

**Université de Montréal**

**Contrôle traductionnel du rythme circadien de la  
bioluminescence chez le dinoflagellé *Lingulodinium*  
*polyedrum***

par

Mathieu Lapointe

Biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.  
en biologie moléculaire

Mars, 2007



QH  
506  
U54  
2007  
v.011

Direction des bibliothèques

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Contrôle traductionnel du rythme circadien de la bioluminescence chez le dinoflagellé  
*Lingulodinium polyedrum*

présenté par :  
Mathieu Lapointe

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean-Claude Labbé, président rapporteur  
David Morse, directeur de recherche  
Pascal Chartrand, membre du jury

## Résumé

*Lingulodinium polyedrum* est un dinoflagellé photosynthétique marin couramment utilisé pour l'étude du contrôle des rythmes circadiens. Parmi les nombreux rythmes observables chez cette algue, celui de la bioluminescence est le plus détaillé. La réaction bioluminescente est catalysée par l'enzyme luciférase (LCF). Le substrat luciférine est séquestré par la « luciferin-binding protein » (LBP). Ces trois acteurs sont inclus dans une organelle appelée scintillon qui est le siège de la réaction bioluminescente.

Des études précédentes ont montré que la formation et la destruction des scintillons étaient directement liées à la capacité de la cellule à émettre de la lumière, le maximum d'émission étant au milieu de la nuit. La capacité d'émission a également été corrélée avec la synthèse et la dégradation des protéines LCF et LBP, leur niveau cellulaire variant d'un facteur de 10 au cours du cycle circadien. Des analyses « Northern » ont toutefois montré que les niveaux d'ARNm des gènes *lcf* et *lbp* ne varient pas pendant le cycle, suggérant un contrôle traductionnel de leur expression.

La présente étude s'est attachée à élucider le mécanisme de contrôle d'expression du gène *lbp*. Le modèle privilégié implique un facteur *trans* reconnaissant et liant un élément *cis* sur l'ARNm de *lbp* et réprimant sa traduction. Une étude précédente avait fait état de la liaison spécifique d'une protéine à un élément UG-riche de la région 3' non traduite (3'UTR). Des approches biochimique et génomique ont été tentées pour vérifier cette hypothèse.

Des essais *in vitro* de retardement sur gel et de protection contre l'ARNase ciblant la région 3'UTR n'ont pas permis d'identifier de liaison spécifique à l'ARNm. Seule une liaison non spécifique a été observée, ce qui contraste avec la précédente étude. En plus, un criblage d'une banque d'expression d'ADNc chez *E. coli* et un criblage 3-hybride chez la levure en utilisant la région 3'UTR n'ont pu démontrer d'interaction spécifique.

Ces résultats mettent en doute les conclusions de l'étude précédente et suggèrent de revoir le mécanisme de contrôle traductionnel proposé. L'étude d'autres régions de

l'ARNm, notamment la région 5' non traduite (5'UTR), devra être abordée. L'exploration d'autres mécanismes de contrôle traductionnel, les miARN par exemple, est également à considérer.

**Mots-clés :** *Lingulodinium polyedrum*, dinoflagellé, rythme circadien, bioluminescence, « luciferin-binding protein », contrôle traductionnel, REMSA, criblage 3-hybride.

## Abstract

*Lingulodinium polyedrum* is a marine photosynthetic dinoflagellate widely used for the study of circadian rhythm control. Among the numerous observable rhythms in this algae, bioluminescence is the best characterized. The bioluminescent reaction is catalyzed by the enzyme luciferase (LCF). The substrate luciferin is sequestered by the luciferin-binding protein (LBP). These three players are located in an organelle called « scintillon » in which the bioluminescent reaction occurs.

Previous studies showed that formation and destruction of scintillons is directly correlated with the cell's capacity to emit light, the maximum of emission being in the middle of the night. The capacity of emission is also correlated with the synthesis and degradation of LCF and LBP, the cellular level of these proteins showing a ten-fold variation during the circadian cycle. However, Northern blot analysis showed no cycle variation of the mRNA levels, suggesting a translation control.

The present study was designed to elucidate the *lbp* expression control mechanism. The proposed mechanism involves a *trans* factor recognizing and binding a *cis* element on *lbp* mRNA and repressing its translation. A previous study showed a specific binding of a protein in a UG-rich element located in the 3' untranslated region (3'UTR). Biochemical and genomic approaches were employed to test that hypothesis.

*In vitro* electrophoretic mobility shift assay and RNase protection assay using the *lbp* 3'UTR did not show any specific binding on the mRNA, in contrast to previous report. Furthermore, no specific binding of protein factors could be detected by screening cDNA libraries, either in bacteria or in yeast, using the 3'UTR as a probe. These results are inconsistent with the previous study and suggest that the proposed translational control mechanism recognising the 3'UTR should be reconsidered. Testing other mRNA regions,

such as the 5' untranslated region (5'UTR) is one possibility, and alternative translation control mechanisms such as miRNA is another.

**Keywords :** *Lingulodinium polyedrum*, dinoflagellate, circadian rhythm, bioluminescence, luciferin-binding protein, translation control, REMSA, 3-hybrid screening.



## Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract .....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	x
Liste des figures .....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
1) Dinoflagellés .....	1
a) Noyau .....	3
b) Cycle cellulaire.....	6
c) Bioluminescence .....	8
i) Luciférine .....	9
ii) Scintillons.....	10
iii) Luciférase.....	11
iv) « Luciferin-binding protein » .....	11
2) Horloge circadienne .....	16
a) Voie afférente.....	17
i) Nitrate.....	17
ii) Lumière .....	18
b) Oscillateur circadien.....	19
c) Voie efférente.....	21
3) Buts .....	23
4) Hypothèses .....	24
Matériel & Méthodes .....	25
1) Approche biochimique .....	25

a) Culture.....	25
b) Extraits protéiques.....	25
c) Sonde d'ARN.....	26
d) Essai de retardement sur gel (EMSA).....	26
e) Chromatographie d'affinité.....	27
f) Protection contre l'ARNase.....	28
i) <i>In vitro</i> .....	28
ii) <i>In vivo</i> .....	28
2) Approche génomique.....	29
a) Criblage 3-hybride chez <i>S. cerevisiae</i> .....	29
i) Plasmides.....	29
ii) Souche YBZ1.....	29
iii) Criblage.....	29
b) Criblage d'une banque d'expression d'ADNc.....	30
i) Banque.....	30
ii) Criblage.....	30
Résultats.....	32
1) Approche biochimique.....	32
a) REMSA.....	32
b) Protection contre l'ARNase.....	34
c) Chromatographie d'affinité.....	35
2) Approche génomique.....	38
a) Criblage d'une banque d'expression d'ADNc.....	38
b) Criblage 3-hybride chez <i>S. cerevisiae</i> .....	39
Discussion.....	41
1) Approche biochimique.....	41
a) REMSA.....	41
b) Protection contre l'ARNase.....	43

2) Approche génomique .....	44
a) Criblage d'une banque d'expression d'ADNc .....	44
b) Criblage 3-hybride chez <i>S. cerevisiae</i> .....	46
3) Méthodes alternatives d'étude d'interactions ARN-protéine.....	48
a) Système biotine/streptavidine .....	48
b) Strepto-tag .....	49
c) Criblage 1-hybride .....	49
d) Essai de fonction liée .....	50
e) Protéomique fonctionnelle .....	51
4) Mécanismes alternatifs de contrôle traductionnel.....	51
a) Micro-ARN .....	51
b) Séquestration de l'ARN .....	52
c) Activateur traductionnel.....	53
d) Structure de la région 5' non traduite.....	54
Conclusion .....	55
Bibliographie.....	xvii

## Liste des tableaux

Tableau I Identification des microséquences de protéines liant l'ARN <i>BglI</i> biotinylé .....	37
Tableau II Criblage 3-hybride chez <i>S. cerevisiae</i> . .....	40

## Liste des figures

Figure 1 Structure secondaire complexe des extrémités non traduites de l'ARNm <i>lbp</i> .....	14
Figure 2 Les essais de retardement sur gel d'électrophorèse (EMSA) avec des extraits protéiques de <i>L. polyedrum</i> ne montrent pas de différence circadienne.....	33
Figure 3 Région 3'UTR de <i>lbp</i> non protégée contre l'ARNase <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> . ....	35
Figure 4 Purification de protéines liant la région 3'UTR de <i>lbp</i> par chromatographie d'affinité d'ARN.....	36
Figure 5 Criblage d'une banque d'expression d'ADNc dans <i>E. coli</i> avec une sonde d'ARN <i>BglI</i> .....	38

## Liste des abréviations

**5-FOA** : acide 5-fluoroorotique

**ADNc** : ADN complémentaire

**APC** : « anaphase-promoting complex »

**CCTR** : « circadian-controlled translational repressor »

**cdc** : « cell division cycle »

**CDK** : « cyclin-dependent kinase »

**Ci** : curie

**cm** : centimètre

**cpm** : coup par minute

**DEPC** : diéthylpyrocarbonate

**DTT** : dithiothréitol

**EDTA** : acide éthylènediaminetétraacétique

**EMSA** : « electrophoretic mobility shift assay »

**EST** : « expressed sequence tag »

**frq** : « frequency »

**h** : heure

**HEPES** : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazineéthanesulfonique

**HLP** : « histone-like protein »

**IPTG** : Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside

**kB** : kilobase

**kDa** : kilodalton

**L** : litre

**LBP** : « luciferin-binding protein »

**LCF** : luciférase

**LD** : « light/dark »

**m** : mètre

**M** : molaire  
**μg** : microgramme  
**mg** : milligramme  
**μL** : microlitre  
**mL** : millilitre  
**μm** : micromètre  
**μM** : micromolaire  
**mM** : millimolaire  
**mmol** : millimole  
**MS** : spectrométrie de masse  
**μW** : microwatt  
**ng** : nanogramme  
**NR** : nitrate réductase  
**PAGE** : « polyacrylamide gel electrophoresis »  
**PBS** : « phosphate-buffered saline »  
**PCP** : « peridinin chlorophyll *a*-binding protein »  
**PCR** : « polymerase chain reaction »  
**pfu** : « plate forming unit »  
**pg** : picogramme  
**PMSF** : phénylméthanesulphonylfluoride  
**RHA** : ARN hélicase A  
**rpm** : rotation par minute  
**RRL** : lysats de réticulocytes de lapin  
**RRM** : « RNA recognition motif »  
**s** : seconde  
**SDS** : sodium dodécylsulfate  
**Tris** : trishydroxyméthylaminométhane  
**TBE** : tris borate EDTA

**TBP** : « TATA box-binding protein »

**TIP** : « translation intermediate purification »

**u** : unité

**UTR** : région non traduite

**UV** : ultraviolet

**V** : volt

**X-Gal** : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside



*À mes parents Guy et Carole*

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur David Morse pour son soutien indéfectible tant au plan scientifique que financier, mais surtout pour la passion et la rigueur dont il fait preuve dans son travail et qu'il a su m'inculquer au cours des dernières années. David m'a donné ma première chance dans ce milieu, ce que je n'oublierai jamais.

Merci également à mes collègues au laboratoire, Thierry Bertomeu, Tyler MacKenzie, Yunling Wang et Nasha Nasoury. Ce fut un plaisir de tous les instants de pouvoir vous côtoyer quotidiennement. Je ne peux pas imaginer comment j'aurais pu survivre sans vos judicieux conseils et surtout votre soutien moral.

Merci aux membres du laboratoire de Mario Cappadocia pour les nombreux emprunts de matériel, les leçons de mandarin gratuites et les nombreux gâteaux d'anniversaire partagés en cachette.

Merci à tous les membres et le personnel de l'IRBV qui ont fait en sorte que ces quelques années passées à l'institut aient été aussi agréables et stimulantes.

我要感谢范京京女友对我的无私支持。我们朝夕相处、同舟共计。你总是在我实验遇到困难时耐心鼓励要我坚持不懈，在我成功时与我分享喜悦。我感到你在我身边珍贵无比。我诚挚地爱你。

Merci Gony !

## Introduction

### 1) Dinoflagellés

*Lingulodinium polyedrum* (autrefois connu sous le nom *Gonyaulax polyedra*) est un dinoflagellé photosynthétique marin (Lewis and Hallett 1997). Cet organisme unicellulaire est bioluminescent et une grande partie de son métabolisme est contrôlée par l'horloge circadienne. Ses dimensions moyennes sont de 35 $\mu$ m x 45 $\mu$ m et son enveloppe présente un patron complexe de plaques thécales.

Les dinoflagellés forment un groupe varié d'organismes classés parmi les protistes (Spector 1984). La diversité au sein de ce groupe a fait en sorte qu'ils aient été classés comme protozoaires par les zoologistes et comme algues par les botanistes. En effet, si certains dinoflagellés vivent librement, d'autres sont plutôt parasitiques ou symbiotiques. Certains vivent en eau douce, d'autres en eau salée. Plusieurs sont autotrophes, mais il existe également des hétérotrophes. La plupart des autotrophes possèdent des plastides entourés de 3 membranes plutôt que les 2 ou 4 habituelles (Hackett, Anderson et al. 2004). Ces plastides seraient issus d'une endosymbiose secondaire et auraient un génome réduit. Le pigment accessoire principal dans ces plastides est le caroténoïde péridinine qui confère la couleur brun-rouge responsable de la dénomination « pyrophyte » (algue de feu) attribuée à ces espèces par les botanistes (grec: « pyrros » = flamme).

Traditionnellement, les dinoflagellés ont été classés selon la présence ou l'absence d'une couverture cellulaire appelée thèque (Netzel and Dürr 1984). Cette structure consiste en une série de vésicules aplaties situées sous la membrane externe. Les vésicules thécales peuvent être vides ou remplies de matériel granulaire, ce qui confère à la cellule une forme plus ou moins complexe pouvant servir à la classification taxonomique. De la plaque thécale, émergent 2 flagelles; l'un transversal, l'autre longitudinal. Ces flagelles permettent le déplacement à des vitesses pouvant atteindre 75 à 370  $\mu$ m/s et leur orientation permet un

mouvement de nage en spirale à l'origine de leur appellation « dinoflagellé » donnée par les zoologistes (grec: « dinos » = tourbillon).

Récemment, une révision complète de la classification des dinoflagellés et autres protistes a été publiée en tenant compte des observations ultrastructurales et des études de phylogénie moléculaire (Adl, Simpson et al. 2005). Les dinoflagellés y sont placés dans le supergroupe des *Chromalveolata* qui regroupe des organismes dont le plastide est le résultat d'une endosymbiose secondaire d'un *Archaeplastide* ancestral qui peut ensuite avoir été perdu ou réduit et parfois réacquis par une endosymbiose tertiaire. L'origine des plastides des dinoflagellés est d'ailleurs encore aujourd'hui un sujet de débat actif (Waller, Patron et al. 2006). Avec les *Apicomplexa* et les *Ciliophora*, les *Dinozoa* forment le groupe des *Alveolata* caractérisé par les alvéoles corticales pouvant être vides ou remplies de matériel granulaire. Les *Dinozoa* se distinguent de leurs cousins par leur fuseau mitotique extranucléaire. Parmi les *Dinozoa*, les espèces présentant 2 flagelles forment les *Dinoflagellata*. La structure chromosomique sans histones caractérise les *Dinophyceae* parmi les *Dinoflagellata*. Les différentes espèces de *Dinophyceae* (dinoflagellés) sont ensuite classées principalement selon la structure de leur plaque thécale. *Lingulodinium polyedrum* est classé parmi les *Peridiniophycidae* étant donné les séries de 5 ou 6 plaques latitudinales qui composent sa plaque thécale.

Faisant partie du phytoplancton, l'importance écologique des dinoflagellés est considérable étant donné leur position à la base de la chaîne alimentaire (Hackett, Anderson et al. 2004). Les espèces photosynthétiques sont responsables d'une proportion substantielle de la production primaire de la biosphère et ils contribuent également à enrichir les fonds marins en sédimentant. La surprolifération de certaines espèces est à l'origine des marées rouges qui se produisent généralement dans des eaux chaudes et peu profondes. Au cours de ce phénomène, la densité cellulaire peut atteindre  $10^7/L$  et l'eau prend une couleur rouge due à la périodinine présente dans ces algues. Ces marées posent un problème de santé publique

étant donné la capacité de plusieurs espèces à produire de puissantes toxines pouvant s'avérer mortelles. Les dinoflagellés sont également responsables de la luminescence qui peut parfois être observée dans l'océan la nuit puisque certaines espèces ont la capacité d'émettre de la lumière. Il existe donc plusieurs raisons d'étudier les dinoflagellés.

### a) Noyau

En 1965, John Dodge suggérait l'appellation mésocaryote pour décrire les dinoflagellés comme un groupe intermédiaire entre les procaryotes et les eucaryotes (Dodge 1965). Les nombreuses caractéristiques inhabituelles du noyau des dinoflagellés ne sont certainement pas étrangères à cette proposition. En effet, les dinoflagellés contiennent de 6 à 400 pg d'ADN/noyau alors que la plupart des eucaryotes n'en contiennent que 0,04 à 3 pg/noyau (Rizzo 1987). Leur ADN contient certaines bases modifiées telles que l'hydroxyméthylurée (unique à ce groupe), la *N*<sup>6</sup>-méthyladénine et la 5-méthylcytosine dans une proportion pouvant atteindre jusqu'à 70%, ce qui pourrait lui conférer des propriétés spéciales de liaison et affecter l'expression génique et l'organisation chromosomique.

L'organisation, la régulation et l'expression génique chez les dinoflagellés diffèrent en certains aspects des autres eucaryotes. Par exemple, à ce jour, aucune boîte TATA ni séquence consensus n'ont été identifiées dans les régions promotrices. Seule une séquence potentiellement promotrice a pu être trouvée dans l'espace intergénique des gènes *lcf* et *pcp* de *L. polyedrum* (Li and Hastings 1998). Récemment, une forme de TBP exprimée chez *Cryptothecodinium cohnii* a été identifiée. Ce nouveau facteur d'initiation a une très grande affinité pour la séquence TTTT, ce qui pourrait expliquer l'absence de boîtes TATA (Guillebault, Sasorith et al. 2002). Certains gènes contiennent des séquences répétées, d'autres ont des copies en tandem. Certains n'ont pas d'introns et produisent un ARNm unique ou polycistronique. La régulation génique semble être faite au niveau

transcriptionnel. Toutefois, des études d'expression chez *Pyrocystis lunula* ont montré un contrôle circadien de l'accumulation de certains transcrits ainsi qu'un contrôle traductionnel (Okamoto and Hastings 2003). On note également une abondance de séquences répétées non codantes dont la fonction demeure à ce jour obscure.

La structure chromosomique des dinoflagellés (dinochromosomes) est de nos jours encore source de débat. Les eucaryotes empaquettent leur chromatine grâce à une organisation nucléosomique et supranucléosomique qui permet d'exercer une régulation fine de la structure. Chez les dinoflagellés, des études biochimiques ont confirmé l'absence d'histones, qui sont les unités protéiques autour desquelles s'enroule l'ADN pour former le nucléosome (Rizzo 1987). En outre, le ratio protéine:ADN n'est que de 1:10, contrairement au ratio de 1:1 trouvé chez les autres eucaryotes. Ceci laisse donc entrevoir une organisation chromosomique distincte chez les dinoflagellés de même qu'un contrôle différent de la structure chromatiniennne étant donné l'impossibilité d'exploiter le code histone (Wargo and Rizzo 2001).

De petites protéines basiques appelées HLP (« histone-like protein ») ont été isolées et caractérisées chez plusieurs espèces de dinoflagellés. Ces protéines lient spécifiquement des séquences d'ADN et semblent être acétylées, ce qui suggère un rôle analogue à celui des histones (Chudnovsky, Li et al. 2002). De plus, des analyses phylogénétiques ont permis de relier certaines HLP de *C. cohnii* à HU, la protéine la plus abondante liant l'ADN du nucléoïde de *Escherichia coli*, ainsi qu'à l'histone H1 eucaryote (Wong, New et al. 2003). Les autres alvéolates (ciliés et apicomplexes) ayant des histones eucaryotes, il est possible que les dinoflagellés aient perdu ces histones et simultanément ou séquentiellement incorporés les HLP bactériennes, auquel cas un ancêtre dinoflagellé avec un noyau eucaryote « traditionnel » aurait pu exister (Wong and Kwok 2005). Toutefois, le rôle des HLP dans la structure de l'ADN n'est pas encore généralement accepté, certains

les croyant plutôt impliqués dans la régulation de l'expression génique (Sala-Rovira, Geraud et al. 1991).

La question de l'empaquetage d'une aussi grande quantité d'ADN sans nucléosomes demeure toutefois sans réponse. Les dinochromosomes renferment une grande proportion d'ARN, de cations divalents et de métaux de transition tels que  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Ni}^{2+}$ . Tous pourraient jouer un rôle dans l'organisation de la chromatine. À ce jour, le modèle le plus généralement accepté pour l'organisation chromosomique chez les dinoflagellés est dit « de cristaux liquides » (Rill, Livolant et al. 1989). Selon ce modèle, la majorité de l'ADN se trouverait sous une forme liquide cholestérique cristalline, c'est-à-dire une phase condensée fluide dans laquelle les molécules sont ordonnées, mais peuvent diffuser. Cet état est comparable aux membranes cellulaires ou au nucléoïde bactérien. Le reste de l'ADN formerait des boucles latérales moins concentrées qui pourraient être les sites de transcription actifs (Soyer-Gobillard, Gillet et al. 1999). La nature linéaire des dinochromosomes est toutefois typiquement eucaryote, de même que l'existence de séquences télomériques similaires à celles des plantes (Moreno Diaz de la Espina, Alverca et al. 2005).

Une autre caractéristique des chromosomes des dinoflagellés est qu'ils demeurent condensés pendant tout le cycle cellulaire, bien qu'on puisse observer des niveaux de condensation variant pendant l'interphase (Costas and Goyanes 2005), notamment pour permettre la réplication (Spector, Vasconcelos et al. 1981). Leur organisation est également unique et change pendant le cycle cellulaire. Le nombre des chromosomes varie selon l'espèce et son mode de vie, les dinoflagellés parasitiques en ayant moins. Les estimations à cet effet vont de 20 à 270 chromosomes par noyau haploïde. Les dinochromosomes sont attachés à l'enveloppe nucléaire comme le nucléoïde bactérien est fixé à la membrane plasmique.

## b) Cycle cellulaire

Bien que le mode principal de reproduction soit la mitose, une reproduction sexuée a été observée chez quelque 18 espèces de dinoflagellés (Pfiester 1984). Le cycle de vie de la plupart des espèces à reproduction sexuée passe par une phase végétative et une phase sexuelle. La cellule végétative est généralement haploïde et se divise par mitose pour produire des gamètes. La fusion de 2 gamètes produit une cellule diploïde appelée planozygote. Celui-ci croît et devient un hypnozygote qui subit ensuite une méiose pour produire des cellules végétatives. Ce modèle ne s'applique pas à toutes les espèces à reproduction sexuée. Par exemple, les cellules végétatives de *Noctiluca scintillans* sont plutôt diploïdes.

Le cycle cellulaire des dinoflagellés comporte les étapes G1-S-G2-M caractéristiques des eucaryotes. Le passage entre ces étapes est également contrôlé de façon serrée. Toutefois, ils sont parmi les seuls eucaryotes à posséder un fuseau mitotique extranucléaire. Au cours de la mitose, il y a maintien de l'intégrité de la membrane nucléaire et du nucléole. Le noyau est plutôt traversé par des invaginations cytoplasmiques dans lesquels passe le fuseau mitotique (Perret, Davoust et al. 1993). Des structures s'apparentant à des kinétochores interagiraient avec ce fuseau par l'intermédiaire de la membrane nucléaire. Les chromosomes seraient ainsi orientés de telle façon qu'ils puissent être distribués équitablement entre les 2 cellules-filles. Une telle mitose « fermée » est également observée chez d'autres alvéolates tels que les ciliés et les apicomplexes. La nécessité d'un tel mécanisme peut être reliée à l'état de cristaux liquides de l'ADN de ces organismes. En effet, cet état est très sensible aux variations des conditions physico-chimiques, lesquelles diffèrent entre le noyau et le cytosol. Un changement de volume du noyau ou sa désintégration peuvent provoquer une transition entre les différentes phases cholestériques et ainsi compromettre l'intégrité du génome (Strzelecka, Davidson et al. 1988).



Bien que semblant distinct, le cycle cellulaire des dinoflagellés comporte néanmoins plusieurs éléments typiquement eucaryotes. Un ADNc du dinoflagellé *L. polyedrum* encodant une cycline mitotique a récemment été isolé par complémentation fonctionnelle d'un mutant de *Saccharomyces cerevisiae* (Bertomeu and Morse 2004). L'extrémité N-terminale de GpCYC1 n'a que 30% de similarité avec les autres cyclines mitotiques connues à ce jour. Toutefois, elle partage 70% d'identité avec le fragment C-terminal encodé par un ADNc du dinoflagellé *Alexandrium tamarense*. À ce jour, aucun gène *cdk* de dinoflagellé n'a été formellement isolé. Toutefois, un ADNc de *Karlodinium micrum* encoderait un polypeptide contenant une séquence PSTAIRE caractéristique de ce type de kinase et ayant plus de 50% d'identité avec les autres CDK. Un ADNc de *Heterocapsa triquetra* code également pour un polypeptide présentant 40% d'identité avec la séquence de *K. micrum* et les autres CDK. En attendant l'identification formelle d'un gène *cdk*, plusieurs indices suggèrent que le cycle cellulaire des dinoflagellés est contrôlé par une ou des CDK. En effet, le passage G1/S est inhibé chez plusieurs espèces par l'olomoucine, un inhibiteur compétitif de l'ATP sur la kinase p34<sup>cdc2</sup> (Van Dolah and Leighfield 1999). Un point de contrôle de la phase M est également suggéré par la prolongation de la métaphase causée par le nocodazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules (Yeung, New et al. 2000). Des études immunologiques à partir d'anticorps anti-PSTAIR ont permis d'identifier chez des dinoflagellés des polypeptides de plus de 30 kDa avec une activité kinase sur l'histone H1 atteignant des maxima lors de la phase S et la mitose (Bhaud, Barbier et al. 1994; Leveson, Wong et al. 1997). On soupçonne également l'existence d'un APC (« anaphase-promoting complex ») étant donné la dégradation contrôlée par le cycle cellulaire de cyclines humaines recombinantes dans des extraits protéiques du dinoflagellé *C. cohnii* (Yeung, New et al. 2000).

La division cellulaire des dinoflagellés semble réglée pour se produire généralement à la fin de la phase nocturne même si le cycle cellulaire dure plusieurs jours. Il existerait donc une relation entre le cycle cellulaire et le cycle circadien. L'horloge circadienne ouvrirait une

fenêtre d'opportunité pour permettre aux cellules ayant atteint une taille suffisante d'entrer en phase M. Le mécanisme de ce contrôle n'a pas été élucidé chez les dinoflagellés étant donné le manque de connaissances sur les éléments régulateurs du cycle cellulaire. Toutefois, dans des cellules murines de foie en régénérescence, il a été montré que l'horloge circadienne contrôle l'expression de gènes associés au cycle cellulaire, notamment *wee1*, ce qui module l'activité du complexe cycline B1-cdc2 kinase qui permet la progression en phase M (Matsuo, Yamaguchi et al. 2003). En outre, l'absence de lumière et une carence en azote bloquent le cycle cellulaire en G1 chez le dinoflagellé *Amphidinium carterae* (Olson and Chisholm 1986).

### **c) Bioluminescence**

Parmi les dinoflagellés marins, certaines espèces ont la capacité de produire de la bioluminescence. Ce phénomène est attribuable à l'oxydation par l'O<sub>2</sub> d'un substrat, la luciférine, catalysée par une enzyme, la luciférase. Cette réaction, de façon générique, est commune à toutes les espèces bioluminescentes, tant chez les dinoflagellés que chez les bactéries, les méduses ou les insectes. Toutefois, les acteurs de cette réaction ne partagent pas de similarité d'une espèce à l'autre, ce qui représente un exemple d'évolution convergente (Wilson and Hastings 1998).

Il existe 2 modes d'émission de lumière chez les dinoflagellés. Le premier, le « flashing », est visible à l'oeil nu et est dû à une émission brève (0,1 s), mais intense (10<sup>9</sup> quanta/s/cellule) de photons pouvant être spontanée ou stimulée. Dans la culture, elle est maximale au milieu de la nuit. Chaque cellule produirait spontanément un seul flash par nuit. Certains auteurs proposent que la bioluminescence décroît la prédation par les copépodes, une idée supportée par la prédation accrue des dinoflagellés bioluminescents dans leur phase de jour. Les copépodes possédant un organe sensible à la lumière, ils

seraient désorientés par la luminescence (Esaias and Curl Jr 1972). Le « flashing » pourrait aussi servir de système d'alarme afin de diminuer la prédation (Abrahams and Townsend 1993). En l'occurrence, l'alarme est déclenchée par un prédateur, typiquement un copépode, nageant au milieu d'une population de dinoflagellés, ce qui cause un mouvement dans l'eau suffisant pour déformer la membrane du dinoflagellé et activer la réaction bioluminescente. Cette alarme attire un policier, prédateur de copépodes, qui se nourrit de ce dernier ou, à tout le moins, le fait fuir, diminuant la quantité de prédation sur les dinoflagellés. Des résultats expérimentaux appuient les 2 hypothèses. La bioluminescence étant une réaction oxydative, certains ont émis l'hypothèse qu'elle servirait à diminuer pendant la nuit la quantité de dérivés réactifs de l'oxygène produits pendant le jour par la photosynthèse et pouvant causer divers dommages cellulaires. Cette fonction serait au plus marginale puisque les dinoflagellés produisent plusieurs enzymes, notamment la superoxyde dismutase, pour traiter ces produits (Okamoto, Robertson et al. 2001). Le second mode, le « glowing », est une émission faible ( $10^4$  quanta/s/cellule), mais continue qui atteint un maximum vers la fin de la nuit. Il serait fort possiblement dû au désassemblage des organites fonctionnels de la bioluminescence et n'aurait pas d'importance écologique.

### **i) Luciférine**

La bioluminescence a particulièrement été étudiée chez le dinoflagellé *L. polyedrum*. La luciférine est un tétrapyrrole linéaire analogue à la chlorophylle (Nakamura, Kishi et al. 1989). Ce substrat est particulièrement sensible à l'auto-oxydation non luminescente, d'où la nécessité de le séquestrer par la « luciferin-binding protein » (LBP). Le pH détermine l'affinité de liaison de la luciférine à ses différents partenaires. À pH 7 et plus, elle est fortement liée à LBP; alors qu'à pH 6,5 et moins, elle est oxydée par la luciférase (LCF) (Morse, Pappenheimer et al. 1989). Il a été proposé que la variation de pH détermine l'émission de lumière en provoquant le changement de partenaire de la luciférine (Hastings

and Dunlap 1986). Toutefois, plusieurs dinoflagellés bioluminescents, notamment *P. lunula*, ne contiennent pas de LBP (Colepicolo, Roenneberg et al. 1993).

## ii) Scintillons

Le siège de la réaction de bioluminescence chez *L. polyedrum* est un petit organite appelé scintillon. Ces scintillons, au nombre d'environ 400/cellule en phase de nuit, ont un diamètre d'environ 0,4  $\mu\text{m}$ . Ils sont formés par l'invagination de la membrane vacuolaire où le pH serait contrôlé. La réaction bioluminescente est déclenchée par une déformation de la membrane plasmique, ce qui provoquerait l'activation de récepteurs couplés à une protéine G (Chen, Latz et al. 2007). La transduction du signal impliquerait ensuite un changement de la concentration intracellulaire de calcium (von Dassow and Latz 2002). Un potentiel d'action propagé le long de la membrane vacuolaire permettrait finalement un flux de protons de la vacuole vers le cytoplasme résultant en une acidification du scintillon. Environ dix fois plus de scintillons sont observés dans les cellules émettrices de lumière pendant la nuit en comparaison avec le jour, ce qui implique un contrôle circadien de leur formation (Fritz, Morse et al. 1990). Toutefois, les détails de la formation et de la destruction de ces organites sont inconnus. La luminescence des scintillons co-localise avec la fluorescence de la luciférine (Johnson, Inoue et al. 1985). LBP et la luciférase co-immunolocalisent également avec les scintillons (Nicolas, Morse et al. 1991). Lors d'une extraction à pH 8, l'activité bioluminescente se retrouve tant dans la fraction soluble que dans la fraction insoluble. Cette dernière est due à la fermeture des scintillons en vésicules lors du bris de la membrane vacuolaire. Les scintillons purifiés contiennent uniquement LCF, LBP et la luciférine (Desjardins and Morse 1993) et peuvent émettre des photons *in vitro* lorsque stimulés par une diminution de pH à 6.

### iii) Luciférase

Le cycle de formation et destruction des scintillons chez *L. polyedrum* est synchronisé avec celui de synthèse et dégradation de l'enzyme luciférase, la quantité de cette dernière étant 10 fois plus grande la nuit que le jour. La luciférase est une protéine d'environ 137 kDa ayant 3 domaines catalytiques presque identiques (Li, Hong et al. 1997). Le gène *lcf* est organisé en répétition en tandem dans le génome et ne comporte pas d'intron. L'espace intergénique est d'une taille de 1,5 kB et ne contient ni boîte TATA ni séquences promotrices reconnues. Toutefois, une séquence de 13 nucléotides également présente dans l'espace intergénique de *pcp* chez *L. polyedrum* pourrait représenter le premier promoteur dinoflagellé (Li and Hastings 1998). Des analyses « Northern » de *lcf* révèlent que le niveau d'ARNm ne varie pas pendant la durée du cycle circadien (Mittag, Li et al. 1998). De plus, les ARNm extraits de cellules à différents temps circadiens sont tous traduits au même niveau *in vitro* dans des lysats de réticulocytes de lapins (RRL), ce qui permet de conclure à un contrôle traductionnel de la synthèse de la luciférase. Chez *L. polyedrum*, plusieurs protéines semblent contrôlées de cette façon (Milos, Morse et al. 1990). Le mécanisme par lequel s'exerce ce contrôle demeure toutefois inconnu à ce jour. Toutefois, le cycle de synthèse/dégradation de la luciférase n'est pas le seul mécanisme de régulation de la luciférase, même chez les dinoflagellés dans lesquels la bioluminescence est contrôlée par l'horloge circadienne. Chez *P. lunula*, l'abondance de la luciférase demeure constante pendant tout le cycle (Knaust, Urbig et al. 1998). Par contre, sa localisation cellulaire et sa sensibilité à la stimulation mécanique varient pendant la journée (Widder and Case 1982).

### iv) « Luciferin-binding protein »

Le second élément protéique du système bioluminescent chez *L. polyedrum*, LBP, passe également par un cycle quotidien de synthèse et de dégradation avec un rapport nuit/jour

d'environ 10. La nuit, LBP peut représenter jusqu'à 1% de la quantité totale de protéine dans la cellule (Morse, Milos et al. 1989). La protéine LBP est d'environ 75 kDa et comporte un domaine N-terminal de liaison à la luciférine (Morse, Pappenheimer et al. 1989). On retrouve une molécule de substrat par dimère de LBP. Avec un point isoélectrique de 6,7, LBP subirait un changement conformationnel lors des variations de pH au sein des scintillons, ce qui modifierait son affinité pour la luciférine. Le gène *lbp* est de 2,3 kB, compte environ 1000 copies organisées en tandem dans le génome et ne contient pas d'intron ni de signal de polyadénylation (Lee, Mittag et al. 1993). Un tel signal, conservé chez la plupart des autres eucaryotes, n'a d'ailleurs jamais été identifié chez les dinoflagellés. Les ARNm sont toutefois bel et bien polyadénylés. L'espace intergénique de *lbp* compte environ 3,0 kB et ne contient pas de séquences promotrices connues ni la séquence mentionnée ci-haut de *lcf* et *pcp*.

*lbp* est en fait une grande famille de gènes pouvant être séparée en 2 groupes encodant respectivement les protéines LBP $\alpha$  et LBP $\beta$  (Machabée, Wall et al. 1994). LBP $\beta$  partage 86% d'identité avec LBP $\alpha$  tant au niveau des acides aminés que des nucléotides. L'électrophorèse bidimensionnelle montre les deux isoformes en quantité égale dans les extraits protéiques. Les analyses « Northern » isoformes-spécifiques montrent également des niveaux d'ARNm semblables. Les analyses « Southern » indiquent que chaque isoforme compte environ le même nombre de copies et présente une organisation génomique semblable. Il est intéressant de noter que les 2 isoformes de LBP se retrouvent en quantité égale et que LBP lie la luciférine sous forme de dimère. Il est ainsi raisonnable d'émettre l'hypothèse qu'il s'agisse d'un hétérodimère  $\alpha\beta$  et non d'un homodimère tel que postulé auparavant.

Tout comme la luciférase, l'expression de *lbp* semble contrôlée au niveau traductionnel, son ARNm étant d'une abondance égale tout au long du cycle circadien et pouvant être traduit *in vitro* dans les RRL (Morse, Milos et al. 1989). De plus, l'ARNm de *lbp* se trouve

majoritairement associé aux polysomes pendant la phase nocturne contrairement à la phase diurne (Sczekan, Lee et al. 1993). Une étude avec la thiolutine, un inhibiteur de l'ARN polymérase II, a confirmé que les niveaux d'ARNm de *lbp* et *lcf* de *L. polyedrum* demeuraient élevés pendant plusieurs heures suivant l'ajout de l'inhibiteur peu importe le temps au cours du cycle circadien (Rossini, Taylor et al. 2003), ce qui éliminait l'hypothèse d'un contrôle post-transcriptionnel via une modulation de la stabilité de l'ARNm. Un tel contrôle circadien a déjà été rapporté pour les gènes *ccl* et *sen1* chez *Arabidopsis thaliana* (Lidder, Gutierrez et al. 2005).

Fait à noter, l'analyse des régions 5' et 3' non traduites de l'ARNm de *lbp* a montré un haut niveau de structure secondaire aux 2 extrémités (Sczekan, Lee et al. 1993) (Fig. 1). De telles structures complexes sont souvent reconnues par des facteurs de régulation de la traduction (Kozak 1988). Une protéine d'environ 45 kDa a d'ailleurs été rapportée comme liant spécifiquement la région 3'UTR de l'ARNm de *lbp* sur une séquence (U)UG-riche de 22 nucléotides (Mittag, Lee et al. 1994).

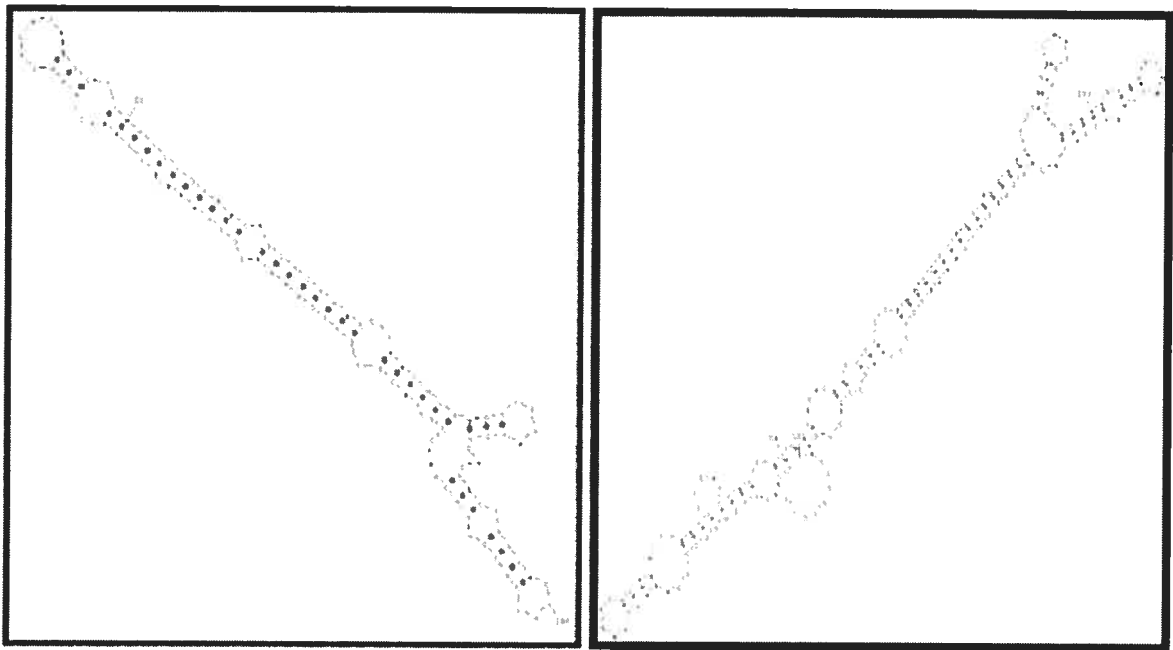


Figure 1 Structure secondaire complexe des extrémités non traduites de l'ARNm *lbp*.

Structure secondaire prédite des régions 5'UTR (gauche) et 3'UTR (droite) de l'ARNm *lbp*. Les séquences ont été soumises à mfold version 3.0 (copyright 1996 Dr. M. Zuker).



Le contrôle traductionnel implique également un petit cadre de lecture de 111 nucléotides dans la région 5'UTR. Ce petit cadre causerait un « leaky scanning » du codon initiateur normal, ce qui conduirait à la traduction de 2 formes de LBP : LBP-A (75kDa) et LBP-B (72kDa) (Mittag, Eckerskorn et al. 1997). Seule la quantité de LBP-A varie durant le cycle circadien, la quantité de LBP-B demeurant faible et constante. Étant donné que le contrôle traductionnel via la région 3'UTR implique généralement une interaction directe ou indirecte avec l'extrémité 5', Mittag *et al.* ont supposé un mécanisme au cours duquel le facteur liant la région 3'UTR masquerait pendant la nuit le codon initiateur du petit cadre de lecture en 5' (circularisant ainsi l'ARNm), ce qui permettrait à l'initiation d'être effectué sur le premier AUG du cadre de lecture de *lbp* produisant la forme LBP-A. Cette hypothèse n'est toutefois pas en accord avec les résultats précédents puisque le facteur ne lie l'extrémité 3' que durant le jour, agissant ainsi comme répresseur traductionnel. Des résultats récents ont montré que la température influence le rapport LBP-A:LBP-B chez *L. polyedrum* (Mittag M.; Communication personnelle).

Une étude d'hybridation *in situ* de l'ARNm de *lbp* chez ce dinoflagellé a montré une répartition homogène du transcrit dans la cellule tout au long du cycle (Fritz, Milos et al. 1991). Toutefois, une étude de fractionnement d'un extrait cellulaire par ultracentrifugation différentielle a montré une localisation membranaire du transcrit pendant le jour et une localisation au cytosquelette pendant la nuit corrélant avec le rythme de traduction de la protéine (Techel, Chuang et al. 1996). Les auteurs expliquent la différence des résultats avec l'étude d'hybridation *in situ* par le fait que cette technique est moins sensible. Cette même étude rapporte 4 protéines liant spécifiquement l'ARNm de *lbp* tant en phase diurne que nocturne. La liaison de ces protéines à l'ARNm est faible, ce qui est caractéristique des facteurs régulateurs. Ces protéines ont été isolées par hybridation *in vitro* à un ARN biotinylé de *lbp*. Cet ARN n'inclut toutefois la partie 3'UTR, ce qui signifie que les protéines identifiées ne correspondent pas au répresseur traductionnel mentionné ci-haut. Il est ainsi possible que le complexe ARN-protéine contrôle la traduction de LBP en dictant la localisation cellulaire du transcrit. Fait intéressant à noter, bien que le contrôle de l'expression de *lbp* chez *L. polyedrum* semble extrêmement complexe, ce gène ne se retrouve pas chez toutes les espèces de dinoflagellés bioluminescents.

## 2) Horloge circadienne

L'étude des dinoflagellés, notamment *L. polyedrum*, a grandement contribué à l'avancement des connaissances sur les rythmes circadiens. En effet, ils constituent un modèle intéressant pour l'étude de ce système étant donné leur nature unicellulaire. On s'assure ainsi que toutes les composantes génétiques associées aux rythmes circadiens sont exprimées dans cette cellule, ce qui permet l'étude aux niveaux moléculaire, physiologique, comportemental et environnemental. Ils présentent également une grande variété de rythmes circadiens aisément observables et dont les mesures peuvent parfois même être automatisées.

Les rythmes circadiens sont des rythmes biologiques d'une périodicité d'environ 24 heures. Ils permettent d'anticiper les changements environnementaux les plus probables de façon à optimiser le métabolisme d'un organisme. Ils se retrouvent chez une grande variété d'espèces qui vont des Cyanobactéries à l'Homme. Dans des conditions constantes, le rythme circadien persiste et suit une périodicité qui peut être légèrement différente de 24 heures. On parle alors de rythme endogène.

Le système circadien inclut l'oscillateur circadien, une voie afférente et une voie efférente. La voie afférente permet d'acheminer à l'oscillateur circadien les informations nécessaires pour que l'horloge soit synchronisée avec l'environnement. La lumière constitue le principal « zeitgeber » (allemand : « zeitgeber » = donneur de temps), mais la température et certains signaux chimiques peuvent également jouer ce rôle. La voie afférente peut par exemple être constituée par une protéine activée par la lumière ou par un récepteur membranaire. L'oscillateur circadien sert à intégrer les informations environnementales pour synchroniser les différents rythmes circadiens. La lumière permet également de décaler le rythme circadien en le retardant ou en l'avancé. Cette caractéristique est

particulièrement observable par les voyageurs qui se déplacent entre différents fuseaux horaires et dont le rythme circadien du sommeil est progressivement synchronisé avec les nouvelles conditions environnementales. Dans des systèmes modèles autres que *L. polyedrum*, l'oscillateur se compose de différents gènes et les produits de ces gènes participent à des boucles de rétroaction positives et négatives (Dunlap 1999). Ensemble, ces gènes vont contrôler l'expression de protéines en fonction des informations temporelles reçues. La voie efférente permet d'acheminer l'information donnée par l'oscillateur circadien pour moduler l'expression ou l'activité de certaines protéines, ce qui donne naissance aux rythmes circadiens. La voie efférente constitue des rythmes observables et peut agir à plusieurs niveaux de l'expression génétique via un ou plusieurs intermédiaires.

### **a) Voie afférente**

#### **i) Nitrate**

Une très grande partie de la physiologie de *L. polyedrum* est contrôlée par l'horloge circadienne. Chez ce dinoflagellé, la lumière constitue le plus important « zeitgeber ». Récemment, il a été montré qu'un signal non photique, le nitrate, pouvait influencer la phase, la période et l'amplitude du rythme circadien de la bioluminescence chez des cellules privées de ce nutriment (Roenneberg and Rehman 1996). En laboratoire, le nitrate est sans effet puisque les milieux de culture en contiennent suffisamment. Toutefois, en conditions naturelles, il est rare que les cellules soient exposées à de grandes concentrations de nitrate pendant tout le cycle circadien. En effet, pendant le jour, les cellules nagent et s'agrègent près de la surface océanique pour absorber l'énergie solaire et le CO<sub>2</sub> pour la photosynthèse. La nuit, elles descendent à une profondeur d'environ dix mètres où les nutriments, dont le nitrate, sont plus abondants et plus aisément disponibles étant donné la concentration inférieure d'organismes à cette profondeur. C'est à cette période qu'elles produisent la bioluminescence. Ainsi, le comportement circadien de cette algue lui permet d'optimiser

l'exploitation des ressources nécessaires à sa prolifération. Paradoxalement, il a été montré que l'activité de la nitrate réductase (NR) chez *L. polyedrum* atteint un maximum pendant la phase diurne (Ramalho, Hastings et al. 1995). Ces résultats ont toutefois été obtenus avec des cellules cultivées dans un milieu où la concentration de nitrate est constante et non limitante, où seule la lumière permet de synchroniser le rythme circadien.

## ii) Lumière

Bien que l'importance des signaux photiques soit indéniable pour la synchronisation du ou des oscillateurs circadiens chez les dinoflagellés, très peu d'informations sont disponibles sur la voie afférente qui achemine l'information lumineuse vers l'oscillateur circadien. De façon générale, il semble y avoir une distinction entre les photorécepteurs circadiens et ceux utilisés pour d'autres comportements, phototactiques par exemple. Ainsi, chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*, une rhodopsine est utilisée pour la phototaxie, alors que le rythme circadien est contrôlé par au moins deux photorécepteurs différents encore non caractérisés. Chez les plantes supérieures, il existe également deux photorécepteurs, les phytochromes et les cryptochromes. L'existence de plus d'un photorécepteur suggère que le système circadien exploite non seulement les différences d'intensité de la lumière, mais également les changements dans la composition spectrale de celle-ci. Chez *L. polyedrum*, l'existence de deux photorécepteurs a été postulée dès 1988, car la période rythmique augmente avec l'intensité de la lumière rouge et diminue avec la lumière bleue. Malgré tout, aucun d'entre eux n'a été identifié à ce jour. Le premier photorécepteur proposé doit répondre fortement à la lumière bleue (courte longueur d'onde). L'exposition à cette lumière au milieu de la nuit subjective peut causer une avance de phase de plus de 12 heures, alors qu'elle est presque sans effet au milieu du jour subjectif. Ceci suggère que ce photorécepteur est lui-même contrôlé par l'oscillateur circadien. Une telle boucle de rétroaction avait déjà été proposée d'après les effets de la créatine sur le rythme de la bioluminescence (Roenneberg and Taylor 1994). Le second photorécepteur répond tant à la lumière rouge (longue longueur d'onde) qu'à la lumière

bleue et cause de petites avances de phase à l'aube et des retards de phase au crépuscule. Ainsi, au milieu de la nuit subjective, lorsque les cellules sont en profondeur, seules les photorécepteur qui cause une avance de phase pendant la nuit soit sensible à la lumière bleue.

### **b) Oscillateur circadien**

L'oscillateur circadien est composé d'un ensemble de gènes régulés de façon à générer un rythme et ce même en absence de signaux photiques. Ces gènes forment un réseau complexe de boucles de rétro-activation et/ou de rétro-inhibition qui contrôlent directement ou indirectement l'expression rythmique de nombreuses protéines. Il en résulte des changements moléculaires, physiologiques ou comportementaux qui sont observables, ce que l'on appelle les rythmes circadiens. En conditions constantes, l'oscillateur circadien impose un rythme dont la période est rarement de 24 heures exactement. Le synchronisme avec les changements environnementaux est atteint grâce aux signaux perçus par différents récepteurs et acheminés à l'oscillateur via une voie afférente. Ces signaux sont intégrés et causent des avances ou des délais dans l'expression des gènes de l'oscillateur qui se répercutent sur les rythmes circadiens.

Même si les premières observations de l'existence d'une horloge circadienne ont été faites chez les plantes (de Mairan 1729), les premières études exhaustives se sont concentrées sur *Drosophila melanogaster* et le champignon *Neurospora crassa*. Chez ce dernier, les premiers clones des gènes de l'oscillateur ont été obtenus en 1984 via la caractérisation de mutants affectant l'horloge. Des gènes de l'horloge circadienne et les promoteurs qu'ils reconnaissent ont depuis été caractérisés chez les mammifères et, assez récemment, chez les plantes supérieures. L'avancement des connaissances révèle une complexité croissante de

l'oscillateur circadien. Cette complexité est conservée tant chez les organismes multicellulaires qu'unicellulaires. Toutefois, il n'existe pas d'homologie entre les gènes de l'horloge des animaux et de végétaux, ce qui ne facilite pas l'identification de ces gènes chez des espèces éloignées.

Chez les dinoflagellés, aucun gène de l'horloge n'a été caractérisé à ce jour. Ces organismes ne se prêtant pas bien aux études de caractérisation de mutants, l'élucidation de leur oscillateur circadien s'avère d'autant plus ardue. L'étude de l'oscillateur chez ces espèces s'effectue plutôt par perturbation du système circadien. Ainsi, une étude chez *L. polyedrum* a permis de postuler l'existence de plus d'un oscillateur circadien chez les organismes unicellulaires, ce que plusieurs croyaient limité aux organismes pluricellulaires (Roenneberg and Morse 1993). Cette étude montrait qu'en gardant les cellules sous une lumière rouge constante ou en ajoutant du nitrate à des cellules sous une lumière blanche intense, on observe une désynchronisation des rythmes de bioluminescence et d'agrégation. Cette désynchronisation serait due aux sensibilités différentes des divers oscillateurs à la lumière et aux nutriments.

Dès les années 1960, l'hypothèse de l'existence de plusieurs oscillateurs circadiens au sein d'un même organisme avait été émise pour expliquer la précision de l'horloge de même que la complexité des comportements rythmiques (Pittendrigh 1960). Chez les vertébrés, il existe un système hiérarchique dans lequel un oscillateur principal situé dans le cerveau coordonne les oscillateurs périphériques qui contrôlent les rythmes circadiens de façon tissu-spécifique (Bell-Pedersen, Cassone et al. 2005). Chez les organismes microbiens, plusieurs oscillateurs circadiens intracellulaires contrôlent les divers rythmes (Lakin-Thomas and Brody 2004). Une étude récente a montré que des oscillateurs circadiens contrôlant des rythmes distincts chez *N. crassa* peuvent partager certains composants, ce qui permettrait d'assurer la stabilité du système et le maintien de fréquences identiques et de la phase appropriée (de Paula, Lewis et al. 2006). Il s'agit d'une première étape dans la

compréhension des interactions entre les divers oscillateurs circadiens chez les organismes microbiens. Chez les vertébrés, la communication entre l'oscillateur principal et les oscillateurs spécifiques serait faite par un signal qui diffuserait du cerveau jusqu'aux tissus périphériques (Yamaguchi, Isejima et al. 2003). L'existence de 2 oscillateurs circadiens a également été observée chez *A. thaliana* (Michael, Salome et al. 2003).

La phosphorylation joue également un rôle important dans l'oscillateur circadien. Une oscillation circadienne présentant les propriétés fondamentales de l'horloge a été mesurée *in vitro* dans un tube contenant uniquement les protéines de Cyanobactérie KaiA, KaiB et KaiC avec de l'ATP (Nakajima, Imai et al. 2005). Cette expérience a montré que même en absence de transcription et/ou traduction, un rythme métabolique (« phoscillateur ») peut être au cœur de l'horloge circadienne, à tout le moins dans ce système simple. Les protéines de l'horloge chez les mammifères et les plantes contiennent également plusieurs sites de phosphorylation dont les fonctions sont encore à élucider. Ainsi, l'horloge circadienne est un système beaucoup plus complexe qu'il n'y paraît de prime abord même chez les organismes les plus simples.

### **c) Voie efférente**

Une approche prometteuse dans l'étude de l'oscillateur circadien passe par l'élucidation de la voie efférente, c'est-à-dire la façon dont l'oscillateur contrôle des rythmes circadiens observables. Une telle approche peut dans un premier temps permettre de comprendre comment l'horloge contrôle divers rythmes circadiens à des phases différentes. Deuxièmement, une fois le mécanisme élucidé, il peut permettre de remonter aux composantes de l'oscillateur. Plusieurs études chez *L. polyedrum* tentent actuellement de remonter la voie efférente jusqu'aux boucles de l'oscillateur circadien, notamment pour les rythmes de la division cellulaire et de la photosynthèse.

L'une des voies où le contrôle est le plus étudié concerne le contrôle traductionnel de la protéine LBP dans le rythme circadien de la bioluminescence. Le mécanisme proposé implique un élément *cis* dans la partie 3'UTR de l'ARNm auquel viendrait se lier un facteur *trans* qui inhiberait la traduction pendant la phase diurne. Ce mécanisme a été proposé à la suite de l'observation par « RNA electrophoretic mobility shift assay » (REMSA) qu'une protéine appelée « circadian-controlled translational repressor » (CCTR) liait l'ARNm de *lbp* pendant la phase diurne alors que la traduction de LBP est à son minimum (Mittag, Lee et al. 1994). Ce facteur agirait donc comme inhibiteur de la traduction. L'élément *cis* reconnu est situé dans la région 3'UTR et englobe une séquence (U)UG-riche de 22 nucléotides (GCU UUG UGU GUG UUG UGU GCA G). La caractérisation de CCTR a révélé qu'il s'agissait d'un dimère ou multimère d'environ 45 kDa en conditions natives. La découverte de ce système constituait à l'époque le premier contrôle circadien de la traduction et un des premiers contrôles traductionnels à utiliser la région 3'UTR.

L'existence d'un tel mécanisme chez *L. polyedrum* a stimulé les recherches d'un équivalent chez d'autres organismes présentant des rythmes circadiens. Chez l'algue verte *C. reinhardtii*, une protéine appelée CHLAMY 1 a été purifiée grâce à son activité de liaison au 3'UTR de l'ARNm de *lbp* de *L. polyedrum* (Mittag 1996; Zhao, Schneid et al. 2004). Bien que non bioluminescente et ne possédant pas de *lbp*, *C. reinhardtii* semble également utiliser un mécanisme de contrôle traductionnel passant par une séquence UG-riche. Son génome étant mieux connu que celui du dinoflagellé, de nombreux gènes présentant un tel élément ont été identifiés, notamment des gènes des métabolismes du nitrate et du carbone dont le contrôle circadien est bien documenté (Mittag and Waltenberger 1997; Waltenberger, Schneid et al. 2001). CHLAMY 1 est un hétéromère de 2 sous-unités (C1 et C3). Des études de surexpression et de sous-expression des 2 sous-unités ont montré une perturbation importante de l'horloge circadienne, suggérant un possible rôle de ces sous-unités dans l'oscillateur circadien (Iliev, Voytsekh et al. 2006). L'expression de chaque sous-unité semble également interconnectée. CHLAMY 1 deviendrait ainsi la première



protéine liant l'ARN à jouer un rôle dans l'oscillateur circadien d'un organisme unicellulaire. Chez *D. melanogaster*, la protéine LARK de la famille RRM (« RNA recognition motif ») contrôle le rythme circadien de l'éclosion adulte (McNeil, Zhang et al. 1998). Chez *A. thaliana*, la perturbation du rythme circadien d'abondance de la protéine AtGRP7 affecte certains rythmes circadiens seulement, ce qui suggère que cette protéine contrôle des voies efférentes spécifiques (Heintzen, Nater et al. 1997). Ceci illustre le fait que, bien que peu d'éléments moléculaires de l'oscillateur soient conservés au cours de l'évolution, tous les systèmes modèles étudiés à ce jour font appel à des mécanismes similaires (Dunlap and Loros 2004).

En plus du contrôle traductionnel exercé par CCTR sur l'expression de LBP, des résultats préliminaires indiquent que l'activité de liaison du répresseur pourrait être réduite par phosphorylation au début de la nuit (Mittag and Hastings 1996). La recherche d'une éventuelle protéine kinase représenterait ainsi l'étape suivante dans la remontée vers l'oscillateur circadien de *L. polyedrum*. Ceci montre également que le système circadien peut exercer son action à différents niveaux de l'expression génétique. Chez les Cyanobactéries, presque tous sinon la totalité des gènes sont régulés de façon circadienne au niveau de la transcription contre environ 10% chez les eucaryotes (Nakahira, Katayama et al. 2004). Chez de nombreux micro-organismes, il a été noté que l'expression des protéines à la fin de la voie efférente est sous un tel contrôle. Ainsi, il est envisageable que plusieurs niveaux de contrôle d'expression génétique au sein d'une même voie efférente soient utilisés par le système circadien.

### 3) Buts

- (1) Relier l'expression du gène *lbp* à l'horloge circadienne;
- (2) Identifier un élément *cis* de contrôle de la traduction de l'ARNm *lbp*;
- (3) Identifier un facteur *trans* régulateur de la traduction de LBP.

#### 4) Hypothèses

- (1) L'expression du gène *lbp* est régulée au niveau traductionnel;
- (2) Un élément *cis* de l'ARNm *lbp* est reconnu par un facteur *trans* régulateur de la traduction;
- (3) L'expression ou l'activité de ce facteur *trans* est régulée par l'horloge circadienne.

## **Matériel & Méthodes**

### **1) Approche biochimique**

#### **a) Culture**

*Lingulodinium polyedrum* (CCMP no. 1936) a été obtenu du Centre de Culture pour le Phytoplancton Marin Provasoli-Guillard (Boothbay Harbor, ME) et est cultivé dans un milieu d'eau de mer modifiée (f/2) (Guillard and Ryther 1962) à une température constante de  $18 \pm 1^\circ\text{C}$  sous un cycle 12h lumière/12h noirceur en utilisant une lumière blanche fluorescente à une intensité de  $50 \mu\text{mol de photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Le début de la phase lumineuse dans le cycle lumière/noirceur (LD) est défini comme le temps 0 (LD 0) et le début de la phase sombre est défini comme LD 12. Les cultures ont atteint une densité de 12-14 000 cellules/mL telle que mesurée en comptant avec un hémocytomètre.

#### **b) Extraits protéiques**

Pour préparer les extraits protéiques, des cultures de *L. polyedrum* ont été filtrées sous vide sur des filtres Whatman 541, puis congelées dans l'azote liquide et entreposées à  $-80^\circ\text{C}$ . Elles ont ensuite été décongelées sur glace et resuspendues dans un petit volume de tampon Munro (Coughlin, Teixeira et al. 2000) suppléé de Nonidet NP-40 0,1% de façon à obtenir une suspension visqueuse. Les cellules ont été brisées par 3 traitements de 60 secondes au « bead-beater » avec des billes de zirconium en laissant reposer 60 secondes entre chaque traitement. Les débris cellulaires insolubles ont été retirés par centrifugation à 16 000 g pendant 12 minutes à  $4^\circ\text{C}$  et seul le surnageant a été quantifié par un essai de Bradford et utilisé dans les essais.

### c) Sonde d'ARN

La sonde d'ARN a été synthétisée selon le protocole fourni par *Promega*. La taille de la sonde dépend de l'enzyme de restriction utilisé pour linéariser le plasmide. Le mélange réactionnel se compose de Tris-HCl 40 mM (pH 7,9), MgCl<sub>2</sub> 6 mM, spermidine 2 mM, NaCl 10mM, DTT 10 mM, RNAGuard RNase Inhibitor (Porcine) (*Pharmacia*) 1 u/μL, rATP 0,5 mM, rCTP 0,5 mM, rGTP 0,5 mM, rUTP 12 μM, plasmide pMM3 linéarisé 50 ng/μL (Mittag, Lee et al. 1994), [α-<sup>32</sup>P]rUTP (3000 Ci/mmol) 2,5 μCi/μL et T7 RNA polymérase 1 u/μL. Après incubation à 37°C pendant 1 heure, 1 u de RQ1 RNase-free DNase est ajoutée par μg de plasmide linéarisé, puis incubé à 37°C pendant 15 minutes. Les protéines sont ensuite extraites dans un volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1). La sonde est finalement filtrée sur une colonne Microcon (Millipore) afin d'éliminer les ribonucléotides non incorporés. L'activité de la sonde est mesurée par un compteur à scintillations et son intégrité a été constatée après migration sur gel de polyacrylamide avec urée 8 M.

### d) Essai de retardement sur gel (EMSA)

La concentration d'ARN radiomarqué dans tous les essais est de 100 pM. Le tampon de liaison est composé de tampon Munro (Coughlin, Teixeira et al. 2000)(HEPES 10 mM (pH 7,6), KCl 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 3 mM, DTT 1 mM, glycérol 5%) suppléé de PMSF 300 μM, leupeptine 3 μg/mL, NaF 25 mM, β-glycérophosphate 80 mM et ARN de levure 0,2 mg/mL (Hook, Bernstein et al. 2005). Chaque essai de 20 μL contient 28 μg de protéines à moins d'indication contraire. Les incubations ont été faites à 25°C pendant 30 minutes. Dans chaque essai de 20 μL, 1 μL de tampon de chargement (glycérol 98%, bleu de bromophénol 1% et xylène cyanol 1%) a été ajouté. Les échantillons ont été analysés sur un

gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes (6% [w/v] 20:1 acrylamide/Bis-acrylamide, glycérol 10%, TBE 0,5X). Le gel a été résolu à 200 V dans du TBE 0,5X pendant 4 heures à 4°C, puis séché et autoradiographié.

### **e) Chromatographie d'affinité**

500 µL de billes paramagnétiques enrobées de streptavidine (Spherotech Inc.) ont été lavées 4 fois dans 500 µL de PBS traité au DEPC en utilisant un aimant (Promega) (Mehta and Driscoll 1998). Ensuite, 10 µg de transcrit biotinylé ont été synthétisés en présence de CTP biotinylé (Biotin-11-CTP; Enzo Life Sciences Inc.) en plus des nucléotides non modifiées selon le protocole décrit ci-haut. Le ratio molaire CTP:biotin-11-CTP est de 2:1. Le transcrit biotinylé a été ajouté aux billes dans un volume total de 200 µL de PBS et incubé 1 heure à température pièce avec agitation. Le transcrit non lié a été retiré par 10 lavages dans 500 µL de PBS. Les billes ont ensuite été équilibrées 8 fois dans 500 µL de tampon Munro. 1 mg d'extrait protéique a été incubé sur glace pendant 20 minutes avec 1 mg d'ARN de levure comme compétiteur non spécifique. La réaction a ensuite été ajoutée aux billes de streptavidine équilibrées et incubée à 4°C pendant 2 heures avec agitation. Les protéines non liées ont ensuite été retirées par 4 lavages avec 500 µL de tampon Munro. Les protéines ont finalement été éluées séquentiellement dans 200 µL de NaCl 100mM, 500mM et 1 M pendant 45 minutes respectivement à température pièce avec agitation. Les échantillons pour l'analyse SDS-PAGE ont été préparés et migrés selon les techniques usuelles (Wang, Jensen et al. 2005). Les protéines excisées du gel coloré au bleu de Coomassie ont été décolorées, digérées à la trypsine, puis les fragments ont été séquencés par spectrométrie de masse (MS). Les fragments tryptiques ont été préparés et analysés à l'Institut de Recherche en Immunologie et Cancérologie (Montréal, Qc).

## f) Protection contre l'ARNase

### i) *In vitro*

Les réactions de liaison ont été faites telles que décrites ci-haut. Après la liaison, les échantillons ont été exposés sur glace pendant 30 minutes à une forte radiation UV ( $2000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) (Waltenberger, Schneid et al. 2001). 2  $\mu\text{L}$  de RNase A (10 mg/mL) ont ensuite été ajoutés et les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 30 minutes. Les produits de réaction ont été dénaturés dans le tampon de chargement, puis bouillis pendant 10 minutes et chargés sur un gel de SDS/polyacrylamide (séparation : 10% [w/v] 37,5:1 acrylamide/Bis-acrylamide; résolution : 5%). Le gel a été résolu à 150 V dans le tampon d'électrophorèse pendant 1 heure, puis séché et autoradiographié.

### ii) *In vivo*

25 mL de cellules prélevées à LD 17,5 et LD 20,5 ont été exposés sur glace pendant 30 minutes à une forte radiation UV ( $2000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) (Waltenberger, Schneid et al. 2001). Les cellules ont ensuite été centrifugées à 1 000 g pendant 1 minute, puis resuspendues dans du tampon Munro et brisées au « bead-beater » avec des billes de zirconium et incubées à 37°C pendant 30 minutes avec 2  $\mu\text{L}$  de RNase A (10 mg/mL). Les essais ont ensuite été mis dans un tampon de chargement SDS 1X, puis bouillies pendant 10 minutes et chargées sur un gel de SDS/polyacrylamide (séparation : 10% [w/v] 37,5:1 acrylamide/Bis-acrylamide; résolution : 5%). Le gel a été résolu à 200 V dans le tampon d'électrophorèse pendant 90 minutes. Les protéines ont ensuite été transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond C (Amersham). Les membranes ont été incubées à 65°C avec la sonde radioactive *lbp* préparée par la méthode d'amorce aléatoire.

## 2) Approche génomique

### a) Criblage 3-hybride chez *S. cerevisiae*

#### i) Plasmides

Le plasmide pIIIA LBP-MS2 a été préparé en clonant un fragment de la région 3'UTR de *lbp* amplifié par PCR dans les sites *SmaI* et *SphI* du plasmide pIIIA MS2-2. Le plasmide porte les marqueurs auxotrophiques *ADE2* et *URA3*. Ce vecteur permet l'expression de l'ARN hybride chez la levure.

La banque d'ADNc a été préparée par (Bertomeu and Morse 2004) dans le vecteur pAD-GAL4 selon le protocole décrit par *Stratagene*. Le plasmide porte le marqueur auxotrophique *LEU2* de même que le gène de résistance à l'ampicilline. Cette banque permet l'expression des ADNc chez *S. cerevisiae*.

#### ii) Souche YBZ1

Le génotype de la souche YBZ1 de *S. cerevisiae* est *MATa*, *ura3-52*, *leu2-3, 112*, *his3-200*, *trp1-1*, *ade2*, *LYS2 :: (LexAop)-HIS3*, *ura3 :: (lexAop)-lacZ*, *LexA-MS2 coat (N55K)* (Hook, Bernstein et al. 2005).

#### iii) Criblage

Le criblage 3-hybride est une adaptation d'un protocole décrit (Bernstein, Buter et al. 2002). Le plasmide pIIIA LBP-MS2 a d'abord été introduit (Gietz and Woods 2002) dans

*S. cerevisiae* YBZ1 et maintenu sur un milieu SC-Ura. Les levures ont ensuite été transformées avec la banque d'ADNc, puis étalées sur un milieu SC-Leu-His. Les clones survivants après une semaine ont été transférés sur un milieu Sc-Leu-Ade-His pour éliminer les clones ARN-indépendants. Après une semaine, les clones survivants ont été repiqués dans un milieu SC-Leu liquide. Les clones causant une agrégation des cellules en milieu liquide ont été éliminés. Les plasmides des clones restant ont été extraits et transformés dans XL-1 Blue MRF' (Stratagene). Les plasmides purifiés de *E. coli* ont ensuite été retransformés dans YBZ1 contenant le plasmide pIIIA LBP-MS2 pour confirmer leur activité permettant le sauvetage sur un milieu SC-Leu-His. Les clones subsistant ont ensuite été digérés par *EcoRI* et *XhoI* et séquencés.

## **b) Criblage d'une banque d'expression d'ADNc**

### **i) Banque**

La banque d'ADNc a été préparée par (Chaput, Wang et al. 2002) dans le vector lambda ZAP selon le protocole décrit par *Stratagene*. Le plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline. Cette banque permet l'expression des ADNc chez *E. coli*.

### **ii) Criblage**

L'infection par les bactériophages  $\lambda$  et l'étalement de *Escherichia coli* (souche XL-1 Blue MRF') a été faite selon le protocole décrit par *Stratagene* de façon à avoir  $2,5 \times 10^4$  pfu/pétri (150 mm). Des membranes de nitrocellulose ont ensuite été imprégnées dans une solution d'IPTG 20 mM pendant 30 minutes, puis appliquées sur les pétris et incubées toute la nuit à 37°C (Sägesser, Martinez et al. 1997).



Le tampon de criblage est composé de HEPES 15 mM (pH 7,9), KCl 50 mM, Ficoll 0,1% (w/v), Polyvinyl-Pyrrolidon PVP-40 0,1% (w/v), Nonidet P-40 0,01% (w/v),  $MnCl_2$  0,1 mM,  $ZnCl_2$  0,1 mM, EDTA 0,1 mM et DTT 0,5 mM. Pour la pré-hybridation et l'hybridation, 100  $\mu$ L d'ARN de levure 50 mg/mL ont été ajoutés à 50 mL de tampon de criblage. Les membranes de nitrocellulose ont d'abord été séchées sur du papier Whatman 3MM, puis lavées 4 fois pendant 5 minutes dans 100 mL de tampon de criblage à 4°C avec une agitation de 200 rpm. Elles ont ensuite été pré-hybridées pendant 30 minutes à 4°C dans 50 mL de tampon de criblage suppléé d'ARN de levure. L'hybridation s'est poursuivie pendant 2 heures avec la sonde d'ARN donnant une activité finale de  $0,5 \times 10^6$  cpm/mL. Les membranes ont finalement été lavées 4 fois pendant 5 minutes dans 100 mL de tampon de criblage, puis séchée sur du papier Whatman 3MM, enveloppée dans une pellicule plastique et autoradiographiée. Les clones positifs ont été purifiés jusqu'à homogénéité par des criblages secondaires et tertiaires (Sambrook, Fritsch et al. 1989).

## Résultats

Deux approches ont été employées afin d'identifier la protéine CCTR dont la liaison à un élément de la partie 3' non traduite de l'ARNm de *lbp* serait responsable de l'inhibition de la traduction pendant la phase diurne. L'approche biochimique consiste à répéter les expériences de 1994 qui avaient amené à formuler l'hypothèse du contrôle traductionnel de l'expression de *lbp* chez *L. polyedrum*. Ces expériences peuvent par la suite servir de test d'activité au cours d'un schéma de purification sur une colonne d'affinité d'ARN telle qu'employée lors de la purification de CHLAMY 1 de *C. reinhardtii*. L'approche génétique se base sur l'hypothèse que la protéine CCTR lie la partie 3' non traduite de *lbp* pour cribler 2 banques d'ADNc.

### 1) Approche biochimique

#### a) REMSA

En mélangeant des extraits protéiques de *L. polyedrum* préparés soit à LD2 soit à LD14, correspondant respectivement aux minimum et maximum de la traduction de LBP (Morse, Milos et al. 1989) avec une sonde d'ARN composée de la séquence 3'UTR de *lbp*, un retardement de la migration sur gel de polyacrylamide a été observé. Ceci confirme qu'une ou des protéines dans l'extrait peuvent lier la sonde d'ARN. Toutefois, la liaison n'est pas dépendante de l'heure à laquelle les cellules ont été prélevées. Cet effet est notable pour des sondes de tailles différentes (*BglI* et *XbaI* pour les Fig. 2A et 2B respectivement). La liaison ARN-protéine semble être non spécifique puisque l'ajout du transcrit *XbaI* non radioactif jusqu'à une concentration 400X supérieure à la sonde radioactive ne parvient pas à compétitionner (Fig. 2B). Ces essais ont été répétés avec des extraits protéiques prélevés à divers temps intermédiaires du cycle circadien. À tous les temps, les résultats sont demeurés les mêmes.

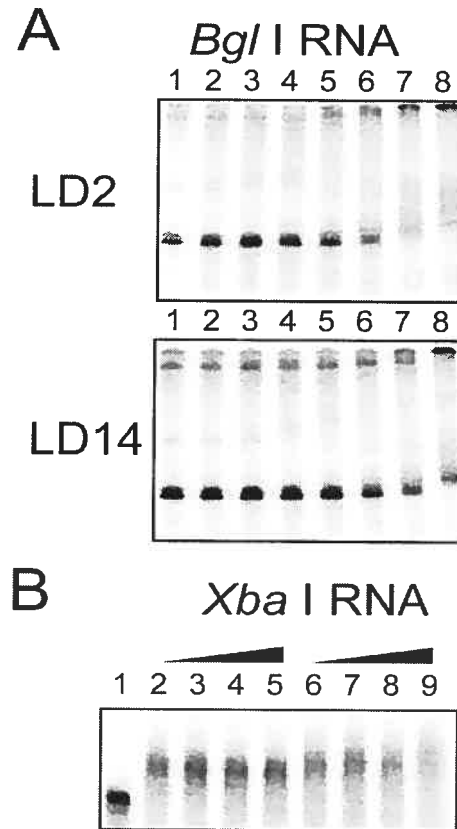


Figure 2 Les essais de retardement sur gel d'électrophorèse (EMSA) avec des extraits protéiques de *L. polyedrum* ne montrent pas de différence circadienne.

(A) Autoradiogramme de EMSA avec 20 000 cpm d'une sonde radiomarquée *BglI* (145 nucléotides) seule (ligne 1) ou après incubation avec des protéines extraites de cultures cellulaires à LD2 et LD14 (lignes 2 à 8). Les essais contiennent 0,28  $\mu$ g, 0,56  $\mu$ g, 1,4  $\mu$ g, 2,8  $\mu$ g, 5,6  $\mu$ g, 14  $\mu$ g ou 28  $\mu$ g (lignes 2 à 8 respectivement). (B) Autoradiogramme de EMSA avec 20 000 cpm d'une sonde radiomarquée *XbaI* (263 nucléotides) seule (ligne 1) ou après incubation avec 28  $\mu$ g de protéines extraites de cultures cellulaires à LD2 (lignes 2 à 5) ou LD14 (lignes 6 à 9). Un transcrit *XbaI* non radioactif a été ajouté comme compétiteur spécifique à une concentration 2X (lignes 3,7), 20X (lignes 4,8) ou 400X (lignes 5,9) plus que la sonde radiomarquée.

## **b) Protection contre l'ARNase**

Afin de valider les résultats obtenus par EMSA, la sonde d'ARN *BgII* a été utilisée pour observer la protection contre l'ARNase *in vitro* (Mittag, Lee et al. 1994) et avait révélé qu'une protéine d'environ 25 kDa pouvait lier la sonde. En absence de l'extrait protéique, la sonde est complètement dégradée par le traitement à l'ARNase (Fig. 3A ligne 1). Quant aux extraits protéiques prélevés à LD2 et LD14, aucun n'a pu protéger la sonde de la dégradation lorsque incubé avec cette dernière (Fig. 3A ligne 2 et 3 respectivement). Pour l'essai *in vivo*, les cellules intactes prélevées à LD2 et LD14 ont été exposées aux UV de façon à lier l'ARN *lbp* avec son partenaire. Après l'extraction et l'électrophorèse des protéines par SDS-PAGE, les essais ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose et sonde avec un fragment de *lbp* radioactif. Aucune liaison n'a toutefois été observée aux 2 temps circadiens (Fig. 3B lignes 1 et 2).

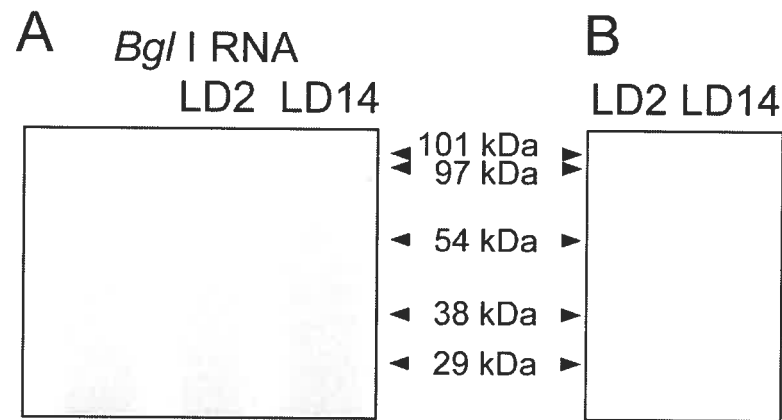


Figure 3 Région 3'UTR de *lbp* non protégée contre l'ARNase *in vitro* et *in vivo*.

(A) Autoradiogramme d'un essai de protection contre l'ARNase *in vitro* avec un transcrit radioactif *BglI* seul (ligne 1) ou après incubation avec 28  $\mu$ g de protéines extraites de cultures cellulaires à LD2 (ligne 2) ou LD14 (ligne 3). Les essais ont été traités à l'ARNase A et analysés par SDS-PAGE. (B) Autoradiogramme d'un essai de protection contre l'ARNase *in vivo* dans lequel les cellules en culture à LD2 et LD14 (lignes 1 et 2 respectivement) ont été exposées aux UV et les protéines extraites ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur une membrane de nitrocellulose et incubées avec une sonde d'amorce aléatoire de *lbp* contenant la séquence codante et la région 3'UTR.

### c) Chromatographie d'affinité

Malgré l'absence d'un test d'activité efficace, une purification de la protéine pouvant lier la région 3'UTR de *lbp* a été tentée par chromatographie d'affinité sur un extrait protéique brut prélevé à LD2. Une sonde biotinylée d'ARN du 3'UTR de *lbp* a été immobilisée sur

une matrice de billes ferromagnétiques enrobées de streptavidine. Environ 1 mg d'extrait protéique brut a été incubé avec ces billes qui ont ensuite été isolées avec un aimant. Après une incubation de 2 heures, des fractions d'élution ont été récoltées avec des solutions de NaCl 100 mM, 500 mM et 1 M., puis analysées par SDS-PAGE (Fig. 4). Quelques bandes ont été observées, mais aucun éluat ne contenait la bande à 25 kDa rapportée plus tôt. De plus, aucune des bandes observées n'a pu être identifiée par microséquençage et recherche sur BLAST.

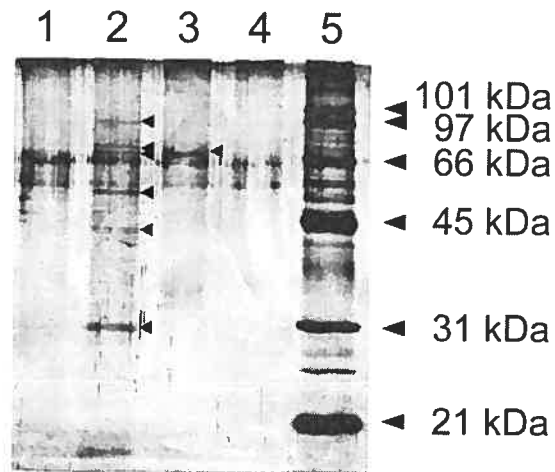


Figure 4 Purification de protéines liant la région 3'UTR de *lbp* par chromatographie d'affinité d'ARN.

Analyse SDS-PAGE des fractions protéiques obtenues au cours de la purification par chromatographie d'affinité d'ARN. La colonne a été chargée avec environ 1 mg de protéines de *L. polyedrum* prélevées à LD2. 10% des fractions éluées à 100 mM, 500 mM et 1 M (lignes 1 à 3 respectivement), le tampon de chargement (ligne 4) et le marqueur de poids moléculaire (ligne 5) ont été chargés sur le gel coloré au Flamingo (BioRad). 90% des fractions éluées restantes ont été analysées parallèlement sur un gel coloré au bleu de Coomassie duquel des bandes indiquées ont été excisées pour microséquençage (Tableau I).

Tableau I Identification des microséquences de protéines liant l'ARN *BglI* biotinylé

Poids moléculaire apparent (kDa)	Protéines identifiées	Espèce	Séquence couverte	Longueur (a.a.)
97 <sup>1</sup>	« EF-1 $\alpha$ like protein »	<i>Heterocapsa</i>	15%	474
74 <sup>1</sup>	Non identifié			
72 <sup>1</sup>	Non identifié			
55 <sup>1</sup>	F1ATPase mitochondrial	<i>Toxoplasma</i>	15%	560
	RuBisCO	<i>Lingulodinium</i>	12%	547
42 <sup>1</sup>	Non identifié			
31 <sup>1</sup>	Ferrédoxine NADP <sup>+</sup> réductase plastidique	<i>Heterocapsa</i>	14%	416
	G-3-P déhydrogénase	<i>Lingulodinium</i>	11%	419
72 <sup>2</sup>	« Luciferin-Binding Protein »	<i>Lingulodinium</i>	24%	668

<sup>1</sup> Éluion à NaCl 500 mM

<sup>2</sup> Éluion à NaCl 1 M

## 2) Approche génomique

### a) Criblage d'une banque d'expression d'ADNc

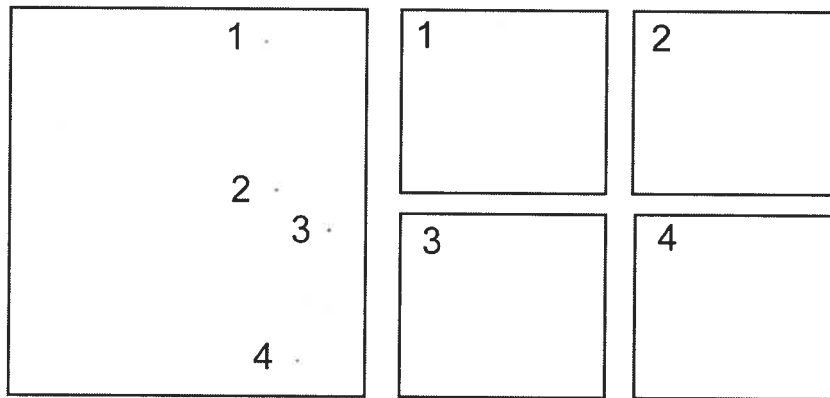


Figure 5 Criblage d'une banque d'expression d'ADNc dans *E. coli* avec une sonde d'ARN *BglI*.

Autoradiogrammes de membranes de nitrocellulose portant des protéines phagiques incubées avec la sonde d'ARN *BglI*. La première ronde de criblage (gauche) a produit plusieurs signaux dont 16 ont été sélectionnés et réétalés pour une seconde ronde n'ayant donné aucun signal reproductible (droite, 1 à 4).

La sonde d'ARN *BglI* utilisée au cours de l'approche biochimique a également été utilisée afin de cribler une banque d'ADNc empaquetée dans le phage  $\lambda$ . Les ADNc étant contenus dans le phagemide Bluescript, leur expression a été induite par l'IPTG. Les protéines recombinantes ainsi obtenues ont adhéré à une membrane de nitrocellulose, puis ont été incubées en présence de la sonde d'ARN. Les clones exprimant une protéine capable de lier la sonde radioactive sont ainsi révélés par autoradiographie. 200 000 clones ont été



criblés au cours de la première ronde et 16 signaux positifs ont été identifiés après exposition des membranes à un film autoradiographique (4 présentés dans la Fig. 5 gauche). Les 16 clones en question ont été repiqués, étalés et induits de nouveau pour une deuxième ronde de criblage. Aucun signal n'a été identifié au cours de cette deuxième ronde (Fig. 5 droite).

### **b) Criblage 3-hybride chez *S. cerevisiae***

Le criblage de la banque d'ADNc clonée dans le vecteur pAD-GAL4 a été fait en vue d'isoler l'ADNc codant pour le polypeptide interagissant avec la partie 3' non traduite de l'ARNm de *lbp*. Cette région sans la queue de poly-A a été clonée dans le vecteur pIIIA MS2-2, puis transformée dans la levure avant d'y introduire la banque. Le titre de la transformation initiale est de 840 000 (Tableau II). Ces transformants ont été étalés sur un milieu sans histidine et sans leucine, ce dernier permettant la conservation du plasmide de la banque. Le plasmide encodant l'hybride d'ARN n'a pas été sélectionné dans cette étape initiale par son marqueur *ADE2*. Ainsi, les levures dans lesquelles l'activation du gène *HIS3* est ARN-indépendante ont pu perdre le plasmide pIIIA MS2-LBP étant donné l'absence de pression sélective. Les 58 clones ayant survécu à l'étape initiale ont ensuite été transférés sur un milieu carencé en histidine, en leucine et en adénine. 35 clones ont survécu, les autres ayant perdu le plasmide de l'hybride d'ARN. Les clones survivants ont ensuite été mis en culture dans un milieu sans leucine. Les cultures dans lesquelles les cellules se sont agrégées ont été éliminées. Les plasmides des 11 clones restant ont ensuite été isolés et retransformés dans YBZ1 pour confirmer l'activation du gène rapporteur. Les plasmides des 8 clones subsistants ont d'abord été digérés par *EcoRI* et *XhoI*, puis ont été séquencés.

Tableau II Criblage 3-hybride chez *S. cerevisiae*.

Étape	Colonies
Transformants	840 000
<i>HIS3</i> +	58
<i>ADE2</i> +	35
Culture homogène	11
Re-complémentation	8
CCTR	0

Les patrons de digestion observés après migration sur gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium ont permis de supposer que les 8 plasmides contenaient le même ADNc. Les 4 ADNc les plus longs ont été séquencés par les deux extrémités. Les séquences ont dans un premier temps confirmé que les 4 ADNc étaient identiques. Les séquences ont ensuite été soumises à la base de données BlastX. Avec une « E value » de 0,018, la séquence a été associée au gène de l'imidazoleglycérolphosphate déshydrogénase de la flavobactérie *Robiginitalea biformata*. Cette enzyme catalyse la septième étape de la voie de biosynthèse de l'histidine chez les bactéries, les champignons et les plantes. Chez *S. cerevisiae*, cette protéine est encodée par le gène *HIS3*. Après retransformation, il appert que les clones isolés sont en mesure de secourir la levure de façon ARN-indépendante.

## Discussion

### 1) Approche biochimique

#### a) REMSA

Le but de la présente étude était de relier l'expression du gène *lbp* chez *L. polyedrum* à l'horloge circadienne de façon à comprendre comment l'oscillateur circadien contrôle le rythme de la bioluminescence chez cette algue. Plusieurs données suggéraient depuis de nombreuses années que le contrôle de l'expression de ce gène était fait au niveau traductionnel. Par EMSA, une protéine d'environ 25 kDa a été rapportée comme liant la région 3'UTR de *lbp* de façon circadienne (Mittag, Lee et al. 1994). Comme la liaison était minimale à LD14, quand la synthèse de LBP est au maximum, il a été postulé qu'il s'agissait d'un répresseur de la traduction pour donner naissance au rythme circadien de la bioluminescence. Les expériences rapportées ici ont été élaborées afin de purifier et caractériser cette protéine en exploitant les résultats rapportés plus tôt. Pour ce faire, 2 approches ont été privilégiées. Dans un premier temps, une purification de l'activité de retardement sur gel de la sonde d'ARN a été envisagée. Des protéines liant un ARN d'intérêt ayant été purifiées sur une colonne d'affinité d'ARN, un schéma semblable pouvait être employé pour la purification du facteur de contrôle traductionnel. Malheureusement, il n'a pas été possible de confirmer l'activité de liaison à la région 3'UTR de *lbp* par aucune des techniques employées.

L'étude de retardement sur gel (EMSA) a été répétée en employant plusieurs protocoles et sondes différentes, y compris les mêmes qu'auparavant. Un retardement de la migration de la sonde sur gel a bel et bien été observé en présence d'extraits protéiques de *L. polyedrum*. Toutefois, contrairement aux résultats rapportés (Mittag, Lee et al. 1994), aucune variation circadienne de la liaison n'a été notée. Également, la liaison observée est non spécifique telle que démontrée par l'absence de compétition par un transcrit spécifique froid. L'étude précédente faisait également état d'une liaison non spécifique distincte de la liaison

spécifique. Par contre, tant la liaison spécifique que non spécifique présentait une variation circadienne. Les essais ont été tentés avec des extraits protéiques prélevés à des temps intermédiaires avec toujours le même résultat.

Afin d'augmenter la résolution des bandes, des gels plus longs (15 cm) et plus concentrés (jusqu'à 8%) ont été utilisés. Une sonde plus courte a également été préparée de façon à augmenter l'écart des vitesses de migration entre la sonde libre et la sonde liée. Une sonde a également été synthétisée avec une cytosine radiomarquée plutôt qu'un uracile en se basant sur une étude rapportant une différence de signal selon le nucléotide radiomarqué employé (Hartley, Le Meuth-Metzinger et al. 2002). Le résultat observé est toutefois demeuré le même peu importe les conditions employées.

Le EMSA étant un essai *in vitro*, il est possible que l'étude d'interaction soit compliquée par des modifications post-traductionnelles du facteur affectant la liaison. Il avait été suggéré que des modifications post-traductionnelles de CCTR telles que la phosphorylation pouvaient contrôler l'activité de liaison de la protéine (Mittag and Hastings 1996). Afin d'empêcher toute déphosphorylation de la protéine lors de la préparation de l'extrait protéique, des inhibiteurs de phosphatase ont été ajoutés au tampon de liaison. En l'occurrence, le NaF et le  $\beta$ -glycérophosphate agissent comme compétiteurs du phosphate dans le site actif de plusieurs phosphatases. Des cocktails d'inhibiteurs de phosphatase ont également été utilisés sans toutefois affecter la mobilité de la sonde. Il appert ainsi qu'en utilisant les mêmes protocoles qu'il y a 13 ans ou en essayant diverses conditions de liaison et de résolution, il n'a pas été possible d'observer un signal de retardement sur gel qui soit spécifique à la région 3' non traduite de l'ARNm de *lbp* et qui corrèle avec le rythme de la bioluminescence de *L. polyedrum*.

Une des différences avec l'étude antérieure est la souche utilisée. La souche CCMP no. 1936 a été isolée en 1998, alors que la souche utilisée auparavant, GP70, l'a été en 1970.

Toutefois, aucune différence notable dans le rythme de la bioluminescence n'a été observée entre les 2 souches, rendant peu probable que la liaison à la région 3'UTR de *lbp* en soit affectée. Les cultures sont également placées sous un éclairage 3 fois moins intense que celles de l'étude de 1994. Aucun indice ne suggère que cette différence puisse avoir une incidence sur la liaison d'une protéine à l'ARN. En définitive, aucun de ces éléments n'est suffisant pour mettre en doute la validité des résultats obtenus.

### **b) Protection contre l'ARNase**

En appui aux résultats de EMSA, un essai de protection contre l'ARNase *in vitro* n'a pas permis de retrouver la protéine de 25 kDa rapportée auparavant (Mittag, Lee et al. 1994). La sonde *BglI* employée ne contient pas la queue de poly-A de façon à ne pas observer les protéines liant cette région, notamment PABP. L'essai a également été fait *in vivo*, avec aucune interaction détectée sur la région 3'UTR de *lbp*. L'interaction avec une autre région de l'ARN n'est toutefois pas exclue puisque la sonde employée n'incluait pas la région 5'UTR et la queue de poly-A. Une difficulté de l'exposition aux UV consiste à déterminer l'intensité nécessaire pour induire les liaisons covalentes. Elle est particulièrement importante chez les organismes photosynthétiques contenant de nombreux pigments capables d'absorber les radiations UV. Le protocole employé pour ces essais est basé sur une étude avec *C. reinhardtii*, une algue verte photosynthétique (Waltenberger, Schneid et al. 2001).

## 2) Approche génomique

### a) Criblage d'une banque d'expression d'ADNc

Les études précédentes ont démontré que l'élément *cis* de l'ARNm de *lbp* interagissant avec CCTR est une région (U)UG riche de 22 nucléotides dans la partie 3'UTR. Disposant de banques d'ADNc de *L. polyedrum*, divers criblages ont été entrepris afin d'isoler un ADNc encodant un polypeptide capable d'interagir avec cet élément. Le premier criblage a été tenté par Hélène Chaput dans la levure *S. cerevisiae*. La région 3'UTR de *lbp* avait alors été fusionnée à *gsp1-val21* dont l'expression est létale pour la levure (Belhumeur, Lee et al. 1993). Le gène *gsp1-val21* était sous le contrôle du promoteur GAL1, donc inductible par le galactose. L'interaction de la région (U)UG-riche avec CCTR étant réputée inhibitrice de la traduction, une levure exprimant ce polypeptide aurait été en mesure de survivre même lorsque l'expression de *gsp1-val21* était induite. Ce criblage n'a pas permis d'isoler le clone recherché. Pour expliquer cet échec, on peut émettre l'hypothèse que l'expression de *gsp1* était trop forte pour être totalement inhibée par l'expression de CCTR, ce qui aurait masqué un potentiel clone positif. Étant donné la létalité du produit de ce gène, il aurait toutefois été difficile de doser l'induction de *gsp1-val21* pour produire d'authentiques clones positifs tout en ayant le minimum de faux positifs. En conséquence, il serait préférable de privilégier une approche de criblage qui élimine la protéine létale du système.

Une méthode plus directe en vue d'isoler rapidement un ADNc interagissant avec l'ARN d'intérêt est de cribler une banque d'expression d'ADNc empaquetée dans le bactériophage  $\lambda$  (Werner, Muhlbach et al. 1995). Une fois les phages étalés sur pétri l'expression des ADNc est induite par l'IPTG et les protéines sont transférées sur des membranes de nitrocellulose. Ces membranes sont ensuite hybridées avec une sonde d'ARN radioactive. Tout clone produisant un polypeptide capable d'interagir avec la sonde apparaît ainsi sur un

film radiographique. Le clone est ensuite repiqué et purifié jusqu'à homogénéité. Cette technique a été améliorée il y a quelques années afin de diminuer le bruit de fond causé par les interactions non spécifiques (Sägesser, Martinez et al. 1997). Cette technique présente maintenant l'avantage de n'utiliser qu'un seul tampon. Elle permet de détecter des interactions ARN-protéines spécifiques même lorsque l'ADNc en question est sous-représenté dans la banque. Elle requiert une affinité de liaison d'environ  $10^{-8}$  M.

Parmi les améliorations apportées, les auteurs ont noté que la composition du tampon influence grandement le ratio signal:bruit. Par exemple, une concentration trop élevée en sels peut causer la dissociation d'un ARN lié spécifiquement. Toutefois, la présence des cations  $Zn^{2+}$  et  $Mn^{2+}$  à une faible concentration diminue grandement le bruit de fond. Une faible concentration de détergent neutre a le même effet. L'ajout d'ARN de levure dans le tampon lors de l'hybridation est essentiel pour bloquer les sites non spécifiques. Il a également été noté que le signal non spécifique augmente grandement lorsque le pH est sous 7,5.

Les membranes Hybond C (*Amersham*) ont été utilisées au cours du criblage. Ce type de membrane permet l'obtention d'un ratio signal:bruit acceptable pour la détection d'authentiques clones positifs. Pour augmenter ce ratio, des membranes de 82 mm de diamètre ont été utilisées, les grandes membranes permettant un plus grand bruit de fond. La limite de détection de cette technique de criblage est grandement diminuée par la moindre dégradation de la sonde. Ainsi, un grand soin doit être apporté à la préparation du tampon et du matériel afin de diminuer l'activité RNase au cours de la procédure. L'intensité d'un signal positif est inversement proportionnel à la densité des plaques de lyse sur le pétri. Une densité de 25 000 pfu/pétri comme celle utilisée lors du criblage permet encore la détection non ambiguë d'un signal positif. Un autre facteur à considérer est la taille de la sonde utilisée. Une sonde de 46 nucléotides (Jessen, Oubridge et al. 1991) a produit un bruit de fond similaire à celui d'une sonde de 2028 nucléotides (Tabler and

Sanger 1985). Ainsi, la sonde de 263 nucléotides employée pour le criblage était appropriée. Il est à noter que cette technique ne fait pas appel à une sonde fusionnée avec un autre ARN pouvant influencer la structure secondaire et l'affinité de liaison. Par contre, un des désavantages de cette méthode est que l'expression des protéines est faite chez *E. coli*. Il est donc envisageable que les conditions cellulaires soient suffisamment différentes de celles chez *L. polyedrum* pour altérer le repliement de la protéine, ce qui peut nuire à l'interaction avec l'ARN. De plus, cette interaction ARN-protéine est faite dans un milieu extracellulaire dont la composition peut ne pas être appropriée pour l'interaction recherchée. Ces facteurs peuvent expliquer l'échec du criblage par cette méthode. Le criblage d'une banque d'ADNc comporte également le désavantage qu'il n'y ait que des monomères identiques qui sont exprimés dans l'organisme employé. Toutefois, il a été montré que la liaison à l'ARN peut employer 2 polypeptides différents. Des modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation peuvent également moduler l'activité de liaison. L'expression hétérologue de l'ADNc peut faire en sorte que ces modifications covalentes soient modifiées ou tout simplement absentes chez la levure ou la bactérie.

### **b) Criblage 3-hybride chez *S. cerevisiae***

Depuis 1996, un système de criblage 3-hybride chez la levure a été utilisé pour identifier de nouveaux partenaires d'interaction ARN-protéines et pour caractériser ces interactions (Sengupta, Zhang et al. 1996; Bernstein, Buter et al. 2002). Dans ce système une protéine chimérique contenant un domaine d'interaction d'ADN et un domaine d'interaction d'ARN lie un ARN au promoteur d'un gène rapporteur. Ce système permet de cribler une banque d'ADNc fusionnée à un domaine d'activation de la transcription tel qu'utilisé pour les criblages 2-hybride. Par le passé, ce genre de criblage produisait une grande quantité de faux positifs. À la base, des facteurs hors de contrôle par le chercheur tels que l'abondance de l'ADNc recherché dans la banque et l'affinité de l'interaction affectent l'efficacité du



criblage. Diverses méthodes ont été développées pour éliminer les protéines qui lient la protéine de fusion LexA/MS2 sans lier l'ARN, ce qui réduit le nombre de faux positifs (Park, Tan et al. 1999). Récemment, le développement d'une nouvelle souche de levure, YBZ1, a grandement contribué à augmenter la sensibilité et l'efficacité du criblage (Hook, Bernstein et al. 2005). Cette souche permet d'isoler plus de véritables partenaires ARN-protéine en criblant moins de clone et de diminuer le nombre de faux positifs ARN-indépendants.

Une banque d'ADNc fusionnée au domaine activateur de GAL4 a ainsi été criblée pour isoler un clone interagissant avec la partie 3' non traduite de l'ARNm de *lbp*. Au terme du criblage, 8 ADNc ont été isolés et séquencés. La soumission des séquences à la base de données BLASTX a permis de conclure que les 8 ADNc correspondaient à l'homologue du gène *HIS3* de *S. cerevisiae*. Ce gène est celui utilisé comme rapporteur lors du criblage. Après vérification, il s'est avéré que les 8 ADNc étaient en mesure de secourir la levure YBZ1 de façon ARN-indépendante. Le plasmide encodant l'hybride d'ARN porte le marqueur ADE2. Lors de la transformation initiale, les levures ont été étalées sur un milieu carencé en leucine et histidine de façon à leur permettre de perdre le plasmide pIIIA LBP-MS2 s'il n'était pas essentiel à l'activation de *HIS3*. Elles ont ensuite été transférées sur le milieu SC-Leu-His-Ade pour que les levures ayant perdu le plasmide soient éliminées. De plus, sur un milieu carencé en adénine, les levures tentent de synthétiser ce métabolite *de novo* et accumulent un intermédiaire purique rouge étant donné l'absence du produit du gène *ADE2*. Ainsi, les colonies rosées ont également été éliminées. Une méthode supplémentaire pour éliminer les faux positifs ARN-indépendants utilise l'acide 5-fluoro-orotique (5-FOA) (Park, Tan et al. 1999). Le plasmide pIIIA LBP-MS2 porte également le marqueur *URA3* et, sur un milieu contenant le 5-FOA, les levures exprimant le gène *URA3* ne survivent pas. Ainsi, les survivantes peuvent être éliminées. Une telle sélection aurait permis d'identifier plus rapidement les 8 ADNc isolés comme faux-positifs.

Bien que la technique ait été efficace pour identifier et caractériser de nombreuses interactions ARN-protéine qui ont ensuite été confirmées *in vivo*, une grande prudence doit être adoptée pour interpréter les résultats d'un criblage 3-hybride. En effet, l'utilisation d'un hybride d'ARN peut modifier la structure secondaire du transcrit, ce qui peut conduire à l'identification d'interactions qui n'ont pas cours *in vivo* ou masquer les interactions réelles. Ainsi, un criblage 3-hybride a permis d'identifier des interactions entre la protéine p53 et plusieurs ARN (Riley, Cassiday et al. 2006). Bien que p53 puisse discriminer entre plusieurs ARN dans le système de 3-hybride, il lie tous les ARN testés *in vitro*. De plus, tous les ARN interagissant avec p53 dans le 3-hybride sont également liés par une nucléocapside du VIH connue comme étant une protéine liant l'ARN de façon séquence non spécifique. Ainsi, il est nécessaire que les résultats obtenus lors d'un criblage 3-hybride soient confirmés par au moins une autre méthode d'étude d'interactions ARN-protéine.

### **3) Méthodes alternatives d'étude d'interactions ARN-protéine**

#### **a) Système biotine/streptavidine**

L'isolation d'une protéine liant l'ARN peut également être effectuée par une méthode de chromatographie d'affinité. Un extrait protéique peut ainsi être fractionné par la liaison à un ARN immobilisé sur une matrice. Typiquement, un ARN biotinylé est immobilisé sur des billes d'agarose ou sur des billes magnétiques recouvertes de streptavidine (Gruter, Tabernero et al. 1998). Cette technique présente toutefois le désavantage de ne se limiter qu'aux interactions ARN-protéine de haute affinité. De plus, la présence du ribonucléotide biotinylé peut affecter la structure secondaire de l'ARN et affecter l'interaction avec le peptide, ce qui amène parfois à la purification de protéines non spécifiques. Le système biotine/streptavidine a permis la purification de 4 protéines liant l'ARNm de *Ibp* (Techel, Chuang et al. 1996). Ces protéines n'ont toutefois pas été identifiées ni caractérisées. La

protéine CHLAMY 1 a également été purifiée de cette façon (Mittag 1996; Zhao, Schneid et al. 2004).

Une variation de ce système, appelé TIP (« Translation Intermediate Purification »), fait appel à un oligonucléotide biotinylé antisens pour purifier l'ARNm endogène et les protéines qui lui sont associées (Muckenthaler, Gray et al. 1998). Le TIP offre l'avantage d'étudier les interactions ARN-protéines formés *in vivo* et permet, avec différents inhibiteurs de la traduction, d'observer la formation des complexes traductionnels.

### **b) Strepto-tag**

Cette méthode de chromatographie d'affinité utilise un ARN de 45 nucléotides capable de lier l'antibiotique streptomycine (Wallace and Schroeder 1998). L'ARN à immobiliser est ainsi fusionné à cet ARN. Jusqu'à tout récemment, cette technique ne permettait que de tester de courts fragments d'ARN bien définis. Toutefois, après quelques modifications de l'aptamère STag, des ARN de jusqu'à 550 nucléotides ont été immobilisés sur la colonne de streptomycine couplée à la sépharose (Dangerfield, Windbichler et al. 2006). La méthode est maintenant beaucoup plus efficace pour isoler de nouveaux partenaires d'interaction ARN-protéine. Elle a de plus prouvé son efficacité à purifier des protéines tant de haute que de basse affinité (Bachler, Schroeder et al. 1999).

### **c) Criblage 1-hybride**

Le criblage 1-hybride est basé sur la capacité de la protéine N du bactériophage  $\lambda$  à lier une séquence d'ARN spécifique dans la région 5' d'un ARNm et ainsi permettre à la RNA polymérase d'ignorer les signaux de terminaison de la transcription dans le région 3' du

même message. Le système 1-hybride repose donc sur l'antiterminaison de la transcription dans un gène fusion ou un gène rapporteur est ajouté en aval des séquences de terminaison, Pour isoler des ADNc dont le produit possède une capacité de liaison à un élément d'ARN particulier (Wilhelm and Vale 1996), la séquence spécifique est placée en amont du gène rapporteur. L'ADNc est quant à lui fusionné au gène de la protéine N. La liaison du produit de l'ADNc sur l'élément étudié localise la protéine N près des signaux de terminaison transcriptionnelle, ce qui cause l'antiterminaison, d'où l'expression du gène rapporteur, typiquement *LacZ*. Ce système est utilisable chez *E. coli*, ce qui accélère grandement le criblage et facilite la détection des positifs sur des pétris contenant du X-Gal.

#### **d) Essai de fonction liée**

Chez de nombreuses, sinon la plupart des protéines liant l'ARN, le domaine de liaison à l'ARN peut être séparé du domaine fonctionnel. Ce dernier est par exemple responsable du contrôle de la stabilité de l'ARN, de la maturation, de la traduction, de la localisation cellulaire ou des modifications covalentes. Ainsi, il est possible de lier ce domaine fonctionnel à un domaine connu de liaison à l'ARN. Cette technique est dite de fonction liée et peut permettre de caractériser la fonction d'une protéine liant l'ARN (Coller and Wickens 2002). Pour ce faire, un élément régulateur reconnu par le domaine connu de liaison à l'ARN est inséré généralement dans les régions non traduites de l'ARNm d'un gène rapporteur. L'effet du domaine fonctionnel étudié peut ensuite être observé *in vivo*. Cet essai fonctionnel permet d'observer *in vivo* une grande variété d'activités associées aux ARN. Elle permet également une grande flexibilité quant au choix du gène rapporteur, de l'emplacement de l'élément régulateur dans l'ARN et de la protéine de fusion employée. Elle est également utilisable pour séparer plusieurs fonctions au sein d'un complexe protéique (Lykke-Andersen, Shu et al. 2001).

### e) Protéomique fonctionnelle

La caractérisation de nouvelles protéines liant l'ARN exprimées de façon circadienne a été possible chez *C. reinhardtii* par l'analyse protéomique fonctionnelle (Wagner, Fiedler et al. 2004). Cette algue présente l'avantage de pouvoir être cultivée en grande quantité sur une courte période de temps. Une telle approche serait toutefois difficilement utilisable avec *L. polyedrum* étant donné le peu d'informations disponibles sur son génome contrairement à celui de *C. reinhardtii* qui a été entièrement séquencé. Ainsi, la plupart des peptides séquencés obtenus avec *L. polyedrum* ne pourraient probablement pas être identifiés.

## 4) Mécanismes alternatifs de contrôle traductionnel

### a) Micro-ARN

Une méthode alternative de contrôle de la traduction implique les micro-ARN et les ARN antisens. Les miARN sont d'environ 22 nucléotides, s'apparient avec leur ARN cible et entraînent l'assemblage de complexes ARN-protéine provoquant la dégradation de l'ARN cible, d'où le contrôle traductionnel. Chez les plantes, les miARN sont presque parfaitement complémentaires avec leur cible et s'apparient généralement avec la région codante de l'ARNm. Les miARN animaux sont généralement interrompus par des gaps et des mésappariements et lient la région 3'UTR de l'ARNm. Chez *Caenorhabditis elegans*, deux miARN ont été identifiés comme des régulateurs du temps de développement (Ambros 2004). Les miARN contrôleraient la traduction en inhibant la fonction du complexe coiffe/eIF4E et de la queue de poly(A) (Humphreys, Westman et al. 2005). D'autres suggèrent qu'ils agiraient en permettant la formation d'un complexe ribonucléoplasmique s'accumulant dans les corpuscules P où les ARNm ciblés sont séparés

de la machinerie traductionnelle (Valencia-Sanchez, Liu et al. 2006). Les deux modèles ne sont pas mutuellement exclusifs. Des ARN antisens de gènes de l'horloge circadienne ont été rapportés chez les mammifères, les insectes et les champignons. Un des mieux caractérisés est associé au gène *frq* de *N. crassa*, qui encode un des composants majeurs de l'horloge (Kramer, Loros et al. 2003). L'abondance de cet ARN antisens varie en antiphasse avec celle du transcrit sens de *frq* au cours du cycle circadien.

Ainsi, il est raisonnable d'émettre l'hypothèse que l'expression contrôlée par l'horloge circadienne d'un miARN ou d'un ARN antisens puisse réguler l'expression de *lbp* chez *L. polyedrum*. Toutefois, des analyses « Northern » avec une sonde d'ARN sens de *lbp* n'ont pas permis d'identifier d'ARN complémentaire qui puisse jouer ce rôle.

## **b) Séquestration de l'ARN**

D'abord considérée comme marginale au cours des années 1980, la régulation de la localisation cellulaire d'un ARNm apparaît aujourd'hui comme un élément majeur du contrôle de la traduction. Ce mécanisme a été observé tant chez les vertébrés que les invertébrés et même les organismes unicellulaires (Kindler, Wang et al. 2005). Son plus grand avantage est qu'il permet le contrôle local de l'expression génétique. Typiquement, un élément *cis* de l'ARN portant un code de destination est reconnu par un facteur *trans* qui peut agir comme adaptateur dans la formation d'un complexe ribonucléoprotéique. Le transport de l'ARN est généralement associé à une répression traductionnelle. Cette répression peut demeurer même lorsque le cargo a atteint sa destination en attendant un signal d'activation. Cette caractéristique est particulièrement importante au niveau de la zone synaptique des neurones (Smith, Starck et al. 2005). Le répresseur peut agir tant au niveau de l'initiation, de l'élongation ou de la terminaison de la traduction. Par exemple, chez *C. reinhardtii*, il a été montré que la protéine NAB1 lie l'ARNm de *lhcbm*, qui encode

une protéine du photosystème II, et le stabilise à un stade de pré-initiation, le séquestrant ainsi dans un complexe subpolysomal, ce qui empêche sa traduction (Mussnug, Wobbe et al. 2005).

Dans le cas de *lbp*, des données indiquent que la répression est associée à une localisation membranaire du transcrit, alors que la traduction est liée à une localisation au cytosquelette (Techel, Chuang et al. 1996). Plusieurs protéines ont été rapportées comme pouvant lier l'ARNm de *lbp*. Aucune donnée ne permet toutefois de présumer du rôle de chacune d'elle, mais il est envisageable que certaines contrôlent la localisation cellulaire du transcrit, alors que d'autres régulent la traduction.

### c) **Activateur traductionnel**

Les résultats présentés ici amènent également à remettre en question l'hypothèse du contrôle traductionnel de l'expression de *lbp*. Le mécanisme de la répression se basait dans un premier temps sur la liaison circadienne de CCTR sur l'extrémité 3'UTR de l'ARNm de *lbp* aux temps où la synthèse de la protéine est réduite (Mittag, Lee et al. 1994). Or, des doutes pèsent maintenant sur la validité de ce résultat. L'ARNm *lbp* prélevé à tous les temps circadiens peut efficacement être traduit dans les RRL (Morse, Milos et al. 1989), ce qui est en accord avec l'hypothèse de la répression traductionnelle. Toutefois, un tel résultat ne peut pas exclure l'implication d'un activateur traductionnel. Il a récemment été montré que l'ARN hélicase A (RHA) est capable de promouvoir la traduction d'ARNm dont la structure de la région 5'UTR est complexe (Tettweiler and Lasko 2006). Cette protéine fait partie la superfamille DEXD/H et elle est impliquée dans le transport nucléocytoplasmique. Elle active spécifiquement la traduction en désassemblant les structures complexes en 5' pour faciliter la liaison du ribosome. Il n'est pas exclu qu'une protéine semblable dans les RRL puisse faire de même avec l'ARNm *lbp* dont la structure secondaire en 5' est

complexe. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par une étude de retardement sur gel en utilisant les protéines du RRL.

Le système de traduction *in vitro* peut également compromettre la stabilité de la structure secondaire de l'ARN (Kozak 2006), ce qui pourrait expliquer la traduction de *lbp* dans ce système sans faire appel à un tiers parti. Ainsi, sur la base des résultats accumulés jusqu'à présent, l'existence d'un activateur traductionnel ne peut pas être exclue.

#### **d) Structure de la région 5' non traduite**

Au cours des dernières années, certains phénomènes d'abord interprétés comme un contrôle traductionnel se sont plutôt révélés être dus à un changement de la structure de l'ARNm (Denis, Tolley et al. 2005; Diernfellner, Schafmeier et al. 2005; Tang, Tao et al. 2006). L'hypothèse du contrôle traductionnel de l'expression de *lbp* se base sur les niveaux constants d'ARNm pendant le cycle circadien observés par « Northern blot » et par l'incorporation de méthionine radiomarquée montrant une synthèse active au début de la phase nocturne (Morse, Milos et al. 1989). De tels résultats peuvent être expliqués par une modification post-transcriptionnelle de la structure de la région 5' de l'ARNm. Une telle hypothèse n'a jamais été vérifiée à ce jour.



## Conclusion

Le but de cette étude était d'élucider le mécanisme de contrôle du rythme circadien de la bioluminescence chez le dinoflagellé *Lingulodinium polyedrum*. Une part de ce mécanisme est présumée agir via le contrôle de la traduction de la protéine LBP. Pour ce faire, il a été postulé qu'un élément *cis* sur l'ARNm de *lbp* est reconnu par un facteur *trans* régulateur de la traduction. Une étude précédente avait identifié un élément UG-riche dans le 3'UTR de l'ARNm comme séquence régulatrice potentielle (Mittag, Lee et al. 1994). Afin de vérifier cette hypothèse, la recherche d'un facteur *trans* capable de lier cet élément a été entreprise selon des approches biochimique et génomique.

Les essais biochimiques de retardement d'une sonde radioactive sur gel et de protection contre l'ARNase tant *in vitro* qu'*in vivo* n'ont pas permis d'observer une interaction spécifique avec l'élément UG-riche. Ces essais auraient pu servir de test d'activité afin de suivre la purification du facteur régulateur. Une purification par chromatographie d'affinité a tout de même été tentée sur un extrait protéique brut sans toutefois permettre de purifier suffisamment un polypeptide candidat pour le micro-séquençage.

L'élément UG-riche a également été testé avec 2 méthodes de criblage de banques d'ADNc : le criblage 3-hybride chez la levure *S. cerevisiae* et le criblage d'une banque d'expression dans le phage  $\lambda$ . Aucune des 2 méthodes n'a permis d'isoler un ADNc encodant le facteur *trans* recherché.

Ainsi, aucun élément ne permet d'appuyer le mécanisme proposé de contrôle de la traduction de LBP. La recherche d'un autre élément régulateur sur l'ARNm de *lbp* est une des avenues à considérer pour la suite du projet. La région 5'UTR a déjà été étudiée dans ce sens sans permettre d'identifier de candidat (Mittag, Lee et al. 1994). Il faut également

considérer la possibilité que le contrôle de la traduction s'exerce par un mécanisme différent. En ce sens, la recherche d'ARN antisens doit absolument être considérée.

Il importe également de considérer que LBP n'est pas la seule protéine du système de la bioluminescence sous contrôle traductionnel. En effet, la luciférase est également soumise à ce contrôle. Comme la synthèse de ces 2 protéines est synchronisée, il est envisageable qu'elles soient contrôlées par les mêmes facteurs. Dans le cas contraire, il sera certainement intéressant de comprendre comment l'horloge circadienne parvient à les synchroniser.

Dans une perspective plus globale, il serait opportun de caractériser la machinerie traductionnelle chez les dinoflagellés. En effet, l'expérience a démontré que ces espèces n'en sont pas à une particularité près en ce qui a trait à leur biologie (Moreno Diaz de la Espina, Alverca et al. 2005). Comme dans plusieurs domaines, très peu est connu sur leur mécanisme général de traduction. On connaît par exemple l'existence des ribosomes et de la queue de poly-A. Toutefois, le signal de polyadénylation n'a été caractérisé chez aucune espèce de dinoflagellé. Aucun des facteurs de traduction généralement présents chez les eucaryotes n'a été formellement caractérisé à ce jour. La présence de la coiffe en 5' des ARNm n'a jamais été démontrée, quoique des ADNc codant pour la protéine eIF4E aient été trouvés dans les banques d'EST de *K. micrum* et *A. tamarense*. Dans un tel contexte, il est possible que notre incapacité à décrire le mécanisme de contrôle de la traduction d'un ARNm spécifique découle du peu de connaissances que nous avons du mécanisme général de la traduction chez les dinoflagellés.

## Bibliographie

- Abrahams, M. V. and L. D. Townsend (1993). "Bioluminescence in dinoflagellates: A test of the burglar alarm hypothesis." Ecology **74**(1): 258-260.
- Adl, S. M., A. G. B. Simpson, et al. (2005). "The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists." The Journal of Eukaryotic Microbiology **52**(5): 399-451.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." Nature **431**(7006): 350.
- Bachler, M., R. Schroeder, et al. (1999). "StreptoTag: a novel method for the isolation of RNA-binding proteins." RNA **5**(11): 1509-1516.
- Belhumeur, P., A. Lee, et al. (1993). "GSP1 and GSP2, genetic suppressors of the prp20-1 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization." Molecular & Cellular Biology **13**(4): 2152-2161.
- Bell-Pedersen, D., V. M. Cassone, et al. (2005). "Circadian rhythms from multiple oscillators: lessons from diverse organisms." Nat Rev Genet **6**(7): 544-56.
- Bernstein, D. S., N. Buter, et al. (2002). "Analyzing mRNA-protein complexes using a yeast three-hybrid system." Methods **26**(2): 123.
- Bertomeu, T. and D. Morse (2004). "Isolation of a dinoflagellate mitotic cyclin by functional complementation in yeast." Biochemical and Biophysical Research Communications **323**(4): 1172.
- Chaput, H., Y. Wang, et al. (2002). "Polyadenylated Transcripts Containing Random Gene Fragments are Expressed in Dinoflagellate Mitochondria." Protist **153**(2): 111-122.
- Chen, A. K., M. I. Latz, et al. (2007). "Evidence for the Role of G-Proteins in Flow Stimulation of Dinoflagellate Bioluminescence." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.
- Chudnovsky, Y., J. F. Li, et al. (2002). "Cloning, expression, and characterization of a histone-like protein from the marine dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* (dinophyceae)." Journal of Phycology **38**(3): 543-550.
- Colepiccolo, P., T. Roenneberg, et al. (1993). "Circadian regulation of bioluminescence in the dinoflagellate *Pyrocystis lunula*." Journal of Phycology **29**(2): 173-179.

- Coller, J. and M. Wickens (2002). "Tethered function assays using 3' untranslated regions." Methods **26**(2): 142.
- Costas, E. and V. Goyanes (2005). "Architecture and evolution of dinoflagellate chromosomes: an enigmatic origin." Cytogenetic and Genome Research **109**(1-3): 268.
- Coughlin, B. C., S. M. R. Teixeira, et al. (2000). "Amastin mRNA Abundance in *Trypanosoma cruzi* Is Controlled by a 3'-Untranslated Region Position-dependent cis-Element and an Untranslated Region-binding Protein." JBC **275**(16): 12051-12060.
- Dangerfield, J. A., N. Windbichler, et al. (2006). "Enhancement of the StreptoTag method for isolation of endogenously expressed proteins with complex RNA binding targets." Electrophoresis **27**(10): 1874-1877.
- de Mairan, J. (1729). "Observation botanique." Hist. Acad. Roy. Sci.: 35-36.
- de Paula, R. M., Z. A. Lewis, et al. (2006). "Two circadian timing circuits in *Neurospora crassa* cells share components and regulate distinct rhythmic processes." Journal of Biological Rhythms **21**(3): 159-168.
- Denis, M. M., N. D. Tolley, et al. (2005). "Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets." Cell **122**(3): 379-391.
- Desjardins, M. and D. Morse (1993). "The polypeptide components of scintillons, the bioluminescence organelles of the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." Biochem Cell Biol **71**(3-4): 176-82.
- Diernfellner, A. C. R., T. Schafmeier, et al. (2005). "Molecular mechanism of temperature sensing by the circadian clock of *Neurospora crassa*." Genes Dev. **19**(17): 1968-1973.
- Dodge, J. D. (1965). Chromosome structure of the dinoflagellates and the problem of the mesocaryotic cell. Progress in protozoology, London.
- Dunlap, J. (1999). "Molecular bases for circadian clocks." Cell **96**(2): 271.
- Dunlap, J. C. and J. J. Loros (2004). "The *Neurospora* Circadian System." J Biol Rhythms **19**(5): 414-424.
- Esaias, W. E. and H. C. Curl Jr (1972). "Effect of dinoflagellate bioluminescence on copepod ingestion rates." Limnology and Oceanography **17**: 901-906.

- Fritz, L., P. Milos, et al. (1991). "In situ hybridization of luciferin-binding protein anti-sense RNA to thin sections of the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." Journal of Phycology **27**(3): 436-441.
- Fritz, L., D. Morse, et al. (1990). "The circadian bioluminescence rhythm of *Gonyaulax* is related to daily variations in the number of light-emitting organelles." J Cell Sci **95**(2): 321-328.
- Gietz, R. and R. Woods (2002). "Transformation of yeast by the Liac/SS carrier DNA/PEG method." Methods in enzymology **350**: 87-96.
- Gruter, P., C. Taberero, et al. (1998). "TAP, the Human Homolog of Mex67p, Mediates CTE-Dependent RNA Export from the Nucleus." Molecular Cell **1**(5): 649.
- Guillard, R. R. and J. H. Ryther (1962). "Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran." Canadian journal of microbiology **8**: 229-239.
- Guillebault, D., S. Sasorith, 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 *Cryptocodinium cohnii*." J. Biol. Chem. **277**(43): 40881-40886.
- Hackett, J. D., D. M. Anderson, et al. (2004). "Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment." Am. J. Bot. **91**(10): 1523-1534.
- Hartley, R., V. Le Meuth-Metzinger, et al. (2002). "Screening for sequence-specific RNA-BPs by comprehensive UV crosslinking." BMC molecular biology **3**: 8.
- Hastings, J. W. and J. C. Dunlap (1986). Cell-free components in dinoflagellate bioluminescence. The particulate activity: scintillons; the soluble components: luciferase, luciferin, and luciferin-binding protein. Bioluminescence and chemiluminescence : part B. M. A. DeLuca and W. D. McElroy. Toronto, Academic Press Inc. **133**: 307-323.
- Heintzen, C., M. Nater, et al. (1997). AtGRP7, a nuclear RNA-binding protein as a component of a circadian-regulated negative feedback loop in *Arabidopsis thaliana*. **94**: 8515-8520.
- Hook, B., D. Bernstein, et al. (2005). "RNA-protein interactions in the yeast three-hybrid system: Affinity, sensitivity, and enhanced library screening." RNA **11**(2): 227-233.
- Humphreys, D. T., B. J. Westman, et al. (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **102**(47): 16961-16966.

- Iliev, D., O. Voytsekh, et al. (2006). "A Heteromeric RNA-Binding Protein Is Involved in Maintaining Acrophase and Period of the Circadian Clock." Plant Physiol.
- Jessen, T. H., C. Oubridge, et al. (1991). "Identification of molecular contacts between the U1 A small nuclear ribonucleoprotein and U1 RNA." EMBO journal **10**(11): 3447.
- Johnson, C. H., S. Inoue, et al. (1985). "Compartmentalization of algal bioluminescence: autofluorescence of bioluminescent particles in the dinoflagellate *Gonyaulax* as studied with image-intensified video microscopy and flow cytometry." J. Cell Biol. **100**(5): 1435-1446.
- Kindler, S., H. Wang, et al. (2005). "RNA transport and local control of translation." Annual Review of Cell and Developmental Biology **21**(1): 223-245.
- Knaust, R., T. Urbig, et al. (1998). "The circadian rhythm of bioluminescence in *Pyrocystis* is not due to differences in the amount of luciferase: a comparative study of three bioluminescent marine dinoflagellates." Journal of Phycology **34**(1): 167-172.
- Kozak, M. (1988). "A profusion of controls." J. Cell Biol. **107**(1): 1-7.
- Kozak, M. (2006). "Rethinking some mechanisms invoked to explain translational regulation in eukaryotes." Gene **382**: 1-11.
- Kramer, C., J. J. Loros, et al. (2003). "Role for antisense RNA in regulating circadian clock function in *Neurospora crassa*." Nature **421**(6926): 948-952.
- Lakin-Thomas, P. L. and S. Brody (2004). "Circadian rhythms in microorganisms: New complexities." Annual Review of Microbiology **58**: 489-519.
- Lee, D. H., M. Mittag, 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.
- Lewis, J. and R. Hallett (1997). "*Lingulodinium polyedrum* (*Gonyaulax polyedra*) a blooming dinoflagellate." Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. **35**: 97-161.
- Li, L. and J. W. Hastings (1998). "The structure and organization of the luciferase gene in the photosynthetic dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*." Plant Molecular Biology **36**(2): 275.
- Li, L., R. Hong, et al. (1997). "Three functional luciferase domains in a single polypeptide chain." PNAS **94**(17): 8954-8958.
- Lidder, P., R. A. Gutierrez, et al. (2005). "Circadian Control of Messenger RNA Stability. Association with a Sequence-Specific Messenger RNA Decay Pathway." Plant Physiol. **138**(4): 2374-2385.

- Lykke-Andersen, J., M.-D. Shu, et al. (2001). "Communication of the Position of Exon-Exon Junctions to the mRNA Surveillance Machinery by the Protein RNPS1." Science **293**(5536): 1836-1839.
- Machabée, S., L. Wall, et al. (1994). "Expression and genomic organization of a dinoflagellate gene family." Plant Molecular Biology **25**(1): 23.
- McNeil, G. P., X. Zhang, et al. (1998). "A molecular rhythm mediating circadian clock output in *Drosophila*." Neuron **20**(2): 297-303.
- Mehta, A. and D. M. Driscoll (1998). "A Sequence-Specific RNA-Binding Protein Complements Apobec-1 To Edit Apolipoprotein B mRNA." Mol. Cell. Biol. **18**(8): 4426-4432.
- Michael, T. P., P. A. Salome, et al. (2003). "Two *Arabidopsis* circadian oscillators can be distinguished by differential temperature sensitivity." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(11): 6878.
- Milos, P., D. Morse, et al. (1990). "Circadian control over synthesis of many *Gonyaulax* proteins is at a translational level." Naturwissenschaften **77**(2): 87-89.
- Mittag, M. (1996). "Conserved circadian elements in phylogenetically diverse algae." PNAS **93**(25): 14401-14404.
- Mittag, M., C. Eckerskorn, et al. (1997). "Differential translational initiation of *lbp* mRNA is caused by a 5' upstream open reading frame." FEBS Letters **411**(2-3): 245.
- Mittag, M. and J. W. Hastings (1996). "Exploring the signaling pathway of circadian bioluminescence." Physiologia Plantarum **96**(4): 727-732.
- Mittag, M., D. Lee, et al. (1994). "Circadian Expression of the Luciferin-Binding Protein Correlates with the Binding of a Protein to the 3' Untranslated Region of its mRNA." PNAS **91**(12): 5257-5261.
- Mittag, M., L. Li, et al. (1998). "The mRNA level of the circadian regulated *Gonyaulax* luciferase remains constant over the cycle." Chronobiology International **15**(1): 93-98.
- Moreno Diaz de la Espina, S., E. Alverca, et al. (2005). "Organization of the genome and gene expression in a nuclear environment lacking histones and nucleosomes: the amazing dinoflagellates." European Journal of Cell Biology **84**(2-3): 137.
- Morse, D., P. M. Milos, et al. (1989). "Circadian Regulation of Bioluminescence in *Gonyaulax* Involves Translational Control." PNAS **86**(1): 172-176.

- Morse, D., A. M. Pappenheimer, Jr., et al. (1989). "Role of a luciferin-binding protein in the circadian bioluminescent reaction of *Gonyaulax polyedra*." J. Biol. Chem. **264**(20): 11822-11826.
- Muckenthaler, M., N. K. Gray, et al. (1998). "IRP-1 Binding to Ferritin mRNA Prevents the Recruitment of the Small Ribosomal Subunit by the Cap-Binding Complex eIF4F." Molecular Cell **2**(3): 383-388.
- Nakahira, Y., M. Katayama, et al. (2004). "Global gene repression by KaiC as a master process of prokaryotic circadian system." PNAS **101**(3): 881-885.
- Nakajima, M., K. Imai, et al. (2005). "Reconstitution of Circadian Oscillation of Cyanobacterial KaiC Phosphorylation in Vitro." Science **308**(5720): 414-415.
- Nakamura, H., Y. Kishi, et al. (1989). "Structure of dinoflagellate luciferin and its enzymic and nonenzymic air-oxidation products." J. Am. Chem. Soc. **111**(19): 7607-7611.
- Netzel, H. and G. Dürr (1984). Dinoflagellate cell cortex. Dinoflagellates. D. L. Spector. Orlando, Academic Press Inc.: 43-105.
- Nicolas, M. T., D. Morse, et al. (1991). "Colocalization of luciferin binding protein and luciferase to the scintillons of *Gonyaulax polyedra* revealed by double immunolabeling after fast-freeze fixation." Protoplasma **160**(2 - 3): 159-166.
- Okamoto, O. K. and J. W. Hastings (2003). "Novel dinoflagellate clock-related genes identified through microarray analysis." Journal of Phycology **39**(3): 519-526.
- Okamoto, O. K., D. L. Robertson, et al. (2001). "Different Regulatory Mechanisms Modulate the Expression of a Dinoflagellate Iron-Superoxide Dismutase." J. Biol. Chem. **276**(23): 19989-19993.
- Olson, R. J. and S. W. Chisholm (1986). "Effects of light and nitrogen limitation on the cell cycle of the dinoflagellate *Amphidinium carteri*." J. Plankton Res. **8**(4): 785-793.
- Park, Y. W., S. L. Tan, et al. (1999). "Differential sensitivity to 5-fluoro-orotic acid as a screen for bait RNA-independent false positives in a yeast three-hybrid system." Biotechniques **26**(6): 1102.
- Perret, E., J. Davoust, et al. (1993). "Microtubule organization during the cell cycle of the primitive eukaryote dinoflagellate *Cryptocodinium cohnii*." J Cell Sci **104**(3): 639-651.
- Pfiester, L. A. (1984). Sexual reproduction. Dinoflagellates. D. L. Spector. Orlando, Academic Press Inc.: 181-199.



- Pittendrigh, C. S. (1960). "Circadian rhythms and the circadian organization of living systems." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **25**: 159-184.
- Ramalho, C. B., J. W. Hastings, et al. (1995). "Circadian Oscillation of Nitrate Reductase Activity in *Gonyaulax polyedra* Is Due to Changes in Cellular Protein Levels." Plant Physiol. **107**(1): 225-231.
- Riley, K. J. L., L. A. Cassidy, et al. (2006). "Recognition of RNA by the p53 tumor suppressor protein in the yeast three-hybrid system." RNA **12**(4): 620-630.
- Rill, R. L., F. o. Livolant, et al. (1989). "Electron microscopy of liquid crystalline DNA: direct evidence for cholesteric-like organization of DNA in dinoflagellate chromosomes." Chromosoma **98**(4): 280.
- Rizzo, P. J. (1987). Biochemistry of the dinoflagellate nucleus. The Biology of Dinoflagellates. M. F. J. R. Taylor. Oxford, Blackwell Scientific Publications. **21**: 143-173.
- Roenneberg, T. and D. Morse (1993). "Two circadian oscillators in one cell." Nature **362**(6418): 362.
- Roenneberg, T. and J. Rehman (1996). "Nitrate, a nonphotic signal for the circadian system." FASEB J. **10**(12): 1443-1447.
- Roenneberg, T. and W. Taylor (1994). "Light-Induced Phase Responses in *Gonyaulax* Are Drastically Altered by Creatine." Journal of Biological Rhythms **9**(1): 1-12.
- Rossini, C. C., W. W. Taylor, et al. (2003). "Lifetimes of mRNAs for clock-regulated proteins in a dinoflagellate." Chronobiology international **20**(6): 963.
- Sägesser, R., E. Martinez, et al. (1997). "Detection and isolation of RNA-binding proteins by RNA-ligand screening of a cDNA expression library." Nucleic acids research **25**(19): 3816-3822.
- Sala-Rovira, M., M. L. Geraud, et al. (1991). "Molecular cloning and immunolocalization of two variants of the major basic nuclear protein (HCC) from the histone-less eukaryote *Cryptothecodinium cohnii* (Pyrrophyta)." Chromosoma **100**(8): 510.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, et al. (1989). Molecular cloning : a laboratory manual Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sczekan, S., D.-H. Lee, et al. (1993). Translational control in the circadian regulation of luminescence in the unicellular dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. Translational regulation of gene expression 2. J. Ilan. New York, Plenum Press: 265-277.

- Smith, W. B., S. R. Starck, et al. (2005). "Dopaminergic Stimulation of Local Protein Synthesis Enhances Surface Expression of GluR1 and Synaptic Transmission in Hippocampal Neurons." Neuron **45**(5): 765.
- Soyer-Gobillard, M. O., B. Gillet, et al. (1999). "Dinoflagellate chromosome behaviour during stages of replication." International microbiology **2**: 93-102.
- Spector, D. L. (1984). Dinoflagellates: An introduction. Dinoflagellates. D. L. Spector. Orlando, Academic Press Inc.: 1-15.
- Spector, D. L., A. C. Vasconcelos, et al. (1981). "DNA duplication and chromosome structure in the Dinoflagellates." Protoplasma **105**(3 - 4): 185.
- Strzelecka, T. E., M. W. Davidson, et al. (1988). "Multiple liquid crystal phases of DNA at high concentrations." Nature **331**(6155): 457-460.
- Tabler, M. and H. L. Sanger (1985). "Infectivity studies on different potato spindle tuber viroid (PSTV) RNAs synthesized in vitro with the SP6 transcription system." EMBO journal **4**(9): 2191-2199.
- Tang, S., M. Tao, et al. (2006). "The E7 Oncoprotein Is Translated from Spliced E6\*I Transcripts in High-Risk Human Papillomavirus Type 16- or Type 18-Positive Cervical Cancer Cell Lines via Translation Reinitiation." J. Virol. **80**(9): 4249-4263.
- Techel, D., E. Chuang, et al. (1996). "Changes in the ultrastructural localization of mRNA for a circadian regulated protein." Molecular marine biology and biotechnology **5**(4): 241.
- Tettweiler, G. and P. Lasko (2006). "A new model for translational regulation of specific mRNAs." Trends in Biochemical Sciences **31**(11): 607-610.
- Valencia-Sanchez, M. A., J. Liu, et al. (2006). "Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs." Genes Dev. **20**(5): 515-524.
- Van Dolah, F. M. and T. A. Leighfield (1999). "Diel phasing of the cell-cycle in the Florida red tide dinoflagellate, *Gymnodinium breve*." Journal of Phycology **35**(6): 1404-1411.
- von Dassow, P. and M. I. Latz (2002). "The role of Ca<sup>2+</sup> in stimulated bioluminescence of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum*." J Exp Biol **205**(19): 2971-2986.
- Wagner, V., M. Fiedler, et al. (2004). "Functional proteomics of circadian expressed proteins from *Chlamydomonas reinhardtii*." FEBS Letters **559**(1-3): 129-135.

- Wallace, S. T. and R. Schroeder (1998). "In vitro selection and characterization of streptomycin-binding RNAs: recognition discrimination between antibiotics." RNA **4**(1): 112-123.
- Waller, R. F., N. J. Patron, et al. (2006). "Phylogenetic history of plastid-targeted proteins in the peridinin-containing dinoflagellate *Heterocapsa triquetra*." Int J Syst Evol Microbiol **56**(6): 1439-1447.
- Waltenberger, H., C. Schneid, et al. (2001). "Identification of target mRNAs for the clock-controlled RNA-binding protein Chlamy 1 from *Chlamydomonas reinhardtii*." Molecular Genetics and Genomics **265**(1): 180-188.
- Wang, Y., L. Jensen, et al. (2005). "Synthesis and degradation of dinoflagellate plastid-encoded psbA proteins are light-regulated, not circadian-regulated." PNAS **102**(8): 2844-2849.
- Wargo, M. J. and P. J. Rizzo (2001). "Exception to Eukaryotic Rules." Science **294**(5551): 2477b.
- Werner, R., H. P. Muhlbach, et al. (1995). "Isolation of viroid-rna-binding proteins from an expression library with nonradioactive-labeled rna probes." Biotechniques **19**(2): 218 ff.
- Widder, E. A. and J. F. Case (1982). "Distribution of subcellular bioluminescence sources in a dinoflagellate, *Pyrocystis fusiformis*." Biol. Bull. **162**: 423-448.
- Wilhelm, J. E. and R. D. Vale (1996). "A one-hybrid system for detecting RNA-protein interactions." Genes to Cells **1**(3): 317-323.
- Wilson, T. and J. W. Hastings (1998). "Bioluminescence." Annual Review of Cell and Developmental Biology **14**(1): 197-230.
- Wong, J. T. Y. and A. C. M. Kwok (2005). "Proliferation of dinoflagellates: blooming or bleaching." BioEssays **27**(7): 730-740.
- Wong, J. T. Y., D. C. New, et al. (2003). "Histone-Like Proteins of the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii* Have Homologies to Bacterial DNA-Binding Proteins." Eukaryotic Cell **2**(3): 646-650.
- Yamaguchi, S., H. Isejima, et al. (2003). "Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus." Science **302**(5649): 1408-1412.
- Yeung, P. K. K., D. C. New, et al. (2000). "The Spindle Checkpoint in the Dinoflagellate *Cryptothecodinium cohnii*." Experimental Cell Research **254**(1): 120.

Zhao, B., C. Schneid, et al. (2004). "The Circadian RNA-Binding Protein CHLAMY 1 Represents a Novel Type Heteromer of RNA Recognition Motif and Lysine Homology Domain-Containing Subunits." Eukaryotic Cell 3(3): 815-825.

