

Université de Montréal

Étude du cycle cellulaire chez *Lingulodinium polyedrum*

Par

Siham Benribague

Département de Sciences Biologiques

Faculté des Arts et Sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en de l'obtention du grade de

Maître ès Sciences (M.Sc.)

en Sciences Biologiques

Résumé

Les Dinoflagellés sont des eucaryotes unicellulaires photosynthétiques qui participent à une production importante du phytoplancton et sont donc à la base de la chaîne alimentaire. Bien qu'ils soient des eucaryotes, leur organisation génétique présente plusieurs particularités qui leur sont singulières. Contrairement à tous les eucaryotes chez qui les chromosomes ne se condensent qu'au moment de la mitose, les chromosomes des dinoflagellés restent condensés pendant tout le cycle cellulaire.

La mitose des dinoflagellés est distinguée de la mitose ordinaire des cellules eucaryotes. Le noyau de *Lingulodinium polyedrum* reste intact et son enveloppe nucléaire ne se brise pas pendant la mitose. Les microtubules devraient ainsi se coller à la membrane nucléaire du côté du cytoplasme pour tenter de s'accrocher aux chromosomes qui eux sont attachés à la surface interne de la membrane, le fuseau mitotique traverse donc le noyau par une ou plusieurs invaginations nucléaires ou canaux. *Lingulodinium polyedrum* est considéré un organisme modèle pour étudier les rythmes circadiens.

Cette étude illustre les changements morphologiques des chromosomes durant les différents stades de la mitose, en utilisant le microscope électronique à transmission et microscope à fluorescence.

Le transcriptôme de *Lingulodinium polyedrum* a été utilisé pour recenser les composants régulateurs conservés contrôlant l'entrée en phase S ou en phase M, telles que des cyclines ou des Cdks.

Mots-clés : *Lingulodinium polyedrum*, dinoflagellé, cycle cellulaire, rythme circadien, mitose, phase S, phase M, cycline, CDK, transcriptome

Abstract

Dinoflagellates are unicellular photosynthetic eukaryotes comprising a major part of the phytoplankton and thus, represent the foundation of the food chain. Although dinoflagellates are eukaryotes, their genetic organization has several features which are unique to them. Unlike all eukaryotes in which the chromosomes condense only at the moment of mitosis, dinoflagellates chromosomes stay condensed throughout the cell cycle.

Furthermore, the mitosis of dinoflagellates is distinguished from the ordinary mitosis of eukaryotic cells. The nucleus of *Lingulodinium polyedrum* remains intact and its nuclear envelope does not break down during mitosis. Microtubules stick to the nuclear membrane on the side of the cytoplasm and link to the chromosomes that are attached to the inner surface of the membrane by transmembrane proteins. The mitotic spindle therefore passes through the nucleus by one or more nuclear invaginations or channels. *Lingulodinium polyedrum* is considered as model organism for studying circadian rhythms among which is featured the cell cycle.

This study illustrates the morphological changes of chromosomes during the various stages of mitosis, by transmission electron microscope and a fluorescence microscope. The transcriptome of *Lingulodinium polyedrum* was used to identify conserved regulatory components controlling entry into S-phase or M phase, such as cyclins or Cdks.

Key words : *Lingulodinium polyedrum*, dinoflagellate, cell cycle, circadian rhythm, mitosis, S-phase, M-phase, cycline, CDK, transcriptome.

Table des matières

Liste des tableaux	4
Liste des figures :	5
Liste des abréviations :	6
Remerciements	8
Introduction	9
1-1- les dinoflagellés	9
1-1-1- Généralités.....	9
1-1-2- Matériel génétique et cycle cellulaire des dinoflagellés	11
1-1-3- Rythmes biologiques chez <i>Lingulodinium polyedrum</i> :	14
1-2 Vue générale du cycle cellulaire :	16
1-2-1 Organisation du cycle cellulaire.....	16
1-2-2- Régulation du cycle de division cellulaire	18
1-2-3 Exemple de régulation du cycle cellulaire chez <i>S.cerevisiae</i> :	20
1-3- Etude du cycle cellulaire chez les dinoflagellés :	25
1-4- Objectifs du projet :	27
Matériels et méthodes :	28
2-1- Entretien des cultures	28
2-2- Microscopie électronique à transmission	28
2-3- Microscopie à fluorescence	29
3- Résultats :	30
4- Discussion	43
Annexes :	47
Références :	52

Liste des tableaux

Tableau I : Nombre de cellules contenues dans chaque culture30
Tableaux II : Nombre de chromosomes à chaque stade de division cellulaire.....38

Liste des figures :

Image 1 : Marée rouge.....	10
Figure 1: Les chromosomes des dinoflagellés sont condensés.....	12
Figure 2 : Les rythmes circadiens	15
Figure 3 : Le cycle cellulaire à trois points de contrôle.....	17
Figure 4 : Quelques intervenants moléculaires du cycle cellulaire chez la levure bourgeonnante.....	21
Figure 5 : L'association de la cdc28 à chacune des cyclines spécifiques l'engage à différentes fonctions à travers la progression du cycle cellulaire.....	22
Figure 6 : Les fluctuations des niveaux d'expression de différentes cyclines de <i>S.cerevisiae</i> au cours du cycle cellulaire.....	23
Figure 7 : Courbe de croissance des cultures de <i>L.polyedrum</i>	31
Figure 8 : Pourcentages des cellules aux différentes étapes du cycle de division cellulaire.....	32
Figure 9 : Disposition des chromosomes en interphase.....	33
Figure 10 : Orientation des chromosomes pendant la prophase.....	34
Figure 11 : Orientation des chromosomes pendant la métaphase.....	35
Figure 12 : Orientation des chromosomes au début de l'anaphase.....	36
Figure 13 : Stade de télophase et début de cytokinèse.....	37
Figure 14 : Position phylogénétique des séquences issues du transcriptôme avec des CDK de levures.....	40
Figure 15 : Position phylogénétique des séquences issues du transcriptôme avec des séquences de cyclines de levures.....	41

Liste des abréviations :

2D	bidimensionnel
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
APC	complexe favorisant l'anaphase
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine tri-phosphate
BLAST	outil de recherche d'alignement local de base
CAK	kinase activatrice de CDK
CDC	cycle de division cellulaire
CDK	kinase cycline dépendante
CKI	inhibiteur de CDK
Clb	Cyclin B
Cln	Cyclin
Cyc	cycline
E-value	valeur attendue pour un résultat dû a la chance
Phase G1	gap 1 : anglais
Phase G2	gap 2 : anglais
HABs	population en grand nombre d'algues nocives
IP	iodide de propidium
Kb	kilobase
kDa	kiloDalton
MET	microscope électronique a transmission
NCBI	National Center for Biotechnology Information
Lp	<i>Lingulodinium polyedrum</i>
M	molaire
mg	milligramme
ug	microgramme
mL	millilitre
mM	millimolaire

ORF	cadre de lecture ouvert
PCR	réaction en chaîne de la polymérase
Phase M	phase mitotique
Phase S	phase de synthèse d'ADN
RNP	ribonucléoprotéine
SCF	protéine Skp1/Cullin/F-box
SPBs	spindle pôle body
Swe1	<i>Saccharomyces</i> Wee1

Remerciements

Je voudrais témoigner toute ma reconnaissance aux personnes qui m'ont aidé à la réalisation de ce mémoire.

En premier lieu, je remercie David, pour sa patience, ces précieux conseils et surtout pour sa disponibilité qui ont contribué à me rendre plus efficace et plus indépendante. Tous mes remerciements aux membres du laboratoire Morse, qui m'ont bien accueilli au sein de l'équipe et n'ont pas hésité à venir à mon aide. Un grand merci à tout le personnel de l'IRBV, chercheurs et étudiants pour leur support moral et intellectuel. Un merci spécial à Sonia Dorion qui m'a souvent aidé à trouver des solutions. Les étudiants du labo Geitmann pour leur joie de vivre, leur amour à la science et à la microscopie. Je remercie également Louise Pelletier pour sa joie, pour l'amour de son travail, pour le support technique et surtout moral qu'elle m'a apporté.

J'aimerais remercier aussi Mario pour son sourire chaleureux, pour ses gâteaux, ses journées bien organisées riches en connaissances scientifiques, mais également historiques et culturelles sans limites. Sans oublier de remercier Anne-Marie Gagné pour son soutien moral très apprécié. Un merci à Sanae Chakir d'avoir partagé ensemble les joyeuses et les pires expériences du lab et aussi de la vie.

Ces remerciements ne peuvent s'achever, sans une pensée pour ma première fan : ma chère maman. Sa présence et ses encouragements sont pour moi les piliers fondateurs de ce que je suis. Mes remerciements à toute ma famille, sans leur support je ne pourrai jamais avancer.

Introduction

1-1- les dinoflagellés

1-1-1- Généralités

Les Dinoflagellés sont des protistes, regroupant près de 4000 espèces, qui vivent en eau douce comme aux océans, mieux connus pour leur grande contribution à la formation des marées rouges (Image 1) et à la production subséquente de phytotoxines contaminant la consommation humaine des poissons et des crustacés. Ils sont une partie importante du phytoplancton et sont donc à la base de la chaîne alimentaire, ce qui est par contre moins connu. Ils comprennent aussi bien des espèces hétérotrophes que des autotrophes photosynthétiques. Ils peuvent aussi vivre en symbiose au sein des invertébrés, tels que les coraux, à qui ils procurent jusqu'à 50% de leur apport en carbone. Ces coraux peuvent perdre leur symbiote, le dinoflagellé, suite à une hausse de la température, ce qui conduit à un phénomène de blanchiment des coraux. Les dinoflagellés participent avec les diatomées à la fixation de plus de 50% du carbone de l'océan, ce qui correspond à environ 25% de la fixation du carbone total de la planète.

Les dinoflagellés possèdent deux flagelles, un transversal et l'autre longitudinal, ce qui leur procure une motilité caractéristique d'où leur nom (Dinos au grec : tourbillonnant).

Plusieurs espèces marines de dinoflagellés sont bioluminescentes et il est possible que ce phénomène permet de réduire leur prédation par les copépodes (Mesinger and Case 1992).

La contribution des dinoflagellés à la formation des marées rouges, se fait par une surpopulation explosive d'algues généralement nocives pour l'humain à plusieurs circonstances mal comprises. Certaines espèces seulement produisent des toxines, ce qui pourrait engendrer des intoxications humaines par l'ingestion de certains

organismes marins qui auront concentré ces toxines.

Bien qu'ils fassent l'objet de plusieurs implications sérieuses sur la vie humaine, très peu d'éléments sur leur biologie fondamentale sont connus. En particulier, les mécanismes de régulation du cycle cellulaire qui sont très peu déchiffrés. Dotés d'un génome gigantesque, qui représente 60 fois plus que le contenu d'une cellule haploïde humaine, et qui reste condensé pendant tout le cycle cellulaire en absence d'histones, ces organismes détiennent plusieurs particularités quant à leur cycle de division.



Image 1 : Marée rouge, (photo prise par Myriam Godfrey)

1-1-2- Matériel génétique et cycle cellulaire des dinoflagellés

L'analyse des séquences d'ARNr des dinoflagellés (Cavalier-Smith 1993), les classe avec les ciliés et les apicomplexans, parmi les eucaryotes. Bien que les dinoflagellés soient des eucaryotes, leur organisation génétique présente plusieurs particularités qui leur sont singulières. Cette organisation génétique tellement différente des autres eucaryotes a permis de proposer de classer les dinoflagellés dans un règne intermédiaire entre les procaryotes et les eucaryotes : les mésocaryotes (Dodge 1965). Contrairement à tous les eucaryotes chez qui les chromosomes ne se condensent qu'au moment de la mitose, les chromosomes des dinoflagellés restent condensés pendant tout le cycle cellulaire (Dodge 1965) (figure 1). Curieusement on trouve que le génome des dinoflagellés est riche en nucléotides G et C (65%), alors que pour les autres organismes c'est plutôt A et T qui sont abondants. Aussi on note une absence de nucléosome et d'histones (Rizzo 1991), les dinoflagellés possèdent plutôt des protéines histones-like d'origine bactérienne présentes en un ratio de 1 pour 10 par rapport à l'ADN (Moreno Diaz de la Espina, Alverca et al. 2005). Ces protéines semblent avoir une implication dans la régulation de la transcription en raison de leur présence dominante au niveau des zones périchromosomales, zones transcriptionnellement actives et absentes dans les chromosomes condensés (Chudnovsky 2002).

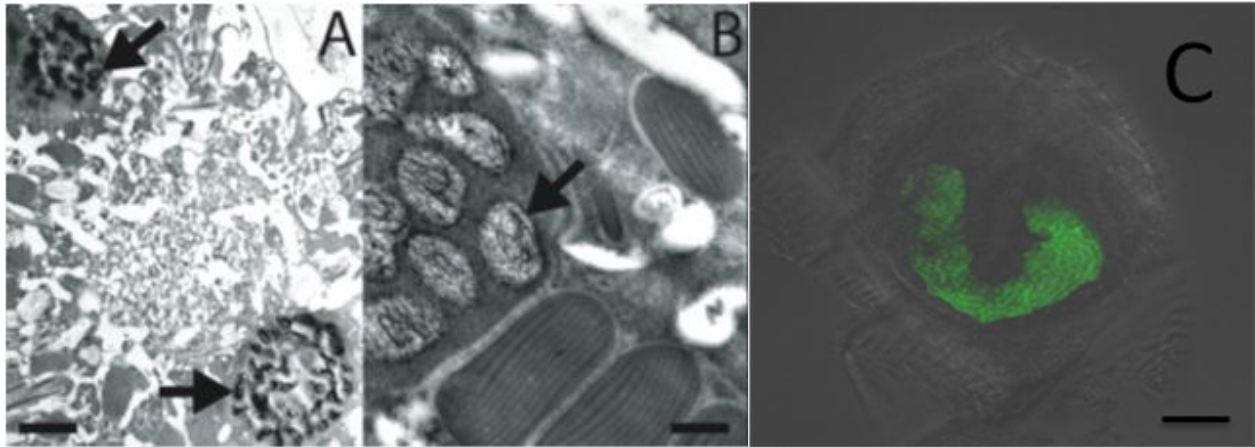


Figure 1 : Les chromosomes des dinoflagellés sont condensés. (A et B) Des cellules de *Lingulodinium polyedrum*, récoltées à l'interphase, fixées au glutaraldéhyde et colorées à l'acétate d'uranyle, sont photographiées au microscope électronique. Des flèches indiquent la présence de chromosomes condensés. (C) *Lingulodinium* coloré à l'Iodide de Propidium et visualisé au microscope confocal révèle un noyau en forme de fer à cheval. L'échelle représente respectivement 2 μm , 0.5 μm et 5 μm pour A, B et C (Photo A et B : courtoisie de N. Nassoury, photo C : Siham Benribague).

Plusieurs hypothèses viennent expliquer la condensation permanente des chromosomes en absence d'histones. La première est le fait que 12 à 68 % des nucléotides thymidines (selon les espèces de dinoflagellés) sont remplacés par le nucléotide analogue hydroxyméthyluracil (Colette 1984). Une autre hypothèse suggère que la grande quantité de cations divalents présents dans le noyau, peut contribuer à la neutralisation des charges négatives dans le noyau. Finalement, de nombreuses protéines basiques qui ressemblent à des protéines basiques bactériennes liant l'ADN ont été identifiées chez les dinoflagellés (Wong, New et al. 2003), l'étude de l'affinité de l'une d'entre ces protéines a montré qu'elle est spécifique seulement à certaines séquences d'ADN (Chudnovsky 2002) contrairement aux histones classiques qui ont la propriété de lier tout l'ADN (Gornik, Ford et al. 2012).

La mitose des dinoflagellés est tellement distinguée de la mitose ordinaire des cellules eucaryotes que l'on avait parlé anciennement de la dinomitose (Bhaud, Guillebault et al. 2000). Le

noyau des dinoflagellés qui peut se retrouver sous différentes formes selon les espèces, sphérique chez *Cryptothecodinium cohnii* et sous forme d'un « C » chez *Lingulodinium polyedrum*, reste intact et son enveloppe nucléaire ne se brise pas pendant la mitose (Rae 1970). Cette persistance de l'enveloppe nucléaire au moment de la mitose a également été notée chez d'autres organismes tels que les levures et les diatomées. Dans leur cas, un fuseau mitotique intranucléaire est mis en place pour permettre la ségrégation des chromosomes, tandis que chez les dinoflagellés les microtubules devraient ainsi se coller à la membrane nucléaire du côté du cytoplasme pour tenter de s'accrocher aux chromosomes qui eux sont attachés à la surface interne de la membrane (Bhaud, Guillebault et al. 2000). Le fuseau mitotique traverse donc le noyau par une ou plusieurs invaginations nucléaires ou canaux (Spector 1984).

La biochimie des dinoflagellés est aussi unique. En ce sens, l'examen des séquences d'ADN génomique en amont de différents gènes montre l'absence de boîte TATA (Le, Markovic et al. 1997) ; (Li and Hastings 1998) (Lin, Cheng et al. 2015). Or chez les autres eucaryotes, le promoteur est lié par la protéine TBP (TATA-box Binding Protein) pour initier la transcription. Il a été démontré que chez les dinoflagellés, on note la présence d'une protéine similaire à TBP (Guillebault, Sasorith et al. 2002) mais qui a plus d'affinité envers une séquence TTTT. Curieusement on note une absence du signal de polyadénylation au niveau des séquences 3'UTR des ARNm, cette séquence nécessaire à la coupure du transcrit et l'ajout de la queue polyA. Un signal de polyadénylation a été retrouvé dans les copies génomiques contenant une séquence AAAAG/C et été conservé entre les espèces (Bachvaroff and Place 2008). Ceci laisse penser que les mécanismes de transcription chez les dinoflagellés peuvent être différents par rapport aux autres eucaryotes.

En plus du noyau des dinoflagellés qui leur est singulier, leurs chloroplastes représentent également certaines caractéristiques particulières, comme par exemple la présence de trois membranes ce qui sollicite un mécanisme adapté pour le criblage des protéines (Nassoury, Cappadocia et al. 2003) (Patron, Waller et al. 2005). Il y'a environ 16 gènes, et ils sont sous forme de mini-cercles. Leurs gènes possèdent une queue polyU à l'extrémité 3' (Wang and Morse 2006) au lieu de la queue polyA commune chez les autres organismes. On note aussi la présence de la protéine PCP (peridinin-chlorophyll a-protein), la protéine soluble de l'antenne, dont la structure est unique (Hofmann, Wrench et al. 1996), et qui ne se retrouve chez aucun

autre organisme. Aussi la fixation du carbone se fait par le biais d'une RuBisCo de la forme II (Morse, Salois et al. 1995) ; (Rowan, Whitney et al. 1996). Cette enzyme retrouvée auparavant uniquement chez les procaryotes anaérobiques, ce qui fait que les dinoflagellés sont les seuls eucaryotes à en posséder.

1-1-3- Rythmes biologiques chez *Lingulodinium polyedrum* :

L.polyedrum est une espèce phototrophe de 40µm de diamètre possédant deux flagelles lui permettant de nager librement dans des milieux salins. Elle possède toute une gamme de rythmes circadiens. Ces rythmes peuvent se définir comme étant des événements physiologiques qui doivent se dérouler une seule fois dans la journée. Dans les conditions constantes, ils ont une rythmicité d'environ 24 heures. Ils sont synchronisés par des signaux quotidiens, qui sont soit des variations de température ou de luminosité qui font de telle sorte à aligner la rythmicité à 24 heures exacte, mais ces rythmes continuent même en absence de ces signaux.

Le dinoflagellé *L.polyedrum* possède des rythmes circadiens dans la photosynthèse, la bioluminescence, la division cellulaire et la migration verticale entre autres. Ainsi *L.polyedrum* migre en profondeur (10m en profondeur) pendant la nuit où il produit une lumière bleuâtre, alors que pendant le jour il regagne la surface pour pouvoir exercer la photosynthèse. La cytotinèse a lieu une heure après le lever du soleil (McMurry and Hastings 1972) (figure 2).

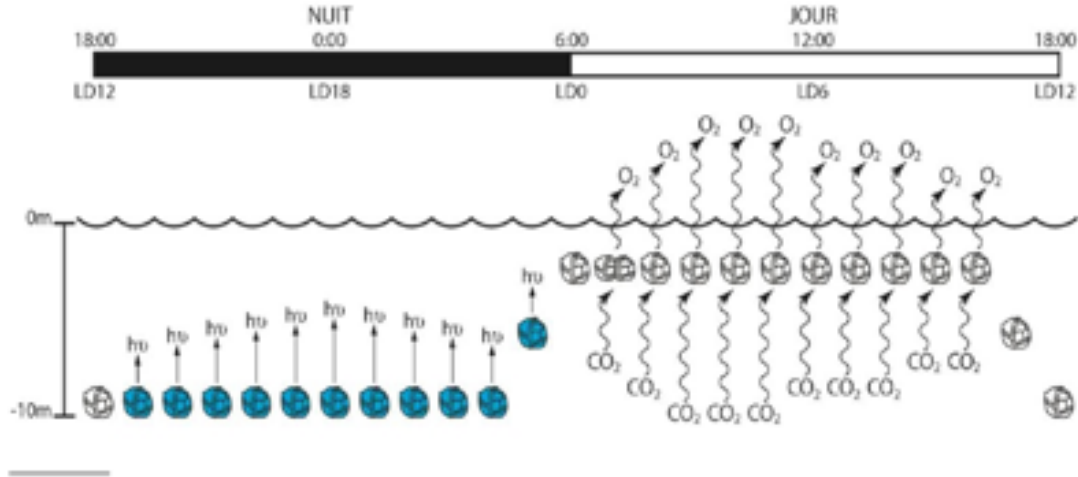


Figure 2 : La succession des rythmes circadiens sur une période de 24h avec 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière (LD12 :12) (Bertomeu 2007).

Les rythmes circadiens sont de nature biochimique. Pendant un cycle de 24 heures avec 12 heures d'obscurité et 12 heures de lumière, LD12 :12 (LD : Light-Dark), LD0 le temps du levé du soleil. Comme exemple, il y'a 2 protéines qui varient en phase avec le rythme circadien de bioluminescence, la luciférase l'enzyme qui catalyse la réaction de bioluminescence (Bae and Hastings 1994), et LBP (luciferin-binding protein) (Lee, Mittag et al. 1993), une protéine de liaison de la luciférine. Le contrôle du cycle de division semble être différent par contre. L'entrée en mitose ne se fait qu'à une heure précise de la journée (entre LD23.5 et LD0), ne serait ce que le mécanisme de contrôle du rythme circadien du cycle cellulaire n'est pas connu. Or, le temps de génération d'une nouvelle cellule prend plus qu'une journée, ainsi le contrôle circadien ouvre des fenêtres d'opportunité permettant au cycle cellulaire de se poursuivre qu'à des moments précis de la journée. Cependant en se référant aux mécanismes de contrôle de bioluminescence et de photosynthèse, on peut penser que les protéines déclenchant l'entrée en mitose peuvent nous montrer quels sont les mécanismes biochimiques responsables du contrôle circadien sur la division cellulaire.

De ce fait, l'étude des opérateurs responsables de la régulation du cycle cellulaire de

Lingulodinium polyedrum en considérant son génome particulier et toutes les différences qu'il représente par rapport aux autres eucaryotes, peut nous conduire à établir un mécanisme de contrôle circadien de la division cellulaire.

1-2 Vue générale du cycle cellulaire :

1-2-1 Organisation du cycle cellulaire

Dans chaque cycle cellulaire la cellule doit réaliser une copie fidèle de l'ADN dans les chromosomes et distribuer ces deux copies en deux cellules filles (ségrégation). En plus de la duplication de l'ADN, la plupart des cellules en doublent aussi leurs organites et leurs macromolécules pour se retrouver avec leur taille originale après chaque division.

Le cycle cellulaire ou cycle de division cellulaire, Cdc, peut encore être défini comme étant tous les événements qui se passent entre deux mitoses successives. Le processus du cycle cellulaire doit comprendre deux phases qui se suivent, la duplication de l'ADN en phase S (S pour la synthèse) qui d'ailleurs ne se fait qu'une seule fois par chaque cycle (Howard and Pelc 1951), et ensuite la division, la ségrégation des chromosomes, et la division cytoplasmique pendant la phase M (M pour mitose). Afin de réussir la préparation adéquate du matériel nécessaire à la division, la cellule a deux périodes intermédiaires connus sous G1, entre la phase M et S, et G2, entre la phase S et M. Les phases G1, S et G2 sont collectivement appelées l'interphase, et c'est pendant cette phase que la cellule croît pour atteindre le volume adéquat à sa division.

Le cycle cellulaire progresse sous un système de contrôle qui surveille le bon déroulement du processus à travers des points de contrôles appelés checkpoints. Ainsi la transition entre les étapes du cycle se fait en fonction de la satisfaction de ces points de contrôle, et la permission du passage d'une étape à l'autre n'est réalisée que sous la satisfaction de certaines conditions (Nurse 1994). A titre d'exemple, le point « START » chez les levures (ou point de restriction chez les mammifères), est un point de contrôle situé dans la phase G1 qui vérifie si les conditions environnementales sont favorables pour l'engagement ultérieur de la cellule dans la synthèse de l'ADN (Cross 1995). Si les signaux extérieurs ne sont pas propices, la cellule arrête sa progression en G1 ou peut même s'engager en une étape qui ne

fait pas partie du cycle cellulaire (G₀) dans laquelle la cellule peut rester bloquée jusqu'à rétablissement de la situation (Morgan 1997). Un autre point de contrôle existe au niveau de la phase G₂ qui bloque la cellule suite à tout endommagement de l'ADN et ne permet à celle-ci de s'engager dans la phase M que lorsqu'il vérifie que tout l'ADN a été répliqué efficacement. Tout dernièrement, dans la métaphase se trouve un point de contrôle qui s'assure que tous les chromosomes ont été bien attachés aux microtubules du fuseau mitotique pour autoriser leur ségrégation (Figure 3) (Stein GS 1998).

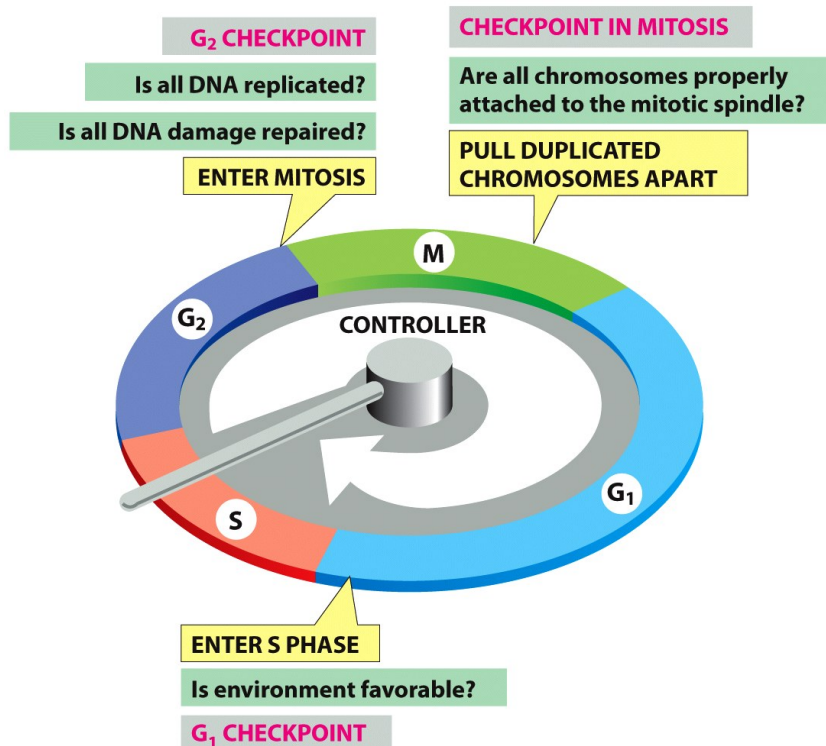


Figure 18-3 Essential Cell Biology 3/e (© Garland Science 2010)

Figure 3 : Le cycle cellulaire à trois points de contrôle, et chaque point doit répondre à des questions critiques avant de permettre le passage à la phase subséquente. L'entrée en S dépend des conditions environnementales. L'entrée en phase M dépend de la répllication de l'ADN et la sortie de M est reliée au bon positionnement des chromosomes au fuseau mitotique (Alberts 2007).

L'initiation de la phase S et celle de la phase M sont réalisées par des éléments régulateurs, ce qui a été démontré par l'observation des changements de noyaux de cellules (hétérocaryons) à différentes étapes qui ont été fusionnées (Johnson and Rao 1970). Par exemple, des cellules en G1 fusionnées à d'autres cellules en S entrent en S, et des cellules en G2 fusionnées à des cellules en M s'engagent dans la phase M. Tandis que des cellules en G2 ne déclenchent pas l'entrée des cellules en G1 en phase S, comme des cellules en G1 ne peuvent pas promouvoir l'entrée en phase M a des cellules en G2. Il y'a donc des facteurs spécifiques permettant l'entrée en phase S et d'autres permettant l'entrée en phase M. Ces facteurs ont été appelés SPF (facteur promouvoir de la phase S) et MPF (facteur promouvoir de la phase M) respectivement.

1-2-2- Régulation du cycle de division cellulaire

La purification du MPF (anglais : maturation promoting factor) par chromatographie (Lohka, Hayes et al. 1988), a permis la découverte de deux composantes majeures de régulation du cycle cellulaire, une kinase (Gautier, Norbury et al. 1988) et une cycline (Gautier, Minshull et al. 1990). Le MPF extrait de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* synchronisées en phase M, s'est révélé capable d'initier la méiose lorsqu'injecté a des oocytes de *Xenopus laevis* (Tachibana, Yanagishima et al. 1987). Le MPF est capable d'induire la mitose chez des organismes hétérologues dans une cascade d'événements similaires à la méiose (Tachibana, Yanagishima et al. 1987).

Pour bien illustrer les mécanismes responsables de la régulation du cycle cellulaire, un aperçu sur le système de contrôle cellulaire chez *Schizosaccharomyces pombe* sera fait, en raison que l'isolement des gènes responsables du contrôle de la division cellulaire chez les levures s'est avéré bien efficace (Lee and Nurse 1988). Aussi les changements morphologiques de ces levures durant la mitose permet d'analyser l'étape de la division à laquelle elles sont rendues, *Saccharomyces cerevisiae* produit un bourgeon au moment de la transition G1/S qui continue à grossir jusqu'à la phase M, tandis que la *Schizosaccharomyces pombe* ou levure fissipare s'allonge tout au long du cycle cellulaire et se divise en deux par fission. L'établissement d'une collection de mutants déficients est un élément nécessaire pour déterminer les gènes

responsables du contrôle du cycle cellulaire. Dans ce sens, en se basant sur le diagnostic de la morphologie des levures, une mutation au niveau d'un gène initiant la synthèse de l'ADN chez *Saccharomyces cerevisiae*, produira des cellules avec un petit bourgeon, ce qui veut dire les cellules ont arrêté leur progression en division au niveau de la transition G1/S. En revanche, la kinase Cdc2 est plus impliquée dans la transition G2/M chez la levure fissionante *Schizosaccharomyces pombe* (Lee and Nurse 1988), car lorsque inactivée par la chaleur les cellules mutantes restent bloquées au point G2/M. D'autres gènes pourraient influencer l'activité de la kinase Cdc2, ce qui la qualifie comme étant un élément clé pour l'entrée en phase M. Le gène codant pour la Cdc25, produit une protéine tyrosine phosphatase qui active Cdc2 par déphosphorylation (Millar, McGowan et al. 1991). A l'opposé, l'inactivation de Cdc2 se fait par une phosphorylation, réalisée par une protéine, la Wee1 (Moreno, Hayles et al. 1989), qui est une protéine tyrosine et sérine/thréonine kinase. On retrouve la cdc2 associée à une cycline cdc13 pendant la mitose.

Chez les autres eucaryotes on retrouve également des homologues de Cdc2 connues en tant que CDKs (Cyclin Dependant Kinase) car leur activation dépend de leur liaison à une cycline (Pines 1995). Les protéines kinases cycline-dépendantes CDK jouent un rôle primordial dans la régulation du cycle cellulaire chez les eucaryotes. Elles ont été impliquées dans le contrôle de la transcription de plusieurs gènes ainsi que d'autres processus par phosphorylation des protéines clés.

Il s'agit de sérine/thréonine kinases qui en plus de posséder tous les domaines conservés des kinases retrouvés chez les eucaryotes, leur domaine III contient une séquence PSTAIRE aussi notée chez cdc2. Les CDKs sont caractérisées par la présence de deux sites de phosphorylation, le premier se trouve dans la boucle-P en N-terminal, sur la tyrosine 15 pour Cdc2. Sa phosphorylation empêche la liaison d'une ATP d'où l'inactivation de cdc2 (Smits and Medema 2001). Le deuxième site permet le changement de conformation de CDK en changeant la boucle T d'où l'activation de la kinase (Smits and Medema 2001).

L'activité des CDK est régie par les cyclines, des événements de phosphorylation inhibitrice par des CKI tel que la Wee1, et la phosphorylation activatrice par les phosphatases notamment la Cdc25 qui enlève le phosphate inhibiteur et par les CAKs (CDK-Activating Kinase) qui activent les CDKs par phosphorylation. Un aperçu sur l'implication de la CDK appelée cdc28 au cours du cycle cellulaire de la levure

bourgeonnante est illustré dans la figure 4.

Chez les humains on retrouve l'homologue de *cdc2* qui est CDK1 (Stein GS 1998), en plus d'une dizaine d'autres CDKs. On retrouve aussi 25 cyclines dont uniquement la moitié qui peuvent être impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire (Stein GS 1998).

Les cyclines doivent leur nomination au fait que leur première découverte a permis de les définir comme des protéines cycliquement détruites après chaque division chez les œufs d'oursin de mer en mitoses répétées (Evans, Rosenthal et al. 1983). Actuellement on les connait en tant que protéines possédant deux domaines boîte-cycline, de 150 acides aminés chacun, et d'avoir l'aptitude de lier et d'activer une CDK (Kobayashi, Stewart et al. 1992). Les cyclines, en particulier celles ayant un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, possède une particularité par rapport aux CDKs du moment où leur activité varie d'une étape du cycle de division à une autre, on note des pics d'expressions à l'étape du cycle où leur activité est primordiale (Murray 2004), contrairement aux CDKs ayant une expression en général constante.

1-2-3 Exemple de régulation du cycle cellulaire chez *S.cerevisiae* :

La régulation du cycle cellulaire de la levure bourgeonnante, permet d'étudier l'implication moléculaire des composants régulateurs du *cdc*, tel que CDKs, cyclines CKIs, dans chaque étape de division, le niveau de leur expression, leur contrôle et leur effet. Ceci permet d'avoir une vue globale sur le déroulement de la régulation du cycle de division, car même en présence d'autres composants régulateurs chez les autres organismes, certains principes de base sont universels dans tous les eucaryotes. La figure 4 montre le processus de contrôle d'activation de la Cdc28, seule kinase impliquée lors du cycle de division de la levure bourgeonnante.

Mitotic cell cycles

(A) *Saccharomyces cerevisiae*

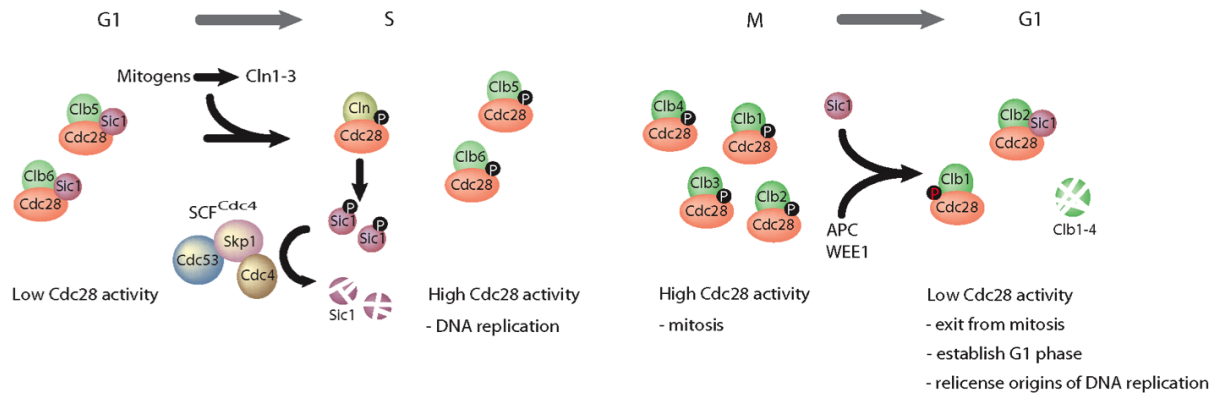
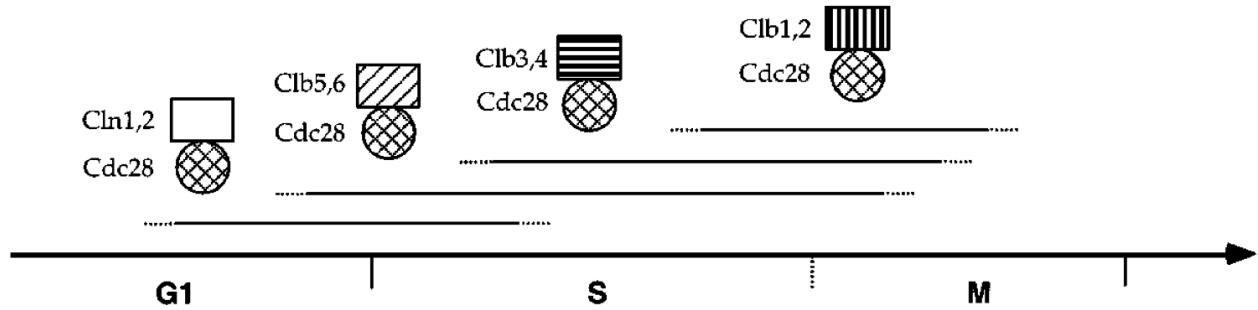


Figure 4 : Quelques intervenants moléculaires principaux du cycle cellulaire chez la levure bourgeonnante (De Clercq and Inze 2006).

Seulement la CDK *cdc28* (parmi 5 CDKs que possède *S.cerevisiae*) est impliquée dans le cycle cellulaire et ce dans tous les stades (Mendenhall and Hodge 1998). Seulement 9 des 22 membres de la famille des cyclines chez *S.cerevisiae* se lie à *cdc28* (Andrews and Measday 1998). Cln1, Cln2 et Cln3 et Clb5 et Clb6 sont les cyclines qui vont régler l'entrée en phase S, tandis que les cyclines Clb1, Clb2, Clb3 et Clb4 vont régler l'entrée en phase M. Cln3 est présente durant tout le cycle cellulaire avec une augmentation de transcription au début de G1. Elle agit en amont de Cln1 et Cln2 et déclenche directement le passage à travers le point START (Tyers, Tokiwa et al. 1993) comme étant senseur de la taille cellulaire (Cross 1995) (figure 5).



S. cerevisiae

Figure 5 : L'association de la cdc28 à chacune des cyclines spécifiques l'engage à différentes fonctions à travers la progression du cycle cellulaire (Morgan 1997).

Puisque la régulation des Cdks est strictement liée à leur liaison aux cyclines, le contrôle des cyclines donc influence l'activation des Cdks. Les deux principaux mécanismes utilisés pour régler les cyclines sont la transcription des gènes et la dégradation protéique (Morgan 1997). Par exemple, la transcription de Cln1 et Cln2 augmente dans la phase tardive de G1 (Morgan 1997). Cette transcription est réglée par le complexe Cdc28-Cln3 qui inactive par la phosphorylation l'inhibiteur Whi5 (Costanzo, Nishikawa et al. 2004). Ceci permet l'activation du facteur de transcription SBF (contenant Swi6 et Swi4) et les gènes Cln1 et Cln2 sont transcrits. La transcription de Clb5 et Clb6 est également déclenchée en G1 tardive, cette fois-ci par le facteur de transcription MBF (contenant Swi6 et Mbp1), et l'augmentation ainsi des taux de Clb inhibe la transcription des cyclines G1 dépendante du SBF (figure 6).

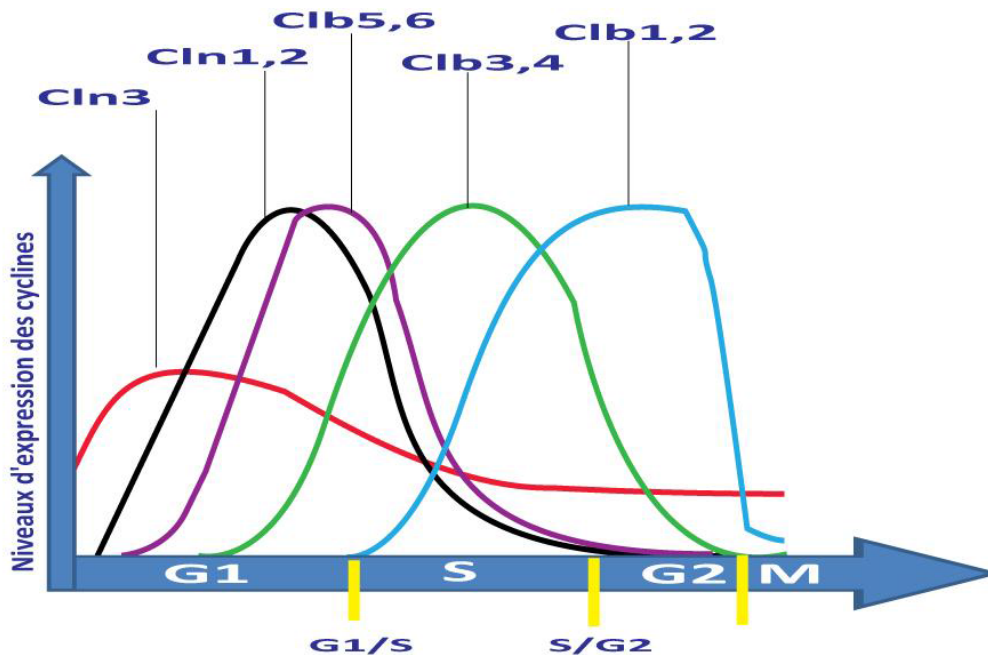


Figure 6 : Les fluctuations des niveaux d'expression de différentes cyclines de *S.cerevisiae* au cours du cycle cellulaire. (Figure inspirée de (Alberts 2007))

Le deuxième mécanisme pour la régulation des cyclines est leur dégradation via ubiquitination. Par exemple, la dégradation des cyclines de mitose est nécessaire pour sortir de la phase M. Cette dégradation implique un complexe appelé « Anaphase Promoting Complex » (APC) qui catalyse l'ubiquitination des cyclines mitotiques (Morgan 1997) menant à leur dégradation dans le protéasome.

Chez *S.cerevisiae* l'ubiquitination par le complexe SCF^{Cdc34} est sollicitée pour entraîner l'instabilité des Cln2 et Cln3 (Morgan 1997). La destruction des protéines Cln est achevée par leur phosphorylation, probablement en s'associant à la sous unité Cdc28 (Morgan 1997).

L'inhibition de l'activité des CDKs, est aussi régie par des CKIs, tel que la protéine Sic1 chez la levure bourgeonnante, qui est capable d'inactiver la cdc28 associée aux cyclines mitotiques de type Clb (Schwob, Bohm et al. 1994). Une fois la cdc28 est associée a des cyclines G1, cln1/cln2, ceci entraine la phosphorylation de Sic1, ce qui inhibe son activité (Verma, Annan et al. 1997) ce qui permet l'entrée en phase S. Une fois la protéine Sic1 est phosphorylée, elle est reconnue par Cdc4 associée au SCF (Skp1/Cullin/F-box protein). Le complexe constitue une ligase ubiquitine E3 (Nash, Tang et al. 2001) qui conduira à la destruction de

Sic1.

L'initiation de la réplication doit se faire qu'une seule fois dans chaque cycle cellulaire (Howard and Pelc 1951) et est initiée aux origines de réplication par le complexe de reconnaissance de l'origine de réplication ORC (origin recognition complex).

Les protéines Sld2/Drc1 phosphorylées par des CDKs permettent l'initiation de la réplication (Masumoto, Muramatsu et al. 2002). Les protéines de l'ORC se lient autour des sites ARS (Autonomous Replication Sequence), sites d'origine de la réplication caractéristiques de la levure. Les protéines d'ORC subissent alors une phosphorylation via Clb5 et Clb6 associées à Cdc28 (Weinreich, Liang et al. 2001), ces complexes permettent également la phosphorylation de la protéine Cdc6. L'ORC lie la protéine Cdc6, ce qui permet le recrutement des protéines Mcm formant un complexe pré-répliatif. SPF déclenche la phase S, tout en empêchant une deuxième réplication, en ciblant la Cdc6 pour être dégradée par la protéase, et en la maintenant à un niveau très bas (Bloom and Cross 2007).

L'expression des cyclines mitotiques se fait par binômes, à la transition G1/S on note un pic d'expression de Clb5 et Clb6, pour Clb3 et Clb4 c'est à la fin de la phase S, et 10 minutes avant l'anaphase on note une augmentation de l'expression de Clb1 et Clb2 (Epstein and Cross 1992). L'initiation de la mitose se fait surtout par le biais de Clb1 et Clb2 associées à la Cdc28 (Surana, Robitsch et al. 1991), tandis que pendant la métaphase la formation du fuseau mitotique est assurée par Clb3 et Clb4 associées à Cdc28 (Richardson, Lew et al. 1992). La levure bourgeonnante possède un homologue au Wee1, qui est la kinase Swe1. Cette kinase permet d'inactiver le complexe Cdc28-Clb1/2 par phosphorylation inhibitrice (Booher, Deshaies et al. 1993). L'activation de ce complexe se fait par déphosphorylation catalysée par la phosphatase Mih1, homologue à la Cdc25 (Mendenhall and Hodge 1998).

Les motifs présents sur la Clb2 permettent à la Cdk-Clb2 de cibler et partiellement phosphoryler Swe1, ce qui permet son activation. En se liant au complexe Cdc28-Clb2, Swe1 inhibe compétitivement la liaison du complexe à d'autres substrats en plus de sa fonction de régulateur de l'activité de Cdk via la phosphorylation inhibitrice sur la tyrosine (Hu, Gan et al. 2008), et la phosphorylation réciproque entre Cdk-Clb2 et Swe1 maintient la Cdk inactive (Harvey, Charlet et al. 2005).

La destruction des cyclines mitotiques est une étape cruciale, car en son absence les cellules peuvent rester bloquées en métaphase (Murray 2004).

Pendant le début de la phase M, se forme le fuseau mitotique composé de microtubules qui permettront la séparation des chromatides sœurs lors de l'anaphase. Ce réseau mitotique commence à se former pendant la prophase, mais il ne contacte les chromosomes qu'en pro-métaphase lorsque l'enveloppe nucléaire disparaît. Les chromosomes, tirés par une collaboration entre les dynéines et kinésines arrivent au centre de la cellule pour former la plaque mitotique en métaphase (Alberts 2007). Du moment que la membrane nucléaire ne se brise pas chez la levure, le réseau de microtubules s'installe à l'intérieur du noyau à l'aide des homologues de centrosomes, appelés SPBs, spindle pole body. La cytokinèse vient achever le cycle de division, en bouclant la fermeture des cercles formés d'actine et qui sont associés à la membrane de la cellule, pour séparer les cellules filles individuellement.

1-3- Etude du cycle cellulaire chez les dinoflagellés :

Le fait qu'il n'y avait aucun génome de dinoflagellés qui a été séquencé, explique que l'on ne retrouve pas encore des régulateurs du cycle cellulaire déjà isolés. Les premières tentatives effectuées pour isoler des régulateurs du cycle cellulaires étaient (Salos and Morse 1996). Ils ont tenté d'isoler l'homologue de cdc2, par technique PCR et criblage d'ADNc avec un anticorps dirigé vers un cdc2-like, ce qui n'a pas donné de résultats fructueux.

L'étude du cycle cellulaire chez les dinoflagellés a été donc limitée à quelques techniques, la cytométrie en flux (analyses par FacScan) qui permet de déterminer en quelle étape de cycle de division se trouvent les cellules. La cytométrie est une technique fiable qui donne le pourcentage des cellules en G1 et en G2/M et de prédire le pourcentage des cellules en S. Les techniques microscopiques permettent d'étudier les changements morphologiques du génome en fonction des différentes étapes du cycle cellulaire. Un aspect de ce projet consiste à identifier les temps circadiens où les cellules peuvent entrer dans la phase S (par FacScan) et la phase M (par microscopie confocale) et d'ensuite identifier les cibles de la CDK à ces deux temps.

L'utilisation d'anticorps contre des protéines régulatrices du cycle cellulaire établies chez d'autres organismes peut indiquer le comportement de protéines chez les dinoflagellés.

L'utilisation de drogues pour arrêter le cycle à un des points de contrôle précis a été testée chez d'autres organismes, si elle a le même effet chez *Lingulodinium polyedrum* cela

pourrait affirmer l'existence de ce point de contrôle. La phase S et M sont contrôlées sous un rythme circadien, la phase S démarre 6 heures après la transition jour/nuit dans un cycle d'éclairage 12 : 12 (Homma and Hastings 1989). L'utilisation d'anticorps contre PSTAIRE chez *Lingulodinium polyedrum* a permis l'obtention d'une bande de 32 kDa par transfert Western (Morse, Salois et al. 1995). Ce qui est contradictoire avec des même expériences réalisées chez *Cryptothecodinium cohnii* et *Gambierdiscus toxicus* qui reconnaissent une bande de 34kDa qui est la taille la plus typique pour les CDKs. Un criblage en ADNc a montré que la protéine chez *Lingulodinium polyedrum* n'est pas une kinase.

1-4- Objectifs du projet :

Autre objectif était d'étudier les changements morphologiques des chromosomes durant la mitose via des observations de cellules en division au microscope à fluorescence et ensuite au microscope électronique à transmission. Cette étude a permis d'établir la comparaison entre des cellules qui se préparent pour entrer en phase M environ LD22 et sur des cellules déjà engagées en division (LD0, LD1). La détection du moment d'entrée en phase M fut déterminé par analyse des images prises au microscope confocal.

Le premier objectif était d'isoler certains intervenants au niveau du contrôle du cycle de division cellulaire comme des Cdks, CAK ou des CKI, à partir d'une analyse des séquences qui se trouvent dans le transcriptôme dont le séquençage a été terminé dernièrement, tout en s'appuyant sur les intervenants moléculaires connus chez l'organisme modèle *S.cerevisiae*. Cette étude phylogénétique permettra de déterminer la similarité entre des séquences du transcriptôme de *Lingulodinium polyedrum* avec des séquences de protéines régulatrices du cycle cellulaire d'organismes connus comme la levure bourgeonnante. Plusieurs séquences similaires aux cyclines et aux CDKs ont déjà été trouvées dans le transcriptôme.

Avant d'avoir l'accès aux séquences du transcriptôme, il a fallu étudier les cellules s'apprêtant à entrer à la phase S, et celles qui s'apprêtent à entrer en phase M. Étant donné que les fonctions biologiques de notre organisme sont rythmées par l'horloge circadienne, la transcription ou la traduction des intervenants de l'entrée à une des phase S ou M ne sont autorisées qu'à un moment précis de la journée. Les mécanismes biochimiques permettant ce contrôle peuvent aussi s'illustrer à une phosphorylation ou déphosphorylation de certaines protéines.

Matériels et méthodes :

2-1- Entretien des cultures

Lingulodinium polyedrum (CCMP numéro d'accèsion 1936) a été acquis du Centre de Culture pour le Phytoplancton Marin Provasoli-Guillard (Boothbay Harbor, ME). Les cultures sont maintenues dans un milieu d'eau de mer modifié (f/2) (Guillard and Ryther 1962) à une température contrôlée de $18 \pm 1^\circ\text{C}$ sous un cycle 12h lumière/12h noirceur. Le début de la phase lumineuse (lumière blanche fluorescente à une intensité de $100 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) dans le cycle lumière/noirceur est défini comme le temps 0 (LD 0) et le début de la phase obscure est défini comme étant LD 12. Les cultures ont été conservées dans la phase de croissance exponentielle jusqu'à atteindre une densité de 12-14000 cellules/mL, telle que mesurée avec un hémocytomètre.

2-2- Microscopie électronique à transmission

Pour préparer les échantillons pour étudier les changements morphologiques des chromosomes, des cultures de *L. polyedrum* (LD 21, 22.5, 23 & 23.5) ont été filtrées sous vide sur de filtres de nylon $38\mu\text{m}$ de Sefar Inc. Les cellules ont été fixées pendant une heure à la température de la pièce avec une solution de 0.4 M de tampon phosphate pH 7.4 contenant 3% glutaraldéhyde, et puis rincée deux fois avec du 0.4 M PBS pH 7.4 (Morse, Fritz et al. 1989). La déshydratation des cellules s'est faite avec deux lavages d'éthanol 70% de 30 minutes chaque à température pièce. Les cellules ont été enrobées avec une résine de L.R. White (Sigma-Aldrich) selon le protocole du fabricant. Le bloc polymérisé a été coupé en fines sections qui ont été montées sur des grilles de nickel couvertes de formvar-carbone et séchées toute la nuit. Les coupes ont été ensuite colorées avec l'acétate d'uranyle pour visualiser les chromosomes. Ensuite l'observation est effectuée via le microscope électronique à transmission.

2-3- Microscopie à fluorescence

Les cellules cultivées sous un cycle de LD 12:12 pour cerner le temps d'entrée à la phase S, cette phase a lieu durant la période d'obscurité (Homma and Hastings 1989). Donc, pour nos différentes photopériodes, des échantillons ont également été prélevés à (LD16, LD17, LD18, LD19, LD20, LD21, LD22, LD23, LD0). Pour chaque échantillon, un volume de 150 ml de culture cellulaire était centrifugé à 1000 g pendant 1 min et remis en suspension dans 15 ml de formaldéhyde 4%. Après 1h d'incubation à température pièce avec agitation, les cellules ont été centrifugées et remises en suspension dans 15 ml d'éthanol à 100% puis incubées à la lumière ambiante pendant 1 à 2 h en agitant doucement pour blanchir les pigments résiduels. Les échantillons ont été stockés à 4 ° C. Avant utilisation, les cellules ont été centrifugées et remises en suspension dans 15 ml de 70% éthanol puis lavé deux fois avec de l'eau. Les échantillons dans un volume final de 5 ml d'eau ont été incubées avec 40 mg / ml de RNase A pendant 30 minutes à la température ambiante puis colorées pendant 30 minutes avec 50 mg / ml de l'iodure de propidium (Sigma, St. Louis, MO) dans l'obscurité à 37°C. Une goutte est montée entre lame et lamelle et les cellules sont observées par la suite au microscope confocal Zeiss LSM 700.

2-4- Étude phylogénétique

Des banques de données de séquences des régulateurs du cycle cellulaire surtout de cyclines et des CDKs de la levure bourgeonnante furent préparées, en réalisant un BLAST contre les séquences de *lingulodinium polyedrum*. Les séquences retrouvées ont fait l'objet d'une comparaison via le logiciel BLASTx (NCBI) pour vérifier leurs similarités aux séquences de la banque de données universelle.

À l'aide du logiciel Geneious, les séquences de *L. polyedrum* similaires aux cyclines ont été alignées avec des séquences de cyclines de l'organisme modèle *Saccharomyces cerevisiae*. Une étude phylogénétique a été réalisée avec le même logiciel.

3- Résultats :

La participation cruciale des dinoflagellés à la production des marées rouges, donne une envergure économique quant à la recherche par rapport à leur cycle cellulaire. La particularité de leur noyau, ouvre une curiosité pour la découverte de nouveaux mécanismes de régulation du cycle cellulaire.

Pour étudier des cellules en division, il a fallu analyser l'évolution des cultures. En faisant un comptage quotidien du nombre de cellules contenu dans chaque flacon de culture pour réaliser une courbe de croissance, à partir de la quelle on pourrait déduire les temps de division active.

Medium volume	1500 ml
Samples	10
Frequence	1 per day
Volume	10 ul

Tableau I : Les cellules sont cultivées dans des flacons contenant 1500ml de milieu de culture. Pour chaque jour on prélève de chaque flacon (10 flacons au total) 10ul qu'on étale sur une lame, afin de compter le nombre de cellules par flacon.

Avec les résultats du comptage des cellules on réalise une courbe de croissance

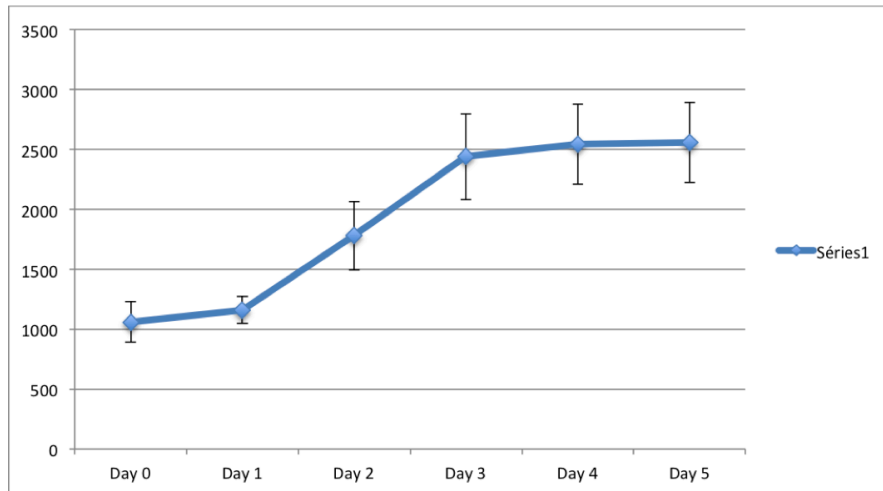


Figure 7 : Courbe de croissance des cultures de *Lingulodinium polyedrum* a température 18C. On remarque que le nombre de cellules est doublé au troisième jour.

L'observation des cellules en division au microscope confocal, a permis au début de l'étude de cerner le temps de mitose chez *L.polyedrum*. Les données de l'étude de cytométrie en flux ont permis de prédire le temps de l'entrée en phase M, aux alentours du temps circadiens LD22 (LD : Light-Dark) (Dagenais-Bellefeuille, Bertomeu et al. 2008). Ceci a orienté la récolte des cellules au bout de chaque heure, dans une marge de temps commençant de LD20 jusqu'à LD3. Par la suite les cellules furent fixées au formaldéhyde 4%, et ensuite colorées à l'iodide de propidium, pour les observer au microscope confocal.

A partir des échantillons des cellules fixées aux différents temps LD, une fraction de cellules contenant approximativement de 350 à 410 cellules, fut étalée sur une lame, et le comptage du pourcentage de cellules aux différents stades de division est réalisé. Ceci a permis d'établir une courbe (figure 8) par la suite montrant les pourcentages de cellules aux différentes phases de division aux différents temps circadiens.

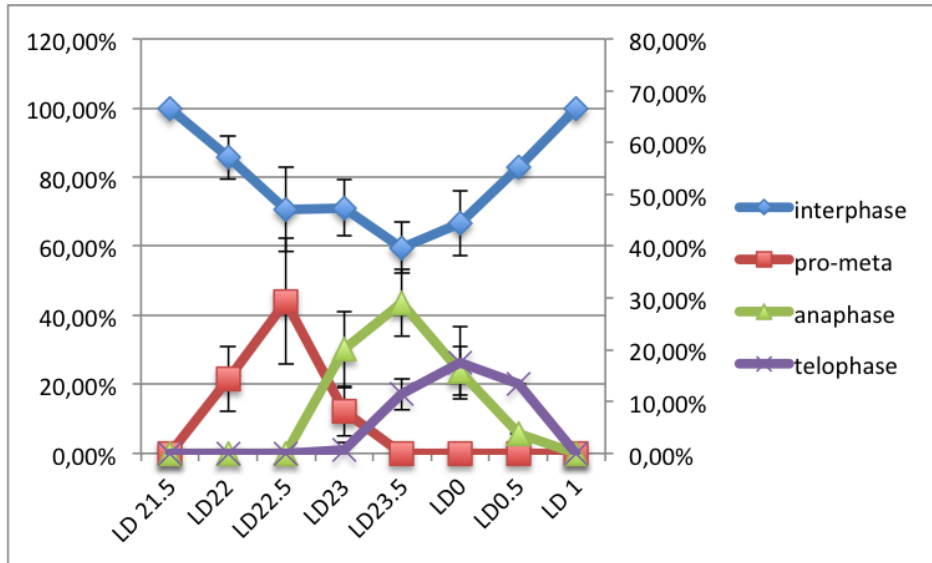


Figure 8 : Pourcentages des cellules aux différentes étapes du cycle de division cellulaire. On observe que les premières cellules de prophase apparaissent à LD22, et que la terminaison de la mitose de fait à LD1.

A partir des résultats de la figure 8, les cellules ont été prélevées à des temps circadiens précis, pour observer leurs aspects ainsi que les changements morphologiques des chromosomes passant des différentes étapes de la mitose.

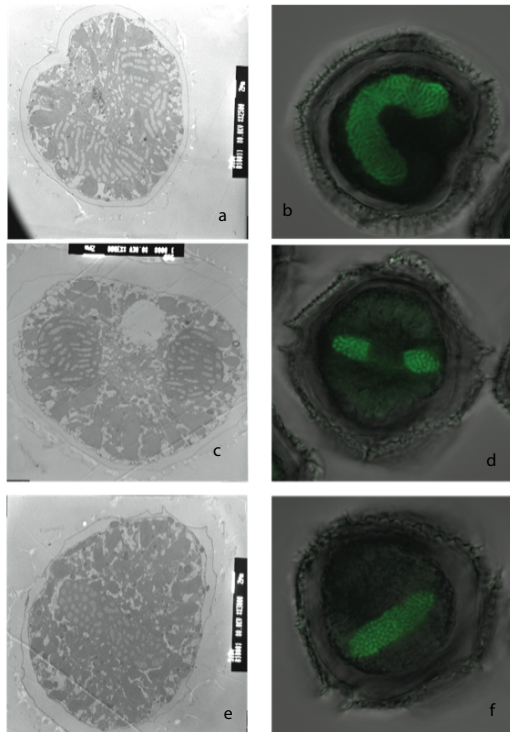


Figure 9 : En interphase le noyau en forme « C », les chromosomes sont disposés sans aucune orientation précise (a et b). Les 2 extrémités du noyau (c et d) ainsi que le centre (e et f) sont aussi illustrés. Echelle microscope confocal, images a droite : 1cm =5 um.

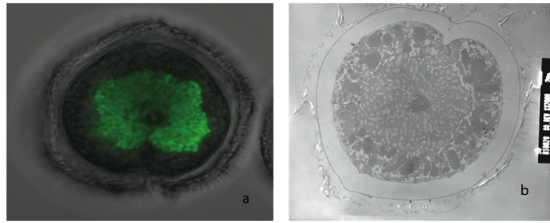


Figure 10 : Les 2 extrémités du noyau se rejoignent, le noyau adopte la forme d'un « beigne ». Les chromosomes ne suivent pas une orientation déterminée. Au microscope confocal (a) $1\mu\text{m}=5\mu\text{m}$, au microscope électronique nous avons utilisé grossissement 2500X.

L'orientation des chromosomes en métaphase est difficile à visualiser au microscope confocal, pour cette phase les résultats du microscope électronique sont plus précises (figure 11).

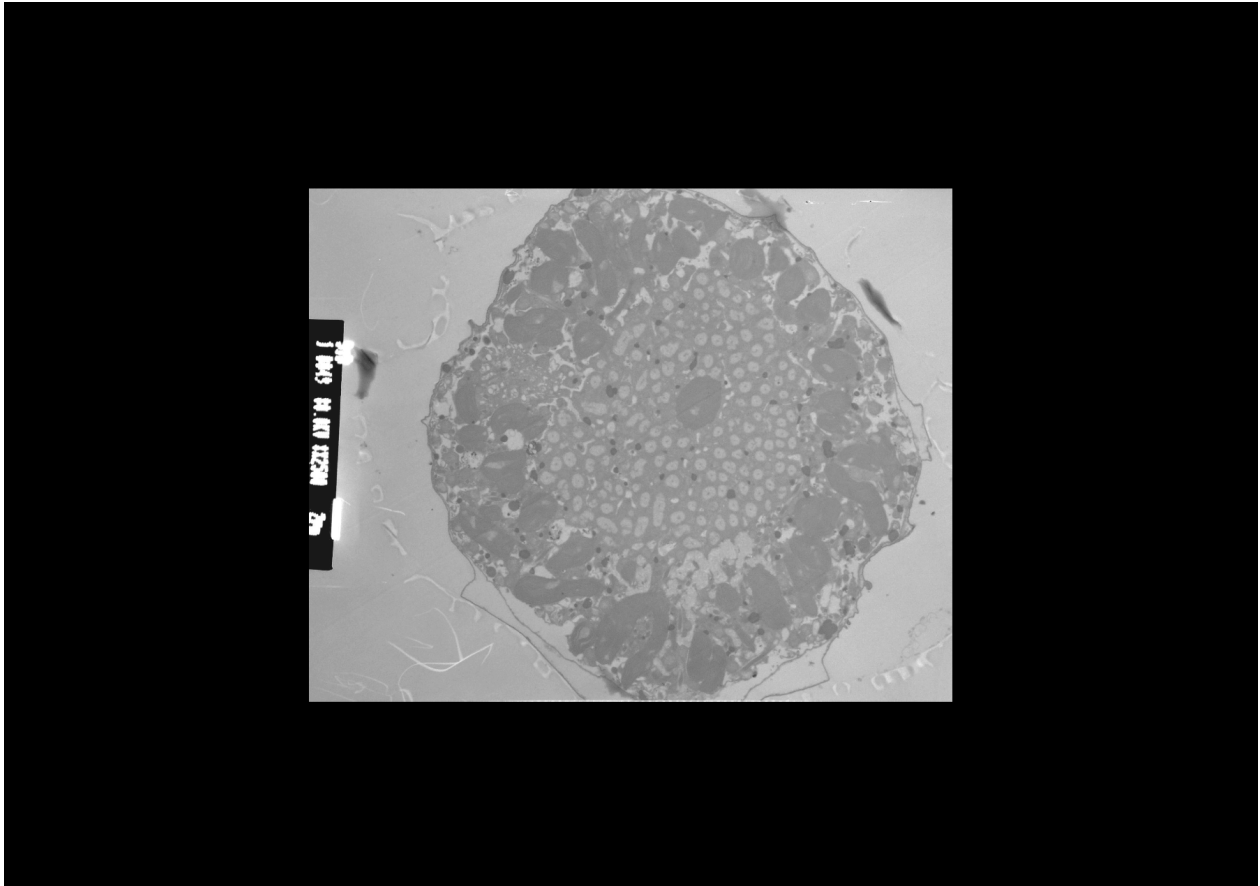


Figure 11 : La métaphase est caractérisée par l'orientation unique de tous les chromosomes, nous remarquons selon la coupe que tous les chromosomes sont orientés d'une manière perpendiculaire au plan de la figure, chaque point représente un chromosome. Grossissement 2500X au microscope électronique.

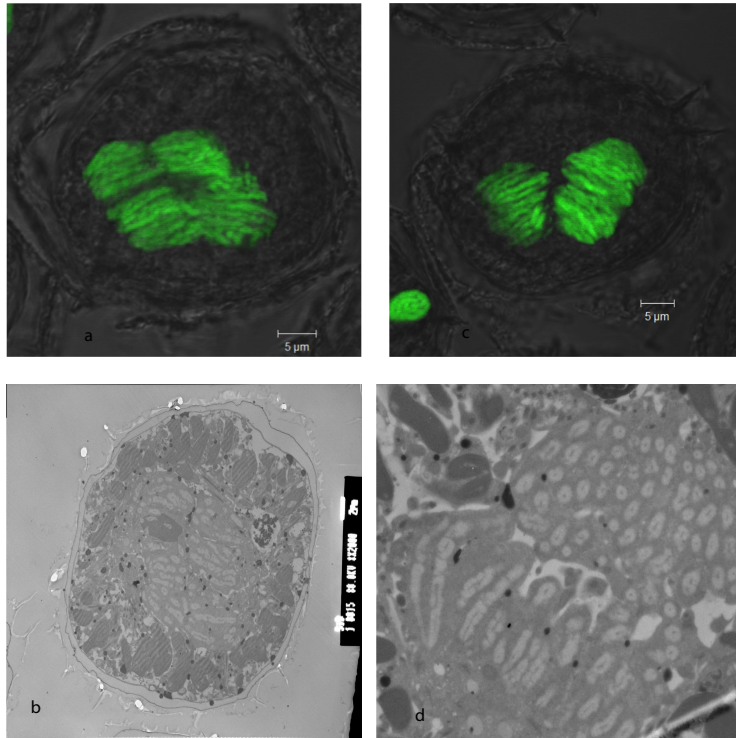


Figure 12 : Orientation des chromosomes au début de l'anaphase, alignés dans la même direction pour faciliter la séparation (a et b), les chromosomes en ségrégation s'orientent d'une manière perpendiculaire (c et d). Microscope confocal (a et c) 1cm =5um, microscope électronique (b et d) grossissement 2000X.

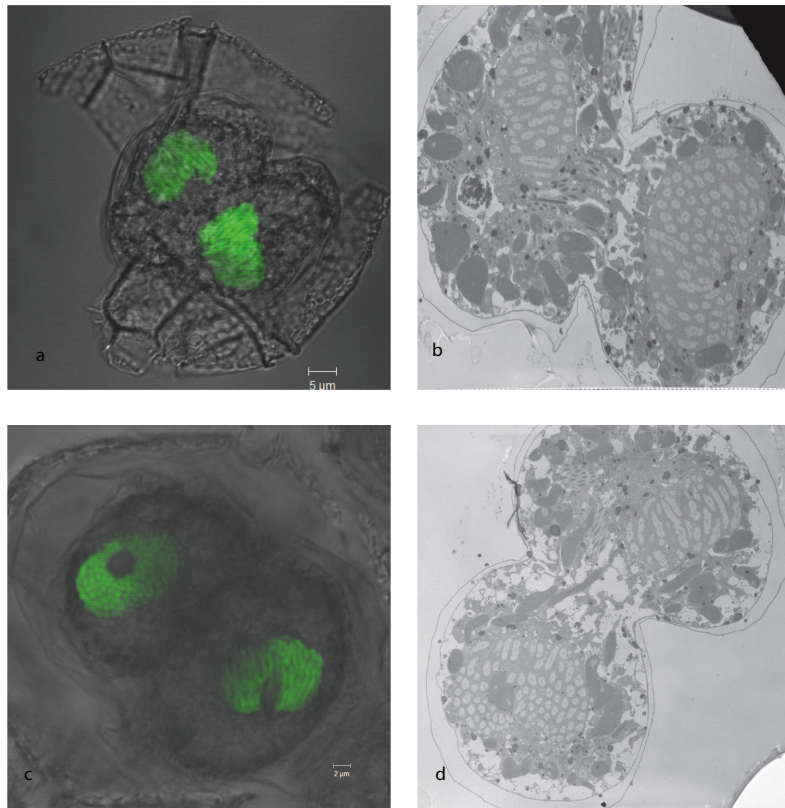


Figure 13 : Stade de télophase et début de cytokinèse. L'orientation des chromosomes dans deux sens perpendiculaires est bien illustrée que ce soit avec une coupe périphérique (a et b) ou une coupe plus profonde (c et d). Microscope confocal (a) 1cm=5 μm, (c) 1cm=2μm ; microscope électronique (b et d) grossissement 2500X.

Cette étude a permis de définir le temps du début et de la fin de la mitose qui se situe aux alentours de LD22 à LD1. Aussi cette analyse a permis de définir les premiers changements morphologiques des chromosomes durant la mitose. Le noyau passe de la forme en « C » à la forme en beigne « O » en joignant les 2 extrémités du « C » ensemble. Notre étude a permis l'observation de la séparation des chromatides sœurs durant l'anaphase (figure 12), et ensuite la télophase (figure 13).

La comparaison du nombre des chromosomes visibles dans les coupes de cellules en interphase, prophase, métaphase et anaphase, permet de confirmer que le processus de division a bel et bien eu lieu.

	Interphase	Prophase	Métaphase	Anaphase
Nombre de chromosomes	60,67	111	120	56

Tableau II : Nombre de chromosomes à chaque stade de division cellulaire.

Les données sur les séquences nucléotidiques liées au contrôle cellulaire étaient bien rares, ceci dit l'étude du cycle de division a été basée sur l'utilisation systématique d'anticorps hétérologues. Puisque les essais d'amplification par PCR des régions conservées des CDKs (Salois and Morse 1996) et de cyclines n'ont pas été fructueuses. Il a fallu trouver d'autres approches pour détourner le problème.

La complémentation fonctionnelle est une technique qui a permis l'isolement des premières cyclines humaines à l'aide de la levure bourgeonnante ayant une mutation conditionnelle pour ses cyclines G1/S (Lew, Dulic et al. 1991). Cette technique qui consiste en un remplacement total ou partiel d'une fonction biologique inhibée chez un organisme par un gène provenant d'un autre organisme, a permis l'isolement d'une cycline mitotique à partir de *Lingulodinium polyedrum*, GpCyc1 (Bertomeu and Morse 2004).

Une étude permettant d'analyser la présence de certains régulateurs du cycle cellulaire, conservés au niveau du transcriptôme a été ajouté à ce travail.

L'identification de plusieurs protéines candidates pour la phosphorylation par des CDKs a été obtenue en faisant des BLAST contre des séquences connues de levure, les séquences retrouvées dans le transcriptôme de *L. polyedrum* ayant des caractéristiques de CDKs sont représentées a la figure 14.

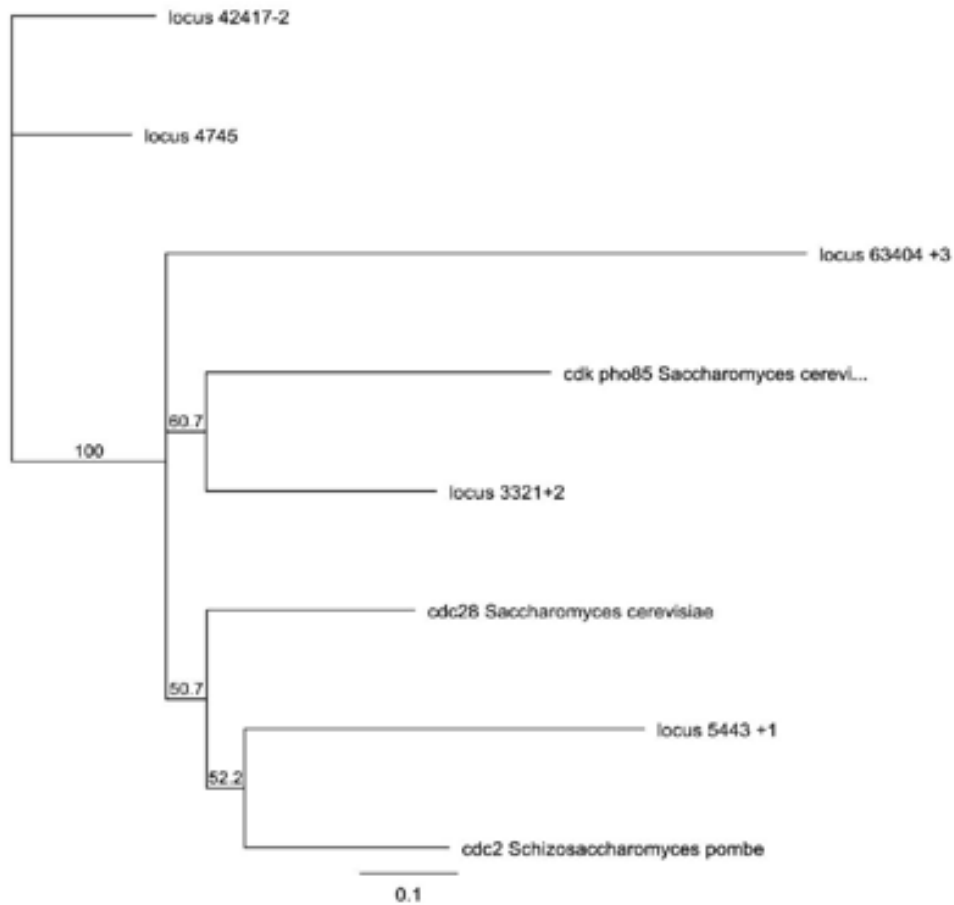


Figure 14 : Position phylogénétique des séquences issues du transcriptôme en faisant une recherche par BLAST utilisant des CDK de levures. Les séquences de *Lingulodinium polyedrum* sont représentées par des locus.

La même étude a été effectuée pour déterminer la similarité entre des séquences de cyclines connues de levure avec des séquences du transcriptôme de *L. polyedrum*.

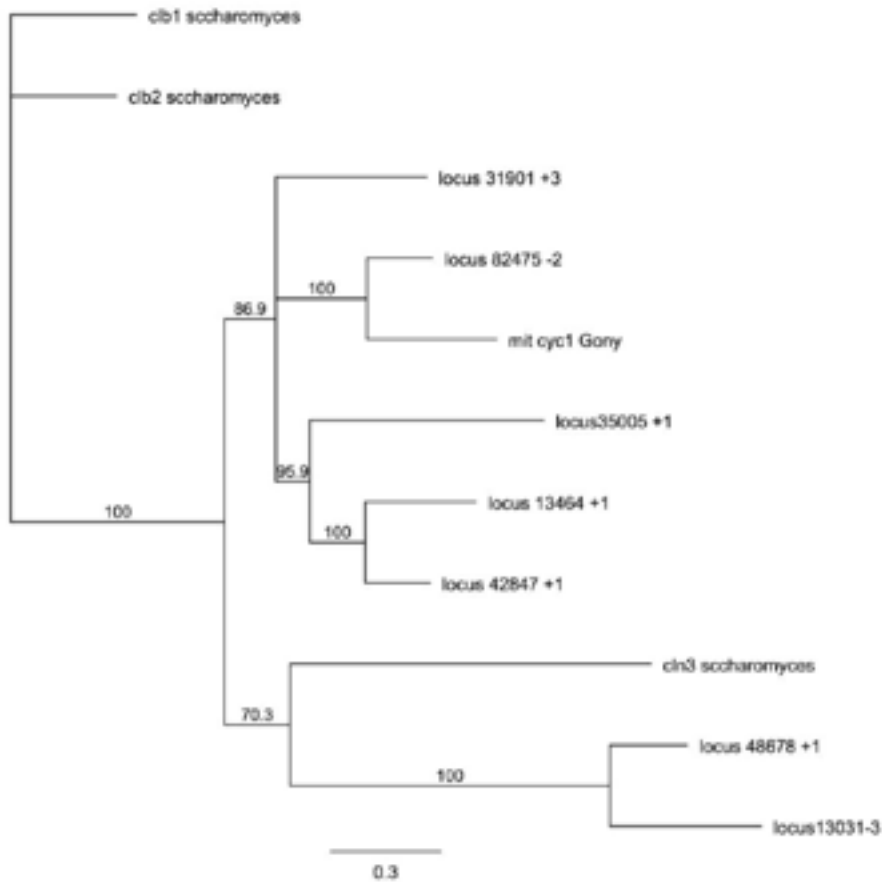


Figure 15 : Position phylogénétique des séquences similaires aux cyclines issues de notre transcriptôme avec des séquences de cyclines de levures. La figure contient aussi la cycline mitotique identifiée chez *L. polyedrum*.

Ceci permettra de prédire en guise d'exemple si des séquences se casent avec des cyclines type G1/S, que probablement ces séquences seraient des cyclines intervenant au niveau de la transition G1/S, et de même si certaines séquences se classent avec des cyclines mitotiques, que celles-ci seraient des cyclines mitotiques. Finalement si certaines de nos séquences s'isolent dans un groupe à part, on pourrait prédire qu'il s'agirait peut être de cyclines caractéristiques pour *Lingulodinium polyedrum*.

4- Discussion

En se basant sur la courbe de croissance (figure 7), nous prélevons des cellules pendant la phase de croissance linéaire, à différents temps circadiens, qui seront fixées au formaldéhyde 4%. Ensuite l'ADN est marqué à l'Iodide de Propidium, et les cellules sont ensuite visualisées au microscope confocal.

Cette étude nous a permis de cerner le temps critique de l'entrée en mitose, et de la fin de la division, qui se situe entre LD22 et LD1. La détermination du pourcentage des cellules qui s'engagent en mitose (figure 8) a été réalisé par une observation au microscope confocale. Aussi nous avons pu déterminer à travers cette étude le changement de la morphologie des chromosomes durant les différentes phases de la mitose.

Les pourcentages des cellules engagées dans les différents stades de mitose (figure 8) nous indiquent que le temps critique de l'entrée en phase M se situe entre LD21.5 et LD 22.5, c'est principalement pendant ce temps où il y'aura intervention des régulateurs du cycle cellulaire qui vont déclencher l'entrée en mitose. L'étude du niveau de phosphorylation des protéines pendant ce temps peut donner une idée sur les composants intervenant à ce stade.

Les changements morphologiques des chromosomes sont visibles grâce à l'analyse au confocal. En interphase le noyau est sous sa forme en « C », le premier changement visuel est la fermeture des 2 extrémité du « C » pour donner un noyau en forme de beigne. À ce stade les chromosomes s'alignent pour se préparer à se séparer. Durant l'anaphase les chromosomes se séparent dans 2 directions opposées, ensuite vient la télophase suivie de la cytokinèse. Des observations au microscope électronique ont été faites pour appuyer les résultats obtenus par le microscope confocal.

Au temps LD22 nous remarquons les premières cellules engagées en prophase et métaphase, sur la courbe nous avons nommé cette phase pro-métaphase car c'est impossible de distinguer entre les 2 au microscope confocal. Pour ce faire, nous avons utilisé le microscope électronique à transmission. A partir du temps de la prophase, les 2 extrémités du noyau se rejoignent, au premier lieu les chromosomes sont disposés a leur guise (figure 10), ensuite ils vont tous s'organiser de telle sorte d'avoir tous la même orientation (figure 11) pour ainsi faciliter leur séparation a l'anaphase (figure 12). En métaphase régulière des eucaryotes les chromosomes s'alignent au niveau de la

plaque équatoriale. Nous notons un pic de 30% de population engagée en cette phase à LD22.5.

L'orientation des chromosomes en métaphase est difficile à visualiser au microscope confocal, pour cette phase les résultats du microscope électronique sont plus précises (figure 11).

Nous avons pu par la suite suivre l'orientation des chromosomes lors de la séparation en anaphase. Les noyaux gardent toujours la forme circulaire en beigne et commencent la séparation. Au fur et à mesure que les noyaux s'éloignent nous remarquons que les chromosomes s'orientent d'une manière perpendiculaire les uns par rapport aux autres (figure 12).

Une galerie 3D peut être ajoutée éventuellement à ce travail à l'aide d'un logiciel tel que Imaris pour bien visualiser les composantes de nos cellules, aussi pour étudier les changements morphologiques et l'orientation des chromosomes durant toutes les étapes de la mitose.

Un comptage approximatif de chromosomes durant les phases de mitose a été réalisé via les images obtenues par microscopie électronique, pour confirmer le processus de division cellulaire. A la phase d'interphase nous avons trouvé que le nombre de chromosomes serait aux alentours de 60 (tableau II) chromosomes disposés à leur guise. En prophase lorsque le nombre de chromosomes par coupe serait de 111 (tableau II), en métaphase alors que les chromosomes sont tous alignés suivant la même orientation nous pouvons remarquer que le nombre de chromosomes dans une coupe est aux alentours de 120, ce qui laisse croire que tous les chromosomes ont été dupliqués à ce stade et s'apprêtent à se diviser. Au niveau de l'anaphase le comptage des chromosomes contenus dans l'un des noyaux des deux cellules filles indique à peu près 56 chromosomes, et ceci confirme qu'il y'a eu division et rétablissement du nombre initial des chromosomes en interphase (tableau II). Ceci suggère que les chromosomes dupliqués ne sont pas tenus ensemble.

On remarque d'après la courbe que les cellules commencent à s'engager dans la phase S entre LD16 et LD17, atteignent l'optimum en LD18 et terminent à peu près la synthèse de l'ADN entre LD21 et LD22. L'entrée en G2 commence vers LD20, ce qui concorde avec les résultats trouvés précédemment (Dagenais-Bellefeuille, Bertomeu et al. 2008).

La purification de phosphoprotéines permettra de comparer les niveaux de phosphorylation des

protéines aux différents temps de la mitose déjà définis. On doit aussi vérifier si les protéines sont phosphorylées de manière circadienne. La comparaison se fera à l'aide des gels 2D colorés au ProQ. Ensuite il faudrait extraire les spots intéressants et les envoyer pour le microséquençage. Nous pourrions ajouter à cette expérience, si la localisation de la protéine dans le gel 2D à l'aide d'anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt.

Une fois cette protéine isolée, cycline ou CDK, l'identification de ses partenaires d'interaction, telles que des CAKs, CKIs doit être abordée. Pour ce faire la technique double hybride chez la levure serait intéressante, ou encore la co-immunoprécipitation qui fait appel à des anticorps contre la protéine d'intérêt.

Les protéines les plus intéressantes peuvent faire l'objet d'une étude de leurs distributions subcellulaires au cours de la progression de la cellule à travers le cycle cellulaire. La technique d'immunocytochimie serait pertinente, des anticorps vont être dirigés contre ces protéines et la révélation de l'interaction anticorps-protéine va être ensuite décelée par microscope à fluorescence ou par immunoblot.

Nous remarquons suite à une étude phylogénétique (figure 14) qu'une séquence (locus 3321+2) a plus de similarités avec la Cdk *pho85*, mais le support, 60%, n'est pas très convainquant. *Pho85* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, homologue de la Cdk5 chez les autres eucaryotes tels que les humains. Contrairement à d'autres kinases dépendantes de la cycline, CDK5 ne nécessite pas aussi la phosphorylation de la boucle T de telle sorte que la liaison avec son activateur est suffisante pour activer la kinase (Tarricone, Dhavan et al. 2001). Une protéine Cdk5-like a déjà été caractérisée chez *Lingulodinium polyedrum* (Bertomeu, Rivoal et al. 2007).

Une autre séquence a plus de ressemblance pour la Cdc2 de la levure fissipare, Cdk1 chez les autres eucaryotes, encore le support n'est que 50% ce qui est plus faible. C'est Cdc28 chez *Saccharomyces cerevisiae*-autre eucaryote, une protéine qui fonctionne comme une sérine / thréonine kinase, qui remplit une fonction clé dans la régulation du cycle cellulaire (Crosby 2007).

Notre analyse phylogénétique des cyclines (figure 15) nous permet de noter que certaines séquences sont casées avec des cyclines de type G1/S de levures, (locus 48678+1, locus 13031-3 avec *cln3* de *saccharomyces cerevisiae*), CLN3 est une cycline de la levure bourgeonnante de type G1 contrôle le moment le point d'engagement à un cycle

cellulaire mitotique (Shi and Tu 2013). Elle est considérée comme le principal régulateur reliant la croissance cellulaire à la progression du cycle cellulaire (Futcher 1996).

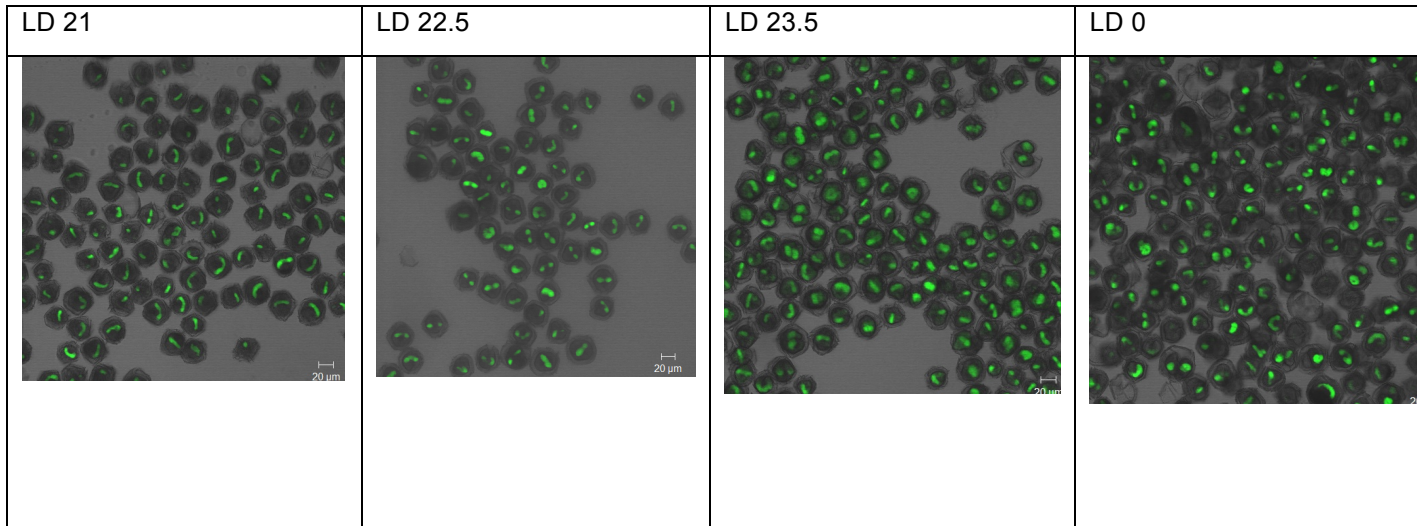
D'autres sont casées avec la cycline mitotique de notre dinoflagellé (*Gpcyc1*).

Ces séquences pourront faire l'objet de la même analyse, par amplification par PCR, clonage et séquençage pour arriver à identifier la protéine en question.

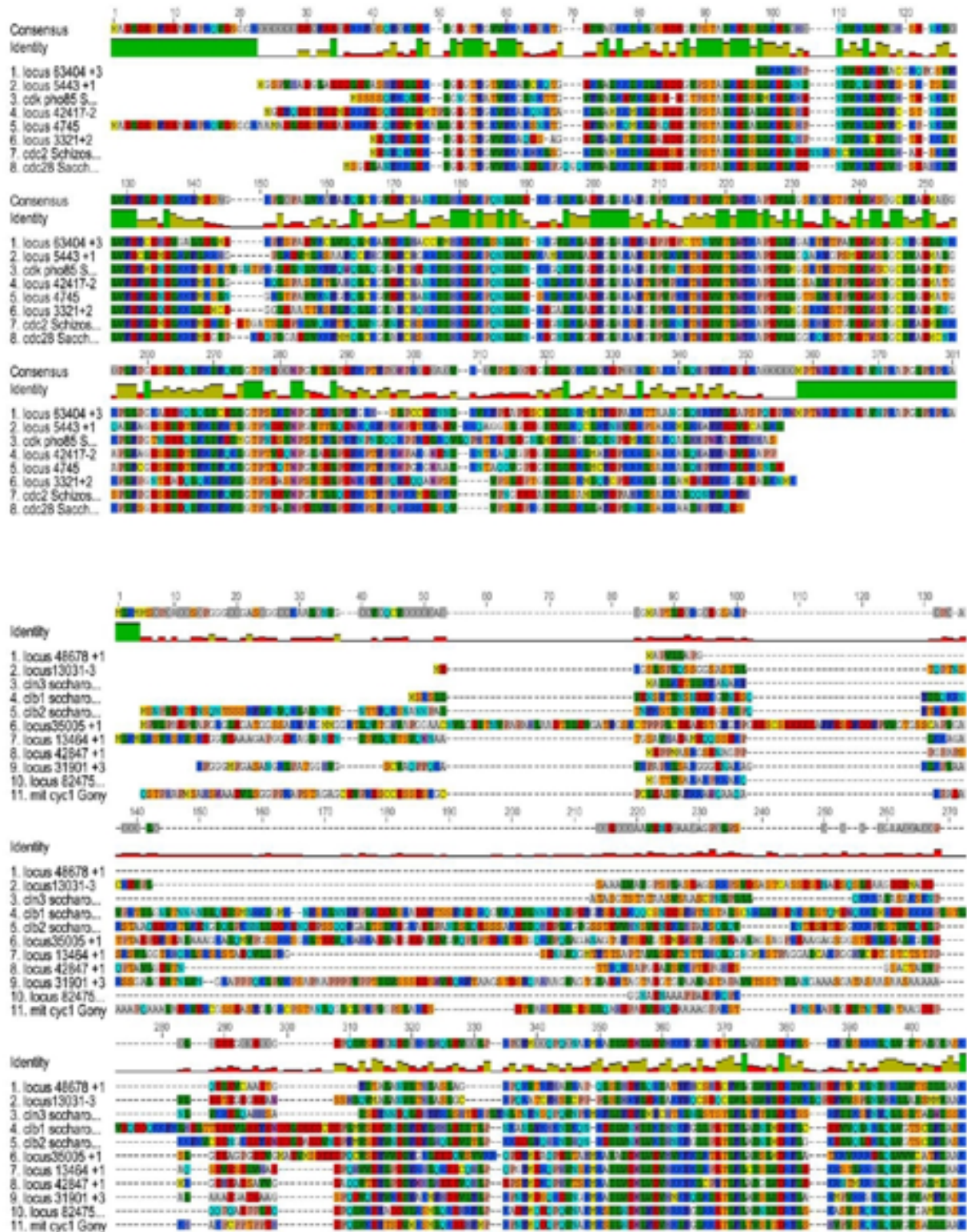
Nous espérons que des séquences du transcriptôme de *L.polyedrum* permettront probablement d'identifier des protéines ayant certaines similarités avec des éléments fonctionnels dans le contrôle du cycle cellulaire chez d'autres organismes (les CDKs, les CAKs, les CKI..).

Un autre volet pourrait s'avérer intéressant à ajouter a ce projet, ceci consiste à étudier l'interaction entre l'horloge circadienne et le cycle cellulaire. L'horloge circadienne chez *Lingulodinium polyedrum* ouvre des fenêtres d'opportunité pour que les cellules s'engagent ou continuent leur division cellulaire. Il a été démontré que l'expression de la protéine Wee1, est régulée par l'horloge circadienne chez la souris (Matsuo, Yamaguchi et al. 2003), du moment que l'entrée en phase S ainsi qu'en phase M, sont toutes les deux régulées selon un rythme circadien (Dagenais-Bellefeuille, Bertomeu et al. 2008) chez *L.polyedrum*, il s'agit peut être d'une intégration des signaux par le CDK que nous aimerions tester. Il serait plus intéressant, comme objectif à long terme, de déchiffrer le mécanisme de ce contrôle chez *L.polyedrum*.

Annexes :



Exemples d'images de groupe de cellules fixées a un temps circadien précis pour compter le pourcentage des cellules aux différents stades de la mitose, à commencer de l'interphase, et ensuite (prophase, métaphase _pro-métaphase_, anaphase, et télophase), pour réaliser les courbes permettant de déterminer le pourcentage de chaque population.



Alignement des séquences intéressantes Cdks et cyclines avec des homologues surtout chez la levure bourgeonnante.

	1					7	
Consensus	P	S	T	A	L	R	E
Identity							
1. hCDK6_Diatoms	L	Q	N	L	E	I	E
2. Locus_37940_	E	C	M	K	L	R	E
3. hCDK4_Diatoms	K	V	V	P	M	R	E
4. hCDK3_Diatoms	P	C	N	V	I	R	E
5. Locus_33607_	P	A	H	V	I	R	E
6. CDKC1_Diatoms	P	L	O	F	I	R	E
7. Locus_31222_	P	I	A	S	L	R	E
8. CDKC2_Diatoms	P	I	T	A	L	R	E
9. Cdc2 (Sp)	P	S	T	A	I	R	E
10. Cdc28 (Sc)	P	S	T	A	I	R	E
11. Cdk1 (Hs)	P	S	T	A	I	R	E
12. Cdk5 (Hs)	P	S	T	A	I	R	E
13. CDKA1_Diatoms	P	S	T	A	I	R	E
14. Locus_17896_	P	S	T	A	I	R	E
15. Locus_3321_	P	S	T	A	I	R	E
16. Locus_42417_	P	S	T	A	I	R	E
17. Locus_4745_	P	S	T	A	I	R	E
18. CDKA2_Diatoms	P	S	T	A	L	R	E
19. Locus_5443_	P	S	T	A	L	R	E
20. Locus_84196_	P	V	T	A	M	R	E
21. hCDK2_Diatoms	P	V	T	T	L	R	E
22. hCDK5_Diatoms	P	V	T	A	L	R	E
23. CDKD_Diatoms	N	F	T	A	V	R	E
24. Locus_31740_	G	F	T	A	L	R	E
25. Locus_18214_	A	O	R	T	F	R	E
26. hCDK7_Diatoms	A	V	R	L	Y	R	E
27. Locus_11859_	G	K	R	C	L	R	E
28. hCDK1_Diatoms	A	K	R	I	L	R	E
29. Locus_11916_	G	K	R	I	L	R	E
30. Locus_6940_	G	K	R	I	L	R	E
31. Locus_939_	T	K	R	T	L	R	E

Alignement de séquences des domaines PSTAIRE chez les Cdks des diatomées comparées à celles retrouvées dans notre transcriptôme pour appuyer l'hypothèse qu'il s'agit de séquences de Cdks.

Séquences retrouvées au transcriptôme	Identification au BLAST	E-Value
Locus 13464	mitotic cyclin-Cyc2 [Paramecium tetraurelia]	e-81
Locus 82475	mitotic cyclin 1 [Gonyaulax polyedra]	e-73
Locus 31943	mitotic cyclin 1 [Gonyaulax polyedra]	E-100
Locus 31901	Mitotic cyclin, CYC2 [Paramecium tetraurelia strain d4-2]	e-70
Locus 4216	cyclin 2 [Perkinsus marinus]	e-80
Locus 53413	mitotic cyclin-Cyc2 [Paramecium	e-76
Locus 42847	mitotic cyclin-Cyc2 [Paramecium tetraurelia]	e-76
Locus 13272	cyclin [Dictyostelium fasciculatum]	e-59

Références :

Alberts, B. e. a. (2007). Molecular Biology of the Cell. New York.

Andrews, B. and V. Measday (1998). "The cyclin family of budding yeast: abundant use of a good idea." Trends Genet **14**(2): 66-72.

Bachvaroff, T. R. and A. R. Place (2008). "From stop to start: tandem gene arrangement, copy number and trans-splicing sites in the dinoflagellate *Amphidinium carterae*." PLoS ONE **3**(8): e2929.

Bae, Y. M. and J. W. Hastings (1994). "Cloning, sequencing and expression of dinoflagellate luciferase DNA from a marine alga, *Gonyaulax polyedra*." Biochim Biophys Acta **1219**(2): 449-456.

Bertomeu, T. and D. Morse (2004). "Isolation of a dinoflagellate mitotic cyclin by functional complementation in yeast." Biochem Biophys Res Commun **323**(4): 1172-1183.

Bertomeu, T., et al. (2007). "A dinoflagellate CDK5-like cyclin-dependent kinase." Biol Cell **99**(9): 531-540.

Bhaud, Y., et al. (2000). "Morphology and behaviour of dinoflagellate chromosomes during the cell cycle and mitosis." J Cell Sci **113 (Pt 7)**: 1231-1239.

Bloom, J. and F. R. Cross (2007). "Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(2): 149-160.

Booher, R. N., et al. (1993). "Properties of *Saccharomyces cerevisiae* wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins." Embo j **12**(9): 3417-3426.

Cavalier-Smith, T. (1993). "Kingdom protozoa and its 18 phyla." Microbiol Rev **57**(4): 953-994.

Chudnovsky, Y., J. Li, et al. (2002). "Cloning, expression, and characterizaion of a histone-like protein from the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* (Dinophyceae)."

Colette, G. (1984). the fifth base: A natural feature of dinoflagellate DNA.

Costanzo, M., et al. (2004). "CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast." Cell **117**(7): 899-913.

Crosby, M. E. (2007). "Cell Cycle: Principles of Control." The Yale Journal of Biology and Medicine **80**(3): 141-142.

Cross, F. R. (1995). "Starting the cell cycle: what's the point?" Curr Opin Cell Biol **7**(6): 790-797.

Dagenais-Bellefeuille, S., et al. (2008). "S-phase and M-phase timing are under independent circadian control in the dinoflagellate *Lingulodinium*." J Biol Rhythms **23**(5): 400-408.

De Clercq, A. and D. Inze (2006). "Cyclin-dependent kinase inhibitors in yeast, animals, and plants: a functional comparison." Crit Rev Biochem Mol Biol **41**(5): 293-313.

Dodge, J. D. (1965). "Chromosome structure in the dinoflagellate and the problem of the mesokaryotic cell." Excerpta med.

Epstein, C. B. and F. R. Cross (1992). "CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase." Genes Dev **6**(9): 1695-1706.

Evans, T., et al. (1983). "Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division." Cell **33**(2): 389-396.

Futcher, B. (1996). "Cyclins and the Wiring of the Yeast Cell Cycle." Yeast **12**(16): 1635-1646.

Gautier, J., et al. (1990). "Cyclin is a component of maturation-promoting factor from *Xenopus*." Cell **60**(3): 487-494.

Gautier, J., et al. (1988). "Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*." Cell **54**(3): 433-439.

Gornik, S. G., et al. (2012). "Loss of nucleosomal DNA condensation coincides with appearance of a novel nuclear protein in dinoflagellates." Current Biology **22**(24): 2303-2312.

Guillard, R. R. and J. H. Ryther (1962). "Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Grun." Can J Microbiol **8**: 229-239.

Guillebault, D., et al. (2002). "A new class of transcription initiation factors, intermediate between TATA box-binding proteins (TBPs) and TBP-like factors (TLFs), is present in the marine unicellular organism, the dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*." J Biol Chem **277**(43): 40881-40886.

Harvey, S. L., et al. (2005). "Cdk1-dependent regulation of the mitotic inhibitor Wee1." Cell **122**(3): 407-420.

Hofmann, E., et al. (1996). "Structural basis of light harvesting by carotenoids: peridinin-chlorophyll-protein from *Amphidinium carterae*." Science **272**(5269): 1788-1791.

Homma, K. and J. W. Hastings (1989). "The s phase is discrete and is controlled by the circadian clock in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." Exp Cell Res **182**(2): 635-644.

Howard, A. and S. R. Pelc (1951). "Synthesis of nucleoprotein in bean root cells." Nature **167**(4250): 599-600.

- Hu, F., et al. (2008). "Identification of Clb2 Residues Required for Swe1 Regulation of Clb2-Cdc28 in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **179**(2): 863-874.
- Johnson, R. T. and P. N. Rao (1970). "Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei." Nature **226**(5247): 717-722.
- Kobayashi, H., et al. (1992). "Identification of the domains in cyclin A required for binding to, and activation of, p34cdc2 and p32cdk2 protein kinase subunits." Mol Biol Cell **3**(11): 1279-1294.
- Le, Q. H., et al. (1997). "Structure and organization of the peridinin-chlorophyll a-binding protein gene in *Gonyaulax polyedra*." Mol Gen Genet **255**(6): 595-604.
- Lee, D. H., et al. (1993). "Molecular cloning and genomic organization of a gene for luciferin-binding protein from the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." J Biol Chem **268**(12): 8842-8850.
- Lee, M. and P. Nurse (1988). "Cell cycle control genes in fission yeast and mammalian cells." Trends Genet **4**(10): 287-290.
- Lew, D. J., et al. (1991). "Isolation of three novel human cyclins by rescue of G1 cyclin (Cln) function in yeast." Cell **66**(6): 1197-1206.
- Li, L. and J. W. Hastings (1998). "The structure and organization of the luciferase gene in the photosynthetic dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." Plant Mol Biol **36**(2): 275-284.
- Lin, S., et al. (2015). "The *Symbiodinium kawagutii* genome illuminates dinoflagellate gene expression and coral symbiosis." Science **350**(6261): 691-694.
- Lohka, M. J., et al. (1988). "Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **85**(9): 3009-3013.
- Masumoto, H., et al. (2002). "S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast." Nature **415**(6872): 651-655.
- Matsuo, T., et al. (2003). "Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division in vivo." Science **302**(5643): 255-259.
- McMurry, L. and J. W. Hastings (1972). "Circadian rhythms: mechanism of luciferase activity changes in *Gonyaulax*." Biol Bull **143**(1): 196-206.
- Mendenhall, M. D. and A. E. Hodge (1998). "Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Microbiol Mol Biol Rev **62**(4): 1191-1243.
- Millar, J., et al. (1991). "cdc25 M-phase inducer." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **56**: 577-584.

- Moreno Diaz de la Espina, S., et al. (2005). "Organization of the genome and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: the amazing dinoflagellates." Eur J Cell Biol **84**(2-3): 137-149.
- Moreno, S., et al. (1989). "Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis." Cell **58**(2): 361-372.
- Morgan, D. O. (1997). "Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors." Annu Rev Cell Dev Biol **13**: 261-291.
- Morse, D., et al. (1989). "Properties and cellular localization of a luciferin binding protein in the bioluminescence reaction of *Gonyaulax polyedra*." J Biolumin Chemilumin **3**(2): 79-83.
- Morse, D., et al. (1995). "A nuclear-encoded form II RuBisCO in dinoflagellates." Science **268**(5217): 1622-1624.
- Murray, A. W. (2004). "Recycling the cell cycle: cyclins revisited." Cell **116**(2): 221-234.
- Nash, P., et al. (2001). "Multisite phosphorylation of a CDK inhibitor sets a threshold for the onset of DNA replication." Nature **414**(6863): 514-521.
- Nassoury, N., et al. (2003). "Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates." J Cell Sci **116**(Pt 14): 2867-2874.
- Nurse, P. (1994). "Ordering S phase and M phase in the cell cycle." Cell **79**(4): 547-550.
- Patron, N. J., et al. (2005). "Complex protein targeting to dinoflagellate plastids." J Mol Biol **348**(4): 1015-1024.
- Pines, J. (1995). "Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view." Biochem J **308** (Pt 3): 697-711.
- Rae, P. M. (1970). "The nature and processing of ribosomal ribonucleic acid in a dinoflagellate." J Cell Biol **46**(1): 106-113.
- Richardson, H., et al. (1992). "Cyclin-B homologs in *Saccharomyces cerevisiae* function in S phase and in G2." Genes Dev **6**(11): 2021-2034.
- Rizzo, P. J. (1991). "The Enigma of the Dinoflagellate Chromosome." The Journal of Protozoology **38**(3): 246-252.
- Rowan, R., et al. (1996). "Rubisco in marine symbiotic dinoflagellates: form II enzymes in eukaryotic oxygenic phototrophs encoded by a nuclear multigene family." Plant Cell **8**(3): 539-553.
- Salois, P. and D. Morse (1996). "Do dinoflagellates contain a Cdc2-like protein kinase?" Mol Mar Biol Biotechnol **5**(1): 52-61.
- Schwob, E., et al. (1994). "The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*." Cell **79**(2): 233-244.

Shi, L. and B. P. Tu (2013). "Acetyl-CoA induces transcription of the key G1 cyclin CLN3 to promote entry into the cell division cycle in *Saccharomyces cerevisiae*." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **110**(18): 7318-7323.

Smits, V. A. and R. H. Medema (2001). "Checking out the G(2)/M transition." Biochim Biophys Acta **1519**(1-2): 1-12.

Spector, D. (1984). "Dinoflagellates." Academic Press.

Stein GS, B. R., Giordano A, (1998). "The Molecular Basis of Cell Cycle and Growth Control." New York.

Surana, U., et al. (1991). "The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*." Cell **65**(1): 145-161.

Tachibana, K., et al. (1987). "Preliminary characterization of maturation-promoting factor from yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Sci **88 (Pt 3)**: 273-281.

Tarricone, C., et al. (2001). "Structure and regulation of the CDK5-p25(nck5a) complex." Mol Cell **8**(3): 657-669.

Tyers, M., et al. (1993). "Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins." Embo j **12**(5): 1955-1968.

Verma, R., et al. (1997). "Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase." Science **278**(5337): 455-460.

Wang, Y. and D. Morse (2006). "The plastid-encoded psbA gene in the dinoflagellate *Gonyaulax* is not encoded on a minicircle." Gene **371**(2): 206-210.

Weinreich, M., et al. (2001). "Binding of cyclin-dependent kinases to ORC and Cdc6p regulates the chromosome replication cycle." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(20): 11211-11217.