

FRÉDÉRIC VIGNEAULT

**CARACTÉRISATION DE LA FAMILLE DES
PROTÉINES KINASES DE TYPE NIMA CHEZ LES
PLANTES ET ANALYSE FONCTIONNELLE DE
PNEK1, UNE NEK DU PEUPLIER (*POPULUS
TREMULA X P. ALBA* CLONE 717 I-B4)**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Sciences forestières
pour l'obtention du grade de *Philosophiæ Doctor* (Ph.D.)

SCIENCES DU BOIS ET DE LA FORÊT
FACULTÉ DE FORESTERIE ET GÉOMATIQUE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2009

© Frédéric Vigneault, 2009

Résumé

Les protéines kinases de type NIMA (*NIMA related kinases* - Neks) forment une famille relativement bien conservée chez les eucaryotes. Plusieurs d'entre elles, comme la protéine kinase NIMA d'*Aspergillus nidulans* et la protéine Nek2 de mammifères ont fait l'objet d'études suffisamment approfondies pour les impliquer dans la régulation du cycle cellulaire. L'objectif du présent travail était de caractériser la famille des Neks chez les plantes, et plus particulièrement de déterminer le rôle de PNek1, une Nek de peuplier.

J'ai identifié neuf PtNeks chez *Populus trichocarpa*, sept AtNeks chez *Arabidopsis thaliana* et six OsNeks chez *Oryza sativa*. L'analyse phylogénétique et leur distribution chromosomique suggèrent une descendance unique chez les plantes, probablement à partir de Nek1. L'analyse du profil d'expression transcriptionnelle indique que la régulation de l'expression des Neks est liée aux patrons de développement basipétal de la feuille et vasculaire de la plante. Plus particulièrement, l'analyse de l'expression du gène *PNek1* révèle une concordance exacte avec les sites de production de l'auxine, du développement basipétal de la feuille et de l'initiation du système vasculaire. *PNek1* n'est toutefois pas induite par la signalisation de l'auxine. La surexpression de PNek1 chez *Arabidopsis* induit des anomalies importantes au niveau de l'inflorescence, empêchant même la fertilisation de la fleur. Au plan cellulaire, PNek1 est localisé dans le nucléole et s'accumule lors de la phase G₂ précédant la mitose. L'accumulation de *PNek1* est aussi induite lors d'un stress génotoxique au point de contrôle en G₁/S. Des résultats récents de double hybride indiquent que PNek1 pourrait être impliquée dans la maturation de l'ARNm puisqu'elle interagit avec DBR1, une protéine directement impliquée dans l'épissage.

Le présent travail offre une perspective inédite de la littérature des Neks comme régulateurs du cycle cellulaire. Le contexte biologique particulier du peuplier m'a aussi conduit à associer les Neks au développement d'organes complexes. Cette approche et ces observations représentent donc en soit une contribution originale, se distinguant des nombreuses études antérieures faites chez les mammifères, où seule leur relation au cycle cellulaire a été étudiée.

Abstract

The NIMA-related kinases family (Neks) is well conserved among eukaryotes. Several studies, especially on *Aspergillus nidulans* NIMA and mammalian Nek2, have tagged them as cell cycle regulators. The objective pursued in this work was to characterise the plant Nek family and, more specifically, to identify a possible role for PNek1, a Nek from poplar tree.

Here, I describe nine *PtNeks* in *Populus trichocarpa*, seven *AtNeks* in *Arabidopsis thaliana* and six *OsNeks* in *Oryza sativa*. Phylogenetic analysis in addition to their chromosomal distribution suggest a unique origin for all plant Neks. Exhaustive transcript expression analysis indicates that plant Neks regulation is related to the basipetal and vascular plant development patterns. Moreover, *PNek1* promoter expression analysis reveals a striking similarity with sites of auxin production, basipetal leaf development and vascular initiation. However, PNek1 is not induced by auxin signalling. PNek1 overexpression in *Arabidopsis* induces severe inflorescence anomalies, which can lead to flower sterility. At the cell level, PNek1 is localised in the nucleoli and accumulates during the G₂ phase before the onset for mitosis. PNek1 transcript accumulation could also be induced by a genotoxic stress at the G₁/S checkpoint. Yeast two-hybrid experiments indicate that PNek1 could be involved in mRNA maturation since it interacts with DBR1, a protein directly involved in RNA splicing.

This work offers a unique perspective to the actual Neks literature as cell cycle regulators. The particular biological context of poplar trees also brought me to associate Neks with complex organ development. This approach and these observations represent an original contribution, distinguishing itself from the numerous mammals studies which only looked at their relation to the cell cycle regulation.

Avant-propos

Après ces dernières années, je réalise à quel point la caractérisation de PNek1 s'est avérée une tâche ardue. Je ne me suis jamais senti aussi près du but, mais aussi loin à la fois. D'un point de vue forestier, j'ai débroussaillé pas mal large. Il reste par contre beaucoup à faire. Je me réjouis toutefois que d'autres laboratoires aient commencé à s'intéresser aux Neks. Ce projet m'a beaucoup apporté, tant du point de vue technique que d'une meilleure connaissance de mes limites, mais surtout de mes intérêts. Bien que la thèse soit l'élément final menant à l'obtention du Doctorat, je l'ai écrite pour moi. En ce sens, cette thèse reflète bien mon esprit rationnel, ainsi que ma personnalité plutôt directe et sans détour.

J'ai eu énormément de chance de travailler dans un environnement où l'accessibilité aux ressources matérielles et surtout humaines n'était jamais une limite. Je te remercie Armand de m'avoir donné cette chance et toute cette latitude de pouvoir orienter le projet comme bon me semblait. Merci surtout d'avoir compris et supporté mes intérêts quant à mon cheminement futur. Je ne crois pas que j'aurais pu me développer autant autrement.

Je tiens aussi à remercier John Mackay. Bien qu'on ne se croise qu'occasionnellement, tu m'as prêté une oreille attentive. Tes conseils et ton expérience furent très appréciés. Je suis bien content de te connaître.

Je remercie les membres mon jury de thèse, Dominique Michaud qui est là depuis le début du projet, Michel Cusson que j'ai eu la chance de croiser au CFL, ainsi que François Ouellet auquel je souhaite merde pour le début de sa carrière académique.

Merci aussi à Jacqueline Grima-Pettenati pour tes conseils et ta bonne humeur. Louis Bernier, merci pour tes conseils avisés lorsque j'ai commencé ce projet.

Thank you Bob Rutledge for developing a technique which saved me several months of work and for all those discussions; I learned a lot.

À l'équipe du labo, un gros merci. Caroline, Marie-Josée, Françoise, Gervais, Dennis, Don et ceux qui ne sont plus là Laurence, Frédéric, Caroline. Merci pour tous les

services que vous m'avez rendus, toutes les discussions, importantes ou non, qu'on a eues. On forme vraiment une grande famille. Merci aussi à Monikca, Richard, Andrée, Arianne, Brian, Valérie, Laurent, Jocelyne, Aïda, Ian, Isabelle, Meriem, ce fut un réel plaisir de vous côtoyer, de discuter et surtout de rire! Je vous souhaite bonne chance. Un merci un peu plus spécial au trio kinase : Marie-Claude dont l'hyperphosphorylation de certaines kinases régule certainement ton caractère hyper-social et Louis-Philippe mon compagnon d'armes depuis le début et futur big boss dans le monde des kinases. On a appris plusieurs trucs ensemble, notamment que... 'c'est pas facile une kinase hein?'

Je tiens à saluer ceux que je croise de temps à autre dans l'équipe de John, notamment Fabienne, Pascal, Claude, Brian, Frank et Florian.

Un merci spécial à mon père Guy et ma mère Sylvie pour m'avoir soutenu, encouragé et être fiers de mon travail. Merci François, c'est bien d'avoir un membre dans la famille qui comprend ce que l'autre fait. Ça a toujours été comme ça entre nous deux. Merci Mira pour ton éternelle bonne humeur quand tu vois ton grand frère préféré. Catherine, merci simplement d'être toi, je suis content de t'avoir dans la famille. Merci aussi à mes grands-parents pour leurs encouragements.

Finalement, merci à mon amour Eliane. Merci pour ta patience, les sacrifices, le réconfort, pour garder espoir qu'à chaque jour on améliore notre sort. Merci aussi pour m'avoir apporté notre plus grande joie. Bien que tu sois trop petite pour lire en ce moment, je te remercie pour tous tes sourires Elora. Chaque jour est une découverte avec toi. Merci d'être patiente avec ton papa. Je vous aime toutes les deux!

*Je dédie ce travail à Eliane et Elora, mes
deux amours.*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Avant-propos	iii
Table des matières	vi
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures.....	xi
Abréviations.....	xiii
Chapitre 1 - Introduction.....	1
1.1 Les méristèmes, sites de prolifération et de différenciation cellulaire	3
1.1.1 Régulation de l'activité méristématique	3
1.1.2 Contrôle hormonal de l'activité méristématique	6
1.2 Le développement du système vasculaire.....	9
1.2.1 Initiation du développement vasculaire	10
1.2.2 Développement vasculaire dans les feuilles	11
1.3 Les protéines de type NIMA.....	13
1.2.1 Le cycle cellulaire.....	15
1.2.3 Des protéines de type NIMA chez les plantes	17
1.4 Objectif de l'étude	19
Chapitre 2 - Les protéines kinases de type NIMA seraient impliquées dans le développement des organes et du système vasculaire chez les plantes	20
2.1.1 Résumé.....	22
2.1.2 Summary.....	22

2.2 Introduction.....	23
2.3 Results.....	24
2.3.1 The Nek family is conserved in plant genomes.....	24
2.3.2 Whole genome duplication was involved in shaping the plant Neks.....	26
2.3.3 Conserved exon and intron organization in plant <i>Nek</i> genes.....	27
2.3.4 Functional analysis of the AtNek family using insertion mutants.....	28
2.3.5 Plant Nek expression profiles correlate with organ developmental patterns.....	29
2.3.6 Expression of <i>PNek1</i> promoter:: <i>GUS</i> corresponds to sites of auxin production and vascular development.....	35
2.3.7 <i>PNek1</i> expression is linked to vascular development but not to auxin response	37
2.4 Discussion.....	40
2.5 Conclusion.....	43
2.6 Experimental procedures.....	44
2.6.1 Sequence alignment, phylogenetic analysis and genome organization.....	44
2.6.2 Evaluation of T-DNA insertion mutants.....	45
2.6.3 Transcript expression analyses.....	45
2.6.4 <i>PNek1</i> promoter:: <i>GUS</i> fusion construct and plant transformation.....	47
2.6.5 <i>pNek1</i> :: <i>GUS</i> histochemistry.....	48
2.7 Acknowledgements.....	49
2.8 Supplementary Material.....	49
Chapitre 3 - Caractérisation de <i>PNek1</i> , une protéine kinase de type NIMA chez le peuplier et de son rôle potentiel au niveau de l'activité méristématique.....	50
3.1.1 Résumé.....	51

3.1.2 Abstract.....	52
3.2 Introduction.....	52
3.3 Materials and Methods.....	54
3.3.1 Plant materials.....	54
3.3.2 Two-hybrid library construction and screening.....	54
3.3.3 cDNA cloning, plasmid construction and mutagenesis.....	54
3.3.4 Computational analysis of PNek1.....	55
3.3.5 Cell cycle synchronization and northern analysis.....	55
3.3.6 Arabidopsis thaliana transformation and overexpression of GFP fusions.....	56
3.4 Results.....	56
3.4.1 PNek1 is part of a NIMA family in plant.....	56
3.4.2 The presence of the PNek1 serine 416 and its homodimerization domain are necessary to trigger the 14-3-3 interaction.....	58
3.4.3 Expression of PNek1 mRNA is cell cycle regulated.....	59
3.4.4 PNek1 is located in the cytoplasm and the nucleolar region.....	61
3.4.5 Overexpression of PNek1 causes several morphological abnormalities.....	62
3.5 Discussion.....	64
3.6 Acknowledgements.....	67
Chapitre 4 - Un rôle pour PNek1 dans la signalisation cellulaire et la maturation de l'ARN?	68
4.1 Résumé.....	69
4.2 Introduction.....	69
4.3 Résultats et discussion.....	72

4.3.1 Implication de PNek1 dans la réponse aux stress génotoxiques pendant le cycle cellulaire.....	72
4.3.2 Le petit interactome de PNek1.....	74
4.4 Orientations futures.....	80
4.5 Matériel et méthodes.....	81
Chapitre 5 - Discussion.....	84
5.1 Le rôle des Neks dans le cycle cellulaire.....	84
5.2 Interactions protéine-protéine et implication des Neks dans le cycle cellulaire.....	87
5.3 Influence du contexte biologique dans l'étude de PNek1.....	91
5.4 Conclusion.....	95
Références citées ou bibliographiques.....	96
Annexe 1 - Table S1: Plant NIMA-related kinases (Neks) protein sequences.....	117
Annexe 2 - Table S2: Exons-introns lengths and intron phase.....	125
Annexe 3 - Table S3: Expression data presented in Figure 2.4. Also includes primers used for qPCR.....	134
Annexe 3 - Table S3: Expression data presented in Figure 2.4. Also includes primers used for qPCR.....	134

Liste des tableaux

Table 2.1. Nomenclature of the plant Neks in <i>Arabidopsis thaliana</i> (At), <i>Populus trichocarpa</i> (Pt) and <i>Oryza sativa</i> (Os)	25
Tableau 4.1. Résultats détaillés des protéines interagissant avec PNek1 en essai par double hybride dans la levure.....	76

Liste des figures

Figure 1.1. Localisation et structure des méristèmes chez les dicotylédones	5
Figure 1.2. Modèle moléculaire du maintien du méristème apical de la tige	6
Figure 1.3. Corrélation entre l'expression du facteur de transcription PLETHORA et le gradient d'auxine dans la racine	7
Figure 1.4. Transport polaire de l'auxine dans les racines	8
Figure 1.5. Distribution de l'auxine AIA dans l'axe transversal de la tige de peuplier	10
Figure 1.6. Distribution des sites de synthèse d'auxine lors du développement du primordium foliaire chez <i>Arabidopsis thaliana</i>	12
Figure 1.7. Étapes de la division cellulaire et kinases intervenant dans sa régulation	14
Figure 1.8. Modèle du cycle cellulaire chez les plantes	16
Figure 2.1. Phylogenetic relationships between Arabidopsis, poplar and rice Neks	26
Figure 2.2. Distribution of the Nek genes in their respective plant genome	27
Figure 2.3. Scaled diagram of exon-intron structure of the plant Neks in poplar, Arabidopsis and rice	28
Figure 2.4. Gradient contour charts of the plant Nek expression profiles in various organs	31
Figure 2.5. GUS expression of the PNek1 promoter fused to the uidA reporter gene	36
Figure 2.6. Expression of pNek1::GUS relates to vascular development following auxin induction	38
Figure 2.7. Tension wood formation induces expression of PNek1	39
Figure 3.1. PNek1 structural features	58
Figure 3.2. Analysis of the 14-3-3 interaction domain involved in PNek1 interaction	59
Figure 3.3. Expression analysis of PNek1 transcripts in poplar cell suspension	61

Figure 3.4. Confocal laser scanning microscopies of Arabidopsis root hairs show that GFP-PNek1 cellular localization is mediated through signals found in its C-terminal tail ..	62
Figure 4.1. La réplication de l'ADN par la polymérase A nécessite des amorces d'ARN pour compléter le brin retardé.....	71
Figure 4.2. Analyse northern de l'expression de PNek1 dans une suspension cellulaire de peuplier H11-11, lors d'un blocage aux points de contrôle.....	73
Figure 4.3. Schéma de l'épissage d'un ARNm et de la dégradation de l'intron lasso excisé	78
Figure 4.4. Analyse des domaines impliqués dans l'interaction entre PNek1 et DBR1	79
Figure 5.1. Mesure de l'expression transcriptionnelle des Neks dans les cellules humaines HeLa, par puce ADNc	85
Figure 5.2. Mesure de l'expression transcriptionnelle des Neks dans les cellules MM2 d'Arabidopsis avec la puce ATH1	86
Figure 5.3. Diagramme de l'implication des Neks dans la régulation du cycle cellulaire chez les humains	89

Abréviations

2,4-D; acide 2,4-Dichlorophénoxyacétique

5'UTR; Région 5' non-traduite (*5' untranslated region*)

ADN; Acide désoxyribonucléique

ADNc; ADN complémentaire

ARN; Acide ribonucléique

ARNm; ARN messenger

ARNr; ARN ribosomal

ARR; ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR

AtHB8; *Arabidopsis thaliana* Homeobox gene 8

AtNek; *Arabidopsis thaliana* NIMA-related kinase

AUX1; AUXIN RESISTANT1

CAK; Kinase activatrice de CDK (*CDK-activating kinase*)

CDK; Kinase cycline-dépendante (*Cyclin-dependent kinase*)

Chr; Chromosome

CLV; CLAVATA

CSC; *Cell cycle and Splicing Complex*

C-terminal; Carboxy-terminal

CYC; Cycline

DBR1; *Debranching enzyme*

GFP; *Green Fluorescent Protein*

GUS; Protéine de la β -glucuronidase

HsNek; *Homo sapiens* NIMA-related kinase

IAA; acide indole-3-acétique

ICK; Inhibiteur de CDK

KNAT1; KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1 (facteur de transcription
BREVIPEDICELLUS 1)

LPI; Indice de position de la feuille (*Leaf Position Index*)

MAPK; *Mitogen Activated Protein Kinase*

MEN; MITOTIC EXIT NETWORK

MmNek; *Mus musculus NIMA-related kinase*
 MP; MONOPTEROS
 MPSS; *Massive Parallel Signature Sequencing*
 NAA; acide 1-Naphthaleneacétique
 Nek; Kinase de type NIMA (*NIMA-related kinase*)
 NIMA; Never-In-Mitosis gene A
 NLS; Signal de localisation nucléaire (*Nuclear localization signal*)
 N-terminal; Amino-terminal
 OC; Centre organisationel (*Organisational center*)
 Oligo; Oligonucléotides (*Oligonucleotide*)
 OsNek; *Oriza sativa NIMA-related kinase*
 Peuplier 717; *Populus tremula x Populus alba*, clone INRA 717 1-B4
 PID; PINOID kinase
 PIN; PIN-FORMED
 PLK1; Kinase de type Polo 1 (*Polo-like kinase 1*)
 PLT; PLETHORA
 Poplar clone 717-1B4; *Populus tremula x Populus alba*, clone INRA 717 1-B4
 PtNek; *Populus trichocarpa NIMA-related kinase*
 QC; Centre quiescent (*Quiescent center*)
 RB; Rétinoblastome
 RT-PCR; Transcription inverse suivie d'une Réaction de polymérisation en chaîne (*Reverse transcription - Polymerase chain reaction*)
 RT-qPCR; Transcription inverse suivie d'une PCR quantitative en temps réel (*Real-time Polymerase chain reaction*)
 SCF; SCARFACE
 SIN; SEPTATION INITIATION NETWORK
 SPAK; Self-Pruning associated kinase
 STM; SHOOTMERISTEMLESS
 TTK; *Threonin/Tyrosin kinase*
 WOL/CRE1; WOODEN LEG/CYTOKININ RECEPTOR 1
 WUS; WUSCHEL

Chapitre 1 - Introduction

Comparées aux mammifères, les plantes ont la particularité d'avoir un développement majoritairement post-embryonnaire. C'est donc dire que les différents tissus et organes tel les éléments vasculaires, les feuilles, les fleurs et les racines se développent continuellement à partir de zones de prolifération et de différenciation cellulaire bien spécifiques. L'avantage pour la plante est qu'un organe complet, voire même un plante complète, peuvent être régénérés à partir d'une seule cellule (Klimaszewska *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2006). Ainsi, les plantes peuvent rapidement modifier leur développement en fonction de leur environnement. D'un point de vue moléculaire, les stimuli environnementaux sont souvent perçus par des systèmes de récepteurs (à l'exception de stress abiotiques). Ces signaux sont ensuite transférés via un important réseau de signalisation à l'intérieur de la cellule.

Au niveau cellulaire, les interactions protéine-protéine constituent un des mécanismes importants de la signalisation et de la régulation des activités cellulaires. Parmi ces protéines de signalisation, les kinases représentent sans doute la superfamille la plus abondante, particulièrement chez les eucaryotes. Par exemple, elles représentent près de 2% du génome humain, soit 518 protéines kinases (Manning *et al.*, 2002). Elles sont encore plus abondantes chez les plantes avec environ 1000 protéines kinases chez *Arabidopsis thaliana* et 1400 chez le riz, ce qui représente 4% de leur génome (Champion *et al.*, 2004; Dardick *et al.*, 2007). Si cette logique est respectée, il pourrait y avoir près de 1800 kinases chez le peuplier, qui possèdent un génome plus imposant. Les protéines kinases sont impliquées dans les modifications post-traductionnelles en catalysant l'ajout d'un groupement phosphate sur une protéine cible, une réaction appelée phosphorylation. L'ajout de ce phosphate modifie la capacité de la protéine phosphorylée à interagir ou non avec sa cible. De par leur nombre et de par la nature de leur activité, les protéines kinases jouent un rôle de premier plan dans la signalisation cellulaire et sont impliquées dans la régulation de multiples processus liés au fonctionnement de la cellule.

Ce premier chapitre se veut une introduction sur certains aspects clés de la signalisation entourant le développement de la plante. J'aborderai notamment la régulation

de ces zones de prolifération et de différenciation que sont les méristèmes. L'activité de ces méristèmes est primordiale au développement du système vasculaire de la plante. Les méristèmes sont constitués de cellules indifférenciées et caractérisés par un niveau élevé de division cellulaire. Le cycle cellulaire représente aussi un processus hautement régulé, particulièrement par diverses familles de protéines kinases. Plus particulièrement, les protéines kinases de type NIMA et à leurs rôles dans la signalisation et la régulation du cycle cellulaire seront abordées.

Vous constaterez que plusieurs expériences se sont déroulées en parallèle chez le peuplier et *Arabidopsis*, deux dicotylédones. Ces deux plantes offrent des avantages indéniables en recherche (Goodman *et al.*, 1995; Jansson and Douglas, 2007). *Arabidopsis* est depuis longtemps le système végétal modèle par excellence, et il y a déjà une quantité très appréciable d'informations et d'outils développés pour l'étude des voies de signalisation et de régulation transcriptionnelle chez cette plante. Pour sa part, le peuplier est en quelque sorte devenu "l'arbre modèle", ou encore l'espèce pérenne modèle. En pratique, le peuplier possède des qualités semblables à *Arabidopsis*, notamment la petite taille de son génome qui l'a rapidement propulsé au rang de candidat numéro un pour le séquençage chez les arbres. Le développement d'outils de la biologie moléculaire pour l'étude de cette espèce, s'est par le fait même accéléré. L'utilisation d'une plante pérenne permettant d'étudier des aspects peu ou pas du tout explorés chez une espèce annuelle comme *Arabidopsis*. Entre autres, le peuplier est un système plus complet pour l'étude du développement secondaire, notamment la formation et l'activité du cambium vasculaire. Il y a quelques autres aspects pour lesquels le peuplier offre une perspective plus complète qu'*Arabidopsis*, mais qui ne seront pas abordés plus en détails dans cette thèse. Nous pouvons penser au développement du bois, aux mécanismes de réponse face aux variations saisonnières et climatiques, ainsi qu'aux mécanismes de réponse aux stress biotiques et abiotiques. Vous serez à même de constater, au Chapitre 2, l'intérêt pour nos observations qu'a pu avoir l'utilisation du peuplier comme modèle complémentaire à *Arabidopsis* dans la compréhension du rôle de PNek1.

1.1 Les méristèmes, sites de prolifération et de différenciation cellulaire

Le développement des plantes se fait à partir des méristèmes. Les méristèmes apicaux des tiges et des racines sont responsables de la croissance en longueur de la plante, alors que les méristèmes latéraux sont impliqués dans la croissance du diamètre de la tige (Figure 1.1A). Il est important de mentionner que la très grande majorité des plantes monocotylédones n'ont pas de méristèmes latéraux. De plus, le développement des feuilles, des tiges et des racines, chez ces monocots, ne se fait pas nécessairement en continu à partir de méristèmes apicaux, comme c'est le cas, par exemple, des racines adventives du maïs ou du riz (Scarpella and Meijer, 2004). Tel que mentionné précédemment, je vais surtout m'attarder aux méristèmes retrouvés chez *Arabidopsis* et chez le peuplier.

1.1.1 Régulation de l'activité méristématique

Les méristèmes sont des régions de cellules indifférenciées caractérisées par un niveau élevé de divisions cellulaires. Ces cellules suivent ensuite des épisodes de différenciation et d'élongation qui donneront aux organes leurs structures et leurs fonctions finales. Par exemple, le méristème apical de la tige peut être divisé en trois zones (Figure 1.1B), la zone centrale étant composée de cellules indifférenciées. Ces cellules s'éloignent de la zone centrale par une série de divisions pour atteindre soit la zone périphérique, où les cellules se différencieront pour donner les primordia foliaires, soit la zone médullaire qui donnera les tissus parenchymateux et permettra la croissance en hauteur de la tige. La zone centrale peut être divisée en quatre, à savoir la couche épidermique L1, la couche sous-épidermique L2, la couche interne L3 et le centre organisationnel. Les couches L1 et L2 ne se divisent que de façon anticline, alors que la couche L3 subit à la fois des divisions anticlines et périclines. Le centre organisationnel fournit les signaux nécessaires au fonctionnement du méristème. Le méristème apical racinaire est quelque peu différent du méristème caulinaire (Figure 1.1C), avec le centre quiescent, qui joue un rôle équivalent au centre organisationnel. Par contre, il est entouré de cellules initiales indifférenciées qui se divisent et se différencient, selon leur position, en différents types tissulaires (Veit, 2006).

D'un point de vue moléculaire, le développement de la plante est sous le contrôle de l'expression, de la régulation transcriptionnelle et de la transduction de signaux aussi bien intracellulaires qu'intercellulaires. Plusieurs protéines sont impliquées dans la communication intercellulaire dans les méristèmes. C'est le cas, notamment, des membres de la famille CLAVATA (CLV), lesquels interagissent entre eux et avec le facteur de transcription WUSCHEL (WUS), afin de réguler le développement et la différenciation des cellules méristématiques. Ce système, qui permet la coordination de la division cellulaire, est influencé par différents signaux de croissance (Haecker and Laux, 2001).

Au niveau du méristème apical de la tige, le centre organisationnel exprime la protéine WUS, dont le rôle est de maintenir l'état indifférencié des cellules de la zone centrale. WUS est réprimée par les CLAVATA. Le peptide CLV3 est exprimé au niveau des couches L1 et L2, alors que le récepteur kinase CLV1 est exprimé au niveau de la couche L3, déterminant ainsi la zone centrale indifférenciée. Selon les modèles actuels, CLV3 interagirait avec CLV1 pour réprimer WUS, dans une sorte de boucle rétroactive où WUS activerait l'expression de CLV3. Une seconde boucle rétroactive régulerait en parallèle la zone méristématique, impliquant SHOOTMERISTEMLESS (STM), un facteur de transcription de la famille des gènes *KNOX*, qui est exprimé au niveau de la zone périphérique. STM induit l'expression de WUS qui active à son tour l'expression de STM, mais inhibe CLV3, réprimant à son tour STM (Doerner, 2003). Au bilan, ces boucles rétroactives renforcent le maintien des cellules dans leur état méristématique, c'est-à-dire indifférencié (Figure 1.2). Il est maintenant connu que WUS et STM sont requises pour induire l'expression des CLV, et que l'expression ectopique de ces facteurs inhibe le développement des organes et favorise la formation de cellules embryonnaires (Gallois *et al.*, 2002).

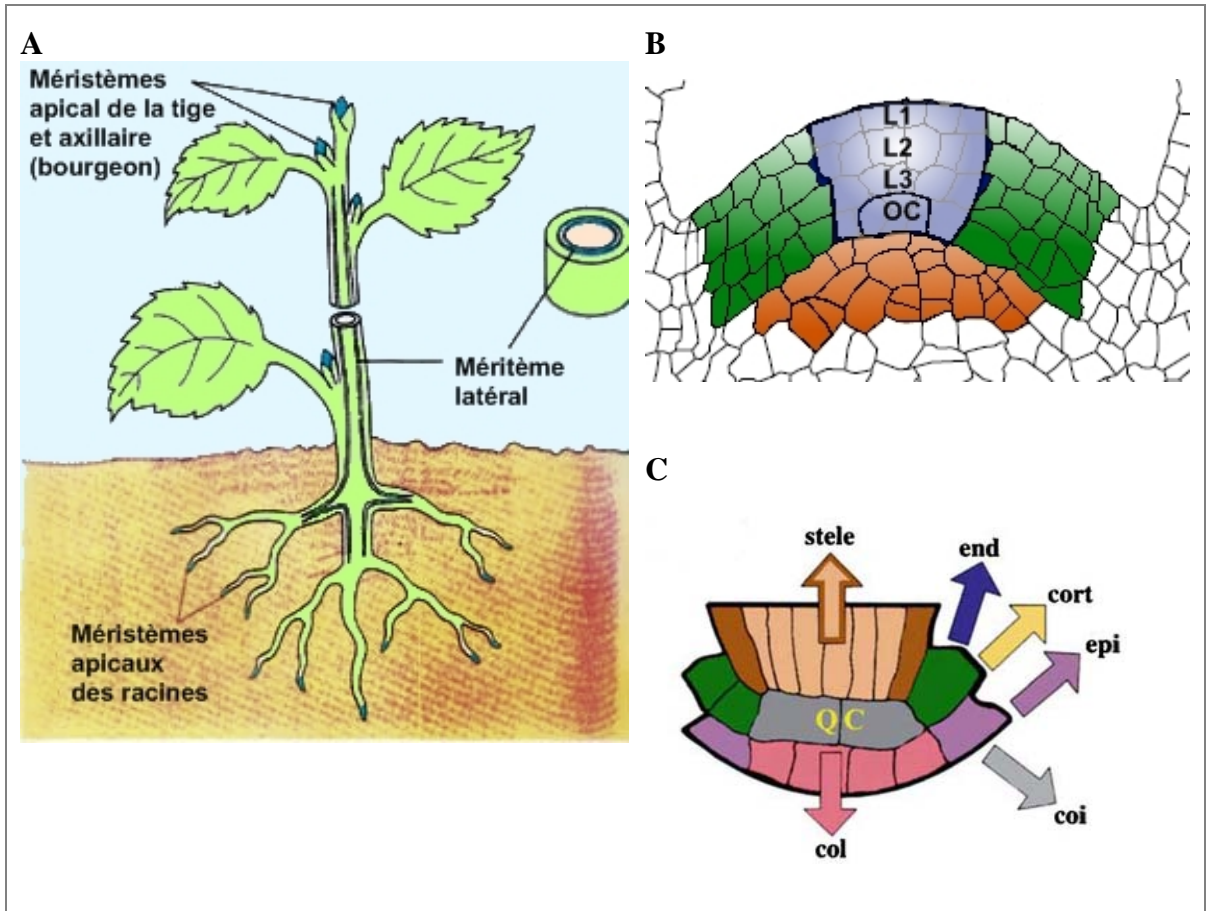


Figure 1.1. Localisation et structure des méristèmes chez les dicotylédones. **A.** Emplacement des principaux méristèmes chez la plante. Les zones méristématiques sont représentées en bleu. (Source : Centre de développement de l'*in vitro*, Université de Liège <http://www2.ulg.ac.be/cedevit/image/Def/meristeme.jpg>). **B.** Organisation du méristème apical de la tige. La zone centrale est représentée en bleu, la zone périphérique en vert et la zone médullaire en orange. Les couches L1, L2, L3 et le centre organisationnel (OC) sont localisés sur le schéma (figure adaptée de Haecker and Laux, 2001). **C.** Organisation du méristème apical de la racine. Le centre quiescent (QC) est entouré des cellules initiales qui formeront la stèle, l'endoderme (end), le cortex (cort), l'épiderme (epi), la coiffe (coi) et la columelle (col) (Veit, 2006).

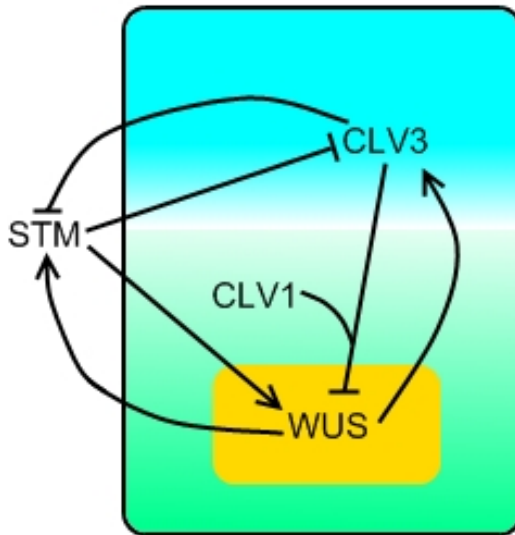


Figure 1.2. Modèle moléculaire du maintien du méristème apical de la tige.

WUS, qui est exprimé au centre organisationnel, induit l'expression de CLV3 dans les couches L1 et L2. De concert avec CLV1 dans la couche L3, CLV3 réprime à son tour l'expression de WUS. L'expression de STM et WUS est favorable à l'un comme à l'autre, alors que STM et CLV3 s'inhibe mutuellement.

1.1.2 Contrôle hormonal de l'activité méristématique

Les cytokinines et les auxines sont des phytohormones impliquées dans la promotion de la division cellulaire, de la différenciation cellulaire et tissulaire, et du développement des organes. Il a été démontré que WUS réprime les gènes *ARR5*, *ARR6*, *ARR7* et *ARR15* (*ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR*) impliqués dans la répression de la signalisation des cytokinines (Leibfried *et al.*, 2005). L'impact négatif qu'une cytokinine peut avoir sur le maintien de la zone méristématique est tout à fait logique puisque cette hormone induit la division cellulaire. Tel que mentionné précédemment, c'est par une série de divisions que les cellules maintenues dans un état indifférencié quittent la zone centrale pour atteindre la zone périphérique, hors du contrôle de WUS et de CLV. Les cytokinines semblent aussi réguler positivement l'expression de STM, qui favorise à son tour l'accumulation de cytokinines (Rupp *et al.*, 1999). Éventuellement, ceci favorisera l'accumulation de WUS et la suppression des répresseurs de cytokinines ARR, permettant ainsi la prolifération cellulaire.

Il est bien connu qu'une proportion élevée de cytokinines par rapport aux auxines favorise le développement de la tige alors qu'inversement, une proportion faible favorise la

formation des racines. À la pointe des racines, l'identité cellulaire est déterminée par l'influence des auxines sur l'expression des facteurs de transcription PLETHORA (PLT) (Blilou *et al.*, 2005). Ces derniers régulent l'expression de protéines de la famille des PIN-FORMED (PIN) qui, en retour, répriment PLT, contribuant à ainsi maintenir l'activité du méristème racinaire et à former un gradient d'auxines le long de la partie apicale de la racine, avec un maximum d'auxine observé près du centre quiescent (Figure 1.3).

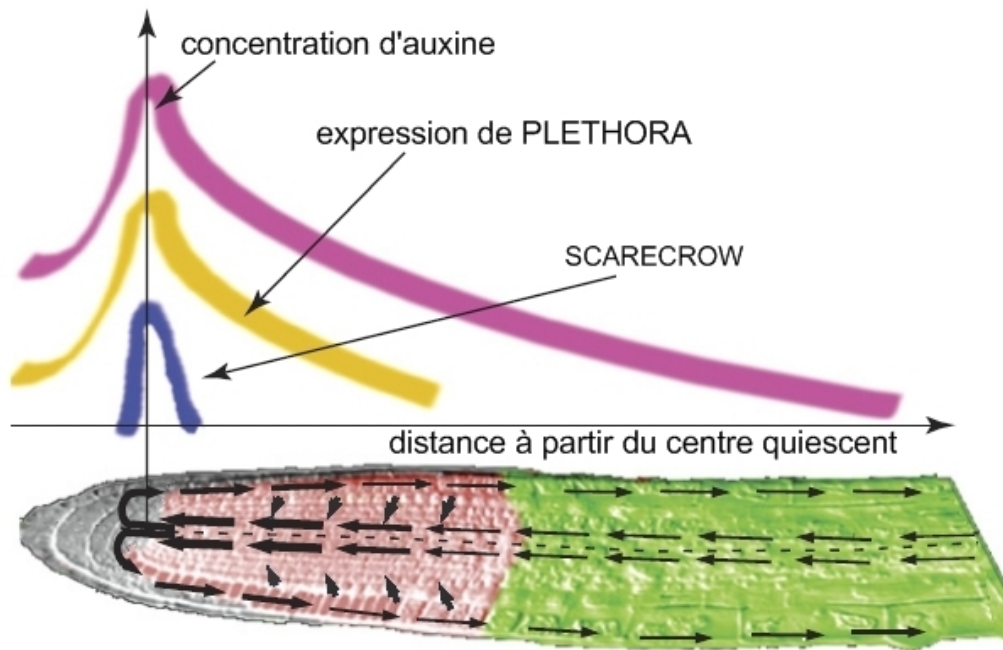


Figure 1.3. Corrélation entre l'expression du facteur de transcription PLETHORA et le gradient d'auxine dans la racine. La distribution des auxines dans la racine est représentée par les flèches noires. Les niveaux maximaux d'auxine et de PLT sont observés au centre quiescent situé à la jonction apicale de la coiffe (gris) et de la zone de prolifération (rose). Ensemble, l'auxine, PLT et SCARECROW, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation cellulaire, délimitent la zone méristématique et la zone de prolifération (rose). Le gradient d'auxine diminue à mesure que l'on s'éloigne du centre quiescent dans la zone d'élongation (vert). Figure adaptée de Doerner (2008).

Les protéines PIN jouent pour leur part un rôle majeur dans le transport polaire de l'auxine et la formation du gradient d'auxine dirigeant la régulation du cycle cellulaire et la différenciation au niveau des méristèmes (Wisniewska *et al.*, 2006). De par sa nature amphiphile, l'auxine entre d'un côté de la cellule à la fois par diffusion passive et à l'aide de la protéine d'influx AUXIN RESISTANT1 (AUX1). Des mutants déficients en AUX1 présentent une diminution du transport d'auxine vers les racines et les feuilles, en plus d'être insensibles à l'addition d'auxines de synthèse (Swarup *et al.*, 2001). Le transport polaire de l'auxine est caractérisé par leur exportation à l'autre extrémité de la cellule par les protéines d'efflux PIN localisées à la base de la membrane plasmique. Le gradient de transport d'auxine tend vers une orientation basipète, c'est-à-dire de l'apex vers la base. L'auxine peut aussi être distribuée de façon acropète au niveau du phloème, avec l'aide encore des facteurs AUX1 et PIN. Leur distribution polaire signifie qu'elles sont localisées à une extrémité précise dans la cellule, soit à la base pour un rôle de transport acropète, soit au sommet pour un transport basipète. L'expression spécifique des protéines PIN (Figure 1.4) est importante pour le maintien du gradient d'auxine dans la racine (Friml, 2003; Blakeslee *et al.*, 2005).

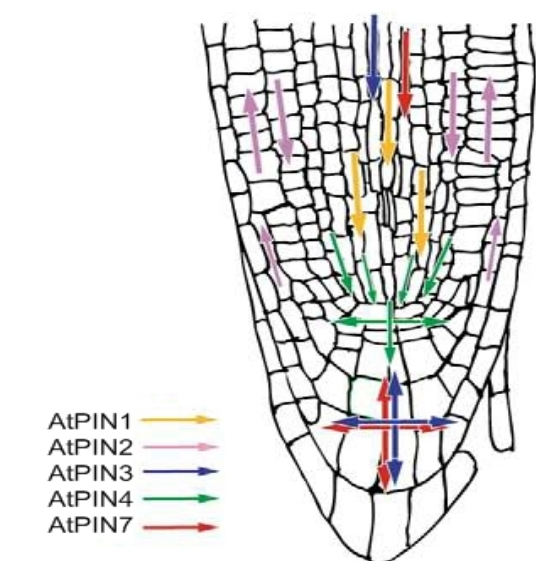


Figure 1.4. Transport polaire de l'auxine dans les racines. Le diagramme présente à la fois la localisation de l'expression des gènes *PIN* (couleurs), ainsi que la direction du courant d'auxine (orientation des flèches) dans la pointe racinaire d'*Arabidopsis*. Les PIN sont co-régulés de façon fonctionnelle, de telle sorte que l'absence de l'une est compensée par les autres (Vieten *et al.*, 2005).

1.2 Le développement du système vasculaire

Le transport polaire de l'auxine joue non seulement un rôle important dans l'activité méristématique des racines, mais aussi dans le développement des primordia foliaires et le développement du système vasculaire (Friml, 2003). Le système vasculaire forme un réseau continu responsable du transport de l'eau, des nutriments et de molécules régulatrices diverses telles les auxines, en plus de jouer un rôle de support physique, en particulier au niveau de la tige et des feuilles. Lors de la formation du tissu vasculaire, les cellules méristématiques apicales de la tige et de la racine se différencient en cellules procambiales puis en cellules cambiales. Les cellules procambiales se divisent parallèlement à l'axe de développement du faisceau vasculaire, c'est-à-dire parallèlement à l'axe de la tige ou de la racine. Les cellules procambiales se différencient en xylème et en phloème. Le faisceau vasculaire ainsi formé est central au niveau de la racine pour former une sorte de cylindre vasculaire, mais adopte une formation concentrique de faisceaux vasculaires, formant ainsi un cercle, continu ou non, autour de la tige. Il est bien établi que les sites de formation des cellules procambiales et leur activité déterminent le patron de vascularisation, en plus de fournir les cellules précurseurs à la différenciation des tissus vasculaires en xylème et en phloème (Ye, 2002). Le procambium se développe en cambium vasculaire lors de la croissance secondaire, il constitue un méristème latéral, tel que présenté en début de chapitre.

Le cambium vasculaire est responsable de la formation polaire du phloème et du xylème secondaires, deux tissus bien présents chez une espèce ligneuse comme le peuplier, mais peu abondants chez *Arabidopsis*. Une fois de plus, un gradient d'auxine serait responsable de la différenciation des cellules cambiales en xylème et en phloème (Figure 1.5). L'auxine jouerait aussi un rôle de signalisation en fonction de sa distribution, la zone cambiale se situant au site de concentration maximale en auxines. Ensuite, les cellules cambiales et les cellules différenciées se développent en fonction de leur position par rapport à ce gradient d'auxine, ce qui signifie que l'auxine aurait la capacité de modifier la zone de prolifération cambiale et le développement du xylème et du phloème (Mellerowicz *et al.*, 2001). Chez le peuplier, une modification de la distribution et de la concentration

naturelle d'auxine induit effectivement un élargissement de la zone de cellules cambiales en division, mais entraîne une diminution de la formation du xylème. Par contre, la zone d'élongation est accrue, ce qui résulte en la formation de cellules de xylème à plus large lumen (Tuominen *et al.*, 1997). Des homologues pour les gènes de la famille AUX/LAX et des PIN sont impliqués dans la formation du gradient d'auxine au niveau du cambium vasculaire, ainsi que dans la formation du xylème, et non pas seulement lors de l'initiation mais aussi lors de la lignification, particulièrement dans le cas de PttLAX1 (Schrader *et al.*, 2003).

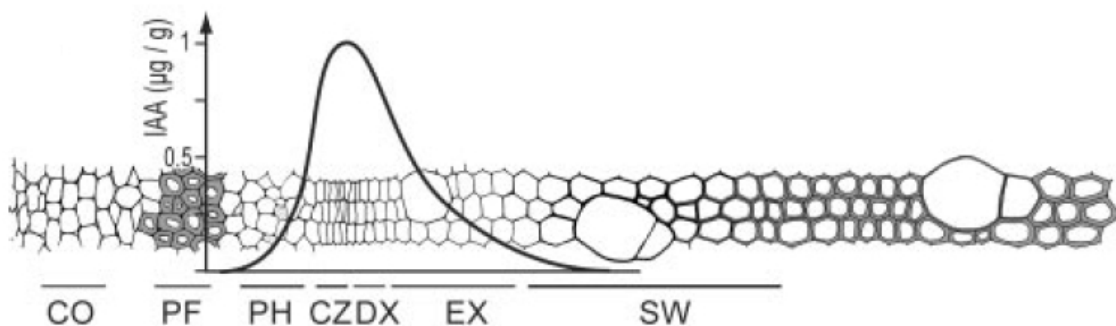


Figure 1.5. Distribution de l'auxine AIA dans l'axe transversal de la tige de peuplier. CO, cortex; PF, fibre de phloème; PH, phloème; CZ, cambium vasculaire; DX, xylème en division; EX, xylème en expansion; SW, zone de lignification (Tuominen *et al.*, 1997; Schrader *et al.*, 2003).

1.2.1 Initiation du développement vasculaire

Le transport polaire de l'auxine à partir des méristèmes apicaux induit la formation des cellules procambiales. Il a été démontré qu'une application exogène d'auxine pouvait remplacer les méristèmes dans l'initiation et le développement du procambium (Aloni *et al.*, 2003). L'absence de certains gènes impliqués dans la signalisation de l'auxine peut également perturber la formation des cellules procambiales. C'est le cas, notamment, du facteur de réponse à l'auxine MONOPTEROS (MP) qui est nécessaire à toutes les étapes de la formation d'un réseau continu de faisceaux vasculaires (Hardtke and Berleth, 1998). En son absence, le développement même des cellules pré-procambiales dans l'embryon est

perturbé. Sous l'action de l'auxine, l'expression du facteur de transcription AtHB8 induit la prolifération et la différenciation des cellules procambiales et cambiales. Une boucle de rétroaction est formée puisque la différenciation des cellules cambiales induira à son tour la signalisation de l'auxine (Baima *et al.*, 2001). L'induction de la formation des cellules cambiales se fait sous le contrôle de la protéine kinase PINOID (PID), dont l'expression est induite par l'auxine et qui, en même temps, inhibe la signalisation par l'auxine. La protéine PID est impliquée dans l'activité des PIN et du transport polaire d'auxine et une mutation dans ce gène abolit complètement la formation de cambium vasculaire (Christensen *et al.*, 2000). De leur côté, les cytokinines jouent aussi un rôle important dans l'induction de la division des cellules procambiales et de leur différenciation. En l'absence du gène récepteur de cytokinine *WOL/CRE1 (WOODEN LEG/CYTOKININ RECEPTOR 1)*, les cellules procambiales cessent de proliférer et se différencient toutes en protoxylème (Scheres *et al.*, 1996; Mahonen *et al.*, 2006).

1.2.2 Développement vasculaire dans les feuilles

Tel que mentionné précédemment, le facteur STM favorise la synthèse de cytokinines dans le méristème apical de la tige, favorisant ainsi la prolifération cellulaire. L'auxine, quant à elle, s'accumule dans la zone périphérique, et initie inais la formation d'un primordium foliaire en réprimant les gènes *KNOX – STM, KNAT1* et probablement *KNAT2* – (Kepinski, 2006). C'est lors du développement du primordium foliaire que le procambium et le réseau vasculaire se développent (Scarpella and Meijer, 2004). L'auxine est principalement synthétisée au niveau des primordia foliaires. Toutefois, l'inhibition du transport de l'auxine lors du développement du primordium résulte en une malformation du réseau vasculaire de la veine centrale, du point d'insertion du pétiole et de la marge de la feuille (Sieburth, 1999). Le fait qu'une inhibition de l'auxine provoque l'accumulation d'éléments trachéaires près de la marge implique donc que des sites de production d'auxines soient aussi distribués le long de celle-ci. Il a été démontré, en fait, que le patron de vascularisation suit étroitement le patron de distribution des sites de synthèse de l'auxine dans les feuilles, notamment au niveau des hydathodes, selon un modèle basipète (Figure 1.6).

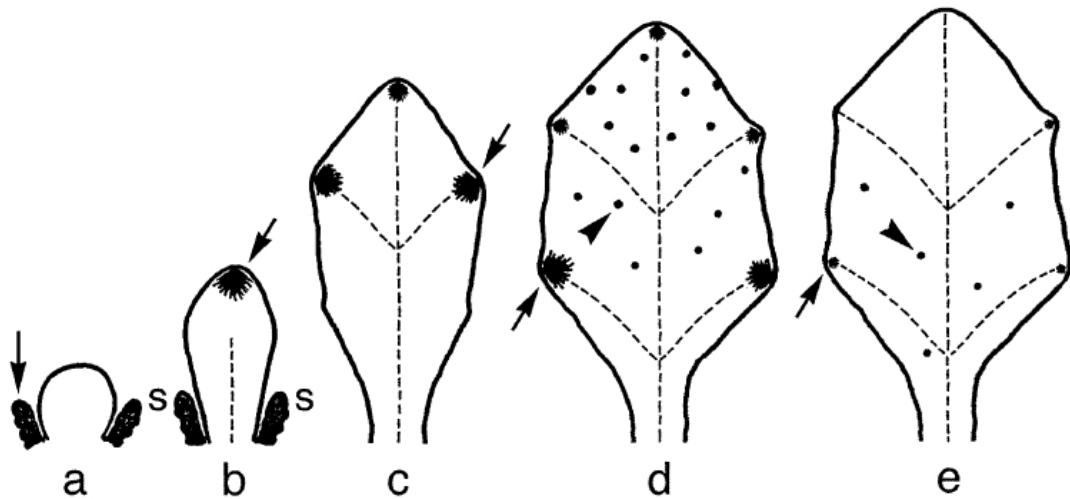


Figure 1.6. Distribution des sites de synthèse d'auxine lors du développement du primordium foliaire chez *Arabidopsis thaliana*. Les points indiquent les sites à concentration élevée d'auxine, les flèches indiquent les principaux sites de production d'auxine, alors que les têtes de flèches indiquent les sites secondaires de production d'auxine. Le développement de la veine centrale et des veines secondaires est représenté par la ligne pointillée (les veines capillaires ne sont pas représentées). **a** Au tout début, l'auxine est produite seulement au niveau des stipules (s) du primordium, avant l'apparition de la veine centrale. **b** La production d'auxine à l'apex du primordium est observée lors de l'établissement de la dominance apicale de la feuille et du développement acropète de la veine centrale. **c** La concentration élevée d'auxines dans les lobes apicaux induit la formation de veines secondaires. **d** Des concentrations élevées d'auxine sont ensuite observées dans les lobes inférieurs et de façon aléatoire au niveau de la lamina. Les concentrations d'auxine diminuent dans les autres sites. **e** Il y a finalement maintien de sites de production secondaire d'auxine dans la lamina et les lobes à la base de la feuille en fin de développement vasculaire. Traduit d'Aloni *et al.* (2003).

Il est intéressant d'observer que le phloème se forme du côté abaxial et le xylème du côté adaxial de la feuille. Plusieurs gènes contrôlent cette polarisation, et leur suppression ou leur surexpression provoquant des modifications profondes du réseau vasculaire, voire son absence complète. Puisque ce thème n'a pas fait parti de la caractérisation de PNeK1, je

vous invite à consulter l'ouvrage de Scarpella et Meijer (2004), qui présente une liste exhaustive de mutants impliqués dans la détermination du développement abaxial-adaxial.

1.3 Les protéines de type NIMA

Depuis quelques années, plusieurs travaux ont démontré l'importance de membres de la superfamille des kinases, dont notamment les protéines kinases sérine/thréonine de type NIMA (O'Connell *et al.*, 2003). Tout d'abord découverte chez *Aspergillus nidulans*, la protéine NIMA est essentielle à l'entrée en mitose, d'où sa dénomination Never-In-Mitosis. Elle serait associée à plusieurs événements d'entrée en mitose à la transition G₂/M, dont la condensation des chromosomes et l'arrangement des microtubules (Doonan, 1992). La dégradation de NIMA est aussi essentielle à la sortie de la phase de mitose (Osmani and Ye, 1996). Plusieurs études subséquentes ont démontré que cette famille est hautement conservée chez les eucaryotes. Bien qu'il n'y ait qu'un seul membre chez *A. nidulans*, 11 Neks (NIMA related kinases) ont été isolées chez les mammifères (O'Connell *et al.*, 2003). De celles-ci, Nek2 présente le plus haut niveau de similitude avec NIMA et est de ce fait la plus étudiée. Tout comme NIMA, l'activité de Nek2 est maximale lors de la transition G₂/M (Figure 1.7 et Figure 1.8), plus précisément au niveau du centrosome (Fry, 2002), et serait directement responsable de la séparation des centrioles (Fragher and Fry, 2003). Toutefois, Nek2 ne complémente pas la perte d'activité chez les mutants *nimA* d'*A. nidulans*. À ce jour, NIM-1, isolée de *Neurospora crassa*, est le seul homologue fonctionnel de NIMA (Pu *et al.*, 1995). Les autres Neks de mammifères présentent des patrons d'activités différents de ceux de Nek2. Par contre, elles semblent toutes avoir un rôle au niveau du cycle cellulaire (O'Connell *et al.*, 2003). Il est intéressant de noter que plusieurs études suggèrent l'association des Neks avec d'autres protéines, voir même une cascade de Neks impliquant Nek9, Nek6 et Nek7 (Belham *et al.*, 2003). Presque toutes les Neks identifiées jusqu'ici possèdent deux transcrits de tailles différentes, qui proviendraient d'un épissage différentiel (Uto *et al.*, 1999) et pourraient avoir des rôles parallèles, mais à différents sites ou à différents stades de développement (Hames and Fry, 2002).

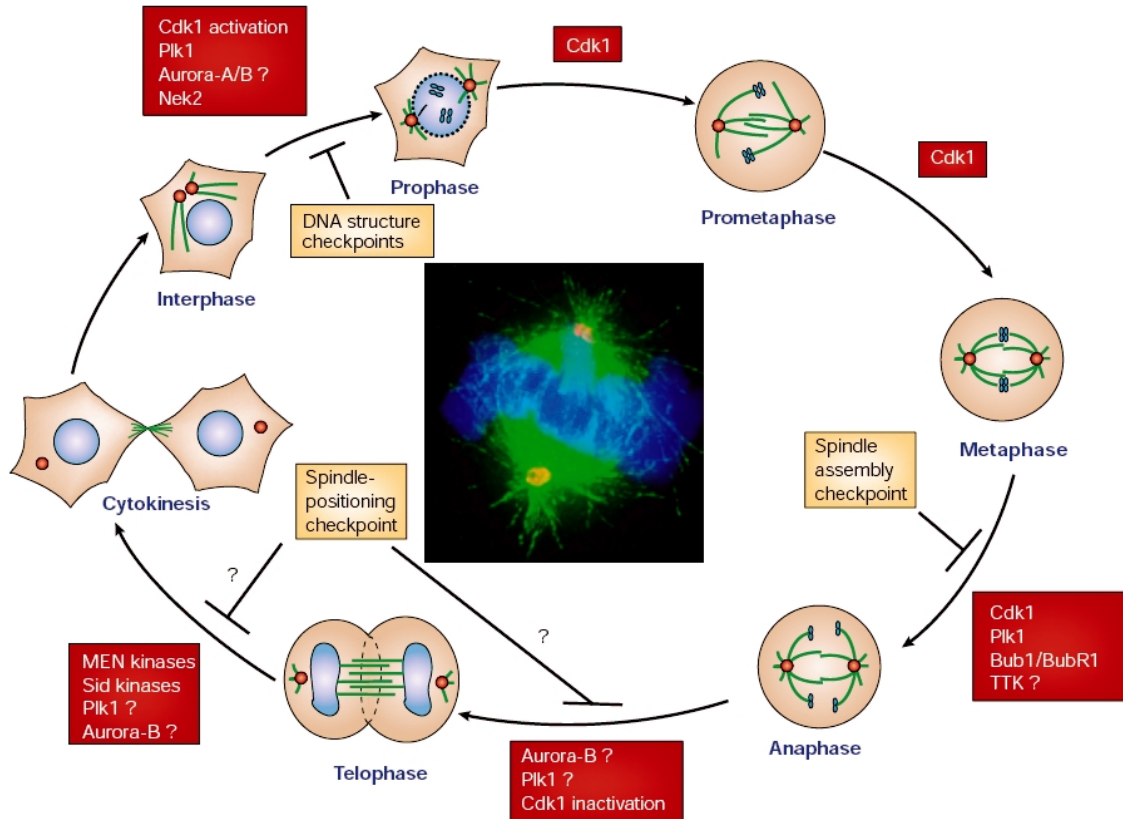


Figure 1.7. Étapes de la division cellulaire et kinases intervenant dans sa régulation.

Cette figure représente les étapes de la phase de mitose (phase M) des cellules du règne animal. Différents points de contrôle (boîtes jaunes) y sont indiqués, ainsi que certaines protéines kinases potentiellement impliquées à chaque point (boîtes rouges). L'activation de la kinase cycline-dépendante CDK1 est l'événement majeur pour l'entrée en mitose. PLK1 (*Polo-like kinase 1*) serait pour sa part nécessaire à la maturation des centrosomes, alors que les kinases de type Aurora seraient impliquées dans la dissociation des centromères. À noter que Nek2 se retrouve en début de phase M et serait impliquée dans la séparation des centrosomes et la condensation des chromosomes. Les autres kinases représentent des homologues potentiels chez la levure et seraient impliquées dans l'activité des kinétochores en coopération avec TTK (*Threonine/Tyrosine kinase*), alors que les kinases MEN (*MITOTIC EXIT NETWORK*) et SIN (*SEPTATION INITIATION NETWORK*) sont, comme leur nom l'indique, impliquées respectivement dans la sortie de la phase M et la cytokinèse (Nigg, 2001)

1.2.1 Le cycle cellulaire

Il est évident que le cycle cellulaire est un processus important dans l'activité méristématique. Le cycle cellulaire est un processus finement orchestré, traditionnellement divisé en quatre phases. La phase G_1 correspond à la période d'activité spécifique à la cellule, pendant laquelle elle exécute les tâches pour lesquelles elle s'est différenciée. La phase S correspond à l'étape de réplication de l'ADN en vue de la division cellulaire. Pendant la phase G_2 , les molécules nécessaires à la division cellulaire sont synthétisées. La phase M peut être considérée comme l'aboutissement du cycle cellulaire; il s'agit de l'étape de mitose, au cours de laquelle l'ADN dupliqué et le contenu cytosolique sont répartis entre les deux cellules. La succession des cycles cellulaires implique un réseau complexe de points de contrôle assurant l'intégrité de la cellule. Ce réseau permet de vérifier que chaque étape du cycle s'est exécutée correctement, particulièrement lors de la transition G_1/S , puis lors de la transition G_2/M . Il permet aussi d'empêcher l'entrée en mitose avant que la réplication de l'ADN ne soit complétée ou pour répondre à une perturbation, tel que de l'ADN endommagé ou la synthèse de protéines en réponse à un stress. Ces points de contrôle sont régulés par des interactions entre plusieurs protéines, dont l'association entre des kinases cycline-dépendantes (CDK) et des cyclines (CYC). Une panoplie d'autres molécules comprenant des hormones de croissance, d'autres kinases, des phosphatases, des facteurs de transcription et autres régulateurs, tel que des inhibiteurs de protéines kinases, contrôlent l'expression et l'activité de ces protéines lors du cycle cellulaire et de la mitose. À ce jour, le contrôle du cycle cellulaire par la régulation de l'activité des protéines kinases de type CDKs fait l'objet de plusieurs études (Nigg, 2001; Stals and Inzé, 2001). La Figure 1.8 présente le modèle classique de la succession des différents points de contrôle et de leur régulation par les complexes CDK/CYC.

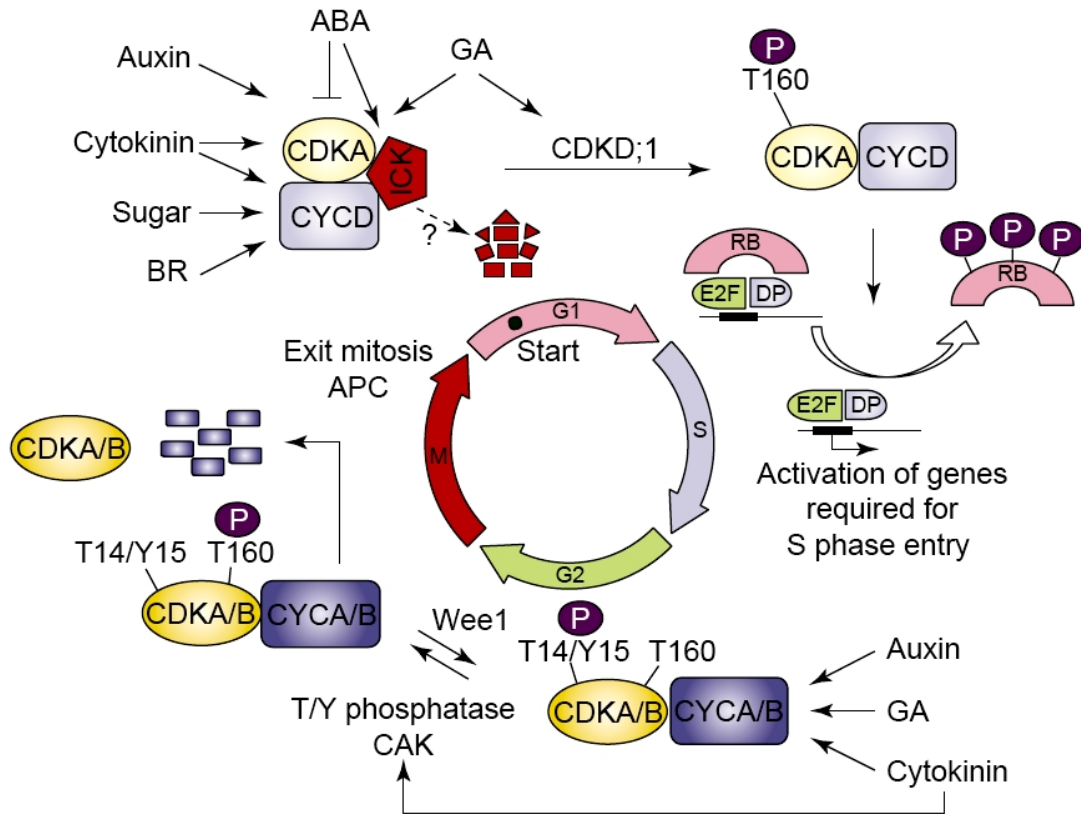


Figure 1.8. Modèle du cycle cellulaire chez les plantes. Plusieurs phytohormones contrôlent l'expression de CYCD et de la CDKA en phase G₁. La formation d'un complexe CDKA-CYCD est contrôlée par ICK, une protéine inhibitrice de CDK (Wang *et al.*, 2000). L'activation de ce complexe passe par la phosphorylation de la CDKA par la kinase activatrice de CDK (CDKD;1). Une fois activée, CDKA phosphoryle à son tour les protéines du rétinoblastome (RB) qui séquestrent les facteurs de transcription de type E2F nécessaires à l'entrée et à la progression en phase S. Un mécanisme semblable se répète en G₂, impliquant cette fois un complexe CDKA-CYCA lors de la progression de la phase G₂ et lors de la transition G₂/M, ainsi qu'un complexe CDKB-CYCB nécessaire à la transition G₂/M. La régulation et l'activation de ces complexes se font une fois de plus par des événements de phosphorylation impliquant les CDKD;1 et les CAKs (CDK-activating kinases), et d'autres événements de phosphorylation impliquant les kinases de type WEE1, le tout sous contrôle hormonal (Stals and Inzé, 2001).

1.2.3 Des protéines de type NIMA chez les plantes

La première indication de la présence d'une Nek chez les plantes nous vient d'une étude chez *Antirrhinum majus*. Un fragment partiel d'*AmnimA* fut isolé par RT-PCR et les résultats d'hybridation *in situ* révélèrent une expression associée aux régions à forte division cellulaire des méristèmes (Zhang *et al.*, 1996). La seconde Nek végétale identifiée, mais la première isolée, est SPAK (*Self-Pruning associated kinase*) de *Lycopersicon esculentum* (Pnueli *et al.*, 2001). Elle fut identifiée lors d'un criblage d'interaction en double-hybride chez la levure avec la protéine SP, qui est impliquée dans le développement des tiges et de la floraison. Il fut aussi démontré qu'elle interagit avec des protéines de type 14-3-3. Ces petites protéines sont particulièrement connues pour servir d'intermédiaire dans les interactions protéine-protéine et sont, par conséquent, impliquées dans une multitude de rôles de localisation et de signalisation cellulaires (van Hemert *et al.*, 2001). La suppression de l'expression de SPAK cause une élongation des fruits de *L. esculentum* (Pnueli *et al.*, 2001).

Au même moment, Le Dr. Monicka Cloutier a identifié un homologue de SPAK, PNek1, suite à un criblage d'interaction double-hybride avec une protéine de type 14-3-3 chez le peuplier (*Populus tremula* x *Populus alba*, clone INRA 717 1-B4). Contrairement à la banque criblée par Pnueli *et al.* (2001) qui contenait des ADNc de la région apicale d'un individu de *L. esculentum*, la banque d'ADNc que nous avons utilisée avait la particularité d'avoir été construite à partir de feuilles traitées avec différents éliciteurs de la réponse de défense (blessure, acide salicylique, acide jasmonique, méthyl-jasmonate, chitosan et fusicoccine). Le criblage de cette banque a fait ressortir une interaction forte entre la 14-3-3 et PNek1. Le domaine catalytique de PNek1 présente 95% d'identité avec SPAK. Ces deux Neks de plante possèdent les caractéristiques générales de la famille des Neks, notamment un domaine catalytique en N-terminal caractéristique d'une kinase sérine/thréonine, et une longue extension C-terminale qui ne possède pas d'homologie séquence, à l'exception de motifs de dégradation PEST et d'un domaine d'interaction *coiled-coil*, lesquels sont conservés chez les Neks (O'Connell *et al.*, 2003). Ce dernier serait nécessaire à la formation d'un homodimère Nek. L'homodimérisation de Nek2 des mammifères permettrait son activation maximale *in vitro* (Fry *et al.*, 1999).

Le domaine catalytique de PNek1 possède seulement 48% de similitude avec celui de NIMA. Il est intéressant de noter que son homologue le plus proche chez les vertébrés est Nek4 (68% de similarité), alors que le plus distant est effectivement Nek2 (58%). Peu de travaux ont été publiés jusqu'à présent sur Nek4. La protéine fut isolée pour la première fois lors de l'étude de l'expression des protéines kinases dans une lignée de cellules malignes de cancer du sein (Levedakou *et al.*, 1994). Elle se retrouve dans la plupart des tissus, sous deux formes transcrites de tailles différentes et ne semble pas être régulée lors du cycle cellulaire. Deux groupes ont simultanément rapporté avoir cloné l'homologue de Nek4 chez les rongeurs (Chen *et al.*, 1999; Hayashi *et al.*, 1999). Dans un premier temps, Chen *et al.* (1999) ont cloné MmNek4 (Mm pour *Mus musculus*) lors d'une étude pour trouver des homologues de NIMA chez la souris. MmNek4 possède aussi deux transcrits qui se trouvent exclusivement dans les testicules et au niveau des tubules séminifères, son niveau d'expression étant le plus élevé dans les spermatocytes en début de méiose I. Le second groupe a cloné un homologue de HsNek4 en provenance d'une banque d'ADNc de tissus embryonnaires de souris (Hayashi *et al.*, 1999). Ils ont eux aussi trouvé deux transcrits qui se retrouvent dans le cytoplasme des cellules. Étrangement, cette fois-ci les deux formes se retrouvent dans la plupart des tissus, avec une légère préférence pour les testicules. Une recherche des substrats de MmNek4 révèle une préférence pour les mêmes substrats que NIMA, notamment la β -caséine. De plus, MmNek4 ne semble pas être régulée par le cycle cellulaire.

Selon l'idée générale que les Neks seraient impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, il est intéressant de noter que Nek11 serait impliquée dans la réponse aux stress génotoxiques (Noguchi *et al.*, 2002), un aspect que j'ai abordé pendant mes études. Nek11 possède aussi deux transcrits provenant d'un épissage différentiel, et forme un sous-groupe avec Nek3 et Nek4. Elle s'exprime dans différents tissus, surtout dans le noyau au niveau des microtubules, et s'accumule préférentiellement pendant les phases G₂ à M. La suppression de Nek11 n'empêche pas la progression normale de la mitose. Par contre, différents agents de blocage utilisés lors de la synchronisation cellulaire, et plus particulièrement près de la transition G₁/S, augmentent par deux fois l'activité de phosphorylation de Nek11 (Noguchi *et al.*, 2002). Parallèlement, le niveau d'expression de

Nek4 augmente fortement lors de l'induction de la réponse inflammatoire (Bandman *et al.*, 2002).

1.4 Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est de cerner le rôle potentiel de la protéine kinase PNek1 dans la régulation du cycle cellulaire et le développement de la plante. Cette Thèse comporte quatre chapitres, en plus de celui-ci, qui visent à répondre aux questions biologiques concernant le rôle de PNek1. Le Chapitre 2 compare l'ensemble de la famille des Neks chez les trois espèces végétales séquencées jusqu'ici, soit *Arabidopsis thaliana*, *Populus Trichocarpa* et *Oryza sativa* (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000; Yu *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Tuskan *et al.*, 2006). L'analyse de l'expression transcriptionnelle chez les trois espèces est assez exhaustive et permet de jeter un premier coup d'œil sur l'implication probable des Neks dans le développement des organes. Ce chapitre accorde aussi une plus grande attention à l'expression de *PNek1* dans le développement de la plante, plus particulièrement au niveau du cambium vasculaire. Le Chapitre 3 présente les observations découlant d'une étude plus précise sur l'expression de *PNek1* dans le contexte du cycle cellulaire. Il nous est apparu que la variation du niveau d'expression en fonction du cycle cellulaire, en plus de la localisation cellulaire de PNek1, sont comparables aux observations faites chez d'autres Neks de mammifères. Le Chapitre 4 présente des observations préliminaires sur l'expression de PNek1 en lien avec un rôle possible dans la réponse aux stress génotoxiques, une avenue qui reste toutefois à développer, tout comme les résultats sur les interactions protéine-protéine obtenus par double-hybride afin d'identifier des interacteurs potentiels à PNek1. Ces résultats suggèrent l'existence possible d'une interaction Nek-Nek chez les plantes, comme chez les mammifères, et un rôle possible au niveau de la maturation de l'ARN. Finalement, le Chapitre 5 se veut une évaluation des preuves de l'implication des Neks dans le cycle cellulaire, dans le but d'établir si elles méritent pleinement leur titre de régulateur du cycle cellulaire. Ce chapitre aborde aussi les perspectives futures quant au rôle de PNek1 dans un contexte biologique donné.

Chapitre 2 - Les protéines kinases de type NIMA seraient impliquées dans le développement des organes et du système vasculaire chez les plantes

Suite à la publication du génome de peuplier (Tuskan *et al.*, 2006), l'idée de caractériser les Neks, une famille relativement nouvelle de protéines kinases chez le peuplier, est devenue très intéressante. Et pourquoi ne pas inclure l'analyse chez *Arabidopsis* et le riz, les deux autres plantes séquencées? Mais comme je ne voulais pas en faire un produit purement descriptif, j'ai tenu à y ajouter une saveur fonctionnelle. Suite à l'analyse *in silico* des génomes (Tableau 2.1; Figures 2.1, 2.2 et 2.3), j'ai produit une banque d'ADNc provenant d'organes et de tissus à différents stades du développement du peuplier. Puis, avec l'aide de Gervais Pelletier et des conseils du Dr. Bob Rutledge, j'ai procédé à l'analyse exhaustive de l'expression des Neks de peuplier dans cette banque par RT-qPCR (Figure 2.4A). J'ai ensuite interrogé les ressources de puces à ADN disponibles sur internet, pour en retirer l'information correspondante au développement chez *Arabidopsis* (Figure 2.4B). J'ai aussi eu la permission du Dr. Timothy Nelson, de l'Université Yale, de cribler sa banque de puces à ADN pour le riz et de pouvoir publier mes résultats avant même qu'il ne publie les siens (Figure 2.4C). Les résultats concernant la Nek1 des plantes furent corroborés par l'analyse du promoteur de *PNek1* en fusion avec GUS chez le peuplier et chez *Arabidopsis* (Figure 2.5, 2.6 et 2.7). Denis Lachance s'était occupé d'isoler une région du promoteur et de transformer *Arabidopsis*, alors que Caroline Levasseur s'était occupée de la transformation du peuplier. L'article fut accepté et publié dans *The Plant Journal*, édition d'août 2007, volume 51(4), pages 575 à 588. Ce travail représente une analyse exhaustive de la famille des Neks chez les plantes, raison pour laquelle j'ai choisis de le présenter au début de cette thèse, malgré qu'il ait été publié dans le dernier tiers de mon cheminement.

Members of the plant NIMA-related kinases are involved in organ development and vascularization in poplar, *Arabidopsis* and rice

Frédéric Vigneault, Denis Lachance, Monikca Cloutier, Gervais Pelletier, Caroline Levasseur and Armand Séguin

Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Centre, 1055 du P.E.P.S., P.O. Box 10380, Stn. Sainte-Foy, Quebec, Quebec, Canada G1V 4C7.

Running title: The plant Nek family in poplar, *Arabidopsis* and rice.

Keywords: NIMA, poplar, real-time PCR (qPCR), plant development, vascularization, cell-cycle.

2.1.1 Résumé

Les protéines kinases de type NIMA (Neks) forment une famille de kinases sérine/thréonine impliquée dans la régulation du cycle cellulaire chez les champignons et les mammifères. Par contre, l'information concernant le rôle des Neks chez les plantes est très limitée. Nous avons étudié les Neks chez les trois espèces végétales dont leur génome a été séquencé, dans le but d'accroître nos connaissances sur le rôle de ces kinases chez les plantes. Nous avons identifié sept membres chez *Arabidopsis thaliana*, neuf chez *Populus trichocarpa* et six chez *Oryza sativa*. Les analyses phylogénétiques ont démontré que les Neks de plantes sont étroitement apparentées et que plusieurs gènes sont en fait des paralogues. De plus, leur distribution chromosomale et leur structure exon-intron ont révélé que les Neks tireraient leur origine d'un représentant unique suite à d'importants événements de duplication du génome chez les plantes. L'analyse fonctionnelle de l'expression des transcrits a été réalisée par RT-qPCR pour les Neks du peuplier et par le criblage des données publiques de puces à ADN pour *Arabidopsis* et le riz. Bien que les Neks de plantes soient présentes dans tous les organes, leur profil d'expression suggère leur implication dans des processus de développement de la plante. Par surcroît, nous démontrons que *PNek1*, un membre des Neks de peuplier, s'exprime aux sites de synthèse d'auxine et est impliquée dans le processus de vascularisation.

2.1.2 Summary

NIMA-related kinases (Neks) are a family of serine/threonine kinases that have been linked to cell-cycle regulation in fungi and mammals. Information regarding the function of Neks in plants is very limited. We screened the three plant species that have had their genomes sequenced in an attempt to improve our understanding of their role in plants. We retrieved seven members in *Arabidopsis thaliana*, nine in *Populus trichocarpa* and six in *Oryza sativa*. Phylogenetic analysis showed that plant Neks are closely related to each other and contain paralogous genes. Moreover, their chromosome distribution and their exon-intron structure revealed that the actual plant Nek family was derived from a single representative followed by large segmental duplication events. Functional expression analyses in the three species relied on RT-qPCR in poplar and publicly available

microarray data for *Arabidopsis* and rice. Although plant Neks are present in every organ analyzed, their expression profiles suggest their involvement in plant development processes. Furthermore, we showed that *PNek1*, a member of the poplar family, is expressed at sites of free auxin synthesis and is specifically involved during the vascularization process.

2.2 Introduction

Plant development involves a series of precisely regulated cell proliferation and differentiation events. Vascular tissue formation initiates with meristematic cells differentiating into procambium and then vascular cambium, which experience further division and differentiation into xylem or phloem (Ye, 2002; Scarpella and Meijer, 2004; Sieburth and Deyholos, 2006). Several protein kinases drive the cell division process in plants, such as the cyclin-dependent kinases (CDKs) whose activation requires their association with cyclins (Inzé, 2005; Gegas and Doonan, 2006). More recently three members of the Aurora kinase family have been linked to cell-cycle signalization in *Arabidopsis thaliana* (Demidov *et al.*, 2005). In animals and fungi, another group of mitotic kinases, the NIMA-related kinases (Neks), have been involved in cell-cycle transition. NIMA is a serine/threonine kinase essential for entry into mitosis and chromosome condensation, and its degradation is required for mitotic exit in *Aspergillus nidulans* (Osmani and Ye, 1996). Although there is only one NIMA in *Aspergillus*, 11 Neks have been described in mammals (O'Connell *et al.*, 2003). Human Nek2 (HsNek2) possesses the closest sequence similarity to the fungal NIMA and has consequently been the subject of numerous studies. Like NIMA, HsNek2 is cell-cycle-regulated, exhibiting maximal activity at the onset of mitosis in G₂/M transition, but is not essential for either entry into or exit from mitosis. Nevertheless, convincing evidence supports a role in microtubule organization and centrosome separation (Hayward and Fry, 2006).

Since the cell-cycle is well conserved in eukaryotes, we would expect to also find Neks in plants. The first indication of a plant Nek came from a partial cDNA clone isolated in *Antirrhinum majus*, which showed high expression levels in proliferating cells inside the meristems (Zhang *et al.*, 1996). The first plant Nek to be isolated, SPAK (AAL04423), was

retrieved from an interaction between SP, a 23-kDa protein involved in shoot architecture and flowering regulation in tomato. Suppression of SPAK by antisense RNA resulted in elongated tomato fruit, suggesting a role in early organ development (Pnueli *et al.*, 2001). We had previously isolated PNek1 from *Populus tremula* x *P. alba* (AAL79042), using a two-hybrid approach with a 14-3-3 protein as bait (Cloutier *et al.*, 2005). This poplar Nek shares 95% identity with the tomato Nek. Transcript level was shown to increase during the G₂ phase, peaking at the onset of mitosis. Overexpression of PNek1 in *Arabidopsis* resulted in abnormal flower development and plants with increased branching, suggesting its involvement in organ development and meristem activity.

Availability of genome-scale analyses prompted us to conduct a comprehensive investigation of the Nek family in *Arabidopsis*, *Oryza sativa* and *Populus trichocarpa*, the three plant species that have had their genomes sequenced. We show that plant Neks evolved from a unique descendant following recent large-scale duplication events. Expression analyses in the three species suggest their involvement in organ development. A closer look at PNek1 suggests a role in vascularization processes rather than cell division.

2.3 Results

2.3.1 The Nek family is conserved in plant genomes

Our previous phylogenetic analysis revealed that the tomato SPAK and poplar PNek1 had seven potential homologues in *Arabidopsis* (Cloutier *et al.*, 2005). The *Arabidopsis* Neks were named AtNek1 to AtNek7 according to their sequence similarity with the catalytic domain of the first isolated members of plant Neks: SPAK and PNek1. NIMA-related kinases have a conserved N-terminal serine/threonine kinase domain, as well as a long basic C-terminal non-catalytic extension with no sequence similarity, except for a conserved PEST degradation motif and a coiled-coil interaction domain towards the very end (O'Connell *et al.*, 2003). Starting with this definition, each of the seven AtNeks were then used in successive searches to retrieve other potential AtNeks from the TAIR database (Garcia-Hernandez *et al.*, 2002). No additional AtNeks were identified. A similar approach was used to search the *Populus* Genome Assembly (Tuskan *et al.*, 2006). Each new gene

was then curated manually using the corresponding ESTs. A total of nine poplar Neks were identified and named PtNek1 to PtNek9 based on their sequence similarity with the catalytic domain of PNek1 (Table 2.1).

Table 2.1. Nomenclature of the plant Neks in *Arabidopsis thaliana* (At), *Populus trichocarpa* (Pt) and *Oryza sativa* (Os)

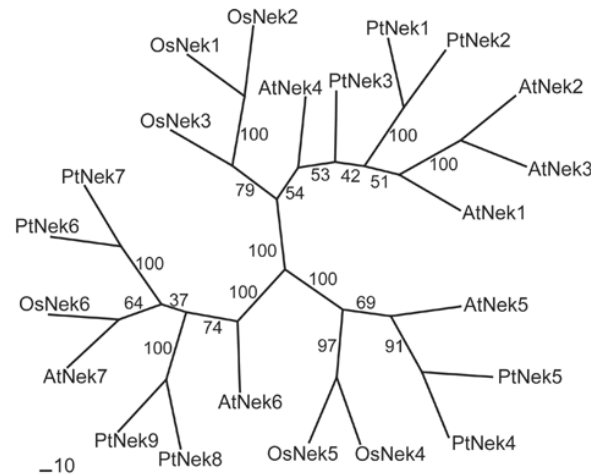
At gene	At gene code	Pt gene	Pt gene model ^a	Os Gene	Os gene code
AtNek1	At1g54510	PtNek1	eugene3.00700083	OsNek1	Os03g43590
AtNek2	At3g04810	PtNek2	eugene3.00130382	OsNek2	Os12g41180
AtNek3	At5g28290	PtNek3	gw1.II.3414.1	OsNek3	Os07g08000
AtNek4	At3g63280	PtNek4	gw1.IX.4562.1	OsNek4	Os05g36960
AtNek5	At3g44200	PtNek5	gw1.I.662.1 ^b	OsNek5	Os01g64490
AtNek6	At3g20860	PtNek6	grail3.0152000301 ^b	OsNek6	Os02g37830
AtNek7	At3g12200	PtNek7	grail3.0004013301 ^b		
		PtNek8	estExt_fgenesh1_pm_v1.C_LG_I0105 ^b		
		PtNek9	estExt_fgenesh4_pm.C_LG_III0643 ^b		

^a Sequences are presented in Table S1.

^b These poplar representative gene models are based on JGI genome assembly v1.1 and do not match exactly with our investigation. The divergences are observed for the C-terminal extensions, ranging from 50% to 90% identity. No difference occurs between the catalytic domain predictions (i.e. kinase domain).

Six Neks were identified with the TIGR Rice Genome Annotation (Yuan *et al.*, 2005) and named OsNek1 to OsNek6. Moreover, closely related orthologues are present in each species, such as the closely related plant Nek1, Nek2 and Nek3. This subgroup also presents one pair of paralogues per species: AtNek2 and AtNek3, PtNek1 and PtNek2, OsNek1 and OsNek2 (Figure 2.1). The kinase domain identity averaged 85% for the Nek1 to Nek3 subgroup, 85% for the Nek4 and Nek5 subgroup and 72% for the Nek6 to Nek9 subgroup. Our phylogenetic analysis indicates that plant Neks are very similar to each other. As information on plant Neks is limited, we propose that this systematic nomenclature be adopted.

Figure 2.1. Phylogenetic relationships between *Arabidopsis*, poplar and rice Neks. The unrooted tree was generated from aligned amino-acid sequences of the conserved N-terminal catalytic domain by neighbor-joining distance, using ClustalW v1.8 and PHYLIP v3.65. Numbers indicate the frequency at each node. Line lengths indicate the relative distances between nodes.



2.3.2 Whole genome duplication was involved in shaping the plant Neks

The close similarity and presence of putative paralogues prompted us to investigate the genome distribution of the plant Nek family. *In silico* chromosome mapping revealed that poplar *Neks* are scattered throughout the genome (Figure 2.2). With the exception of *PtNek5* and *PtNek8*, which are located on chrI, the other *PtNeks* are present on different chromosomes. *PtNek1* and *PtNek6* are located on short scaffolds that have yet to be assigned to a specific linkage group. Interestingly, five of the seven *AtNeks* are located on chromosome III (chrIII). This concentration of *Nek* genes on a single chromosome is not observed in poplar or rice. Paralogues *AtNek2* and *AtNek3* are located on chrIII and V respectively. Paralogues in poplar are also located on different chromosomes or scaffolds. In rice, the six *OsNeks* are each located on a different chromosome. This scattered distribution is in perfect agreement with previous studies that described large-scale duplication events in poplar (Tuskan *et al.*, 2006), *Arabidopsis* (Ermolaeva *et al.*, 2003) and rice (Yu *et al.*, 2005). However, extensive reshuffling and divergent evolution following these massive duplications are certainly responsible for the present organization of the plant *Neks*.

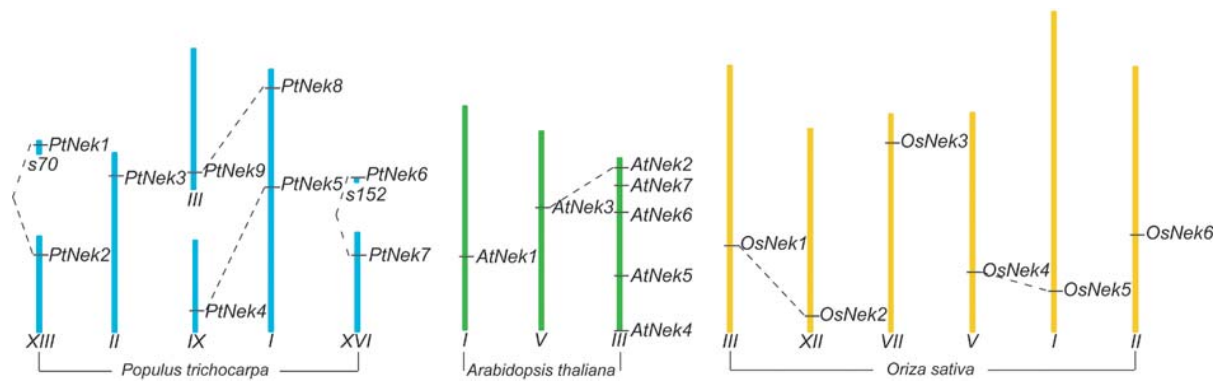


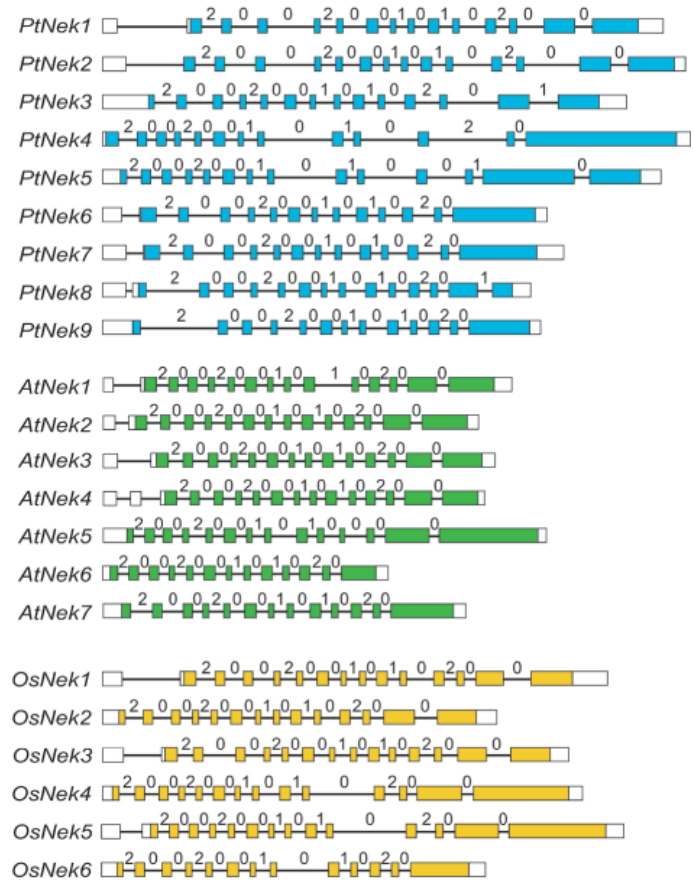
Figure 2.2. Distribution of the Nek genes in their respective plant genome. Chromosomes are represented as vertical bars and identified using roman numerals. Two unassembled scaffolds, s70 and s152, contain a *PtNek* gene. Paralogues are linked by dashed lines.

2.3.3 Conserved exon and intron organization in plant *Nek* genes

The majority of higher eukaryote genes are discontinuous. While searching for *Nek* genes in plant genomes, we observed that their catalytic domains were divided by numerous introns. In addition, the plant *Neks* intron and exon distribution looked practically identical in the three species. Analysis of the exon-intron junctions showed that the N-terminal catalytic domain coding sequences are partitioned into 12 small exons, shorter than 100 bp (Figure 2.3 and Table S2). In contrast, the long C-terminal extension is composed of only one or two long exons. The C-terminals of plant *Nek1* to *Nek5* are divided by one intron, while those of *Nek6* to *Nek9* are made of a single exon. Furthermore, the intron phase pattern is conserved for all the plant *Nek* genes analyzed. The intron phase refers to where a given intron is inserted within a codon, which can be immediately upstream (phase 0), after the first nucleotide (phase 1) or after the second nucleotide (phase 2). The plant *Neks* show a strong bias toward phase-0 introns. We found that 60% of introns are in phase 0, with 17% and 23% in phases 1 and 2, respectively. This distribution is rather similar to those previously reported in eukaryotic genomes, including *Arabidopsis* in which approximately 50% are in phase 0, 25% in phase 1 and 25% in phase 3 (Ruvinsky *et al.*, 2005). Interestingly, the majority of the 5'UTRs are divided by an intron. Overall, the

strongly conserved exon-intron distribution emphasizes the close relationship between the plant Neks, which further supports our phylogenetic analysis.

Figure 2.3. Scaled diagram of exon-intron structure of the plant Neks in poplar, Arabidopsis and rice. Exons and introns are represented by boxes and black lines respectively. White boxes correspond to the UTRs. Intron phases are indicated on the diagram and the length of each structure is provided in Table S2. Exons and introns longer than 200 bp were halved to restrain the size of the figure (see Table S2).



2.3.4 Functional analysis of the AtNek family using insertion mutants

Overexpression of PNek1 in *Arabidopsis* caused an increase in cauline branches and severe flower developmental anomalies (Cloutier *et al.*, 2005). These included disorganized inflorescences and underdeveloped stamens, carpel and petals. As a consequence, most of these plants were sterile. These phenotypes were somewhat similar to those observed in a *leafy* mutant (Schultz and Haughn, 1991), and hinted at a potential role in organ development or meristem activity. To gain an initial insight into the functional role of the plant Nek family, we examined insertion mutants for *AtNek1* and *AtNek2* obtained from the Salk T-DNA insertion mutant collection (Alonso *et al.*, 2003). No visible phenotypes were apparent in either the homozygous *atnek1* (SALK_065629) or *atnek2* (SALK_012284)

lines. Seeds from a second *atnek2* line (SALK_062288) did not germinate. Actual homozygous insertions were confirmed by PCR as described by Alonso *et al.* (2003). Interestingly, RT-PCR allowed the detection of a transcript for *atnek1* (data not shown). These observations raise more questions, such as whether plant *Nek* genes are involved in fertility or germination, or whether the absence of a phenotype can be explained by functional redundancy. For *atnek1*, the insertion is located in the last exon. As mammals *Nek2* and *Nek11* have been shown to possess a functional alternate splicing variant with a truncated C-terminal (Uto *et al.*, 1999; Noguchi *et al.*, 2002), it is possible that the *AtNek1* transcripts detected are translated into a functional protein.

2.3.5 Plant *Nek* expression profiles correlate with organ developmental patterns

As a complementary approach to the characterization of T-DNA insertions in *AtNeks*, we decided to examine plant *Nek* expression profiles in each organism using real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR). In poplar, primers were designed based on the 3'UTR sequence of each *PtNek* (Table S3). Our poplar EST search on NCBI revealed that this region is unique to each gene and is conserved in different *Populus* backgrounds. We effectively achieved near perfect amplification efficiency and comparable expression levels in two genetic backgrounds: *P. trichocarpa* x *P. deltoides* and *P. tremula* x *P. alba*. In order to draw a detailed expression pattern of the poplar *Nek* family reflecting whole plant development, we extracted a collection of RNA from multiple organs and tissues. This collection was harvested from *P. tremula* x *P. alba* clone 717-1B4. Processed data of *PtNek* transcripts are presented in Figure 2.4A. The number of target molecules per nanogram of cDNA for each *PtNek* and various control genes are provided in the Table S3. Genevestigator was used to extract *Arabidopsis* expression data (Zimmermann *et al.*, 2004). Unlike RT-qPCR analysis, the signal intensity values given by the GeneChip analyses are not a measure of the absolute transcript abundance. Nevertheless, they do reflect the variation in transcript accumulation in a defined organ (Figure 2.4B). Rice *Nek* expression data were retrieved from the Rice MPSS Database (Meyers *et al.*, 2004) and the Rice Cellular Expression Profile Project (T. Nelson, personal communication). By combining the information available from both databases, we

were able to define general expression trends for each of the *OsNeks* (Figure 2.4C). Overall, expression levels of the plant *Neks* are generally low. Furthermore, paralogues show similar transcript levels and similar expression profiles.

PtNek1 and *PtNek2* are preferentially expressed in young leaves and in the apical bud. Expression is between 10 to 60 times lower in a mature leaf. Interestingly, their expression doubles between the tip of the leaf compared with the base of the leaf. Overall, this is evocative of the basipetal development pattern in leaves (Aloni *et al.*, 2003). *PtNek3* also shows a higher expression level in younger leaves. In the apical region of the tree, expression levels of *PtNek1*, *PtNek2* and *PtNek3* are higher in the leaf primordium than in the first unfolded leaves. However, the highest expression level for *PtNek2* is observed in the apical meristem (Table S3). In the stem, *PtNek1* and *2* expression levels are twofold higher in the phloem-cambium extract than in the xylem. Moreover, expression levels are observed to be higher in the young stem, a tissue composed essentially of primary tissues unlike the older stem which shows secondary phloem and xylem development. By comparison, *PtNek3* expression levels are observed to double in the stem with highest transcript accumulation observed in the xylem of the young stem. This could indicate a preferred expression in vascular tissues. Accordingly, the highest transcript level of *PtNeks 1 to 3* in a leaf, irrespective of its position on the tree, is observed in the midvein. Transcript accumulation for *PtNek1*, *PtNek2* and *PtNek3* is similar in all root samples. Overall these observations suggest a potential complementary role in organ development between *PtNek3* and the paralogues *PtNek1* and *PtNek2*.

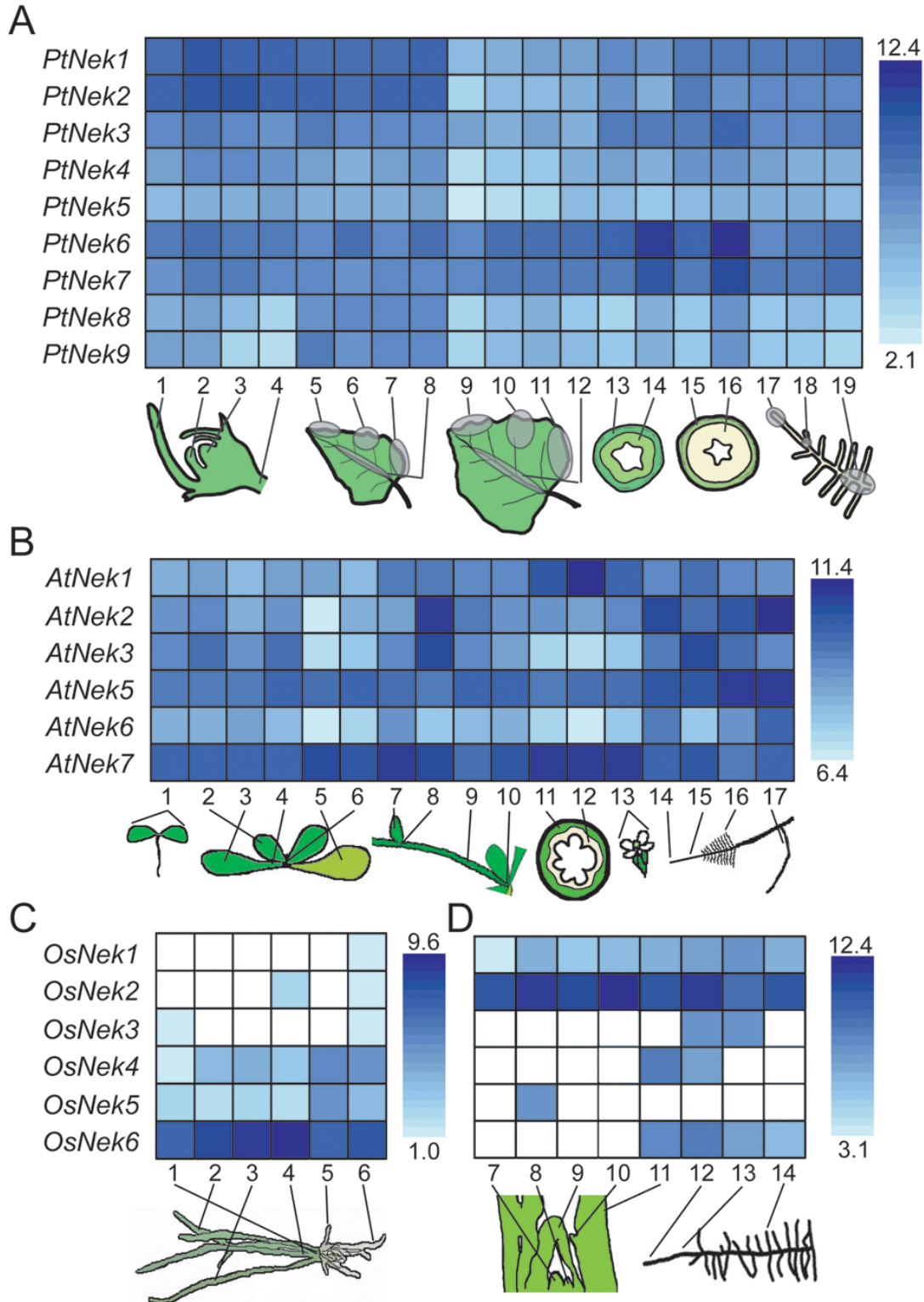


Figure 2.4. Gradient contour charts of the plant Nek expression profiles in various organs. A. Poplar *Neks* transcript expression was measured by RT-qPCR, replicates were

averaged and log₂ transformed. Legend for poplar extracts: first unfolded leaf (1), leaf primordium (2), apical meristem (3) and stem section (4) of the apical bud; apical margin (5), middle section (6), base margin (7) and mid vein (8) of a young leaf at internode 2; apical margin (9), middle section (10), base margin (11) and mid vein (12) of a mature leaf at internode 12; phloem/cambium (13) and xylem (14) of a young stem at internode 4; phloem/cambium (15) and xylem (16) of a stem at internode 14; root tip (17), lateral root (18) and maturing root (19). **B.** *Arabidopsis Nek* expression values were extracted from Genevestigator (Zimmermann *et al.*, 2004). *AtNek4* is not represented by any probeset. Legend for *Arabidopsis* extracts: cotyledons (1), juvenile leaf (2), adult leaf (3), petiole (4), senescent leaf (5), cauline leaf (6), node (7), shoot apex (8), stem (9), hypocotyl (10), xylem (11), cork (12), flower (13), root tip (14), elongation zone (15), root hair zone (16) and lateral root (17). **C** and **D.** Rice expression data were retrieved from (**C**) the Rice MPSS Database (Meyers *et al.*, 2004) and (**D**) the RICEATLAS (Timothy Nelson, personal communication). Legend for rice extracts: meristem (1), young leaf (2), mature leaf (3), stem (4), young root (5), mature root (6); axillary meristem (7), leaf primordium 1 (8), hood-shaped primordium 2 (9), ligule primordium 3 (10), mature leaf (11); root tip (12), root elongation zone (13) and root maturation zone (14). Detailed expression data used to draw the gradient contour charts are provided in Table S3. White squares represent absent calls. Log scales are provided at the right side of each of the charts.

AtNek1, *AtNek2* and *AtNek3* also show a higher expression in juvenile leaves, suggestive of the basipetal pattern observed in poplar. Interestingly, *AtNek2* and *AtNek3* signals decrease drastically in senescent leaves. Expression levels of *AtNek1*, *AtNek2* and *AtNek3* are also relatively high in the shoot apex. *AtNek1* signal values are lower in the leaves when compared with the apical meristem and the vascular representing elements. The strongest levels of *AtNek1* expression are observed in the hypocotyl and in the xylem, suggesting an involvement in vascular-related functions. On the other hand, *AtNek3* expression in the hypocotyl, xylem and cork extracts are very low, with *AtNek2* being between the two. Moreover, another distinction is apparent in roots between *AtNek2* and 3.

While the *AtNek2* signal is strong in the lateral root, elongation zone and in the root hairs, *AtNek3* is particularly strong in the root tip. *AtNek1* is also preferentially expressed in the root tip. Together, these observations suggest the adoption of complementary roles between the *AtNek1* to 3, similar to what we observed for *PtNek1* to 3. Unfortunately, the Affymetrix GeneChip does not contain any probeset for *AtNek4*. However, online Massive Parallel Signature Sequencing data (MPSS) show its strong expression in the root and in immature inflorescence buds (data not shown).

In rice, *OsNek1* shows an increase in expression during both leaf primordium and root development. Its paralogue *OsNek2* shows highest expression levels in the third leaf primordium and in the root tip, but decreases in mature organs. Although the relatively low expression levels of *OsNek1* are typical of our observations with other plant *Neks*, *OsNek2* expression levels seem particularly high in the oligo array data, which may indicate a central role for this kinase in rice. It is also possible that observed levels for *OsNek2* are a consequence of the specificity and efficiency inherent to the microarray approach with the *OsNek2* oligo. Inspection of the *OsNek2* 70-mer oligo sequence shows a weak affinity for *OsNek1*, but by itself is insufficient to explain the observed level. Only partial information could be retrieved for *OsNek3*. Though limited, expression in rice is consistent with our previous observations for plant *Nek1*, *Nek2* and *Nek3* showing an increased expression in relation to organ development.

PtNek4 and *PtNek5* expression levels are generally the lowest observed of the *PtNeks*. Expression profiles are remarkably low in mature leaf. In both cases, expression levels in leaves are higher in the younger leaf with increased transcript accumulation observed in the midvein. Of all samples tested, *PtNek4* expression levels are highest in the leaf primordia. Transcript levels are low in the root extracts and do not vary much. Contrastingly, *AtNek5* expression is higher in all aboveground organs and does not vary between leaf stages. It appears to be preferentially expressed in appendices, including the petiole, cauline leaf and flower. Its highest expression levels are observed in the roots, especially in the elongation and root hair zones. In contrast, its lowest expression levels are found in the shoot apex and in the xylem. For paralogues *OsNek4* and *OsNek5* expression

levels are in between those of their poplar and *Arabidopsis* putative orthologues. Similar to the *PtNeks*, it is higher in the younger rather than the mature leaf. However, akin to *AtNek5*, their highest expression levels are seen in young roots and decrease as the root matures. The oligo array data partially supports these observations, at least for *OsNek4*.

Paralogues *PtNek6* and *PtNek7* show the highest level of expression of all the *PtNeks*. Contrary to other family members, their level of expression in leaves is higher in the mature leaf. Analysis of transcript accumulation for *PtNek6* also revealed the highest level of expression observed amongst all *PtNeks* in developing xylem. Accordingly, the transcript levels are higher in the xylem than in the phloem-cambium extracts, which again sets *PtNek6* apart from other family members. In roots, its expression is higher in the maturing tissue. *PtNek8* and *PtNek9* show very low levels of expression, except in young leaves where it is comparable with the other *PtNeks*. Unlike all other *PtNeks*, *PtNek9* displays an acropetal profile in the young leaf and lower levels in the apical meristem.

PtNek8 and *PtNek9* relate to *PtNek6* and *PtNek7*, with higher transcript accumulation in the xylem from mature stems. *AtNek6* signal value is generally low in all organs and particularly in senescent leaves and xylem. Expression is somewhat higher in lateral roots and in root hairs. Moreover, the typical plant *Neks* juvenile to adult leaf developmental pattern is not observed. Similar to the *PtNek6* and *PtNek7* paralogues, *AtNek7* shows the highest level of expression of all the *AtNeks*. High levels of transcript accumulation are seen in highly vascularized tissues such as the xylem and hypocotyl sections, but are also seen in the cork. The shoot apex and the node are also regions of high expression. An exclusive feature of *AtNek7* is its strong signal value in senescent leaves. The signature abundance measured for *OsNek6* is considerably higher than those of the other *OsNeks*, which is consistent with the observation made earlier with plant *Nek6* and *Nek7*. Likewise, *OsNek6* expression levels are generally higher in the more mature organs. However, the oligo array of laser-dissected tissue reveals that expression is higher in the root tip than in the maturing root.

2.3.6 Expression of *PNek1* promoter::*GUS* corresponds to sites of auxin production and vascular development

Our RT-qPCR analysis supports the idea that plant *Nek* expression varies with organ development. To gain insight into the expression pattern of a member of the *PtNek* family, we inserted the promoter region of *PNek1* fused to the β -glucuronidase reporter gene (*pNek1::GUS*) into *Arabidopsis* and poplar. This region contains the 5'UTR of 252 bp, in which is found a 1 kb intron, and the 2.5 kb region immediately upstream that we believe contains the complete *PNek1* promoter sequence. GUS activity was observed in specific regions of the plant, as seen by the blue coloration in the hydathodes, the trichomes and the vascular elements of *Arabidopsis* leaves (Figure 2.5C to F). Interestingly, the expression pattern is observed to change with the development of the leaf. In the meristem, GUS staining is located at the apex of leaf primordia (Figure 2.5A). As the leaf primordium develops, GUS activity can be found in the procambium (Figure 2.5B). During leaf development, activity increases in the tips of the first unfolded leaf (Figure 2.5C), which will develop into hydathodes and take part in the vascularization process (Figure 2.5D and E). All these regions show a decrease in GUS expression as the leaf completes its development (Figure 2.5F). Observation of *pNek1::GUS* in poplar leaves is similar to the developmental pattern that was observed in *Arabidopsis*. Expression in the apical meristem is seen in the leaf primordium and in the hydathodes of a very young developing leaf (Figure 2.5K). Expression is also strong along the margin and in the hydathodes of a young leaf, following a basipetal developmental pattern, as seen by the loss of apical expression (Figure 2.5L and M). The expression also becomes stronger within the vascular tissues (Figure 2.5M) and will eventually be restricted to the developing vasculature of the veinlets in a mature leaf (Figure 2.5N). In an *Arabidopsis* stem section near the hypocotyl, the expression is restricted to the cambium (Figure 2.5G and H). In a young poplar stem section presenting only primary development, expression is observed in the xylem and phloem (Figure 2.5O). Expression in the vascular cambium is very weak. However, as the stem develops secondary growth, expression in the cambium increases (Figure 2.5P). Expression in the xylem is restricted to a few parenchyma rays. In the root tip of both *Arabidopsis* and poplar, GUS activity is present in the columella of the mature root tip, below the quiescent cells (Figure 2.5I, Q and R). Coloration seen around the quiescent

center in the poplar root could be explained by diffusion or a weak expression. The cell division zone shows no expression, but coloration can be observed in the elongation zone, where cells begin to differentiate (Figure 2.5Q). Expression is also observed in the vascular bundle of a budding lateral root (Figure 2.5J and S). A cross section of a maturing root vascular bundle reveals expression of *PNek1* at the phloem/cambium interface and possibly in the differentiating xylem (Figure 2.5T and U). Together, expression of *PNek1* promoter in *Arabidopsis* and poplar revealed a clear vascular developmental pattern in every organ.

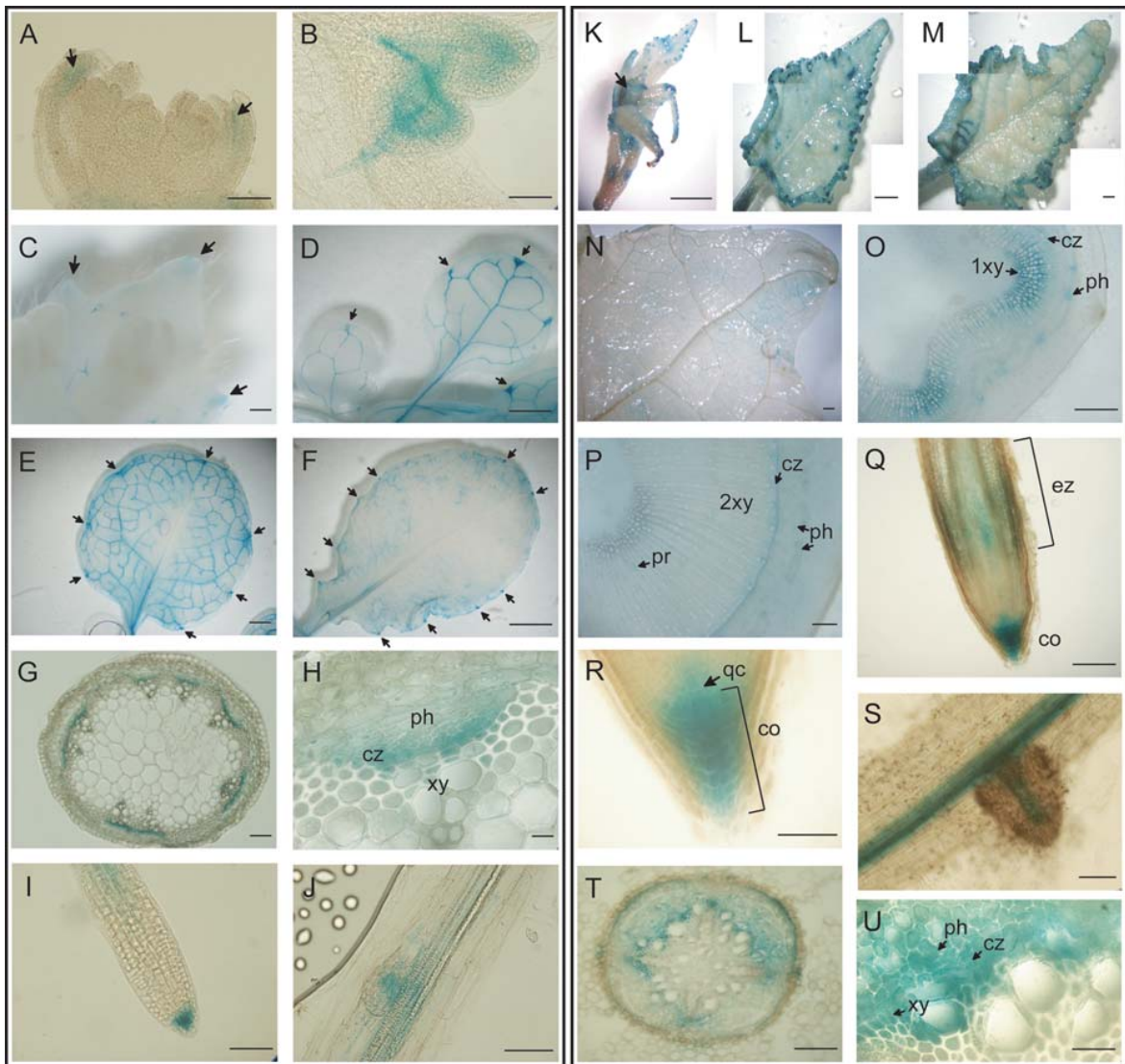


Figure 2.5. GUS expression of the PNek1 promoter fused to the uidA reporter gene. *Arabidopsis* (A to J): GUS staining in developing leaf primordium of a meristem (A,

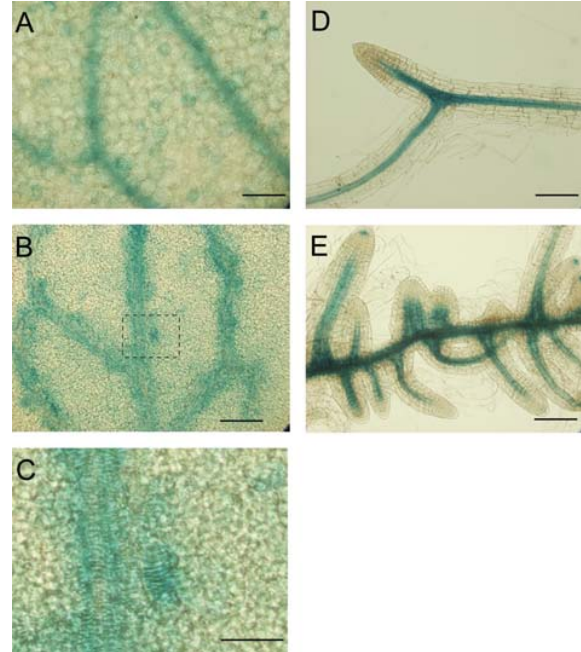
arrows), in the procambium (B), and in the tips (C, arrows) and trichomes of a small leaf; in the hydathodes (arrows) and vascular tissues during leaf development (D, E and F); in the cambium (cz) of the stem (G and H); in the columella (co) of the root tip (I). Poplar (K to U): GUS staining in the hydathodes, ligule and leaf primordium (arrow) of the shoot apex (K); in the hydathodes and along the margin of a leaf at internode 2 (L); in the hydathodes, along the margin and in the veins of a leaf at internode 4 (M); weak expression in the small veins of a leaf at internode 12 (N); in the primary xylem (1xy), cambium (cz) and phloem (ph) of a stem at internode 4 (O); in the cambium (cz) and xylem ray parenchyma (pr) of a stem at internode 12 (P); in the columella (co) and elongation zone (ez) of a root tip (Q and close-up R); in the developing vasculature of a lateral root (S); in cambium (cz), phloem (ph) and differentiating xylem (xy) of a maturing root (T and close-up U). Bar = 1 mm in F, K, L, M and N; 500 μm in D, E, O and P; 250 μm in Q; 100 μm in A, B, C, G, I, J, R and S; 25 μm in H and T; and 2.5 μm in U. Legend: *co*, columella; *cz*, cambium; *ez*, elongation zone; *ph*, phloem; *pr*, xylem ray parenchyma; *qc*, quiescent center; and *xy*, xylem.

2.3.7 P*Nek1* expression is linked to vascular development but not to auxin response

Promoter analysis of an auxin response element, DR5::GUS, has demonstrated that the hydathodes, trichomes and columella of the root apex are the main sites of auxin production (Aloni *et al.*, 2003). The *P*Nek1** promoter region contains two potential auxin response elements (AuxRE). One is approximately 0.9 kb upstream of the 5'UTR, and the second is located within the 5'UTR. In order to test whether *P*Nek1** could be induced by auxin, *Arabidopsis* seedlings containing *p*Nek1*::GUS* were allowed to germinate and grow in liquid for 12 days, after which 1 to 10 μM of NAA was added to the medium. Seedlings were then harvested at different time points ranging from 30 min to 4 days and incubated in β -glucuronide. No induction was observed during the first 24 h (data not shown). However, after several days of growing in auxin supplemented media, seedlings presented abnormal vascular development in the leaves and abundant lateral root formation (Figure 2.6B, D). Increase in *p*Nek1*::GUS* expression could be observed in the vascular elements of both the

leaves and roots, including the ectopic development of tracheary elements in the leaves (Figure 2.6B insert) and in the lateral roots that could contain multiple vessels (Figure 2.6E). This indicates that while *PNek1* expression is associated with the vascularization process, it does not directly respond to exogenous application of auxin.

Figure 2.6. Expression of pNek1::GUS relates to vascular development following auxin induction. Twelve-day-old *Arabidopsis* seedlings were treated with 1 μM of NAA for 4 days (B, C and E). Auxin-induced vascular development as seen by the formation of multiple tracheary elements in young leaves (B and insert C) and considerable lateral root formation (E). Untreated (A and D) and NAA-treated seedlings (B, C and D) show specific expression in the vascular tissues. Bar = 225 μm in B (75 μm in inset); 100 μm in A, C and D.



Attempts to increase GUS activity through auxin induction in poplar have proven unsuccessful. Spraying or soaking leaves in auxin did not induce accumulation of GUS, whereas adding auxin over the media surrounding the roots did not result in the tremendous increase in lateral root formation observed in *Arabidopsis* (data not shown).

In trees, tension wood formation is closely linked to an increase in vascular cambium activity and an auxin mediated mechanism has been suggested to be linked with this process (Moyle *et al.*, 2002; Schrader *et al.*, 2003; Hellgren *et al.*, 2004; Andersson-Gunneras *et al.*, 2006). The effect of the induction of tension wood formation on *PNek1*

expression was investigated with *pNek1::GUS* transformed poplars in the greenhouse. Histochemical analysis showed an increase in GUS expression in the cambial region of the reaction wood (Figure 2.7). Fluorometric quantification confirmed that GUS activity was two times higher in the tension wood than in the opposite side (data not shown). However, RT-qPCR analysis revealed that *PNek1* transcript synthesis was only 1.2 times higher in tension wood (Figure 2.7, right panel). These results indicate once more that the observed increase in *pNek1::GUS* expression is related to cambial activity and vascularization.

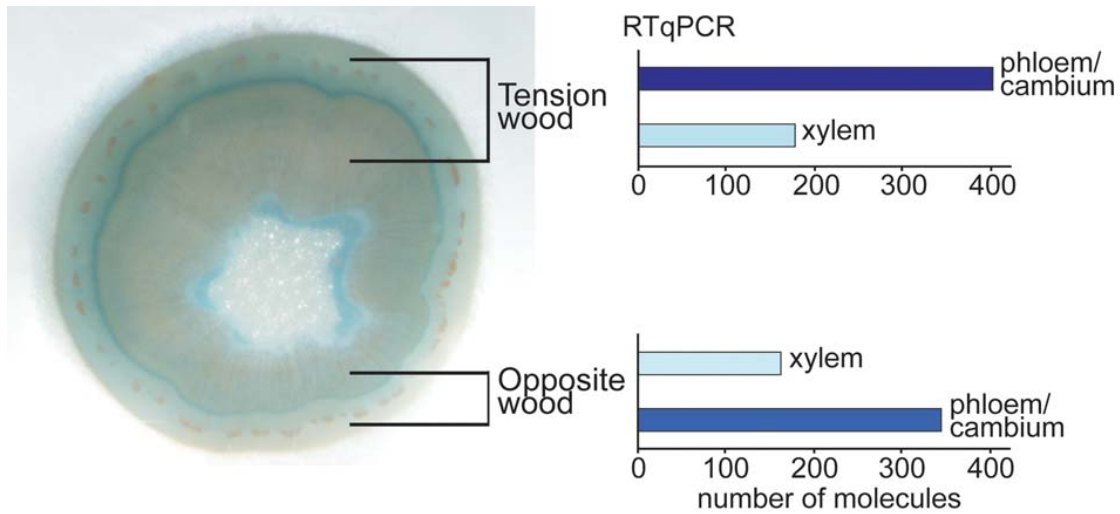


Figure 2.7. Tension wood formation induces expression of *PNek1*. Tension wood formed on the upper side along the stem of trees bent at 45° for 4 weeks, as seen by an increase in xylem width in a cross section of a stem at internode 12 (left panel). Expression of *pNek1::GUS* is enhanced in the cambium on the tension wood side. RT-qPCR analysis of *PNek1* transcript is only 1.2 times higher on the tension wood side compared with the opposite side (right panel).

2.4 Discussion

NIMA-related kinases are represented by small and closely related family members in plants. By screening three plant genomes we retrieved seven members in *Arabidopsis*, six in rice and nine in poplar. As information concerning their biological functions is limited, we did not subdivide the phylogenetic tree presented here into clearly annotated subgroups, as has previously been carried out with MAPKs (The MAPK Group, 2002). However, searches for clustered motifs revealed that the protein kinase ATP-binding region signature (PROSITE: PS00107) contains sequence variations that cluster Nek1, Nek2 and Nek3; Neks 4 and Nek5; and Nek6, Nek7, Nek8 and Nek9. This region is specifically targeted by several protein kinase inhibitors (Booher *et al.*, 1997; Taylor and Radzio-Andzelm, 1997; Cheetham, 2004) and single-amino acid mutations in its sequence have been shown to alter its protein kinase substrate affinity and activity (Yamaji *et al.*, 2001; Praseeda *et al.*, 2004). Therefore, the variations observed in the ATP-binding motifs could play an important role in segregating the Nek biological functions.

Plant Neks are scattered throughout their genomes. Strikingly, paralogue distributions in the three species correspond exactly to the recent extensive chromosomal duplication mapping done in *Arabidopsis* (Blanc *et al.*, 2000), rice (Guyot and Keller, 2004) and poplar (Tuskan *et al.*, 2006). For example, a block that includes *PtNek4* on chrIX was duplicated on the precise region of chrI where *PtNek5* is located. Interestingly, *PtNek1* and *PtNek6*, which are paralogues of *PtNek2* and *PtNek7* respectively, are located on unassigned short scaffolds. This can probably be explained by the fact that approximately 30% of the *Populus* genomic sequences are heterochromatic (Tuskan *et al.*, 2006). Genes in this region are often associated with differential control of replication and centrosome assembly. Moreover, heterochromatic genotoxic stress responsive genes have been shown to be upregulated in the *Arabidopsis* mutant for *CAF-1*, which is involved in heterochromatin formation (Schonrock *et al.*, 2006). While not heterochromatic, HsNek2 is involved in centrosome separation (Faragher and Fry, 2003; Fletcher *et al.*, 2004), while HsNek11 expression increased in response to genotoxic stress (Noguchi *et al.*, 2002).

The larger number of paralogues in poplar hints that recent genome wide duplication events were important in shaping the present poplar genome, as was observed for the MAPKs and MAPKKs (Hamel *et al.*, 2006). A highly conserved exon-intron structure is also an indication of a recent evolution event (Boudet *et al.*, 2001). It has been demonstrated that large-scale duplication events in *Arabidopsis* are most likely responsible for the actual kinome (Maere *et al.*, 2005). Additionally, these large-scale duplication events resulted in paralogues with similar expression patterns, while segmental and tandem duplications show more divergent expression (Casneuf *et al.*, 2006). Accordingly, paralogues show close transcript levels and similar expression profiles, in poplar and *Arabidopsis* at least. This suggests that pairs of *PtNeks* could act as functional paralogues. Moreover, although the *AtNek2* signal was shown to be strong in the root elongation zone, *AtNek3* was particularly strong in root tips. Therefore, paralogues could also have adopted complementary functions. Our data supports a duplication event that gave rise to *Nek1*, *Nek2* and *Nek3* genes before the divergence between the three plant species. Duplications which correlate with the early establishment of land plants have been observed in the Shaggy kinase (Richard *et al.*, 2005) and *OEP16* membrane protein gene families (Drea *et al.*, 2006). In fact, the exon-intron distribution emphasizes the high degree of conservation of the plant *Neks*. Moreover, it favors duplication from a unique representative, followed by a gain of intron in the C-terminal coding region. Indeed, the strong bias toward phase 0 introns has been suggested to be indicative of intron gain (Boudet *et al.*, 2001; Ruvinsky *et al.*, 2005). Interestingly, the majority of the 5'UTRs are divided by an intron. In some cases, the presence of such introns has been seen to affect the transcript level and translation efficiency, a process called intron-mediated enhancement of expression (Rethmeier *et al.*, 1997; Chaubet-Gigot *et al.*, 2001; Morello *et al.*, 2002; Chung *et al.*, 2006).

We previously showed that PNek1 and the AtNeks clustered in a subgroup different from the fungal and mammal Neks, but were most similar to the mammalian Nek11 (Cloutier *et al.*, 2005). To date, most of the Neks are believed to be involved in cell-cycle regulation (O'Connell *et al.*, 2003). Although not incompatible with cell-cycle processes, we have several reasons to believe that plant Neks also play a different role. Our

expression analyses suggest an obvious role in organ development and vascularization. Nek1-3 are preferentially expressed in young leaves and vascular elements, which suggests their involvement in organ initiation and development. Neks 4 and 5 seem to be more involved in root development. The relatively high level of expression of Neks 6 to 9 in the vascular extracts, especially in both the primary and secondary xylem of poplar stem extracts, is suggestive of a putative involvement in xylogenesis. One of the hallmarks of trees is the production of a large quantity of wood. Consequently secondary development is more important and makes poplar an ideal system to study the full extent of vascular development. While strong transcript accumulation is often observed in meristems, Nek expression seems to follow a developmental pattern in plant organs as well as being expressed in vascular tissue. If the plant Neks were exclusively involved in cell division, we would have expected them to be more markedly located in regions of high cell-cycle activity. The promoter:reporter phenotyping of *PNek1* is in agreement with a concomitant role in vascular tissue formation during organ development. *PNek1* expression begins in the procambium of both leaf primordium and the root tip, and remains in the vascular cambium of the stems and the mature root. Moreover, localization with *pNek1::GUS* expression does not overlap with the typical pattern observed with several cell-cycle regulators, such as cyclins and cyclin-dependent kinases (for examples see Donnelly *et al.*, 1999; Burssens *et al.*, 2000; Wildwater *et al.*, 2005; Zhiponova *et al.*, 2006). Studies with *Zinnia elegans* have demonstrated that isolated mesophyll cells can differentiate into xylem tracheary elements without cell division (Fukuda, 2004). Overall, it appears that plant Neks are more involved in cell differentiation and tissue formation processes than cell division.

Xylogenesis in *Zinnia* culture cells is induced by cytokinin and auxin. *In planta*, auxin is distributed as a gradient across the cambial zone, which suggests a role in regulating vascular tissue differentiation and development (Tuominen *et al.*, 1997; Ye, 2002; Schrader *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005). Promoter regions of both *PNek1* and *AtNek1* contain putative binding sites for transcription factors involved in auxin signaling and vascular development (PLACE and AGRIS databases). These include two predicted ARF motifs, an ATHB2 and an ATHB8 motif, which are regulated by auxin and involved

in vascular development (Ulmasov *et al.*, 1997; Steindler *et al.*, 1999; Baima *et al.*, 2001; Kang and Dengler, 2002; Liscum and Reed, 2002). The *PNek1 promoter::GUS* expression pattern is strikingly similar to that of the *DR5::GUS* auxin response element construct (Aloni *et al.*, 2003). Like the synthetic *DR5* construct, *PNek1* is specifically expressed in the primary sites of auxin synthesis including the hydathodes in the leaves and the columella of the root meristem. It also follows a basipetal development. However, we could not directly induce *pNek1::GUS* expression with exogenous auxin application. Nevertheless, auxin addition to the growth media stimulated the formation of numerous vascular elements, leading to the observation of stronger GUS expression. This observation indicates that *PNek1* expression is secondary to the induction of vascular development. Similarly, we believe that induction of *PNek1* expression in tension wood is subsequent to an increase in cambial activity. Tension wood occurs in reaction to a gravitational stress, such as bending the tree. It asymmetrically involves increased activity in the vascular cambium on the upper side of the bent stem. It is also characterized by the synthesis of a different cell wall layer in the fibers (Pilate *et al.*, 2004). Tension wood serves as a good model to study vascular activity during wood formation. Auxin level and distribution across the wood-forming tissues are unchanged in tension wood, while it is reduced by half on the opposite side (Hellgren *et al.*, 2004). These authors suggested that this decrease was the result of reduced activity in the cambial zone rather than the cause. This further supports our previous observations, since expressions of *PNek1* transcript in the tension wood and opposite sides were in the range of expression levels measured in upright trees. Nevertheless, several genes involved in auxin signalling are differentially expressed during tension wood formation (Moyle *et al.*, 2002; Andersson-Gunneras *et al.*, 2006).

2.5 Conclusion

Further studies are required to understand the regulation of cambial activity. *PNek1* is a novel element that needs to be added to an already complex puzzle. Here we provide a preliminary glimpse at the plant Nek family. Our analyses relied essentially on our own gene expression analysis data in poplar and transcriptional profiling in *Arabidopsis* and

rice, available through public databases. Whether or not plant Neks participate in cell-cycle regulation as do their fungal and mammalian homologues is still open for debate. By extrapolating observations made on PNek1 in this study and the previous one (Cloutier *et al.*, 2005), we believe that their main focus could be on vascular development. Moreover, analysis of *Arabidopsis* GeneChip datasets from synchronized cell cultures does not point towards any specific function during cell-cycle progression (supplementary data in Menges *et al.*, 2003). Recently, a comparative analysis between human, fungi and *Arabidopsis* cell-cycle genes revealed that even if the proteins and mechanisms have been conserved, their expression and regulation differ significantly (Jensen *et al.*, 2006). Individual characterization of each member of the family will be necessary to elucidate their specific functions. Promoter::reporter expression and reverse genetics, together with the availability of genomic approaches in the three species, will be helpful for gaining insight into each member of the plant Nek family. Obtaining the complete picture could be complicated by the fact that differentially expressed alternate-spliced versions have been found in two vertebrate Neks. It remains to be seen whether this also occurs in plants.

2.6 Experimental procedures

2.6.1 Sequence alignment, phylogenetic analysis and genome organization

Plant Neks were identified based on their homology to the previously isolated PNek1 in poplar clone 717-1B4 (Cloutier *et al.*, 2005). Putative AtNeks were retrieved using successive protein blast searches on both TAIR (Garcia-Hernandez *et al.*, 2002) and NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Each putative AtNek was used in successive screens over two databases. The same method was used to screen for putative OsNeks on both TIGR Rice Genome Annotation 4.0 (Yuan *et al.*, 2005) and NCBI. PtNeks were retrieved using the TBLASTN alignment program on the *P. trichocarpa* Genome Assembly 1.1 (Tuskan *et al.*, 2006). Less stringent scoring matrixes were used (PAM70 and BLOSUM45). The genomic sequences were curated manually by using successive alignments of the tblastn results and poplar ESTs retrieved on both NCBI and PopulusDB

(Sterky *et al.*, 2004). The conserved N-terminal catalytic domain of the predicted protein sequences were aligned using CLUSTALW 1.8 (Chenna *et al.*, 2003). The phylogenetic tree was constructed using the neighbour-joining method in the PHYLIP package 3.65 (Felsenstein, 2005) and displayed using TREEVIEW 1.6.6 (Page, 1996).

2.6.2 Evaluation of T-DNA insertion mutants

T-DNA inserted mutants of *Arabidopsis* were obtained from the Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/gabout.html>). A single insertion line in the last exon of the C-terminal coding region was available for *AtNek1* (SALK_065629) and two insertion lines in the catalytic coding sequence were available for *AtNek2* (SALK_012284 and SALK_062288). PCR was done to confirm homozygosity of the insertion as described by Alonso *et al.* (2003). RT-PCR was used to validate the absence of transcript accumulation. Total RNA from the mutants was extracted with the RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN), and cDNA synthesized with SuperScript II Reverse Transcriptase following the manufacturer's instructions (INVITROGEN). Primers targeted two different exons, avoiding DNA contamination. Primers used were: Left border Lbb1 (5'GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT); S_656-LP (5'CAAGTGTACAGATTACAAATGCAAA) and S_656-RP (5'ATCAGCTCGCCGGACTTCTCT); S_122-LP (5'TCTCTGGAAACGATGCCGTTC) and S_122-RP (5'AAGCCGGATTTTCTTCAAACA); S_622-LP (5'AAAGATTCTTGGGTTGAAAAGG) and S_622-RP (5'TGAGAAACTTGCCCTAGCGACCA).

2.6.3 Transcript expression analyses

Poplar *Nek* expression was quantified by RT-qPCR. Tissues and organs were collected from 15 poplar clone 717-1B4 trees (3 pools of 5 plants), grown under controlled greenhouse conditions (16 h/8 h day/night at 24°C/20°C). Total RNA was extracted as described by Chang *et al.* (1993) and treated on a column using the QIAGEN DNase Set. First strand cDNA was synthesized using Oligo(dt) and SuperScript II RT (INVITROGEN). Ten ng of cDNA in a 25 µl reaction volume was used for real-time

qPCR with the QuantiTect SYBR Green PCR Kit (QIAGEN) in the MX3000 model (STRATAGENE). Thermocycling was initiated with a 15-min incubation at 94°C, followed by 45 cycles (93°C for 10 s; 65°C for 120 s) with three fluorescent readings taken at the end of each cycle. Specificity of amplification and absence of primer dimers were confirmed by melting curve analysis at the end of each run. Specific primers targeted the 3'UTR of the *PtNeks* and amplified a 120-200 bp fragment (Table S3). The number of amplicon molecules was calculated based on sigmoidal curve-fitting (Rutledge, 2004). A derivative of this model allows the calculation of the efficiency based on linear regression analysis of the fluorescence readings generated by an individual amplification reaction (R.G. Rutledge, unpublished data). We find this technique both efficient and precise, enabling us to determine the amplification efficiency for each reaction individually, without the need for using a standard curve to estimate the efficiency each time. The validity and efficiency of our primer design were assayed on a series of cDNAs synthesized from different organs in the poplar hybrid *P. trichocarpa* x *P. deltoides* clone H11-11 (the organs harvested are described in Nicole *et al.*, 2006). Polyubiquitin control gene (*UBQ10*; DT476991) was chosen based on previous statistical validation of potential control genes done in poplar (Brunner *et al.*, 2004). In house validation on our broader collection of organs revealed that a more careful selection and primer design increased the amplification efficiency than those tested by Brunner *et al.* (2004).

The Gene Atlas and Digital Northern tools were used to mine wild type data corresponding to *AtNeks* organ specificity in GENEVESTIGATOR (Zimmermann *et al.*, 2004). Rice *Nek* expression data were retrieved from the Rice MPSS Database (Meyers *et al.*, 2004) and the RICEATLAS Project Website (<http://plantgenomics.biology.yale.edu/riceatlas>). As suggested, RICEATLAS data were retrieved after June 30, 2006, at which time the complete dataset underwent a significant normalization (Timothy Nelson, personal communication). These data constitute pre-publication elements that may be subject to revision. All the data were averaged and log₂ transformed before plotting the gradient contour charts (Table S3).

2.6.4 *PNek1* promoter::GUS fusion construct and plant transformation

The *uidA* reporter gene under the control of the *PNek1* promoter (*pNek1::GUS*) was constructed and used to transform *A. thaliana* ecotype Wassilewskija and poplar clone 717-1B4. The sequence upstream from the *PNek1* coding sequence was obtained by genome walking using the Universal GenomeWalker™ kit (CLONTECH). Genomic DNA was isolated from the young leaves of poplar clone 717-1B4 as described in Klimaszewska *et al.* (2001). Genome walking banks were prepared as described in the manufacturer's instructions. Two successive walks were conducted using the following primer combinations: kin3 (5'CTCGCAAGCCTGATCTTTTTCAACACA) and kin2 (5'GCAGAACCAAAAGAACCCTTCCCTATT), then kin4 (5'GTGAGAGAGAGGGAGACAAGAAAGTGG) and kin5 (5'AAGAAGGAGAAGCTGGGGTTGAAGAGG-3'). Amplified fragments were cloned using the TA cloning kit (INVITROGEN) and transformed into *E. coli* XL1-Blue by electroporation. Plasmid was isolated using the Qiaprep 8 mini plasmid kit (QIAGEN). Contiguous sequence assembly resulted in a consensus sequence 3.8 kb in length, 2.5 kb upstream from the transcription start site. Based on that sequence, primers kinbamh1 (5'CGGGATCCTTAGGAATACTTCATCTCATCACTGGTTG) and kinspe1comp (5'GACTAGTCTCTAATACTTCATACTGCTCCATCTGAG) (*Bam*H1 and *Spe*1 restriction site are underlined; ATG start codon is in bold) were used to PCR amplify directly from poplar clone 717-1B4 genomic DNA a 3.7 kb fragment in phase with the ATG less coding sequence of *uidA* reporter gene on the vector. The purified fragment was digested and directionally inserted into the binary vector pCambia1381Xc (CAMBIA, Australia). The plasmid was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58pMP90 (Koncz and Schell, 1986). This strain was used to transform both *Arabidopsis* (Ws) and poplar clone 717-1B4. *Arabidopsis* was transformed using the flower infiltration protocol (Clough and Bent, 1998). T1 transformants were selected on MS semisolid media supplemented with 50 mg.L⁻¹ hygromycin. T3 homozygote plants were subsequently obtained and used for histochemical analysis. Poplar clone 717-1B4 transformation was carried out by internode cocultivation with *Agrobacterium* (Leplé *et al.*, 1992). Explants were decontaminated with 300 mg.L⁻¹ cefotaxim and transferred onto M2 medium. Transgenic cells were selected on M3 medium supplemented with 10 mg.L⁻¹

hygromycin. Shoots were transferred for rooting in $\frac{1}{2}$ MS medium without hygromycin and supplemented with 1 mM [2-*N*-morpholino]ethanesulfonic acid. Hygromycin resistant shoots were screened according to positive β -glucuronidase tests and assayed for *uidA* transcript accumulation by RT-PCR. Transgenic plantlets were transferred into a mix of peatmoss, vermiculite and turface (ratio 4-2-1) and grown in a moist environment for 15 days before being transferred to the greenhouse with a photoperiod 16 h/8 h day/night at 24°C/20°C. Only single copy events were retained for histochemical analysis as determined by southern analysis (data not shown).

Putative regulatory elements on the promoter sequence, such as the auxin responsive elements (AuxRE), were identified using the Plant *cis*-acting regulatory DNA elements database – PLACE (Higo *et al.*, 1999) and *Arabidopsis thaliana cis*-regulatory database – AGRIS (Palaniswamy *et al.*, 2006).

2.6.5 *pNek1::GUS* histochemistry

Expression analysis of the *pNek1::GUS* fusion was done according to Jefferson *et al.* (1987), but included modifications described in Hemerly *et al.* (1993). Briefly, samples consisting of whole plants for *Arabidopsis* and organs or sections for poplar, were pre-treated in 90% cold acetone for 15 min on ice and rinsed in 100 mM sodium phosphate buffer pH 7. Incubation was performed in 1 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronic acid, with 2 mM potassium ferricyanide and 2 mM potassium ferrocyanide in 100 mM sodium phosphate buffer. The reaction was performed under vacuum (80 kPa) for 16 h at room temperature. Samples were dehydrated and cleared in 70% EtOH. Stem cross-sections of 50-100 μ m thickness were obtained with a vibratome. Quantitative GUS assays were performed as described by Côté and Rutledge (2003).

For auxin induction, *Arabidopsis* seeds were allowed to germinate and grow in $\frac{1}{2}$ MS liquid media in 24-well plates under a 16-h light /8-h dark cycle at 22°C for 12 days. 1 to 10 μ m of naphthalenacetic acid (NAA) was then added to the medium and seedlings were harvested at different intervals ranging from 30 min to 4 days. β -glucuronidase assays were performed as above. Tension wood formation was induced by bending

approximately 150 cm tall poplar trees at 45° and then allowing growth for 4 weeks under greenhouse conditions. Cross-sections of 5 to 10 mm long were harvested at different intervals along the stem and incubated in acetone for histochemical analysis as described above.

2.7 Acknowledgements

We thank Robert Rutledge (Canadian Forest Service) for his help on qPCR analysis. We thank Florian Lafarquette (Université Laval) for his help on tension wood formation. Rice microarray data were obtained from the RICEATLAS Project which is supported by the NSF Plant Genome Award (#DBI-0325821). FV was supported by the Fund for Nature and Technologies (NATEQ). AS was supported by the National Biotechnology Strategy of Canada and by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

2.8 Supplementary Material

The following supplementary material is available for this article online:

Table S1: Plant NIMA-related kinases (Neks) protein sequences.

Table S2: Exons-introns lengths and intron phase.

Table S3: Expression data presented in Figure 2.4. Also include primers used for qPCR.

This material is available as part of the online article from <http://www.blackwell-synergy.com>.

Chapitre 3 - Caractérisation de PNek1, une protéine kinase de type NIMA chez le peuplier et de son rôle potentiel au niveau de l'activité méristématique

Sans le savoir, le laboratoire du Dr. Armand Séguin était en compétition pour le premier article décrivant une protéine de type NIMA chez les plantes. Malheureusement, à quelques mois de la publication, son groupe s'est fait devancer par le groupe de Pnueli *et al.* (2001) qui démontraient eux aussi l'interaction entre une protéine de type 14-3-3 et l'homologue de PNek1 chez la tomate. Le Dr. Monikca Cloutier, qui travaillait sur ce projet pour sa thèse de doctorat, a donc décidé d'explorer les similitudes qui pourraient exister entre PNek1 et NIMA, en lien avec le cycle cellulaire. Ce moment constitue en quelque sorte mon entrée en scène dans le laboratoire du Dr. Séguin et le monde des Neks. J'ai réalisé l'analyse phylogénétique et l'analyse des motifs protéiques (Figure 3.1). Monikca a exécuté le double hybride (Figure 3.2). Denis Lachance s'est occupé de surexprimer une construction PNek1-GFP dans *Arabidopsis* (Figure 3.4 et 3.5). Monikca a aussi participé à la planification de l'expérience de synchronisation cellulaire. Toutefois, la synchronisation en temps que telle a été exécutée par Denis, alors que j'ai effectué l'analyse northern et l'ajout des marqueurs spécifiques au cycle cellulaire qui s'avèrent essentiels à l'acceptation de l'article (Figure 3.3A), en plus de réaliser la courbe de croissance et de mesurer l'expression dans les différents organes (Figure 3.3B). J'ai écrit l'article au complet en mettant l'accent sur le rôle biologique de PNek1, mais aussi en présentant une interprétation des résultats remettant en question le rôle de régulateur du cycle cellulaire de PNek1. Je tiens à mentionner que j'avais à ce moment, et encore aujourd'hui, de sérieux doutes sur le rôle 'régulateur' du cycle cellulaire que plusieurs groupes tentent à tout prix d'imposer aux Neks. Ce qui est vrai pour NIMA ou pour Nek2, ne l'est pas nécessairement pour toutes les autres Neks...

L'article fut été accepté et publié dans *FEBS Letters*, le 29 août 2005, volume 579(21), pages 4659 à 4665.

Characterization of a poplar NIMA-related kinase PNek1 and its potential role in meristematic activity

Monikca Cloutier, Frédéric Vigneault, Denis Lachance, Armand Séguin

Natural Resources Canada, Canadian Forest Service, Laurentian Forestry Centre, 1055 du P.E.P.S., P.O. Box 3800, Sainte-Foy, Québec, Canada, G1V 4C7

Abbreviations: CDK, cyclin-dependent kinases; Neks, NIMA-related kinase; SPAK, Self-Pruning associated kinase; SIP4, Self-Pruning interacting protein 4; PNek1, Poplar NIMA related kinase 1; WT, wild-type; NLS, nuclear localization sequence; LPI, leaf plastochron index; RBR, retinoblastoma-related protein.

3.1.1 Résumé

Les méristèmes sont le lieu de division des cellules végétales indifférenciées, qui évolueront éventuellement en organes fonctionnels. En utilisant la technique du double hybride avec une protéine 14-3-3 de peuplier comme partenaire d'interaction, nous avons isolé PNek1, une protéine hautement similaire aux Neks, lesquelles semblent impliquées dans la progression du cycle cellulaire chez les mammifères. En utilisant une suspension cellulaire synchronisée de peuplier, nous avons observé une accumulation de l'ARNm de PNek1 à la transition G₁/S et lors de la progression des phases G₂ à M. De plus, l'abondance de la protéine de fusion PNek1-GFP était maximale dans le noyau et le nucléole. La surexpression de PNek1-GFP dans *Arabidopsis* provoque des malformations au niveau des fleurs et des siliques. Ces résultats suggèrent que PNek1 joue un rôle dans le développement de la plante.

3.1.2 Abstract

Meristems are sites of undifferentiated cell division, which carry on developing into functional organs. Using the two-hybrid system with a poplar 14-3-3, we uncovered PNek1 as an interacting protein. PNek1 shows high homology to the mammalian Neks, which are thought to be involved in cell cycle progression. Using a synchronized poplar cell suspension, we observed an accumulation of PNek1 mRNA at the G₁/S transition and throughout the G₂-to-M progression. Moreover, PNek1-GFP fusion protein localized in the cytoplasm and in both the nuclear and nucleolar regions. Overexpression of PNek1-GFP in *Arabidopsis* caused morphological abnormalities in flower and siliques. Overall, these results suggest that PNek1 is involved in plant development.

3.2 Introduction

Plant development is essentially postembryonic, and meristems are well known regions of cell division and proliferation in plants. For example, leaf initiation is under the tight control of transcriptional regulators including *CLAVATA*, *WUSCHEL* and *KNOX* genes, which are thought to be modulated by hormones, such as auxins and cytokinins (De Veylder *et al.*, 2003; Kessler and Sinha, 2004). Further leaf development involves a series of coordinated cell division, differentiation and elongation (Beemster *et al.*, 2003). As in any other eukaryote, the plant cell cycle is driven by CDKs. Activation of CDK requires association with their regulatory units called cyclins. CDK/cyclin complexes are involved in the progression of the cell cycle at different levels. In plants, progression through the G₁ phase is regulated by the association between A-type and D-type cyclins (CycA and CycD) with A-type CDKs (CDKA), while CDKA and CDKB complex with either CycA or CycB to allow G₂/M transition and mitosis to proceed (De Veylder *et al.*, 2003).

In the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*, entrance into mitosis also requires the activation of NIMA. Lack of NIMA function causes cell cycle arrest in G₂ while overexpression of the *NIMA* gene results in the premature onset of mitosis with chromatin condensation and the formation of abnormal mitotic spindles (O'Connell *et al.*, 1994). Additional studies established a correlation between histone H3 phosphorylation by NIMA and chromosome condensation (De Souza *et al.*, 2000). To date, the *Neurospora crassa*

NIM-1 is the only functional NIMA homologue identified (Pu *et al.*, 1995), but ectopic expression of NIMA in fission yeast, *Xenopus laevis* and human cells also leads to chromatin condensation (O'Connell *et al.*, 1994). At least eleven mammalian Neks have been described (O'Connell *et al.*, 2003). Among these, Nek2, which possesses the highest sequence identity to the fungal NIMA, is involved in the centrosome cycle through phosphorylation of c-Nap1 during the cell cycle (Faragher and Fry, 2003).

To date, the *Antirrhinum majus* AmnimA and the tomato SPAK are the only Neks described in plants. *AmnimA* was recovered as a partial 500 bp fragment in the catalytic kinase domain (Zhang *et al.*, 1996). SPAK was shown to interact with SP, a 23-kDa protein involved in shoot architecture and flowering regulation (Pnueli *et al.*, 2001). SPAK was also found to interact with 14-3-3 isoforms and SIP4 a novel 10 kDa protein. 14-3-3 proteins are highly conserved acidic proteins involved in many cellular processes through protein-protein interactions (Fu *et al.*, 2000). Most of these interactions involve the presence of phosphorylated residues according to a particular motif on the 14-3-3 ligand (Lowery *et al.*, 2007). The need for 14-3-3 during the cell cycle was demonstrated in *Schizosaccharomyces pombe* when Rad24 and Rad25 were shown to be involved in the G₂ checkpoint (Ford *et al.*, 1994). In mammalian cells, 14-3-3s play a role in cell cycle regulation through interaction with several proteins including cdc25 phosphatase (Polci *et al.*, 2004), the transcription factor p53 (Hermeking *et al.*, 1997), the Wee1 kinase (Wang *et al.*, 2000) and cyclin-dependent kinases (Laronga *et al.*, 2000).

In this study, we report on the isolation of another plant NIMA-related kinase PNek1 and its interaction with a poplar 14-3-3. We also show that Neks represent a conserved gene family in plants. We found that *PNek1* transcript accumulates at the G₁/S transition and during G₂-to-M progression. Ectopic expression of PNek1 in *Arabidopsis thaliana* resulted in abnormal flower development. These results suggest that PNek1 is involved cell proliferation and plant development.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Plant materials

The two-hybrid cDNA library was prepared from leaves of *Populus tremula* x *alba* clone (INRA 717 1-B4). Cell cycle synchronization was performed on a poplar cell suspension of *Populus trichocarpa* x *deltoides* (clone H11-11) (de Sá *et al.*, 1992). The *Arabidopsis thaliana* ecotype Wassilewskija (Ws) was used for the overexpression of the GFP transformants.

3.3.2 Two-hybrid library construction and screening

Leaves from poplar were subjected to wounding and the following chemical treatments: salicylic acid, chitosan, jasmonic acid, and fusicoccin. Total RNA was extracted (Chang *et al.*, 1993) from a mixture of these induced leaves from which mRNA was isolated using the Polytract IV system (Promega). Five micrograms of mRNA was used for cDNA synthesis. A GAL4 activation domain fusion cDNA library was then generated using the Hybrizap 2.1 Kit (Stratagene). The coding region of *14-3-3P20-5* was inserted in-frame into the pBD-Gal4 vector (Stratagene), and the two-hybrid screening was performed as described by the manufacturer using the yeast strain Y190 (BD Biosciences).

3.3.3 cDNA cloning, plasmid construction and mutagenesis

Cloning techniques were performed according to standard protocols (Maniatis *et al.*, 1989). The complete cDNA encoding poplar *PNek1* was obtained by 5'RACE with the SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). The 2419 pb complete *PNek1* cDNA was cloned into pCR2.1 using the TA cloning kit (Invitrogen). A 1.9 kb PCR amplicon obtained with primers 9kin2ATG (5'-GCATCCTGTCGACTCGAGATGGAGCAGTATGAAGTA) and 9kinstop (5'-GCGTCGACCTAACAAATCTTCCGTTTTGGC) was *SalI* digested and subcloned into the pBD-Gal4 vector to generate pNek-BD. The different pNek-BD deletants were obtained by subcloning the following restriction digest fragments into pBD-GA14: a 1042 pb *EcoRI/XhoI*, a 230 pb *EcoRI*, and a 430 pb *NdeI* fragment from pPNek-AD (the original

clone recovered from the two-hybrid screening) were used to generate PNekBD Δ 383-621, PNekBD Δ 383-457 and PNekBD Δ 462-606 respectively. The PNekBD Δ 1-263 deletant was obtained by subcloning a 0.4 kb PCR amplicon generated with primers 9kin2ATG and 9catstop (5'-GCGTCGACCTAAAGGACATAAGGCTGAAGA) into the pBD-Gal4. Mutagenesis was performed using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Stratagene). The following mutagenized primers (mutagenized nucleotides are underlined) were used for obtaining the different mutants of plasmid pNek-BD: (GAAGTATGTGTTGAGGAAAGATCAGGCTTGCGAGGC) for the catalytically inactive PNekBD Δ K33R, and (AGCCCTAGACAGAATGCATTACCTTTCCAATG), (CACTACTAGGAGACGGGCAGAGCCTGTAAAAAAC), and (CAACAACCTCGCAGAACAGGCTTTGCCATTGCCATC) for the three 14-3-3 motif mutants PNekBD Δ T276A, PNekBD Δ T389A and PNekBD Δ S416A respectively.

3.3.4 Computational analysis of PNek1

WWWPESTfind (<http://www.at.embnet.org/embnet/tools/bio/PESTfind/>) and Coils Server (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html) programs were used to predict these specific secondary motifs of the Neks. Scansite (<http://scansite.mit.edu/>) was used to find the putative 14-3-3 binding domains. The catalytic domain, nuclear localization sequence and gamma-carboxyglutamic acid-rich (GLA) domain were predicted by PROSITE (<http://ca.expasy.org/tools/scanprosite/>), PFAM (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/search.shtml>) and PlantsP (http://plantsp.sdsc.edu/plantsp/html/feature_scan.html) respectively. Sequence alignments were performed using ClustalW (v1.8), and phylogenetic analyses were carried out with the PHYLIP package (v3.6).

3.3.5 Cell cycle synchronization and northern analysis

Synchronization of poplar cell suspension H11-11 with aphidicolin was performed as previously described (Menges and Murray, 2002). Early stationary phase cells (day 7) were incubated with aphidicolin (4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) for 21 h and were then extensively washed. Aliquots of the synchronized cells were taken during a period of 26 h. Northern analyses

were performed using 10 µg of total RNA. Probing was carried out using a 437 bp fragment from the PNek1 carboxy-terminal region corresponding to amino acids 270 to 415; a 180 bp fragment for histone H4 and a 441 bp fragment for cyclin B1 from a poplar EST database; and a 193 bp fragment from the 3' untranslated region of *14-3-3P20-5* cDNA. To determine the M/A index, cells were DAPI-stained and the proportions in metaphase and anaphase determined under a fluorescence microscope.

3.3.6 Arabidopsis thaliana transformation and overexpression of GFP fusions

Agrobacterium tumefaciens strain C58pMP90 (Koncz and Schell, 1986) carrying the GFP fusion binary vectors pEGAD and the 35S promoter (Cutler *et al.*, 2000) was used to transform *Arabidopsis* (Ws) at the floral stage using the Silwet protocol (Clough and Bent, 1998). Seeds of these plants were surface-sterilized and grown *in vitro* (Estelle and Somerville, 1987). Selection of transformed plants was performed on 10 µg mL⁻¹ ammonium glufosinate (Basta). *Arabidopsis* root hairs were observed by Confocal Laser Scanning Microscopy using a Zeiss LSM310 instrument.

3.4 Results

3.4.1 PNek1 is part of a NIMA family in plant

A total of 3×10^6 transformants from a poplar two-hybrid library were screened using 14-3-3P20-5 (AF121195) as bait. We recovered a 5' truncated cDNA encoding 239 amino acids showing homology to the Nek family. The complete cDNA encoding *PNek1* (AF469649) was subsequently obtained by 5'RACE. The *PNek1* cDNA is 2419 pb long and encodes a predicted protein of 621 amino acids with a molecular weight of 69.7 kDa and an isoelectric point of 9.5. The predicted protein contains a kinase catalytic domain (amino acids 1-263) with conserved sub-domains typical of serine/threonine protein kinases related to the NIMA family (Schultz *et al.*, 1994) and a long c-terminal tail (amino acids 264-621).

Our *Arabidopsis* genome-wide search has uncovered seven putative ORFs showing homology to the Nek family. Phylogenetic analysis of the catalytic domains of the Neks indicates that PNek1, SPAK and all the putative proteins from *Arabidopsis* cluster within a subgroup that includes the human isoforms Nek4 and Nek11 (Fig. 3.1A). In the present study, we decided to name the *Arabidopsis* NIMA-related kinases AtNek1 to AtNek7 based on their sequence homology with PNek1. The catalytic domain of PNek1 is closely related to the putative AtNek1 and to the tomato SPAK proteins (90% identity), and shows 45% identity with human Nek4. Secondary motif prediction of PNek1 indicates a potential bipartite nuclear localization sequence, a PEST degradation motif, a coiled-coil domain, and three putative 14-3-3 binding motifs. These motifs are typical of the long C-terminal extension of the Neks (O'Connell *et al.*, 2003). Here we show that these motifs are conserved within the plant Neks (Fig. 3.1B). Interestingly, AtNek5 and AtNek7 constitute a subgroup distinct from the other plant sequences, presenting two potential coiled-coil domains in their C-terminal regions and a GLA domain, which is a calcium-dependent membrane-binding motif (Price *et al.*, 1987). These data suggest that, as in mammalian cells, plant Neks also constitute a closely related gene family.

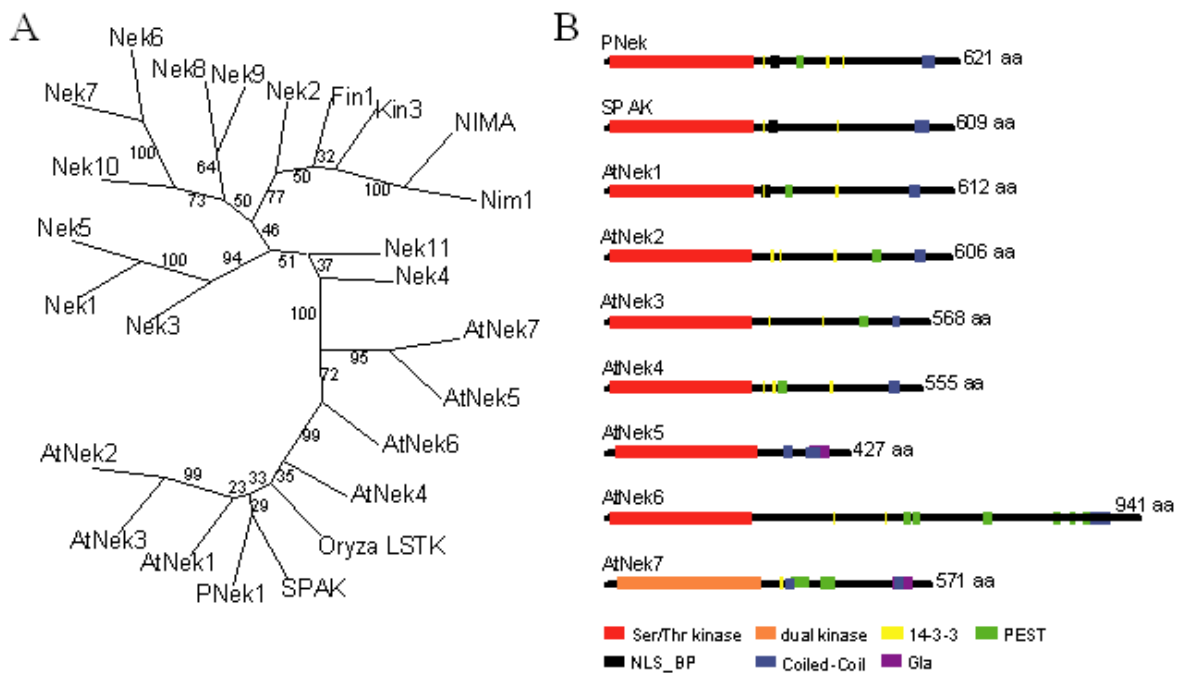


Figure 3.1. PNek1 structural features. **A:** Phylogenetic tree of the NIMA kinase family. The tree was generated from amino-acid sequences of aligned N-terminal catalytic domain by neighbor-joining distance. Line lengths indicate the relative distances between nodes. Bootstrap values of 100 replications are shown for all branches. **B:** Schematic representation of analysed plant Neks with their respective predicted secondary motifs. Accession numbers are: *A. nidulans* NIMA (P11837); *N. crassa* Nim1 (P48479); *S. pombe* Fin1 (O13839); *S. cerevisiae* Kin3 (NP_009410); *A. thaliana* AtNek1 (NP_175853), AtNek2 (NP_187132), AtNek3 (NP_198181), AtNek4 (NP_191887), AtNek5 (NP_188722), AtNek6 (NP_190006), AtNek7 (NP_187827); *L. esculentum* SPAK (AAL04423); *P. canescens* PNek1 (AF469649); *H. sapiens* sequences can be retrieved from www.kinase.com.

3.4.2 The presence of the PNek1 serine 416 and its homodimerization domain are necessary to trigger the 14-3-3 interaction

In order to verify if the putative 14-3-3 motifs present in the deduced PNek1 were required for the 14-3-3/PNek1 interaction, we replaced each of the three possible phosphorylated residues within those motifs with an alanine residue (Fig. 3.2A). Two-hybrid analysis using these PNek1 mutants revealed that mutating serine 416 completely abolished the interaction with the 14-3-3, whereas mutating threonine 276 and threonine 389 had no effect. Of the seven putative AtNeks, five contain a potential 14-3-3 binding site near PNek1 threonine 276 and four display a similar motif near PNek1 serine 416 (Fig. 3.2B). We also generated a catalytic inactive kinase by replacing the conserved lysine residue implicated in the ATP binding loop with an arginine. This catalytic inactive kinase displays a weaker 14-3-3 interaction, suggesting the need for PNek1 kinase activity in order to achieve proper interaction. PNek1 was found to homodimerize in yeast cells and among all PNek1 mutants, only mutation to the threonine 389 weakened the homodimerization of PNek1. To further characterize the PNek1 protein domains involved in 14-3-3 interaction and for its homodimerization, we analyzed truncated mutants (Fig. 3.2A). Those results indicate that the homodimerization domain of PNek1 lies between residues 463 to 606

which include the putative coiled-coil domain. In addition to serine 416, this homodimerization domain seems to be necessary for 14-3-3/PNek1 interaction.

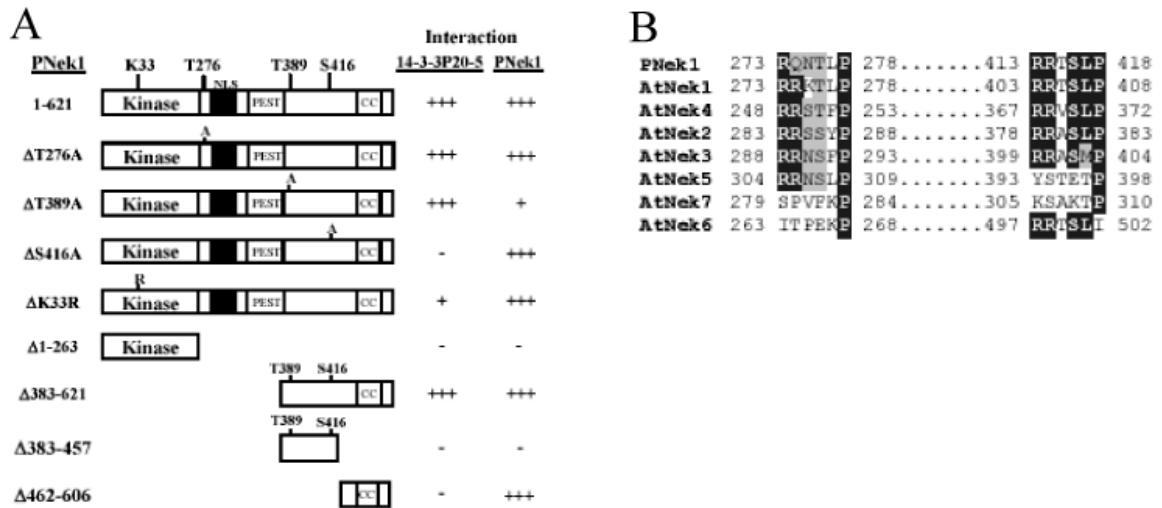


Figure 3.2. Analysis of the 14-3-3 interaction domain involved in PNek1 interaction.

A: Mapping of the 14-3-3 binding sites and homodimerization domain in PNek1. Schematic diagram showing association of either PNek1 or 14-3-3P20-5 with the indicated single point mutants (A, alanine; K, lysine; R, arginine; S, serine; T, threonine) and truncations of PNek1 in the yeast two-hybrid system. Legend: +++, strong interaction; +, weak interaction; -, undetectable interaction; NLS, Nuclear localization signal; PEST, PEST degradation motifs; CC, Coiled-coil domains. **B:** Pairwise alignment of the potential 14-3-3 binding motifs from the putative AtNeks. Amino acid number is indicated for both 14-3-3 potential motifs.

3.4.3 Expression of PNek1 mRNA is cell cycle regulated

In order to characterize the expression pattern of PNek1, a poplar cell suspension was synchronized using aphidicolin, which arrests the cell cycle in early S phase (Reichheld et al., 1998). Work with *Arabidopsis* MM2d cell suspension had shown a high degree of synchronization from late G₁/early S phases through the entrance in another S phase, 17 h after blocking was released (Menges and Murray, 2002). Progression of poplar cells

through the cell cycle was slower than that of *Arabidopsis* MM2d cells, as determined by DAPI staining (Fig. 3.3A). *PNek1* transcript accumulates in cells blocked with aphidicolin in early S phase (at time 0). Afterwards, *PNek1* mRNA rapidly decreases to no detectable level 2 h after being released from the block. *PNek1* transcript remains undetectable until 6 h post-aphidicolin in late S phase and then quickly reaches maximal levels of expression between 14 h and 22 h, which correspond to the G₂-to-M phases. As control for the experiment, the S phase marker gene histone *H4* was found to accumulate during the block and for 2 h following the release from the aphidicolin block and then to rapidly decrease. In comparison, the B-type cyclin, *CycB1* was used as a control to determine the G₂/M phase, which occurred between 18h and 22h. Expression of *14-3-3P20-5* transcripts does not fluctuate during the progression of the cell cycle. These data suggest that *PNek1* could be involved during the progression through the G₁/S and G₂/M, but is not required during S phase.

PNek1 expression levels are relatively high in meristematic tissues, as observed with the accumulation of transcripts in apical meristems, buds and cambium (Fig. 3.3B). Interestingly, both cell cycle marker genes, *H4* and *CycB1*, show a pattern similar to *PNek1*. Moreover, we observed a decrease in the level of expression from a young leaf to a mature leaf. These data are consistent with a role in cell proliferation.

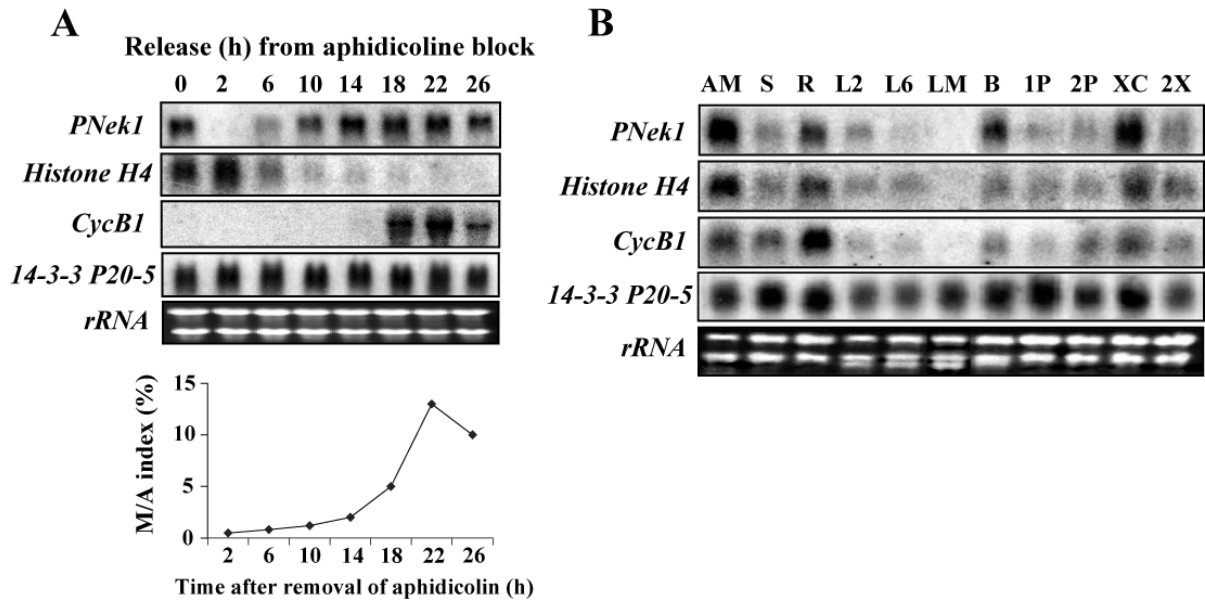


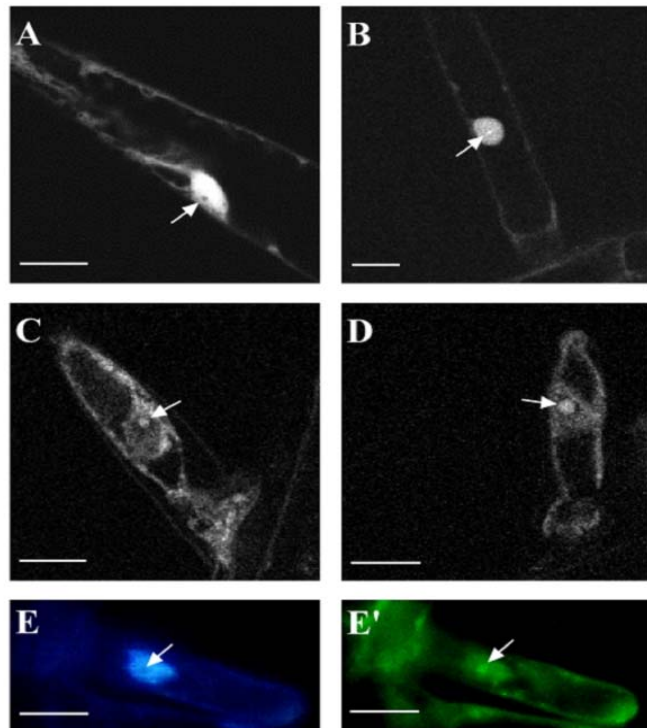
Figure 3.3. Expression analysis of PNek1 transcripts in poplar cell suspension. **A:** Northern analysis of poplar suspension cells synchronized in early S phase. Total RNA was prepared at the indicated time after release from early S arrest (from 0 to 26 h). The histone *H4* and B-type cyclin (*CycB1*) were used as a positive control for cell cycle synchronization. The mitotic index (lower panel) was determined by microscopic observation of DAPI-stained cells. **B:** Analysis of the expression of *PNek1* and *14-3-3P20-5* in poplar tissues: apical meristem, AM; stem, S; roots, R; young leaf (LPI-2), L2; developing leaf (LPI-6) leaf, L6; mature leaf, LM; buds, B; primary phloem, 1P; secondary phloem, 2P; xylem cambium-enriched, XC; secondary xylem, 2X. Total RNA loading is illustrated by ethidium-bromide staining of rRNA in the bottom of each panel.

3.4.4 PNek1 is located in the cytoplasm and the nucleolar region

To investigate the subcellular localization of PNek1, the entire PNek1 coding sequence (GFP-PNek1), the N-terminal catalytic domain (GFP- Δ 263-N; amino acids 1-263), the C-terminal tail (GFP- Δ 264-C; amino acids 264-621) and the control pEGAD vector (GFP alone) were transformed into *Arabidopsis* to generate four different 35S::GFP-transgenic lines. Confocal laser scanning microscopy of single cell root hairs revealed that

GFP- Δ 263-N accumulate predominantly in the nucleus, including the nucleolar region (Fig. 3.4B), while the GFP control was present in the nucleus but excluded from the nucleolus (Fig. 3.4A). GFP-PNek1 and GFP- Δ 264-C showed similar cellular localization with GFP signals being observed in the nuclear and the nucleolar region, as well as in the cytoplasm (Fig. 3.4C and 3.4D). These results indicate that the PNek1 C-terminal tail contains the signal required for its proper cellular targeting.

Figure 3.4. Confocal laser scanning microscopies of *Arabidopsis* root hairs show that GFP-PNek1 cellular localization is mediated through signals found in its C-terminal tail. A: GFP control. B: GFP- Δ 263-N. C: GFP-PNek1. D: GFP- Δ 264-C. E: Confirmation of localization in the nuclear region of GFP-PNek1 was done using DAPI staining (E'). Arrow indicates the nucleolus. Bar = 10 μ m.



3.4.5 Overexpression of PNek1 causes several morphological abnormalities

Among the 50 independent 35S::GFP-PNek1 *Arabidopsis* lines examined, more than half displayed significant morphological anomalies mostly affecting the floral organs. Many transformants displayed flowers with shorter stamen filaments (Fig. 3.5B). Others exhibited atrophied or absent petals, small green cylindrical structures reminiscent of the stamen, and a shorter carpel as well as completely disorganized inflorescence branches

(Fig. 3.5C, 3.5D and 3.5E). Additional phenotypes included many lines that displayed sterile siliques or carried only a few seeds (Fig. 3.5F). These siliques were smaller when compared with the wild type (Fig. 3.5G). Furthermore, many under-developed ovules were observed among the few normal developing seeds, indicating sporadic failure in ovule development or insufficient pollen for fertilization. Plants were also observed with smaller rosette leaves and displaying a rapid emergence of secondary meristems at the axes of the cauline branches, leading to plants with increased branching (Fig. 3.5H, 3.5I). Together, these phenotypes demonstrate that ectopic expression of PNek1 affects organ development and possibly meristem activity.

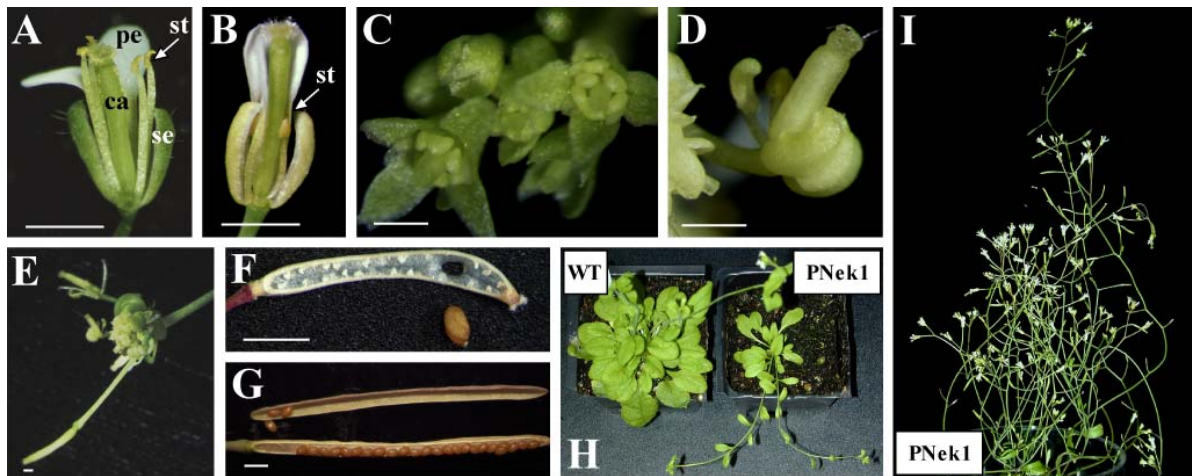


Figure 3.5. Phenotypic analysis of GFP-PNek1 overexpression in Arabidopsis. **A:** WT flower containing sepals (se), petals (pe), stamens (st) and a central gynoecium with fused carpels (ca). **B:** Flowers showing shorter stamens. In **A** and **B**, some of the sepals and petals were removed to reveal the inner organs. **C, D** and **E:** Smaller stamens and practically nonexistent petals and a completely disorganized flower. **F** and **G:** GFP-PNek1 lines had smaller siliques and poor seed production (**F**, 3 X magnification) as compared with the ~50 seeds contained in a WT silique (**G**, 1X magnification). **H** and **I:** GFP-PNek1 lines exhibit smaller rosette leaves and accentuated ramifications of the floral stems. Bar = 1 mm.

3.5 Discussion

14-3-3 proteins are known to be involved in many protein-protein interactions, which link them to a wide range of cellular processes. We presented here the interaction between 14-3-3P20-5 and PNek1 in poplar. Mapping of the 14-3-3/PNek1 interaction has revealed that serine 416 along with the dimerization domain comprising a coiled-coil motif, are essential for that interaction. Although the first NIMA kinase was found in the fungus *Aspergillus nidulans* and further described in other eukaryotic organisms (O'Connell et al., 2003), none of those studies have shown an interaction with a 14-3-3. Indeed, the poplar PNek1 and the tomato SPAK are the only two Neks yet shown to interact with 14-3-3 isoforms. In silico analyses predict that mammalian Nek1, Nek3, Nek4, Nek9, Nek10 and *Neurospora* Nim1 have potential 14-3-3 interaction motifs, all located in their c-terminal region (data not shown). The binding of 14-3-3 to plant Neks certainly does appear to be a common mechanism as we have found a typical 14-3-3 binding motif around serine 416 on four (AtNek1, AtNek2, AtNek3, and AtNek4) of the seven putative AtNeks. However, it remains to be seen whether the association between 14-3-3 and Neks may be generalized across the plant kingdom. In addition, all putative plant Neks were found to cluster with only two (Nek4 and Nek11) of the eleven characterized members of the mammalian NIMA kinase family. During mitosis, the fungal NIMA is localized to the spindle microtubules and to the spindle pole bodies (De Souza et al., 2000), and both the human Nek2 and the *Dictyostelium* DdNek2 are found associated with the centrosome (Fry et al., 1998; Graf, 2002). Higher plants do not have this typical centrosome structure. This raises the question of whether or not Nek2-related kinases are present in plants and whether they fulfill similar roles but through different substructures.

Using aphidicolin to cell cycle synchronize a poplar cell suspension, we were able to correlate PNek1 mRNA levels with the G₁/S transition and with the progression through the G₂-to-M phases. Similar results have also been observed in mitotic cells with different Neks including NIMA (Osmani et al., 1987; Schultz et al., 1994; Noguchi et al., 2002). Checkpoint association seems to be widespread in this family. Indeed, Nek6 and Nek9 have also been shown to be associated with the G₂/M transition (Roig et al., 2002; Yin et al., 2003) and Nek11 has been proposed to have a role in the G₁/S checkpoint (Noguchi et al.,

2002). However, the question is open whether *PNek1* is rather downregulated in S phase. Several Neks and NIMA itself have been shown to phosphorylate histones and regulate chromatin condensation (De Souza et al., 2000; Hashimoto et al., 2002). Furthermore, Neks are involved in centrosomal structures formation, which are typically duplicated in S phase (Faragher and Fry, 2003; Yin et al., 2003). Since plants use scattered dynamic microtubule-nucleating foci rather than well-defined centrosomes (Chan et al., 2003), *PNek1* is an interesting candidate who might be involved in such microtubule regulation during cell proliferation.

We observed that *PNek1* is expressed in actively proliferating tissues, such as the meristems, developing leaves and cambium. Moreover, this is similar to the expression pattern observed with cell cycle regulator gene histone *H4* and *CycB1* genes (this study and (Brandstadter et al., 1994; Wang et al., 2004)). This is in accordance with in situ hybridization results with *AmNimA* and *SPAK* where expression was observed in the actively proliferating regions of apical and floral meristems (Zhang et al., 1996; Pnueli et al., 2001). Moreover, flowers and siliques were the most visibly affected organs from our *PNek1* overexpression. Severely affected lines were considered sterile. This result indicates that reproductive organ development is sensitive to an ectopic expression of *PNek1* and suggests a role in the regulation of organ development. Overexpression of other cell cycle-related proteins has also been shown to affect the morphology of floral organs, including the ectopic expression of *ICK1*, a CDK inhibitor in *Arabidopsis*, which showed drastic growth and cell division inhibition (Wang et al., 2000). As well, both the antisense expression of the tomato *SPAK* and the ectopic expression of its C-terminal extension resulted in the formation of pear-shaped fruits (Pnueli et al., 2001).

Despite the fact that nuclear and cytoplasmic localizations have been published for several other Neks, nucleolar targeting seems to be restricted to our results. Although GFP- $\Delta 263$ -N does not have a predicted NLS, it exhibited a strictly nuclear localization including the nucleolar region. This implies that a region in the catalytic domain triggers nuclear localization. Two recent studies have shown that, even though *CDK2*, *ERK1* and *ERK2* do not possess any NLS, they are translocated to the nucleus via an association between their

catalytic domains and a protein with a NLS (Liu *et al.*, 2004; Osawa *et al.*, 2004). Furthermore, several cell cycle regulators whose activities are regulated by sequestration in the nucleolus have been identified (Cockell and Gasser, 1999; Visintin and Amon, 2000).

Although, no specific nucleolar targeting consensus sequence has been identified, a basic amino stretch rich in arginine and lysine seems to be required (Créancier *et al.*, 1993). Recent proteomic studies tend to demonstrate that the nucleolus forms through protein-protein and protein-RNA interaction rather than having a nucleolar localization sequence (Parry *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2005). Both GFP-PNek1 and GFP- Δ 264-C displayed similar subcellular localization, being found in the cytoplasm and in both the nuclear and nucleolar regions. This indicates that the targeting signals of PNek1 are found in its C-terminal extension. A 14-3-3 protein has been shown to be involved in the cytoplasmic sequestration of phosphatase Cdc25, which is required to activate the nuclear Cdc2 kinase and allow entry into mitosis (Kumagai and Dunphy, 1999). In addition, it has been shown that 14-3-3s can actually enter the nucleus to interact with their target and allow their nuclear export (Brunet *et al.*, 2002). It is possible that such a sequestration mechanism regulates PNek1 localization and activity. Moreover, among the three different GFP fusions studied, the GFP-PNek1 lines were the only ones to display morphological abnormalities in *Arabidopsis*.

Overall, our work strongly suggests that PNek1 is involved in cell proliferation and organ development. We demonstrate for the first time that *PNek1* expression is cell cycle-regulated. Moreover, the subcellular localization of PNek1 is consistent with nuclear functions. In addition, overexpression of PNek1 altered the morphology of floral organs and branching patterns, possibly as a result of an effect on cell division. In tomato, the SPAK signaling network is suggested to involve associations with many proteins including SP, 14-3-3 and SIP4. The interaction between SPAK and SP from tomato is also possible with the SP orthologs TFL1 (*Arabidopsis*) and CEN (*Antirrhinum*) (Pnueli *et al.*, 2001). These associations could very well be conserved in the plant kingdom. At this time however, the exact nature and role of the signaling pathway involving plant Neks remains

to be defined. PNek1 is part of a newly emerging family of NIMA-related kinase in plants, and it will be interesting to understand their association with plant development.

3.6 Acknowledgements

We would like to thank Robert Rutledge, John Mackay and Brian Boyle for their critical reading of this manuscript. We thank Richard Sibout for his help with the *Arabidopsis* work, Danny Rioux and Marie Simard for general advice on microscopy, and Pamela Cheers for editorial assistance. This research was supported by a grant from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) and the National Biotechnology Strategy of Canada to A.S., NSERC Scholarship and FCAR-MEQ to M.C., and NATEQ-BMP to F.V.

Chapitre 4 - Un rôle pour PNek1 dans la signalisation cellulaire et la maturation de l'ARN?

Cet ambitieux projet de caractérisation de PNek1 laisse beaucoup de questions en suspend et tout autant d'hypothèses à tester. Ce chapitre présente des résultats complémentaires qui n'ont pas encore fait l'objet d'une publication scientifique. Malgré tout, ces informations sont très intéressantes et présentent une base sérieuse pour la continuité du projet et l'orientation que j'ai souhaité lui donner pendant les derniers mois de mon doctorat. En fait, il m'apparaît essentiel de revenir à un niveau biologique plus élémentaire, soit la cellule, afin d'identifier le rôle de signalisation de PNek1. En continuité avec les analyses d'expression présentées au Chapitre 3, je présente donc certaines données sur l'expression de PNek1 lors de stress génotoxiques qui affectent le bon déroulement du cycle cellulaire. J'ai tenté, sans succès, de corroborer ces interactions en utilisant une technique différente. Je me suis aussi intéressé à la protéine en tant que telle. Je présente, entre autres, les résultats de l'interaction entre PNek1 et une protéine directement impliquée dans la maturation de l'ARN. Beaucoup de travail reste à faire sur ces interactions. En guise de conclusion, je présente donc une orientation future possible, celle que j'ai développée lors des derniers mois de mon séjour dans le labo.

Il est important de souligner la contribution additionnelle du Dr. Monikca Cloutier, de Louis-Philippe Hamel et de Marie-Josée Morency à la conception de banques d'ADNc utilisées pour les essais en double hybride.

4.1 Résumé

Nous avons déterminé précédemment que l'expression du transcrit *PNek1* correspondait au patron du développement vasculaire de la plante et aussi à celui de la synthèse de l'auxine sans pour autant pouvoir établir un lien direct avec celle-ci (Chapitre 2). De plus, nous avons observé que l'expression est régulée en fonction du cycle cellulaire, particulièrement lors de la phase G₂ avant la mitose (Chapitre 3). Encore une fois, nous n'avons pu démontrer un lien direct avec la régulation du cycle cellulaire. L'objectif de base de ce quatrième volet était donc de préciser le rôle de PNek1 au niveau cellulaire. Ces résultats laissent croire que PNek1 aurait en effet un rôle dans la signalisation cellulaire. *PNek1* est fortement induit au point de contrôle en G₁/S par l'application d'agents génotoxiques. De plus, les résultats d'essais en double hybride dans la levure démontrent une interaction entre PNek1 et DBR1, une enzyme impliquée dans l'épissage de l'ARNm. Bien que non-essentielle, cette enzyme est connue pour avoir un impact en particulier sur le développement cellulaire.

4.2 Introduction

L'étude du rôle des Neks chez les plantes a débuté en toute logique par une approche similaire à l'étude des Neks chez les humains, c'est-à-dire en testant l'hypothèse que PNek1 est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, tout comme NIMA et Nek2. En effet, nous avons pu observer au Chapitre 3 que le profil d'expression transcriptionnel lors du cycle cellulaire semblait typique à celui de NIMA et de Nek2. Toutefois, à lui seul cet aspect ne représente pas une preuve de l'implication réelle de PNek1 comme régulateur du cycle cellulaire. Au contraire, l'analyse de l'expression de PNek1 au niveau d'un plant complet laisse plutôt présager son implication lors de l'initiation du développement du système vasculaire (Vigneault *et al.*, 2007). Cette hypothèse expliquerait bien le patron d'expression présenté au Chapitre 2 et aussi les phénotypes liés aux aberrations florales présentées au Chapitre 3.

Il y a cependant une piste importante que je n'ai pas développée jusqu'au bout : la possibilité que PNek1 soit impliquée dans la réponse aux stress génotoxiques. Tel que

décrit au Chapitre 1, le cycle cellulaire est un processus finement orchestré, entre autre par des protéines kinases. Le bon déroulement et la stabilité de la division dépendent en outre d'une réponse adéquate face à différents facteurs, tel que les dommages à l'ADN. Des points de contrôles en G_1/S et en G_2/M vont notamment retarder la progression du cycle cellulaire en réponse à différents stress génotoxiques. Tel qu'observé au Chapitre 3, en lien avec la synchronisation cellulaire, il est intéressant de constater l'accumulation de transcrits au moment du blocage à l'aphidicoline, soit au tout début de la phase S du cycle cellulaire (Figure 3.3A). L'aphidicoline est un inhibiteur spécifique de l'ADN polymérase A, empêchant ainsi la réplication de l'ADN en phase S. Nous savons que NIMA joue un rôle central dans l'entrée en mitose chez *A. nidulans*. Il est donc intéressant d'observer que son expression n'est pas affectée suite à l'induction de dommage à l'ADN en G_2/M tel qu'on aurait pu croire, mais qu'elle est négativement régulée lors de l'induction du point de contrôle en phase S par un agent génotoxique, empêchant ainsi une progression erronée vers la mitose (Ye *et al.*, 1996; Ye *et al.*, 1997).

En plus des dommages à l'ADN, il est connu que la synthèse de l'ARN joue aussi un rôle dans l'activation des points de contrôles en G_1 et en S. L'indice le plus intéressant est sans doute que bien que l'aphidicoline induise un arrêt au point de contrôle en G_1/S suite à l'inhibition de la synthèse d'ADN par la Polymérase A, la suppression de cette ADN polymérase en tant que telle, n'induit pas ce point contrôle (Michael *et al.*, 2000). Lors de la réplication d'ADN, les topoisomérases et les hélicases interviennent tout d'abord pour dérouler la chromatine et diviser les brins d'ADN, puis la polymérase synthétise l'ADN dans le sens 5'-3'. Le brin complémentaire retardé, formé de fragments d'Okazaki, sera réassemblé, habituellement avec l'aide d'amorce d'ARN (Figure 4.1). L'ADN Polymérase A utilise des amorces d'ARN synthétisées par une ARN Primase. Michael *et al.* (2000) ont démontré, à l'aide d'anticorps et de mutants spécifiques à différents facteurs intervenant dans la réplication de l'ADN, que la synthèse de ces amorces d'ARN était le signal activateur de ce point de contrôle.

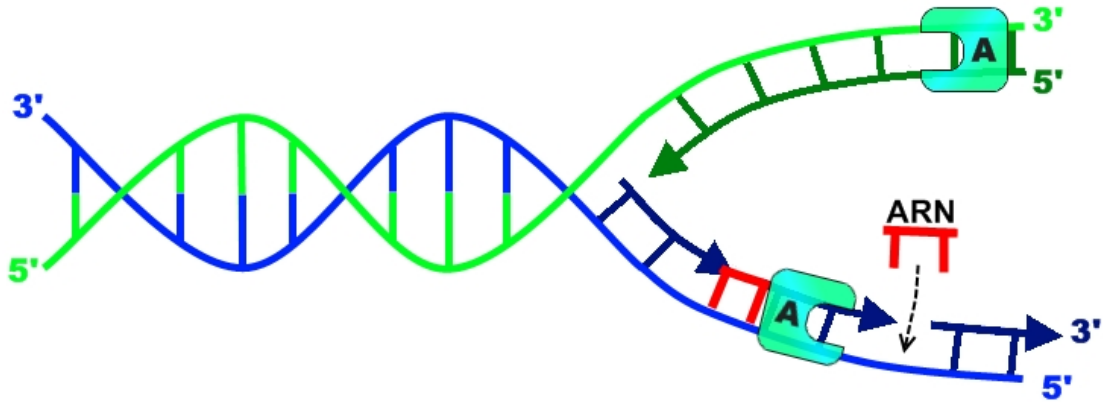


Figure 4.1. La réplication de l'ADN par la polymérase A nécessite des amorces d'ARN pour compléter le brin retardé. Des topoisomérases et des hélicases sont respectivement responsable de dérouler et de séparer les brins d'ADN (non représentées) ce qui les rend accessibles à l'ADN polymérase A. Celle-ci synthétise l'ADN seulement dans le sens 5' → 3'. Le brin direct (**vert**) va être répliqué de façon continue (**vert foncé**), alors que le brin indirect (**bleu**) est créé de façon discontinue, sous forme de fragments d'Okazaki (**bleu foncé**). Une ARN primase (non représentée) va créer des amorces d'ARN (**rouge**) permettant à l'ADN polymérase A de commencer la réplication.

Plusieurs gènes semblant jouer un rôle à la fois au niveau de l'épissage de l'ARN et au niveau du contrôle du cycle cellulaire ont été identifiés chez la levure (Russell *et al.*, 2000). Ce groupe formerait un complexe protéique nommé CSC pour *Cell cycle and Splicing Complex* (Dahan and Kupiec, 2002). L'épissage de l'ARN est une étape essentielle de la maturation et de la régulation de l'expression transcriptionnelle. De leur côté, les membres du CSC auraient comme principales cibles des facteurs de régulation du cycle cellulaire tel que des CDK impliquées dans les points de contrôle. La protéine CDC40 est la mieux caractérisée de ce complexe. Bien que ce rapprochement n'ait pas encore été rapporté dans la littérature, il est intéressant de noter que le mutant thermosensible *cdc40* présente des phénotypes similaires à ceux provoqués par le mutant thermosensible *nimA*, notamment l'arrêt du cycle cellulaire en G₂/M et le désassemblage du fuseau mitotique (*spindle pole body* chez la levure, l'équivalent des centrioles animaux). Une des cibles de CDC40 serait le

gène ANC1 (*Adenine Nucleotide Carrier*) impliqué dans la transition en G₂/M (Kaplan and Kupiec, 2007). De plus CDC40 aurait comme cible Cdc28, une CDK, et sa cycline CLN2, toutes deux impliquées au point de contrôle en G₁ (Kaplan and Kupiec, 2007).

Dans ce chapitre, je présenterai donc des informations préliminaires sur le rôle possible de PNek1 dans la cellule et aussi une découverte liant PNek1 à l'épissage de l'ARN. Les données récoltées lors de l'induction d'un stress génotoxique en phase G₁/S, suite à l'ajout d'inhibiteurs de la réplication de l'ADN, permettent de présumer que PNek1 pourrait être impliquée, ou du moins activée, au point de contrôle en G₁/S. De plus, l'utilisation du double hybride révèle une interaction entre PNek1 et PNek3, mais surtout l'interaction avec DBR1, une protéine impliquée dans l'épissage de l'ARN.

4.3 Résultats et discussion

4.3.1 Implication de PNek1 dans la réponse aux stress génotoxiques pendant le cycle cellulaire

En plus de l'aphidicoline, qui inhibe la réplication de l'ADN, arrêtant ainsi la progression du cycle cellulaire au point de contrôle G₁/S, deux autres agents furent utilisés pour bloquer des suspensions cellulaires de peuplier à deux moments précis du cycle cellulaire. Il s'agit de l'hydroxyurée, un inhibiteur de la ribonucléotide réductase, qui bloque la progression en fin de phase G₁ du cycle cellulaire, juste avant la blocage induit par l'ajout d'aphidicoline (Reichheld *et al.*, 1995) et de la colchicine, un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline, provoquant ainsi l'arrêt de la mitose lors de la transition anaphase/métaphase. Les niveaux de transcrits *PNek1* sont élevés après 24h, mais diminuent de façon marquée après 48h d'incubation avec l'hydroxyurée (Figure 4.2; HU). Il est important de rappeler que le niveau transcriptionnel de *PNek1* diminuait après la mitose (Figure 3.3A). Ceci pourrait donc indiquer que les transcrits de *PNek1* ne s'accumulent pas spontanément avant la phase S, comme pourrait le laisser croire le blocage à l'aphidicoline, mais renforce plutôt l'idée que *PNek1* réagit en réponse aux stress génotoxiques induits par l'aphidicoline ou l'hydroxyurée au moment de la transition G₁/S.

Le traitement à la colchicine, quant-à-lui, tend à confirmer le niveau relativement élevé de transcrits de *PNek1* observé en début de mitose (Figure 4.2; CO) et qui devrait diminuer à mesure que la mitose avance (Figure 3.3A à 26h).

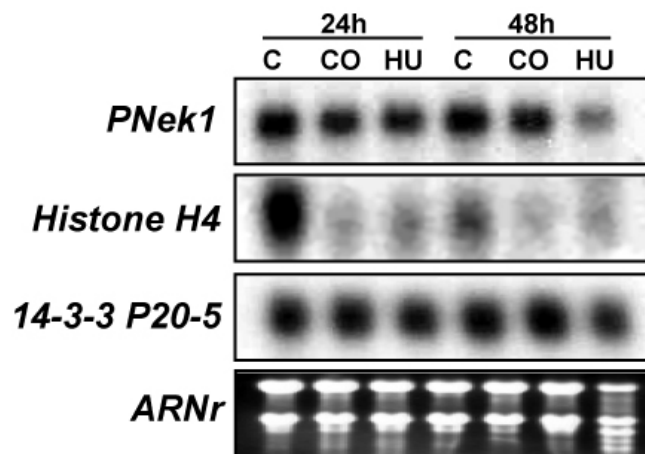


Figure 4.2. Analyse northern de l'expression de *PNek1* dans une suspension cellulaire de peuplier H11-11, lors d'un blocage aux points de contrôle. Les cellules ont été bloquées au moment de la 'métaphase/anaphase' avec 0,05% de colchicine (CO) et à la fin de la phase G₁ avec 10 mM d'hydroxyurée (HU). Les blocages ont été maintenus pendant 24 et 48 heures. Les résultats sont comparés à des cellules non-traitées (C). L'histone H4 est utilisée comme marqueur de la phase G₁/S et l'ARN total marqué au bromure d'éthidium est utilisé pour contrôler la quantité d'ARN dans chaque puits (*ARNr*). À noter que le niveau d'expression de la 14-3-3 est relativement invariable, fidèle aux observations précédentes du Chapitre 2 (données supplémentaires) et du Chapitre 3 (Figure 3.3).

La réponse au stress génotoxique a été rapportée pour la Nek11 chez les humains (Noguchi *et al.*, 2002). L'accumulation et l'activité de Nek11 étaient spécifiquement plus élevées dans les cellules HeLa en présence d'inhibiteurs de la réplication de l'ADN comme l'aphidicoline, l'hydroxyurée et la thymidine. Il est intéressant de noter que l'hydroxyurée est un traitement irréversible qui induit des dommages spécifiques à l'ADN, de même que l'aphidicoline qui, bien que considéré réversible, induit aussi des bris dans l'ADN (Hammond *et al.*, 2003). L'aphidicoline induit aussi la phosphorylation de Chk1 et H2A,

deux protéines du point de contrôle de la transition G₁/S impliquées dans la réponse au stress lors de la réplication de l'ADN (Brown and Baltimore, 2003). Par contre, un blocage à la thymidine n'endommage pas l'ADN, mais induit tout de même une réponse de signalisation similaire au stress UV et l'arrêt du cycle cellulaire en début de phase S (Pedoux *et al.*, 1998). Une autre observation, doublement intéressante, est la description de l'interaction entre Nek11 et Nek2 (Noguchi *et al.*, 2004). Bien que Nek2 soit connue pour son rôle dans la séparation des centromères à la transition G₂/M (Hayward and Fry, 2006), c'est lors du passage G₁/S que l'auto-activation de Nek2 viendrait directement activer Nek11, et ce de façon encore plus marquée lors d'un blocage à l'aphidicoline ou à l'hydroxyurée.

Il serait intéressant d'explorer l'activité de PNek1 lors du blocage à l'aphidicoline, puis de corroborer ces résultats avec l'activité d'autres kinases et d'inhibiteurs du mécanisme de régulation aux points de contrôles ATM/ATR (Abraham, 2001). Pour procéder à une telle analyse il est toutefois essentiel d'obtenir une protéine PNek1 soluble et active, ainsi qu'un anticorps spécifique. Ces outils ont fait défaut pendant une bonne partie de mon projet, mais nous avons récemment fait synthétiser des anticorps polyclonaux à partir de peptides synthétiques spécifique à PNek1. Il serait donc primordial que l'étape suivante à cette Thèse détermine si la protéine PNek1 joue effectivement un rôle aux points de contrôle du cycle cellulaire et lors de la réponse aux dommages à l'ADN.

4.3.2 Le petit interactome de PNek1

Dans le but de caractériser le rôle de PNek1 au sein de la cellule, j'ai entrepris de cribler trois banques d'ADNc provenant du peuplier 717-1B4. Le premier crible double hybride utilisait la même banque qui nous a permis d'isoler PNek1 par son interaction avec une 14-3-3 (Cloutier *et al.*, 2005). Cette banque provenait de feuilles matures de peuplier, traitées avec différents éliciteurs de la réponse de défense. Il est acquis que cette banque contient très peu de cellules en division. La seconde banque d'ADNc fut produite à partir d'un ensemble de tissus et d'organes utilisés pour l'analyse par qPCR présenté au Chapitre 2. Cette banque se voulait enrichie en éléments méristématiques et en organes en plein développement. La troisième banque fut produite à partir de feuilles matures du clone de

peuplier NM6 inoculé avec une souche de *Melampsora medusae*, un champignon pathogène causant la rouille du peuplier et provoquant aussi une réaction de défense chez cette espèce (L.-P. Hamel, communication personnelle). Les résultats de ces trois criblages sont présentés au Tableau 4.1.

La première constatation est le petit nombre d'interactions répertoriées après avoir procédé à trois essais indépendants et en utilisant deux techniques de double hybride différentes (voir la section 4.6 Matériel et méthodes). Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un environnement stressé ne soit propice ni à PNek1, ni à ses partenaires habituels. Nous avons aussi pu observer au Chapitre 2 que le patron d'expression du transcrite de PNek1 est étroitement lié au développement basipète typique de la feuille et que, par conséquent, PNek1 est présente à des niveaux très faibles dans les feuilles matures, qui sont aussi les organes récoltés pour les banques liées aux stress. Dans un deuxième temps, la récolte des feuilles s'est faite dans une période relativement courte après les traitements, soit 8 heures pour le premier criblage avec les inducteurs (Cloutier *et al.*, 2005), soit 5 jours après l'inoculation avec *M. medusae*, c'est-à-dire avant l'apparition des premières nécroses (L.-P. Hamel, communication personnelle). Il est donc, une fois de plus, probable qu'un gène impliqué dans la prolifération cellulaire et le développement des organes ne soit pas sollicité, mais plutôt réprimé à ces stades aussi courts. Ces deux criblages ne me permettent donc pas d'associer PNek1 à une activité particulière, sinon que ce n'est probablement pas lors de la défense de la plante. Les réponses de défense sont étroitement liées au stade de développement chez une plante, les jeunes feuilles étant souvent résiliente à l'infection. Il n'est donc pas inconcevable que l'utilisation d'une banque faite à partir de jeunes feuilles stressées aurait donné des résultats différents.

Tableau 4.1. Résultats détaillés des protéines interagissant avec PNek1 en essai par double hybride dans la levure.

Essai (Matériel; traitement)	Interaction (modèle JGI)*	Description	No. colonies isolées par millions
Criblage 1 (Feuille mature de peuplier 717; Éliciteurs des mécanismes de défense) (Cloutier <i>et al.</i> , 2005)	YHu1 (grail3.0024013801)	Protéine inconnue (<i>Yeast-two Hybrid unknown 1</i>) Fonction inconnue Protéine possiblement membranaire et chloroplastique (prédiction <i>in silico</i>).	3
Criblage 2 (Tissus méristématiques et organes en développement de peuplier 717) (Vigneault <i>et al.</i> , 2007)	PtDUF1 (gw1.III.2289.1 – modèle incomplet)	Protéine de fonction inconnue contenant un motif DUF1644 Fonction putative : motif en doigts de zinc liant l'ARN	8
	DBR1 (estExt_fgenes4_pg.C_LG_XVIII0523)	<i>RNA lariat debranching enzyme</i> Fonction connue : excission des liaisons 2'-5'-phosphodiester qui se retrouvent dans les introns en lasso	1
	NEK3 (gw1.II.3414.1)	<i>Poplar Nima-related kinase 3</i> Fonction putative : potentiellement impliquée dans le développement des organes et du xylème (Vigneault <i>et al.</i> , 2007).	1
Criblage 3 (Feuille mature de peuplier NM6; Inoculation avec <i>M. medusae</i>) (L.-P. Hamel)	Non-identifié	Impossible d'isoler une colonie viable à partir de la plaque maîtresse suite au double-hybride.	2

*Le modèle du gène correspondant au séquençage du génome de peuplier par le Joint Genome Institute (http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html).

La seconde constatation est l'interaction entre Nek1 et la Nek3. Jusqu'à ce jour il n'y a que chez les mammifères que l'interaction entre deux Neks ait été rapportée : Nek2 et Nek11 (Noguchi *et al.*, 2004), ainsi que Nek9 avec Nek6 et Nek7 (Belham *et al.*, 2003). Dans le premier cas, Nek2 phosphoryle Nek11 au nucléole lors de l'activation du point de contrôle en G₁/S. Ceci est d'autant plus surprenant que le niveau d'expression et d'activité de Nek2 est très faible à ce stade. Dans le second cas, Nek9 phosphoryle les protéines Nek6 et Nek7 lors de l'entrée en mitose. Bien que non-essentiels, les interactions favorisent la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire. En ce qui nous concerne, l'information limitée concernant PNek3 ne permet pas d'inférer une fonction précise à PNek1, sinon qu'il soit probable qu'une cascade de signalisation de Neks soit éventuellement caractérisée chez les plantes, tout comme c'est le cas les mammifères.

La troisième constatation, et probablement la plus intéressante, est l'interaction avec deux protéines liant l'ARN. La première est une protéine de fonction inconnue possédant un motif DUF1644, particulier aux plantes, qui pourrait être un domaine en doigts de zinc se liant à l'ARN. Cependant, aucune des cinq protéines possédant ce domaine chez *A. thaliana* n'a de fonction connue à ce jour. La seconde protéine, DBR1, est une métallophosphoestérase contenant un domaine de débranchement des lassos d'ARN. Le gène DBR1 est unique dans chacun des génomes eucaryotes séquencés à ce jour, une règle qui ne fait pas exception chez le peuplier, malgré l'abondance de gènes paralogues. DBR1 reconnaît et linéarise les introns lassos pour que ceux-ci puissent être dégradés (figure 4.3). Bien que son absence provoque l'accumulation d'introns non-dégradés, DBR1 ne semble pas être absolument essentiel à la croissance d'un organisme donné. Par contre, les mutants *dbr1* accusent divers degrés de retard de croissance en fonction de la quantité totale d'introns présents dans le génome d'un organisme donné. C'est le cas chez *Schizosaccharomyces pombe* dont 40% des gènes sont introniques. L'absence de DBR1 provoque des aberrations développementales, tel que des cellules fortement allongées, accompagnées d'un retard de développement, en plus de l'accumulation d'introns excisés non-dégradés (Nam *et al.*, 1997). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, dont seulement 2,5% des gènes possèdent un ou plusieurs introns, l'absence de DBR1 provoque aussi l'accumulation d'introns excisés, ce qui ne semble toutefois pas avoir de conséquence sur

la croissance de la cellule (Nam *et al.*, 1997). Autre fait intéressant, son homologue chez *A. thaliana* a été caractérisé (Wang *et al.*, 2004). *AtDBR1* fut identifié suite à un criblage pour des mutants présentant des problèmes de développement au niveau embryonnaire chez *A. thaliana*. Environ 25% des graines ne se rendent pas à maturité chez les plants *dbr1* et le développement des embryons semble retardé de façon générale. Chez les lignées homozygotes, aucune graine n'est viable. Fonctionnellement, il s'agit bien d'une DBR1. *AtDBR1* a été introduite dans une souche de *E. coli* spécialement conçu pour tester l'activité enzymatique des DBR1 *in vitro*, et coupait effectivement les liens 2'-5' phosphodiester (Ooi *et al.*, 2001).

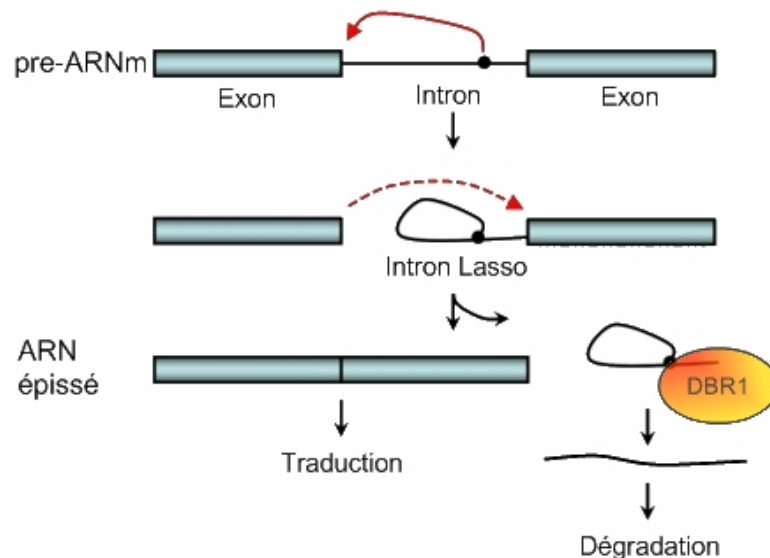


Figure 4.3. Schéma de l'épissage d'un ARNm et de la dégradation de l'intron lasso excisé. L'épissage est catalysé par le splicéosome, un complexe de petites ribonucléoprotéines nucléaires (snRNPs, non-représentées). Lors de la première étape, un pont 2'-5' phosphodiester est formé créant ainsi une structure en lasso. Les groupes en 3' restant vont ensuite être fusionnés, relâchant ainsi l'intron lasso. Celui-ci doit ensuite être linéarisé par l'enzyme de débranchement DBR1 pour pouvoir être recyclé. Le texte et la figure sont adaptés de Ooi *et al.*, (2001) et de Wikipedia (http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Two-step_Splicing_Reaction.png), respectivement.

La co-transformation en double hybride fut utilisée afin de déterminer de quelle façon PNek1 et DBR1 interagissent (Figure 4.4). La forme complète de PNek1 interagit avec le domaine phosphatase de DBR1. Puisque le rôle de DBR1 est bien connu et est lié à la combinaison unique d'un domaine phosphoestérase en N-terminal avec un domaine DBR1 en C-terminal, il est probablement plus réaliste de penser que PNek1 phosphorylerait DBR1, plutôt que DBR1 qui déphosphorylerait PNek1. Une telle activité permettrait d'impliquer directement PNek1 avec un rôle au niveau de la synthèse de l'ARN et plus précisément au niveau de la maturation de l'ARNm.

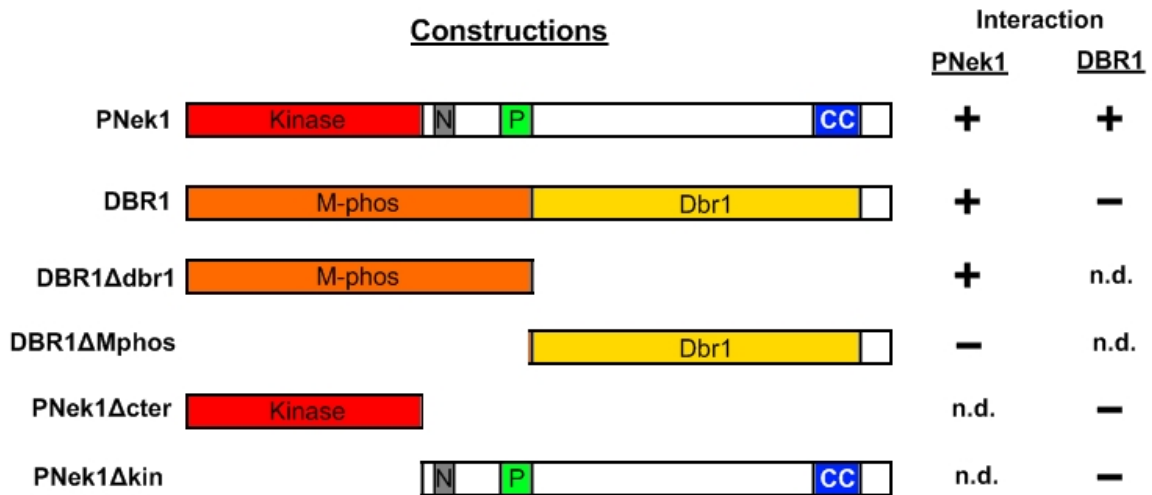


Figure 4.4. Analyse des domaines impliqués dans l'interaction entre PNek1 et DBR1. Association entre PNek1 et DBR1 en fonction des domaines sélectionnés. Légende : Kinase (kin), sérine/thréonine kinase; N, signal de localisation nucléaire *NLS*; P, motif de dégradation *PEST*; CC, motif d'interaction *coiled-coil*; M-phos, métallophosphoestérase; Dbr1, motif de l'enzyme de débranchement de lasso; +, interaction positive; -, absence d'interaction; n.d., données non-disponibles. La portion C-terminale (cter) de PNek1 englobe les domaines N, P et CC, tel que présenté dans le diagramme.

Ces données de double hybride suggèrent que l'extension C-terminale de PNek1 soit requise pour qu'il y ait interaction avec DBR1. Il est donc envisageable que d'autres facteurs puissent être impliqués dans la régulation de cette interaction, via les différents domaines présent en région C-terminal de PNek1. Il est aussi possible que l'homodimérisation/autophosphorylation de PNek1 soit en fait suffisante à cette interaction. NIMA et la HsNek2 sont connues pour s'autophosphoryler suite à leur homodimérisation (Fry *et al.*, 1999). Nos propres résultats de double hybride (Chapitre 3) et ceux de Fry *et al.* (1999) indiquent que cette l'homodimérisation/autophosphorylation nécessite le domaine coiled-coil.

4.4 Orientations futures

Les observations présentées dans ce chapitre apportent un éclairage différent et permettent de mieux cerner le rôle probable de PNek1 au niveau cellulaire. Ce rôle pourrait lier à la fois la synthèse de l'ARN et la réponse aux stress génotoxiques en G₁/S. Pour en faire un article complet, nous devons toutefois compléter ce chapitre avec une analyse plus précise de l'expression du gène et plus particulièrement de la protéine en fonction de différentes hormones et agents génotoxiques. De plus, les circonstances entourant la régulation probable de DBR1 par PNek1 restent toujours à déterminer.

Une approche, que j'ai initié, est en cours de développement pour créer un système de cellule de permettant ce type d'étude faisant intervenir à la fois des interactions protéine-protéine et des inductions. L'idée est d'utiliser *Agrobacterium tumefaciens* afin d'exprimer de façon transitoire nos gènes d'intérêt dans des cellules de peuplier. Il y aurait plusieurs avantages à un tel système. Comme tout se fait en culture liquide, il est facile de varier les volumes et de comparer plusieurs conditions à la fois, dans des plaques multi-puits, par exemple. De plus, l'observation de cellules individuelles au microscope est nettement plus facile que l'observation d'un organe complet. Ce système devrait aussi permettre à la fois d'induire et de suivre facilement l'expression de nos gènes cibles dans les cellules, soit par qPCR ou par immuno-histochimie. Plus important encore, ce système devrait permettre aussi de caractériser les interactions protéine-protéine dans les cellules et d'observer leur localisation en fonction des paramètres choisis, notamment en transformant les cellules

avec des protéines fusionnées à différents marqueurs fluorescents et par complémentation bimoléculaire (Bhat *et al.*, 2006; Citovsky *et al.*, 2006). Avec un tel système, il serait évidemment plus facile et plus rapide de caractériser le rôle de signalisation cellulaire joué par PNek1. Nous pourrions notamment déterminer les conditions qui incitent le rapprochement entre PNek1 et DBR1 et l'impact de la phosphorylation sur DBR1.

On peut aussi penser qu'un environnement à niveau de prolifération cellulaire élevé devrait être propice à l'étude du rôle de PNek1 dans un contexte de division cellulaire. Par contre, le désavantage majeur d'un tel système d'expression transitoire dans les cellules, est qu'il n'est probablement pas représentatif de la plante complète et ne m'aurait pas permis d'associer PNek1 au contexte de développement des organes et du réseau vasculaire. Il est donc possible que le contexte biologique ne soit pas présent. Vu la disparité entre les résultats de double-hybride dépendamment du type de banque utilisée, le contexte de l'organe et du tissu semble effectivement important pour PNek1. Par contre, la simplicité d'un tel système permettrait de faire des découvertes rapidement à l'échelle cellulaire, lesquelles nous pourrions ensuite replacer dans un contexte biologique approprié. Le second désavantage est la nouveauté d'un tel outil chez le peuplier et l'optimisation que cela représente. En fait, c'est la raison pour laquelle ce chapitre constitue une histoire à suivre...

4.5 Matériel et méthodes

Les hybridations ont été réalisées selon la méthode northern décrite précédemment au Chapitre 3. Brièvement, 10 µg d'ARN total fut utilisé par puits. L'hybridation fut effectuée avec des sondes spécifiques marquées radioactivement au P-32, de 437 pb pour *PNek1*, 180 pb pour l'histone *H4* et 193 pb pour la *14-3-3P20-5*, et les blocages du cycles cellulaires furent effectués en traitant les suspensions de cellules de *Populus trichocarpa* x *Populus deltoides* (clone H11-11; de Sá *et al.*, 1992) en phase de croissance logarithmique, avec des concentrations finales de 10 mM d'hydroxyurée et 0,05% de colchicine (Hemerly *et al.*, 1993).

Deux techniques de double hybride furent utilisées. La première par co-transformation a été effectuée telle que décrite précédemment au Chapitre 3. Brièvement, la même banque d'ADNc fut utilisée. Celle-ci fut préparée à partir de feuilles matures du clone peuplier hybride 717 (*Populus tremula* x *Populus alba* clone INRA 717 1-B4), traitées pendant 8 heures avec différents éliciteurs de la réponse de défense (blessure, acide salicylique, acide jasmonique, méthyl jasmonate, chitosan et fusicoccine). L'ADNc fut synthétisé à partir de 5 µg d'ARNm en utilisant le *Hybrizap 2.1 Library Construction Kit* (Stratagene). La région codante de *PNek1* fut insérée dans le plasmide pGal4-BD, puis utilisée pour transformer des cellules *S. cerevisiae* souche Y190. Le double-hybride par co-transformation consiste ensuite à utiliser la banque d'ADNc contenue dans le plasmide pGal4-AD et à la transformer dans la souche Y190 contenant pGal4-BD:PNek1.

Le deuxième et le troisième criblage furent effectués en utilisant la technique d'accouplement en suivant les instructions fournis dans le Matchmaker™ Two-Hybrid Library Construction & Screening Kit (Clontech). L'ARNm fut extrait soit d'un ensemble de tissus riches en méristèmes ou d'organes en développement de peuplier 717, tel que décrit au Chapitre 2 pour le deuxième criblage, ou soit de feuilles matures de peuplier NM6 (*Populus nigra* × *P. maximowiczii* 'clone NM6') 5 jours après avoir été traitées avec une souche de *Melampsora medusae* (L.-P. Hamel, communication personnelle) pour le troisième criblage. Dans les deux cas, les banques d'ADNc furent synthétisées par PCR et insérées par recombinaison homologue dans le plasmide pGADT7-Rec (GAL4-AD) puis utilisées pour transformer la souche Y187 (MAT α). La région codante de *PNek1* fut insérée dans le plasmide de liaison pGBKT7 (GAL4-BD) puis utilisée pour transformer la souche AH109 (MAT \mathbf{a}). Ensuite les deux souches transformées furent co-cultivées afin de se 'reproduire' entre elles puisqu'elles possèdent des types sexuels complémentaires (*mating type α and \mathbf{a}*). La sélection s'est faite sur un milieu stringent utilisant cinq marqueurs (gènes rapporteurs) de sélection indépendants, soit la croissance en l'absence des acides aminés adénine (ADE2), histidine (HIS3), leucine (LEU2) et tryptophane (TRP1), en plus du développement d'une coloration bleu (MEL1) en présence du substrat chromogénique X- α -Gal, ceci afin d'éviter les faux positifs.

Chapitre 5 - Discussion

5.1 Le rôle des Neks dans le cycle cellulaire

La majorité des observations portant sur les Neks de mammifères attribuent à ces gènes un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire à partir d'études faites sur le développement de cellules cancéreuses. À mon avis, il est possible que l'interprétation du rôle des Neks soit par conséquent biaisée. Il m'a donc semblé intéressant d'utiliser la littérature pour tenter d'intégrer les Neks dans un même modèle afin d'obtenir une perspective globale de leur rôle potentiel au sein du cycle cellulaire. Pour commencer, j'ai interrogé plusieurs banques disponibles en ligne contenant les résultats d'analyse de puces d'ADN visant à répertorier les gènes différenciellement exprimés au cours du cycle cellulaire chez les mammifères. À mon grand désarroi, il n'existerait qu'une seule étude concernant le cycle cellulaire (Whitfield *et al.*, 2002). Toutefois, la procédure expérimentale utilisait aussi un blocage à l'aphidicoline. L'analyse de ces données révèle qu'il n'y a seulement que *HsNek2* dont l'expression transcriptionnelle varie significativement en fonction du cycle cellulaire (Figure 5.1). Dans son ensemble, la littérature tend à lier *de facto* les Neks avec la régulation du cycle cellulaire proprement dite (Forrest *et al.*, 2003; O'Connell *et al.*, 2003; Li and Li, 2006; O'Regan *et al.*, 2007). L'étude de Forrest *et al.* (2003) est un cas où les auteurs ont choisi de répertorier l'ensemble des gènes de souris impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire en se basant sur les similitudes de séquences avec les cyclines et les Neks, ce qui à mon avis pourrait s'avérer trompeur. Il m'apparaît toutefois que, si toutes les Neks sont effectivement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, celles-ci sont régulées différemment des autres kinases traditionnellement connues pour contrôler le cycle cellulaire, comme les CDKs qui sont toutes exprimées différenciellement en fonction du cycle cellulaire (Pines, 1999; Whitfield *et al.*, 2002; Bloom and Cross, 2007). Sur une base transcriptionnelle, il n'y a pas raison d'inclure *HsNek3* et *HsNek4*, deux membres pour lesquels aucune étude ne les associe au cycle cellulaire (Levedakou *et al.*, 1994; Hayashi *et al.*, 1999). Tel que présenté au Chapitre 1, les Cyclines et les CDKs sont régulées par leurs multiples associations qui favorisent l'activation des CDKs, lesquelles favorisent, à leur tour, le passage d'une phase à l'autre du

cycle cellulaire. Leur dissociation et leur dégradation sont aussi requises afin de permettre la progression de la phase suivante.

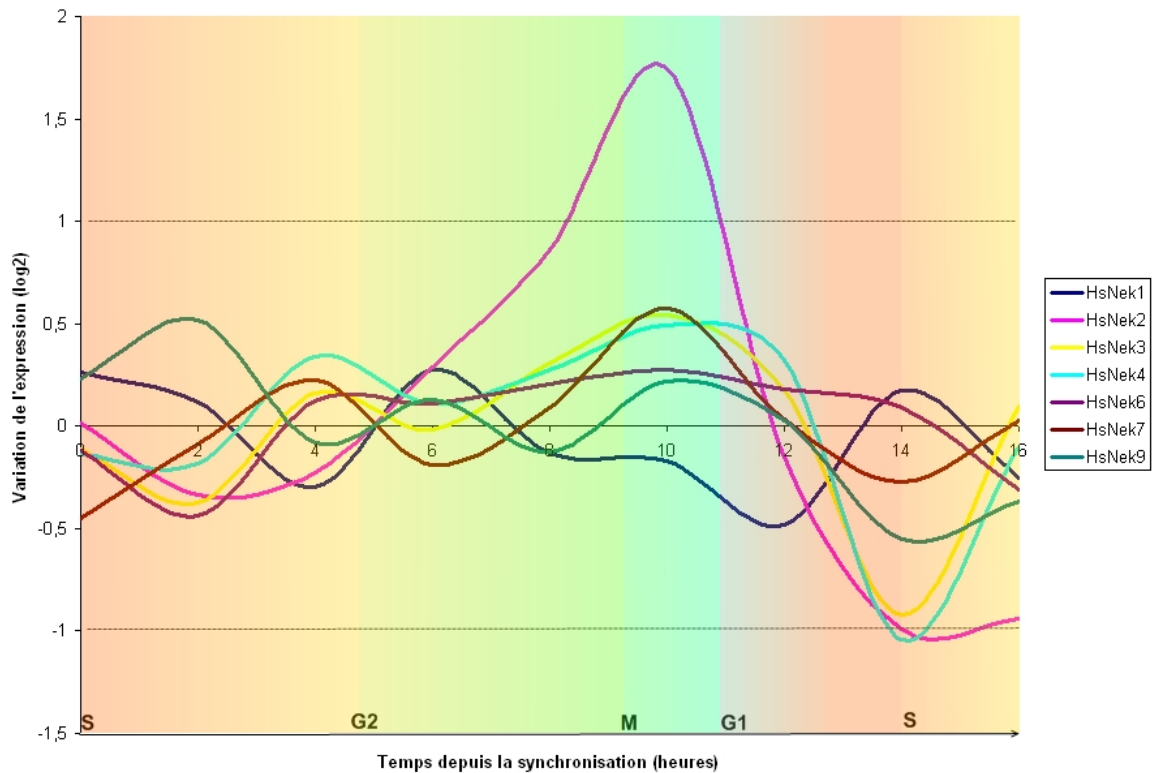


Figure 5.1. Mesure de l'expression transcriptionnelle des Neks dans les cellules humaines HeLa, par puce ADNc. Les niveaux d'expression sont représentés selon le temps écoulé depuis la relâche du blocage à l'aphidicoline au tout début de la phase S en fonction de la variation de l'intensité de l'expression transformée en log2. Les phases du cycle cellulaire sont indiquées en dessous de l'axe des abscisses. Les données brutes sont tirées de Whitfield *et al.* (2002).

Une étude similaire à celle de Whitfield *et al.*, (2002) existe chez *Arabidopsis* (Menges *et al.*, 2003). La comparaison semble toutefois un peu plus révélatrice que chez l'humain (Figure 5.2). Les *AtNek3*, *AtNek5* et *AtNek6* présentent des variations significatives de deux fois l'intensité du signal mesuré, surtout au début de la phase S. Bien

que l'expression d'*AtNek2* varie en fonction des points de transition, cette variation ne semble toutefois pas significative statistiquement, à condition que les critères statistiques à la mode de nos jours soient valables biologiquement parlant. En ce qui a trait à *AtNek1*, l'homologue de *PNek1*, il ne varie pas significativement, ce qui semble différent de nos observations du Chapitre 3, mais offre toutefois la même tendance, c'est-à-dire une accumulation en G₂ puis une diminution pendant la mitose semble toutefois similaire à celle observée avec *PNek1* (Figure 3.3). Quoique variant un peu plus chez des cellules végétales que chez des cellules humaines, la variation des transcrits en fonction du cycle cellulaire semble somme toute limitée pour des régulateurs du cycle cellulaire. Tout comme chez les mammifères, les CDKs sont différenciellement exprimées en fonction du cycle cellulaire chez *Arabidopsis* (Menges *et al.*, 2003; Menges *et al.*, 2005) Dans leur ensemble, il m'apparaît que chez les plantes, tout comme chez les mammifères, l'analyse transcriptionnelle ne lie pas nécessairement la famille des Neks à une activité de régulateur du cycle cellulaire. Il faudrait donc chercher ailleurs.

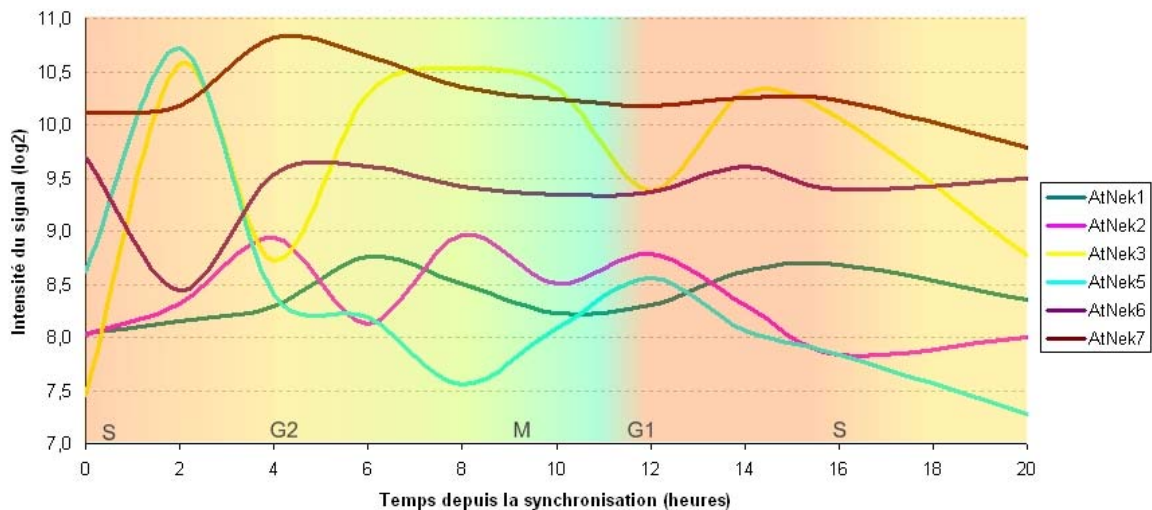


Figure 5.2. Mesure de l'expression transcriptionnelle des Neks dans les cellules MM2 d'Arabidopsis avec la puce ATH1. Les niveaux d'expression sont représentés selon le temps écoulé depuis la relâche du blocage à l'aphidicoline au tout début de la phase S, en fonction de l'intensité de l'expression transformé en log₂. Les phases du cycle cellulaire

sont indiquées au-dessus de l'axe des abscisses. Les données brutes sont tirées de Menges *et al.* (2003).

5.2 Interactions protéine-protéine et implication des Neks dans le cycle cellulaire

Avec la popularité grandissante de projets de protéomique et l'accessibilité des données grâce à la bioinformatique, il est relativement aisé et intéressant d'interroger les banques d'interactions protéine-protéine disponibles sur internet. Ainsi, j'ai pu construire un modèle à jour permettant de lier plusieurs HsNeks à la régulation du cycle cellulaire (Figure 5.3).

La majorité de ces interactions ont été décrites dans la littérature. La phosphorylation de Nek11 par Nek2 survient au noyau lors d'un stress génotoxique au point de contrôle en G₁/S (Noguchi *et al.*, 2004). Par l'entremise de son domaine coiled-coil, Nek2 interagit avec CEP2 (GeneID 11190) qui est impliqué dans la cohésion des centrosomes (Fry *et al.*, 1998; Mayor *et al.*, 2000); elle phosphoryle aussi HEC1 (GeneID 10403) permettant ainsi la ségrégation des chromosomes (Chen *et al.*, 2002). Nek2 s'associe avec les protéines MAD1 (GeneID 8379) et MAD2 (GeneID 4085), elles-aussi impliquées dans l'assemblage et la séparation des chromosomes, en aidant leur localisation aux kinétochores (Lou *et al.*, 2004). Nek2 phosphoryle PP1C (GeneID 5499), une sous-unité de la protéine PP1 impliquée dans plusieurs activités de régulation cellulaire et qui formerait un complexe tertiaire avec CEP2 afin de contrôler la séparation des centrosomes (Helps *et al.*, 2000). La rootletin CROCC (GeneID 9696), dont le rôle serait de permettre l'ancrage entre CEP2 et les centrioles (Yang *et al.*, 2006), interagirait aussi avec Nek2, probablement par l'entremise de leur domaine coiled-coil.

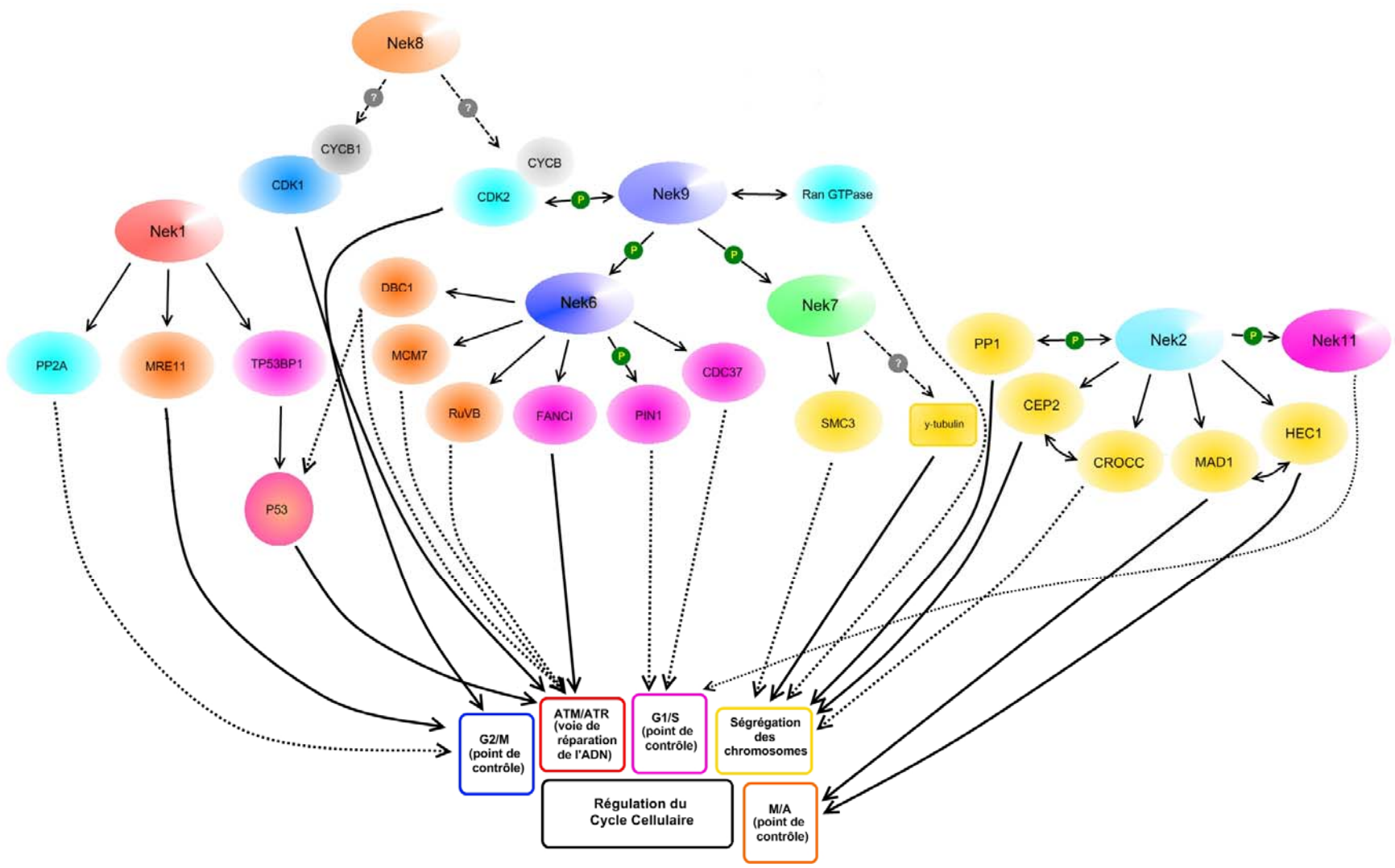




Figure 5.3. Diagramme de l'implication des Neks dans la régulation du cycle cellulaire chez les humains. Une flèche pleine (\longrightarrow) signifie une interaction directe avec une protéine ou un élément de contrôle du cycle cellulaire, alors qu'une flèche pointillée ($\cdots\rightarrow$) indique une interaction indirecte, c'est-à-dire qu'au moins un intermédiaire existe entre cette protéine et l'élément de contrôle du cycle cellulaire. Le symbole  signifie que la Nek phosphoryle sa cible, alors que le symbole  indique que l'interaction directe entre la Nek et la cible n'est supportée par aucune observation concrète, mais que des données démontrent que cette cible affecte le déroulement du cycle cellulaire. Les données ayant servi à construire ce modèle proviennent toutes de banques de données disponibles en libre-accès sur internet : Database of Interacting Proteins (DIP), <http://dip.doe-mbi.ucla.edu> (Xenarios *et al.*, 2002); Molecular INTeraction database (MINT), <http://mint.bio.uniroma2.it/mint/Welcome.do> (Zanzoni *et al.*, 2002); Biomolecular Object Network Databank (BOND), <http://bond.unleashedinformatics.com> (Bader *et al.*, 2003); Human Protein Reference Database (HPRD), <http://www.hprd.org> (Peri *et al.*, 2003); Mammalian protein-protein interaction database (MIPS), <http://mips.gsf.de/proj/ppi> (Pagel *et al.*, 2005); et Entrez Gene (NCBI), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene> (Maglott *et al.*, 2005). Voir le texte pour la description des gènes.

L'interaction de Nek6 et Nek7 avec Nek9 a aussi été décrite (Belham *et al.*, 2003). Nek6 et Nek7 sont directement activées suite à leur phosphorylation par Nek9 au moment de la transition G₂/M. L'absence de Nek9 occasionne un désalignement des chromosomes lors de leur ségrégation. Nek9 est hyper-phosphorylée et phosphoryle à son tour CDC2/CDK2 qui est impliquée dans les points de contrôle en G₁/S et G₂/M (Roig *et al.*, 2002). De plus, Nek9 interagit aussi avec une RAN (GeneID 5901), une petite protéine GTP, ce qui pourrait conférer un rôle pour Nek9 dans la synthèse des microtubules au noyau. Nek7 aussi pourrait être impliquée dans la synthèse des microtubules aux centrosomes, puisque l'absence de Nek7 occasionne une diminution marquée de γ -tubuline

(Kim *et al.*, 2007). Nek7 interagit aussi avec SMC3 (GeneID 9126), une cohésine impliquée dans l'attachement des chromatides.

De son côté, Nek6 aurait un rôle important à jouer pendant la division cellulaire au moment du point de contrôle anaphase/métaphase, puisque son absence provoque l'arrêt en début de métaphase et l'apoptose (Yin *et al.*, 2003). Une récente étude canadienne a aussi révélé que Nek6 interagissait avec CDC37 (GeneID 11140), une chaperone interagissant avec plusieurs CDKs; FANCI (GeneID 55215), une sous-unité d'un complexe protéique nucléaire qui serait impliquée dans la voie de signalisation ATM/ATR; RuVB (GeneID 10856), une hélicase impliquée dans la réparation de l'ADN; MCM7 (GeneID 4176), qui fait partie du complexe de réplication de l'ADN; et DBC1 (GeneID 57805), qui s'associe avec la p53, protéine bien connue pour son rôle dans la régulation du cycle cellulaire et la formation de cancer (GeneID 7157) (Ewing *et al.*, 2007). De plus, Nek6 phosphoryle PIN1 (GeneID 5300), une protéine dont le nom même provient de son interaction avec les NIMA (peptidylprolyl isomerase, NIMA-interacting 1) et qui interagit avec une multitude de protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Chen *et al.*, 2006).

Une étude sur les interactions avec Nek1 au moment de la transition G₂/M (Surpili *et al.*, 2003) révèle qu'elle interagirait avec la phosphatase PP2A (GeneID 5528), largement impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, de la croissance et de la division; MRE11 (GeneID 4361), une protéine impliquée dans la recombinaison homologue; ainsi qu'une protéine de liaison à la P53, TP53BP1 (GeneID 7158), laquelle serait impliquée dans la détection des dommages à l'ADN. Finalement, la surexpression de Nek8 provoque une accumulation des complexes CDK1/CycB1 et CDK2/CycB1, ce qui laisse présager une implication au niveau du point de contrôle en G₂/M (Bowers and Boylan, 2004).

O'Regan *et al.* (2007) ont récemment procédé à une revue partielle de la littérature sur les interactions impliquant les Nek2, Nek9, Nek6 et Nek7 dans la régulation du cycle cellulaire. Le modèle présenté ici est en quelque sorte plus complet et intégré. En somme, l'analyse des interactions protéine-protéine donne un portrait beaucoup plus complet que l'analyse transcriptionnelle seule. Non seulement sept des onze Neks sont clairement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, mais elles se partagent les rôles. Leurs

actions sont en effet étroitement coordonnées, comme en témoigne les liens entre Nek2 et Nek11; Nek6, Nek7 et Nek 9; et possiblement Nek8 et Nek9 par l'intermédiaire de CDK2.

À l'heure actuelle, il n'est pas possible d'effectuer une analyse comparable chez les plantes. Nous pouvons toutefois postuler que PNek1 joue un rôle dans la régulation de la maturation de l'ARNm, étant donné son interaction avec DBR1. Cette activité pourrait avoir un impact sur la prolifération cellulaire, étant donné l'impact qu'a DBR1 sur le développement embryonnaire chez *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2004). Chez *S. pombe*, l'absence de DBR1 entraîne aussi un retard dans l'entrée en mitose (Shimada *et al.*, 2005).

Chez *Arabidopsis*, AtNek6 interagit avec la kinésine ARK1 (Armadillo Repeat Kinesin1) (Motosé *et al.*, 2008). Cette kinésine joue un rôle important dans le développement morphologique des poils racinaires en favorisant la dépolymérisation des microtubules. L'assemblage et la séparation des microtubules des centrioles jouent un rôle important au niveau de l'entrée en mitose, un événement auquel participe HsNek2 (Fry, 2002). Par contre, AtNek6 semble spécifiquement impliquée dans un rôle morphologique des cellules, par l'entremise de l'arrangement des microtubules et non du cycle cellulaire (Motosé *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2008).

5.3 Influence du contexte biologique dans l'étude de PNek1

Toutefois, il est important de rappeler que le contexte biologique dans lequel l'expérience se déroule, peut faire une différence. Par exemple, l'utilisation de peupliers m'a permis de tester l'expression de *PNek1* en fonction de l'activité du cambium vasculaire et du développement d'éléments secondaires dans la tige. Par contre, le peuplier n'est peut-être pas le système biologique idéal pour étudier le cycle cellulaire. Pour de multiples raisons éthiques, financières et logistiques, il n'y a que très peu d'études chez des organismes entiers en se qui concerne les Neks de mammifères. La majorité des études sont réalisées dans un contexte cellulaire, habituellement des cellules cancéreuses, ce qui va évidemment de pair avec la régulation ou la dérégulation du cycle cellulaire.

Est-ce que le même raisonnement peut être appliqué à mon étude des Neks de plantes, et plus particulièrement de PNek1? Lors de ce projet, nous avons souvent varié le contexte

biologique, dans le but de vérifier nos nouvelles hypothèses. Après tout, il ne faut pas oublier que c'est la plante tout entière qui est ultimement régulée. Par contre, les données présentées au Chapitre 2 quant à un rapprochement avec le développement des organes pour les Neks, et de façon plus particulière du système vasculaire pour PNek1, sont loin d'être complètes. Ce chapitre est tout de même assez informatif, puisque la localisation de l'expression dans les tissus vasculaires et les régions de différenciation n'est pas contradictoire à une association avec les microtubules ou à la prolifération cellulaire, comme c'est établi chez des Neks de mammifères. Bien que je n'ai pas établi de lien directe avec la régulation de l'auxine, il demeure qu'une explication possible de la localisation de l'expression de PNek1 est que le développement vasculaire à partir du procambium est largement influencé par la synthèse et le transport de l'auxine (Berleth and Mattsson, 2000; Berleth *et al.*, 2000). Au niveau cellulaire, l'orientation et le positionnement des cellules procambiales dans l'axe de développement de l'organe est sous l'influence de xylogènes, des protéoglycans induisant la signalisation entre les cellules (Motose *et al.*, 2004). Ceux-ci sont transportés et sécrétés à l'extrémité des cellules en différenciation par les vésicules. Le développement et le transport des vésicules sont intimement liés au cytosquelette, donc aux microtubules. Les plants d'*Arabidopsis* déficients pour le gène *SCARFACE* (*SCF*) présentent des anomalies à la fois au niveau de la formation du système vasculaire, mais aussi de son orientation (Koizumi *et al.*, 2005; Sawa *et al.*, 2005). *SCF* est un important régulateur du trafic vésiculaire et membranaire et affecterait à la fois le transport de l'auxine et possiblement les xylogènes. Il n'existe par contre qu'un seul exemple, celui du gène *POLARIS*, qui serait à la fois impliqué dans l'organisation des microtubules et du transport d'auxine, via la signalisation par l'éthylène (Chilley *et al.*, 2006). Il reste à savoir si c'est dans une situation semblable que PNek1, comme la majorité des Neks, serait impliquée dans le développement du système vasculaire par l'entremise d'une activité reliée aux microtubules. Deux études récentes ont indépendamment démontré que AtNek6 est localisée aux microtubules et serait impliquée dans la conformation et l'élongation des cellules au niveau de la base de l'hypocotyle, des poils racinaires et de la racine (Motose *et al.*, 2008; Sakai *et al.*, 2008). L'absence d'AtNek6 provoque l'apparition de protubérances et une torsion vers la droite de la racine à mesure que celle-ci s'allonge.

Le double hybride était un bon moyen de faire la transition entre les observations effectuées chez les plantes et l'objectif de définir un rôle pour PNek1 au niveau de la signalisation cellulaire. C'est en quelque sorte un essai *in vitro*, mais réalisé à partir de banques contextuelles provenant d'organes complets, où le résultat final semble lier PNek1 à la synthèse de l'ARN, via son interaction avec DBR1 et DUF1644. Tel que mentionné au Chapitre 4, l'épissage est impliqué dans la régulation du cycle cellulaire en permettant la maturation d'ARNm impliqués dans son contrôle. Par contre, il reste beaucoup à faire afin d'expliquer ces interactions. Dans un premier temps, il serait important de corroborer les résultats du double hybride avec une technique complémentaire. L'utilisation de la technique par fluorescence bimoléculaire semble une avenue intéressante puisqu'elle permet de placer les interacteurs dans un environnement *in vivo* (Bhat *et al.*, 2006). L'utilisation d'un système cellulaire tel que décrit au Chapitre 4 pourrait notamment faciliter à la fois les manipulations et la prise d'images au microscope, puisque les cellules isolées en suspension offrent un meilleur potentiel au niveau du champ de visualisation. Plusieurs combinaisons de différentes constructions pourraient ainsi être testées pour la présence ou l'absence d'interaction, en plus d'offrir une idée du lieu de l'interaction dans la cellule. Dans un second temps, des protéines recombinantes pourraient être utilisées pour vérifier si DBR1 et DUF1644 sont des substrats pour PNek1 dans un essai de phosphorylation *in vitro*. Finalement, il existe un mutant *dbr1* chez *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2004). Le phénotype observé au niveau du développement embryonnaire peut être secouru par la surexpression de DBR1. Dans une approche où le contexte devient la plante complète, il serait intéressant de voir l'effet de la suppression d'AtNek1, ou même de PNek1, sur le sauvetage du phénotype par DBR1.

Tel que mentionné précédemment, l'apparente absence d'interactions dans un contexte de défense offre peut-être une piste quant à l'éventail ou, dans notre cas, la spécificité du rôle de PNek1. L'essai par double hybride qui avait précédemment permis d'isoler PNek1 en interaction avec la 14-3-3P20-5 (Cloutier *et al.*, 2005), n'avait pas non plus révélé beaucoup d'interactions (Monicka Cloutier, communication personnelle). Il y avait une aquaporine, une protéine membranaire et quelques protéines inconnues. La seule interaction qui revenait plus d'une fois était celle avec PNek1. À l'origine, l'objectif était

d'identifier des facteurs interagissant avec une 14-3-3 dans un contexte de défense. Le choix de la 14-3-3 s'était basé sur des travaux antérieurs (Lapointe *et al.*, 2001). Une hypothèse non-vérifiée est que nous n'avons pas utilisé la bonne 14-3-3. L'idée est donc que PNek1, normalement impliquée dans les phases de développement, serait séquestrée à l'extérieur du noyau par la 14-3-3 afin d'y être dégradée par le protéasome. Si tel est le cas, il serait donc normal de n'observer que peu ou pas d'interactions lorsque les mécanismes de défense sont induits. Cette hypothèse fut émise sur la base des travaux de Lapointe *et al.* (2001) qui ont identifiés un groupe de protéines 14-3-3 dans le peuplier, dont certaines réagissaient à l'induction des mécanismes de défense, sans toutefois pouvoir précisément identifier ces 14-3-3. De plus, l'analyse des données provenant de puces d'ADN de peuplier (V. Levée, A. Azaez et L.-P. Hamel, communications personnelles) et d'*A. thaliana* (Genevestigator) indiquent que la 14-3-3P20-5, ou son homologue At1g26480, n'est pas induite lors de la réponse aux stress.

La protéine 14-3-3 TFT9 chez la tomate, l'homologue de la 14-3-3P20-5, est induite par la fusicoccine, une toxine fongique faisant partie des éliciteurs utilisés pour traiter des feuilles de peuplier dans notre première banque d'ADNc utilisée pour le double hybride. Cette toxine active la pompe à protons membranaire en stabilisant l'interaction entre une 14-3-3 et la H⁺ATPase. Il en résulte ainsi une sortie massive de protons à l'extérieur de la cellule, favorisant l'acidification rapide de la paroi cellulaire et la production de H₂O₂, ce qui provoque l'ouverture des stomates et éventuellement la mort du tissu végétal, puis de la plante (Roberts and Bowles, 1999; Malerba *et al.*, 2004). À partir de ce que nous connaissons de PNek1, nous pouvons spéculer que le stress oxydatif généré par l'application de fusicoccine sur la feuille de peuplier ait activé les mécanismes de défense, inhibant ainsi la signalisation de l'auxine et les activités liées à celle-ci, tel que la prolifération cellulaire et le développement de la plante (Kovtun *et al.*, 1998). L'hypothèse est donc que PNek1 serait séquestrée dans le cytosol par la 14-3-3, soit temporairement ou soit pour y être dégradée par l'intermédiaire de son motif PEST. Ceci pourrait expliquer pourquoi PNek1 fut le principal interacteur de la 14-3-3P20-5.

5.4 Conclusion

En énumérant les données concernant PNek1, notamment la localisation dans les régions productrices d'auxines, son accumulation en G2, son accumulation lors de stress génotoxiques, sa localisation nucléaire, ainsi que son interaction avec DRB1; la marche n'est plus très haute pour impliquer PNek1 dans la régulation du cycle cellulaire. La dernière marche de ce projet se voulait une sorte de retour aux sources en mettant l'emphase sur la caractérisation de PNek1 au niveau cellulaire. La principale étape à franchir à ce niveau serait probablement de vérifier le rôle de PNek1 en lien direct ou indirect avec les microtubules, pour ainsi confirmer ce qui est à mon avis la principale caractéristique d'une Nek, peu importe l'organisme et son contexte.

Les travaux présentés dans cette thèse ont jeté les premières balises de la caractérisation des Neks chez les plantes. Déjà, AtNek6 a fait l'objet d'études pas deux autres groupes de chercheurs indépendants et, je l'espère, d'autres suivront. Je souligne aussi que l'utilisation du peuplier s'est avéré importante pour l'observation de l'expression de PNek1 au niveau du cambium vasculaire. Toutefois, je crois qu'il y a beaucoup de débroussaillage à faire à la base avant de pousser plus loin. Bien que l'utilisation d'un système plus simple à manipuler tel qu'*Arabidopsis* pourrait permettre d'accélérer les découvertes, une recommandation qui pourrait s'appliquer à n'importe quel projet de caractérisation d'une des 387 sérine/thréonine kinases du peuplier, mon conseil est d'aller de l'avant avec un système encore plus simple, celui de la cellule. Les cultures de cellules en suspension ont déjà un quasi monopole dans les études portant sur les mammifères et deviennent aussi de plus en plus populaires dans la communauté *Arabidopsis* et, je le souhaite, chez le peuplier. Un peu comme si la plante essayait de rattraper les humains.

Références citées ou bibliographiques

- Abraham RT** (2001) Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev.* **15**: 2177-2196
- Aloni R, Schwalm K, Langhans M, Ullrich CI** (2003) Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **216**: 841-853
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E, Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR** (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**: 653-657
- Andersen JS, Lam YW, Leung AK, Ong SE, Lyon CE, Lamond AI, Mann M** (2005) Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**: 77-83
- Andersson-Gunneras S, Mellerowicz EJ, Love J, Segerman B, Ohmiya Y, Coutinho PM, Nilsson P, Henrissat B, Moritz T, Sundberg B** (2006) Biosynthesis of cellulose-enriched tension wood in *Populus*: global analysis of transcripts and metabolites identifies biochemical and developmental regulators in secondary wall biosynthesis. *Plant J.* **45**: 144-165
- Bader GD, Betel D, Hogue CW** (2003) BIND: the Biomolecular Interaction Network Database. *Nucleic Acids Res.* **31**: 248-250
- Baima S, Possenti M, Matteucci A, Wisman E, Altamura MM, Ruberti I, Morelli G** (2001) The arabidopsis ATHB-8 HD-zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiol.* **126**: 643-655
- Bandman O, Coleman RT, Loring JF, Seilhamer JJ, Cocks BG** (2002) Complexity of inflammatory responses in endothelial cells and vascular smooth muscle cells determined by microarray analysis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **975**: 77-90

- Beemster GT, Fiorani F, Inzé D** (2003) Cell cycle: the key to plant growth control? *Trends Plant Sci.* **8**: 154-158
- Belham C, Roig J, Caldwell JA, Aoyama Y, Kemp BE, Comb M, Avruch J** (2003) A mitotic cascade of NIMA family kinases. Nerccl1/Nek9 activates the Nek6 and Nek7 kinases. *J. Biol. Chem.* **278**: 34897-34909
- Berleth T, Mattsson J** (2000) Vascular development: tracing signals along veins. *Curr. Opin. Plant Biol.* **3**: 406-411
- Berleth T, Mattsson J, Hardtke CS** (2000) Vascular continuity and auxin signals. *Trends Plant Sci.* **5**: 387-393
- Bhat RA, Lahaye T, Panstruga R** (2006) The visible touch: in planta visualization of protein-protein interactions by fluorophore-based methods. *Plant Methods* **2**: 12
- Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS** (2005) Auxin transport. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 494-500
- Blanc G, Barakat A, Guyot R, Cooke R, Delseny M** (2000) Extensive duplication and reshuffling in the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell* **12**: 1093-1101
- Blilou I, Xu J, Wildwater M, Willemssen V, Paponov I, Friml J, Heidstra R, Aida M, Palme K, Scheres B** (2005) The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots. *Nature* **433**: 39-44
- Bloom J, Cross FR** (2007) Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 149-160
- Booher RN, Holman PS, Fattaey A** (1997) Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J. Biol. Chem.* **272**: 22300-22306
- Boudet N, Aubourg S, Toffano-Nioche C, Kreis M, Lecharny A** (2001) Evolution of intron/exon structure of DEAD helicase family genes in *Arabidopsis*, *Caenorhabditis*, and *Drosophila*. *Genome Res.* **11**: 2101-2114
- Bowers AJ, Boylan JF** (2004) Nek8, a NIMA family kinase member, is overexpressed in primary human breast tumors. *Gene* **328**: 135-142
- Brandstadter J, Rossbach C, Theres K** (1994) The pattern of histone H4 expression in the tomato shoot apex changes during development. *Planta* **192**: 69-74
- Brown EJ, Baltimore D** (2003) Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev.* **17**: 615-628

- Brunet A, Kanai F, Stehn J, Xu J, Sarbassova D, Frangioni JV, Dalal SN, DeCaprio JA, Greenberg ME, Yaffe MB** (2002) 14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport. *J. Cell. Biol.* **156**: 817-828
- Brunner AM, Yakovlev IA, Strauss SH** (2004) Validating internal controls for quantitative plant gene expression studies. *BMC Plant Biol.* **4**: 14
- Burssens S, Himanen K, van de Cotte B, Beeckman T, Van Montagu M, Inzé D, Verbruggen N** (2000) Expression of cell cycle regulatory genes and morphological alterations in response to salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **211**: 632-640
- Casneuf T, De Bodt S, Raes J, Maere S, Van de Peer Y** (2006) Nonrandom divergence of gene expression following gene and genome duplications in the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* **7**: R13
- Champion A, Kreis M, Mockaitis K, Picaud A, Henry Y** (2004) Arabidopsis kinome: after the casting. *Funct Integr Genomics* **4**: 163-187
- Chan J, Calder GM, Doonan JH, Lloyd CW** (2003) EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in *Arabidopsis*. *Nat. Cell Biol.* **5**: 967-971
- Chang SJ, Puryear J, Cairney J** (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**: 113-116
- Chaubet-Gigot N, Kapros T, Flenet M, Kahn K, Gigot C, Waterborg JH** (2001) Tissue-dependent enhancement of transgene expression by introns of replacement histone H3 genes of *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* **45**: 17-30
- Cheetham GM** (2004) Novel protein kinases and molecular mechanisms of autoinhibition. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**: 700-705
- Chen A, Yanai A, Arama E, Kilfin G, Motro B** (1999) NIMA-related kinases: isolation and characterization of murine *nek3* and *nek4* cDNAs, and chromosomal localization of *nek1*, *nek2* and *nek3*. *Gene* **234**: 127-137
- Chen J, Li L, Zhang Y, Yang H, Wei Y, Zhang L, Liu X, Yu L** (2006) Interaction of Pin1 with Nek6 and characterization of their expression correlation in Chinese hepatocellular carcinoma patients. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **341**: 1059-1065

- Chen Y, Riley DJ, Zheng L, Chen PL, Lee WH** (2002) Phosphorylation of the mitotic regulator protein Hec1 by Nek2 kinase is essential for faithful chromosome segregation. *J. Biol. Chem.* **277**: 49408-49416
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD** (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* **31**: 3497-3500
- Chilley PM, Casson SA, Tarkowski P, Hawkins N, Wang KL, Hussey PJ, Beale M, Ecker JR, Sandberg GK, Lindsey K** (2006) The POLARIS peptide of *Arabidopsis* regulates auxin transport and root growth via effects on ethylene signaling. *Plant Cell* **18**: 3058-3072
- Christensen SK, Dagenais N, Chory J, Weigel D** (2000) Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell* **100**: 469-478
- Chung BY, Simons C, Firth AE, Brown CM, Hellens RP** (2006) Effect of 5'UTR introns on gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* **7**: 120
- Citovsky V, Lee LY, Vyas S, Glick E, Chen MH, Vainstein A, Gafni Y, Gelvin SB, Tzfira T** (2006) Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *J. Mol. Biol.* **362**: 1120-1131
- Clough SJ, Bent AF** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735-743
- Cloutier M, Vigneault F, Lachance D, Séguin A** (2005) Characterization of a poplar NIMA-related kinase PNek1 and its potential role in meristematic activity. *FEBS Lett.* **579**: 4659-4665
- Cockell MM, Gasser SM** (1999) The nucleolus: nucleolar space for RENT. *Curr. Biol.* **9**: R575-576
- Coté C, Rutledge RG** (2003) An improved MUG fluorescent assay for the determination of GUS activity within transgenic tissue of woody plants. *Plant Cell Rep.* **21**: 619-624
- Créancier L, Prats H, Zanibellato C, Amalric F, Bugler B** (1993) Determination of the functional domains involved in nucleolar targeting of nucleolin. *Mol. Biol. Cell.* **4**: 1239-1250

- Cutler SR, Ehrhardt DW, Griffiths JS, Somerville CR** (2000) Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 3718-3723
- Dahan O, Kupiec M** (2002) Mutations in genes of *Saccharomyces cerevisiae* encoding pre-mRNA splicing factors cause cell cycle arrest through activation of the spindle checkpoint. *Nucleic Acids Res.* **30**: 4361-4370
- Dardick C, Chen J, Richter T, Ouyang S, Ronald P** (2007) The rice kinase database. A phylogenomic database for the rice kinome. *Plant Physiol* **143**: 579-586
- de Sá MM, Subramaniam R, Williams FE, Douglas CJ** (1992) Rapid Activation of Phenylpropanoid Metabolism in Elicitor-Treated Hybrid Poplar (*Populus trichocarpa* Torr. & Gray *x* *Populus deltoides* Marsh) Suspension-Cultured Cells. *Plant Physiol.* **98**: 728-737
- De Souza CP, Osmani AH, Wu LP, Spotts JL, Osmani SA** (2000) Mitotic histone H3 phosphorylation by the NIMA kinase in *Aspergillus nidulans*. *Cell* **102**: 293-302
- De Veylder L, Joubes J, Inze D** (2003) Plant cell cycle transitions. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **6**: 536-543
- Demidov D, Van Damme D, Geelen D, Blattner FR, Houben A** (2005) Identification and dynamics of two classes of aurora-like kinases in *Arabidopsis* and other plants. *Plant Cell* **17**: 836-848
- Doerner P** (2003) Plant meristems: a merry-go-round of signals. *Curr. Biol.* **13**: R368-374
- Doerner P** (2008) Plant roots: recycled auxin energizes patterning and growth. *Curr Biol* **18**: R72-74
- Donnelly PM, Bonetta D, Tsukaya H, Dengler RE, Dengler NG** (1999) Cell cycling and cell enlargement in developing leaves of *Arabidopsis*. *Dev. Biol.* **215**: 407-419
- Doonan JH** (1992) Cell division in *Aspergillus*. *J. Cell Sci.* **103** (Pt 3): 599-611
- Drea SC, Lao NT, Wolfe KH, Kavanagh TA** (2006) Gene duplication, exon gain and neofunctionalization of *OEPI6*-related genes in land plants. *Plant J.* **46**: 723-735
- Du J, Xie HL, Zhang DQ, He XQ, Wang MJ, Li YZ, Cui KM, Lu MZ** (2006) Regeneration of the secondary vascular system in poplar as a novel system to investigate gene expression by a proteomic approach. *Proteomics* **6**: 881-895

- Ermolaeva MD, Wu M, Eisen JA, Salzberg SL** (2003) The age of the *Arabidopsis thaliana* genome duplication. *Plant Mol. Biol.* **51**: 859-866
- Estelle MA, Somerville C** (1987) Auxin-resistant mutants of *Arabidopsis thaliana* with an altered morphology. *Mol. Gen. Genet.* **206**: 200-206
- Ewing RM, Chu P, Elisma F, Li H, Taylor P, Climie S, McBroom-Cerajewski L, Robinson MD, O'Connor L, Li M, Taylor R, Dharsee M, Ho Y, Heilbut A, Moore L, Zhang S, Ornatsky O, Bukhman YV, Ethier M, Sheng Y, Vasilescu J, Abu-Farha M, Lambert JP, Duewel HS, Stewart, II, Kuehl B, Hogue K, Colwill K, Gladwish K, Muskat B, Kinach R, Adams SL, Moran MF, Morin GB, Topaloglou T, Figeys D** (2007) Large-scale mapping of human protein-protein interactions by mass spectrometry. *Mol. Syst. Biol.* **3**: 89
- Faragher AJ, Fry AM** (2003) Nek2A kinase stimulates centrosome disjunction and is required for formation of bipolar mitotic spindles. *Mol. Biol. Cell.* **14**: 2876-2889
- Felsenstein J** (2005) PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. *In* Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.,
- Fletcher L, Cerniglia GJ, Nigg EA, Yend TJ, Muschel RJ** (2004) Inhibition of centrosome separation after DNA damage: a role for Nek2. *Radiat. Res.* **162**: 128-135
- Ford JC, al-Khodairy F, Fotou E, Sheldrick KS, Griffiths DJ, Carr AM** (1994) 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Science* **265**: 533-535
- Forrest AR, Taylor D, Grimmond S** (2003) Exploration of the cell-cycle genes found within the RIKEN FANTOM2 data set. *Genome Res.* **13**: 1366-1375
- Friml J** (2003) Auxin transport - shaping the plant. *Curr. Opin. Plant Biol.* **6**: 7-12
- Fry AM** (2002) The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. *Oncogene* **21**: 6184-6194
- Fry AM, Arnaud L, Nigg EA** (1999) Activity of the human centrosomal kinase, Nek2, depends on an unusual leucine zipper dimerization motif. *J. Biol. Chem.* **274**: 16304-16310

- Fry AM, Mayor T, Meraldi P, Stierhof YD, Tanaka K, Nigg EA** (1998) C-Nap1, a novel centrosomal coiled-coil protein and candidate substrate of the cell cycle-regulated protein kinase Nek2. *J. Cell Biol.* **141**: 1563-1574
- Fry AM, Meraldi P, Nigg EA** (1998) A centrosomal function for the human Nek2 protein kinase, a member of the NIMA family of cell cycle regulators. *Embo J.* **17**: 470-481
- Fu H, Subramanian RR, Masters SC** (2000) 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**: 617-647
- Fukuda H** (2004) Signals that control plant vascular cell differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**: 379-391
- Gallois JL, Woodward C, Reddy GV, Sablowski R** (2002) Combined *SHOOT MERISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development* **129**: 3207-3217
- Garcia-Hernandez M, Berardini TZ, Chen G, Crist D, Doyle A, Huala E, Knee E, Lambrecht M, Miller N, Mueller LA, Mundodi S, Reiser L, Rhee SY, Scholl R, Tacklind J, Weems DC, Wu Y, Xu I, Yoo D, Yoon J, Zhang P** (2002) TAIR: a resource for integrated *Arabidopsis* data. *Funct. Integr. Genomics* **2**: 239-253
- Gegas VC, Doonan JH** (2006) Expression of cell cycle genes in shoot apical meristems. *Plant Mol. Biol.* **60**: 947-961
- Goodman HM, Ecker JR, Dean C** (1995) The genome of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10831-10835
- Graf R** (2002) DdNek2, the first non-vertebrate homologue of human Nek2, is involved in the formation of microtubule-organizing centers. *J. Cell. Sci.* **115**: 1919-1929
- Guyot R, Keller B** (2004) Ancestral genome duplication in rice. *Genome* **47**: 610-614
- Haecker A, Laux T** (2001) Cell-cell signaling in the shoot meristem. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 441-446
- Hamel LP, Nicole MC, Sritubtim S, Morency MJ, Ellis M, Ehling J, Beaudoin N, Barbazuk B, Klessig D, Lee J, Martin G, Mundy J, Ohashi Y, Scheel D, Sheen J, Xing T, Zhang S, Séguin A, Ellis BE** (2006) Ancient signals: comparative genomics of plant MAPK and MAPKK gene families. *Trends Plant Sci.* **11**: 192-198

- Hames RS, Fry AM** (2002) Alternative splice variants of the human centrosome kinase Nek2 exhibit distinct patterns of expression in mitosis. *Biochem J.* **361**: 77-85
- Hammond EM, Green SL, Giaccia AJ** (2003) Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest. *Mutat. Res.* **532**: 205-213
- Hardtke CS, Berleth T** (1998) The *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *Embo J.* **17**: 1405-1411
- Hashimoto Y, Akita H, Hibino M, Kohri K, Nakanishi M** (2002) Identification and characterization of Nek6 protein kinase, a potential human homolog of NIMA histone H3 kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **293**: 753-758
- Hayashi K, Igarashi H, Ogawa M, Sakaguchi N** (1999) Activity and substrate specificity of the murine STK2 Serine/Threonine kinase that is structurally related to the mitotic regulator protein NIMA of *Aspergillus nidulans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **264**: 449-456
- Hayward DG, Fry AM** (2006) Nek2 kinase in chromosome instability and cancer. *Cancer Lett.* **237**: 155-166
- Hellgren JM, Olofsson K, Sundberg B** (2004) Patterns of auxin distribution during gravitational induction of reaction wood in poplar and pine. *Plant Physiol.* **135**: 212-220
- Helps NR, Luo X, Barker HM, Cohen PT** (2000) NIMA-related kinase 2 (Nek2), a cell-cycle-regulated protein kinase localized to centrosomes, is complexed to protein phosphatase 1. *Biochem. J.* **349**: 509-518
- Hemerly AS, Ferreira P, de Almeida Engler J, Van Montagu M, Engler G, Inzé D** (1993) *cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5**: 1711-1723
- Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, He TC, Zhang L, Thiagalingam S, Kinzler KW, Vogelstein B** (1997) 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Mol. Cell* **1**: 3-11
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res.* **27**: 297-300

- Inzé D** (2005) Green light for the cell cycle. *EMBO J.* **24**: 657-662
- Jansson S, Douglas CJ** (2007) *Populus*: a model system for plant biology. *Annu. Rev. Plant Biol.* **58**: 435-458
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6**: 3901-3907
- Jensen LJ, Jensen TS, de Lichtenberg U, Brunak S, Bork P** (2006) Co-evolution of transcriptional and post-translational cell-cycle regulation. *Nature* **443**: 594-597
- Kang J, Dengler N** (2002) Cell cycling frequency and expression of the homeobox gene *ATHB-8* during leaf vein development in *Arabidopsis*. *Planta* **216**: 212-219
- Kaplan Y, Kupiec M** (2007) A role for the yeast cell cycle/splicing factor Cdc40 in the G1/S transition. *Curr. Genet.* **51**: 123-140
- Kepinski S** (2006) Integrating hormone signaling and patterning mechanisms in plant development. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 28-34
- Kessler S, Sinha N** (2004) Shaping up: the genetic control of leaf shape. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 65-72
- Kim S, Lee K, Rhee K** (2007) NEK7 is a centrosomal kinase critical for microtubule nucleation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **360**: 56-62
- Klimaszewska K, Lachance D, Pelletier G, Lelu MA, Séguin A** (2001) Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. mariana*, and *P. abies* after cocultivation of embryogenesis tissue with *Agrobacterium tumefaciens*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* **37**: 748-755.
- Koizumi K, Naramoto S, Sawa S, Yahara N, Ueda T, Nakano A, Sugiyama M, Fukuda H** (2005) VAN3 ARF-GAP-mediated vesicle transport is involved in leaf vascular network formation. *Development* **132**: 1699-1711
- Koncz C, Schell J** (1986) The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Mol. Gen. Genet.* **204**: 383-396
- Kovtun Y, Chiu WL, Zeng W, Sheen J** (1998) Suppression of auxin signal transduction by a MAPK cascade in higher plants. *Nature* **395**: 716-720

- Kumagai A, Dunphy WG** (1999) Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev.* **13**: 1067-1072
- Lapointe G, Luckevich MD, Cloutier M, Seguin A** (2001) 14-3-3 gene family in hybrid poplar and its involvement in tree defence against pathogens. *J Exp Bot* **52**: 1331-1338
- Laronga C, Yang HY, Neal C, Lee MH** (2000) Association of the cyclin-dependent kinases and 14-3-3 sigma negatively regulates cell cycle progression. *J. Biol. Chem.* **275**: 23106-23112
- Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ, Lohmann JU** (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* **438**: 1172-1175
- Lep le JC, Brasileiro ACM, Michel MF, Delmotte F, Jouanin L** (1992) Transgenic poplars: expression of chimeric genes using four different constructs. *Plant Cell Reports* **11**: 137-141
- Levedakou EN, He M, Baptist EW, Craven RJ, Cance WG, Welch PL, Simmons A, Naylor SL, Leach RJ, Lewis TB, et al** (1994) Two novel human serine/threonine kinases with homologies to the cell cycle regulating *Xenopus* MO15, and NIMA kinases: cloning and characterization of their expression pattern. *Oncogene* **9**: 1977-1988
- Li JJ, Li SA** (2006) Mitotic kinases: The key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol. Ther.* **111**: 974-984
- Liscum E, Reed JW** (2002) Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* **49**: 387-400
- Liu Q, Luo Y, Jiang L, Zhou WQ, Man XH, Zhang X** (2004) Preliminary analysis of CDK2 sequence and its nuclear import. *Yi Chuan Xue Bao* **31**: 444-448
- Lou Y, Yao J, Zereshki A, Dou Z, Ahmed K, Wang H, Hu J, Wang Y, Yao X** (2004) NEK2A interacts with MAD1 and possibly functions as a novel integrator of the spindle checkpoint signaling. *J. Biol. Chem.* **279**: 20049-20057

- Lowery DM, Clauser KR, Hjerrild M, Lim D, Alexander J, Kishi K, Ong SE, Gammeltoft S, Carr SA, Yaffe MB** (2007) Proteomic screen defines the Polo-box domain interactome and identifies Rock2 as a Plk1 substrate. *Embo J* **26**: 2262-2273
- Maere S, De Bodt S, Raes J, Casneuf T, Van Montagu M, Kuiper M, Van de Peer Y** (2005) Modeling gene and genome duplications in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**: 5454-5459
- Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T** (2005) Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. *Nucleic Acids Res.* **33**: D54-58
- Mahonen AP, Bishopp A, Higuchi M, Nieminen KM, Kinoshita K, Tormakangas K, Ikeda Y, Oka A, Kakimoto T, Helariutta Y** (2006) Cytokinin signaling and its inhibitor AHP6 regulate cell fate during vascular development. *Science* **311**: 94-98
- Malerba M, Crosti P, Cerana R, Bianchetti R** (2004) Fusicoccin affects cytochrome *c* leakage and cytosolic 14-3-3 accumulation independent of H⁺-ATPase activation. *Physiol Plant* **120**: 386-394
- Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J** (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual / J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis. In. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press*
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S** (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* **298**: 1912-1934
- Mayor T, Stierhof YD, Tanaka K, Fry AM, Nigg EA** (2000) The centrosomal protein C-Nap1 is required for cell cycle-regulated centrosome cohesion. *J. Cell Biol.* **151**: 837-846
- Mellerowicz EJ, Baucher M, Sundberg B, Boerjan W** (2001) Unravelling cell wall formation in the woody dicot stem. *Plant Mol. Biol.* **47**: 239-274
- Menges M, de Jager SM, Gruissem W, Murray JA** (2005) Global analysis of the core cell cycle regulators of *Arabidopsis* identifies novel genes, reveals multiple and highly specific profiles of expression and provides a coherent model for plant cell cycle control. *Plant J.* **41**: 546-566
- Menges M, Hennig L, Gruissem W, Murray JA** (2003) Genome-wide gene expression in an *Arabidopsis* cell suspension. *Plant Mol. Biol.* **53**: 423-442

- Menges M, Murray JA** (2002) Synchronous *Arabidopsis* suspension cultures for analysis of cell-cycle gene activity. *Plant J.* **30**: 203-212
- Meyers BC, Lee DK, Vu TH, Tej SS, Edberg SB, Matvienko M, Tindell LD** (2004) *Arabidopsis* MPSS. An online resource for quantitative expression analysis. *Plant Physiol.* **135**: 801-813
- Michael WM, Ott R, Fanning E, Newport J** (2000) Activation of the DNA replication checkpoint through RNA synthesis by primase. *Science* **289**: 2133-2137
- Morello L, Bardini M, Sala F, Breviario D** (2002) A long leader intron of the *Ostub16* rice *beta*-tubulin gene is required for high-level gene expression and can autonomously promote transcription both *in vivo* and *in vitro*. *Plant J* **29**: 33-44
- Motose H, Sugiyama M, Fukuda H** (2004) A proteoglycan mediates inductive interaction during plant vascular development. *Nature* **429**: 873-878
- Motose H, Tominaga R, Wada T, Sugiyama M, Watanabe Y** (2008) A NIMA-related protein kinase suppresses ectopic outgrowth of epidermal cells through its kinase activity and the association with microtubules. *Plant J.* **54**: 829-844
- Moyle R, Schrader J, Stenberg A, Olsson O, Saxena S, Sandberg G, Bhalerao RP** (2002) Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the *Aux/IAA* gene family in hybrid aspen. *Plant J.* **31**: 675-685
- Nam K, Lee G, Trambley J, Devine SE, Boeke JD** (1997) Severe growth defect in a *Schizosaccharomyces pombe* mutant defective in intron lariat degradation. *Mol. Cell. Biol.* **17**: 809-818
- Nicole MC, Hamel LP, Morency MJ, Beaudoin N, Ellis BE, Séguin A** (2006) MAP-ping genomic organization and organ-specific expression profiles of poplar MAP kinases and MAP kinase kinases. *BMC Genomics* **7**: 223
- Nigg EA** (2001) Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**: 21-32
- Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y** (2002) Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses. *J. Biol. Chem.* **277**: 39655-39665
- Noguchi K, Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y** (2004) Nucleolar Nek11 is a novel target of Nek2A in G1/S-arrested cells. *J. Biol. Chem.* **279**: 32716-32727

- O'Connell MJ, Krien MJ, Hunter T** (2003) Never say never. The NIMA-related protein kinases in mitotic control. *Trends Cell Biol.* **13**: 221-228
- O'Connell MJ, Norbury C, Nurse P** (1994) Premature chromatin condensation upon accumulation of NIMA. *Embo J.* **13**: 4926-4937
- O'Regan L, Blot J, Fry AM** (2007) Mitotic regulation by NIMA-related kinases. *Cell Div.* **2**: 25
- Ooi SL, Dann C, 3rd, Nam K, Leahy DJ, Damha MJ, Boeke JD** (2001) RNA lariat debranching enzyme. *Methods Enzymol.* **342**: 233-248
- Osawa M, Itoh S, Ohta S, Huang Q, Berk BC, Marmarosh NL, Che W, Ding B, Yan C, Abe J** (2004) ERK1/2 associates with the c-Met-binding domain of growth factor receptor-bound protein 2 (Grb2)-associated binder-1 (Gab1): role in ERK1/2 and early growth response factor-1 (Egr-1) nuclear accumulation. *J. Biol. Chem.* **279**: 29691-29699
- Osmani SA, May GS, Morris NR** (1987) Regulation of the mRNA levels of *nimA*, a gene required for the G2-M transition in *Aspergillus nidulans*. *J. Cell Biol.* **104**: 1495-1504
- Osmani SA, Ye XS** (1996) Cell cycle regulation in *Aspergillus* by two protein kinases. *Biochem. J.* **317** (Pt 3): 633-641
- Page RD** (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput. Appl. Biosci.* **12**: 357-358
- Pagel P, Kovac S, Oesterheld M, Brauner B, Dunger-Kaltenbach I, Frishman G, Montrone C, Mark P, Stumpflen V, Mewes HW, Ruepp A, Frishman D** (2005) The MIPS mammalian protein-protein interaction database. *Bioinformatics* **21**: 832-834
- Palaniswamy SK, James S, Sun H, Lamb RS, Davuluri RV, Grotewold E** (2006) AGRIS and AtRegNet. a platform to link cis-regulatory elements and transcription factors into regulatory networks. *Plant Physiol.* **140**: 818-829
- Parry G, Delbarre A, Marchant A, Swarup R, Napier R, Perrot-Rechenmann C, Bennett MJ** (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *Plant J.* **25**: 399-406

- Pedoux R, Al-Irani N, Marteau C, Pellicier F, Branche R, Ozturk M, Franchi J, Dore JF** (1998) Thymidine dinucleotides induce S phase cell cycle arrest in addition to increased melanogenesis in human melanocytes. *J. Invest. Dermatol.* **111**: 472-477
- Peri S, Navarro JD, Amanchy R, Kristiansen TZ, Jonnalagadda CK, Surendranath V, Niranjana V, Muthusamy B, Gandhi TK, Gronborg M, Ibarrola N, Deshpande N, Shanker K, Shivashankar HN, Rashmi BP, Ramya MA, Zhao Z, Chandrika KN, Padma N, Harsha HC, Yatish AJ, Kavitha MP, Menezes M, Choudhury DR, Suresh S, Ghosh N, Saravana R, Chandran S, Krishna S, Joy M, Anand SK, Madavan V, Joseph A, Wong GW, Schiemann WP, Constantinescu SN, Huang L, Khosravi-Far R, Steen H, Tewari M, Ghaffari S, Blobel GC, Dang CV, Garcia JG, Pevsner J, Jensen ON, Roepstorff P, Deshpande KS, Chinnaiyan AM, Hamosh A, Chakravarti A, Pandey A** (2003) Development of human protein reference database as an initial platform for approaching systems biology in humans. *Genome Res.* **13**: 2363-2371
- Pilate G, Déjardin A, Laurans F, Leplé JC** (2004) Tension wood as a model for functional genomics of wood formation. *New Phytol.* **164**: 63-72
- Pines J** (1999) Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell Biol.* **1**: E73-79
- Pnueli L, Gutfinger T, Hareven D, Ben-Naim O, Ron N, Adir N, Lifschitz E** (2001) Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *Plant Cell* **13**: 2687-2702
- Polci R, Peng A, Chen PL, Riley DJ, Chen Y** (2004) NIMA-related protein kinase 1 is involved early in the ionizing radiation-induced DNA damage response. *Cancer Res.* **64**: 8800-8803
- Praseeda M, Pradeep KK, Krupa A, Krishna SS, Leena S, Kumar RR, Cheriyan J, Mayadevi M, Srinivasan N, Omkumar RV** (2004) Influence of a mutation in the ATP-binding region of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II on its interaction with peptide substrates. *Biochem J.* **378**: 391-397
- Price PA, Fraser JD, Metz-Virca G** (1987) Molecular cloning of matrix Gla protein: implications for substrate recognition by the vitamin K-dependent gamma-carboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**: 8335-8339

- Pu RT, Xu G, Wu L, Vierula J, O'Donnell K, Ye XS, Osmani SA** (1995) Isolation of a functional homolog of the cell cycle-specific NIMA protein kinase of *Aspergillus nidulans* and functional analysis of conserved residues. *J. Biol. Chem.* **270**: 18110-18116
- Reichheld J-P, Sonobe S, Clement B, Chaubet N, Gigot C** (1995) Cell cycle-regulated histone gene expression in synchronized plant cells. *Plant J.* **7**: 245-252
- Reichheld JP, Gigot C, Chaubet-Gigot N** (1998) Multilevel regulation of histone gene expression during the cell cycle in tobacco cells. *Nucleic Acids Res.* **26**: 3255-3262
- Rethmeier N, Seurinck J, Van Montagu M, Cornelissen M** (1997) Intron-mediated enhancement of transgene expression in maize is a nuclear, gene-dependent process. *Plant J.* **12**: 895-899
- Richard O, Paquet N, Haudecoeur E, Charrier B** (2005) Organization and expression of the GSK3/shaggy kinase gene family in the moss *Physcomitrella patens* suggest early gene multiplication in land plants and an ancestral response to osmotic stress. *J. Mol. Evol.* **61**: 99-113
- Roberts MR, Bowles DJ** (1999) Fusicoccin, 14-3-3 proteins, and defense responses in tomato plants. *Plant Physiol* **119**: 1243-1250
- Roig J, Mikhailov A, Belham C, Avruch J** (2002) Nercc1, a mammalian NIMA-family kinase, binds the Ran GTPase and regulates mitotic progression. *Genes Dev.* **16**: 1640-1658
- Rupp HM, Frank M, Werner T, Strnad M, Schmulling T** (1999) Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant J.* **18**: 557-563
- Russell CS, Ben-Yehuda S, Dix I, Kupiec M, Beggs JD** (2000) Functional analyses of interacting factors involved in both pre-mRNA splicing and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* **6**: 1565-1572
- Rutledge RG** (2004) Sigmoidal curve-fitting redefines quantitative real-time PCR with the prospective of developing automated high-throughput applications. *Nucleic Acids Res.* **32**: e178

- Ruvinsky A, Eskesen ST, Eskesen FN, Hurst LD** (2005) Can codon usage bias explain intron phase distributions and exon symmetry? *J. Mol. Evol.* **60**: 99-104
- 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*. *Plant J.* **53**: 157-171
- Sawa S, Koizumi K, Naramoto S, Demura T, Ueda T, Nakano A, Fukuda H** (2005) DRP1A is responsible for vascular continuity synergistically working with VAN3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **138**: 819-826
- Scarpella E, Meijer AH** (2004) Pattern formation in the vascular system of monocot and dicot plant species. *New Phytol.* **164**: 209-242
- Scheres B, McKhann HI, Van Den Berg C** (1996) Roots Redefined: Anatomical and Genetic Analysis of Root Development. *Plant Physiol.* **111**: 959-964
- Schonrock N, Exner V, Probst A, Gruissem W, Hennig L** (2006) Functional genomic analysis of CAF-1 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **281**: 9560-9568
- Schrader J, Baba K, May ST, Palme K, Bennett M, Bhalerao RP, Sandberg G** (2003) Polar auxin transport in the wood-forming tissues of hybrid aspen is under simultaneous control of developmental and environmental signals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 10096-10101
- Schultz EA, Haughn GW** (1991) *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **3**: 771-781
- Schultz SJ, Fry AM, Sutterlin C, Ried T, Nigg EA** (1994) Cell cycle-dependent expression of Nek2, a novel human protein kinase related to the NIMA mitotic regulator of *Aspergillus nidulans*. *Cell Growth Differ.* **5**: 625-635
- Shimada M, Namikawa-Yamada C, Nakanishi M, Murakami H** (2005) Regulation of Cdc2p and Cdc13p is required for cell cycle arrest induced by defective RNA splicing in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **280**: 32640-32648
- Sieburth LE** (1999) Auxin is required for leaf vein pattern in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **121**: 1179-1190
- Sieburth LE, Deyholos MK** (2006) Vascular development: the long and winding road. *Curr. Opin. Plant Biol.* **9**: 48-54

- Stals H, Inzé D** (2001) When plant cells decide to divide. *Trends Plant Sci.* **6**: 359-364
- Steindler C, Matteucci A, Sessa G, Weimar T, Ohgishi M, Aoyama T, Morelli G, Ruberti I** (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* **126**: 4235-4245
- Sterky F, Bhalerao RR, Unneberg P, Segerman B, Nilsson P, Brunner AM, Charbonnel-Campaa L, Lindvall JJ, Tandré K, Strauss SH, Sundberg B, Gustafsson P, Uhlén M, Bhalerao RP, Nilsson O, Sandberg G, Karlsson J, Lundeberg J, Jansson S** (2004) A *Populus* EST resource for plant functional genomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 13951-13956
- Surpili MJ, Delben TM, Kobarg J** (2003) Identification of proteins that interact with the central coiled-coil region of the human protein kinase NEK1. *Biochemistry* **42**: 15369-15376
- Swarup R, Friml J, Marchant A, Ljung K, Sandberg G, Palme K, Bennett M** (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the *Arabidopsis* root apex. *Genes Dev.* **15**: 2648-2653
- Taylor SS, Radzio-Andzelm E** (1997) Protein kinase inhibition: natural and synthetic variations on a theme. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1**: 219-226
- The Arabidopsis Genome Initiative** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- The MAPK Group** (2002) Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci.* **7**: 301-308
- Tuominen H, Puech L, Fink S, Sundberg B** (1997) A radial concentration gradient of indole-3-acetic acid is related to secondary xylem development in hybrid aspen. *Plant Physiol.* **115**: 577-585
- Tuskan GA, DiFazio S, Jansson S, Bohlmann J, Grigoriev I, Hellsten U, Putnam N, Ralph S, Rombauts S, Salamov A, Schein J, Sterck L, Aerts A, Bhalerao RR, Bhalerao RP, Blaudez D, Boerjan W, Brun A, Brunner A, Busov V, Campbell M, Carlson J, Chalot M, Chapman J, Chen GL, Cooper D, Coutinho PM, Couturier J, Covert S, Cronk Q, Cunningham R, Davis J, Degroeve S, Déjardin A, dePamphilis C, Detter J, Dirks B, Dubchak I, Duplessis S, Ehrling**

- J, Ellis B, Gendler K, Goodstein D, Gribskov M, Grimwood J, Groover A, Gunter L, Hamberger B, Heinze B, Helariutta Y, Henrissat B, Holligan D, Holt R, Huang W, Islam-Faridi N, Jones S, Jones-Rhoades M, Jorgensen R, Joshi C, Kangasjärvi J, Karlsson J, Kelleher C, Kirkpatrick R, Kirst M, Kohler A, Kalluri U, Larimer F, Leebens-Mack J, Leplé JC, Locascio P, Lou Y, Lucas S, Martin F, Montanini B, Napoli C, Nelson DR, Nelson C, Nieminen K, Nilsson O, Pereda V, Peter G, Philippe R, Pilate G, Poliakov A, Razumovskaya J, Richardson P, Rinaldi C, Ritland K, Rouzé P, Ryaboy D, Schmutz J, Schrader J, Segerman B, Shin H, Siddiqui A, Sterky F, Terry A, Tsai CJ, Uberbacher E, Unneberg P, Vahala J, Wall K, Wessler S, Yang G, Yin T, Douglas C, Marra M, Sandberg G, Van de Peer Y, Rokhsar D** (2006) The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science* **313**: 1596-1604
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1997) ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science* **276**: 1865-1868
- Uto K, Nakajo N, Sagata N** (1999) Two structural variants of Nek2 kinase, termed Nek2A and Nek2B, are differentially expressed in *Xenopus* tissues and development. *Dev. Biol.* **208**: 456-464
- van Hemert MJ, Steensma HY, van Heusden GP** (2001) 14-3-3 proteins: key regulators of cell division, signalling and apoptosis. *Bioessays* **23**: 936-946
- Veit B** (2006) Stem cell signalling networks in plants. *Plant Mol. Biol.* **60**: 793-810
- Vieten A, Vanneste S, Wisniewska J, Benkova E, Benjamins R, Beeckman T, Luschnig C, Friml J** (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development* **132**: 4521-4531
- Vigneault F, Lachance D, Cloutier M, Pelletier G, Levasseur C, Seguin A** (2007) Members of the plant NIMA-related kinases are involved in organ development and vascularization in poplar, *Arabidopsis* and rice. *Plant J.* **51**: 575-588
- Visintin R, Amon A** (2000) The nucleolus: the magician's hat for cell cycle tricks. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **12**: 372-377

- Wang G, Kong H, Sun Y, Zhang X, Zhang W, Altman N, DePamphilis CW, Ma H** (2004) Genome-wide analysis of the cyclin family in Arabidopsis and comparative phylogenetic analysis of plant cyclin-like proteins. *Plant Physiol.* **135**: 1084-1099
- Wang H, Hill K, Perry SE** (2004) An *Arabidopsis* RNA lariat debranching enzyme is essential for embryogenesis. *J. Biol. Chem.* **279**: 1468-1473
- Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill S, Fowke LC** (2000) Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant J.* **24**: 613-623
- Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, Matese JC, Perou CM, Hurt MM, Brown PO, Botstein D** (2002) Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol. Biol. Cell.* **13**: 1977-2000
- Wildwater M, Campilho A, Perez-Perez JM, Heidstra R, Blilou I, Korthout H, Chatterjee J, Mariconti L, Gruijssem W, Scheres B** (2005) The *RETINOBLASTOMA-RELATED* gene regulates stem cell maintenance in *Arabidopsis* roots. *Cell* **123**: 1337-1349
- Wisniewska J, Xu J, Seifertova D, Brewer PB, Ruzicka K, Blilou I, Rouquie D, Benkova E, Scheres B, Friml J** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* **312**: 883
- Xenarios I, Salwinski L, Duan XJ, Higney P, Kim SM, Eisenberg D** (2002) DIP, the Database of Interacting Proteins: a research tool for studying cellular networks of protein interactions. *Nucleic Acids Res.* **30**: 303-305
- Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J, Scheres B** (2006) A molecular framework for plant regeneration. *Science* **311**: 385-388
- Yamaji S, Suzuki A, Sugiyama Y, Koide Y, Yoshida M, Kanamori H, Mohri H, Ohno S, Ishigatsubo Y** (2001) A novel integrin-linked kinase-binding protein, affixin, is involved in the early stage of cell-substrate interaction. *J. Cell. Biol.* **153**: 1251-1264
- Yang J, Adamian M, Li T** (2006) Rootletin interacts with C-Nap1 and may function as a physical linker between the pair of centrioles/basal bodies in cells. *Mol. Biol. Cell* **17**: 1033-1040

- Ye XS, Fincher RR, Tang A, O'Donnell K, Osmani SA** (1996) Two S-phase checkpoint systems, one involving the function of both BIME and Tyr15 phosphorylation of p34cdc2, inhibit NIMA and prevent premature mitosis. *Embo J.* **15**: 3599-3610
- Ye XS, Fincher RR, Tang A, Osmani SA** (1997) The G2/M DNA damage checkpoint inhibits mitosis through Tyr15 phosphorylation of p34cdc2 in *Aspergillus nidulans*. *Embo J.* **16**: 182-192
- Ye Z-H** (2002) Vascular tissue differentiation and pattern formation in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**: 183-202
- Yin MJ, Shao L, Voehringer D, Smeal T, Jallal B** (2003) The serine/threonine kinase Nek6 is required for cell cycle progression through mitosis. *J. Biol. Chem.* **278**: 52454-52460
- Yu J, Wang J, Lin W, Li S, Li H, Zhou J, Ni P, Dong W, Hu S, Zeng C, Zhang J, Zhang Y, Li R, Xu Z, Li S, Li X, Zheng H, Cong L, Lin L, Yin J, Geng J, Li G, Shi J, Liu J, Lv H, Li J, Wang J, Deng Y, Ran L, Shi X, Wang X, Wu Q, Li C, Ren X, Wang J, Wang X, Li D, Liu D, Zhang X, Ji Z, Zhao W, Sun Y, Zhang Z, Bao J, Han Y, Dong L, Ji J, Chen P, Wu S, Liu J, Xiao Y, Bu D, Tan J, Yang L, Ye C, Zhang J, Xu J, Zhou Y, Yu Y, Zhang B, Zhuang S, Wei H, Liu B, Lei M, Yu H, Li Y, Xu H, Wei S, He X, Fang L, Zhang Z, Zhang Y, Huang X, Su Z, Tong W, Li J, Tong Z, Li S, Ye J, Wang L, Fang L, Lei T, Chen C, Chen H, Xu Z, Li H, Huang H, Zhang F, Xu H, Li N, Zhao C, Li S, Dong L, Huang Y, Li L, Xi Y, Qi Q, Li W, Zhang B, Hu W, Zhang Y, Tian X, Jiao Y, Liang X, Jin J, Gao L, Zheng W, Hao B, Liu S, Wang W, Yuan L, Cao M, McDermott J, Samudrala R, Wang J, Wong GK, Yang H** (2005) The genomes of *Oryza sativa*: a history of duplications. *PLoS Biol.* **3**: e38
- Yuan Q, Ouyang S, Wang A, Zhu W, Maiti R, Lin H, Hamilton J, Haas B, Sultana R, Cheung F, Wortman J, Buell CR** (2005) The institute for genomic research Osa1 rice genome annotation database. *Plant Physiol.* **138**: 18-26
- Zanzoni A, Montecchi-Palazzi L, Quondam M, Ausiello G, Helmer-Citterich M, Cesareni G** (2002) MINT: a Molecular INTeraction database. *FEBS Lett.* **513**: 135-140

- Zhang H, Scofield G, Fobert P, Doonan JH** (1996) A nimA-like protein kinase transcript is highly expressed in meristems of *Antirrhinum majus*. *J. Microsc.* **181 (Pt 2)**: 186-194
- Zhao C, Craig JC, Petzold HE, Dickerman AW, Beers EP** (2005) The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the *Arabidopsis* root-hypocotyl. *Plant Physiol.* **138**: 803-818
- Zhiponova MK, Pettkó-Szandtner A, Stelkovics E, Neer Z, Bottka S, Krenács T, Dudits D, Fehér A, Szilák L** (2006) Mitosis-specific promoter of the alfalfa cyclin-dependent kinase gene (*Medsa;CDKB2;1*) is activated by wounding and ethylene in a non-cell division-dependent manner. *Plant Physiol.* **140**: 693-703
- Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W** (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.* **136**: 2621-2632

Annexe 1 - Table S1: Plant NIMA-related kinases (Neks) protein sequences

<i>Arabidopsis thaliana</i>	Representative gene model	Protein Sequence
AtNek1	At1g54510	MEQYEFLEQIGKGSFGSALLVRHKHEKKKYVLKKIRLARQTQTRRSAHQEMELISKMRHPFIVEYKDSWVEKAC YVCIVIGYCEGGDMAQAIAIKKSNGVHFQEEKLCKWLVLQLLMGLEYLHSNHILHRDVKCSNIFLTKEQDIRLGDFGL AKILTSDDLTSVVGTPSYMCPPELLADIPYGSKSDIWSLGCCYEMAYLKPAFKAFDMQALINKINKTIVSPLPA KYSGPFRLVKSMLRKNPEVRPSASDLLRHPHLQPYVLDVKLRNLNLRKTLPPPELPSKRIMKKAHFSEPAVTC PAFGERQHRSLWDRALNPEAEEDTASSIKCISRRISDLSIESSSKGTLICKQVSSACKVSKYPLAKSSVTSRR IMETGRRSDHLHPVSGGGTTSKIIPSARRTSLPLTKRATNQEVAAAYNPVIGILQNVKSPEYSINEPQVDKIAIFP LAPYEQDIFFTPMQRKTSSKSSSVSDRSITKDKCTVQHTTWQGIQLNMVDNISDGSSSSDQNATAGASSHTTSS SSRRCRFDPSSYRQRADALEGLLEFSARLLQEGRYDELNVLLKPFPGPKVSPRETAIWIAKSLKENRDKTKMVDL NVSREIPHVGLL
AtNek2	At3g04810	MENYEVLEQIGKGSFGSALLVRHKHEKKLYVLKKIRLARQTGRTRRSAHQEMELISKIHNPFFIVEYKDSWVEKGC YVCIIGYCKGGDMAEAIKKTNGVHFTEEKLCKWLVLQILLALEYLHANHILHRDVKCSNIFLTKDQDIRLGDFGL AKVLTSDDLASSVVGTPSYMCPPELLADIPYGSKSDIWSLGCCMYEMTAMKPAFKAFDMQGLINRINRSIVPPLPA QYSAAFRLVKSMLRKNPELRLPSAAELLRQPLLQPYIQKIHLKVNDPGSNVLPQWPESESARRNSFPEQRRRPA GKSHSFGPSRFRGNLEDSVSSIKKTVPAYLNRRERQVDLSTDASGDGTVVRRTSEASKSSRYVPVRASASPVRPRQ PRSDLGQLPVSSQLKNRKPAAALIRRASMPSSRKPAAEKDLSLYISKTSFLHQINSPDVSMNAPRIDKIEFPLASY EEEEFPVVRGKSKKASSRGSYSPPPEPPLDCSITKDKFTLEPGQNREGAIMKAVYEEDAYLEDRSESSDQNATA GASSRASSGVRQRFDPSYQRAEALEGLLEFSARLLQDERYDELNVLLRPFPGPKVSPRETAIWLSKSFKETT TTKLGD
AtNek3	At5g28290	MEHYEVLEQIGKGSFGSALLVRHKHEKKLYVLKKIRLARQTGRTRRSAHQEMELISKIRNPFIVEYKDSWVEKGC YVCIVIGYCKGGDMAEAIKANGVEFSEEKCKWLVLQLLMALEYLHASHILHRDVKCSNIFLTKDQDIRLGDFGL AKILTSDDLASSVVGTPSYMCPPELLADIPYGSKSDIWSLGCCMYEMTALKPAFKAFDMQGLINRINRSIVAPLPA QYSTAFRSLVKSMLRKNPELRLPSASDLLRQPLLQPYVQKVLLKLSFREHDTLPSESESSRRSSYPQQRKRTSGKSVS FGPSRFGVDQEDSVSSVKPVHTYLHRHRPVDLSANDTSRVVVRPAVSSVVSNSKYPVRSNQPKSGGLLKPAV VTRRASLPISQKPAKGTKDSLYHPNIGILHQLNSPDVSNSPRIDRIKFPPLASYEEMPFPVVRKKGSSRGSYS PPPEPPLDCSITKDKFTLEPERETKSDLSQNATAGASSRASSGASRRQRFDPSYRQRAEALEGLLEFSARLLI DERYDELNVLLKPFPGPKVSPRETAIWLSKSFKESSPSNLEED

AtNek4	At3g63280	<p>MERYEVLEQIGKGSFSGSALLVVRHKQERKKYVLKKIRLARQSDRARRSAHQEMELISTVRNPFVVEYKDSWVEKGC YVCIVIGYCQGGDMTDTIKRACGVHFPPEEKLCQWLVLQLLMALDYLHSNHILHRDVKCSNIFLTKEQDIRLGDVFL AKILTSDDLTSVVGTPSYMCPPELLADIPYGSKSDIWSLGCCMYEMA AHKPPFKASDVQTLITKIHKLIMDPIPA MYSGSFRGLIKSMLRKNPELRPSANELLNHPHLQPYISMVYMKLESPPRRSTFPPLQFSERDATLKERRRSSFSNDR RLNPSVSDTEAGSVSSSGKASPTPMFNGRKVSEVTVGVVREEIVPQRQEEAKQSGAARTPRVAGTSKASTQRT VFKHELMKVSNPTEERRRVSLPLVVENPYTYESDITALCSLNSPDVSVNTPRFDKIAEFPEIDIFQNQNRETASRR EVARHSFSSPPCPPHGEDNSNGSITKDKCTVQKRSVSEVKQRRFDTSSYQQRAEALEGLLEFSAKLLQQERYDEL GVLLKPFGAERVSSRETAIWLTKSFKEASV</p>
AtNek5	At3g44200	<p>MESRMDQYELMEQIGRGAFGAAILVHHKAERKKYVLKKIRLARQTERCRRSAHQEMSLIARVQHPYIVEFKEAWV EKGCYVCIVTGYCEGGDMAELMKKSNVGYFPPEEKLCQWFTQLLLAVEYLHSNYVLHRDLKCSNIFLTQDQDVRLG DFGLAKTLKADDLTSVVGTPNYMCPPELLADIPYGFKSDIWSLGCCYEMAAYRPAFKA'FDMAGLISKKSTHQGN VKEEPRVSARKMASEILKHPYLQPYVEQYRPTLSAASITPEKPLNSREGRRSMAESQNSNSSSSEKDNFVSDKNI RYVVP SNGNKVTE TD SGFV DDED IL DHVQ QSAENGNLQSVSATKPDGHGILKPVHSDQRPDV IQPRHPKTIRNIM MVLKEEKARENGSPMRSNRSPSSVPTQKNNVETPSKIPKLG DIAHSSKTNASTPIPPSKLASDSARTPGSFPK HHMPVIDSSPKLKPRNDRISPSPA AKHEAE EAMSVKRRQRT PPTLPRRTSLIAHQSRQLGADISNMAAKETAKLH PSVPSESETNSHQSRVHASPVSTTPEPKRTSVGSAKGMQSESSNSISSLSMQAFELCDDASTPYIDMTEHTTPD DHRRSCHSEYSYSFPDISSEMIRRDEHSTSMRLTEIPDSVSGVQNTIAHHQPEREQGSCPTVLKDDSPATLQSY EPNTSQHQHGDDKF' TVKEFVSSVPGPAPLPLHV E PSHQVNSHSDNKT SVMSQNSALEKNNSHSHPHPVDDV IHV IRHSSFRVGS DQPVME SVEVGVQNVDMGKLINVV RDEMEVRK GATPSE SPTTRS I ISEPDSRTEPRPKPEPDI TN YSETKSFNSCSDSSPAETRINSFVPEEETTPTPPVKETLTDIKSFRQRAEALEGLLELSADLLEQSRLEELAIVLQ PFGKNKVS PRETAIWLAKSLKGMIEDINNNNSSGSSRNCS</p>
AtNek6	At3g20860	<p>MANKISETASKMDDYEVVEQIGRGAFGSAFLVIHKSERRKYVVKKIRLAKQTERCKLAAIQEMSLISKLKSPYIV EYKDSWVEKDCVCIVTSYCEGGDMTQMIKKSRGVFASEEKLCRWMVQLLLAIDYLHNNRVLHRDLKCSNIFLTKE NEVRLGDFGLAKLLGKDDLASSMVGTPNYMCPPELLADIPYGYKSDIWSLGCCMFEVA AHQPAFKAPDMAALINKI NRSSLSPLPVMYSSSLKRLIKSMLRKNPEHRPTAAELLRHPHLQPYLAQCQNLSPVFKPVVSKSEHNTNENRTGL PPKTKSAKTPIKHNQESEETEKKNKDTSSSSKDKERPAKSQEMSVISTLTLLREFQKSPKSEERA EALESLLEL CAGLLRQEKFDELEGLKPFGDETVSSRETAIWLTKSLMNVKRKQNDDE' T NI</p>

AtNek7	At3g12200	<p>MQMEANDCQEEHKFTLDNYHVVEQVRRGKSSSDFFVVLHDIEDKKYAMKKICLAKHTDKLKQTALQEMKLLSSLKN PYIVHYEDSWIDNDNNACIF'TAYYEGGNMANAIKKARGKLFPEERIFKWLAQLLLAVNYLHSNRVVMHMDLTC SNIFLPKDDHVQLGNYGLAKLINPEKPVSMVSGISNSMCPEVLEDQPYGKSDIWSLGCCMYEITAHQPAFKAPDMAG LINKINRSILMSPLPIVYSSTLKQMIKMLRKKPEYRPTACELLRNPSLQPYLLQCQNLSPYILPVFPKIPVNSPK DKARRNSLPGKFGKERVSREKSEVSRLENLYPFWTNTETGSSSSSQPASSTNGAEDKLETKRIDPSCDTLKISE FTSQKSDLESLIDPDIAVYSTETPAEENALPKETENIFSEESQLRDVDVGVVSAQEVACSPPRAIIEEAETQEALPK PKEQITVPISSVAHSSTEVAANKDHLSGSLEGDKAKMVKLTASEMSSVLSKLTCLGPPQSKERADALECLLEKCA GLVKQEKYEELAGLLTPFGEDGVSARDTAIWFAKTLLSSDKLNQGT</p>
--------	-----------	---

Populus trichocarpa	Representative gene model	Protein Sequence
--------------------------------	--------------------------------------	-------------------------

PtNek1	eugene3.007000 83	<p>MEQYEVLEQIGKGSFGSALLVKHKHEKKKYVLKKIRLARQTDERSRRAHQEKELISRIRNPFIVEYKDSWVEKGC YVCI IIGYCEGGDMAEAIKKANGVHFPEEKLCWLVQLLMALDYLHMNHILHRDVKCSNIFLTKGKDIRLGDFGL AKILTSDDLASSVVGTPSYMCPPELLADIPYGSKSDIWSLGCCYEMTSLKPAFKAFDMQALINKINKSIVAPLPT KYSGAFRGLVKSMRKNPELRPGAAELLRHPHLQPYVLKIHLMNSPRQNTLPFQWPEPHYMKKTKFLVPEDNPL KAHREKRYSLNDRALNPSISAAEQDSVCSTEGIHDTPSYLNRLSDSSIESSHEGTVICRSIASKPSNIAKT'TK PAPT'KASVT'RRRTEPVKKRESL'PVTRTP'TKKSNPT'RRRSL'PLPSRTAI'QNSARGT'NNSILLQ'IKSPDVSVNAP RIDRIA'EFPLASYE'EPFLP'FRRTS'STSAQ'GSSNSLHHGDRSIT'KDKCTVQI'SDRTS'AKPNFTEAWQGI'EHGMFQV DEENG'SNSSNQ'NATAGASSHTSSDM'RRRRFDTSS'FQQRAE'ALEGLLEF'SARLLQ'DARYDELGVLLK'PF'GPGK'VSP RETAI'WLT'KSF'KENTAK'PED</p>
--------	----------------------	--

PtNek2	eugene3.001303 82	<p>MEQYEILEQIGKGSFGSALLVRHKHEKKKYVLKKIRLARQTDERSRRAHQEKELISRIRSPFIVEYKDSWVEKGC YVCI IIGYCEGGDMAEAIKKANGMLFSEEKLCWLVQLLMALDYLHMNHILHRDVKCSNIFLTKQQDIRLGDFGL AKILTSDDLASSVVGTPSYMCPPELLADIPYGSKSDIWSLGCCYEMTSLRPAFKAFDMQALINKINKSIVAPLPT KYSGAFRGLVKSMRKNPELRPGAAELLRHPQLQPYVLKIHLMNSPRQNTLPFQWPEPHYMKKTRFLVPEDNPR KVHRDKRYSLGNDRALNPSISVAEQDSVCSTEGIHDTPIYLNRRRLSDSSIECSQGTVICRSIASKPSNSAKTPKL TPTKASVTIKRRTESARKCESLPVTRKTPTKKSNPSARRASFPLPSKGRIQNSPSGTNISILSQIKSPDVSVNAP RIDRMA'EFPLASYDE'PFLP'IRKTS'STSARG'SSNSLRHGDCSIT'KDKCTVQL'SDRTS'ARP'NLTEAWQGI'ELGMFQV DEENG'SNSSNQ'NATAGASSRTSSD'TRQRR'FDTSSL'QQRAE'ALEGLLEF'SARLLQ'AARYDELGVLLK'PF'GPGK'VSP RETAI'WLT'KSF'KENTAK'PED</p>
--------	----------------------	---

PtNek3 gw1.II.3414.1
MEQYEILEQIGKGSFGSALLVVRHKHEKKKYVLKKIRLARQTDRTRRSAYQEMELISKASNPFIVEYKDSWVEKGC
YVCI IIGYCEGGDMAEAIKKASGVHFPPEEKLCCKWLVLQLLMALDYLHANHILHRDVKCSNIFLTKDQDIRLGDVFLG
AKMLTSDDLASSVVGTPSYMCPPELLADIPYGSKSDIWSLGCCYEMAAHKSAPKAFDIQTLINKINKSIVAPLPT
VYSGPLRGLIKSMLRKNPELRPSAAELLGHPHLQPYLLKIHKLKLNPRRNTFFVIEWSDFVVKASFLDPQAVPS
FTTREKRRSFNDRALNPSISGTEQDSDPHSSQRDQESPAP IYLNQRFTELSVGVVHEEFGNTAAKFSTYARTPRL
MPSKISATPRRQSTPSKISYITSKRDSLPSCTTVSKSSHTARRASLPFPTRAAAAAGTQYKASHGLLHSMDS
NVSVNAPRIDKIAEFFPLASSEDPLIPIHGTSTSAQFSSSPYSVDCSITKDKCTVQVLERAVSKHRVTDACQRIGS
ECSEHNPTSGVSSRSSSDSRQRRFDTSYQQRRAEALGLELLEFSARLLQQRFAELGVLLKPFGEKVS PRETAI
WLAKSFKETAV

PtNek4 gw1.IX.4562.1
MESRMDQYEIMEQIGRGAFGAAIIVHKKSERKKYVLKKIRLARQTERCRRSAHQEMALIARIQHYPYIVEFKEAWW
EKGCVCI VTYGCEGGDMAELMKKSNVYFPEEKLCCKWFTQLLLAVEYLHGNFVLRDLKCSNIFLTKEQDVRIG
DFGLAKTLKADDLASSVVGTPNYMCPPELLADIPYGFKSDIWSLGCCMYEMAARRPAFKAFDMAGLISKINRSSIG
PLPSCYSPSLKTLIKGMLRKNPEHRPNASEILKHPYLQTYVDQYRPSFSPPTSCSPEKPIPRSRRESRRSMDESQT
SNSSSSDKDSLPSDDRNIPAVVSNCDNKATDIDLASVGDDEGTKEPMPSEERSPNVICVMNEQRMKPSHNEH
GCNVEPKQPKTIKGIMMALKEGKPRENSSLSRGNHTKSGSAPTQRSNIEASPKPLIPNALASGLKSNADTPTVAP
AKAALDSAKQVQGSHPKHLPI IESSPKTKLRHDGTPPPGPIKHVDDGLAMKPRQRTPNLFRSSFPGRTRQTG
ADVPNGNMKLSPTTEKNQEPENTYQVPDGRPYFSKEVVSQESQKALFRACKGKQAESSNSVSSSMSIQSFELCDDAT
TPFVAMPEQTLPNHEAVICTESLENHPPGCSPATTLHSGMSENLSWENSACAGCAHKSILCSEETSDVVTDLHKK
TVGDGREGVSSALNLIVSSFEERFICKDNTQLSRPSTGPDVMPQSNLISASGGDDKFTVRELLSPVSETTPSIT
SPMSTSQKNLQSEKAAIILQNSTVEKPTAAHLSPAFDDVIHVIRHSSFRVGTQEPAMETVEMGIQNVDVGKLLNVV
GDELEMRNVSTPMALKSSNCSEALSLKSSLSDFHSIKEIDLNRNISPPLVPQFDLSELPKSNSPVTEEEAAAARETLD
VKSFRQRAEALGLELLELSADLLQQRLEELAVVLKPFGEKDKVSPRETAIWLAKSLKGMMAEDSGRSS

PtNek5 gw1.I.662.1b
MESRMDQYEIMEQIGRGAFGAAIIVNHKSEKKKYVLKKIRLARQTERCRRSAHQEMALIARIQHYPYIVEFKEAWW
EKGCVCI VTYGCEGGDMAELMKKSNVYFPEEKLCCKWFTQLLLAVEYLHGNFVLRDLKCSNIFLTKEQDVRIG
DFGLAKTLKADDLASSVVGTPNYMCPPELLADIPYGFKSDIWSLGCCMYEMAARRPAFKAFDMAGLISKINRSSIG
PLPPCYSPSLKTLIKGMLRKNPEHRPSVRLKNYASEILKHPYLQPYVDQYRPSFSPPTSLSSEKRLPRSRRESRRS
MAESQNSNSSSSDKDSLSSERNIPAMVSNCDNKATDIDLASFDDDEGAEQMPCEENNLNVRIVKMNEQRMK
PCHDEIGCNVEPKQPKTIKSIIMMALKEGKPRENGSPMRGNRTKTSASTQRSNIEASPKVLRPNALASGLKFNAD
TPTVAPAKAALDSAKRIQGSHPMKHLPI IESSPKTKPRYDGI PPAGPSKHVDDGLAVKPRQRTPPNLFQRSSFP
GRTTQIGAGVPNGNMKLCPTETSEEPESTSYQVPDGRPYSSSEEVSPESQRALVGACKGMQTESSNSVSSSVSIQA
FELCDDATNPFVAMPEQTPPNHEAVICTENLEHYPPSCSPATTSYSGMSENLSGQNSECGHKSILYSVEASNVI
DLHKKTIVGDGREVESSALNPTAPSSEEIFICENNTQLSRLSAIPETVPQSNLISASGGDDKFTVRELLSSVSET
TTSITSP ISTGQKNMQPEKAMILQNSTTEKPAAAHLSPAFDDVIHVIRHSSFRVGTQEPAMETVEMGVQNVVVGK
LLNVVRDELEMRNVSTAVTLKSSNCSEAVSLKSSISDQSGTKEIDLNRNIEIASVPQSDISELPKPNSSI SEEEAPA

		KETLDVKSFRQRADALEGLLELSAELLQQSRLEELAVVLKPFPGKDKVSPRETAIWLAKSLKGMIEESGRSS
PtNek6	grail3.0152000 301*	<p>MEADAAEVKSKMEDYEVIEQIGRGAFGSAFLVLHKTETKKYVLKKIRLAKQTEKFKRTAHQEMNLIAKLNNPYIV EYKDSWVDKGNCVCIVTGYCEGGDMAAIKKGARGIFFPEEKLCCKWLAQLLLAVDYLHSNRVLHRDLKCSNIFLTK ENDIRLGDFGLAKLLNTEDLASSVVGSPNYMCPPELLADIPYGYKSDIWSLGCCMFEIAAHQPAFRAPDMAGLINK INRSCISPLPIVYSSSLKQIKSMLRKNPEHRPTAAELLRHPHLQPHLLRCRNASSVFLPVYPINNSKEKTRRKS LPAKLSVGKDNRDKDVGASKQPEYEPFFERNVEAQRSNLPQNDKPTSMSSTEYSLENKTVDPPTSCSVEVSDGPKD SSTDSETSVCNGEKQADCSSPPQKDGTEIESTSESI PNSQHEADCSSPPQKDGTEIESTSESI PNSQHEEEEEPSA LRFQDLQEVVDKIVTSKDQATFCSGQFPPEEVQTEGKGDIVDETRKLEMPSLSCANHDAASDDKSPSTVNEPYAE ALQKPESPDVYTESTHIEYLSSESNDVLPCKDEIQAKPENNNCSMDTEKDDIHAMTNAQLLSTLAALTGDESKSE WENPSQQRADALESLLELCARLLKQEKIDELAGVLKPFGEEMVSSRETAIWLTKSLMSQQKLNEXT</p>
PtNek7	grail3.0004013 301*	<p>MEADTGEVSKSKMEDYEVIEQIGRGAFGSAFLVLHKTETKKYVLKKIRLAKQTEKFKRTAHQEMNLIAKLNNPYVV EYKDSWVDKGNCVCIVTGYCEGGDVAGIKKGARGIFFPEEKLCCKWLAQLLLAVDYLHSNRVLHRDLKCSNIFLTK DNDIRLGDFGLAKLLNTEDLASSVVGTPNYMCPPELLADIPYGYKSDIWSLGCCMFEIAAHQPAFRAPDMAGLINK INRSTISPLPIVYSSSLKQIKSMLRKNPEHRPTAAELLRHPHLQPHLLRCRNASSVFLPLHSINNSKEKTRRKS LPAKLSAGKDNNDKVEGASKRKENHPFEINMEAHRSNSHQIDKPTSMSSTDDSLGNKTVDPPTSCSVEVSDGPKD SSTDSETSVCNGEKQAYCSSPPQKDGTEIESTSESI PNSQHKKEEPSAVHFQNLQEVDAKIVTTKDQAAFCGQIP EEVQTEGQGDALHETGKPEIPSLSCANHDASSDDKSPSAVNEPSAEQAQCSQKPESPDVYTESAHTDYLSSES DVLPCKNKIRAKPENDNCSTETQKDDIHAMSNAQLLRLTAAALTGEETKREWENPSQQRADALESLLELCARLLKQ EKIDELAGVLKPFGEEMVSSRETAIWLTKSLMSKKGNGGT</p>
PtNek8	estExt_fgenesh 1_pm_v1.C_LG_I 0105*	<p>METKNKEMVSKMDDYEVIEQIGRGTFGAAFLVLHKFENKRYVLKKIRLAKQTEKFKQTAYQEMNLI SKLNNPYIV QYKDSWVEKESYVCIVTTSYCEGGDMAQMIKKARGTYLPEEMLCRWLTQLLALDYLSNRVLHRDLKCSNIFLAK DGNIQLGDFGLAKLLNKEDLASTIVGTPNYMCPPELLADIPYGYKSDIWSLGCCMFEIAAHQPAFRASDMAGLINK INRSSISPLPTAYSSSTLKQLIKTMLRKSPEHRPTAAELLRHPHLQPYLAQCQNLSPVFLPVTSEYSCTDKPRGTR LPNKSSVHKNAIALKASPCKEFCFNQEKVGAFAQRVAANDSPKSAEQTEKVNSGTSSASIAARTHHEEKQEIAS EKSQIVQEKLCGVGQAGMECKSASSGNSKRMEKLSADSTGYVGLAGYKKASALAMDDQTRHDLELEPEFCKPPTV TDMKSTPSKSKPPHGNDRQKELNRSPSDISSVSSLTSLHGDETKINWNPQSLQRADALESLLEICATLVRQERY EELAGVLRPFSEEAVSSRETAIWLTKSLMKLHKKGNAAQQ</p>
PtNek9	estExt_fgenesh 4_pm.C_LG_III0 643*	<p>METKNKEMVSKMDDYGLIEQIGRGIFGAAFLVLHKFENKRYVLKKIRLAKQTEKFKQTAYQEMNLI SKLNNPYIV EYKDSWVEKESYVCIVTTSY CAGGDMAQMIKKARGTYLPEEKLCCKWLTQLLLAVDYLHSNRVLHRDLKCSNIFLTK DGNIQLGDFGLAKLLNKEDLASTIVGTPKYMCPPELLADIPYGYKSDIWSLGCCMFEIAAHQPAFRAHDMAGLINK INRSSISPLPAAYSSSTLKQLIKTMLRKSPEHRPTAAELLRHPHLQPYLAKCQNLVFLPVKSEYFSLDKPKGTR LPNKSSVHKNNIGLKASPSKGRCFKQDAFEQKVAASDLYNSAEKTESANSETSSASIAARTHPEDEKTEIASKKS QIVQEKLCGAGQASMEFKNASLGI CKRMEKLS SEDSTGYVGLSGYKKASASAMGDKTGHMELEPKFCKLPAVTEM</p>

KSTPSKPPCGNDVVGQKEMNRTPSDISLISSLTSLHGDEIKIEWNPQSLQRADALESLLEICANLLRQERYEELSG
VLGPFSEEAVSSRETAIWLTKSLMKLEKNGNGAA

<i>Oryza sativa</i>	Representative gene model	Protein Sequence
OsNek1	Os03g43590	<p>MEQYEVLEQIGKGAFGSALLVRHKVEKKKYVLKKIRLARQTDRTRRSAHQEMQLIATVRNPFIVEYKDSWVEKGC YVCI IIGYCEGGDMAEAIKRATGDHFSEEKLCWKLVQLLMALDYLHANHILHRDVKCSNIFLTRDQSIRLGDFGL AKILTSDDLASSVVGTPSYMCPPELLADIPYGTKSDIWSLGCCYEMTALRPAFKAFDMQALISKITKSIVSPLPT RYSGAFRGLIKSMLRKSPEHRPSAAELLKHPHLQPYVLQVHLKSSPARNIIPSHQSPIDKVKKMTFPTESMCRSK GRRNSLGNERTVTFSSKPSPERKFTSSIQSIKDYSTTRSVKDLSDVSLVEEVSSKTTFTTRTSSIVKTPKRTPSK TITTPQLEPPKVSYNRVNRSELLSRTPVNR SARVIRRASLPLPLPSSETPKRGVSSISILEQLESPDVSVNSPRI DRIAEFPLASSEDPPFLKLHGRRSPTPTPQHCVIIDQSIITKDKCMVEAFHIIDVDDDDGRSDSSSGRNMAAAAASS RAGSSESTRQRRFDTSYQQRAEALEGLLEFSAQLLQQERYDELGVLLKPFPGPEKVSRETAIWLTKSFKETGL</p>
OsNek2	Os12g41180	<p>MDQYEVLEQIGKGAFGSALLVRHKLEKKKYVLKKIRLARQTDRTRRSAHQEMQLIATVRNPFIVEYKDSWVEKGC YVCIVIGYCEGGDMAEAIKRANGTYFSEEKLCWKLVQLLMALDYLHANHILHRDVKCSNIFIARDQSIRLGDFGL AKILTSDDLASSVVGTPSYMCPPELLADIPYGTKSDIWSLGCCYEMTALRPAFKAFDMQALINKITKSIVSPLPT KYSGAFRGLIKSMLRKSPEHRPSAAQLLKHPQLQPYVLQVQLKSSPTRNILPIHQSLTDKVKKMTFPDSDVDSAR RRMARRNSLGNERTVTFSSKPSPERNSVSSSTRSIEKYTTTQSVKGLSVDSSSEAGDEVTSKAIITKTSSILRTPKSL PAKTYTARNQLEPPKTSYNRTYRSELPSKTTPNKIARPARRASLPLSTYETPTKRSISILEQLDSDPDVSVNAPRI DRIAEFPLASSEDPLLP IHNKLSPGHGSCSTPPFINRSITKDKCTIQVLRITDGDNGSDSSGRNATAASSRGSNDS RQQRFDTSFQQRAEALEGLLEFSAQLLQQERYEELGILLKPFPGPEKASRETAIWLTKSFKETAS</p>
OsNek3	Os07g08000	<p>MEQYEVLEQIGKGSFGSALLVRHKVEKKRYVLKKIRLARQTDRCRRSAHQEMELIAKVRNPYIVEYKDSWVEKGC YVCIVIGYCEGGDMSEAIKKANSNYFSEERLCMWLVQLLMALDYLHVNHILHRDVKCSNIFLTRDQNIIRLGDFGL AKVLTSDDLTSSVVGTPSYMCPPELLADIPYGSKSDIWSLGCCLYEMTALKPAFKAFDMQTLINKISKSVLAPLPT IYSGAFRGLIKSMLRKS PDHRPSAAELLKHPHLQPFVLELQLKSSPARNLFPDITNKASCSDDENNWKAKYSKSHS FKVDRIVKVDKVAANNGHPSSTGTAKDYQELLKQPMDELLGQLTEKVVDEVIHGNSRVTKSPAPT PRRASSTPR IRLEPSKTFHARAAETPPSKCSLERASQPTRRASTPVNMLQTPEKRQGADILTRLKS PDVSVNSPRI DRIAEFPI PSFDDEQLHPTFKLKYPPSITDQSIITKDKCTFQVLRSDSSKNHTGDS SDPSILGTD SNPLITSSSDWMKQRRFD TTSYRQRAEALEGLLEFSAQLLQQERFEELGILLKPFPGPKASRETAIWLSKSFKGTGL</p>

OsNek4 Os05g36960
MESRMDQYEIMEQVGRGAFGAAIILVNHKIERKKYVLKKIRLARQTERCRKSAHQEMALIARLQHPYIVEFKEAWV
EKGCYVCIVTGYCEGGDMDELMKKLNGTYFPPEEKLLKWFAQLVLAVDYLHSNYVLHRDLKCSNIFLTKDQDIRLG
DFGLAKTLKEDDLTSSVVGTPNYMCPPELLTDIPYGFKSDIWSLGCCMYEMAAHRPAFKAFDMAGLISKINRSSIG
PLPACYSSSMKTLIKSMLRKSPEHRPTASEILKNPYLQPYVNQCRPLSDAPTPIRMPEKPLSTSRSNQRCTSESQ
SSSISCSIDIDSTQSSDRSTSGGAPSTDSKLNDIRSIQDADRADSDEKCVTPEDLRGNKNISGAELKRQDSSKSVH
QHHRGESKQPKIEEKIMTTLREESRLRENNSPVSSSGVKLTSAVSNKNQAEQSSESSRPHSGVSYSSKFGDISSN
GWTNTSDECVDPVQVPLQLKQLSPTVEHCPKLNKSGSSTPEPAKQIAENGSSASGMSKTKSSPSSRRPSPQRQT
VAGIPIVPPFTVSKRAHIKAESEKTPPRPAHSPNNSLHNLPLIPISTNLSEENIKLGNSQAMPAPLEFVTAASKE
DISFYNSVDCVEKAEPSEVFESNSPAYLTPPWTGPVLDKGENGLIAIPCSEIHTGTLQKSMASNDSSLSPP
LDTFYLSFEQEFVCKDDSQSSKHGSAVTLISGEDKFTVQELLASTPVI SPFVSSTSNLTPEDKSSYQSFKKQSD
SHSGPPVDVPAQTIRLNSFLVSEWPTSETVQGEARDAASKLLNVVREDFDVRSSSCSTSTQPSGQTPVRSKLN
VPETNLASNISIPSI SEAVRLSTAMDVKPYTSEASNGVKEEASPAKEALDVT SFRQRAEAEGLLELSADLLENN
RLEELAIVLQPF GKKNKVS PRETAIWLARSFKGMMNEEGRLSM

OsNek5 Os01g64490
MDSRMDQYEVMEQIGRGAFGAAIILVNHKTEKKKYVLKKIRLARQTERCRKSAHQEMALIARLQHPYIVEFKEAWV
EKGCYVCIVTGYCEGGDMAELMKKANGTYFPPEEKLLKWFAQLALAVDYLHSNFVLRDLKCSNIFLTKDQDIRLG
DFGLAKTLKADDLTSSVVGTPNYMCPPELLADIPYGFKSDIWSLGCCMYEMAAHRPAFKAFDMAGLISKINRSSIG
PLPPCYSPSMKSLIKSMLRKSPEHRPTASEILKSPYLQPYVNQYRPFADISHPIHSLEKPI TSSRSSQKSMGSGQ
CSSISGSDIDS IQSSERN TSGPSTSSNNTIDTEGAEATDHVSVKNCSRSDDVKSNKETVGP ELERQDSSKSIHVD
QRPRNEIKQPKI IKKILTLREESKLRQNNSP IRASRVKLNSPSNREQLSDDSKHSSDISSSSKSSEVTSRESAK
VICEPVKRAQASPLKHLSPIVEHSPKAKIKQDEPLQDPQAMEDVDAAVGKVKNRTPPSYSRRLSIPRRRPL
GAESPLHADTKRAHNKVIKERAKSPCRPVHGPNDNDIIEPPGPFMAPPSPPLGGVQMKVGNARAKSAPPRAVSIKED
SSDCSSSTIAYAENTELSEPSKQDSSAQLVSSCKCSIPDAAIQKHDLTAMPSSSELNTTNFQKSMASNDVCENLA
LEPSSDISEQVSIFKDNVPCSKISQSTANAI VQNDKFTVQELLSSVADIAPFVSTKNFALEKGSPP IQSLERT
SSPHLNPPIEDVIHVIRHSSFRVCGEQAVAENAEMGVQSSDVGKLLNVVREEVDSRSIPSNLVP HRLPDCAAPK
PNISETNTISSKTACSDVVKFLTVPEVNSTTTAINNGFKEEASPTKEILLDVKSFRQRAEAEGLLELSADLLQHN
RLEELAVVLKPF GKDKVSPRETAIWLAKSFKGMMNDEASRSSM

OsNek6

Os02g37830

MEQYEVVEQIGRGAYGSAYLVVHKGERKRYVMKKIRLSKQNDKFQRTAYQEMSLMASLSNPYIVEYKDGWVDEGT
SACIVTSYCEGGDMAERIKKARGVLFSEERVCRWFTQLLLALDYLHCNRVLHRDLKCSNILLTKDNNIRLADFGL
AKLLMEDLASTIVGTPNYMCP EILADIPYGYKSDIWSLGCCMFEILAH RPAFKAADMASLINKINRSSISPM PPI
YSSSLKQIVKSM LRKNPEHRPTAGELLRHPYLQPYLAESCSCSPIYLPVKPTKSNLGD KQQSRKPGSGRKR IKT
NGSSEALETAAEQAVDTRDNSTYISEESSPKSAVKLAHSDSTPAEWDHLNIVQQRADALESLLELCAKLLKQERL
EELAGVLRPFGE GAVSSRETAIWLTKSLMTPPKLEGSPKLT

*These poplar representative gene models are based on JGI genome assembly v1.1 and do not match exactly with our predicted sequence. The divergences do not occur between the catalytic domain predictions (ie. **kinase domain**). The differences are observed between C-terminal extension predictions, ranging from 50% to 90% identity.

Annexe 2 - Table S2: Exons-introns lengths and intron phase

from JGI *Populus trichocarpa* genome assembly v1.0 (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home.html>)

Intron length represented in *italic* and underlined have been halved while drawing the diagram presented in Figure 3

PtNek1 scaffold_70:540256-545281		length	PtNek2 LG_XIII:2640246-2645820		length	PtNek3 LG_II:3204043-3208875		length			
exon	1	86	86	exon	1	86	86	exon	1	86	86
intron	87	234	147	intron	87	234	147	intron	87	275	188
exon	235	302	67	exon	235	302	67	exon	276	343	67
intron	303	708	<u>405</u>	intron	303	776	<u>473</u>	intron	344	743	<u>399</u>
exon	709	775	66	exon	777	843	66	exon	744	810	66
intron	776	1502	<u>726</u>	intron	844	1577	<u>733</u>	intron	811	1064	<u>253</u>
exon	1503	1550	47	exon	1578	1625	47	exon	1065	1112	47
intron	1551	1666	115	intron	1626	1732	106	intron	1113	1219	106
exon	1667	1713	46	exon	1733	1779	46	exon	1220	1266	46
intron	1714	1890	176	intron	1780	1985	<u>205</u>	intron	1267	1397	130
exon	1891	1972	81	exon	1986	2067	81	exon	1398	1479	81
intron	1973	2063	90	intron	2068	2158	90	intron	1480	1580	100
exon	2064	2107	43	exon	2159	2202	43	exon	1581	1624	43
intron	2108	2192	84	intron	2203	2287	84	intron	1625	1758	133
exon	2193	2243	50	exon	2288	2338	50	exon	1759	1809	50
intron	2244	2343	99	intron	2339	2438	99	intron	1810	1902	92
exon	2344	2426	82	exon	2439	2521	82	exon	1903	1985	82
intron	2427	2522	95	intron	2522	2623	101	intron	1986	2083	97
exon	2523	2573	50	exon	2624	2674	50	exon	2084	2134	50
intron	2574	2966	<u>392</u>	intron	2675	3237	<u>562</u>	intron	2135	2285	150
exon	2967	3041	74	exon	3238	3312	74	exon	2286	2360	74
intron	3042	3143	101	intron	3313	3422	109	intron	2361	2540	179
exon	3144	3196	52	exon	3423	3475	52	exon	2541	2593	52
intron	3197	3590	<u>393</u>	intron	3476	4342	<u>866</u>	intron	2594	3374	<u>780</u>

exon	3591	4038	<u>447</u>	exon	4343	4787	<u>444</u>	exon	3375	3829	<u>454</u>
intron	4039	4181	142	intron	4788	4928	140	intron	3830	4253	<u>423</u>
exon	4182	4857	<u>675</u>	exon	4929	5604	<u>675</u>	exon	4254	4862	<u>608</u>

PtNek4 LG_IX:9674989-9681802				PtNek5 LG_I:16006138-16012189				PtNek6 scaffold_152:16918-21311			
		length			length				length		
exon	1	98	98	exon	1	98	98	exon	1	119	119
intron	99	222	123	intron	99	208	109	intron	120	467	<u>347</u>
exon	223	290	67	exon	209	276	67	exon	468	535	67
intron	291	375	84	intron	277	366	89	intron	536	997	<u>461</u>
exon	376	442	66	exon	367	433	66	exon	998	1064	66
intron	443	516	73	intron	434	539	105	intron	1065	1211	146
exon	517	564	47	exon	540	587	47	exon	1212	1259	47
intron	565	662	97	intron	588	675	87	intron	1260	1492	<u>232</u>
exon	663	709	46	exon	676	722	46	exon	1493	1539	46
intron	710	804	94	intron	723	816	93	intron	1540	1626	86
exon	805	886	81	exon	817	898	81	exon	1627	1708	81
intron	887	983	96	intron	899	991	92	intron	1709	1799	90
exon	984	1027	43	exon	992	1035	43	exon	1800	1843	43
intron	1028	1127	99	intron	1036	1146	110	intron	1844	1953	109
exon	1128	1178	50	exon	1147	1197	50	exon	1954	2004	50
intron	1179	2204	<u>1025</u>	intron	1198	2107	<u>909</u>	intron	2005	2261	<u>256</u>
exon	2205	2287	82	exon	2108	2190	82	exon	2262	2344	82
intron	2288	2363	75	intron	2191	2269	78	intron	2345	2423	78
exon	2364	2414	50	exon	2270	2320	50	exon	2424	2474	50
intron	2415	3262	<u>847</u>	intron	2321	3116	<u>795</u>	intron	2475	2599	124
exon	3263	3337	74	exon	3117	3192	75	exon	2600	2674	74
intron	3338	4515	<u>1177</u>	intron	3193	3764	<u>571</u>	intron	2675	2855	180
exon	4516	4568	52	exon	3765	3835	70	exon	2856	2908	52
intron	4569	4654	85	intron	3836	3899	63	intron	2909	2988	79
exon	4655	6886	<u>2231</u>	exon	3900	5255	<u>1355</u>	exon	2989	4213	<u>1224</u>

PtNek7 LG_XVI:3269005-3273051			PtNek8 LG_I:2687147-2690919			PtNek9 LG_III:16862016-16866770					
	length			length		length		length			
exon	1	119	119	exon	1	119	119	exon	1	119	119
intron	120	470	<u>350</u>	intron	120	906	<u>786</u>	intron	120	1266	<u>1146</u>
exon	471	538	67	exon	907	974	67	exon	1267	1334	67
intron	539	1005	<u>466</u>	intron	975	1084	109	intron	1335	1446	111
exon	1006	1072	66	exon	1085	1151	66	exon	1447	1513	66
intron	1073	1201	128	intron	1152	1286	134	intron	1514	1656	142
exon	1202	1249	47	exon	1287	1334	47	exon	1657	1704	47
intron	1250	1489	<u>239</u>	intron	1335	1630	<u>295</u>	intron	1705	2018	<u>313</u>
exon	1490	1536	46	exon	1631	1677	46	exon	2019	2065	46
intron	1537	1622	85	intron	1678	1784	106	intron	2066	2173	107
exon	1623	1704	81	exon	1785	1866	81	exon	2174	2255	81
intron	1705	1790	85	intron	1867	1947	80	intron	2256	2335	79
exon	1791	1834	43	exon	1948	1991	43	exon	2336	2379	43
intron	1835	1939	104	intron	1992	2077	85	intron	2380	2465	85
exon	1940	1990	50	exon	2078	2128	50	exon	2466	2516	50
intron	1991	2253	<u>262</u>	intron	2129	2274	145	intron	2517	2670	153
exon	2254	2336	82	exon	2275	2357	82	exon	2671	2753	82
intron	2337	2415	78	intron	2358	2449	91	intron	2754	2840	86
exon	2416	2466	50	exon	2450	2500	50	exon	2841	2891	50
intron	2467	2607	140	intron	2501	2595	94	intron	2892	2979	87
exon	2608	2682	74	exon	2596	2670	74	exon	2980	3054	74
intron	2683	2855	172	intron	2671	2756	85	intron	3055	3138	83
exon	2856	2908	52	exon	2757	2809	52	exon	3139	3191	52
intron	2909	2987	78	intron	2810	2890	80	intron	3192	3273	81
exon	2988	4137	<u>1149</u>	exon	2891	3309	<u>418</u>	exon	3274	4177	<u>903</u>
				intron	3310	3517	<u>207</u>				
				exon	3518	3817	<u>299</u>				

from TAIR (<http://arabidopsis.org/>)

Intron length represented in *italic* and underlined have been halved while drawing the diagram presented in Figure 3

AtNek1	At1g54510	length	AtNek2	At3g04810	length	AtNek3	At5g28290	length			
exon	1	74	74	exon	1	86	86	exon	1	210	<u>210</u>
intron	75	482	<u>408</u>	intron	87	187	101	intron	211	691	<u>481</u>
exon	483	595	113	exon	188	254	67	exon	692	820	129
intron	596	684	89	intron	255	365	111	intron	821	933	113
exon	685	751	67	exon	366	431	66	exon	934	1000	67
intron	752	828	77	intron	432	519	88	intron	1001	1232	<u>232</u>
exon	829	894	66	exon	520	566	47	exon	1233	1298	66
intron	895	979	85	intron	567	671	105	intron	1299	1396	98
exon	980	1026	47	exon	672	717	46	exon	1397	1443	47
intron	1027	1127	101	intron	718	802	85	intron	1444	1529	86
exon	1128	1173	46	exon	803	883	81	exon	1530	1575	46
intron	1174	1256	83	intron	884	967	84	intron	1576	1664	89
exon	1257	1337	81	exon	968	1010	43	exon	1665	1745	81
intron	1338	1419	82	intron	1011	1104	94	intron	1746	1825	80
exon	1420	1462	43	exon	1105	1154	50	exon	1826	1868	43
intron	1463	1540	78	intron	1155	1235	81	intron	1869	1948	80
exon	1541	1590	50	exon	1236	1317	82	exon	1949	1998	50
intron	1591	1687	97	intron	1318	1409	92	intron	1999	2074	76
exon	1688	1769	82	exon	1410	1459	50	exon	2075	2156	82
intron	1770	2313	<u>544</u>	intron	1460	1545	86	intron	2157	2251	95
exon	2314	2363	50	exon	1546	1619	74	exon	2252	2301	50
intron	2364	2441	78	intron	1620	1696	77	intron	2302	2392	91
exon	2442	2515	74	exon	1697	1748	52	exon	2393	2466	74
intron	2516	2591	76	intron	1749	1841	93	intron	2467	2559	93
exon	2592	2643	52	exon	1842	2243	<u>402</u>	exon	2560	2611	52
intron	2644	2724	81	intron	2244	2331	88	intron	2612	2694	83
exon	2725	3138	<u>414</u>	exon	2332	3174	<u>843</u>	exon	2695	3063	<u>369</u>

intron	3139	3232	94	intron	3064	3141	78
exon	3233	4180	<u>948</u>	exon	3142	3924	<u>783</u>

AtNek4 At3g63280	length	AtNek5 At3g44200	length	AtNek6 At3g20860	length		
exon	1	97	97	exon	1	119	119
intron	98	201	104	intron	447	530	84
exon	202	278	77	exon	531	597	67
intron	279	563	<u>285</u>	intron	598	661	64
exon	564	687	124	exon	662	727	66
intron	688	786	99	intron	728	813	86
exon	787	853	67	exon	814	860	47
intron	854	964	111	intron	861	985	125
exon	965	1030	66	exon	986	1031	46
intron	1031	1120	90	intron	1032	1117	86
exon	1121	1167	47	exon	1118	1198	81
intron	1168	1255	88	intron	1199	1284	86
exon	1256	1301	46	exon	1285	1327	43
intron	1302	1387	86	intron	1328	1417	90
exon	1388	1468	81	exon	1418	1467	50
intron	1469	1556	88	intron	1468	1851	<u>384</u>
exon	1557	1599	43	exon	1852	1933	82
intron	1600	1671	72	intron	1934	2008	75
exon	1672	1721	50	exon	2009	2058	50
intron	1722	1789	68	intron	2059	2276	<u>218</u>
exon	1790	1871	82	exon	2277	2300	24
intron	1872	1960	89	intron	2301	2583	<u>283</u>
exon	1961	2010	50	exon	2584	2640	57
intron	2011	2084	74	intron	2641	2732	92
exon	2085	2158	74	exon	2733	3377	<u>645</u>
intron	2159	2237	79	intron	3378	3456	79
exon	2238	2289	52	exon	3457	5049	<u>1593</u>

intron	2290	2374	<u>85</u>
exon	2375	2773	<u>399</u>
intron	2774	2857	<u>84</u>
exon	2858	3482	<u>625</u>

AtNek7	At3g12200		length
exon	1	407	<u>407</u>
intron	408	707	<u>300</u>
exon	708	774	<u>67</u>
intron	775	1185	<u>411</u>
exon	1186	1251	<u>66</u>
intron	1252	1328	<u>77</u>
exon	1329	1375	<u>47</u>
intron	1376	1484	<u>109</u>
exon	1485	1530	<u>46</u>
intron	1531	1635	<u>105</u>
exon	1636	1716	<u>81</u>
intron	1717	1817	<u>101</u>
exon	1818	1860	<u>43</u>
intron	1861	1957	<u>97</u>
exon	1958	2007	<u>50</u>
intron	2008	2127	<u>120</u>
exon	2128	2209	<u>82</u>
intron	2210	2281	<u>72</u>
exon	2282	2331	<u>50</u>
intron	2332	2425	<u>94</u>
exon	2426	2499	<u>74</u>
intron	2500	2587	<u>88</u>
exon	2588	2639	<u>52</u>
intron	2640	2727	<u>88</u>
exon	2728	3835	<u>1108</u>

from TIGR Rice genome annotation v4.0 (<http://www.tigr.org/tdb/e2k1/osa1/>)

Intron length represented in *italic* and underlined have been halved while drawing the diagram presented in Figure 3

OsNek1	LOC_Os03g43590	length	OsNek2	LOC_Os12g41180	length	OsNek3	LOC_Os07g08000	length
exon	1	296	<u>296</u>	1	336	<u>336</u>	1	149
intron	297	1170	<u>873</u>	337	464	127	150	<u>557</u>
exon	1171	1286	115	465	532	67	708	827
intron	1287	1432	145	533	803	<u>270</u>	828	941
exon	1433	1500	67	804	870	66	942	1009
intron	1501	1778	<u>277</u>	871	962	91	1010	1496
exon	1779	1845	66	963	1010	47	1497	1563
intron	1846	2006	160	1011	1102	91	1564	1702
exon	2007	2054	47	1103	1149	46	1703	1750
intron	2055	2172	117	1150	1248	98	1751	1833
exon	2173	2219	46	1249	1330	81	1834	1880
intron	2220	2323	103	1331	1427	96	1881	1983
exon	2324	2405	81	1428	1471	43	1984	2065
intron	2406	2501	95	1472	1562	90	2066	2185
exon	2502	2545	43	1563	1613	50	2186	2229
intron	2546	2636	90	1614	1691	77	2230	2340
exon	2637	2687	50	1692	1774	82	2341	2391
intron	2688	2764	76	1775	1863	88	2392	2476
exon	2765	2847	82	1864	1914	50	2477	2559
intron	2848	2935	87	1915	2051	136	2560	2624
exon	2936	2986	50	2052	2126	74	2625	2675
intron	2987	3465	<u>478</u>	2127	2225	98	2676	2775
exon	3466	3540	74	2226	2278	52	2776	2850
intron	3541	3633	92	2279	2381	102	2851	2960
exon	3634	3686	52	2382	2838	<u>456</u>	2961	3013

intron	3687	3778	<u>91</u>	intron	2839	3156	<u>317</u>	intron	3014	3126	112
exon	3779	4193	<u>414</u>	exon	3157	4034	<u>877</u>	exon	3127	3553	<u>426</u>
intron	4194	4552	<u>358</u>					intron	3554	3910	<u>356</u>
exon	4553	5684	<u>1131</u>					exon	3911	4772	<u>861</u>

OsNek4	LOC_Os05g36960	length		OsNek5	LOC_Os01g64490	length		OsNek6	LOC_Os02g37830	length	
exon	1	247	<u>247</u>	exon	1	282	<u>282</u>	exon	1	320	<u>320</u>
intron	248	384	136	intron	283	618	<u>335</u>	intron	321	418	97
exon	385	452	67	exon	619	851	<u>232</u>	exon	419	486	67
intron	453	559	106	intron	852	934	82	intron	487	742	<u>255</u>
exon	560	626	66	exon	935	1002	67	exon	743	809	66
intron	627	703	76	intron	1003	1082	79	intron	810	915	105
exon	704	751	47	exon	1083	1149	66	exon	916	963	47
intron	752	835	83	intron	1150	1234	84	intron	964	1062	98
exon	836	882	46	exon	1235	1282	47	exon	1063	1109	46
intron	883	966	83	intron	1283	1375	92	intron	1110	1223	113
exon	967	1048	81	exon	1376	1422	46	exon	1224	1305	81
intron	1049	1122	73	intron	1423	1510	87	intron	1306	1393	87
exon	1123	1166	43	exon	1511	1592	81	exon	1394	1437	43
intron	1167	1255	88	intron	1593	1673	80	intron	1438	1539	101
exon	1256	1306	50	exon	1674	1717	43	exon	1540	1587	47
intron	1307	1607	<u>300</u>	intron	1718	1796	78	intron	1588	2361	<u>773</u>
exon	1608	1690	82	exon	1797	1847	50	exon	2362	2444	82
intron	1691	1774	83	intron	1848	2057	<u>209</u>	intron	2445	2528	83
exon	1775	1825	50	exon	2058	2140	82	exon	2529	2579	50
intron	1826	2834	<u>1008</u>	intron	2141	2209	68	intron	2580	2663	83
exon	2835	2909	74	exon	2210	2260	50	exon	2664	2738	74
intron	2910	3133	<u>223</u>	intron	2261	3416	<u>1155</u>	intron	2739	2824	85
exon	3134	3186	52	exon	3417	3491	74	exon	2825	2877	52
intron	3187	3264	77	intron	3492	3780	<u>288</u>	intron	2878	2965	87
exon	3265	3925	<u>660</u>	exon	3781	3833	52	exon	2966	4072	<u>1106</u>

intron	3926	4007	81	intron	3834	3925	91
exon	4008	5629	<u>1621</u>	exon	3926	4574	<u>648</u>
				intron	4575	4648	73
				exon	4649	6350	<u>1701</u>

Phase of each intron in the coding sequence

(i.e. phase is the position of an intron within a codon: phase 0 is before the first base; phase 1 is after the first base; and phase 2 is after the second base).

PtNek1	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0	AtNek1	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0	OsNek1	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0
PtNek2	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0	AtNek2	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0	OsNek2	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0
PtNek3	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 1	AtNek3	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0	OsNek3	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0
PtNek4	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 -	AtNek4	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0	OsNek4	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0
PtNek5	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 0 1 0	AtNek5	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 0 0 0	OsNek5	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 0
PtNek6	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 -	AtNek6	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 -	OsNek6	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 -
PtNek7	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 -	AtNek7	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 -		
PtNek8	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 1				
PtNek9	2 0 0 2 0 0 1 0 1 0 2 0 -				

Annexe 3 - Table S3: Expression data presented in Figure 2.4. Also includes primers used for qPCR

	mature leaf at internode 12				young leaf at internode 2				apex				stem at internode 4		stem at internode 14		root		
	top margin	bottom margin	middle section	mid vein	top margin	bottom margin	middle section	mid vein	leaflet	primordium	apical meristem	stem	phloem/cambium	xylem	phloem/cambium	xylem	root tip	lateral root	maturing root
average number of molecules	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
PtNek1	27	70	46	71	534	534	641	772	526	1180	678	665	229	99	394	297	387	309	433
PtNek2	14	27	34	50	832	649	536	743	707	1084	1324	825	126	45	249	136	173	195	191
PtNek3	63	64	55	50	247	223	217	198	242	367	201	144	339	331	375	714	154	178	303
PtNek4	7	14	18	39	63	66	53	97	78	240	165	118	93	47	118	125	67	47	55
PtNek5	4	11	9	35	58	47	52	94	36	48	41	66	25	20	33	52	50	42	32
PtNek6	228	440	584	422	227	238	412	446	346	590	368	387	928	2730	1041	5556	239	396	609
PtNek7	171	332	293	294	190	157	100	186	149	274	272	203	315	1126	249	2190	344	354	510
PtNek8	9	40	25	16	130	173	220	233	54	65	30	12	11	49	18	113	21	24	15
PtNek9	11	37	24	33	304	232	146	167	69	78	12	8	22	48	14	100	16	22	12

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
PtNek1																				
PtNek2																				
PtNek3																				
PtNek4																				
PtNek5																				
PtNek6																				
PtNek7																				
PtNek8																				
PtNek9																				
log2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
PtNek1	4,8	6,1	5,5	6,2	9,1	9,1	9,3	9,6	9,0	10,2	9,4	9,4	7,8	6,6	8,6	8,2	8,6	8,3	8,8	
PtNek2	3,8	4,8	5,1	5,6	9,7	9,3	9,1	9,5	9,5	10,1	10,4	9,7	7,0	5,5	8,0	7,1	7,4	7,6	7,6	
PtNek3	6,0	6,0	5,8	5,6	7,9	7,8	7,8	7,6	7,9	8,5	7,7	7,2	8,4	8,4	8,6	9,5	7,3	7,5	8,2	
PtNek4	2,7	3,8	4,1	5,3	6,0	6,0	5,7	6,6	6,3	7,9	7,4	6,9	6,5	5,5	6,9	7,0	6,1	5,6	5,8	
PtNek5	2,1	3,4	3,1	5,1	5,9	5,5	5,7	6,6	5,2	5,6	5,4	6,1	4,6	4,3	5,1	5,7	5,6	5,4	5,0	
PtNek6	7,8	8,8	9,2	8,7	7,8	7,9	8,7	8,8	8,4	9,2	8,5	8,6	9,9	11,4	10,0	12,4	7,9	8,6	9,3	
PtNek7	7,4	8,4	8,2	8,2	7,6	7,3	6,6	7,5	7,2	8,1	8,1	7,7	8,3	10,1	8,0	11,1	8,4	8,5	9,0	
PtNek8	3,2	5,3	4,7	4,0	7,0	7,4	7,8	7,9	5,8	6,0	4,9	3,5	3,4	5,6	4,2	6,8	4,4	4,6	3,9	
PtNek9	3,5	5,2	4,6	5,0	8,2	7,9	7,2	7,4	6,1	6,3	3,5	3,0	4,5	5,6	3,8	6,6	4,0	4,5	3,6	
average	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	
H4	371	1297	860	857	13066	18403	14868	14275	7422	21506	9695	5320	1934	636	2435	1263	1722	1476	1335	
CycB1	2	2	4	17	212	220	180	171	144	427	270	233	44	11	193	70	189	170	87	
IAA7	743	1523	2425	3054	1685	817	820	2036	207	733	869	603	18	22	13	3	531	471	133	
14-3-3	380	891	870	1501	1733	1905	1222	1873	992	1910	2180	1331	1246	811	1244	1329	1883	1217	691	
UBQ10	1788	3703	4761	5053	1975	1310	1905	4862	2130	2678	3529	2634	1421	1408	3236	2717	3661	4566	7065	

log2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
H4	8,5	10,3	9,7	9,7	13,7	14,2	13,9	13,8	12,9	14,4	13,2	12,4	10,9	9,3	11,2	10,3	10,7	10,5	10,4
CycB1	1,2	1,3	1,9	4,1	7,7	7,8	7,5	7,4	7,2	8,7	8,1	7,9	5,4	3,4	7,6	6,1	7,6	7,4	6,4
IAA7	9,5	10,6	11,2	11,6	10,7	9,7	9,7	11,0	7,7	9,5	9,8	9,2	4,2	4,4	3,7	1,6	9,1	8,9	7,0
14-3-3	8,6	9,8	9,8	10,6	10,8	10,9	10,3	10,9	10,0	10,9	11,1	10,4	10,3	9,7	10,3	10,4	10,9	10,2	9,4
UBQ10	10,8	11,9	12,2	12,3	10,9	10,4	10,9	12,2	11,1	11,4	11,8	11,4	10,5	10,5	11,7	11,4	11,8	12,2	12,8
H4																			
CycB1																			
IAA7																			
14-3-3																			
UBQ10																			

Transcript ID	Primer Set	Forward (5' to 3')	Reverse (5' to 3')
PtNek1	RTU	GACCGTTTCCATTTGTACCATGC	CGTAAGGGCATCTCAACTGGC
PtNek1	sc70(F2R2)	CACTAGATATTTGGGCAGGGTATTTTATAGGTTG	CTACAGTTTTAGCCATGGATCTATTGAGTACC
PtNek2	lg13	GACCGGTTCCGTGTGTACTATATTTTGTAAAC	ATAAAGTTGTCTGCCTAAATATCTATCGTCTCC
PtNek3	lg2	CAAGAAGTTGTCTGTCTCTGTCATCACATG	TGAGAGATCAATACGCACACATTATTAGCATC
PtNek4	lg9	GATATCCGTGGTAAGTTGCTCTAATTTCAATGC	AGACAAGACCTGGCTGTTCTCTGTATAAATTC
PtNek5	lg1a	ATCATGATATCCATGGTAAGTGTGCTCTAG	GGTCACTATGTACAATAACGAAGTGGAAAAG
PtNek6	sc152	TGTGTTTTGACATATAGTGTGTTTTTCCAGAGTG	TCTCAGGAGTTTATTTCCATCAAAGCCAGC
PtNek7	lg16	TTGAGGTGATTCCAACATAATTTATTCATTGCTGG	TTCCATTAAAGCCAGCAATTATGAACAATCAGC
PtNek8	TA3lg1b	AAGGGCAGATGCACTGGAATCACTGCTGGA	AAACTGCTCCATTGCCATTTTTTGTGAGTTTCATG
PtNek9	TD3lg3	AAGGGCAGATGCTCTGGAATCACTGCTA	AAGCTGCTCCATTGCCATTTTTTTTCGAGTTTCATG
14-3-3P20-5	14-3-3P20-5	CACTTGGTGTAGTCTCTTTGTCCG	CCAATTGAAATATAATTGGCCTGCAAGG
Cdc2	cdc2	ATTCCCCAAGTGGCCTTCTAAG	TATTCATGCTCCAAAGCACTCC
CycB1	cycB1	TTATAGCTGAGTTGGGCATGATGC	GGTACCGAGAAACCAGTGTGC
Histone 4	PtaH4	GGATTTTCTGGGCTAGTGGTTCG	AAGGGAGCATTTTCATTTAGATCAAGC
IAA1	IAA1	CCAAGAGCTGTGGAGAAGTGC	CATGGTGCAGAGACTTCCAGG
IAA7	IAA7	TTCATCAGCACCCGAGAGCCATG	CACCCTCACGAAGAGCCCTGC
UBQ10	TD-UBQ10	TAAGATGTGCTGTTTCATGTTGTCCAAG	CAAACAGTACTAGGTGAACAAGAACAG

	21 cotyled ons	41 juvenil e leaf	42 adult leaf	43 petiol e	44 senesce nt leaf	37 caulin e leaf	35 node	36 shoot apex	31 flower	34 stem	45 hypocot yl	451 xylem	452 cork	52 lateral root	53 root tip	54 elongatio n zone	55 root hair zone
average signal value	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
AtNek1	277	371	198	347	381	238	713	710	578	537	1411	2625	969	589	830	579	470
AtNek2	450	567	251	450	96	284	341	2119	634	389	409	308	564	1680	809	1466	2343
AtNek3	512	823	385	828	99	163	487	1524	531	371	139	106	167	633	1584	851	494
AtNek4	not represented in Affymetrix GeneChip																
AtNek5	683	752	624	1108	922	1089	895	663	1039	962	732	810	834	1339	1334	1872	2332
AtNek6	291	298	342	217	88	147	432	190	196	265	151	91	179	654	171	448	992
AtNek7	1082	1095	1026	1031	1579	1336	2004	1870	884	1447	2091	2124	1945	1082	1251	689	1143

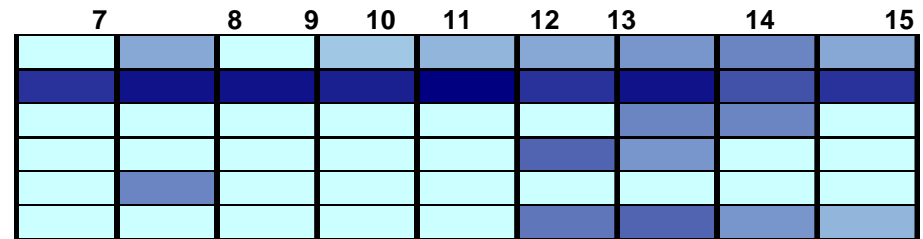
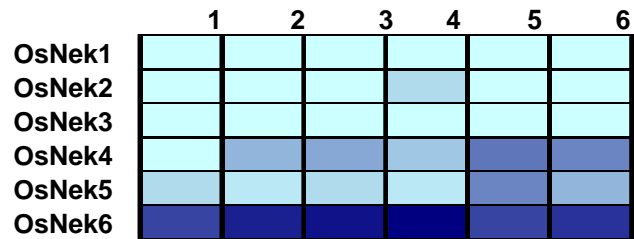
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
AtNek1																	
AtNek2																	
AtNek3																	
AtNek5																	
AtNek6																	
AtNek7																	

log2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
AtNek1	8,1	8,5	7,6	8,4	8,6	7,9	9,5	9,5	9,2	9,1	10,5	11,4	9,9	9,2	9,7	9,2	8,9
AtNek2	8,8	9,1	8,0	8,8	6,6	8,1	8,4	11,0	9,3	8,6	8,7	8,3	9,1	10,7	9,7	10,5	11,2
AtNek3	9,0	9,7	8,6	9,7	6,6	7,3	8,9	10,6	9,1	8,5	7,1	6,7	7,4	9,3	10,6	9,7	8,9
AtNek4	not represented in Affymetrix GeneChip																
AtNek5	9,4	9,6	9,3	10,1	9,8	10,1	9,8	9,4	10,0	9,9	9,5	9,7	9,7	10,4	10,4	10,9	11,2
AtNek6	8,2	8,2	8,4	7,8	6,5	7,2	8,8	7,6	7,6	8,0	7,2	6,5	7,5	9,4	7,4	8,8	10,0
AtNek7	10,1	10,1	10,0	10,0	10,6	10,4	11,0	10,9	9,8	10,5	11,0	11,1	10,9	10,1	10,3	9,4	10,2

	meriste m	young leave s	matur e leaves	ste m	youn g root	matur e root
average MPSS value	1	2	3	4	5	6
OsNek1	0	0	0	0	0	0
OsNek2	0	0	0	5	1	0
OsNek3	1	0	0	0	0	1
OsNek4	2	9	13	6	48	37
OsNek5	5	3	5	3	30	11
OsNek6	185	361	473	758	141	216

averag
e signal
value

Axillary meriste m	Axillary primordiu m	P1	P2	P3	Matur e Leaf	Root tip	Root (elongation)	Root (Maturation)
7	8	9	10	11	12	13	14	15
9	62	0	35	52	67	133	155	90
		331	288	556		433		
1375	3552	0	6	8	1752	2	760	1598
0	0	0	0	0	0	216	205	0
0	0	0	0	0	354	142	0	0
0	215	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	249	366	104	42



log2	1	2	3	4	5	6
OsNek1						
OsNek2				2,3		
OsNek3						
OsNek4	1,0	3,2	3,7	2,6	5,6	5,2
OsNek5	2,3	1,6	2,3	1,6	4,9	3,5
OsNek6	7,5	8,5	8,9	9,6	7,1	7,8

	7	8	9	10	11	12	13	14	15
OsNek1	3,1	5,9		5,1	5,7	6,1	7,1	7,3	6,5
OsNek2	10,4	11,8	11,7	11,5	12,4	10,8	12,1	9,6	10,6
OsNek3							7,8	7,7	
OsNek4						8,5	7,1		
OsNek5		7,7							
OsNek6						8,0	8,5	6,7	5,4