kim et al. 2012). Likewise, other members of this MEK subgroup (MEKK1, MKKK2, MKKK3, MKKK18, etc.) were reported to be involved in a wide range of biological process (Meng and Zhang 2013; Rodriguez et al. 2010; Matsuoka et al. 2015). Otherwise, MKKK19-21 knockdown seems to affect mainly male gametophyte function because of the high number of pollen grains that failed to develop properly. Our microscopic observations of microsporogenesis developmental stages showed that amiRNA affects the tricellular pollen stage, as uni- and bicellular pollen percentages remained normal. Ultrastructural analysis showed that the pollen grains of amiRNA mutants had irregular and dramatically deformed shape. A similar phenotype has been observed in many other mutants that affect pollen development (Jakobsen et al. 2005; Drakakaki et al. 2006; Coimbra et al. 2009).

So far, many mutations affecting pollen early-stage development have been characterized. In contrast, little is known about genes involving in the late male gametogenesis. Nevertheless, some genes have been reported to play a crucial role during this stage. Indeed, *Arabidopsis* phosphatase and tensin homolog (*AtPTEN1*) is expressed exclusively in pollen grains during the late stage of development and RNA interference for *PTEN1* caused pollen cell death after mitosis at the beginning of the tricellular stage (Gupta et al. 2002). Also, the autoinhibited  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 9 (*ACA9*) was predicted to be activated by  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin and *aca9* mutant produced a high number of aborted seeds (Schiott et al. 2004). Interestingly, *AtMKKK20* belong to pollen development-related genes that are co-expressed with *Arabidopsis* Shaggy-like protein kinases (*ASK $\beta$* ), and the mutation in this gene caused pollen defect during late pollen development (Dong et al. 2015). Considering that *AtMKKK19* and *AtMKKK20* were expressed mainly during tricellular and mature pollen grain (Honys and Twell 2004), it is consistent with the current results that MKKK19-21 may regulate pollen development at late microsporogenesis, considering high percentage of abnormal cells found at the tricellular stage. In addition, mRNAs of many late genes could be stored in dry pollen grains and be

translated during pollen germination. Therefore affect pollen tube growth (McCormick 1993; Borg et al. 2009) and explain the reduction of pollen tube length found in mutants' plants. For MKKK19-21 two-hybrid *Arabidopsis* cDNAs screening, neither *AtMKKKKs* nor *AtMKKs* was found for the three kinases, in contrary to our expectation. The only member of MAPK module was MPK18 that interacts specifically with MKKK20. Also, we did not find any common gene for all MKKKs, and MKKK20 has more interactants than MKKK19 and MKKK21. Of course, the most interesting genes category should be those were functionally related to plant reproduction especially male gametogenesis. Among those genes interacting with MKKK20, Reversibly Glycosylated Polypeptide 1 (RGP1) (AT3G02230) and RGP2 were found to be essential for pollen development since the *rgp1/rgp2* double mutant resulted in pollen mitosis defect causing plant lethality (Drakakaki et al. 2006). Two receptor-like kinases STRUBBELIG-RECEPTOR (SRF6) (AT1G53730) and ANXUR2 (ANX2) (AT5G28680) could play a role in pollen development. Ectopic expression of several SRFs genes resulted in male sterility (Eyuboglu et al. 2007). ANX1 and ANX2 are crucial for controlling pollen tube rupture at the proper time (Miyazaki et al. 2009; Mizuta and Higashiyama 2014). Additionally, EXPORTIN1 (XPO1B) (AT3G03110) is important for female and male gametogenesis since *xpo1A/xpo1B* double mutants have smaller pollen grain, poor pollen germination and shorter pollen tubes (Blanvillain et al. 2008). Besides, the orthologue of FIMBRIN1 (AT4G26700) was found to regulate pollen growth tip through actin organisation in lily plant (*Lilium longiflorum*) (Su et al. 2012). In the case of MKKK21, Phenylalanine Ammonia-Lyase 2 (PAL2) (AT3G53260) plays multiple roles in plants including pollen development, because the *pal1/pal2* double mutant produced 11% of wild type pollen (Huang et al. 2010). Furthermore, the expression level of HSP40/DnaJ peptide-binding protein (AT1G44160) is strongly decreased in the male gametogenesis impaired (*mia*) anthers insertion mutation. MIA is essential in the secretory pathway for vesicle cargo secretion to the plasma membrane and *mia* mutant produced fragile pollen grains that failed to dissociate from tetrads (Jakobsen et al. 2005). In addition, ACT4 (AT5G59370) was found to be related to ARO1 which is expressed exclusively in egg and vegetative cell of the male gametophyte and is involved in the signaling network controlling tip growth and regulating actin organization in pollen (Gebert et al. 2008).



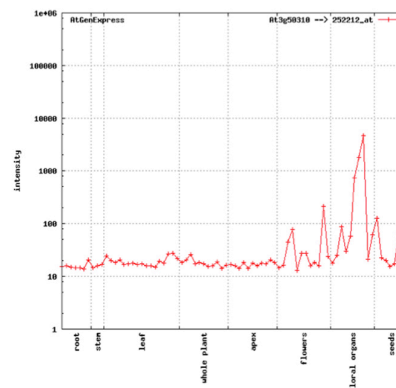
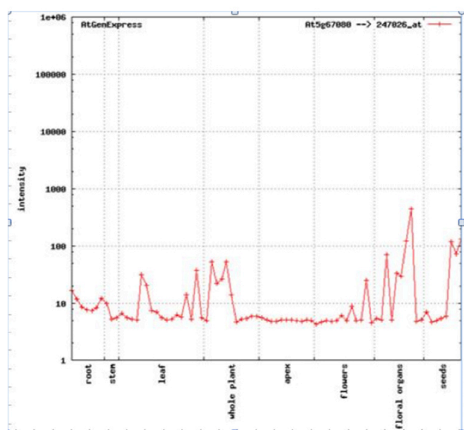
Other interactants were involved in embryonic development, such as *embryo defective 3119* (AT3G04790) that interacts with MKKK19 and MKK21 (Kubis et al. 2004). In addition, *embryo sac development arrest 3* protein (AT2G34860), that caused the arrest of embryo sac at the two-nuclear stage (Pagnussat et al. 2005) was found to interact with MKKK20. Also RAPTOR1 (AT3G08850) that interacts with MKKK21 has been reported to play an important role during early embryo development (Deprost et al. 2005).

Overall, the Y2H screen revealed some interested genes that are involved directly in pollen development and could be good targets for MKKK19-21. Otherwise, these kinases could activate some genes that play an indirect role in pollen development. Indeed, MKKK20 and MAPK18 were reported to be involved in microtubules regulation in *Arabidopsis* (Walia et al., 2009, Benhamman et al., 2016). MKKK19-21 were highly expressed inside pollen tubes and we found that *mkkk20/mkkk21* and amiRNA P1 have shorter pollen tube. MKKK20 might thus play a role in pollen tube growth via microtubule regulation processes. In addition, MOR1 known to play a crucial role in microtubule organisation (Lechner et al. 2012) could be activated by MKKK20 since MOR1 was among the MKKK20 interactants. Interestingly, several studies demonstrated a possible role of microtubules in pollen tube growth, as summarized in a recent review (Onelli et al. 2015). Lastly, DUO1 may activate the expression of MKKK20 after the second mitotic division because both genes were expressed during late pollen development. The promoter sequence of MKKK20 that showed an overrepresentation of MYB binding sites (Borg et al. 2011).

The identification of those *in vivo* interacting substrates for the three MAPKKs represents an important step to discover possible phosphorylation pathways that could be involved in *Arabidopsis* pollen development. Additional studies are required to dissect the precise molecular mechanism behind our observations and to shed light on the regulation of pollen development.

### 3.6 Supplementary data

AtGenexpress



Genevestigator

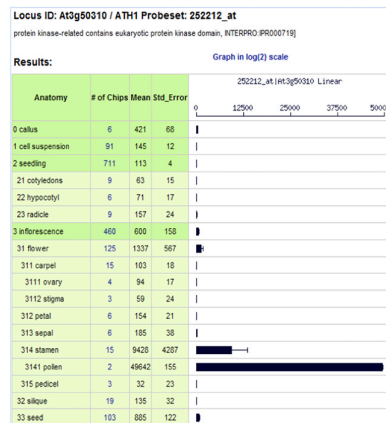
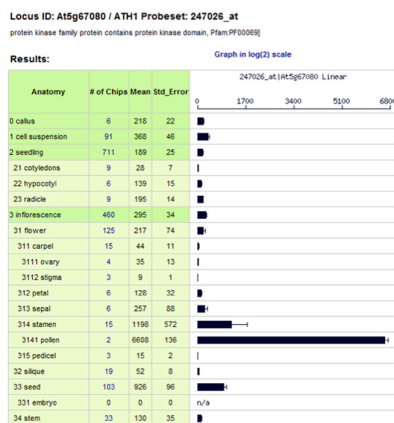
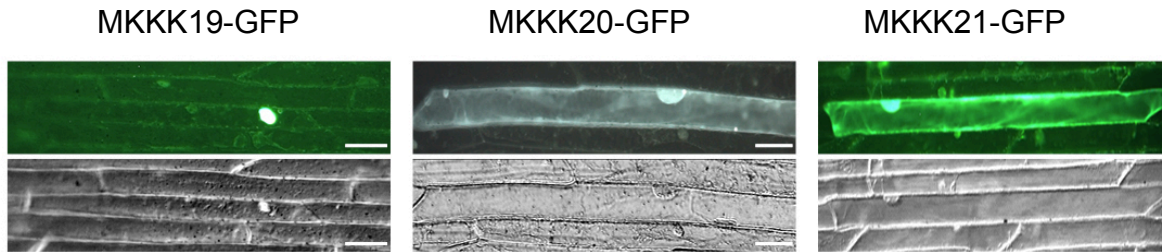


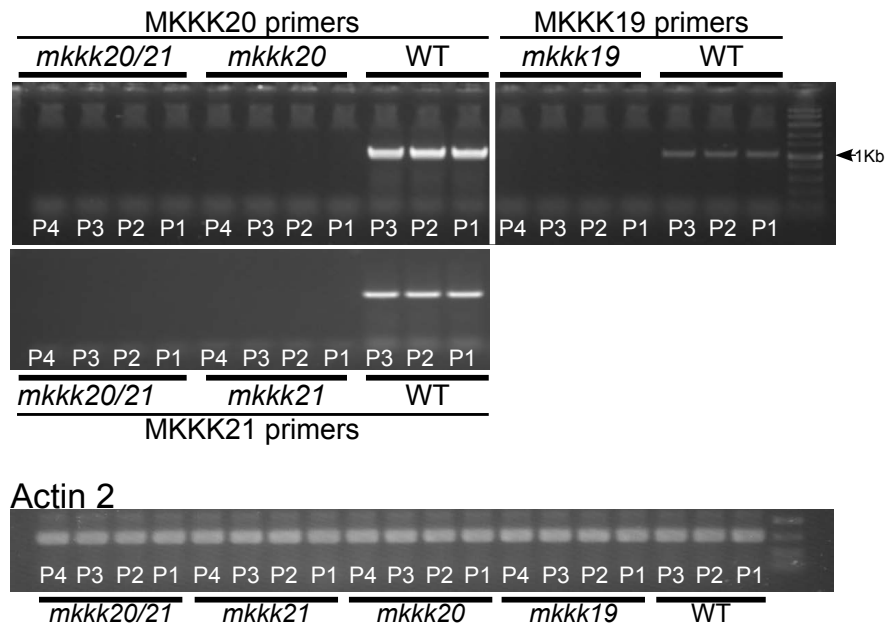
Figure S 3.1. *MKCK19-21* In silico gene expression analysis

A typical output from AtGenexpress and Genevestigator online tool. Both *MKCK19* and *MKCK20* were highly expressed inside flowers comparing to other organs. More specifically, Genevestigator showed that *MKCK19* and *mckk20* were highly expressed in pollen.



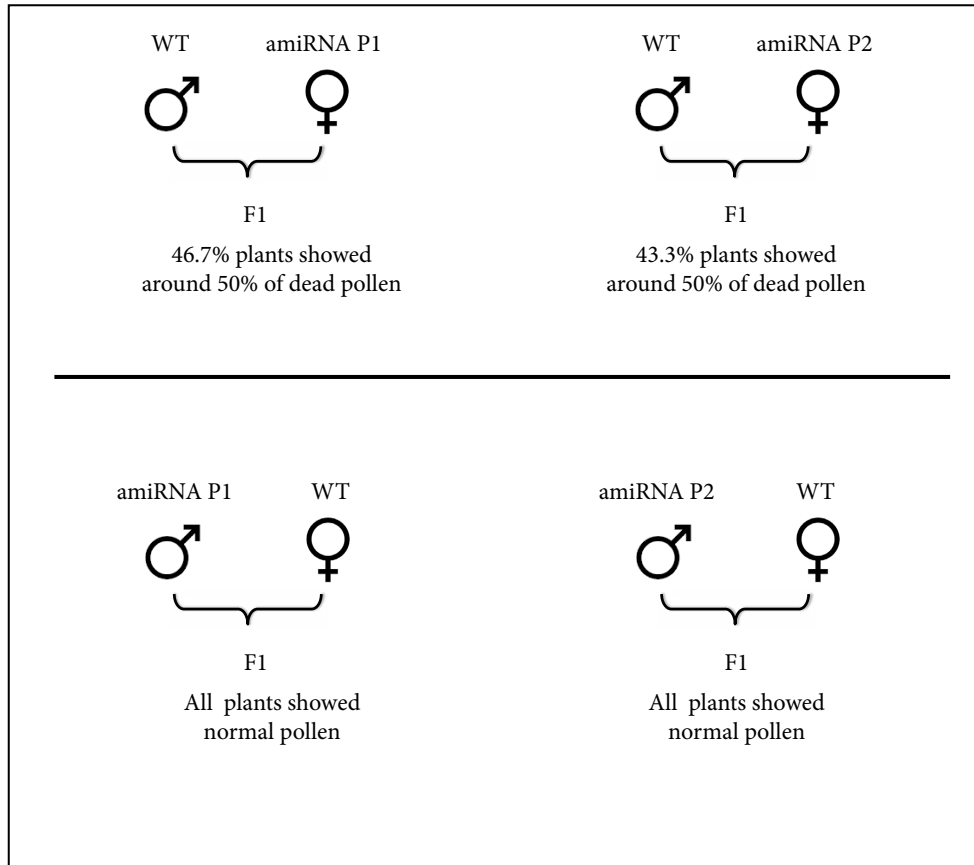
**Figure S3.2. MKKK19-21 subcellular localization**

The three kinase coding regions were fused in-frame to the N-terminus of GFP in pMDC83 vector. Epifluorescence (upper layer) and bright field (lower layer) images of epidermal leaf onion cells. Scale bar=50  $\mu$ m



**Figure S 3.3. *mkkk19-21* knockout mutants**

RT-PCR showing lack of MKKK19-21 transcripts in 10-day-old whole seedlings of *mkkk19-21* mutants. Three different plants from WT (P1 to P2) and four different plants for each *mkkk*'s mutant (P1 to P4) were shown. Expression of the *Arabidopsis* Actin2 gene was used as an internal control.



**Figure S3.4. Diagram of reciprocal crosses.**

MKKK19-21 amiRNA silencing affects exclusively the male gametophyte.

Wild type pollen was used to fertilize amiRNA P1/P2 ovules (top). amiRNA P1/P2 were used as male parents and wild type as female (bottom). In total, 90 plants for each cross was analysed for any abnormal phenotype as well as for pollen viability. Only pollen integrity was compromised for some offspring as indicated.

**Supplemental Table 3. I. Primers used for T-DNA insertion mutants.**

Gene	T-DNA line	LP primer	RP primer
MKKK19	CSHL_GT19223	ATTAGCCGGTGAAGGTGTACC	TTGGGTTGATGAAGATGAAGC
MKKK20	SALK_021755	TCGGACAACATCTCTGGAATC	AATATCCGCTTTCATCACGTG
MKKK21	SALK_149019	AGAGATTTTGAGCATGCATGC	AGCTAAACTACCACCGGAAGC
T-DNA primers (LBmgm): CCCGTCTCACTGGTGAAAAGAAA			

**Supplemental Table 3.II. Primers used for RT-PCR**

RT-PCR primers		
MKKK19	L: 5' GACGTTTTAGTCAAAGAAGAAGATTC	R: 5' CCGTACGGTGACCCAGCTATT
MKKK20	L: 5' CCAGCGAAAAGATGGACGG	R: 5' TCACCGGACTGTAAGCCAACTC
MKKK21	L: 5' AGATGGACGGCTGAGATGCTT	R: 5' CCTGACGTTGACCCAATCACA
Actine 2	L: 5' GCCATCCCAAGCTGTTCTCTC	R: 5' CCCTCGTAGATTGGCACAGT
MKKK14	L: 5' ACGGAGTTGGCGTCGGCAGTG	R: 5' AGACCGATCCGAATCACATGC
MKKK15	L: 5' CTCGCCGGAGACGAGAGTTCC	R: 5' AACAAGAATTTGTAATGTGGC

**Supplemental Table 3.III. Primers used for GUS staining experience construct (Gateway® adapted)**

Name	Sequence
<b>MKKK19</b>	
M19-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTTTATTTTCTCCTTTTCTTTTGTGAA
M19-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTGAAGCAAATCTACGACACGG
<b>MKKK20</b>	
M20-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGGCAATCATGCCATTACGACC
M20-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGAAATTGAAACAAAAGCTTTTAAGA
<b>MKKK21</b>	
M21-F	5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGGTCACTACTCCTTATGGTGGAAATT
M21-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTAGTTAACAGAGAAGAAGAAGAAGAAA

**Supplemental Table 3.IV. Primers used for intracellular localization construct by GFP (Gateway® adapted)**

Name	Sequence
<b>MKKK19</b>	
M19-F	5'- GGGGACAAGTTTCTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGAGTGGATTTCGAGGA
M19-R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACCGTACGGTGACCCA
<b>MKKK20</b>	
M20-F	5'- GGGGACAAGTTTCTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGAGTGGGTTTCGAGGA
M20-R	5'- GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACCGGACTGTAAGCCA
<b>MKKK21</b>	
M21-F	5'- GGGGACAAGTTTCTACAAAAAAGCAGGCTTTATGGAGTGGATTTCGTAGAGAA
M21-R	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCACCTGACGTTGACCCA

Plant genotype	Viable pollen	Dead pollen
Wild Type P1	693 (97.88%)	15 (2.12%)
<i>mkkk19</i>	702 (95.64%)	32 (4.36%)
<i>mkkk21</i>	724 (97.31%)	20 (2.69%)
<i>mkkk21</i>	780 (96.77%)	26 (3.23%)
<i>mkkk20/mkkk21</i>	858 (93.57%)	59 (6.43%)

**Supplemental Table 3.V: Pollen viability of single and double mutants vs. wild type.**

Pollen was stained with 1% aceto-carmin. While viable pollen grains are stained in pink, dead pollen cells are empty, unstained and shriveled shells. Pollen integrity was not compromised for all mutants as they contained approximately the same amount of viable pollen as in wild type.

**Supplemental Table 3.VI. List of MKKK19, 20 and 21 interactants (X= nombre of time found in Y2H screen)**

	Associated No	X	Name of Gene	Description/Fonction
<b>MKKK19</b>	1	1	Invertase/Pectin Methyltransferase Inhibitor Family Protein	Functions in enzyme inhibitor activity, pectinesterase inhibitor activity, pectinesterase activity
	2	1	Glycosyl Transferase Family 17 Protein	Beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase family protein
	3	1	Chaperonin	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein
	4	1	ATL4H; Protein Binding / Zinc Ion Binding (At14h)	Putative RING-H2 finger protein ATL4H
	5	1	Aldose Reductase-Like Protein	NAD(P)-linked oxidoreductase superfamily protein
	6	1	Spermidine Synthase (SPDS1)	Functions in spermidine synthase activity, involved in spermidine biosynthetic process
	7	1	Fatty Acid Hydroxylase (FAH1)	Encodes a fatty acid hydroxylase, required for the AtBI-1-mediated suppression of programmed cell death.
	8	1	60s Ribosomal Protein L10 (RPL10c)	Senescence associated gene 24 (SAG24)
	9	1	Suppressor Of Acaulis 52 (Sac52)	Encodes a ribosomal protein L10 and may be involved in translation regulation
	10	1	Rubredoxin-Like Superfamily Protein	Cytochrome-c oxidase activity, cobalt ion binding, zinc ion binding, metal ion binding;
	11	1	Arabidopsis Trithorax-Related7, ATXR7,	Required for histone H3-K4 methylation and for transcriptional activation of Flowering Locus C
	12	1	Plasmodesmata Callose-Binding Protein 4 (PDCB4)	Encodes a ribosomal protein L10 and may be involved in translation regulation
	13	1	RING/U-box superfamily protein	Functions in zinc ion binding
	14	2	P-Loop Containing Nucleoside Triphosphate Hydrolases Superfamily Protein	Functions in guanylate kinase activity
	15	2	Breast Basic Conserved 1	Encodes 60S ribosomal protein L13
	16	1	Accelerated Cell Death 11 (ACD11)	Gene product transports the glycolipid precursor sphingosine between membranes in vitro
	17	1	F-Box Family Protein	RNI-like superfamily protein
	18	1	Embryo Defective 3119 (Emb3119)	Function in Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein
	19	2	Putative Ribosomal Protein L11	Encodes a cytosolic ribosomal protein L16, which is a constituent of 60S large ribosomal complex
	20	1	NOD26-Like Intrinsic Protein 7;1 (NIP7;1)	Encodes NIP7;1, an anther-specific boric acid transporter of the aquaporin superfamily regulated by an unusual tyrosine in helix 2 of the transport pore
	21	1	Zinc Finger (GATA Type) Family Protein	Encodes a member of the GATA factor family of zinc finger transcription factors
	22	2	ADP/ATP carrier 2 (AAC2)	Encodes mitochondrial ADP/ATP carrier
	23	1	Expansin A5 (Expa5)	Encodes an expansin
	24	1	Expansin A9 (ATEXPA9)	Member of Alpha-Expansin Gene Family
	25	1	Heavy Metal Associated Isoprenylated Plant Protein 25	Heavy metal transport/detoxification superfamily protein
	26	1	Actin Depolymerizing Factor 3 (ADF3)	Encodes actin depolymerizing factor 3 (ADF3)

MKK20	1	AT1G22410	1	Class-II DAHP Synthetase-Like Protein	Functions in 3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase activity
	2	AT2G36000	1	Embryo Defective 3114	Mitochondrial transcription termination factor family protein
	3	AT5G29000	1	Myb Family Transcription Factor	Homeodomain-like superfamily protein
	4	AT5G28680	1	ANXUR2 (ANX2)	Receptor-like kinase required for maintenance of pollen tube growth
	5	AT3G05910	1	Pectin Lyase-Like Protein	Functions in carboxylesterase activity
	6	AT1G51200	1	A20/AN1-like zinc finger family protein	Functions in DNA binding, zinc ion binding
	7	AT2G34860	1	Embryo Sac Development Arrest 3 Protein (EDA3)	Functions in unfolded protein binding, heat shock protein binding
	8	AT5G59880	1	Actin Depolymerizing Factor 3 (ADF3)	Encodes actin depolymerizing factor 3 (ADF3)
	9	AT1G53510	1	Mitogen-Activated Protein Kinase 18 (AtMAPK)	MAPK18 involved in cortical microtubule function
	10	AT5G56160	1	Sec14p-Like Phosphatidylinositol Transfer-Like Protein	Encodes Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein
	11	AT3G26920	1	FBD And Leucine Rich Repeat Domain-Containing Protein	Encodes FBD / Leucine Rich Repeat domains containing protein
	12	AT4G26700	1	Fimbrin 1 (Fim1)	Encodes fimbrin-like protein
	13	AT1G06190	1	Rho Termination Factor	Encodes a novel ribonucleic acid-binding protein that interacts with the endonuclease RNase E and supports its function in processing plastid ribonucleic acids
	14	AT3G26900	1	Shikimate Kinase Like (SKL1).	Encodes a protein with some sequence similarity to shikimate kinases
	15	AT3G09890	1	Ankyrin Repeat-Containing Protein.	Encodes Ankyrin repeat family protein
	16	AT4G13170	1	60s Ribosomal Protein L13a-3	Ribosomal protein L13 family protein
	17	AT2G01250	1	60s Ribosomal Protein L7-2	Ribosomal protein L30/L7 family protein;
	18	AT4G14330	1	Phragmoplast-Associated Kinesin-Related Protein2.	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein
	19	AT4G16860	1	Disease Resistance RPP4-Like Protein	Confers resistance to <i>Peronospora parasitica</i>
	20	AT5G51110	1	Transducin/Wd40 Domain-Containing Protein	Transcriptional coactivator/pterin dehydratase
	21	AT5G23450	1	Sphingoid Long-Chain Bases Kinase 1	Encodes a sphingosine kinase that specifically phosphorylates D-erythro-dihydrosphingosine (DHS)
	22	AT5G20290	1	40s Ribosomal Protein S8-1	Ribosomal protein S8e family protein
	23	AT2G34860	1	Embryo Sac Development Arrest 3 (EDA3)	Function in unfolded protein binding, heat shock protein binding;
	24	AT3G55850	1	Amidohydrolase Family Protein (LAF3)	Encodes a product that might regulate nucleo-cytoplasmic trafficking of an intermediate(s) involved in phyA signal transduction
	25	AT1G60240	1	No Apical Meristem Domain-Containing Protein.	NAC (No Apical Meristem) domain transcriptional regulator superfamily protein
	26	AT1G08880	1	Putative Histone H2axa (H2axa)	Encodes HTA5, a histone H2A protein



27	AT3G05100	1	S-Adenosylmethionine-Dependent Methyltransferase Domain-Containing Protein	Encodes S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein;
28	AT3G13445	1	Putative Transcription Initiation Factor TFIID-1	TBP (TATA binding protein) associates with TAF(II)s (TBP-associated factors) to form the TFIID general transcription factor complex
29	AT3G02230	2	Reversibly Glycosylated Polypeptide 1 (RGP1).	RGP1 is a UDP-arabinose mutase that catalyzes the interconversion between the pyranose and furanose forms of UDP-L-arabinose
30	AT1G29260	1	Peroxisomal Targeting Signal Type 2 Receptor (PEX7)	Encodes the peroxisomal targeting signal type 2 receptor that facilitates peroxisomal protein translocation
32	AT2G47460	1	ATMYB12 (MYB12)	MYB12 belongs to subgroup 7 of the R2R3-MYB family.
34	AT5G47190	1	Ribosomal protein L19 family protein	Functions in structural constituent of ribosome
35	AT4G34150	1	Calcium-Dependent Lipid-Binding Domain-Containing Protein.	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
36	AT5G40710	1	C2H2 Type Zinc Finger Protein.	Function in: zinc ion binding, nucleic acid binding
37	AT5G12420	1	O-Acyltransferase (WSD1-Like)	Encodes O-acyltransferase (WSD1-like) family protein
38	AT4G30140	1	GDSL Esterase/Lipase (CDEF1)	Member of the GDSL lipase/esterase family of proteins that functions as cutinase. Expressed in pollen and at the zone of lateral root emergence
39	AT4G03550	1	Callose Synthase 12 (Gsl05)	Encodes a callose synthase that is required for wound and papillary callose formation in response to fungal pathogens Erysiphe and Blumeria
40	AT4G23290	1	Cysteine-Rich Receptor-Like Protein Kinase 21	Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase
41	AT2G35630	1	Microtubule Organization 1 Protein (MOR1)	Member of the MAP215 family of microtubule-associated proteins required to establish interphase arrays of cortical microtubules
42	AT5G16650	1	Chaperone Dnaj-Domain Containing Protein	Functions in unfolded protein binding, heat shock protein binding
43	AT1G71410	1	Armadillo/Beta-Catenin-Like Repeats-Containing Protein	Functions in binding, protein kinase activity, kinase activity, ATP binding
44	AT3G60360	1	Embryo Sac Developmet Arrest 14 (EDA14)	Encodes Embryo Sac Developmet Arrest 14.
45	AT5G53150	1	DNAJ Heat Shock N-Terminal Domain-Containing Protein	Functions in unfolded protein binding, heat shock protein binding
46	AT5G04390	1	C2H2-Type Zinc Finger Protein	Functions in zinc ion binding and nucleic acid binding
47	AT1G50490	1	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 20 (UBC20)	Encodes one of two ubiquitin-conjugating enzymes belonging to the E2-C gene family (the other being UBC19)
48	AT4G01070	1	Utp-Glucose Glucosyltransferase	The glucosyltransferase (UGT72B1) is involved in metabolizing xenobiotica (chloroaniline and chlorophenole)
49	AT3G57680	1	Peptidase S41 Family Protein	Functions in serine-type peptidase activity
50	AT5G53140	1	Protein Phosphatase 2C	Functions in protein serine/threonine phosphatase activity, catalytic activity
51	AT1G74180	1	Receptor Like Protein 14 (RLP14)	Encodes receptor like protein

MKK20	52	AT4G24690	1	Ubiquitin-Associated (Uba) Zinc-Finger And Pb1 Domain-Containing Protein	Encodes NBR1, a selective autophagy substrate
	53	AT1G53730	1	Strubbelig-Receptor 6 (SRF6)	Functions in protein serine/threonine kinase activity, protein kinase activity, ATP binding
	54	AT1G72370	1	40s Ribosomal Protein Sa-1	Acidic protein associated to 40S ribosomal subunit of ribosomes
	55	AT2G34720	1	Nuclear Transcription Factor Y Subunit A-4 (NF-YA4)	Encodes nuclear factor Y, subunit A4 (NF-YA4)
	56	AT2G05940	1	RPM1-INDUCED PROTEIN KINASE (RIPK)	Encodes a receptor-like cytoplasmic kinase that phosphorylates the host target RIN4, leading to the activation of a plant innate immune receptor RPM1
	57	AT2G23810	1	Tetraspanin8 (Tet8)	Member of TETRASPANIN family
	58	AT5G16480	1	Tyrosine Specific Protein Phosphatase Family Protein	Encodes an atypical dual-specificity phosphatase
	59	AT5G38435	1	S-Protein Homologue 8 (SPH8)	Self-incompatibility (S) protein homolog
	60	AT5G56760	1	Serine Acetyltransferase 5 (SERAT1;1)	Encodes a cytosolic serine O-acetyltransferase involved in sulfur assimilation and cysteine biosynthesis.
	61	AT3G13445	1	TATA-Box-Binding Protein 1 (TBP1)	TBP (TATA binding protein) associates with TAF(II)s (TBP-associated factors) to form the TFIID general transcription factor complex
	62	AT3G08850	1	Regulatory Associated Protein of MTOR (RAPTOR1).	Encodes one of two Arabidopsis RAPTOR/KOG1 homologs
	63	AT5G51750	1	Putative Subtilisin Serine Protease	Functions in identical protein binding, serine-type endopeptidase activity
	64	AT3G03110	1	Exportin 1B (XPO1B)	Encodes a member of the exportin family (XPO1B) which function as receptors for nuclear transport

MKKK21	1	AT4G25100	1	FE Superoxide Dismutase (FSD1)	Involved in oxidative stress
	2	AT3G23510	1	Cyclopropane-Fatty-Acyl-Phospholipid Synthase	Functions in cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase activity
	3	AT2G28790	1	Pathogenesis-Related Thaumatin-Like Protein	Encodes pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
	4	AT5G07840	1	Phytochrome Interacting Ankyrin-Repeat Protein 1, PIA1	Ankyrin repeat family protein
	5	AT1G13635	2	DNA-3-Methyladenine Glycosylase I	Involved in DNA repair, base-excision repair
	6	AT1G44160	1	HSP40/DnaJ Peptide-Binding Protein	Functions in unfolded protein binding, heat shock protein binding, involved in protein folding
	7	AT3G04790	1	Embryo Defective 3119 (Emb3119)	Function in Ribose 5-phosphate isomerase, type A protein
	8	AT1G74370	1	Ring/U-Box Domain-Containing Protein	Functions in zinc ion binding
	9	AT3G53260	1	Phenylalanine Ammonia-Lyase 2 (PAL2)	Phenylalanine ammonialyase (PAL) catalyzes the first step in the biosynthesis of phenylpropanoids (complex class of secondary metabolites)
	10	AT1G35720	1	Annexin 1	Encodes a member of the annexin gene family, a diverse, multigene family of calcium-dependent, membrane-binding proteins.
	11	AT3G54210	1	Ribosomal Protein L17-Like Protein	Functions in structural constituent of ribosome
	12	AT3G23400	1	FIBRILLIN 4 (FIB4)	Encodes FIBRILLIN 4 (FIB4). The fibrillins are a large family of chloroplast proteins that have been linked with stress tolerance and disease resistance
	13	AT1G73655	1	FKBP-Like Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase-Like Protein	Functions in FK506 binding, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity
	14	AT2G34470	1	Urease accessory protein G (UREG)	Encodes a urease accessory protein which is essential for the activation of plant urease
	15	AT2G04700	1	Ferredoxin-Thioredoxin Reductase Catalytic Chain	Functions in ferredoxin, thioredoxin reductase activity, ferredoxin reductase activity
	16	AT1G73655	1	FKBP-Like Peptidyl-Prolyl Cis-Trans Isomerase	Functions in FK506 binding, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity
	17	AT1G70790	1	C2-DOMAIN ABA-RELATED 9, CAR9	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
	18	AT4G17830	2	N2-acetylornithine deacetylase (ATNAOD)	Peptidase M20/M25/M40 family protein
	19	AT3G15640	1	Rubredoxin-Like Superfamily Protein;	Functions in cytochrome-c oxidase activity, cobalt ion binding, zinc ion binding, metal ion binding
	20	AT3G02360	1	6-Phosphogluconate Dehydrogenase	Involved in response to salt stress
	21	AT1G70790	1	C2-DOMAIN ABA-RELATED 9	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein
	22	AT1G71980	1	Protease-associated (PA) RING/U-box zinc finger family protein	Functions in peptidase activity, zinc ion binding
	23	AT2G43370	2	RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein	Functions in RNA binding, nucleotide binding, nucleic acid binding

24	AT2G47460	1	MYB Domain Protein 12 (ATMYB12)	MYB12 belongs to subgroup 7 of the R2R3-MYB family
25	AT1G54780	1	Thylakoid Lumen 18.3 KDa Protein	Function in egulating photosystem II repair cycle. Has acid phosphatase activity
26	AT5G63870	1	Serine/Threonine-Protein Phosphatase 7 (PP7)	Encodes a nuclear localized serine/threonine phosphatase that appears to be regulated by redox activity and is a positive regulator of cryptochrome mediated blue light signalling
27	AT4G16440	1	Homolog of Yeast NAR1	Encodes a [FeFe]-hydrogenase-like protein named Gollum
28	AT5G50870	1	Ubiquitin-Conjugating Enzyme E2 27	Encodes ubiquitin-conjugating enzyme 27 (UBC27)
29	AT3G08850	1	Regulatory Associated Protein of MTOR (Raptor1)	RAPTOR proteins are binding partners of the target of rapamycin kinase that is present in all eukaryotes and play a central role in the stimulation of cell growth and metabolism in response to nutrients.
30	AT4G25100	1	Fe superoxide dismutase 1 (FSD1)	Encodes FE-Superoxide dismutase
31	AT4G33510	1	3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase	Enzyme catalyzing the first committed step in aromatic amino acid biosynthesis
32	AT2G21620	1	Responsive to desiccation 2 (RD2)	Encodes gene that is induced in response to dessication
33	AT5G59370	1	Actin 4 (ACT4)	Encodes one of eight Arabidopsis actins. ACT4 belongs to the reproductive actin subclass which is predominantly
34	AT5G13570	1	DECAPPING 2	Encodes DCP2 with mRNA decapping activity
35	AT3G21300	1	RNA Methyltransferase Family Protein	Functions in RNA binding, RNA methyltransferase activity
36	AT1G02410	1	Cytochrome c oxidase 11 (COX11)	Encodes a member of the cytochrome c oxidase 11 protein family
37	AT1G19180	1	Jasmonate-zim-domain protein 1 (ATJAZ1)	JAZ1 is a nuclear-localized protein, involved in jasmonate signaling
38	AT3G61415	1	SKP1-Like Protein 21 (Sk21)	Functions in ubiquitin-protein ligase activity
39	AT4G22240	1	FIBRILLIN 1B (FBN1B)	Plastid-lipid associated protein PAP / fibrillin family protein;
40	AT1G33120	1	Ribosomal Protein L9	Functions in structural constituent of ribosome, rRNA binding
41	AT2G30590	1	WRKY DNA-Binding Protein 21	Encodes WRKY DNA-binding protein 21 (WRKY21)
42	AT4G01070	1	UDP-Glucose-Dependent Glucosyltransferase 72 B1,	Involved in metabolizing xenobiotica (chloroaniline and chlorophenole)
43	AT3G55850	1	LONG AFTER FAR-RED 3 Isoform 1	Encodes a product that might regulate nucleo-cytoplasmic trafficking of an intermediate(s), involved in phytochromeA signal transduction

## **IV. Discussion générale et perspective**

### **1- Le choix des MKKK19, 20 et 21 comme sujet de la thèse**

Mes travaux de recherche dans le cadre de cette thèse ont été centrés sur le rôle de trois protéines kinases de la sous-famille des MEKKs, les MKKK19, MKKK20 et MKKK21 chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Le choix de ces trois kinases représente une continuité aux projets des recherches précédents dans notre laboratoire, menés chez la pomme de terre sauvage *Solanum chacoense* sur une famille de protéines kinases que nous avons nommé FRK pour *Fertilization-related kinases*. En effet, il avait été démontré que des mutations dans les gènes *ScFRK1*, 2 et 3, menaient à un arrêt du développement de gamétophytes mâles (pollen) et femelles (sac embryonnaire) (Daigle and Matton 2015; Gray-Mitsumune et al. 2006; Lafleur et al. 2015; O'Brien et al. 2007). De façon à tirer profit de toutes les ressources génétiques d'une plante considérée comme espèce modèle, à savoir *Arabidopsis thaliana*, mes travaux se sont donc concentrés sur les orthologues potentiels des kinases *ScFRK* chez *A. thaliana*, soit les MKKK19 à 21. Sachant que le génome de cette plante a été complètement séquencé, ceci permettait aussi d'établir un inventaire précis des gènes potentiellement impliqués dans les voies de signalisation impliquant les MKKK19, 20 et 21.

### **2- Les voies MAPK chez *Arabidopsis thaliana***

Les MAPKs représentent des voies de signalisation conservées qui permettent la transduction des signaux environnementaux ou développementaux vers une réponse cellulaire adaptée et programmée. Dans le modèle canonique, calqué sur des données obtenues tant chez la levure que sur des modèles animaux, la stimulation d'un récepteur transmembranaire active une MKKK qui active une MKK, cette dernière activant à son tour une MAPK (MPK). Une fois activée, la MAPK ciblera par la suite des protéines cytoplasmiques ou nucléaires incluant diverses protéines dont des enzymes, des facteurs de transcription ou d'autres protéines kinases (Rodriguez et al. 2010). Chez *Arabidopsis*, on retrouve 20 MAPKs, 10 MKK et plus de 60 MKKKs (Ichimura and Group 2002). Les trois MKKKs, 19, 20 et 21 appartiennent à la sous-famille des MEKKs. Pour caractériser la fonction de ces kinases, nous avons procédé dans un premier temps au criblage d'une banque d'ADNc des transcrits d'*Arabidopsis* par la méthode dite de double-hybride chez la levure afin d'identifier les possibles substrats de ces

kinases. Ceci nous a permis d'identifier de multiples partenaires potentiels avec qui les MKKK19-21 pourraient former des cascades de MAPK. Parallèlement nous avons analysé les phénotypes de plantes mutantes pour ces trois kinases (mutants insertionnels T-DNA) afin de cerner leurs rôles biologiques.

### **3- Un membre inattendu de la voie MAPK identifié dans le criblage de la banque d'ADNc**

Pour isoler des protéines qui interagissent avec les MKKK19-21, une banque d'ADNc d'*Arabidopsis* construite à partir d'une vaste sélection de tissus incluant plantules, feuilles, fleurs, bourgeons, pollen, siliques et tiges a été criblée. Bien que les MKKKs puissent activer une ou plusieurs MKK(s), ils représentent eux-mêmes la cible d'autres protéines activatrices, dont des MAPKKKs (Dan et al. 2001). Ainsi, un criblage non-ciblé permettait de caractériser non seulement les cibles en aval, mais aussi les éléments situés en amont des trois MKKK19-21. Le résultat du criblage de la banque d'ADNc d'*Arabidopsis* nous a fourni une liste de gènes forts intéressants répartis sur plusieurs catégories fonctionnelles pertinentes. La liste inclut des facteurs de transcription, des protéines kinases et récepteurs kinases, des phosphatases et autres. Ces interactants sont liés fonctionnellement à plusieurs processus biologiques, principalement la reproduction sexuée, la signalisation cellulaire, et la régulation du cytosquelette. La MKKK20 semble interagir avec un plus grand nombre de gènes que les MKKK19 et MKKK21. On note également qu'aucun de ces interactants n'est commun pour les trois MKKKs, alors que le gène *embryo defective 3119* (AT3G04790) codant pour une ribose 5-phosphate isomérase est le seul commun à MKKK19 et MKKK21.

Contre toute attente, aucune MKK ni MKKKKs n'a été recensée lors des criblages à grande échelle. Ceci pourrait s'expliquer par la nature transitoire des interactions protéine-protéine dans le cas des cascades de signalisation exprimées dans un système exogène (Westermarck et al. 2013). De façon surprenante, le seul membre appartenant au module canonique MAPK retrouvé dans le criblage à grande échelle fut la MPK18, interagissant directement avec la MKKK20. Considérant les conditions très stringentes du criblage dans le système des double-hybride chez la levure, ceci suggère fortement que l'interaction MKKK20-MPK18 n'est pas un artefact. Ceci nous amène à poser deux questions. La première est de savoir si une MKKK peut interagir directement avec une MAPK sans passer par un

intermédiaire, généralement une MKK. La seconde, est-ce que les MKKKs peuvent également interagir avec une protéine en dehors de la voie canonique des MAPK. Quoique rare, il a été démontré chez la luzerne (*Medicago sativa*) qu'une MKKK nommée OMTK1 (*oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1*) interagit directement avec la MAPK MMK3 (*Medicago MAPK 3*) (Nakagami et al. 2004). Pour la deuxième question, chez *Arabidopsis* la MKKK MEKK1 interagit directement avec le facteur de transcription WKRY53, en plus de se lier à la séquence promotrice du gène WKRY53 ayant pour effet d'augmenter son expression (Miao et al. 2007).

#### **4- Une nouvelle direction pour la MKKK20**

La MPK18 a été démontrée jouer un rôle fonctionnel dans la stabilité des microtubules corticaux (MTC) chez *Arabidopsis* (Walia et al. 2009). Plusieurs membres de la cascade MAPK sont impliqués dans des voies de signalisation régulatrices des microtubules (MT) par interaction directe avec les MAPs (*Microtubules Associated Proteins*) (Hamada 2014; Komis et al. 2011). Ainsi, une nouvelle voie d'investigation s'ouvre pour étudier le rôle potentiel de la MKKK20 sur la régulation des MTs. En présence des drogues qui affectent l'organisation des MTs comme l'oryzalin, les racines des mutants de la *MKKK20* deviennent relativement courtes et leur angle d'inclinaison par rapport au plan vertical de la croissance racinaire est différent de celui du type sauvage (Figure 2.5). Ce phénotype lié à la désorganisation des MTC a aussi été observé chez le mutant de la *MPK18*. Ainsi les deux kinases peuvent agir dans la même voie. Bien que plusieurs membres de la cascade MAPK soient liés fonctionnellement aux MTs, la caractérisation des voies complètes impliquées dans ce processus reste très limitée. Cependant, l'une des voies MAPKs bien étudiées pour la régulation du cytosquelette est la voie NACK-PQR chez le tabac (Takahashi et al. 2004). Cette voie comprend la protéine 'kinesin-like' NACK1-2 en amont de la MKKK NPK1, la MAPKK NQK1 et la MAPK NRK1. Chez *Arabidopsis*, les orthologues de cette voie ont été caractérisés et incluent les MKKKs *ANP1-3*, les MAPKKs *MKK6-ANQ* et les MAPKs *MPK4-MPK13* (Nishihama et al. 1997; Soyano et al. 2002; Soyano et al. 2003). Les premières observations chez le double mutant *anp1/anp2* montrent un défaut développemental au niveau des racines, cotylédons, rosettes et feuilles caulinaires suggérant une implication dans la division cellulaire et la cytokinèse (Beck et al. 2010; Beck et al. 2011; Krysan et al. 2002). Alors que l'utilisation

des drogues de dépolymérisation des MTs dévoile une perturbation des MTC démontrant que la voie ANP affecte généralement l'organisation et la stabilité des MTC (Beck et al. 2010).

Les mutants de la *MPK6* (*mpk6-1*, *mpk6-2*, *mpk6-3*) sont aussi défectifs au niveau de la détermination du plan de division cellulaire pendant la phase précoce du développement racinaire chez *Arabidopsis*, alors que les MTC ne sont pas visiblement affectés (Muller et al. 2010). Le module *AtMKK1/AtMPK6* est impliqué dans la signalisation de l'acide abscissique dans la graine d'*Arabidopsis* (Xing et al. 2009). *MPK6* se trouve aussi dans la cascade Yoda (MKKK4)-MKK4/5 impliquée dans le 'patterning' des stomates (Bergmann et al. 2004). À noter que le phénotype lié à la perturbation du plan de division chez le mutant *mpk6* est similaire à celui de *yoda* au niveau racinaire (Muller et al. 2010). Cependant une liaison fonctionnelle entre les MEKK1, MKK1 et MKK2 d'une part et la *MPK6* d'autre part n'a pas été établie dans ce contexte biologique.

#### **5- Émergence d'une voie MAPK impliquée dans la régulation des MTs.**

Considérant la conservation de la voie canonique des MAPKs, à savoir, une suite MKKK-MKK-MPK, même si la MKKK20 interagit directement avec la *MPK18*, il n'est pas impossible que la MKKK20 agisse en tant que protéine d'échafaudage (*scaffold protein*) pour la *MPK18* et que cette dernière interagisse aussi avec une MKK. Un deuxième criblage en double-hybride a donc été réalisé, cette fois-ci ciblant uniquement les 10 MKKs d'*Arabidopsis*. Ce criblage a démontré que seule la MKK3 avait la capacité d'interagir avec la MKKK20 (Figure 2.1). Ce résultat a été confirmé chez le colza (*Brassica napus*), où les orthologues d'*AtMKKK20* et *AtMKK3* (*BnaMKKK20* et *BnaMKK3*) interagissent fortement dans un double-hybride, de même qu'en complémentarité bimoléculaire (BiFC) (Sun et al. 2014). Par conséquent, l'*AtMKKK20* peut être placé en amont de l'*AtMKK3* dans une cascade de signalisation MAPK. Étant donné que la MKKK20 interagit avec la MKK3, il sera ainsi important de chercher les éléments en aval qui pourraient être associés à ce module. Il a été démontré que MKK3 interagit avec *MPK7* (Lee et al. 2008), et que la cascade MKK3/*MPK7* est impliquée dans la réponse au pathogène *Pseudomonas syringae* (Doczi et al. 2007). MKKK20 pourrait ainsi être placée en amont de cette voie qui serait impliquée dans la défense, sachant que l'expression de la *MKKK20* et de la *MKKK19* est induite suite à l'infection de la plante par plusieurs pathogènes dont *Pseudomonas syringae* (Menges et al.



2008). De plus, MKK3 active MPK6 dans une cascade de signalisation impliquant l'acide jasmonique (Takahashi et al. 2007) et selon l'étude précédente, les jamonates induisent aussi l'expression de la *MKKK20* (Menges et al. 2008). Donc *MKKK20* pourrait également activer le module MKK3/MPK6 impliqué dans la signalisation de l'acide jasmonique.

Pour la suite de mes travaux, j'ai d'abord vérifié si le mutant *MKK3* est également sensible aux drogues de dépolymérisation des MTs comme pour les mutants de *MPK18* et *MKKK20*. Puis, restait à démontrer si MKK3 pouvait interagir avec la MPK18, recréant ainsi une cascade canonique MKKK-MKK-MPK. Nos résultats montrent que le mutant *mkk3* se comporte comme les mutants *mkkk20* et *mpk18* au niveau de la déstabilisation des MTs suite à des traitements avec des drogues provoquant la dépolymérisation des MT, comme l'oryzalin (Figure 2.5) Par contre, au niveau des interactions protéine-protéine, l'absence d'interaction entre la MKK3 et la MPK18 dans le système de double-hybride (Figure 2.1) suggère que la MPK18 n'est pas en aval de la MKK3. Ce dernier résultat est supporté par des travaux antérieurs aussi en double-hybride, indiquant l'absence d'interaction entre la MKK3 et la MPK18 (Lee et al. 2008).

Afin de mieux comprendre la relation entre ces trois kinases, nous avons tourné notre attention vers leur capacité enzyme-substrat à l'aide d'essais kinases. Nous avons d'abord observé que la *MKKK20* est capable de s'auto-phosphoryler (Figure 2.4). Également la *MKKK20* phosphoryle la MKK3 et la MPK18 individuellement alors que la MKK3 ne phosphoryle pas la MPK18. En plus, la MKK3 devient plus active après sa phosphorylation par *MKKK20*, ce que peut être démontrée par une légère augmentation de la phosphorylation de la MBP (Figure 2.4-A). Quand les trois kinases sont présentes ensemble, la phosphorylation de la MKK3 et la MPK18 par la *MKKK20* semble être le même (Figure 2.4-C). Nos résultats confirment davantage les deux tests de double-hybride comme quoi *MKKK20* interagit avec MKK3 et MPK18. Considérant ces données, nous pouvons conclure qu'il existera deux voies indépendantes issues de *MKKK20*, une vers MPK18 directement et l'autre incluant la MKK3 et éventuellement autre(s) MPK(s). Une analyse détaillée de la structure microtubulaire des mutants peut nous aider à mieux comprendre la nature de ces différentes voies si elles existent évidemment.

## 6- La structure des microtubules dans les mutants

Les MTs sont des polymères hautement dynamiques des tubulines hétérodimériques  $\alpha$  et  $\beta$  qui subissent des cycles de polymérisation, de pause (période sans ajout net ou perte d'unité de tubuline) et de dépolymérisation, un processus connu sous le nom d'instabilité dynamique (Dixit and Cyr 2004). Les MTs des cellules végétales sont organisés sous quatre différents arrangements selon leur emplacement intracellulaire; les premiers sont les MTs corticaux qui régulent la direction de l'expansion des cellules alors que les trois autres sont liés à la division cellulaire, à savoir les MTs du fuseau mitotique, de l'anneau de la préprophase et les MTs phragmoplastiques (Hamada 2014). La matrice des MTC des plantes est constituée d'une population relativement courte de MTs se chevauchants et qui sont principalement liés à la membrane plasmique (Dixit and Cyr 2004). L'utilisation de méthodes d'imagerie des cellules vivantes et les protéines fluorescentes ont permis d'observer les MTC et de bien caractériser leur comportement. Au niveau des organes qui subissent principalement une croissance allongée ou anisotropique comme la racine, les MTC sont disposés en rangées parallèles, perpendiculaires à l'axe d'élongation (Sedbrook and Kaloriti 2008). Ainsi, la racine d'*Arabidopsis* a été exploitée comme un système d'étude des MTs et l'expansion directionnelle des cellules.

Au niveau racinaire, les phénotypes observés chez les mutants *mkkk20* et *mkk3* après traitement avec des drogues de dépolymérisation des MTs sont semblables à celui de la *mpk18* (Figure 2.5) et nous indiquent que les MTs corticaux peuvent être à l'origine de cet effet. Lorsque les racines primaires des plantes poussent le long d'une surface solide (médium de culture sur agar à la verticale), elles peuvent subir une déviation inclinée par rapport au sens de la gravité. On parle d'inclinaison ou de '*skewing*' ou bien une ondulation tout au long de la racine connue en anglais sous le terme du '*waving*' (Oliva and Dunand 2007). Il n'y a pas unanimité pour expliquer cet effet, mais au moins deux modèles ont été proposés afin d'en fournir une explication plausible. Selon le premier modèle, l'inclinaison et l'ondulation sont le résultat de trois facteurs combinés ensemble; le toucher, la gravité et la circumnutation, la circumnutation étant due au mouvement vertical de la croissance globale de la racine (ou de la tige) et au mouvement lié à la croissance différentielle des différentes génératrices (mouvement circulaire). L'association des deux mouvements se traduisant par un mouvement

de type hélicoïdal. Dans un milieu de culture imperméable placé à la verticale, la gravité influence la racine à croître d'une manière à ce que la coiffe racinaire entre en contact avec la surface du milieu de culture gélifié, ce qui provoque ainsi une réponse au toucher. La combinaison du toucher et la gravité associée à une tendance héréditaire de circumnutation préférentielle vers une direction précise de la coiffe racinaire, conduit à une déviation caractéristique par rapport au plan vertical, on parle alors d'inclinaison. Durant cette croissance, des motifs en forme de vagues sinusoïdales sont également générés. Dans ce cas on parle d'ondulation (Migliaccio and Piconese 2001). Le , 2<sup>e</sup> modèle explique l'ondulation comme un résultat direct d'interaction physique entre la coiffe racinaire et la surface du milieu de culture, alors que l'inclinaison est plutôt due à une propriété héréditaire de la racine. Ainsi, l'ondulation est le résultat direct de la perturbation de la croissance de la coiffe racinaire sur un milieu de culture qui entrave par friction son mouvement, tandis que la zone d'élongation de la racine continue sa croissance (Thompson and Holbrook 2004).

Bien que plusieurs facteurs contribuent à l'inclinaison et l'ondulation de la racine, une faible dose de drogues ciblant les MTs, comme l'oryzalin ou le propyzamide, peut également engendrer ce mouvement (Nakamura et al. 2004). L'inclinaison et l'ondulation deviennent alors plus importantes vers la gauche dans le cas de certains mutants tels que *rid5*, *mor1-1* et plusieurs mutants liés à la tubuline (Konishi and Sugiyama 2003; Whittington et al. 2001; Ishida et al. 2007). Cependant, d'autres mutants montrent une inclinaison de la racine vers la droite, comme *SPIRAL1* (*spr1* et *spr2*), *WAVE DAMPENED2* et *ARMADILLO REPEAT KINESIN2* (Furutani et al. 2000; Perrin et al. 2007; Sakai et al. 2008). Ainsi, plusieurs travaux ont mis en évidence l'implication des MTs dans l'inclinaison et l'ondulation racinaire chez les plantes, même si le mécanisme exact qui gouverne ces effets n'est toujours pas entièrement élucidé (Wasteneys and Ambrose 2009).

Selon les résultats obtenus dans le cas des simples mutants *mkkk20*, *mpk18* et *mkk3*, ou les doubles mutants *mkkk20/mpk18* et *mkk3/mpk18*, l'angle d'inclinaison des ces mutants est plus important que chez le type sauvage. Aussi, les racines de ces mutants sont plus courtes lorsqu'en présence d'oryzalin dans le milieu de culture (Figure 2.5). Tous ces résultats nous indiquent que ces kinases peuvent être associées fonctionnellement au MTC. Pour approfondir l'analyse, l'immunomarquage de l' $\alpha$ -tubuline nous a permis de mieux visualiser la structure

des polymères microtubulaire chez nos différents mutants. Nous avons sélectionné la zone de transition située entre la zone de division et la zone d'élongation afin de bien caractériser l'effet sur les cellules fraîchement synthétisées. Chez le type sauvage, dans un milieu de culture sans drogue, on observe une conformation classique des MTC qui sont bien homogènes et perpendiculaires à l'axe d'élongation. La matrice microtubulaire est bien alignée et le bruit de fond reste considérablement faible. Cette conformation confère à la racine une croissance cellulaire optimale qui dépend entre autres de la présence homogène des MTC tout au long du cortex cellulaire. Pour les mutants, l'orientation des MTC reste en général perpendiculaire à l'axe d'élongation, par contre l'alignement de la matrice microtubulaire chez certains génotypes devienne relativement aléatoire. L'ajout d'oryzalin perturbe la polymérisation des MTC et nous avons observé une désorientation différentielle selon le génotype. Ainsi, les structures des polymères microtubulaires du simple mutant *mkkk20* et le double mutant *mkk3/mpk18* sont les plus affectés que les autres (Figure 2.6).

## **7- Une possible convergence des deux voies de signalisation par la MKKK20**

Les résultats d'immunomarquage ainsi que les essais d'activité sont cohérents avec l'idée que les trois kinases n'appartiennent pas à la même voie, mais formeraient plutôt deux voies séparées et indépendantes, MKKK20/MPK18 d'une part et MKKK20/MKK3 d'autre part. Également ces deux voies ne semblent pas être synergiques, parce que le comportement (la taille et l'angle d'inclinaison) de la racine du mutant *mpk18* n'est pas significativement différent à celui du *mkk3* ni au double *mkkk20/mpk18*. L'analyse bibliographique nous pousse à conclure que deux MAPK MPK4 et/ou MPK6 pourraient agir en aval de la MKK3. Cette hypothèse est supportée par deux données, d'abord par l'interaction physique de la MKK3 avec la MPK6 et la MPK4 qui a été reporté par Popescu et ces collaborateurs (Popescu et al. 2009). Le deuxième appui à cette hypothèse provient du fait que la MPK4 et la MPK6 ont été démontré jouer un rôle important dans la régulation des MTs (Beck et al. 2011; Kohoutova et al. 2015; Muller et al. 2010). La cible commune de ces voies serait alors des protéines associées aux microtubules (*Microtubules Associated Proteins* ; MAPs) qui sont responsables de l'organisation des MTs et jouent un rôle très important dans leur dynamique. Le nombre de ces MAPs est considérablement élevé (compté par centaines), et leurs champs d'intervention

ainsi que leur mode d'action sur les MTs sont très variés. Or, la caractérisation fonctionnelle de ces MAPs et de leurs activateurs potentiels dont les MAPKs restent limités chez les plantes (Hamada 2014). Cependant, il a été démontré que la phosphorylation des MAPs conduit à leur déstabilisation et, par conséquent, provoque leur détachement des polymères microtubulaires (Drewes et al. 1998).

L'inhibition de la phosphorylation dans le mutant *mkk3* serait susceptible de provoquer une hyper-stabilisation des microtubules, comme c'est le cas du mutant *mpk18* (Walia et al. 2009). Par contre, si les deux voies sont bloquées, soit depuis leur point commun de divergence, *mkkk20*, ou au niveau de doubles mutants *mkk3/mpk18*, l'effet devient plus drastique sur la dynamique des microtubules (Figure 2.6 et 2.7).

## **8- Implication des MKKK 19, 20 et 21 dans développement pollinique**

Le but de l'autre partie de cette thèse était de caractériser le rôle potentiel des MKKK19-21 dans le développement gamétophytique chez *Arabidopsis* tel que démontré chez les possibles orthologues *FRK1-3* chez *Solanum chacoense* (Daigle and Matton 2015; Gray-Mitsumune et al. 2006; Lafleur et al. 2015; O'Brien et al. 2007). Les articles qui ont cité les MKKK19-21 sont très rares, néanmoins dans les études dédiées à la reproduction chez *Arabidopsis*, on trouve que l'expression des deux *MKKK19* et *MKKK20* est fortement élevée dans les cellules spermatiques du pollen (Borges et al. 2008). Dans la même étude, le transcrit de *MKK3* est le seul qui a été détecté dans les cellules spermatiques. Ceci est fort intéressant, considérant que dans notre double-hybride ciblée, parmi les 10 *AtMKKs* seule la *MKK3* interagit avec les MKKK19-21. Par ailleurs, l'expression de la *MKKK20* s'avère être sous le contrôle du facteur de transcription DUO1 qui joue un rôle déterminant dans la deuxième division cellulaire lors de la gamétogenèse mâle (Durbarry et al. 2005). De plus, la *MKKK20* appartient aux gènes qui sont co-exprimés avec '*Arabidopsis Shaggy-like protein kinases 32*' (*ASKs32*) qui sont indispensables au développement pollinique pendant la phase tardive de la microsporogénèse (Dong et al. 2015).

Nous avons d'abord analysé les profils d'expression des *MKKK19-21 in silico*, tirant profit des bases de données disponibles comme 'Genevestigator', 'bar.utoronto.ca' et ArrayExpress, ensuite expérimentalement par RT-PCR, de même qu'à l'aide du gène rapporteur GUS sous le

contrôle des promoteurs des *MKKK19-21*. À noter que la *MKKK21* était considérée comme un pseudogène d'où son absence dans les biopuces ATH1. Pourtant, nous avons démontré l'activité de son promoteur, détecté son expression et vérifié son intégrité suite l'amplification et le séquençage de l'ADNc correspondant au transcrite (ARNm) de la *MKKK21*. Dans l'ensemble, nous avons déterminé que les trois MKKKs sont fortement exprimés dans les structures reproductives de la plante, plus spécifiquement dans le pollen (Figure 3.1 et 3.2). Dans la littérature, on trouve que d'autres membres de la famille des MEKKs à laquelle appartiennent MKKK19-21 ont aussi été liés fonctionnellement au développement pollinique chez *Arabidopsis*. En effet, MAP3Kε1 (MKKK7) et MAP3Kε2 (MKKK6) sont importants pour la viabilité du pollen (Chaiwongsar et al. 2006).

De façon à caractériser leur fonction, nous avons commencé par l'analyse des mutants insertionnels T-DNA disponibles pour chaque kinase. Les analyses phénotypiques des mutants en conditions normales n'ont révélé aucun défaut développemental visible, suggérant la possibilité d'une redondance fonctionnelle au sein de ce petit groupe de MEKKs. En effet, les mêmes observations ont été réalisées chez d'autres représentants de ce groupe, tels que pour *ANP1*, *ANP2* et *ANP3* (MKKK1-3) chez *Arabidopsis*. Les simples mutants sont normaux alors que deux des trois combinaisons double-mutants montrent des défauts liés à la division cellulaire et la croissance alors que le triple mutant n'est pas transmissible par les gamètes mâles ou femelles (Krysan et al. 2002). Toujours chez *Arabidopsis*, *MKKK7* et *MKKK6* sont fonctionnellement redondants et la combinaison de leur mutations provoque la mort du pollen (Chaiwongsar et al. 2006). Chez *Nicotiana benthamiana*, une espèce de tabac indigène d'Australie, un phénomène semblable a été caractérisé pour trois MKKK (*NbMAPKKKα*, *NbMAPKKKβ*, et *NbMAPKKKγ*) avec une particularité spéciale que ces trois MKKKs forment une voie d'activation linéaire impliquée dans la mort cellulaire programmée.

Par la suite, nous avons essayé de créer des doubles et triples mutants pour les gènes *MKKK19-21*. Bien que le double mutant *mkkk20/mkkk21* ait été obtenu, aucun double mutant avec la plante mutante pour la *MKKK19* n'a pu être généré avec les plantes mutantes pour les *MKKK20* et *MKKK21*. Ceci pourrait s'expliquer par l'absence de mutant disponible dans l'écotype Col-1 (*Colombia*), pour lesquels nous avons des lignées mutantes pour les *MKKK20* et *21*, alors que le seul mutant disponible pour la *MKKK19* est issu de l'écotype Ler

(*Landsberg erecta*). Il faut noter que malgré une éventuelle redondance fonctionnelle entre les *MKKK19-21*, nous avons observé suite aux essais de la germination *in vitro* que la longueur des tubes polliniques des simples mutants est significativement courte par rapport au type sauvage. Également, la croissance du double mutant *mkkk20/mkkk21* est relativement retardée même s'il arrive à gagner la taille normale et à produire des un nombre normal de graines (Figure 3.3). Aussi, la germination des graines de ce double mutant est remarquablement inférieure à celle du type sauvage et aux autres mutants simples (Figure 3.4).

### **9- Analyse d'un triple mutant pour les MKKK19, 20 et 21**

Pour contrer toute éventuelle redondance entre les *MKKK19-21*, nous avons donc essayé de diminuer l'expression des trois gènes simultanément à l'aide de la technique des ARN interférent basée sur des microARN artificiels (Schwab et al. 2006). Pour cet objectif, nous avons donc créé des lignées sous-exprimant les trois *MKKKs*. Les plantes transgéniques démontrant une diminution de l'expression de ces trois *MKKKs* ont montré plusieurs défauts développementaux dès l'apparition des premiers bourgeons alors que la quantité du pollen mort qui a été recensé est considérablement élevée. De plus, plusieurs siliques de ces plantes apparaissent plus petites et déformées et contiennent beaucoup de graines avortées et/ou non fécondées. L'analyse ultrastructurale des grains de pollen mort a montré une déformation dramatique de la structure générale des cellules (Figure 3.7). Ce phénotype est relativement semblable aux autres mutants qui sont liés au développement du pollen y compris; '*male gametogenesis impaired anthers*' (*mia*), '*reversibly glycosylated polypeptides 1 et 2*' (*rgp1/rgp2*) et '*arabinogalactan proteins*' (*agp11*) (Jakobsen et al. 2005; Drakakaki et al. 2006; Coimbra et al. 2009).

### **10- Les MKKK19, 20 et 20 sont liées fonctionnellement à la phase tardive de la microsporogénèse.**

Afin de pousser plus à fond notre étude, nous voulions savoir exactement le stade de la microsporogénèse qui serait affecté. Nous avons observé que le nombre des cellules normales dans les premiers stades (unicellulaire et bicellulaire) est similaire à de celui du type sauvage alors que le stade tricellulaire contient un grand nombre de cellules mortes ou déformées (Figure 3.8). Ces résultats sont cohérents avec les travaux de Honys et Twell qui ont démontré

que l'expression des *MKKK19-20* était plus importante durant la phase tardive du développement de la microsporogénèse (Honys and Twell 2004). À ce jour, un grand nombre de gènes liés fonctionnellement à la phase initiale de la microsporogénèse ont été caractérisés, mais ceux qui pourraient être impliqués dans les stades tardifs sont moins connus. Parmi cette dernière catégorie, on trouve le gène *ACA9* (autoinhibited  $Ca^{2+}$  *ATPases* 9) exprimé dans le pollen. Le mutant *aca9* produit un nombre réduit de graines, produit un court tube pollinique et provoque une diminution de la fertilité (Schiott et al. 2004). Fait intéressant, il a été démontré que la *MKKK20* interagit avec des 'Calmodulins' et 'Calmodulin-like proteins' (Popescu et al. 2007). Aussi, *DUOI* qui est exprimé juste après la première division pollinique (Rotman et al. 2005), contrôle l'expression de la *MKKK20* (Durberry et al. 2005). En plus, le gène *AtPTEN1* qui code pour une tyrosine phosphatase est exprimé exclusivement pendant la phase tardive de la microsporogénèse. La suppression de l'expression d'*AtPTEN* provoque la mort du pollen après la mitose (Gupta et al. 2002). Dans leur discussion, les auteurs n'ont pas exclu la possibilité que *AtPTEN1* puisse réguler une voie MAPK par analogie à son orthologue chez animaux.

### **11- Signification biologique des MKKK19, 20 et 21**

Plusieurs membres de la voie MAPKs ont été montrés jouer un rôle vital dans le développement du pollen et la fertilité chez les plantes. Suite aux analyses des plantes sous-exprimant les trois kinases, *MKKK19*, *MKKK20* et *MKKK21*, nous avons réussi à montrer leurs implications dans développement gamétophytique mâle chez la plante modèle *Arabidopsis*. Également, nous avons pu mettre en évidence l'implication de la *MKKK20* à travers deux autres kinases la *MKK3* et la *MPK18* dans la régulation des MTC. Grâce à l'analyse des simples et doubles mutants et aux essais kinases, nous avons conclu que la *MKKK20* peut agir en amont de deux voies indépendantes liées fonctionnellement aux MTs. Dans l'ensemble, ces kinases s'avèrent impliquées dans deux fonctions définitivement déterminantes à la survie de la plante, quelles soit dans la régulation des MTs ou dans le développement pollinique. Les avancés scientifiques dans ce domaine ne cessent d'identifier d'autres membres de cette grande famille chez plusieurs plants (Mohanta et al. 2015). Quoique la voie MAPK soit conservée durant l'évolution, nous pouvons extrapoler les résultats obtenus dans cette thèse aux autres espèces ayant un intérêt économique plus important.



## V. Conclusion

L'ensemble de notre écosystème est constitué par l'association de deux composantes majeures, le biotope dit littéralement «abiotique ou sans vie» et la biocénose ou «communauté vivante». Cette dernière est constituée par tous les êtres vivants tels que les bactéries, les champignons, les animaux et les végétaux. Bien que l'équilibre de notre écosystème soit maintenu par la présence de chacun de ces éléments constitutifs, la contribution du monde végétale fait sans doute partie des plus importantes. Tout au long de leur évolution, les plantes s'adaptent aux diverses conditions de stress environnemental par un changement particulier et adapté des propriétés physiologiques, moléculaires et biochimiques qui sont associées aux différentes voies de signalisation. Parmi les modules de la signalisation les plus conservés, les cascades de MAPKs ont été démontrées jouer un rôle critique dans la médiation de l'adaptation des plantes à des stress biotiques et abiotiques divers. Les résultats de nos analyses ont permis de préciser le rôle majeur que les MKKK19, MKKK20 et MKKK21 peuvent jouer chez *Arabidopsis*.

Durant le deuxième chapitre de ma thèse, les résultats du criblage par le double-hybrid de la banque d'ADNc commerciale d'*Arabidopsis* nous ont permis d'examiner le rôle de la MKKK20 dans la régulation des microtubules corticaux. Nous avons pu démontrer que la MKKK20 joue un rôle important dans l'organisation des microtubules via deux cascades de signalisation différentes. Nous avons aussi montré qu'un autre membre des MKKs, à savoir la MKK3, est lié fonctionnellement à la MKKK20 dans le même processus biologique. Bien que la MPK18 ait été préalablement démontrée être impliquée dans l'organisation des microtubules corticaux, nous avons pu l'associer à la MKKK20 par interaction physique et par essais kinases.

Dans le troisième chapitre, nous avons pu mettre en évidence l'implication des trois MKKK19-21 dans le développement du pollen chez *Arabidopsis* par analogie à ce qui a été démontré chez *Solanum chacoense*. Bien que la fonction des trois MKKK19-21 ne s'étende pas à la partie femelle, nous avons néanmoins montré que la fonction de ce petit groupe des MEKKs peut être conservée pour le développement pollinique chez *Arabidopsis*. Ainsi, les défauts développementaux relatifs à la diminution de l'expression des trois MKKKs chez les

mutants amiRNAs nous ont permis, en effet, d'ajouter ces trois MKKKs à la liste des gènes qui seront impliqués dans le développement gamétophytique mâle chez la même plante.

Ce projet de recherche a permis d'ajouter une autre dimension au mode de fonctionnement du module MAPK, nous incitant ainsi à reconsidérer le caractère évolutionnaire de la signalisation moléculaire des MAPKs. Nos résultats ajoutent une couche de complexité aux modèles acceptés, tant chez la levure, les cellules mammifères que chez les plantes. En effet, la signalisation à travers le module MAPK est connue par sa nature complexe (Jonak et al. 2002; Su et al. 2007; Meszaros et al. 2007), mais la découverte d'une voie passant outre une des kinases du module canonique MKKK-MKK-MPK est très rare. Dans cette thèse, nous avons montré pour la première fois une interaction directe MKKK-MPK chez *Arabidopsis*. À notre connaissance et jusqu'à la rédaction de cette thèse, le seul cas reporté est celui de la MKKK OMTK qui interagit avec la MPK MMK3 chez la luzerne (Nakagami et al. 2004). Une réévaluation exhaustive des interactions MKKK-MPK devra être réalisée afin de juger si ce cas est rare ou s'il avait été tout bonnement occulté tant le modèle canonique était admis tel quel, sans variation. Déjà complexe, la liste des interactants avec les trois kinases MKKK19, MKKK20 et MKKK21 constitue un bon point de départ pour déterminer les relations de certains de ces gènes aussi avec les 20 MPKs d'*Arabidopsis*, ouvrant ainsi d'autres horizons de recherche impliquant ces trois gènes.

## VI. Bibliographie

- Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *The Journal of biological chemistry* 266 (7):4220-4227
- Albrecht C, Russinova E, Hecht V, Baaijens E, de Vries S (2005) The Arabidopsis thaliana SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *The Plant cell* 17 (12):3337-3349. doi:10.1105/tpc.105.036814
- Ambrose JC, Li W, Marcus A, Ma H, Cyr R (2005) A minus-end-directed kinesin with plus-end tracking protein activity is involved in spindle morphogenesis. *Molecular biology of the cell* 16 (4):1584-1592. doi:10.1091/mbc.E04-10-0935
- Anthony RG, Waldin TR, Ray JA, Bright SW, Hussey PJ (1998) Herbicide resistance caused by spontaneous mutation of the cytoskeletal protein tubulin. *Nature* 393 (6682):260-263. doi:10.1038/30484
- Arena S, Benvenuti S, Bardelli A (2005) Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 62 (18):2092-2099. doi:10.1007/s00018-005-5205-1
- Asai T, Tena G, Plotnikova J, Willmann MR, Chiu WL, Gomez-Gomez L, Boller T, Ausubel FM, Sheen J (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* 415 (6875):977-983. doi:10.1038/415977a
- Aya K, Ueguchi-Tanaka M, Kondo M, Hamada K, Yano K, Nishimura M, Matsuoka M (2009) Gibberellin modulates anther development in rice via the transcriptional regulation of GAMYB. *The Plant cell* 21 (5):1453-1472. doi:10.1105/tpc.108.062935
- Bartolini F, Gundersen GG (2006) Generation of noncentrosomal microtubule arrays. *Journal of cell science* 119 (Pt 20):4155-4163. doi:10.1242/jcs.03227
- Bartrina I, Otto E, Strnad M, Werner T, Schumling T (2011) Cytokinin regulates the activity of reproductive meristems, flower organ size, ovule formation, and thus seed yield in Arabidopsis thaliana. *The Plant cell* 23 (1):69-80. doi:10.1105/tpc.110.079079
- Baskin TI (2001) On the alignment of cellulose microfibrils by cortical microtubules: a review and a model. *Protoplasma* 215 (1-4):150-171
- Baskin TI, Cork A, Williamson RE, Gorst JR (1995) STUNTED PLANT 1, A Gene Required for Expansion in Rapidly Elongating but Not in Dividing Cells and Mediating Root Growth Responses to Applied Cytokinin. *Plant Physiol* 107 (1):233-243
- Baskin TI, Wilson JE, Cork A, Williamson RE (1994) Morphology and microtubule organization in Arabidopsis roots exposed to oryzalin or taxol. *Plant & cell physiology* 35 (6):935-942
- Beck M, Komis G, Muller J, Menzel D, Samaj J (2010) Arabidopsis homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *The Plant cell* 22 (3):755-771. doi:10.1105/tpc.109.071746
- Beck M, Komis G, Ziemann A, Menzel D, Samaj J (2011) Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in Arabidopsis thaliana. *The New phytologist* 189 (4):1069-1083. doi:10.1111/j.1469-8137.2010.03565.x

- Beemster GT, Baskin TI (1998) Analysis of cell division and elongation underlying the developmental acceleration of root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 116 (4):1515-1526
- Bemer M, Angenent GC (2010) Floral Organ Initiation and Development. In: Pua EC, Davey MR (eds) *Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives*. Springer Berlin Heidelberg, pp 173-194. doi:10.1007/978-3-642-02301-9\_9
- Berberich T, Sano H, Kusano T (1999) Involvement of a MAP kinase, ZmMPK5, in senescence and recovery from low-temperature stress in maize. *Molecular & general genetics* : MGG 262 (3):534-542
- Berger F, Twell D (2011) Germline specification and function in plants. *Annual review of plant biology* 62:461-484. doi:10.1146/annurev-arplant-042110-103824
- Bergmann DC (2004) Integrating signals in stomatal development. *Curr Opin Plant Biol* 7 (1):26-32
- Bergmann DC, Lukowitz W, Somerville CR (2004) Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* 304 (5676):1494-1497. doi:10.1126/science.1096014
- Bhatt AM, Canales C, Dickinson HG (2001) Plant meiosis: the means to 1N. *Trends in plant science* 6 (3):114-121
- Bisgrove SR, Hable WE, Kropf DL (2004) +TIPs and microtubule regulation. The beginning of the plus end in plants. *Plant Physiol* 136 (4):3855-3863. doi:10.1104/pp.104.051037
- Bisgrove SR, Lee YR, Liu B, Peters NT, Kropf DL (2008) The microtubule plus-end binding protein EB1 functions in root responses to touch and gravity signals in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 20 (2):396-410. doi:10.1105/tpc.107.056846
- Black DL (2003) Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annual review of biochemistry* 72:291-336. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161720
- Blanvillain R, Boavida LC, McCormick S, Ow DW (2008) Exportin1 genes are essential for development and function of the gametophytes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 180 (3):1493-1500. doi:10.1534/genetics.108.094896
- Bogre L, Calderini O, Binarova P, Mattauch M, Till S, Kiegerl S, Jonak C, Pollaschek C, Barker P, Huskisson NS, Hirt H, Heberle-Bors E (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *The Plant cell* 11 (1):101-113
- Bogre L, Ligtnerink W, Meskiene I, Barker PJ, Heberle-Bors E, Huskisson NS, Hirt H (1997) Wounding Induces the Rapid and Transient Activation of a Specific MAP Kinase Pathway. *The Plant cell* 9 (1):75-83. doi:10.1105/tpc.9.1.75
- Borg M, Brownfield L, Khatab H, Sidorova A, Lingaya M, Twell D (2011) The R2R3 MYB transcription factor DUO1 activates a male germline-specific regulon essential for sperm cell differentiation in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 23 (2):534-549. doi:10.1105/tpc.110.081059
- Borg M, Brownfield L, Twell D (2009) Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of experimental botany* 60 (5):1465-1478. doi:10.1093/jxb/ern355
- Borges F, Gomes G, Gardner R, Moreno N, McCormick S, Feijo JA, Becker JD (2008) Comparative transcriptomics of *Arabidopsis* sperm cells. *Plant Physiol* 148 (2):1168-1181. doi:10.1104/pp.108.125229
- Borisy GG, Marcum JM, Olmsted JB, Murphy DB, Johnson KA (1975) Purification of tubulin and associated high molecular weight proteins from porcine brain and characterization

- of microtubule assembly in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences* 253:107-132
- Boudaoud A, Burian A, Borowska-Wykret D, Uyttewaal M, Wrzalik R, Kwiatkowska D, Hamant O (2014) FibrilTool, an ImageJ plug-in to quantify fibrillar structures in raw microscopy images. *Nature protocols* 9 (2):457-463. doi:10.1038/nprot.2014.024
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249 (4964):64-67
- Brown RC, Lemmon BE (2001) The cytoskeleton and spatial control of cytokinesis in the plant life cycle. *Protoplasma* 215 (1-4):35-49
- Brownfield L, Hafidh S, Borg M, Sidorova A, Mori T, Twell D (2009) A plant germline-specific integrator of sperm specification and cell cycle progression. *PLoS genetics* 5 (3):e1000430. doi:10.1371/journal.pgen.1000430
- Burk DH, Liu B, Zhong R, Morrison WH, Ye ZH (2001) A katanin-like protein regulates normal cell wall biosynthesis and cell elongation. *The Plant cell* 13 (4):807-827
- Burnett EC, Desikan R, Moser RC, Neill SJ (2000) ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *Journal of experimental botany* 51 (343):197-205
- Burnett G, Kennedy EP (1954) The enzymatic phosphorylation of proteins. *The Journal of biological chemistry* 211 (2):969-980
- Bush SM, Krysan PJ (2007) Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of experimental botany* 58 (8):2181-2191. doi:10.1093/jxb/erm092
- Calderini O, Bogre L, Vicente O, Binarova P, Heberle-Bors E, Wilson C (1998) A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of cell science* 111 ( Pt 20):3091-3100
- Cardinale F, Meskiene I, Ouaked F, Hirt H (2002) Convergence and divergence of stress-induced mitogen-activated protein kinase signaling pathways at the level of two distinct mitogen-activated protein kinase kinases. *The Plant cell* 14 (3):703-711
- Cazale AC, Droillard MJ, Wilson C, Heberle-Bors E, Barbier-Brygoo H, Lauriere C (1999) MAP kinase activation by hypoosmotic stress of tobacco cell suspensions: towards the oxidative burst response? *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19 (3):297-307
- Cenzano A, Vigliocco A, Kraus T, Abdala G (2003) Exogenously applied jasmonic acid induces changes in apical meristem morphology of potato stolons. *Ann Bot* 91 (7):915-919. doi:10.1093/aob/mcg098
- Chaiwongsar S, Otegui MS, Jester PJ, Monson SS, Krysan PJ (2006) The protein kinase genes MAP3K epsilon 1 and MAP3K epsilon 2 are required for pollen viability in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48 (2):193-205. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02863.x
- Champion A, Kreis M, Mockaitis K, Picaud A, Henry Y (2004) Arabidopsis kinome: after the casting. *Funct Integr Genomics* 4 (3):163-187. doi:10.1007/s10142-003-0096-4
- Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW (2003) EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. *Nature cell biology* 5 (11):967-971. doi:10.1038/ncb1057

- Chang L, Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410 (6824):37-40. doi:10.1038/35065000
- Chen RE, Thorner J (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta* 1773 (8):1311-1340. doi:10.1016/j.bbamer.2007.05.003
- Chen YC, McCormick S (1996) sidecar pollen, an *Arabidopsis thaliana* male gametophytic mutant with aberrant cell divisions during pollen development. *Development* 122 (10):3243-3253
- Chettoor AM, Givan SA, Cole RA, Coker CT, Unger-Wallace E, Vejlupekova Z, Vollbrecht E, Fowler JE, Evans MM (2014) Discovery of novel transcripts and gametophytic functions via RNA-seq analysis of maize gametophytic transcriptomes. *Genome biology* 15 (7):414. doi:10.1186/s13059-014-0414-2
- Chuong SD, Good AG, Taylor GJ, Freeman MC, Moorhead GB, Muench DG (2004) Large-scale identification of tubulin-binding proteins provides insight on subcellular trafficking, metabolic channeling, and signaling in plant cells. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 3 (10):970-983. doi:10.1074/mcp.M400053-MCP200
- Clark KL, Larsen PB, Wang X, Chang C (1998) Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (9):5401-5406
- Clark RS, Bayir H, Jenkins LW (2005) Posttranslational protein modifications. *Critical care medicine* 33 (12 Suppl):S407-409
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353 (6339):31-37. doi:10.1038/353031a0
- Cohen P (1997) The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends in cell biology* 7 (9):353-361. doi:10.1016/S0962-8924(97)01105-7
- Cohen P (2002) The origins of protein phosphorylation. *Nature cell biology* 4 (5):E127-130. doi:10.1038/ncb0502-e127
- Coimbra S, Costa M, Jones B, Mendes MA, Pereira LG (2009) Pollen grain development is compromised in *Arabidopsis* *agp6 agp11* null mutants. *Journal of experimental botany* 60 (11):3133-3142. doi:10.1093/jxb/erp148
- Colcombet J, Boisson-Dernier A, Ros-Palau R, Vera CE, Schroeder JI (2005) *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *The Plant cell* 17 (12):3350-3361. doi:10.1105/tpc.105.036731
- Colcombet J, Hirt H (2008) *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochem J* 413 (2):217-226. doi:10.1042/BJ20080625
- Collings DA, Lill AW, Himmelspach R, Wasteneys GO (2006) Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist* 170 (2):275-290. doi:10.1111/j.1469-8137.2006.01671.x
- Cooper JA, Bowen-Pope DF, Raines E, Ross R, Hunter T (1982) Similar effects of platelet-derived growth factor and epidermal growth factor on the phosphorylation of tyrosine in cellular proteins. *Cell* 31 (1):263-273
- Costa LM, Marshall E, Tesfaye M, Silverstein KA, Mori M, Umetsu Y, Otterbach SL, Papareddy R, Dickinson HG, Boutiller K, VandenBosch KA, Ohki S, Gutierrez-

- Marcos JF (2014) Central cell-derived peptides regulate early embryo patterning in flowering plants. *Science* 344 (6180):168-172. doi:10.1126/science.1243005
- Courchesne WE, Kunisawa R, Thorner J (1989) A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* 58 (6):1107-1119
- Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL (1992) The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258 (5081):478-480
- Crismani W, Baumann U, Sutton T, Shirley N, Webster T, Spangenberg G, Langridge P, Able JA (2006) Microarray expression analysis of meiosis and microsporogenesis in hexaploid bread wheat. *BMC Genomics* 7:267. doi:10.1186/1471-2164-7-267
- Crowell EF, Bischoff V, Desprez T, Rolland A, Stierhof YD, Schumacher K, Gonneau M, Hofte H, Vernhettes S (2009) Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 21 (4):1141-1154. doi:10.1105/tpc.108.065334
- Curtis MD, Grossniklaus U (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133 (2):462-469. doi:10.1104/pp.103.027979
- Dagenbach EM, Endow SA (2004) A new kinesin tree. *Journal of cell science* 117 (Pt 1):3-7. doi:10.1242/jcs.00875
- Dai Y, Wang H, Li B, Huang J, Liu X, Zhou Y, Mou Z, Li J (2006) Increased expression of MAP KINASE KINASE7 causes deficiency in polar auxin transport and leads to plant architectural abnormality in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 18 (2):308-320. doi:10.1105/tpc.105.037846
- Daigle C, Matton DP (2015) Genome-wide analysis of MAPKKs shows expansion and evolution of a new MEKK class involved in solanaceous species sexual reproduction. *BMC Genomics* 16:1037. doi:10.1186/s12864-015-2228-3
- Dan I, Watanabe NM, Kusumi A (2001) The Ste20 group kinases as regulators of MAP kinase cascades. *Trends in cell biology* 11 (5):220-230
- Danquah A, de Zelicourt A, Boudsocq M, Neubauer J, Frei Dit Frey N, Leonhardt N, Pateyron S, Gwinner F, Tamby JP, Ortiz-Masia D, Marcote MJ, Hirt H, Colcombet J (2015) Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 82 (2):232-244. doi:10.1111/tpj.12808
- de Mesa MC, Santiago-Domenech N, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2004) The CaMV 35S promoter is highly active on floral organs and pollen of transgenic strawberry plants. *Plant cell reports* 23 (1-2):32-38. doi:10.1007/s00299-004-0776-0
- del Pozo O, Pedley KF, Martin GB (2004) MAPKKKalpha is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *The EMBO journal* 23 (15):3072-3082. doi:10.1038/sj.emboj.7600283
- Deprost D, Truong HN, Robaglia C, Meyer C (2005) An *Arabidopsis* homolog of RAPTOR/KOG1 is essential for early embryo development. *Biochemical and biophysical research communications* 326 (4):844-850. doi:10.1016/j.bbrc.2004.11.117
- Desikan R, Cheung MK, Bright J, Henson D, Hancock JT, Neill SJ (2004) ABA, hydrogen peroxide and nitric oxide signalling in stomatal guard cells. *Journal of experimental botany* 55 (395):205-212. doi:10.1093/jxb/erh033
- DeYoung BJ, Bickle KL, Schrage KJ, Muskett P, Patel K, Clark SE (2006) The CLAVATA1-related BAM1, BAM2 and BAM3 receptor kinase-like proteins are required for

- meristem function in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45 (1):1-16. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02592.x
- Dhonukshe P, Bargmann BO, Gadella TW, Jr. (2006) Arabidopsis tubulin folding cofactor B interacts with alpha-tubulin in vivo. *Plant & cell physiology* 47 (10):1406-1411. doi:10.1093/pcp/pc1001
- Dhonukshe P, Laxalt AM, Goedhart J, Gadella TW, Munnik T (2003) Phospholipase d activation correlates with microtubule reorganization in living plant cells. *The Plant cell* 15 (11):2666-2679. doi:10.1105/tpc.014977
- Dixit R, Chang E, Cyr R (2006) Establishment of polarity during organization of the acentrosomal plant cortical microtubule array. *Molecular biology of the cell* 17 (3):1298-1305. doi:10.1091/mbc.E05-09-0864
- Dixit R, Cyr R (2004) The cortical microtubule array: from dynamics to organization. *The Plant cell* 16 (10):2546-2552. doi:10.1105/tpc.104.161030
- Doczi R, Brader G, Pettko-Szandtner A, Rajh I, Djamei A, Pitzschke A, Teige M, Hirt H (2007) The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant cell* 19 (10):3266-3279. doi:10.1105/tpc.106.050039
- Dong X, Nou IS, Yi H, Hur Y (2015) Suppression of ASKbeta (AtSK32), a Clade III Arabidopsis GSK3, Leads to the Pollen Defect during Late Pollen Development. *Molecules and cells* 38 (6):506-517. doi:10.14348/molcells.2015.2323
- Drakakaki G, Zabolina O, Delgado I, Robert S, Keegstra K, Raikhel N (2006) Arabidopsis reversibly glycosylated polypeptides 1 and 2 are essential for pollen development. *Plant Physiol* 142 (4):1480-1492. doi:10.1104/pp.106.086363
- Drechsel DN, Hyman AA, Cobb MH, Kirschner MW (1992) Modulation of the dynamic instability of tubulin assembly by the microtubule-associated protein tau. *Molecular biology of the cell* 3 (10):1141-1154
- Drewes G, Ebnet A, Mandelkow EM (1998) MAPs, MARKs and microtubule dynamics. *Trends in biochemical sciences* 23 (8):307-311
- Drykova D, Cenklova V, Sulimenko V, Volc J, Draber P, Binarova P (2003) Plant gamma-tubulin interacts with alphabeta-tubulin dimers and forms membrane-associated complexes. *The Plant cell* 15 (2):465-480
- Durbarry A, Vizir I, Twell D (2005) Male germ line development in Arabidopsis. duo pollen mutants reveal gametophytic regulators of generative cell cycle progression. *Plant physiology* 137 (1):297-307. doi:10.1104/pp.104.053165
- Eckardt NA (2002) Abscisic acid biosynthesis gene underscores the complexity of sugar, stress, and hormone interactions. *The Plant cell* 14 (11):2645-2649
- Ehrhardt DW, Shaw SL (2006) Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *Annual review of plant biology* 57:859-875. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105329
- Elion EA (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* 3 (6):573-581. doi:S1369-5274(00)00143-0 [pii]
- Elion EA, Grisafi PL, Fink GR (1990) FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60 (4):649-664
- Erhardt M, Stoppin-Mellet V, Campagne S, Canaday J, Mutterer J, Fabian T, Sauter M, Muller T, Peter C, Lambert AM, Schmit AC (2002) The plant Spc98p homologue



- colocalizes with gamma-tubulin at microtubule nucleation sites and is required for microtubule nucleation. *Journal of cell science* 115 (Pt 11):2423-2431
- Evans L, Mitchison T, Kirschner M (1985) Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *The Journal of cell biology* 100 (4):1185-1191
- Eyuboglu B, Pfister K, Haberer G, Chevalier D, Fuchs A, Mayer KF, Schneitz K (2007) Molecular characterisation of the STRUBBELIG-RECEPTOR FAMILY of genes encoding putative leucine-rich repeat receptor-like kinases in *Arabidopsis thaliana*. *BMC plant biology* 7:16. doi:10.1186/1471-2229-7-16
- Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL (1997) MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c-Jun amino-terminal kinases? *Current opinion in genetics & development* 7 (1):67-74
- Fisher DD, Cyr RJ (1998) Extending the Microtubule/Microfibril paradigm. Cellulose synthesis is required for normal cortical microtubule alignment in elongating cells. *Plant Physiol* 116 (3):1043-1051
- Flyvbjerg H, Holy TE, Leibler S (1996) Microtubule dynamics: Caps, catastrophes, and coupled hydrolysis. *Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics* 54 (5):5538-5560
- Frye CA, Tang D, Innes RW (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (1):373-378. doi:10.1073/pnas.011405198
- Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T (2000) The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 127 (20):4443-4453
- Gao M, Liu J, Bi D, Zhang Z, Cheng F, Chen S, Zhang Y (2008) MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell research* 18 (12):1190-1198. doi:10.1038/cr.2008.300
- Garcia-Rodriguez LJ, Valle R, Duran A, Roncero C (2005) Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS letters* 579 (27):6186-6190. doi:S0014-5793(05)01235-4 [pii]
- Garrington TP, Johnson GL (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol* 11 (2):211-218
- Gebert M, Dresselhaus T, Sprunck S (2008) F-actin organization and pollen tube tip growth in *Arabidopsis* are dependent on the gametophyte-specific Armadillo repeat protein ARO1. *The Plant cell* 20 (10):2798-2814. doi:10.1105/tpc.108.061028
- Geitmann A, Snowman BN, Emons AM, Franklin-Tong VE (2000) Alterations in the actin cytoskeleton of pollen tubes are induced by the self-incompatibility reaction in *Papaver rhoeas*. *The Plant cell* 12 (7):1239-1251
- Germain H, Gray-Mitsumune M, Lafleur E, Matton DP (2008) ScORK17, a transmembrane receptor-like kinase predominantly expressed in ovules is involved in seed development. *Planta* 228 (5):851-862. doi:10.1007/s00425-008-0787-0
- Germain H, Rudd S, Zotti C, Caron S, O'Brien M, Chantha SC, Lagace M, Major F, Matton DP (2005) A 6374 unigene set corresponding to low abundance transcripts expressed following fertilization in *Solanum chacoense* Bitt, and characterization of 30 receptor-like kinases. *Plant Mol Biol* 59 (3):515-532. doi:10.1007/s11103-005-0536-8

- Giani S, Campanoni P, Breviaro D (2002) A dual effect on protein synthesis and degradation modulates the tubulin level in rice cells treated with oryzalin. *Planta* 214 (6):837-847. doi:10.1007/s00425-001-0708-y
- Gomez-Gomez L, Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in Arabidopsis. *Molecular cell* 5 (6):1003-1011
- Gray-Mitsumune M, O'Brien M, Bertrand C, Tebbji F, Nantel A, Matton DP (2006) Loss of ovule identity induced by overexpression of the fertilization-related kinase 2 (ScFRK2), a MAPKKK from *Solanum chacoense*. *Journal of experimental botany* 57 (15):4171-4187. doi:10.1093/jxb/erl194
- Guan Y, Meng X, Khanna R, LaMontagne E, Liu Y, Zhang S (2014) Phosphorylation of a WRKY transcription factor by MAPKs is required for pollen development and function in Arabidopsis. *PLoS genetics* 10 (5):e1004384. doi:10.1371/journal.pgen.1004384
- Gupta R, Huang Y, Kieber J, Luan S (1998) Identification of a dual-specificity protein phosphatase that inactivates a MAP kinase from Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 16 (5):581-589
- Gupta R, Ting JT, Sokolov LN, Johnson SA, Luan S (2002) A tumor suppressor homolog, AtPTEN1, is essential for pollen development in Arabidopsis. *The Plant cell* 14 (10):2495-2507
- Gutierrez R, Lindeboom JJ, Paredes AR, Emons AM, Ehrhardt DW (2009) Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nature cell biology* 11 (7):797-806. doi:10.1038/ncb1886
- Hadiarto T, Nanmori T, Matsuoka D, Iwasaki T, Sato K, Fukami Y, Azuma T, Yasuda T (2006) Activation of Arabidopsis MAPK kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding. *Planta* 223 (4):708-713. doi:10.1007/s00425-005-0126-7
- Hafidh S, Breznenova K, Honys D (2012a) De novo post-pollen mitosis II tobacco pollen tube transcriptome. *Plant signaling & behavior* 7 (8):918-921. doi:10.4161/psb.20745
- Hafidh S, Breznenova K, Ruzicka P, Fecikova J, Capkova V, Honys D (2012b) Comprehensive analysis of tobacco pollen transcriptome unveils common pathways in polar cell expansion and underlying heterochronic shift during spermatogenesis. *BMC plant biology* 12:24. doi:10.1186/1471-2229-12-24
- Hamada T (2007) Microtubule-associated proteins in higher plants. *Journal of plant research* 120 (1):79-98. doi:10.1007/s10265-006-0057-9
- Hamada T (2014) Microtubule organization and microtubule-associated proteins in plant cells. *Int Rev Cell Mol Biol* 312:1-52. doi:10.1016/B978-0-12-800178-3.00001-4
- Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, Ehltng J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J, Martin G, Mundy J, Ohashi Y, Scheel D, Sheen J, Xing T, Zhang S, Seguin A, Ellis BE (2006) Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends in plant science* 11 (4):192-198. doi:10.1016/j.tplants.2006.02.007
- Hanks SK, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9 (8):576-596

- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241 (4861):42-52
- Harrison SJ, Mott EK, Parsley K, Aspinall S, Gray JC, Cottage A (2006) A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant methods* 2:19. doi:10.1186/1746-4811-2-19
- Hashimoto M, Komatsu K, Maejima K, Okano Y, Shiraishi T, Ishikawa K, Takinami Y, Yamaji Y, Namba S (2012) Identification of three MAPKKKs forming a linear signaling pathway leading to programmed cell death in *Nicotiana benthamiana*. *BMC plant biology* 12:103. doi:10.1186/1471-2229-12-103
- Heo JB, Sung S (2011) Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331 (6013):76-79. doi:10.1126/science.1197349
- Holmes-Davis R, Tanaka CK, Vensel WH, Hurkman WJ, McCormick S (2005) Proteome mapping of mature pollen of *Arabidopsis thaliana*. *Proteomics* 5 (18):4864-4884. doi:10.1002/pmic.200402011
- Honys D, Twell D (2004) Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 5 (11):R85. doi:10.1186/gb-2004-5-11-r85
- Hoshi M, Ohta K, Gotoh Y, Mori A, Murofushi H, Sakai H, Nishida E (1992) Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *European journal of biochemistry / FEBS* 203 (1-2):43-52
- Huang J, Gu M, Lai Z, Fan B, Shi K, Zhou YH, Yu JQ, Chen Z (2010) Functional analysis of the *Arabidopsis* PAL gene family in plant growth, development, and response to environmental stress. *Plant Physiol* 153 (4):1526-1538. doi:10.1104/pp.110.157370
- Hunter T (2012) Why nature chose phosphate to modify proteins. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367 (1602):2513-2516. doi:10.1098/rstb.2012.0013
- Hussey PJ, Hawkins TJ, Igarashi H, Kaloriti D, Smertenko A (2002) The plant cytoskeleton: recent advances in the study of the plant microtubule-associated proteins MAP-65, MAP-190 and the *Xenopus* MAP215-like protein, MOR1. *Plant Mol Biol* 50 (6):915-924
- Ichimura K, Casais C, Peck SC, Shinozaki K, Shirasu K (2006) MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *The Journal of biological chemistry* 281 (48):36969-36976. doi:10.1074/jbc.M605319200
- Ichimura K, Group M (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in plant science* 7 (7):301-308
- Ichimura K, Group M, Group M, Group M (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in plant science* 7 (7):301-308
- Ichimura K, Mizoguchi T, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K (1998) Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochemical and biophysical research communications* 253 (2):532-543. doi:10.1006/bbrc.1998.9796
- Imin N, Kerim T, Weinman JJ, Rolfe BG (2001) Characterisation of rice anther proteins expressed at the young microspore stage. *Proteomics* 1 (9):1149-1161. doi:10.1002/1615-9861(200109)1:9<1149::AID-PROT1149>3.0.CO;2-R

- Irie K, Gotoh Y, Yashar BM, Errede B, Nishida E, Matsumoto K (1994) Stimulatory effects of yeast and mammalian 14-3-3 proteins on the Raf protein kinase. *Science* 265 (5179):1716-1719
- Ishida T, Kaneko Y, Iwano M, Hashimoto T (2007) Helical microtubule arrays in a collection of twisting tubulin mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (20):8544-8549. doi:10.1073/pnas.0701224104
- Iwakawa H, Shinmyo A, Sekine M (2006) *Arabidopsis* CDKA;1, a cdc2 homologue, controls proliferation of generative cells in male gametogenesis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 45 (5):819-831. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02643.x
- Jakobsen MK, Poulsen LR, Schulz A, Fleurat-Lessard P, Moller A, Husted S, Schiott M, Amtmann A, Palmgren MG (2005) Pollen development and fertilization in *Arabidopsis* is dependent on the MALE GAMETOGENESIS IMPAIRED ANTHERS gene encoding a type V P-type ATPase. *Genes Dev* 19 (22):2757-2769. doi:10.1101/gad.357305
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal* 6 (13):3901-3907
- Jin H, Axtell MJ, Dahlbeck D, Ekwenna O, Zhang S, Staskawicz B, Baker B (2002) NPK1, an MEKK1-like mitogen-activated protein kinase kinase kinase, regulates innate immunity and development in plants. *Developmental cell* 3 (2):291-297
- Johnson LN, Lewis RJ (2001) Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical reviews* 101 (8):2209-2242
- Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W, Barker PJ, Huskisson NS, Hirt H (1996) Stress signaling in plants: a mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (20):11274-11279
- Jonak C, Kiegerl S, Lloyd C, Chan J, Hirt H (1995) MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Molecular & general genetics : MGG* 248 (6):686-694
- Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H (2002) Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* 5 (5):415-424
- Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444 (7117):323-329. doi:10.1038/nature05286
- Ju C, Yoon GM, Shemansky JM, Lin DY, Ying ZI, Chang J, Garrett WM, Kessenbrock M, Groth G, Tucker ML, Cooper B, Kieber JJ, Chang C (2012) CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (47):19486-19491. doi:10.1073/pnas.1214848109
- Jurgens G, Torres Ruiz RA, Berleth T (1994) Embryonic pattern formation in flowering plants. *Annu Rev Genet* 28:351-371. doi:10.1146/annurev.ge.28.120194.002031
- Kawamura E, Himmelspach R, Rashbrooke MC, Whittington AT, Gale KR, Collings DA, Wasteneys GO (2006) MICROTUBULE ORGANIZATION 1 regulates structure and function of microtubule arrays during mitosis and cytokinesis in the *Arabidopsis* root. *Plant Physiol* 140 (1):102-114. doi:10.1104/pp.105.069989

- Kawamura E, Wasteneys GO (2008) MOR1, the Arabidopsis thaliana homologue of Xenopus MAP215, promotes rapid growth and shrinkage, and suppresses the pausing of microtubules in vivo. *Journal of cell science* 121 (Pt 24):4114-4123. doi:10.1242/jcs.039065
- Kerim T, Imin N, Weinman JJ, Rolfe BG (2003) Proteome analysis of male gametophyte development in rice anthers. *Proteomics* 3 (5):738-751. doi:10.1002/pmic.200300424
- Kieber JJ, Rothenberg M, Roman G, Feldmann KA, Ecker JR (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in Arabidopsis, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72 (3):427-441
- Kim JM, Woo DH, Kim SH, Lee SY, Park HY, Seok HY, Chung WS, Moon YH (2012) Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant cell reports* 31 (1):217-224. doi:10.1007/s00299-011-1157-0
- Kirschner M, Mitchison T (1986) Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell* 45 (3):329-342
- Knetsch M, Wang M, Snaar-Jagalska BE, Heimovaara-Dijkstra S (1996) Abscisic Acid Induces Mitogen-Activated Protein Kinase Activation in Barley Aleurone Protoplasts. *The Plant cell* 8 (6):1061-1067. doi:10.1105/tpc.8.6.1061
- Koda Y (1997) Possible involvement of jasmonates in various morphogenic events. *Physiological plantarum* 100:639-646
- Kohoutova L, Kourova H, Nagy SK, Volc J, Halada P, Meszaros T, Meskiene I, Bogre L, Binarova P (2015) The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase 6 is associated with gamma-tubulin on microtubules, phosphorylates EB1c and maintains spindle orientation under nitrosative stress. *The New phytologist* 207 (4):1061-1074. doi:10.1111/nph.13501
- Koltunow AM, Truettner J, Cox KH, Wallroth M, Goldberg RB (1990) Different Temporal and Spatial Gene Expression Patterns Occur during Anther Development. *The Plant cell* 2 (12):1201-1224. doi:10.1105/tpc.2.12.1201
- Komis G, Illes P, Beck M, Samaj J (2011) Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Plant Biol* 14 (6):650-657. doi:10.1016/j.pbi.2011.07.008
- Konishi M, Sugiyama M (2003) Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of Arabidopsis thaliana. *Development* 130 (23):5637-5647. doi:10.1242/dev.00794
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (6):2940-2945
- Kovtun Y, Chiu WL, Zeng W, Sheen J (1998) Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* 395 (6703):716-720. doi:10.1038/27240
- Krizek BA (2011) Auxin regulation of Arabidopsis flower development involves members of the AINTEGUMENTA-LIKE/PLETHORA (AIL/PLT) family. *Journal of experimental botany* 62 (10):3311-3319. doi:10.1093/jxb/err127
- Krysan PJ, Jester PJ, Gottwald JR, Sussman MR (2002) An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *The Plant cell* 14 (5):1109-1120
- Kubis S, Patel R, Combe J, Bedard J, Kovacheva S, Lilley K, Biehl A, Leister D, Rios G, Koncz C, Jarvis P (2004) Functional specialization amongst the Arabidopsis Toc159

- family of chloroplast protein import receptors. *The Plant cell* 16 (8):2059-2077. doi:10.1105/tpc.104.023309
- Kumar K, Rao KP, Sharma P, Sinha AK (2008) Differential regulation of rice mitogen activated protein kinase kinase (MKK) by abiotic stress. *Plant physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale* 46 (10):891-897. doi:10.1016/j.plaphy.2008.05.014
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigan DL, Rapp UR, Avruch J (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358 (6385):417-421. doi:10.1038/358417a0
- Lafleur E, Kapfer C, Joly V, Liu Y, Tebbji F, Daigle C, Gray-Mitsumune M, Cappadocia M, Nantel A, Matton DP (2015b) The ScFRK1 MAPK kinase kinase (MAPKKK) from *Solanum chacoense* is involved in embryo sac and pollen development. *Journal of experimental botany* 66 (7):1833-1843. doi:10.1093/jxb/eru524
- Lalanne E, Twell D (2002) Genetic control of male germ unit organization in Arabidopsis. *Plant Physiol* 129 (2):865-875. doi:10.1104/pp.003301
- Lampard G (2006) Analysis of signaling from an unusual MAPKK (AtMKK3) in Arabidopsis thaliana. University of British Columbia, Vancouver, Canada
- Lang V, Usadel B, Obermeyer G (2015) De novo sequencing and analysis of the lily pollen transcriptome: an open access data source for an orphan plant species. *Plant Mol Biol* 87 (1-2):69-80. doi:10.1007/s11103-014-0261-2
- Lange-Carter CA, Pleiman CM, Gardner AM, Blumer KJ, Johnson GL (1993) A divergence in the MAP kinase regulatory network defined by MEK kinase and Raf. *Science* 260 (5106):315-319
- Laub MT, Goulian M (2007) Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annual review of genetics* 41:121-145. doi:10.1146/annurev.genet.41.042007.170548
- Lechner B, Rashbrooke MC, Collings DA, Eng RC, Kawamura E, Whittington AT, Wasteneys GO (2012) The N-terminal TOG domain of Arabidopsis MOR1 modulates affinity for microtubule polymers. *Journal of cell science* 125 (Pt 20):4812-4821. doi:10.1242/jcs.107045
- Lee H (2015) Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3 Is Required for Regulation during Dark-Light Transition. *Mol Cells* 38 (7):651-656. doi:10.14348/molcells.2015.0055
- Lee JS, Huh KW, Bhargava A, Ellis BE (2008) Comprehensive analysis of protein-protein interactions between Arabidopsis MAPKs and MAPK kinases helps define potential MAPK signalling modules. *Plant signaling & behavior* 3 (12):1037-1041
- Lee JS, Wang S, Sritubtim S, Chen JG, Ellis BE (2009) Arabidopsis mitogen-activated protein kinase MPK12 interacts with the MAPK phosphatase IBR5 and regulates auxin signaling. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 57 (6):975-985. doi:10.1111/j.1365-313X.2008.03741.x
- Lehti-Shiu MD, Shiu SH (2012) Diversity, classification and function of the plant protein kinase superfamily. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 367 (1602):2619-2639. doi:10.1098/rstb.2012.0003
- Leung J, Giraudat J (1998) Abscisic Acid Signal Transduction. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 49:199-222. doi:10.1146/annurev.arplant.49.1.199
- Li H, Zeng X, Liu ZQ, Meng QT, Yuan M, Mao TL (2009) Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-2 acts as a microtubule stabilizer. *Plant Mol Biol* 69 (3):313-324. doi:10.1007/s11103-008-9426-1

- Li J, Assmann SM (1996) An Abscisic Acid-Activated and Calcium-Independent Protein Kinase from Guard Cells of Fava Bean. *The Plant cell* 8 (12):2359-2368. doi:10.1105/tpc.8.12.2359
- Li Y, Zhang L, Lu W, Wang X, Wu CA, Guo X (2014) Overexpression of cotton GhMKK4 enhances disease susceptibility and affects abscisic acid, gibberellin and hydrogen peroxide signalling in transgenic *Nicotiana benthamiana*. *Molecular plant pathology* 15 (1):94-108. doi:10.1111/mpp.12067
- Ligterink W, Hirt H (2001) Mitogen-activated protein [MAP] kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int Rev Cytol* 201:209-275
- Ligterink W, Kroj T, zur Nieden U, Hirt H, Scheel D (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276 (5321):2054-2057
- Liu Y, Lagowski J, Sundholm A, Sundberg A, Kulesz-Martin M (2007) Microtubule disruption and tumor suppression by mitogen-activated protein kinase phosphatase 4. *Cancer research* 67 (22):10711-10719. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1968
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP (2004) Involvement of MEK1 MAPKK, NTF6 MAPK, WRKY/MYB transcription factors, COI1 and CTR1 in N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 38 (5):800-809. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02085.x
- Liu Y, Zhang S (2004) Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 16 (12):3386-3399. doi:10.1105/tpc.104.026609
- Lloyd C, Chan J (2008) The parallel lives of microtubules and cellulose microfibrils. *Curr Opin Plant Biol* 11 (6):641-646. doi:10.1016/j.pbi.2008.10.007
- Lu C, Han MH, Guevara-Garcia A, Fedoroff NV (2002) Mitogen-activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24):15812-15817. doi:10.1073/pnas.242607499
- Lukowitz W, Roeder A, Parmenter D, Somerville C (2004) A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in *Arabidopsis*. *Cell* 116 (1):109-119
- Luttrell DK, Luttrell LM (2003) Signaling in time and space: G protein-coupled receptors and mitogen-activated protein kinases. *Assay Drug Dev Technol* 1 (2):327-338. doi:10.1089/15406580360545143
- Ma H (2005) Molecular genetic analyses of microsporogenesis and microgametogenesis in flowering plants. *Annual review of plant biology* 56:393-434. doi:10.1146/annurev.arplant.55.031903.141717
- Ma J, Skibbe DS, Fernandes J, Walbot V (2008) Male reproductive development: gene expression profiling of maize anther and pollen ontogeny. *Genome biology* 9 (12):R181. doi:10.1186/gb-2008-9-12-r181
- Mandelkow E (1995) Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7 (1):72-81
- Mandelkow EM, Biernat J, Drewes G, Gustke N, Trinczek B, Mandelkow E (1995) Tau domains, phosphorylation, and interactions with microtubules. *Neurobiology of aging* 16 (3):355-362; discussion 362-353
- Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S (2002a) Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends in biochemical sciences* 27 (10):514-520

- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S (2002b) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298 (5600):1912-1934. doi:10.1126/science.1075762
- Mathur J, Mathur N, Kernebeck B, Srinivas BP, Hulskamp M (2003) A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization. *Current biology : CB* 13 (22):1991-1997
- Matsuoka D, Yasufuku T, Furuya T, Nanmori T (2015) An abscisic acid inducible Arabidopsis MAPKKK, MAPKKK18 regulates leaf senescence via its kinase activity. *Plant Mol Biol* 87 (6):565-575. doi:10.1007/s11103-015-0295-0
- Mayank P, Grossman J, Wuest S, Boisson-Dernier A, Roschitzki B, Nanni P, Nuhse T, Grossniklaus U (2012) Characterization of the phosphoproteome of mature Arabidopsis pollen. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 72 (1):89-101. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05061.x
- McCormick S (1993) Male Gametophyte Development. *The Plant cell* 5 (10):1265-1275. doi:10.1105/tpc.5.10.1265
- McCormick S (2004) Control of male gametophyte development. *The Plant cell* 16 Suppl:S142-153. doi:10.1105/tpc.016659
- Mehdy MC (1994) Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* 105 (2):467-472
- Melech-Bonfil S, Sessa G (2010) Tomato MAPKKKepsilon is a positive regulator of cell-death signaling networks associated with plant immunity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 64 (3):379-391
- Melikant B, Giuliani C, Halbmayer-Watzina S, Limmongkon A, Heberle-Bors E, Wilson C (2004) The Arabidopsis thaliana MEK AtMKK6 activates the MAP kinase AtMPK13. *FEBS letters* 576 (1-2):5-8. doi:10.1016/j.febslet.2004.08.051
- Meng H, Zhang X, Hankenson KD, Wang MM (2009) Thrombospondin 2 potentiates notch3/jagged1 signaling. *The Journal of biological chemistry* 284 (12):7866-7874. doi:10.1074/jbc.M803650200
- Meng LS, Yao SQ (2015) Transcription co-activator Arabidopsis ANGUSTIFOLIA3 (AN3) regulates water-use efficiency and drought tolerance by modulating stomatal density and improving root architecture by the transrepression of YODA (YDA). *Plant biotechnology journal* 13 (7):893-902. doi:10.1111/pbi.12324
- Meng X, Wang H, He Y, Liu Y, Walker JC, Torii KU, Zhang S (2012) A MAPK cascade downstream of ERECTA receptor-like protein kinase regulates Arabidopsis inflorescence architecture by promoting localized cell proliferation. *The Plant cell* 24 (12):4948-4960. doi:10.1105/tpc.112.104695
- Meng X, Zhang S (2013) MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual review of phytopathology* 51:245-266. doi:10.1146/annurev-phyto-082712-102314
- Menges M, Doczi R, Okresz L, Morandini P, Mizzi L, Soloviev M, Murray JA, Bogre L (2008) Comprehensive gene expression atlas for the Arabidopsis MAP kinase signalling pathways. *The New phytologist* 179 (3):643-662. doi:10.1111/j.1469-8137.2008.02552.x
- Meszaros T, Helfer A, Bogre L (2007) The More We Know, the Less We Understand?: Complexity of MAP Kinase Signaling. *Plant Signal Behav* 2 (1):30-32
- Meszaros T, Helfer A, Hatzimasoura E, Magyar Z, Serazetdinova L, Rios G, Bardoczky V, Teige M, Koncz C, Peck S, Bogre L (2006) The Arabidopsis MAP kinase kinase



- MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 48 (4):485-498. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02888.x
- Miao Y, Laun TM, Smykowski A, Zentgraf U (2007) Arabidopsis MEKK1 can take a short cut: it can directly interact with senescence-related WRKY53 transcription factor on the protein level and can bind to its promoter. *Plant Mol Biol* 65 (1-2):63-76. doi:10.1007/s11103-007-9198-z
- Migliaccio F, Piconese S (2001) Spiralizations and tropisms in Arabidopsis roots. *Trends in plant science* 6 (12):561-565
- Minden A, Lin A, Claret FX, Abo A, Karin M (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81 (7):1147-1157. doi:S0092-8674(05)80019-4 [pii]
- Miyazaki S, Murata T, Sakurai-Ozato N, Kubo M, Demura T, Fukuda H, Hasebe M (2009) ANXUR1 and 2, sister genes to FERONIA/SIRENE, are male factors for coordinated fertilization. *Current biology : CB* 19 (15):1327-1331. doi:10.1016/j.cub.2009.06.064
- Mizoguchi T, Ichimura K, Irie K, Morris P, Giraudat J, Matsumoto K, Shinozaki K (1998) Identification of a possible MAP kinase cascade in Arabidopsis thaliana based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS letters* 437 (1-2):56-60
- Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases. *Trends in biotechnology* 15 (1):15-19. doi:10.1016/S0167-7799(96)10074-3
- Mizoguchi T, Irie K, Hirayama T, Hayashida N, Yamaguchi-Shinozaki K, Matsumoto K, Shinozaki K (1996) A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (2):765-769
- Mizuta Y, Higashiyama T (2014) Antisense gene inhibition by phosphorothioate antisense oligonucleotide in Arabidopsis pollen tubes. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 78 (3):516-526. doi:10.1111/tpj.12461
- Mohanta TK, Arora PK, Mohanta N, Parida P, Bae H (2015) Identification of new members of the MAPK gene family in plants shows diverse conserved domains and novel activation loop variants. *BMC Genomics* 16:58. doi:10.1186/s12864-015-1244-7
- Morgan BA, Bouquin N, Johnston LH (1995) Two-component signal-transduction systems in budding yeast MAP a different pathway? *Trends in cell biology* 5 (12):453-457
- Morrison DK, Davis RJ (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual review of cell and developmental biology* 19:91-118. doi:10.1146/annurev.cellbio.19.111401.091942
- Muller J, Beck M, Mettlich U, Komis G, Hause G, Menzel D, Samaj J (2010) Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 61 (2):234-248. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.04046.x

- Muller S, Han S, Smith LG (2006) Two kinesins are involved in the spatial control of cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Current biology* : CB 16 (9):888-894. doi:10.1016/j.cub.2006.03.034
- Murata T, Hasebe M (2007) Microtubule-dependent microtubule nucleation in plant cells. *Journal of plant research* 120 (1):73-78. doi:10.1007/s10265-006-0054-z
- Nakagami H, Kiegerl S, Hirt H (2004) OMTK1, a novel MAPKKK, channels oxidative stress signaling through direct MAPK interaction. *The Journal of biological chemistry* 279 (26):26959-26966. doi:10.1074/jbc.M312662200
- Nakagami H, Pitzschke A, Hirt H (2005) Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in plant science* 10 (7):339-346. doi:10.1016/j.tplants.2005.05.009
- Nakamura M, Naoi K, Shoji T, Hashimoto T (2004) Low concentrations of propyzamide and oryzalin alter microtubule dynamics in *Arabidopsis* epidermal cells. *Plant & cell physiology* 45 (9):1330-1334. doi:10.1093/pcp/pch300
- Nakamura S, Pourkheirandish M, Morishige H, Kubo Y, Nakamura M, Ichimura K, Seo S, Kanamori H, Wu J, Ando T, Hensel G, Sameri M, Stein N, Sato K, Matsumoto T, Yano M, Komatsuda T (2016) Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3 Regulates Seed Dormancy in Barley. *Current biology* : CB 26 (6):775-781. doi:10.1016/j.cub.2016.01.024
- Ning J, Li X, Hicks LM, Xiong L (2010) A Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol* 152 (2):876-890. doi:10.1104/pp.109.149856
- Nishihama R, Banno H, Kawahara E, Irie K, Machida Y (1997) Possible involvement of differential splicing in regulation of the activity of *Arabidopsis* ANP1 that is related to mitogen-activated protein kinase kinase kinases (MAPKKKs). *The Plant journal : for cell and molecular biology* 12 (1):39-48
- Nishihama R, Ishikawa M, Araki S, Soyano T, Asada T, Machida Y (2001) The NPK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase is a regulator of cell-plate formation in plant cytokinesis. *Genes Dev* 15 (3):352-363. doi:10.1101/gad.863701
- Nishihama R, Soyano T, Ishikawa M, Araki S, Tanaka H, Asada T, Irie K, Ito M, Terada M, Banno H, Yamazaki Y, Machida Y (2002) Expansion of the cell plate in plant cytokinesis requires a kinesin-like protein/MAPKKK complex. *Cell* 109 (1):87-99
- Nogales E (2000) Structural insights into microtubule function. *Annual review of biochemistry* 69:277-302. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.277
- Nogales E (2001) Structural insight into microtubule function. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 30:397-420. doi:10.1146/annurev.biophys.30.1.397
- Noir S, Brautigam A, Colby T, Schmidt J, Panstruga R (2005) A reference map of the *Arabidopsis thaliana* mature pollen proteome. *Biochemical and biophysical research communications* 337 (4):1257-1266. doi:10.1016/j.bbrc.2005.09.185
- Nonomura K, Miyoshi K, Eiguchi M, Suzuki T, Miyao A, Hirochika H, Kurata N (2003) The MSP1 gene is necessary to restrict the number of cells entering into male and female sporogenesis and to initiate anther wall formation in rice. *The Plant cell* 15 (8):1728-1739
- O'Brien M, Gray-Mitsumune M, Kapfer C, Bertrand C, Matton DP (2007) The ScFRK2 MAP kinase kinase kinase from *Solanum chacoense* affects pollen development and viability. *Planta* 225 (5):1221-1231. doi:10.1007/s00425-006-0432-8

- Oh CS, Martin GB (2011) Effector-triggered immunity mediated by the Pto kinase. *Trends in plant science* 16 (3):132-140. doi:10.1016/j.tplants.2010.11.001
- Oliva M, Dunand C (2007) Waving and skewing: how gravity and the surface of growth media affect root development in *Arabidopsis*. *The New phytologist* 176 (1):37-43. doi:10.1111/j.1469-8137.2007.02184.x
- Onelli E, Idilli AI, Moscatelli A (2015) Emerging roles for microtubules in angiosperm pollen tube growth highlight new research cues. *Frontiers in plant science* 6:51. doi:10.3389/fpls.2015.00051
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *The EMBO journal* 22 (6):1282-1288. doi:10.1093/emboj/cdg131
- Pagnussat GC, Yu HJ, Ngo QA, Rajani S, Mayalagu S, Johnson CS, Capron A, Xie LF, Ye D, Sundaresan V (2005) Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in *Arabidopsis*. *Development* 132 (3):603-614. doi:10.1242/dev.01595
- Paredes AR, Somerville CR, Ehrhardt DW (2006) Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312 (5779):1491-1495. doi:10.1126/science.1126551
- Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH (2001) Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews* 22 (2):153-183. doi:10.1210/edrv.22.2.0428
- Pedley KF, Martin GB (2005) Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 8 (5):541-547. doi:10.1016/j.pbi.2005.07.006
- Perrin RM, Wang Y, Yuen CY, Will J, Masson PH (2007) WVD2 is a novel microtubule-associated protein in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 49 (6):961-971. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.03015.x
- Petersen M, Brodersen P, Naested H, Andreasson E, Lindhart U, Johansen B, Nielsen HB, Lacy M, Austin MJ, Parker JE, Sharma SB, Klessig DF, Martienssen R, Mattsson O, Jensen AB, Mundy J (2000) *Arabidopsis* map kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103 (7):1111-1120
- Pina C, Pinto F, Feijo JA, Becker JD (2005) Gene family analysis of the *Arabidopsis* pollen transcriptome reveals biological implications for cell growth, division control, and gene expression regulation. *Plant Physiol* 138 (2):744-756. doi:10.1104/pp.104.057935
- Pitzschke A, Schikora A, Hirt H (2009) MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr Opin Plant Biol* 12 (4):421-426. doi:10.1016/j.pbi.2009.06.008
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2009) MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes Dev* 23 (1):80-92. doi:10.1101/gad.174009
- Popescu SC, Popescu GV, Bachan S, Zhang Z, Seay M, Gerstein M, Snyder M, Dinesh-Kumar SP (2007) Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (11):4730-4735. doi:10.1073/pnas.0611615104
- Posas F, Saito H (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276 (5319):1702-1705
- Qin Y, Leydon AR, Manziello A, Pandey R, Mount D, Denic S, Vasic B, Johnson MA, Palanivelu R (2009) Penetration of the stigma and style elicits a novel transcriptome in

- pollen tubes, pointing to genes critical for growth in a pistil. *PLoS genetics* 5 (8):e1000621. doi:10.1371/journal.pgen.1000621
- Ray LB, Sturgill TW (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (6):1502-1506
- Ray LB, Sturgill TW (1988) Insulin-stimulated microtubule-associated protein kinase is phosphorylated on tyrosine and threonine in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (11):3753-3757
- Reddy A, Day I (2001) Kinesins in the Arabidopsis genome: a comparative analysis among eukaryotes. *BMC Genomics* 2:2
- Ren D, Yang H, Zhang S (2002) Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* 277 (1):559-565. doi:10.1074/jbc.M109495200
- Richardson DN, Simmons MP, Reddy AS (2006) Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genomics* 7:18. doi:10.1186/1471-2164-7-18
- Riedl SJ, Shi Y (2004) Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* 5 (11):897-907. doi:10.1038/nrm1496
- Rodriguez MC, Petersen M, Mundy J (2010) Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual review of plant biology* 61:621-649. doi:10.1146/annurev-arplant-042809-112252
- Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (18):6940-6943
- Rotman N, Durberry A, Wardle A, Yang WC, Chaboud A, Faure JE, Berger F, Twell D (2005) A novel class of MYB factors controls sperm-cell formation in plants. *Current biology : CB* 15 (3):244-248. doi:10.1016/j.cub.2005.01.013
- Rudd JJ, Osman K, Franklin FC, Franklin-Tong VE (2003) Activation of a putative MAP kinase in pollen is stimulated by the self-incompatibility (SI) response. *FEBS letters* 547 (1-3):223-227
- Rutley N, Twell D (2015) A decade of pollen transcriptomics. *Plant Reprod* 28 (2):73-89. doi:10.1007/s00497-015-0261-7
- Sakai T, Honing H, Nishioka M, Uehara Y, Takahashi M, Fujisawa N, Saji K, Seki M, Shinozaki K, Jones MA, Smirnov N, Okada K, Wasteneys GO (2008) Armadillo repeat-containing kinesins and a NIMA-related kinase are required for epidermal-cell morphogenesis in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 53 (1):157-171. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03327.x
- Sanders PM, Bui AQ, Weterings K, McIntire KN, Hsu Y-C, Lee PY, Truong MT, Beals TP, Goldberg RB (1999) Anther developmental defects in Arabidopsis thaliana male-sterile mutants.pdf. *Sex Plant Reprod* 11:297-322
- Sari-Gorla M, Ferrario S, Villa M, Pè ME (1996) gaMS-1: A gametophytic male sterile mutant in maize. *Sexual Plant Reproduction* 9 (4):216-220

- Sasabe M, Kosetsu K, Hidaka M, Murase A, Machida Y (2011) Arabidopsis thaliana MAP65-1 and MAP65-2 function redundantly with MAP65-3/PLEIADE in cytokinesis downstream of MPK4. *Plant signaling & behavior* 6 (5):743-747
- Sasabe M, Soyano T, Takahashi Y, Sonobe S, Igarashi H, Itoh TJ, Hidaka M, Machida Y (2006) Phosphorylation of NtMAP65-1 by a MAP kinase down-regulates its activity of microtubule bundling and stimulates progression of cytokinesis of tobacco cells. *Genes Dev* 20 (8):1004-1014. doi:10.1101/gad.1408106
- Schiott M, Romanowsky SM, Baekgaard L, Jakobsen MK, Palmgren MG, Harper JF (2004) A plant plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump is required for normal pollen tube growth and fertilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (25):9502-9507. doi:10.1073/pnas.0401542101
- Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D (2006) Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant cell* 18 (5):1121-1133. doi:10.1105/tpc.105.039834
- Scott RJ, Spielman M, Dickinson HG (2004) Stamen structure and function. *The Plant cell* 16 Suppl:S46-60. doi:10.1105/tpc.017012
- Sedbrook JC, Kaloriti D (2008) Microtubules, MAPs and plant directional cell expansion. *Trends in plant science* 13 (6):303-310. doi:10.1016/j.tplants.2008.04.002
- Seger R, Ahn NG, Posada J, Munar ES, Jensen AM, Cooper JA, Cobb MH, Krebs EG (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *The Journal of biological chemistry* 267 (20):14373-14381
- Seo S, Katou S, Seto H, Gomi K, Ohashi Y (2007) The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 49 (5):899-909. doi:10.1111/j.1365-3113X.2006.03003.x
- Seo S, Okamoto M, Seto H, Ishizuka K, Sano H, Ohashi Y (1995) Tobacco MAP kinase: a possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* 270 (5244):1988-1992
- Seo S, Sano H, Ohashi Y (1999) Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *The Plant cell* 11 (2):289-298
- Sethi V, Raghuram B, Sinha AK, Chattopadhyay S (2014) A mitogen-activated protein kinase cascade module, MKK3-MPK6 and MYC2, is involved in blue light-mediated seedling development in Arabidopsis. *The Plant cell* 26 (8):3343-3357. doi:10.1105/tpc.114.128702
- Shaw SL, Kamyar R, Ehrhardt DW (2003) Sustained microtubule treadmilling in Arabidopsis cortical arrays. *Science* 300 (5626):1715-1718. doi:10.1126/science.1083529
- Shiu SH, Bleeker AB (2001) Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19):10763-10768. doi:10.1073/pnas.181141598
- Shoji T, Narita NN, Hayashi K, Asada J, Hamada T, Sonobe S, Nakajima K, Hashimoto T (2004) Plant-specific microtubule-associated protein SPIRAL2 is required for anisotropic growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* 136 (4):3933-3944. doi:10.1104/pp.104.051748

- Smertenko AP, Chang HY, Sonobe S, Fenyk SI, Weingartner M, Bogre L, Hussey PJ (2006) Control of the AtMAP65-1 interaction with microtubules through the cell cycle. *Journal of cell science* 119 (Pt 15):3227-3237. doi:10.1242/jcs.03051
- Smertenko AP, Chang HY, Wagner V, Kaloriti D, Fenyk S, Sonobe S, Lloyd C, Hauser MT, Hussey PJ (2004) The Arabidopsis microtubule-associated protein AtMAP65-1: molecular analysis of its microtubule bundling activity. *The Plant cell* 16 (8):2035-2047. doi:10.1105/tpc.104.023937
- Smertenko AP, Kaloriti D, Chang HY, Fiserova J, Opatrny Z, Hussey PJ (2008) The C-terminal variable region specifies the dynamic properties of Arabidopsis microtubule-associated protein MAP65 isotypes. *The Plant cell* 20 (12):3346-3358. doi:10.1105/tpc.108.063362
- Smirnova E (2012) Microtubules During the Cell Cycle of Higher Plant Cells *Current Frontiers and perspectives in cell biology*
- Smith LG, Gerttula SM, Han S, Levy J (2001) Tangled1: a microtubule binding protein required for the spatial control of cytokinesis in maize. *The Journal of cell biology* 152 (1):231-236
- Smith LG, Hake S, Sylvester AW (1996) The tangled-1 mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development* 122 (2):481-489
- Sorensen A, Guerineau F, Canales-Holzeis C, Dickinson HG, Scott RJ (2002) A novel extinction screen in Arabidopsis thaliana identifies mutant plants defective in early microsporangial development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 29 (5):581-594
- Soyano T, Ishikawa M, Nishihama R, Araki S, Ito M, Ito M, Machida Y (2002) Control of plant cytokinesis by an NPK1-mediated mitogen-activated protein kinase cascade. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 357 (1422):767-775. doi:10.1098/rstb.2002.1094
- Soyano T, Nishihama R, Morikiyo K, Ishikawa M, Machida Y (2003) NQK1/NtMEK1 is a MAPKK that acts in the NPK1 MAPKKK-mediated MAPK cascade and is required for plant cytokinesis. *Genes Dev* 17 (8):1055-1067. doi:10.1101/gad.1071103
- 17/8/1055 [pii]
- Steggerda SM, Paschal BM (2002) Regulation of nuclear import and export by the GTPase Ran. *Int Rev Cytol* 217:41-91
- Stewart M (2000) Insights into the molecular mechanism of nuclear trafficking using nuclear transport factor 2 (NTF2). *Cell structure and function* 25 (4):217-225
- Stone JM, Walker JC (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol* 108 (2):451-457. doi:108/2/451 [pii]
- Stoppin-Mellet V, Gaillard J, Vantard M (2003) Plant katanin, a microtubule severing protein. *Cell biology international* 27 (3):279
- Strachan SD, Hess FD (1983) The biochemical mechanism of action of the dinitroaniline herbicide oryzalin. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 20 (2):141-150. doi:10.1016/0048-3575(83)90018-4
- Strome S, Lehmann R (2007) Germ versus soma decisions: lessons from flies and worms. *Science* 316 (5823):392-393. doi:10.1126/science.1140846

- Su H, Zhu J, Cai C, Pei W, Wang J, Dong H, Ren H (2012) FIMBRIN1 is involved in lily pollen tube growth by stabilizing the actin fringe. *The Plant cell* 24 (11):4539-4554. doi:10.1105/tpc.112.099358
- Su SH, Suarez-Rodriguez MC, Krysan P (2007) Genetic interaction and phenotypic analysis of the Arabidopsis MAP kinase pathway mutations mekk1 and mpk4 suggests signaling pathway complexity. *FEBS letters* 581 (17):3171-3177. doi:10.1016/j.febslet.2007.05.083
- Suarez-Rodriguez MC, Adams-Phillips L, Liu Y, Wang H, Su SH, Jester PJ, Zhang S, Bent AF, Krysan PJ (2007) MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiol* 143 (2):661-669. doi:10.1104/pp.106.091389
- Sugden PH, Clerk A (1997) Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cellular signalling* 9 (5):337-351
- Sugimoto K, Himmelspach R, Williamson RE, Wasteneys GO (2003) Mutation or drug-dependent microtubule disruption causes radial swelling without altering parallel cellulose microfibril deposition in Arabidopsis root cells. *The Plant cell* 15 (6):1414-1429
- Sun SC, Xiong B, Lu SS, Sun QY (2008) MEK1/2 is a critical regulator of microtubule assembly and spindle organization during rat oocyte meiotic maturation. *Molecular reproduction and development* 75 (10):1542-1548. doi:10.1002/mrd.20891
- Sun Y, Wang C, Yang B, Wu F, Hao X, Liang W, Niu F, Yan J, Zhang H, Wang B, Deyholos MK, Jiang YQ (2014) Identification and functional analysis of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) genes in canola (*Brassica napus* L.). *Journal of experimental botany* 65 (8):2171-2188. doi:10.1093/jxb/eru092
- Takahashi F, Yoshida R, Ichimura K, Mizoguchi T, Seo S, Yonezawa M, Maruyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2007) The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *The Plant cell* 19 (3):805-818. doi:10.1105/tpc.106.046581
- Takahashi Y, Soyano T, Sasabe M, Machida Y (2004) A MAP kinase cascade that controls plant cytokinesis. *Journal of biochemistry* 136 (2):127-132. doi:10.1093/jb/mvh118
- Teige M, Scheikl E, Eulgem T, Doczi R, Ichimura K, Shinozaki K, Dangl JL, Hirt H (2004) The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular cell* 15 (1):141-152. doi:10.1016/j.molcel.2004.06.023
- Terret ME, Lefebvre C, Djiane A, Rassinier P, Moreau J, Maro B, Verlhac MH (2003) DOC1R: a MAP kinase substrate that control microtubule organization of metaphase II mouse oocytes. *Development* 130 (21):5169-5177. doi:10.1242/dev.00731
- Thitamadee S, Tsuchihara K, Hashimoto T (2002) Microtubule basis for left-handed helical growth in Arabidopsis. *Nature* 417 (6885):193-196. doi:10.1038/417193a
- Thompson MV, Holbrook NM (2004) Root-gel interactions and the root waving behavior of Arabidopsis. *Plant Physiol* 135 (3):1822-1837. doi:10.1104/pp.104.040881
- Torada A, Koike M, Ogawa T, Takenouchi Y, Tadamura K, Wu J, Matsumoto T, Kawaura K, Ogihara Y (2016) A Causal Gene for Seed Dormancy on Wheat Chromosome 4A Encodes a MAP Kinase Kinase. *Current biology : CB* 26 (6):782-787. doi:10.1016/j.cub.2016.01.063
- Traas J, Bellini C, Nancy P, Bouchez D, Caboche M (1995) Normal differentiation patterns in plants lacking microtubular preprophase bands. *Nature* 375:676-677

- Tran PT, Walker RA, Salmon ED (1997) A metastable intermediate state of microtubule dynamic instability that differs significantly between plus and minus ends. *The Journal of cell biology* 138 (1):105-117
- Twell D, Oh S-A, Honys D (2006) Pollen development, a genetic and transcriptomic view.pdf. *Plant Cell Monogr* 10 (1007):7089\_7042. doi:10.1007/7089\_042/Published
- Twell D, Park SK, Hawkins TJ, Schubert D, Schmidt R, Smertenko A, Hussey PJ (2002) MOR1/GEM1 has an essential role in the plant-specific cytokinetic phragmoplast. *Nature cell biology* 4 (9):711-714. doi:10.1038/ncb844
- Underwood W, Zhang S, He SY (2007) The *Pseudomonas syringae* type III effector tyrosine phosphatase HopAO1 suppresses innate immunity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52 (4):658-672. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03262.x
- Usami S, Banno H, Ito Y, Nishihama R, Machida Y (1995) Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (19):8660-8664
- Verlhac MH, Kubiak JZ, Weber M, Geraud G, Colledge WH, Evans MJ, Maro B (1996) Mos is required for MAP kinase activation and is involved in microtubule organization during meiotic maturation in the mouse. *Development* 122 (3):815-822
- Voronin V, Aionesei T, Limmongkon A, Barinova I, Touraev A, Lauriere C, Coronado MJ, Testillano PS, Risueno MC, Heberle-Bors E, Wilson C (2004) The MAP kinase kinase NtMEK2 is involved in tobacco pollen germination. *FEBS letters* 560 (1-3):86-90. doi:10.1016/S0014-5793(04)00076-6
- Voronin V, Touraev A, Kieft H, van Lammeren AA, Heberle-Bors E, Wilson C (2001) Temporal and tissue-specific expression of the tobacco ntf4 MAP kinase. *Plant Mol Biol* 45 (6):679-689
- Walia A, Lee JS, Wasteneys G, Ellis B (2009) *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase MPK18 mediates cortical microtubule functions in plant cells. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 59 (4):565-575. doi:10.1111/j.1365-313X.2009.03895.x
- Walsh CT, Garneau-Tsodikova S, Gatto GJ, Jr. (2005) Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angewandte Chemie* 44 (45):7342-7372. doi:10.1002/anie.200501023
- Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 40 (3):428-438. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02219.x
- Wang H, Liu Y, Bruffett K, Lee J, Hause G, Walker JC, Zhang S (2008a) Haplo-insufficiency of MPK3 in MPK6 mutant background uncovers a novel function of these two MAPKs in *Arabidopsis* ovule development. *The Plant cell* 20 (3):602-613. doi:10.1105/tpc.108.058032
- Wang H, Ngwenyama N, Liu Y, Walker JC, Zhang S (2007) Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 19 (1):63-73. doi:tpc.106.048298 [pii]
- Wang HW, Nogales E (2005) Nucleotide-dependent bending flexibility of tubulin regulates microtubule assembly. *Nature* 435 (7044):911-915. doi:10.1038/nature03606



- Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH (2008b) Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 148 (3):1201-1211. doi:10.1104/pp.108.126375
- Wang Z, Liang Y, Li C, Xu Y, Lan L, Zhao D, Chen C, Xu Z, Xue Y, Chong K (2005) Microarray analysis of gene expression involved in anther development in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 58 (5):721-737. doi:10.1007/s11103-005-8267-4
- Wasteneys GO (2002) Microtubule organization in the green kingdom: chaos or self-order? *Journal of cell science* 115 (Pt 7):1345-1354
- Wasteneys GO (2004) Progress in understanding the role of microtubules in plant cells. *Curr Opin Plant Biol* 7 (6):651-660. doi:10.1016/j.pbi.2004.09.008
- Wasteneys GO, Ambrose JC (2009) Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends in cell biology* 19 (2):62-71. doi:10.1016/j.tcb.2008.11.004
- Wasteneys GO, Galway ME (2003) Remodeling the cytoskeleton for growth and form: an overview with some new views. *Annual review of plant biology* 54:691-722. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134818
- Wegner A (1976) Head to tail polymerization of actin. *Journal of molecular biology* 108 (1):139-150
- Weigel D, Glazebrook J (2002) *Arabidopsis : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Westermarck J, Ivaska J, Corthals GL (2013) Identification of protein interactions involved in cellular signaling. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 12 (7):1752-1763. doi:10.1074/mcp.R113.027771
- Whittington AT, Vugrek O, Wei KJ, Hasenbein NG, Sugimoto K, Rashbrooke MC, Wasteneys GO (2001) MOR1 is essential for organizing cortical microtubules in plants. *Nature* 411 (6837):610-613. doi:10.1038/35079128
- Wick SM (1985) Immunofluorescence microscopy of tubulin and microtubule arrays in plant cells. III. Transition between mitotic/cytokinetic and interphase microtubule arrays. *Cell biology international reports* 9 (4):357-371
- Wicker-Planquart C, Stoppin-Mellet V, Blanchoin L, Vantard M (2004) Interactions of tobacco microtubule-associated protein MAP65-1b with microtubules. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 39 (1):126-134. doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02115.x
- Widmann C, Gibson S, Jarpe MB, Johnson GL (1999) Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiological reviews* 79 (1):143-180
- Wilkinson JE, Twell D, Lindsey K (1997) Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *Journal of experimental botany* 48 (2):265-275. doi:10.1093/jxb/48.2.265
- Wittmann T, Hyman A, Desai A (2001) The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature cell biology* 3 (1):E28-34. doi:10.1038/35050669
- Xing T, Malik K, Martin T, Miki BL (2001) Activation of tomato PR and wound-related genes by a mutagenized tomato MAP kinase kinase through divergent pathways. *Plant Mol Biol* 46 (1):109-120

- Xing Y, Jia W, Zhang J (2009) AtMKK1 and AtMPK6 are involved in abscisic acid and sugar signaling in Arabidopsis seed germination. *Plant Mol Biol* 70 (6):725-736. doi:10.1007/s11103-009-9503-0
- Xiong L, Yang Y (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant cell* 15 (3):745-759
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H, Lei L, Yang H, Liu G, Ren D (2008) Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in Arabidopsis. *The Journal of biological chemistry* 283 (40):26996-27006. doi:10.1074/jbc.M801392200
- Xu J, Zhang S (2015) Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in plant science* 20 (1):56-64. doi:10.1016/j.tplants.2014.10.001
- Xu T, Sun X, Jiang S, Ren D, Liu G (2007) Cotton GhKCH2, a plant-specific kinesin, is low-affinitive and nucleotide-independent as binding to microtubule. *Journal of biochemistry and molecular biology* 40 (5):723-730
- Yaakov G, Duch A, Garcia-Rubio M, Clotet J, Jimenez J, Aguilera A, Posas F (2009) The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmotic stress. *Molecular biology of the cell* 20 (15):3572-3582. doi:10.1091/mbc.E09-02-0129
- Yang T, Shad Ali G, Yang L, Du L, Reddy AS, Poovaiah BW (2010) Calcium/calmodulin-regulated receptor-like kinase CRLK1 interacts with MEKK1 in plants. *Plant signaling & behavior* 5 (8):991-994. doi:10.1074/jbc.M109.035659
- Yemets A, Sheremet Y, Vissenberg K, Van Orden J, Verbelen JP, Blume YB (2008) Effects of tyrosine kinase and phosphatase inhibitors on microtubules in Arabidopsis root cells. *Cell biology international* 32 (6):630-637. doi:10.1016/j.cellbi.2008.01.013
- Yoo SD, Cho YH, Tena G, Xiong Y, Sheen J (2008) Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C2H4 signalling. *Nature* 451 (7180):789-795. doi:10.1038/nature06543
- Yue J, Xiong W, Ferrell JE (2006) B-Raf and C-Raf are required for Ras-stimulated p42 MAP kinase activation in Xenopus egg extracts. *Oncogene* 25 (23):3307-3315. doi:10.1038/sj.onc.1209354
- Zeng Q, Chen JG, Ellis BE (2011) AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 67 (5):895-906. doi:10.1111/j.1365-3113.2011.04642.x
- Zhang S, Klessig DF (1997) Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *The Plant cell* 9 (5):809-824. doi:10.1105/tpc.9.5.809
- Zhang S, Klessig DF (1998) Resistance gene N-mediated de novo synthesis and activation of a tobacco mitogen-activated protein kinase by tobacco mosaic virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (13):7433-7438
- Zhang S, Klessig DF (2001) MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in plant science* 6 (11):520-527
- Zhang S, Zhou Q, Chen H, Yi J, Gao JF, Yang ZN (2006a) Identification and genetic mapping of a novel gene involved in pollen development in Arabidopsis. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao* 39 (2):163-168
- Zhang T, Liu Y, Xue L, Xu S, Chen T, Yang T, Zhang L, An L (2006b) Molecular cloning and characterization of a novel MAP kinase gene in *Chorispora bungeana*. *Plant*

- physiology and biochemistry : PPB / Societe francaise de physiologie vegetale 44  
(1):78-84. doi:10.1016/j.plaphy.2006.01.001
- Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006c) Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols* 1 (2):641-646. doi:10.1038/nprot.2006.97
- Zhang Z, Wu Y, Gao M, Zhang J, Kong Q, Liu Y, Ba H, Zhou J, Zhang Y (2012) Disruption of PAMP-induced MAP kinase cascade by a *Pseudomonas syringae* effector activates plant immunity mediated by the NB-LRR protein SUMM2. *Cell host & microbe* 11 (3):253-263. doi:10.1016/j.chom.2012.01.015
- Zhao DZ, Wang GF, Speal B, Ma H (2002) The excess microsporocytes1 gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the *Arabidopsis* anther. *Genes Dev* 16 (15):2021-2031. doi:10.1101/gad.997902
- Zhao Y, Chen RH (2006) Mps1 phosphorylation by MAP kinase is required for kinetochore localization of spindle-checkpoint proteins. *Current biology : CB* 16 (17):1764-1769. doi:10.1016/j.cub.2006.07.058
- Zheng CF, Guan KL (1994) Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *The EMBO journal* 13 (5):1123-1131
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136 (1):2621-2632. doi:10.1104/pp.104.046367