

INTRODUCTION

I EMBRYOGENESE PRECOCE DU FUCUS.....

A. PRESENTATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE.....
A.1. Cycle de vie.....
A.1.1. Généralités
A.1.2. La Fécondation.....
A.1.3. Du zygote à l'algue adulte.....
A.2. Avantages et inconvénients du système biologique pour l'étude du développement embryonnaire
A.3. Le zygote de <i>Fucus</i> un modèle historique en biologie du développement.....
B. POLARISATION ET DEVELOPPEMENT PRECOCE DU ZYGOTE DE <i>FUCUS</i>.....
B.1. LA POLARISATION CELLULAIRE, EST UN PREREQUIS POUR LA MORPHOGENESE ERREUR! SIGNET NO
B.2. Photopolarisation du zygote de <i>Fucus spiralis</i>.....
B.3. Acquisition de la polarité
B.3.1. La fécondation
B.3.2. Sélection d'un axe de polarité
<i>Les différents inducteurs de la polarité.....</i>
<i>Perception du signal lumineux.....</i>
B.3.3. La formation de l'axe de polarité
B.3.4. Le cytosquelette
B.3.5. Les interactions plasmalemme-paroi
B.3.6. Le calcium libre.....
B.4. La fixation de l'axe de polarité
B.4.1. Le cytosquelette
B.4.2. La paroi.....
B.4.3. Les sécrétions polarisées et l'asymétrie pariétale
B.4.4. Les acteurs du continuum paroi-membrane-cytosquelette
B.5. Modèle de la polarisation zygotique
B.6. La germination.....
B.7. La division.....
B.7.1. La mitose
<i>Séparation des centrosomes et rotation nucléaire.....</i>
<i>Division nucléaire</i>

B.7.2. La cytodièse

II LE CYCLE CELLULAIRE.....

A. LES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE

B. LES KINASES DEPENDANTES DES CYCLINES ASSURENT LA PROGRESSION DANS LE CYCLE CELLULAIRE

B.1. Identification

B.2. Différents complexes CDK/cyclines interviennent au cours des phases du cycle cellulaire.....

B.2.1. Contrôle de la phase S

B.2.2. Contrôle de la mitose

B.3. Régulation des CDK.....

B.3.1. Structure tridimensionnelle

B.3.2. Régulation par les cyclines

B.3.3. Régulation par phosphorylation

Phosphorylations activatrices

Phosphorylations inhibitrices

B.3.4. Régulation par les CKI

B.3.5. Interactions avec les sous-unités p9

B.3.6. Régulation par synthèse

C. LES MECANISMES DE SURVEILLANCE DU CYCLE CELLULAIRE

C.1. Intégrité de l'information génétique

C.1.1. L'endommagement de l'ADN et l'inhibition de la réplication arrêtent la cellule à différents stades du cycle cellulaire.....

C.1.2. Voie de transduction

C.1.3. Les cibles moléculaires des points de contrôle dépendants de l'ADN

C.2. Assemblage du fuseau mitotique

D. PARTICULARITES DU CYCLE CELLULAIRE DANS LES EMBRYONS PRECOCES D'ANIMAUX

D.1. Rôle et régulation du MPF.....

D.2. Rôle du complexe cdk2/cycline E

D.3. Les points de contrôle du cycle cellulaire embryonnaire.....

E. LE CYCLE CELLULAIRE CHEZ LES VEGETAUX.....

E.1. Diversité des CDK et des cyclines

E.2. rôle des CDK et des cyclines

E.3. Régulation des CDK.....

E.3.1. Interactions avec les molécules régulatrices du cycle.....
E.3.2. Phosphorylations.....

E.4. Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire chez les végétaux

III DEVELOPPEMENT ET VOIES DE SIGNALISATION PAR PHOSPHORYLATION.....

A. GENERALITES

B. IMPORTANCE DES KINASES
--

C. LES CASCADES DE PHOSPHORYLATION.....
--

C.1. Dans la polarisation cellulaire

C.1.1. Polarisation chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
--

C.1.2. Les adhésions focales.....

C.2. Dans l'établissement de la polarité embryonnaire
--

C.3. Dans l'embryogenèse végétale
--

D. COORDINATION CYCLE CELLULAIRE ET DEVELOPPEMENT.....

D.1. Cycle cellulaire et morphogenèse chez les animaux

D.2. Cycle cellulaire et morphogenèse chez les végétaux
--

D.3. Cycle cellulaire et morphogenèse chez les ascomycètes

IV OBJECTIFS DE LA THESE.....

A. CARACTERISATION DU PREMIER CYCLE CELLULAIRE DE <i>FUCUS SPIRALIS</i>.....

B. LE CYCLE CELLULAIRE REGULE-T-IL LA POLARISATION ZYGOTIQUE?
--

C. EXISTE-T-IL UN CONTROLE DE LA POLARISATION PAR LES KINASES?

RESULTATS

ARTICLE 1 :

Un point de contrôle S/M inhibe les événements nucléaires et cytoplasmiques de la division cellulaire, incluant l'alignement de l'axe des centrosomes avec l'axe de polarité, et inhibe l'activation des kinases dépendantes des cycliens dans les embryons de Fucales

ARTICLE II :

Le cycle cellulaire du zygote de *Fucus* présente des parallèles avec le cycle cellulaire des cellules somatiques

ARTICLE III :

Le contrôle du développement précoce du zygote de *Fucus* est dépendant du cycle cellulaire par l'intermédiaire d'une protéine de type CDK

ARTICLE IV :

L'inhibition de l'établissement de la polarité zygotique par des inhibiteurs de tyrosine-kinases perturbe le modelage de l'embryon chez *Fucus*.....

CONCLUSION-PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....

A. LES CDK CONTROLENT DE NOMBREUX EVENEMENTS DU CYCLE CELLULAIRE ET CONSTITUENT UNE CIBLE MAJEURE DES MECANISMES DE SURVEILLANCE

A.1. Identité des CDK responsables de la progression au cours du cycle cellulaire

A.2. Le clonage des ADN_c de CDK de *Fucus* ouvrirait de nombreuses perspectives.....

A.3. Intervention des CDK dans les événements nucléaires et cytoplasmiques de la division.....

A.3.1. Intervention des CDK à la transition G₁/S.....

A.3.2. L'assemblage du fuseau est régulé par les CDK mitotiques.....

A.3.3. Sortie de mitose et cytodiérèse.....

B. MECANISMES DE REGULATION DES CDK.....

B.1. Régulation traductionnelle.....

B.2. Régulation transcriptionnelle de l'activité mitotique.....

B.3. Régulations par phosphorylation

C. RELATIONS CYCLE CELLULAIRE ET DEVELOPPEMENT ERREUR! SIGNET NON DÉFINI.

C.1. Importance de la division cellulaire pour la polarisation et la morphogenèse

- C.2. La CDK PSTAIRE de 34 kDa contrôle la polarisation précoce du zygote**
- C.3. Importance de la polarisation pour l'embryogenèse.....**
- D. EXISTE-T-IL UN CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE PAR LES ACTEURS DE LA POLARISATION? ...**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

INTRODUCTION

EMBRYOGENESE PRECOCE DU FUCUS

A. PRESENTATION DU MATERIEL BIOLOGIQUE

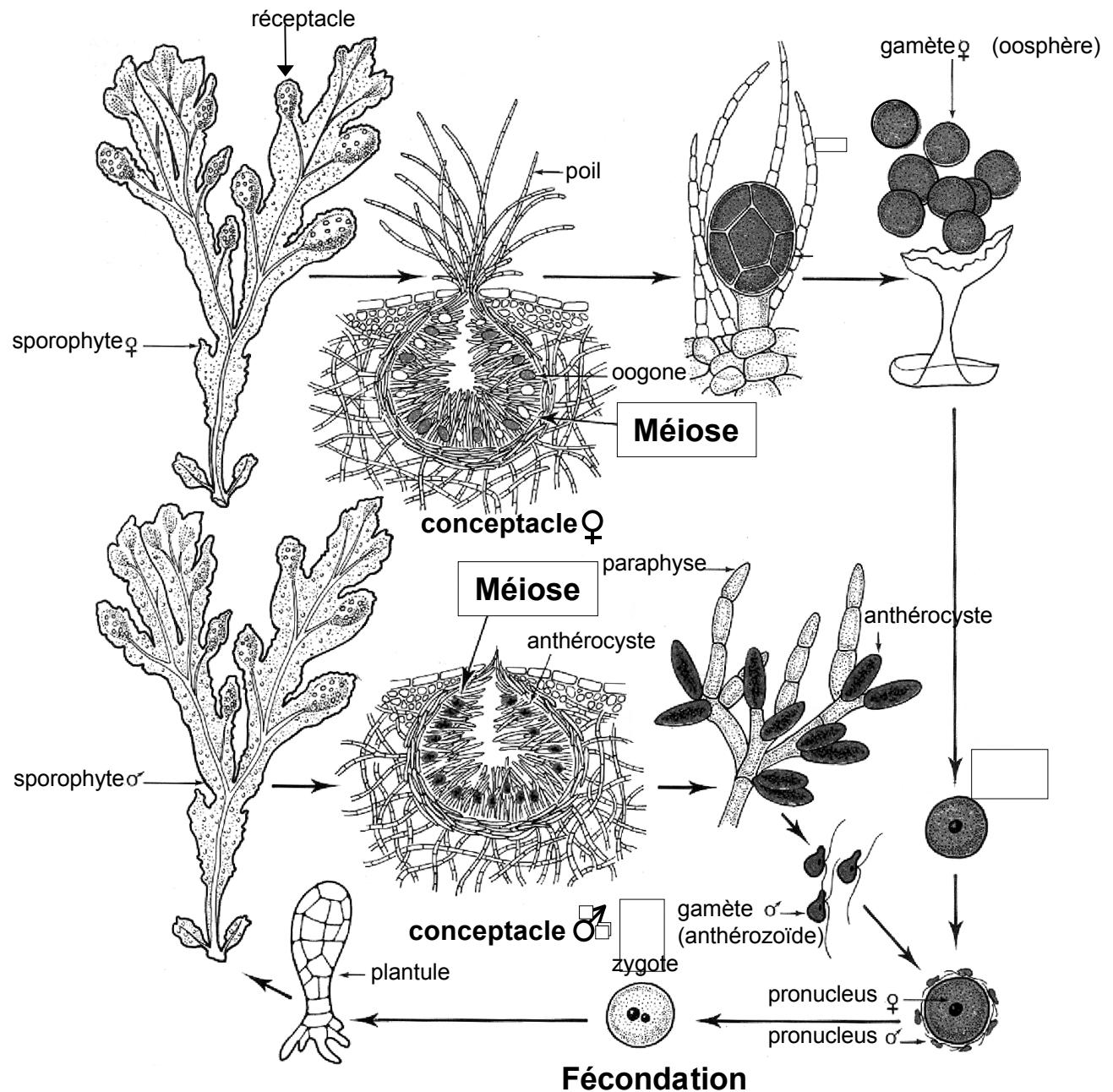
A.1. CYCLE DE VIE

A.1.1. Généralités

Les Fucales sont des algues brunes macrobenthiques qui occupent l'étage médio-littoral supérieur des côtes rocheuses des zones tempérées. Elles se caractérisent par un cycle de vie monogénétique diplophasique, où la phase gamétophytique se résume aux gamètes, et par un mode de reproduction oogamique. La fécondation et le développement externes autorisent la manipulation des gamètes et des zygotes. Les espèces dioïques (*Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus*) permettent un bon contrôle temporel de la fécondation car les gamètes, obtenus séparément, peuvent être réunis au moment choisi par l'expérimentateur. Cependant, chez les espèces monoïques (*Fucus spiralis*, *Fucus distichus*, *Pelvetia compressa*, *Pelvetia canaliculata*), la maturation des gamètes est simultanée et l'émission des anthérozoïdes et des oosphères s'effectue dans des proportions idéales, ce qui conduit à l'obtention rapide d'un taux élevé de zygotes viables et de populations homogènes. Les périodes de reproduction, souvent hivernales, varient dans le temps et sont plus ou moins longues selon les espèces. *Fucus spiralis* est une espèce monoïque dont la période de reproduction est relativement longue, puisqu'elle s'étend généralement d'octobre à juin. Aussi, nous avons choisi d'utiliser principalement cette espèce pour mener nos travaux.

Les parties reproductrices des Fucales correspondent à des sacs renflés appelés réceptacles, situés à l'extrémité des frondes chez les genres *Fucus* et *Pelvetia* (figure 1). Sous la surface des réceptacles, de nombreuses chambres (conceptacles), où se développent les gamètes, s'ouvrent sur l'extérieur par un petit orifice. À maturité, les réceptacles présentent une

Figure 1 : Cycle de vie de *Fucus vesiculosus*



D'après Gayral, 1975

Description dans le texte principal.

surface externe d'aspect granuleux; l'observation de leur surface interne, à l'oeil nu et à la lumière, permet de distinguer les oogones bien individualisés. Un oogone contient, suivant les genres, 2 à 8 oosphères dont le diamètre est d'environ 100 µm. Les anthéozoïdes, contenus dans des anthéridies, possèdent un chloroplaste pourvu d'un stigma (à l'exception de chez *F. spiralis*) qui leur confère une couleur orangée. Cette couleur permet une distinction aisée des sexes chez les espèces dioïques. A marée basse, sous l'effet de la dessiccation, les gamètes perlent à l'extérieur du conceptacle. L'immersion provoque la rupture des enveloppes protectrices des gamètes, leur dispersion et l'activation des anthéozoïdes. Les oosphères sédimentent en milieu calme et émettent une substance chimiotactrice, le fucoserratène, qui attire les anthéozoïdes (Müller et Jaenicke, 1973). Le stigma dirige la nage des anthéozoïdes par phototaxisme négatif, ce qui favorise la rencontre des gamètes sur le fond.

A.1.2. La Fécondation

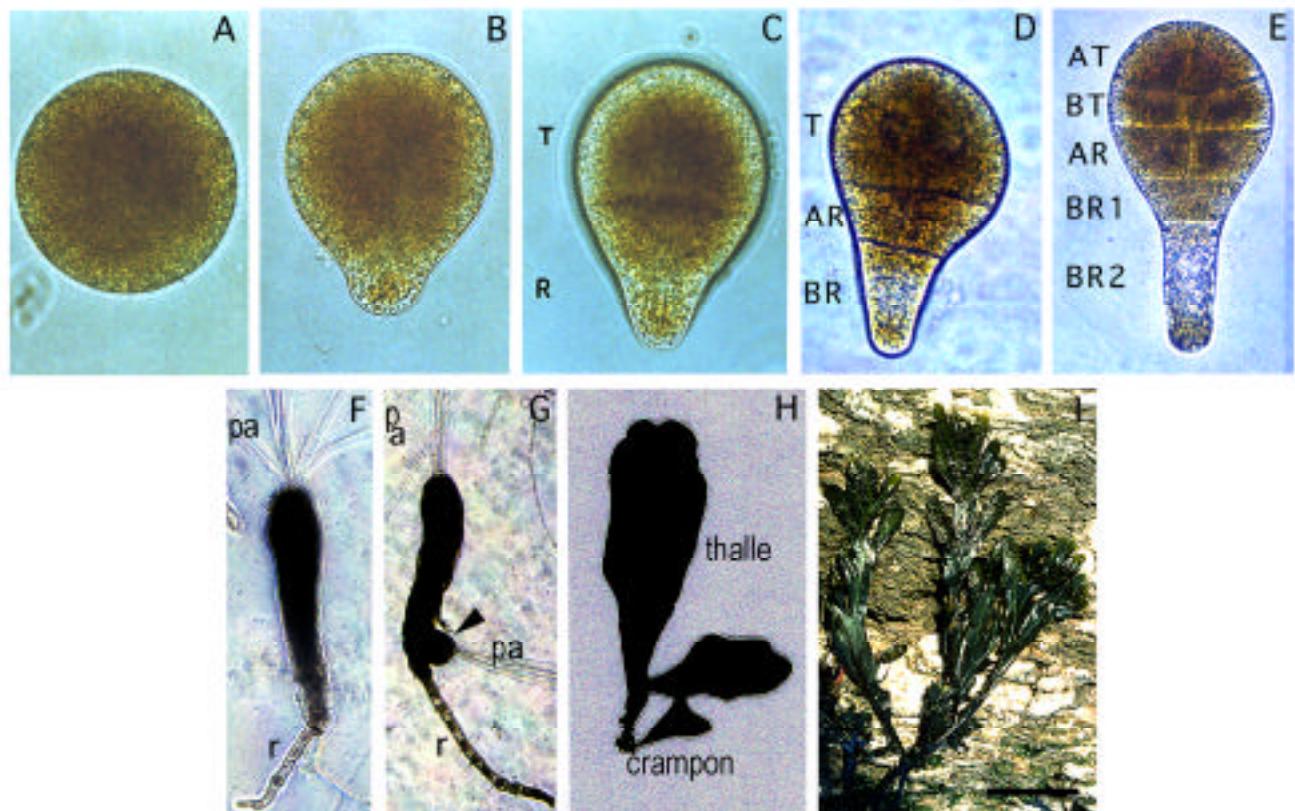
En laboratoire, le relargage des gamètes peut être obtenu après quelques jours de conditionnement des réceptacles à 4°C et à l'obscurité. Les réceptacles sont soumis à un choc osmotique et lumineux (rinçage à l'eau douce, illumination puis immersion en eau de mer) qui provoque l'émission plus ou moins rapide des gamètes, suivie en moyenne trente minutes plus tard, par la fécondation. Le contact des gamètes déclenche immédiatement un potentiel de fécondation qui est initié par l'ouverture des canaux Na^+ , puis des canaux Ca^{2+} , ce qui permet l'influx de ces ions, et s'achève par un efflux de K^+ , qui rétablit le potentiel membranaire de base (Brawley, 1991; Roberts *et al.*, 1993; Taylor et Brownlee, 1993; Roberts et Brownlee, 1995). La dépolarisation membranaire, de -60 mV à -20 mV, constitue une barrière électrique immédiate et efficace à la polyspermie (Brawley, 1991), qui est renforcée par la mise en place rapide (quelques minutes AF) de la paroi cellulaire. Cependant, l'influx de calcium observé à la fécondation est limité en comparaison de la vague calcique intervenant lors de l'activation des œufs animaux (Roberts *et al.*, 1993). L'augmentation de calcium observée chez *Fucus* est diffuse et subcorticale. L'activation métabolique de l'oosphère est marquée par un doublement de l'activité respiratoire (Whitaker, 1931; Levring, 1952) et la reprise de la synthèse d'ARNm et de protéines (Koehler et Linskens, 1967).

A.1.3.Du zygote à l'algue adulte

Les zygotes sédimentent, et adhèrent au substrat cinq à six heures après fécondation (AF). Ces zygotes ont l'originalité de ne posséder initialement aucune asymétrie et de se polariser en réponse à des gradients environnementaux, tels que la lumière. L'expression morphologique de cette polarité se traduit par l'émergence d'une protubérance au pôle opposé à la lumière incidente (germination). Ce phénomène se prolonge par la croissance polarisée du rhizoïde. La première division asymétrique s'effectue perpendiculairement à l'axe de polarité et sépare la cellule "rhizoïde" de la cellule "thalle" (figure 2). Dans nos conditions de culture (lumière continue, 14°C), la germination et le premier clivage du zygote ont lieu, respectivement de 14 à 16 heures et de 22 à 24 heures AF. Les divisions suivantes se succèdent beaucoup plus rapidement : le rhizoïde s'allonge par croissance apicale tandis que des divisions orientées de la cellule "thalle" s'effectuent initialement sans accroissement du volume cellulaire. A terme, le crampon et la fronde de l'algue adulte, qui ont respectivement pour origine les deux premières cellules, rhizoïde et thalle, se forment. Il faut cependant souligner la plasticité du développement de l'embryon de *Fucus* illustrée par la formation tardive d'embryons adventifs à partir de cellules rhizoïdiennes (McLachlan et Chen, 1972; Bouget et al., 1998) (figure 2).

L'embryon âgé de deux à trois semaines mesure environ 1 mm de long et possède plusieurs rhizoïdes, qui sont issus de la cellule apicale rhizoïdienne et forment le crampon embryonnaire. Au pôle apical du thalle se forme une dépression, à la base de laquelle est initiée la croissance de poils apicaux qui atteignent des longueurs de l'ordre de 2 cm et cassent au bout de quelques jours. A la base de ces poils, se met en place une zone méristématique (Oltmanns, 1922). De ce fait, ces poils apicaux sont considérés comme des marqueurs morphologiques du méristème apical embryonnaire. Il est difficile de garder les jeunes *Fucus* en culture au-delà de ce stade. En effet, leur croissance se ralentit et ils finissent par se nécroser. De nombreux essais de culture en laboratoire furent réalisés et ne donnèrent, dans le meilleur des cas, que des algues de taille réduite, mais permirent d'observer l'évolution morphologique du thalle (McLachlan et al., 1971; Fries, 1977; Fries, 1982). Le thalle cylindrique de l'embryon âgé s'aplatit et entame une croissance dichotomique de part et d'autre des cellules basales à l'origine des poils. Dans la nature, le passage de la plantule à l'algue adulte semble se faire en quelques

Figure 2 : Embryogenèse précoce de *Fucus spiralis*



Les zygotes restent sphériques durant toute leur polarisation (14-15 h AF) (A). L'expression morphologique de la polarité s'effectue par l'émergence du rhizoïde (du côté opposé à la lumière) (15-16 h AF B) et la première division asymétrique, perpendiculaire à l'axe de polarité, sépare la cellule thalle de la cellule rhizoïdienne (24 h AF C). Ces deux cellules donnent naissance, respectivement, à la fronde et au crampon de l'algue (H et I). Les divisions suivantes sont également très conservées. Dans le rhizoïde, la deuxième division s'effectue transversalement comme la plupart des divisions rhizoïdiennes qui suivront (32 h AF D et 48 h AF E). Dans le thalle, les divisions se succèdent et sont alternativement parrallèles et perpendiculaires à l'axe de polarité (E). AT, cellules apicale du thalle; BT, cellules basales du thalle; AR, cellules apicales du rhizoïde, BR1 et BR2, cellules basales du rhizoïde. Après deux à trois semaines, une région méristématique est mise en place à l'apex du thalle et précède l'émergence de poils apicaux (pa) (F). Chez certains embryons se développent des embryons adventifs (tête de flèche) à partir de la partie rhizoïdienne de l'algue (G). Après deux mois, la jeune algue s'est développée (H) et donnera, par croissance, l'algue adulte (I). L'échelle représente en A-C 30 µm, en E 40 µm en F et G 100 µm, en H 400 µm et en I 20 cm. D'après Bouget et al., 1998.

mois (2 à 4 mois environ), soit beaucoup plus rapidement que la durée de deux ans rapportée par Knight et Parke (1950).

A.2. AVANTAGES ET INCONVENIENTS DU SYSTEME BIOLOGIQUE POUR L'ETUDE DU DEVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

Les difficultés techniques inhérentes aux végétaux supérieurs compliquent l'avancée de la recherche sur l'embryogenèse végétale. L'embryon, de petite taille, est prisonnier des tissus maternels, ce qui rend toute approche pharmacologique et cellulaire extrêmement difficile. L'approche génétique, principalement réalisée chez *Arabidopsis thaliana*, est la seule envisageable, mais n'est néanmoins pas suffisante. L'étude de l'embryogenèse somatique constitue une alternative, cependant les premiers stades de développement ne reflètent pas ceux de l'embryogenèse zygotique.

Les zygotes de *Fucus* sont libres et se développent de manière synchrone. La culture des zygotes se réalise facilement en eau de mer et leur adhérence naturelle en permet la manipulation aisée. De plus, leur taille relativement importante (80-100 µm) et l'absence de vacuole cellulaire permettent l'utilisation des techniques de microinjection et d'imagerie cellulaire, par ailleurs difficiles chez les végétaux supérieurs. L'abondance de matériel disponible rend possible des approches biochimiques et moléculaires au cours du développement. Enfin, les premiers événements du développement (polarisation et cycle cellulaire) se déroulent suffisamment lentement pour pouvoir les étudier avec précision. Le zygote de *Fucus* est donc l'unique système cellulaire végétal permettant une approche expérimentale de l'embryogenèse dans des conditions physiologiques.

Cependant, la présence de nombreux pigments (chlorophylle, carotène, fucoxanthènes), d'abondants polyphénols et d'une épaisse paroi (cellulose, alginates) nécessite la mise au point de techniques adéquates de biochimie (extraction de protéines et d'ARN) et de biologie cellulaire (problèmes d'autofluorescence, de bruit de fond et d'effet d'écran en imagerie). Outre l'incompatibilité de l'environnement salin avec les techniques classiques de transformation génétique, le maintien laborieux des embryons en culture au delà de quatre

semaines permet difficilement d'envisager la mise en place d'approches génétiques du développement par mutagenèse.

A.3.LE ZYGOTE DE *FUCUS* UN MODELE HISTORIQUE EN BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT

De par son accessibilité, le zygote de *Fucus* constitue, depuis longtemps, un matériel de choix en biologie du développement. Ainsi, dès 1854, Gustave Thuret put observer et décrire la formation des gamètes, la fécondation ainsi que le développement précoce de l'embryon de *Fucus*. Il remarqua notamment que le premier clivage de l'embryon s'effectue toujours perpendiculairement à l'axe du rhizoïde. Strasburger (1897), Farmer et Williams (1896, 1898) et Yamanouchi (1909) poursuivirent les études cytologiques de Thuret sur la gamétogenèse chez le *Fucus*, ce qui les conduisit à étudier la mitose. Dans ce cadre, la mise en place et l'organisation du fuseau mitotique ainsi que la condensation des chromosomes, dans le jeune zygote, fut minutieusement décrite. Yamanouchi remarqua que l'oosphère de *Fucus* ne présentait aucune asymétrie cytologique. A la même époque, Rosenvinge(1889) observa que la polarité du zygote pouvait être imposée par un gradient lumineux : la germination du rhizoïde s'effectue toujours au pôle opposé à la source lumineuse. Il nota qu'à l'obscurité les zygotes en culture dense ont tendance à germer les uns vers les autres. Ce phénomène sera qualifié plus tard d'effet de groupe (Hurd, 1920). La propriété du zygote à orienter sa germination en fonction de facteurs extérieurs suscita l'intérêt de nombreux biologistes. Des études descriptives sur l'embryon mirent en évidence la remarquable conservation des divisions embryonnaires et révélèrent le fonctionnement d'une cellule initiale tétraédrique à la base de la croissance dichotomique du thalle (Oltmanns, 1922; Nienburg 1931).

Parallèlement, le zygote fit l'objet d'études fonctionnelles, qui marquent le début de l'embryologie expérimentale chez les plantes. Au début du siècle (1907), Hans Kniep s'interrogea sur le mode d'action des signaux cellulaires impliqués dans la formation du rhizoïde. Il rechercha notamment, quel pouvait être l'effet de la lumière sur ces signaux et en discuta le mode d'action putatif. Ses expériences constituent l'ébauche de nombreux travaux ultérieurs. Deux conclusions majeures s'en dégagent :

- la polarité zygotique peut être orientée à volonté par un vecteur lumineux pendant une période définie, puis le zygote, toujours sphérique, devient réfractaire à l'orientation lumineuse et germe selon la dernière orientation lumineuse qui lui a été imposée lors de sa période de photosensibilité. Ces deux périodes seront ultérieurement dénommées formation et fixation de l'axe de polarité (Quatrano, 1973).

- chez l'embryon de deux cellules ou plus, à la suite de l'ablation sélective de la (ou des) cellule(s) rhizoïdienne(s), la cellule thalle a la capacité de régénérer la partie rhizoïdienne manquante, indépendamment de l'orientation du vecteur lumineux imposée. Quatre vingt dix ans plus tard, des expériences similaires réalisées par microchirurgie laser démontrent l'existence d'une information de position au sein de l'embryon (Berger *et al.*, 1994; Bouget *et al.*, 1998).

De nombreuses autres investigations portèrent sur les facteurs influençant la polarité : Hurd, en 1920, mit en évidence l'action prépondérante de la lumière bleue sur la polarisation des zygotes et Lund (1923) découvrit qu'ils répondaient également à des champs électriques. Par la suite, Whitaker et Lowrance identifièrent de nombreux facteurs capables d'influencer la polarisation des zygotes, tels que la température (Lowrance, 1937), la force gravitationnelle (Whitaker, 1937), le pH (Whitaker, 1938) et les rayonnements ultraviolets (Whitaker, 1941). Ces auteurs définirent les différentes étapes de la photopolarisation : l'acquisition de la photosensibilité est suivie de la formation d'un axe polaire dont l'expression morphologique différée est la germination (Whitaker et Lowrance, 1936). En 1931, Knapp publia des résultats suggérant que le point d'entrée de l'anthérozoïde influence la polarisation du zygote de *Cystoseira barbata*. Ces résultats seront extrapolés pendant de nombreuses années au zygote de *Fucus* avant d'être confirmés très récemment, chez *Pelvetia* (Hable et Kropf, 2000).

A partir des années 60, deux auteurs émergent et ont une influence considérable sur l'orientation des recherches sur les mécanismes de polarisation du zygote de *Fucus* : L. F. Jaffe et R. S. Quatrano. Le premier s'attache à connaître et à modéliser l'action de la lumière sur la polarité et met en évidence l'existence d'un courant transcellulaire associé à des transport de K⁺ et de Ca²⁺ au cours de l'établissement précoce de la polarité. Quatrano s'intéresse aux processus biochimiques et moléculaires mis en jeu lors de la polarisation. Ceci le conduit à définir

plusieurs phases dans la polarisation et à élaborer un modèle de travail que nous détaillerons ultérieurement. Au cours des dernières années, des efforts croissants ont été réalisés afin de préciser les acteurs moléculaires et les voies de signalisation impliqués dans la polarisation. La dynamique du cytosquelette (D. L. Kropf) et les variations de calcium intracellulaire (K. R. Robinson, C. Brownlee) reçoivent une attention particulière.

B. POLARISATION ET DEVELOPPEMENT PRECOCE DU ZYGOTE DE *FUCUS*

B.1. LA POLARISATION CELLULAIRE, EST UN PREREQUIS POUR LA MORPHOGENESE

Le mécanisme universellement utilisé pour initier la différenciation cellulaire est la localisation polarisée de déterminants cytoplasmiques, qui est le plus souvent suivie par une division asymétrique de la cellule. Chacune des cellules filles hérite ainsi d'un patrimoine particulier, qui reflète et/ou spécifie son destin cellulaire (développement autonome). Le jeu des interactions cellulaires affine l'information propre à chaque cellule (développement non-autonome) (Horvitz et Herskowitz, 1992; Drubin et Nelson, 1996).

Chez le zygote de *Fucus*, l'importance de la polarisation zygotique pour l'embryogenèse tardive n'a pas été clairement établie car seuls les effets précoces de l'inhibition de la polarisation ont été observés, et les répercussions sur le modelage tardif de l'embryon ne sont généralement pas rapportées. Néanmoins, l'inhibition des sécrétions polarisées et/ou de la polymérisation de l'actine au pôle rhizoïdien empêche la polarisation et entrave la germination du jeune embryon. Ceci suggère que la localisation de déterminants morphogénétiques joue un rôle important pour la différenciation des deux premières cellules de l'embryon (Quatrano, 1973; Shaw et Quatrano, 1996a). Cependant, chacune des deux cellules de l'embryon est capable, lorsqu'elle est libérée du contexte embryonnaire et pariétal, de ré-enclencher un programme de développement, et de générer un petit zygote puis un embryon (Berger et Brownlee, 1995). De plus, au sein de l'embryon de trois cellules, la cellule apicale rhizoïdienne est capable, après division, de compenser aussi bien l'ablation de la cellule thalle que celle de la cellule basale

rhizoïdienne (figure 2) (Bouget *et al.*, 1998). Ces résultats indiquent que le développement non-autonome intervient majoritairement dans l'embryogenèse de *Fucus* : le contexte embryonnaire dicte et maintien la différenciation des cellules.

B.2.PHOTOPOLARISATION DU ZYGOTE DE *FUCUS SPIRALIS*

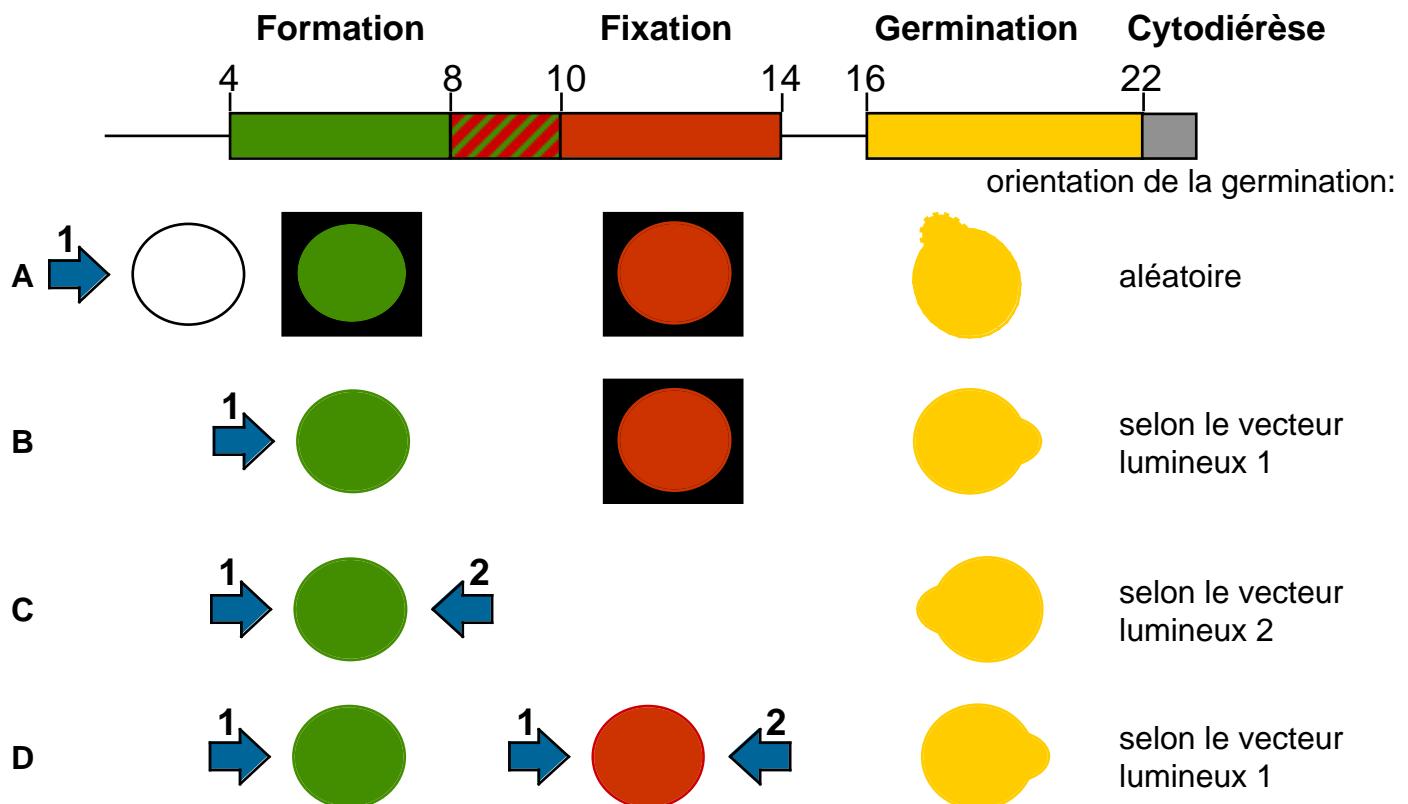
La polarisation du zygote de *Fucus* en réponse à des gradients environnementaux conduit à la formation de deux pôles morphologiquement et cytologiquement différents : le pôle rhizoïdien et le pôle thalle. Le zygote présente des fenêtres temporelles de sensibilité différentes aux vecteurs environnementaux (revue par Quatrano, 1974). Le stimulus lumineux a été de loin le plus étudié. Le zygote de *F. spiralis* est sensible à la lumière de 4/6 h à 10 h AF. Placé à l'obscurité après un stimulus lumineux, de durée et d'intensité adéquates, il germera selon l'orientation de la lumière qui lui a été imposée. Durant cette période, l'expérimentateur peut imposer une nouvelle orientation à l'axe de polarité en changeant l'orientation du vecteur lumineux. Cette période pendant laquelle la polarité est dite labile, est appelée formation de l'axe. Elle est suivie d'une période pré-germinatoire (10 à 14 heures), pendant laquelle le zygote est réfractaire aux changements d'orientation de la lumière : c'est la période de fixation de l'axe. En l'absence de marqueurs cytologiques de la formation, la réponse au vecteur lumineux est évaluée au moment de la germination, dont l'orientation correspond ou non à la direction du vecteur imposé. Ce protocole expérimental a été largement utilisé pour définir les événements cellulaires et moléculaires correspondant à chacune de ces périodes et pour déterminer les acteurs essentiels de la polarisation (figure 3).

B.3.ACQUISITION DE LA POLARITE

B.3.1.La fécondation

Chez *Pelvetia*, après la plasmogamie, la migration du pronucleus mâle s'effectue, par un mécanisme qui implique les microtubules, à une vitesse moyenne de 0,11 à 0,29 µm/mn (Swope et Kropf, 1993). Chez *Fucus* et *Pelvetia*, la caryogamie a lieu entre 2 et 4 h AF, tandis que chez *Ascophyllum*, les noyaux fusionneraient 10 mn AF (Farmer et Williams, 1896).

Figure 3 : Protocole expérimental de détermination des périodes de formation et de fixation de l'axe de polarité



Ce protocole expérimental est actuellement le seul moyen de connaître avec certitude le stade de développement dans lequel se trouvent des zygotes sphériques. Il a largement été utilisé pour associer les événements physiologiques aux périodes de formation ou de fixation de l'axe.

Les zygotes sont soumis à un vecteur lumineux 1 et placés, à différents temps, à l'obscurité ou soumis à un vecteur lumineux opposé 2. Au moment de la manipulation, si les zygotes ne sont pas encore en période de formation (pas photosensibles) ils germeront, à l'obscurité, selon une orientation aléatoire (A). S'ils ont perçu le signal lumineux ils germeront, à l'obscurité, selon le vecteur lumineux 1 (B). S'ils ont perçu le signal mais n'ont pas fixé leur axe de polarité ils percevront et répondront au deuxième vecteur lumineux qui leur est imposé, en germant à l'opposé du vecteur lumineux 2 (C). S'ils ont perçu et intégré définitivement le signal lumineux (fixé leur axe), ils ne répondront plus au deuxième vecteur lumineux (D).

A ce jour aucune asymétrie cytologique et/ou pariétale n'a pu être détectée dans l'oosphère (Brawley *et al.*, 1976). Le pronucleus femelle est maintenu en position centrale par le cytosquelette de microfilaments et de microtubules. Cependant, les zygotes mis en culture dans un milieu homogène (à faible densité et à l'obscurité), où ils ne sont soumis à aucun stimulus suffisant pour les polariser, germent selon une orientation aléatoire et sont donc capables de se polariser. Au début du siècle dernier, des études réalisées sur le zygote de *Cystoseira barbata* indiquent que le point d'entrée de l'anthérozoïde détermine la polarité zygotique. En 1909, Yamanouchi observe la présence de matériel fibreux au point d'entrée de l'anthérozoïde chez les Fucales, mais ce n'est que très récemment qu'une localisation transitoire de l'actine corticale a été mise en évidence au point d'entrée de l'anthérozoïde juste après la fécondation. La polarisation puis la germination s'effectuent au point d'entrée de l'anthérozoïde. De plus, il existe une étroite corrélation entre le taux de polyspermie et la formation d'embryons possédant deux rhizoïdes diamétralement opposés (bipolaires) (Hable et Kropf, 2000). L'entrée de l'anthérozoïde provoque donc une asymétrie initiale, matérialisée par la localisation transitoire du cytosquelette d'actine, qui serait suffisante pour induire et orienter la polarisation. Par la suite, cette première orientation de la polarité est annulée par d'autres stimuli environnementaux plus efficaces.

B.3.2. Sélection d'un axe de polarité

Les différents inducteurs de la polarité

La période pendant laquelle aucune asymétrie n'est détectée, s'étend chez *Fucus spiralis* jusqu'à 6 h AF et peut être conçue comme une période de potentialisation de la cellule à répondre à son environnement. Les composants pariétaux (cellulose, alginates, fucanes peu sulfatés et polyphénols) sont mis en place de façon uniforme et permettent au zygote d'adhérer au substrat (Novotny et Forman, 1974; Vreeland *et al.*, 1993). Simultanément, les synthèses d'ARNm et de protéines nécessaires à la polarisation s'opèrent (Quatrano, 1968; Kropf *et al.*, 1989). La sensibilité du zygote aux nombreux facteurs environnementaux évolue dans le temps (Jaffe, 1968). La sensibilité au "voisin" (effet de groupe) interviendrait très tôt après la fécondation, tandis que la photosensibilité n'apparaît que plus tard (vers 5 h AF pour *F. spiralis*)

(Berger et Brownlee, 1994). De plus, parmi ces facteurs, certains prédominent sur les autres. Ainsi, l'attraction mutuelle des zygotes prévaut sur l'orientation par la lumière (Bentrup et Jaffe, 1968). La qualité d'un facteur donné est également très importante (par exemple, la lumière bleue prédomine sur la lumière blanche). Dans la nature, tous ces facteurs agiraient en synergie pour orienter la croissance rhizoïdienne vers le substrat rocheux.

L'idée que ces facteurs n'agissent pas en réorientant un axe préformé mais sont à l'origine même de sa formation, a reposé, pendant longtemps, sur l'observation suivante : en lumière polarisée, les zygotes développent deux rhizoïdes diamétralement opposés perpendiculairement au plan de vibration de la lumière (Jaffe, 1956; Jaffe, 1958). Comme il semblait difficilement concevable que ces zygotes bipolaires résultent du dédoublement d'un axe préformé, il était généralement accepté que l'axe de polarité du zygote est formé *de novo*. Cette conception est remise en cause par le fait que l'anthérozoïde constitue un stimulus suffisant pour induire la polarité (Hable et Kropf, 2000). De plus, quel que soit l'inducteur de la polarité (l'anthérozoïde ou la lumière), les premières asymétries cellulaires apparaissent au même moment pour une espèce donnée (Hable et Kropf, 1998). Enfin, la réorientation de la polarité par un repositionnement du vecteur lumineux ne retarde pas sensiblement la germination (observation personnelle). Il faut donc concevoir que l'établissement initial de la polarité, à la suite de la fécondation, requiert la mise en place de facteurs qui lui sont propres et qui, plus tard, pourraient être utilisés rapidement lors d'un repositionnement de la polarité.

Perception du signal lumineux

L'influence de la lumière a été beaucoup étudiée. Les zygotes se photopolarisent exclusivement en réponse à la lumière bleue et ultraviolette, après un temps d'exposition qui est fonction de l'intensité lumineuse (Hurd, 1920). Cependant, seules deux études nous renseignent sur les mécanismes de perception du signal lumineux. Elles sont en profond désaccord sur un point fondamental : la localisation des récepteurs à la lumière. La première étude suggère que le zygote aurait la capacité de focaliser la lumière incidente au pôle rhizoïdien au travers de son cytoplasme, qui servirait en quelque sorte de lentille convergente. Les auteurs de cet travail observent que la photopolarisation est inhibée par le ferricyanure qui est préférentiellement réduit au pôle rhizoïdien. Ceci a conduit à l'hypothèse qu'une chaîne rédox

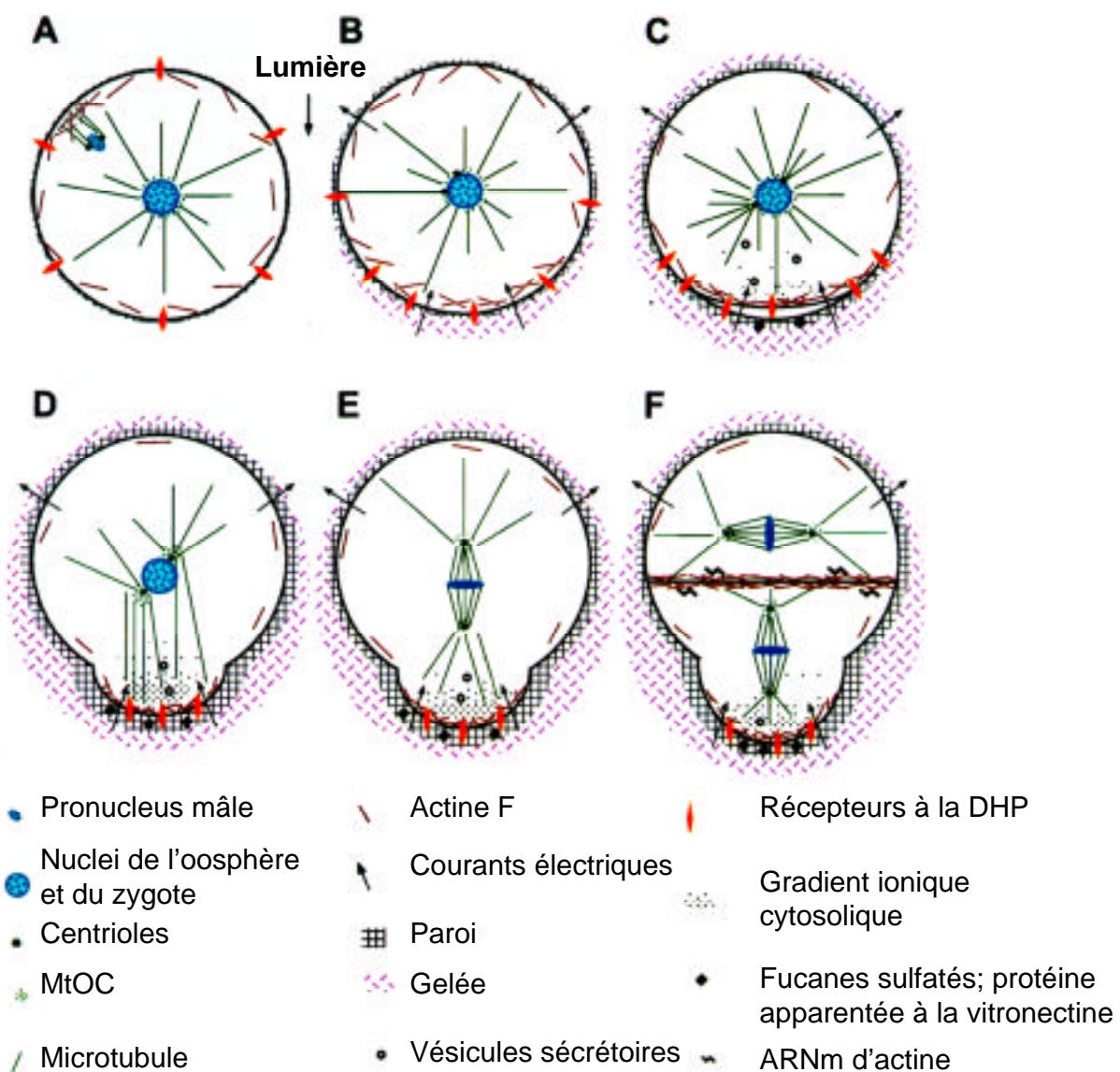
membranaire interviendrait en aval d'un photorécepteur localisé au pôle rhizoïdien (Berger et Brownlee, 1994). La seconde étude démontre que les zygotes absorbent la lumière au pôle thalle et soutient que la lumière ne peut pas être focalisée au pôle rhizoïdien (Robinson, 1996a). Le fait que, chez les embryons âgés, les rhizoïdes s'orientent toujours en réponse à la lumière malgré l'évolution des propriétés optiques due aux multiples cellules, est en faveur de la dernière hypothèse. Des travaux plus récents indiquent qu'un gradient de GMPc est nécessaire à la photopolarisation (Robinson et Miller, 1997). La découverte de fortes concentrations en rétinal dans les zygotes a conduit Robinson à proposer un modèle faisant intervenir la rhodopsine (11-cis-rétinal et opsine), similaire à celui de la transduction de la lumière dans les systèmes visuels de vertébrés (Robinson *et al.*, 1998). Une des faiblesses de ce modèle réside dans la lenteur de l'élévation du GMPc en réponse à la lumière (2 h). En effet, l'essence même du mécanisme de transduction de la lumière par la rhodopsine est l'amplification ultra rapide du signal lumineux grâce à une forte production de GMPc (1 photon déclenche la synthèse de 200 molécules de GMPc) (Lamb et Pugh, 1992).

B.3.3. La formation de l'axe de polarité

Les premières asymétries observées dans le zygote sont peu marquées, ce qui rend leur détection difficile. Elles ont principalement été observées en réponse au vecteur lumineux et peuvent être repositionnées par un changement d'orientation de ce vecteur (figure 4). Aussi, je considérerai dans ce chapitre que les travaux concernant la photopolarisation intéressent directement la formation de l'axe de polarité. Jusqu'à ce jour, aucun phénomène physiologique propre à la formation n'a été identifié et les asymétries détectées sont amplifiées au cours de la période de fixation (figure 4). Elles correspondent principalement à :

- l'apparition de courants transcellulaires de faible intensité entrant, au pôle rhizoïdien et sortant au pôle thalle.
- une localisation au pôle rhizoïdien des microfilaments d'actine corticale.
- une modification des interactions plasmalemme-paroi au pôle rhizoïdien présomptif, qui peut être mis en évidence par une plasmolyse marquée en milieu hypertonique.
- la localisation de molécules affines pour la dihydropyridine à ce même pôle, suggérant une redistribution de canaux calciques en réponse à la lumière.

Figure 4 : Changements physiologiques et structuraux au cours de la polarisation des zygotes de fucales



A. 1 h AF : Le pronucleus mâle migre vers le pronucleus femelle. Le zygote ne présente pas d'asymétrie structurale. **B. Formation de l'axe :** 4-6 h à 8-10 h AF. Les courants transcellulaires s'établissent, les récepteurs à la DHP et l'actine corticale se redistribuent au futur pôle rhizoïdien, les centrosomes commencent à se séparer. Chez *Pelvetia*, de la gelée se dépose au futur site rhizoïdien. **C. Fixation de l'axe :** 8-10 h à 14-16 h AF. Les phénomènes de polarisation s'amplifient. Le gradient de Ca^{2+} est détecté. Les sécrétions polarisées permettent l'ancrage de la polarité. Chez *Fucus*, des composés sulfatés sont mis en place dans la paroi du pôle rhizoïdien. **D. Germination :** 16-18 h AF. Les sécrétions polarisées s'accroissent, et le remaniement pariétal au pôle rhizoïdien permet l'émergence du rhizoïde. Les centrosomes sont les sites majeurs de nucléation des microtubules qui s'allongent vers le pôle rhizoïdien et permettent la rotation nucléaire. **E. Mitose :** 16-20 h AF. La rotation nucléaire s'achève, permettant l'alignement des centrosomes avec l'axe de polarité. Les chromosomes se séparent. **F. Cytodièrèse :** 20-24 h AF. La membrane et la paroi de division se forment transversalement à l'axe de polarité. L'actine et les ARNm d'actine sont localisés au plan de division. MtOC, centre organisateur des microtubules. DHP, dihydropyridine. *D'après Kropf, 1997.*

B.3.4.Le cytosquelette

L'intégrité du cytosquelette d'actine, mais non celle des microtubules, est indispensable à la formation de l'axe (Nelson et Jaffe, 1973; Quatrano, 1973; Brawley et Quatrano, 1979). Chez *Pelvetia*, les inhibiteurs de la polymérisation de l'actine (cytochalasine D ou B, latrunculine B) abolissent les sécrétions polarisées de matériel gélatineux amorphe (gelée) qui sont à l'origine de la formation d'une zone claire située au pôle rhizoïdien (figure 4) (Hable et Kropf, 1998). La cytochalasine D diminue les courants électriques dans l'embryon germé et les inhiberait totalement lors de la polarisation précoce (Brawley et Robinson, 1985). Malheureusement cette dernière observation ne porte que sur trois zygotes et nécessiterait une confirmation expérimentale.

B.3.5.Les interactions plasmalemme-paroi

Chez *Pelvetia*, le site de déposition de la gelée coïncide avec le site de plasmolyse préférentielle chez le zygote et, de ce fait, les modifications des contacts plasmalemme-paroi au pôle rhizoïdien présumptif apparaissent comme une conséquence du flux dirigé d'exocytose (Hable et Kropf, 1998). De nouvelles molécules, dont la nature reste à préciser, seraient insérées dans la membrane au pôle rhizoïdien et permettraient la modification des interactions plasmalemme-paroi. Chez *Fucus*, des modifications similaires semblent avoir lieu lors de la formation de l'axe, car la plasmolyse a lieu au site présumptif de la germination (Whitaker 1941; Reed et Whitaker, 1941). Cependant, le flux dirigé de vésicules d'exocytose n'interviendrait que plus tard, au moment de la fixation de l'axe (Shaw et Quatrano, 1996a). Chez *Fucus*, l'interruption des phénomènes sécrétaires par la bréfélidine A (BFA) ne gêne pas la photopolarisation mais inhibe la fixation de l'axe (Shaw et Quatrano, 1996a), alors qu'un traitement similaire chez *Pelvetia*, empêche également la photopolarisation (Hable et Kropf, 1998). Il faut cependant remarquer que la durée d'incubation des zygotes de *Fucus* en BFA est seulement d'une heure pour les expériences de photopolarisation contre 6 heures pour les expériences de fixation, et il serait judicieux de vérifier qu'un traitement plus précoce et plus long n'a pas d'effet sur la photopolarisation.

B.3.6. Le calcium libre

Historiquement, les courants transcellulaires entrant au pôle rhizoïdien et sortant au pôle thalle ont été détectés avant toutes les autres asymétries. L'étude de ces courants dans des milieux de différentes compositions ioniques, suggère qu'ils sont, en partie, attribuables aux ions calcium (Nuccitelli, 1978). L'utilisation de $^{45}\text{Ca}^{2+}$ permet de mettre en évidence un influx de calcium plus important au pôle rhizoïdien qu'au pôle thalle, 2 h après la stimulation des zygotes de *Pelvetia* par la lumière, c'est à dire 6 h AF (Robinson et Jaffe, 1974). A ce stade, le calcium serait majoritairement responsable du courant transcellulaire. Cet influx décroît par la suite mais se stabilise en situation asymétrique au pôle rhizoïdien (revue par Robinson *et al.*, 1999). Ces expériences constituent le début d'une série de recherches visant à déterminer l'importance du calcium dans le processus de photopolarisation.

Le rôle du calcium dans la croissance apicale du rhizoïde est actuellement bien établi et un gradient de calcium a été visualisé dans le rhizoïde en croissance (Brownlee et Wood, 1986). Il s'étend entre les valeurs extrêmes de 400 nM à la pointe rhizoïdienne et 100 nM, 20 à 30 μm en deçà de cette région. Un plus faible gradient a pu être détecté par une sonde fluorescente tétracycline au moment de la fixation de l'axe (Kropf et Quatrano, 1987). En revanche, l'intervention des ions calcium lors de la formation de l'axe reste discutée. Les zygotes se polarisent dans un gradient d'ionophores spécifiques du calcium et forment leur rhizoïde vers la concentration d'ionophore la plus élevée (Robinson et Cone, 1980). De plus, Robinson observe que les zygotes de *Pelvetia* ne peuvent se photopolariser lorsqu'ils sont en eau de mer artificielle sans calcium, suggérant le rôle non négligeable du calcium extracellulaire pour l'établissement de la polarité (Robinson, 1996b). Plusieurs auteurs rapportent, cependant, que les zygotes de *Fucus* gardent la capacité à se photopolariser dans un milieu déplété en calcium (Kropf et Quatrano, 1987; Love *et al.*, 1997). Il apparaît même que le potassium seul suffit à leur photopolarisation (Hurst et Kropf, 1991). Néanmoins, Love démontre que plusieurs agents bloquants de canaux calciques (nifédipine, TMB 8, bépridil, vérapamil) inhibent la photopolarisation, ce qui renforce les résultats similaires obtenus par Robinson avec les agents bloquants D600 et le Gd^{3+} (Love *et al.*, 1997; Robinson, 1996). Love propose que le calcium intracellulaire libre aurait un rôle majeur par rapport au calcium extracellulaire pour la

photopolarisation. Les différences observées entre *Pelvetia* et *Fucus* pourraient être dues à des variations dans leurs capacités pariétales à chélater le calcium, ce qui rendrait la déplétion de calcium plus difficile chez *Fucus*. En effet, la paroi des algues brunes contient des polymères d'acide guluronique, qui chélatent le calcium, et constitue de ce fait un stock non négligeable de calcium (Kloareg et Quatrano, 1988).

Les expériences citées ci-dessus, font état de la réponse calcique à la suite de l'illumination des zygotes mais ne permettent pas de déterminer si le calcium est nécessaire précocement au cours de la photopolarisation, c'est à dire lors de la formation de l'axe. Deux récents travaux viennent combler cette lacune. En réponse à la lumière, un agent bloquant fluorescent spécifique des canaux calciques, la dihydropyridine (DHP), se localise au pôle non éclairé des zygotes, et peut être repositionné lorsque l'orientation lumineuse est inversée, ce qui suggère que des canaux calciques sont relocalisés au pôle rhizoïdien durant la période de formation de l'axe (Shaw et Quatrano, 1996b). Néanmoins, des mesures électrophysiologiques de l'activité de canaux isolés ne révèlent aucune asymétrie dans la distribution des canaux calciques dans l'embryon de deux cellules et la DHP n'inhibe l'activité d'aucun de ces canaux (Taylor *et al.*, 1996; Taylor communication personnelle). Au moment de la formation de l'axe (1 h après application du vecteur lumineux) une élévation de calcium aurait lieu au site présomptif rhizoïdien (Pu et Robinson, 1998). Cependant, la méthode de quantification du calcium utilisée est indirecte (ratio-imaging à partir de deux sondes différentes) et d'autres expériences seraient nécessaires pour affirmer avec certitude qu'il existe un gradient de calcium lors de la formation de l'axe.

Quoiqu'il en soit, l'ensemble de ces résultats suggère que la calcium intra ou/et extracellulaire intervient dans le phénomène de photopolarisation. Toutefois, face à l'hétérogénéité des résultats et à l'absence de gradient calcique détectable pendant la formation, les auteurs s'accordent pour attribuer au calcium un rôle d'amplificateur plutôt que d'initiateur de la polarisation.

Une protéine apparentée à la calmoduline a été isolée chez *Pelvetia* et *Fucus* (Brawley et Roberts, 1989). Elle semble constituer un médiateur important du calcium lors de la polarisation mais son rôle dans la formation proprement dite reste controversé. Selon les

travaux de Love, la microinjection de calmoduline accentue la photopolarisation des zygotes *Fucus* tandis que les antagonistes de la calmoduline inhibent la photopolarisation (Love *et al.*, 1997). Pu rapporte, à l'inverse, qu'un antagoniste de la calmoduline différent favorise la photopolarisation mais inhibe la germination (Pu et Robinson, 1998). Il est donc trop tôt pour affirmer que le calcium agit *via* la calmoduline lors de la photopolarisation.

B.4. LA FIXATION DE L'AXE DE POLARITE

La fixation de l'axe a été initialement définie comme la période pré-germinatoire pendant laquelle le zygote ne répond plus aux changements d'orientation du vecteur lumineux et au cours de laquelle les phénomènes initiés lors de la formation (les courants transcellulaires, gradient de calcium et les sécrétions polarisées) s'amplifient (figure 4). Lors de la fixation, le site d'émergence du rhizoïde est déterminé, même si, plus tard, le rhizoïde en croissance continuera de s'orienter selon un phototropisme négatif. Ceci laisse présumer que la fixation de l'axe résulte du renforcement des interactions physiques au pôle rhizoïdien plutôt que d'une photodésensibilisation.

B.4.1. Le cytosquelette

Le cytosquelette d'actine a longtemps été considéré comme un acteur principal de la fixation de l'axe du fait que sa localisation au futur pôle rhizoïdien a été détectée initialement durant cette période (Brawley et Robinson, 1985). La cytochalasine B empêche la fixation de l'axe chez des zygotes dont l'axe est déjà formé, de sorte que les zygotes continuent de répondre à l'orientation du vecteur lumineux après le retrait de l'inhibiteur (Quatrano, 1973). Love rapporte, d'ailleurs, que seule la fixation de l'axe serait empêchée par les inhibiteurs de la polymérisation de l'actine. Cependant, il utilise des périodes d'incubation en cytochalasine bien plus longues lors des tests de fixation (7h) que lors des tests de formation (3h) (Love *et al.*, 1997). L'ensemble de ces résultats indique que le rôle essentiel des microfilaments d'actine pour la photopolarisation est maintenu au cours de la fixation de l'axe de polarité. Les microtubules, quant à eux, ne semblent pas intervenir au cours de la fixation de l'axe de polarité, puisque leur dépolymérisation n'a pas d'effet sur la germination (Brawley et Quatrano, 1979).

B.4.2. La paroi

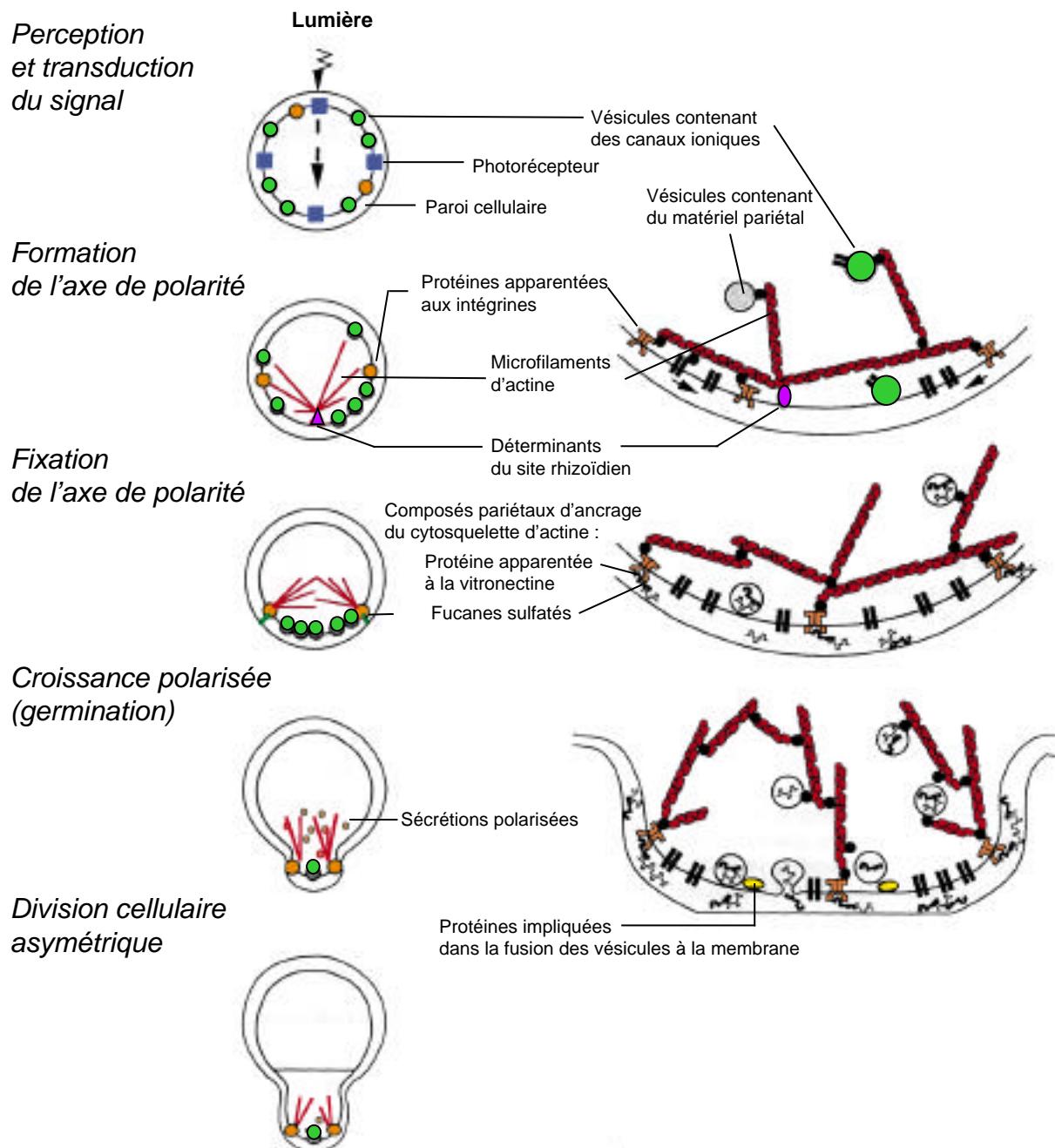
La digestion enzymatique de la paroi de jeunes zygotes de *Fucus* inhibe spécifiquement la fixation de l'axe. Les protoplastes sont capables d'enregistrer le signal lumineux et d'y répondre une fois qu'ils ont régénéré une paroi, mais, tant que la paroi est absente la réorientation de l'axe reste possible (Kropf *et al.*, 1988). Des pseudoprotoplastes de cellule thalle ou rhizoïdienne peuvent être obtenus par microchirurgie laser, à partir d'un embryon de deux cellules. Ces pseudoprotoplastes se développent en de nouveaux zygotes photopolarisables, ce qui démontre également le rôle primordial de la paroi dans l'ancrage et le maintien de la polarité, essentielle à la différenciation cellulaire (Berger et Brownlee, 1995). A l'inverse, une cellule isolée dans sa paroi ne perd pas sa polarité, ce qui confirme le rôle de la paroi dans le maintien de la polarité cellulaire (Bouget *et al.*, 1998)

B.4.3. Les sécrétions polarisées et l'asymétrie pariétale

Quelles sont les molécules impliquées dans les interactions membrane-paroi et quels sont leurs rôles? Ces questions firent l'objet de nombreuses investigations, qui conduisirent à l'élaboration d'un modèle de travail. Ce modèle propose qu'un complexe de stabilisation de l'axe servirait de relais structural et informationnel entre la paroi et le milieu intracellulaire (Quatrano, 1990) (figure 5). Ce modèle est inspiré des adhésions focales dans les cellules animales et du complexe mis en place dans les levures lors des phénomènes de bourgeonnement et de conjugaison (Craig et Jonhson, 1996; Cid *et al.*, 1995). En effet, ces deux situations sont phénoménologiquement proches de la polarisation du zygote de *Fucus* et impliquent, elles aussi, la localisation du cytosquelette d'actine, l'exocytose dirigée de vésicules au site de polarisation et l'intervention de la matrice extracellulaire.

Chez le zygote de *Fucus*, des fucanes très sulfatés sont incorporés dans la paroi rhizoïdienne lors de fixation de l'axe de polarité (environ 2 h avant la germination). De ce fait, ces molécules furent considérées comme de bons candidats pour assumer le rôle d'ancrage de la polarité (Goodner et Quatrano, 1993). En effet, lorsque la fixation de l'axe est inhibée par la cytochalasine B ou par un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide, ces composés sulfatés ne se localisent pas alors que la seule inhibition de la germination en milieu hypertonique permet leur localisation (Novotny et Forman, 1974). De plus, des zygotes cultivés

Figure 5 : Modèle de l'établissement de la polarité zygotique : le complexe de stabilisation de l'axe



A gauche : Processus global de polarisation. A droite : Détail des événements moléculaires se produisant au pôle rhizoïdien. Durant la formation de l'axe, le site rhizoïdien est sélectionné. La polarisation du cytosquelette d'actine à ce site permet le transport polarisé de vésicules contenant des canaux ioniques, dont les canaux calciques responsables de l'augmentation de calcium du pôle rhizoïdien. Le Ca^{2+} favorise la polymérisation de l'actine. D'autres molécules, comme les intégrines, la vitronectine et les fucanes sulfatés, sont mises en place par exocytose dans la membrane et la paroi du pôle rhizoïdien. Elles permettent l'amplification de la polarisation et l'ancrage du cytosquelette au pôle rhizoïdien (Fixation de l'axe). *D'après Goodner et Quatrano, 1993.*

en eau de mer sans sulfate, qui ne présentent pas de localisation de molécules sulfatées, gardent un aspect sphérique mais se divisent. Cependant, ces zygotes adhèrent mal au substrat, et de ce fait après retour en eau de mer normale, l'orientation de leur germination ne renseigne pas sur leur capacité à se polariser durant le traitement. Shaw et Quatrano (1996a) ont montré que, chez *Fucus*, l'inhibition des sécrétions par la BFA empêche la localisation des composés sulfatés et également la fixation de l'axe, et soutiennent l'hypothèse selon laquelle des molécules sécrétées, dont les composés sulfatés, auraient un rôle important pour la fixation de l'axe de polarité. L'ensemble de ces résultats a tout naturellement conduit à l'hypothèse que les fucanes sulfatés localisés au pôle rhizoïdien, par une exocytose dirigée dépendante des filaments d'actine, seraient des acteurs essentiels de la fixation de l'axe. Les composés sulfatés sont de ce fait couramment utilisés comme marqueurs de la fixation de l'axe (figure 5).

Toutefois, Crayton et collaborateurs montrèrent, dans une étude isolée, que les zygotes cultivés en eau de mer sans sulfate mais supplémentée en méthionine, manquent d'adhérence mais peuvent se photopolariser et germer bien qu'ils ne contiennent pas de fucanes sulfatés dans leur paroi (Crayton *et al.*, 1974). Ces embryons ne "produisent pas de rhizoïde allongé d'embryons typiques, mais se développent en embryons globulaires non adhérents" (Wagner *et al.*, 1992). Des expériences, que nous avons réalisées en collaboration avec C. Brownlee, nuancent également le rôle essentiel attribué aux fucanes sulfatés lors de la fixation de l'axe (résultats non publiés). Nous avons pu constater que des zygotes cultivés en eau de mer sans sulfate, mais dont l'adhésion est favorisée par la polylysine, ne germent pas mais forment et fixent un axe de polarité. La polarisation, bien que retardée, s'effectue donc en l'absence de localisation de composés sulfatés au pôle rhizoïdien. Nous avons obtenu des résultats similaires en inhibant la sulfatation avec des inhibiteurs de la sulfatation des polyphénols (dichloronitrophénol et le pentachlorophénol). De plus, nous avons observé que la localisation pariétale des polyphénols, au cours du développement normal, est identique à celle des composés sulfatés lors des différents traitements. Quelle que soit la nature des composés sulfatés, il apparaît donc qu'ils joueraient un rôle dans la morphogenèse rhizoïdienne et non dans la fixation de l'axe de polarité. L'inhibition de la fixation de l'axe par la BFA empêcherait donc la mise en place d'autres molécules clé pour l'ancrage de la polarité, qui restent à identifier.

B.4.4. Les acteurs du continuum paroi-membrane-cytosquelette

D'autres tentatives pour isoler des molécules faisant partie du complexe-relais entre le cytosquelette d'actine et la paroi ont été réalisées. Ainsi, des protéines reconnues par des anticorps anti-vitronectine, anti-vinculine et anti- β -intégrine ont été mises en évidence dans les extraits d'embryons de deux cellules (figure 5) (Quatrano *et al.*, 1991). L'anticorps anti-vitronectine directement ajouté aux cultures de zygotes aurait un effet inhibiteur sur leur capacité d'adhésion et sur le maintien de la polarité mais non sur son établissement. L'immuno-détection *in situ* suggère que la protéine reconnue par cet anticorps serait localisée dans la paroi rhizoïdienne de l'embryon de deux cellules (Wagner *et al.*, 1992). Les tentatives d'identification d'un gène codant la vitronectine ont échoué. Par la suite, Henry et collaborateurs (1996) mirent en évidence que l'actine est localisée aux sites de fortes interactions entre le plasmalemme et la paroi dans la pointe rhizoïdienne. Le nombre de ces interactions apparaît plus faible lorsque les zygotes sont incubés en présence de peptides RGDS qui correspondent à la séquence consensus de liaison des molécules, telle que la vitronectine, aux intégrines (Henry *et al.*, 1996). Ces résultats, quoiqu'encourageants, concernent l'embryon germé et il n'est pas possible d'affirmer avec certitude que ce type d'interaction plasmalemme-paroi est essentiel à la fixation de l'axe de polarité et de conclure quant à la nature exacte des molécules impliquées.

B.5. MODELE DE LA POLARISATION ZYGOTIQUE

Si de nombreux acteurs de la polarisation ont été identifiés, le mécanisme initial par lequel l'asymétrie environnementale est traduite en une asymétrie cytologique et physiologique reste mal comprise. Néanmoins, la localisation de l'actine apparaît être prépondérante (figure 4 et 5). Le cytosquelette d'actine, essentiel tout au long de la polarisation, servirait, notamment, à orienter les sécrétions polarisées. Lors de la formation de l'axe, l'exocytose de vésicules au pôle rhizoïdien pourrait être responsable de la mise en place localisée de canaux calcium. Il est également envisageable qu'une activation précoce et localisée de canaux calciques s'opère au pôle rhizoïdien et participe à la création d'un courant transcellulaire entrant au pôle rhizoïdien et sortant au pôle thalle. L'élévation de calcium favoriserait la polymérisation de l'actine ainsi que l'exocytose au pôle rhizoïdien et agirait donc en boucle d'amplification positive. L'exocytose de

protéines d'adhésion et de pontage, et de polyphénols sulfatés, permettrait d'ancrer les interactions cytosquelette-paroi. Simultanément, la mise en place de composés sulfatés au pôle rhizoïdien, serait à l'origine d'une modification des propriétés pariétales permettant l'émergence ultérieure du rhizoïde.

Les synthèses d'ARNm et protéiques ont lieu avant la période photosensible ce qui suggère que les phénomènes impliqués dans la polarisation sont régulés par voie post-traductionnelle (Quatrano 1968; Kropf *et al.*, 1989). Les ARNm sont localisés au pôle thalle dès la fixation de l'axe mais la signification biologique de cette localisation, qui est dépendante des microfilaments d'actine, n'est pas connue (Bouget *et al.*, 1995).

B.6. LA GERMINATION

L'affaiblissement mécanique de la paroi et l'exocytose accrue de vésicules au pôle rhizoïde permettent l'émergence d'une protubérance qui correspond à la naissance du rhizoïde. A son apex, les microfilaments d'actine et le gradient de calcium intracellulaire sont aisément détectés (Brownlee et Wood, 1986; Kropf et Quatrano, 1987). Le gradient de calcium est nécessaire à la croissance apicale du rhizoïde. Les concentrations calcique atteignent $1\mu\text{M}$ à la pointe rhizoïdienne. L'injection de chélateurs de type BAPTA et la réduction des concentrations extracellulaires de calcium inhibent la croissance rhizoïdienne (Speksnijder *et al.*, 1989). Des phénomènes calciques similaires et d'égale importance se retrouvent dans l'élongation du tube pollinique (Rathore *et al.*, 1991; Miller *et al.*, 1992). Le calcium stabilise la polymérisation des microfilaments d'actine et favorise l'exocytose de vésicules à l'apex.

Les courants transcellulaires s'accentuent lors de la germination, atteignant environ 100 pA (Nuccitelli et Jaffe, 1974). Ils résultent d'un influx de Ca^{2+} , K^+ , Na^+ et d'un efflux de Cl^- au pôle rhizoïde ainsi que d'un efflux des même ions au pôle thalle (Jaffe et Nuccitelli, 1974; Robinson et Jaffe, 1974). Dans l'embryon germé, ces courants sont dépendants de l'intégrité du cytosquelette d'actine. Il a été proposé que l'augmentation du courant transcellulaire résulte de la mise en place de nouveaux canaux ioniques par exocytose (Brawley et Robinson, 1985).

Dans les heures qui suivent, la polarisation cytologique de l'embryon se prononce : le rhizoïde se charge en mitochondries et possède une machinerie sécrétoire très développée

(Golgi et vésicules abondantes) alors que le pôle thalle présente de nombreux chloroplastes (Quatrano, 1972; Brawley *et al.*, 1977). La ségrégation artificielle des organites par centrifugation avant la germination, montre que le pôle thalle se développe du côté où les chloroplastes se sont accumulés (Beams, 1937; Whitaker, 1940). Néanmoins, la violence d'un tel traitement implique la perturbation de nombreux phénomènes et ne permet pas de conclure sur le rôle de la répartition des organites dans l'établissement de la polarisation. La localisation des organites au sein du zygotes, refléterait plutôt la spécification de deux pôles qui, à la suite de la première division cellulaire, sont isolés l'un de l'autre. Chacune des cellules filles adopte un mode de croissance et une physiologie propre aux fonctions des tissus auxquels elle donnera naissance.

B.7. LA DIVISION

La division asymétrique est non seulement l'aboutissement de la polarisation mais surtout celle du premier cycle cellulaire sur lequel il n'existe que très peu de données. Les oosphères se trouvent en phase G_1 du cycle cellulaire et contiendraient 32 chromosomes (Evans, 1962). Motomura soupçonne la nécessité d'un facteur localisé dans le pronucleus femelle pour la réplication de l'ADN, et d'un facteur cytoplasmique de type MPF (M-phase Promoting Factor), dont l'activité maximale en milieu de métaphase permettrait la réalisation de la mitose (Motomura, 1995). La situation temporelle des événements pré-mitotiques du cycle cellulaire n'était jusqu'à ce jour pas connue (article I, II, III).

La mitose a lieu juste après la germination (16-20 h AF) alors que la cytodiéthèse s'effectue entre 20-24 h AF (revue par Kropf, 1992). Le moment de la première division est bien mieux conservé, au sein d'une même espèce, entre des lots de zygotes dans des états physiologiques différents et même entre les genres *Fucus* et *Pelvetia*, que ne le sont les phénomènes de polarisation, ce qui suggère l'existence d'une horloge interne.

B.7.1. La mitose

Séparation des centrosomes et rotation nucléaire

Les centrioles des centrosomes proviennent des corpuscules basaux des flagelles de l'anthéozoïde (Motomura, 1994; Bisgrove *et al.*, 1997). A la suite de la caryogamie, les centrosomes viennent s'accorder à l'enveloppe nucléaire en un même site (Nagasato *et al.*, 1999). Les microtubules émanent à partir de la périphérie nucléaire et présentent une distribution radiale homogène. Leur nombre s'accroît au fur et à mesure du développement (Kropf *et al.*, 1990). En début de mitose, les microtubules interphasiques disparaissent et les centrosomes deviennent les centres de nucléation des microtubules (centre organisateurs des microtubules MtOC) (Allen et Kropf, 1992). Ils migrent lentement et de manière asynchrone pour se placer en position diamétralement opposée autour du noyau selon une orientation aléatoire par rapport à l'axe de polarité (figure 4) (Nagasato *et al.*, 1999; Motomura, 1994). Les MtOC s'alignent alors avec l'axe de polarité, par un mécanisme dépendant des microtubules et de l'actine, provoquant une rotation du noyau (Kropf *et al.*, 1990; Allen et Kropf, 1992; Bisgrove et Kropf, 1998). De ces MtOC émanent des microtubules qui s'allongent vers le pôle rhizoïdien et fourniraient la force motrice principale nécessaire à la rotation nucléaire (Allen et Kropf, 1992). L'actine corticale ne servirait que de point d'ancrage des microtubules. La rotation nucléaire permet d'orienter le plan de la première division asymétrique perpendiculairement à l'axe de polarité. Les agents dépolymérisants des microtubules, les inhibiteurs de la polymérisation de l'actine et les inhibiteurs des sécrétions polarisées conduisent à l'altération de l'orientation du plan de division (Allen et Kropf, 1992; revue par Quatrano et Shaw, 1997). Ceci suggère que l'organisation polaire des microtubules au moment de la germination, qui est retrouvée à la pointe rhizoïdienne lors de la croissance apicale, dépendrait du continuum actine-membrane-paroi établi au moment de la fixation de l'axe (Bisgrove et Kropf, 1998).

Division nucléaire

Motomura (1994) décrit de manière très détaillée les événements de mitose observés en microscopie électronique. Il complète, confirme ou rectifie les observations précédentes (Farmer et Williams, 1896; Yamanouchi 1909; Brawley *et al.*, 1977). La mitose est semblable à celle des autres algues brunes (Markey et Wilce, 1975; La Claire, 1982; Ktsaros et Galatis 1992). La prophase est initiée par la condensation du matériel nucléaire et la nucléation des asters à chaque pôle du futur fuseau. Une discontinuité dans la membrane nucléaire apparaît

tardivement, principalement aux pôles du fuseau et s'accentuera jusqu'en fin de métaphase. Lors de la métaphase, les chromosomes s'alignent sur le plan équatorial du fuseau qui s'est formé progressivement par polymérisation des microtubules. Des microtubules interconnectent les deux pôles, (microtubules polaires) et d'autres se terminent sur des structures kinétochoriennes des chromosomes (microtubules kinétochoriens). Les microtubules émanant vers le cytoplasme se raccourcissent (microtubules astraux). L'anaphase correspond à la séparation des chromatides soeurs vers chacun des pôles de la cellule, phénomène qui s'accompagne de la réapparition de microtubules irradiant des MtOC vers le cytoplasme. En télophase, la membrane nucléaire se reforme autour des nuclei dans lesquels la chromatine se décondense et le nucléole apparaît. Ces nuclei sont pourvus chacun d'une paire de centrioles.

B.7.2.La cytodiérèse

La cytodiérèse s'effectue par un mécanisme faisant probablement intervenir d'avantage l'actine que les microtubules. En effet, l'actine est localisée au plan de division alors que les microtubules n'y sont pas détectés (Brawley *et al.*, 1977). Cependant, le clivage n'est pas inhibé mais simplement retardé par de faibles concentrations de cytochalasine (Quatrano, 1973). L'actine est supposée être responsable de l'accumulation de chloroplastes au plan de division où s'accumulent également de nombreuses vésicules golgiennes (Brawley *et al.*, 1977). L'initiation du clivage centripète n'est pas bien comprise, mais la fusion de vésicules participerait à la formation des membranes et de la paroi intermédiaire. Le réticulum endoplasmique rugueux et l'appareil de Golgi se développent entre les deux noyaux. L'actine, sous forme de collier au plan de clivage, ne se contracte pas et persiste très longtemps après la division. Les transcrits d'actine sont également localisés au niveau de ce collier et contribuent très probablement à la localisation de l'actine à ce site (Bouget *et al.*, 1996). Le rôle de l'actine dans le clivage cellulaire reste à préciser. La cytodiérèse de *Fucus* diffère donc de la cytodiérèse végétale où, avant l'achèvement de la mitose, les microtubules et microfilaments forment transitoirement un réseau dense (la bande préprophasique) qui marque le futur site de division tandis que, les microtubules organisent le phragmoplaste au centre de la cellule et permettent un clivage centrifuge (Staehelin et Hepler, 1996).

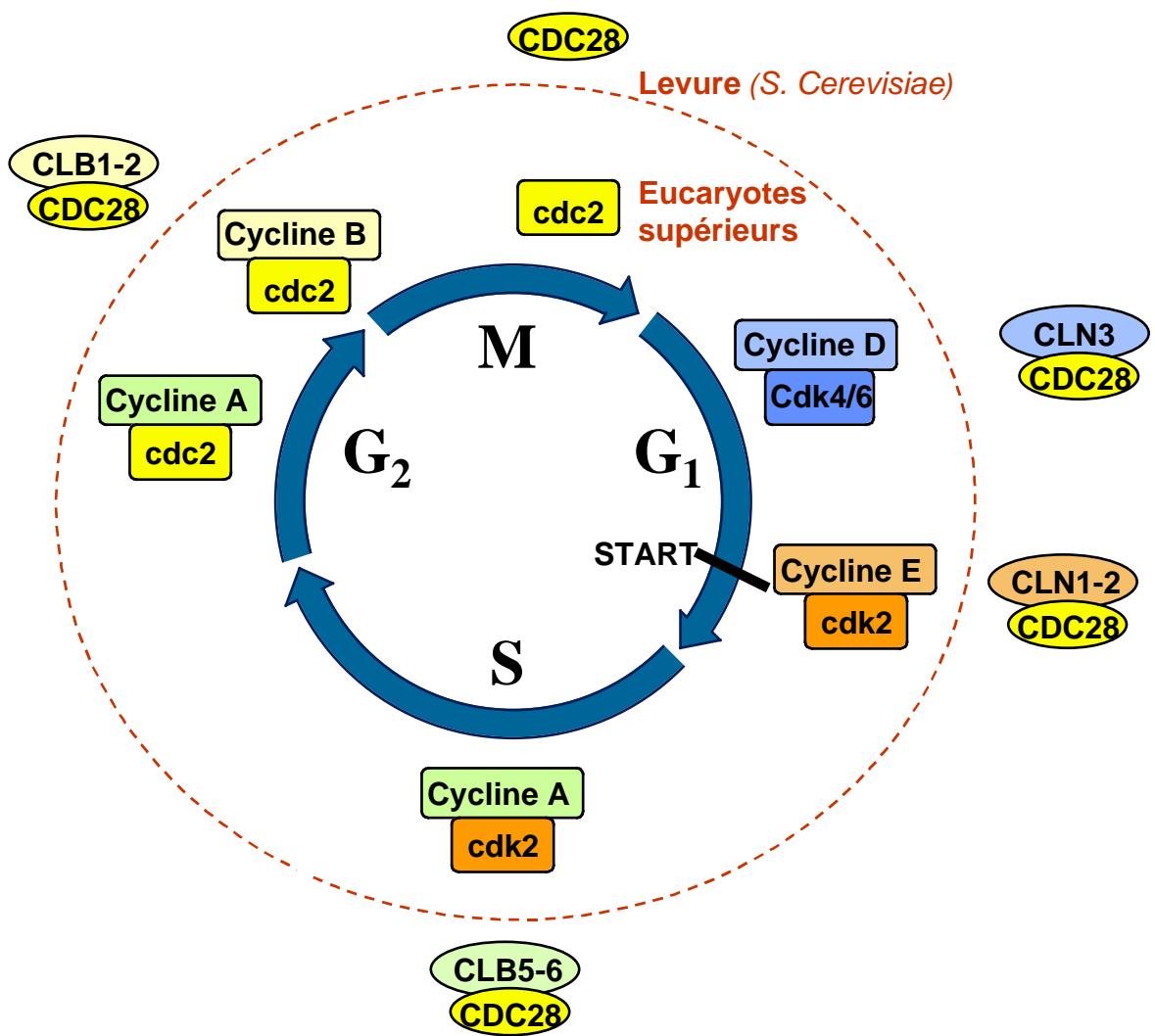
II. LE CYCLE CELLULAIRE

Le cycle de division cellulaire est le moyen fondamental par lequel les êtres vivants se propagent : chez les espèces unicellulaires, chaque division produit un nouvel organisme, tandis que chez les espèces pluricellulaires, des profils complexes de divisions permettent de créer et de maintenir un nouvel organisme.

A. LES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE

La transmission fidèle de l'information génétique de la cellule mère aux cellules filles requiert le déroulement séquentiel et le contrôle strict des événements de réplication de l'ADN (phase de synthèse ou S) et de ségrégation des chromosomes (phase de mitose ou M). Ces phases sont généralement précédées de phases préparatrices appelées "Gap" (G) pour espace (figure 6). En G_1 , les facteurs environnementaux et physiologiques, qui sont intégrés par la cellule, permettent ou non l'entrée en phase S (disponibilité en nutriments, mitogènes, hormones, augmentation de masse cellulaire, lumière pour les cellules végétales). Ces facteurs n'influencent la cellule que pendant une période définie de la phase G_1 , de telle sorte que lorsque les conditions sont favorables, la cellule s'engage irréversiblement dans le cycle de division. Ainsi, au delà de cette transition appelé START (pour les levures) ou point de restriction (R) chez les eucaryotes supérieurs, la cellule achève son cycle cellulaire indépendamment des facteurs exogènes (revue par Planas-Silva et Weinberg, 1997). En revanche, lorsque les conditions ne sont pas favorables à la division, les cellules somatiques peuvent entrer réversiblement dans un état quiescent qui définit la phase G_0 . Durant la phase S, les chromatides soeurs sont néo-synthétisées. Pendant la phase G_2 , la masse cellulaire peut continuer de s'accroître et les acteurs nécessaires à la mitose sont élaborés. La mitose correspond à un remaniement extrême du noyau, menant à la séparation des chromatides soeurs qui constitueront le support de l'information génétique des cellules filles. La mitose se déroule en cinq grandes étapes, la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la

Figure 6 : Les différents complexes CDK/cyclines intervenant lors de la progression dans le cycle cellulaire



Description dans le texte principal

télophase, comme nous l'avons précédemment décrit chez *Fucus* (I-B.7.1). L'enveloppe nucléaire se désagrège, les chromosomes se condensent et le fuseau mitotique se met en place. Après la séparation des chromatides soeurs, les noyaux fils s'individualisent et la cytodiérèse a lieu. La durée d'un cycle est très variable selon le type de cellule et l'organisme. Les variations les plus importantes concernent la phase G₁. La durée d'un cycle est de 8 minutes pour une cellule embryonnaire de drosophile et de 24 h pour une cellule somatique de mammifère (Murray et Hunt, 1993).

B. LES KINASES DEPENDANTES DES CYCLINES ASSURENT LA PROGRESSION DANS LE CYCLE CELLULAIRE

B.1. IDENTIFICATION

L'identification des premières kinase dépendantes des cyclines (CDK) et de leur fonction est le résultat d'approches biochimiques et génétiques complémentaires, effectuées respectivement sur l'oeuf de xénope et la levure. Des études cellulaires démontrent l'existence d'un facteur capable de déclencher la maturation ovocytaire chez le xénope (Rao et Johnson, 1970; Masui et Markert, 1971). Ce facteur fut ultérieurement identifié comme étant responsable de la phase M (méiose et mitose) dans toutes les cellules eucaryotes et baptisé "M phase promoting factor" (MPF) (revue par Kishimoto, 1988). Parallèlement, l'approche génétique permit d'isoler des mutants de levure *cdc* (pour "cell cycle division") (Hartwell, 1974; Nurse *et al.*, 1976; Nasmyth et Nurse, 1981; Beach *et al.*, 1982) et conduisit à l'identification du gène *cdc2* chez *Schizosaccharomyces pombe* et de son homologue *CDC28* chez *Saccharomyces cerevisiae*. Les mutants *cdc2* et *CDC28* sont arrêtés en G₁ et en phase M, ce qui suggère que les CDK sont impliquées tant dans l'entrée en phase S que dans la progression mitotique (Nurse et Bisset, 1981; Beach *et al.*, 1982).

La caractérisation biochimique du MPF conduit à identifier un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique de 34 kDa, qui est codée par le gène homologue *cdc2* et possède une activité kinasique spécifique des résidus serine et thréonine (S/T kinase) (Dunphy *et al.*,

1988; Gautier *et al.*, 1988) et d'une protéine, dont la concentration fluctue au cours du cycle (Evans *et al.*, 1983; Murray, 1989; Gautier *et al.*, 1990). Cette protéine, qui reçut le nom de cycline, s'accumule en interphase pour atteindre un niveau maximum en mitose, puis décroît rapidement en fin de mitose (revue par Hunt, 1989). L'activité du MPF est directement corrélée à l'abondance de cette cycline qui représente donc une sous-unité régulatrice positive. Le MPF est un des représentants d'une famille hétérodimérique de S/T kinases appelées Kinases Cyclines-Dépendantes (CDK pour Cyclin-Dependent Kinase).

De nombreux gènes homologues de *cdc2* furent identifiés par la suite chez les eucaryotes supérieurs (Lehner et O'Farrell, 1990; Paris *et al.*, 1991; Meyerson *et al.*, 1992). Les protéines codées par ces gènes sont des S/T kinases qui possèdent une masse moléculaire de l'ordre de 34 à 40 kDa. Elles présentent, entre elles, 36 à 65% d'identité de séquence (Meyerson *et al.*, 1992; Pines, 1995). Le site catalytique, de 300 acides aminés, contient un motif conservé de liaison à la cycline "PSTAIRE" (cdk1, cdk2, cdk3) ou divergent (cdk4 : PSTVRE, cdk 5 : PSSALRE). L'association à une cycline n'a pas été démontrée pour d'autres protéines apparentées à *cdc2*, qui possèdent un motif PSTAIRE ou divergent, mais ces protéines sont tout de même dénommées CDK.

B.2.DIFFERENTS COMPLEXES CDK/CYCLINES INTERVIENNENT AU COURS DES PHASES DU CYCLE CELLULAIRE

Chez les levures, il n'existe qu'une seule sous-unité catalytique (*cdc2/CDC28*) à laquelle s'associent des cyclines spécifiques, selon la phase du cycle, conférant ainsi à la kinase sa spécificité (Stern et Nurse, 1996; Mendenhall et Hodge, 1998) (figure 6). On distingue classiquement les cyclines de G_1 (CLN) et les cyclines mitotiques (CLB). Chez les eucaryotes supérieurs, la multiplicité des cyclines s'ajoute à celle des kinases, mais les possibilités de combinaison restent réduites car il existe une spécificité entre les sous-unités catalytiques et les cyclines, et la majorité des cyclines n'apparaissent que transitoirement au cours de certaines phases (Pines, 1995). Ainsi, les cyclines D et E interviennent exclusivement en phase G_1 et en phase S précoce et ne peuvent s'associer avec cdk1 (homologue de *cdc2*) qui intervient en fin de phase G_2 et en mitose. En activant des substrats spécifiques, *via* des cascades de

phosphorylation, les différents complexes CDK/cyclines permettent la progression de la cellule à travers les différentes étapes du cycle cellulaire (figure 6).

B.2.1. Contrôle de la phase S

L'inhibition des CDK de G₁ empêche la réplication de l'ADN dans la plupart des systèmes biologiques. Les CDK contrôlent au moins deux événements essentiels à la transition G₁/S : elles activent la transcription de gènes nécessaires à la phase S ainsi que celle des gènes codant les protéines nécessaires à l'empaquetage de l'ADN, et régulent directement la mise en place des complexes d'initiation de la réplication (revue par Heichman et Roberts, 1994; Sherr, 1994; Chevalier et Blow, 1996).

Les CDK de phase G₁ phosphorylent la protéine du rétinoblastome (Rb) et les protéines apparentées p107 et p130, ce qui permet la libération des facteurs de transcription (E2F/ DP1) liés à ces protéines, facteurs qui contrôlent l'expression de protéines requises pour la phase S (figure 8) (Müller, 1995). Les complexes cdk4-6/cyclines D et le complexe cdk2/cycline E interviennent dans la phosphorylation de Rb (Sauer et Lehner, 1995). Les complexes cdk2/cycline A sont responsables de la phosphorylation inactivatrice des facteurs de transcription E2F/DP1, et contrôlent ainsi la durée de la phase S (Krek *et al.* 1994; Xu *et al.*, 1994).

Les CDK de phase S sont colocalisées aux sites de réplication avec les protéines de la réplication comme RP-A (Cardoso *et al.*, 1993). Elles activeraient le désenroulement de l'ADN (Adachi et Laemmli, 1994) et favoriseraient, ainsi, l'association des complexes d'initiation de la réplication aux origines de réplication contenant de l'ADN désenroulé (Roberts, 1993). En effet, des expériences utilisant le virus oncogène SV40 montrent que les CDK activent la fonction topoisomérase de l'antigène T. L'étude de la réplication, chez *S. cerevisiae*, a conduit à l'identification de complexes macromoléculaires (ORC pour Origin of Recognition Complexes), qui reconnaissent les origines de réplication (ARS pour Autonomous Replicative Sequence), dont l'importance est fondamentale pour le déroulement correct de la phase S (revue par Heichman et Roberts, 1994). Certaines sous-unités des ORC, ainsi que de nombreux produits de gènes impliqués dans la régulation des ORC (dont CDC6) possèdent des sites de phosphorylation potentiels pour CDC28. Cependant, les mécanismes de régulation de ces

protéines par les CDK ne sont toujours pas clairement établis. Récemment, il a été montré que la localisation intracellulaire de CDC6, composant essentiel à la réplication, dépend de sa phosphorylation par le complexe cdk2/cycline A (Petersen *et al.*, 1999).

Les CDK assurent également que la réplication n'ait lieu qu'une seule fois par cycle. Ainsi, chez *Schizosaccharomyces pombe*, certaines mutations de *cdc2* ou *cdc13* (qui code la cycline mitotique), conduisent à une re-réplication de l'ADN sans qu'il n'y ait eu de mitose (Broek *et al.*, 1991; Hayles *et al.*, 1994). L'ensemble des données actuelles indiquent que les CDK mitotiques empêcheraient l'accumulation ou l'activation nucléaire de facteurs requis pour le réétablissement des complexes de préréplication en phase G₂ (revue par Chevalier et Blow, 1996).

B.2.2. Contrôle de la mitose

L'activité des CDK mitotiques est essentielle à l'entrée en mitose. Elle est responsable de la rupture de l'enveloppe nucléaire, de la condensation des chromosomes et de la mise en place du fuseau mitotique (revue par Kishimoto, 1994). Bien que de nombreux substrats de *cdc2* soient identifiés *in vitro* (Nigg, 1991), la complexité des événements et des inter-régulations survenant *in vivo* rend la compréhension de la fonction directe des CDK dans les événements mitotiques difficile. Je me cantonnerai donc à illustrer le rôle des CDK par des exemples simples.

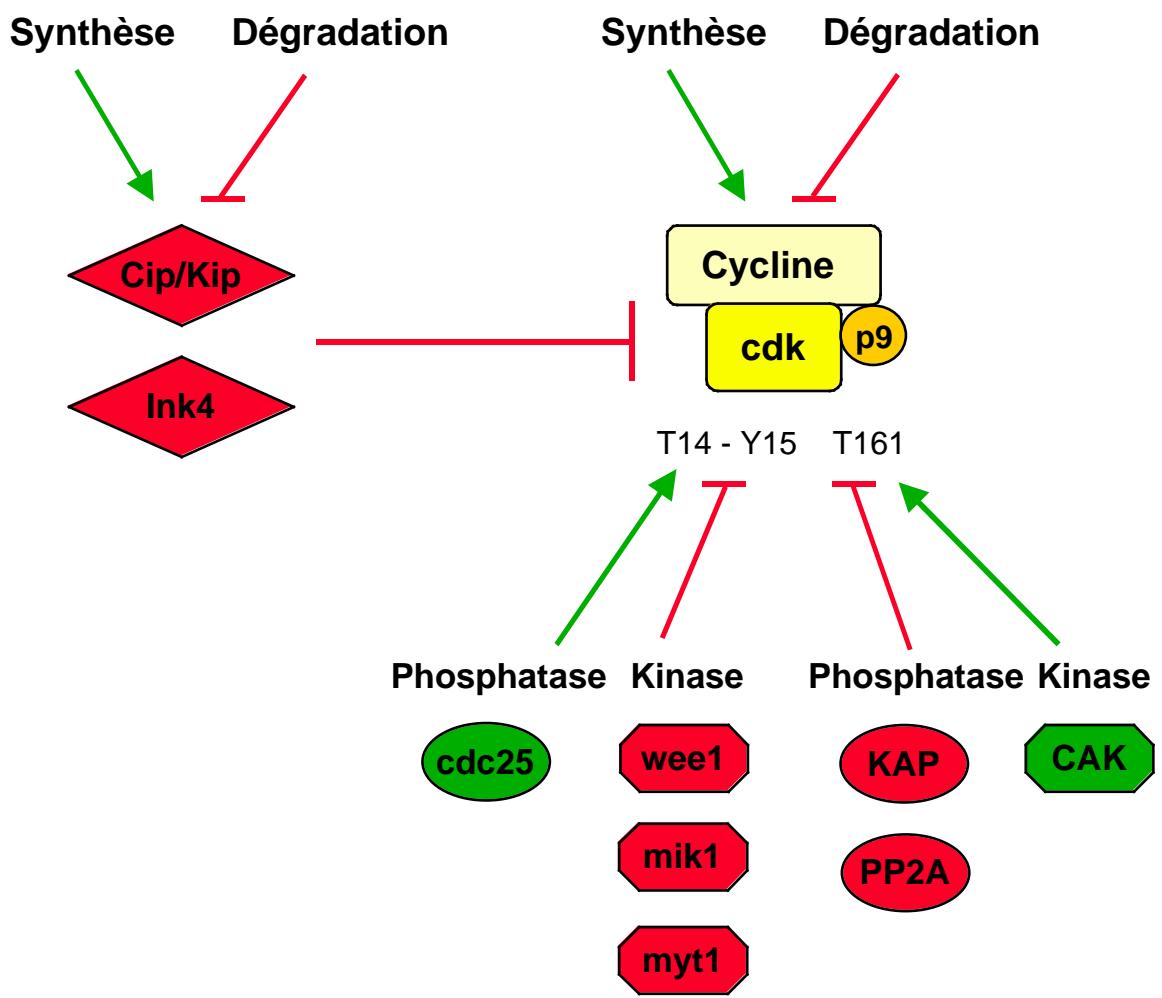
L'hyperphosphorylation des lamines nucléaires, substrats de *cdc2* *in vitro*, favoriserait la désagrégation de l'enveloppe nucléaire (Peter *et al.*, 1990). La condensation des chromosomes résulte, en partie, de la modification des interactions de l'ADN et des protéines de liaison à l'ADN, telles que l'histone H1 et les protéines HMG (High Mobility Group) (Roth et Allis, 1992; Schwanbeck et Wisniewski, 1997), qui sont substrats de *cdc2* en mitose (Arion *et al.*, 1988; Labbé *et al.*, 1989; Meijer *et al.*, 1991). *In vivo*, la phosphorylation de l'histone H1 permettrait l'accès à la chromatine des facteurs directement impliqués dans la condensation des chromosomes (revue par Kishimoto, 1994). La topoisomérase II, qui est phosphorylée directement par *cdc2* et/ou par la caséine kinase II (CKII), elle-même substrat de *cdc2*, agit positivement sur la condensation des chromosomes (Mulner-Lorillon *et al.*, 1990; Cardenas *et al.*, 1992; Wells et Hickson, 1995).

La nucléation du fuseau mitotique au niveau des centrosomes et la réorganisation des microtubules sont également régulées par cdc2 (Verde *et al.*, 1990). La dynamique des microtubules fait intervenir des phosphorylations inhibitrices des protéines associées aux microtubules (MAP), auxquelles cdc2 participe. Les MAP sont des protéines qui stabilisent la polymérisation des microtubules interphasiques et leur inhibition favorise la mise en place du fuseau mitotique (Kishimoto, 1994). D'autre part, le complexe cdc2/cycline B régule, par lui-même, son inactivation, nécessaire à la sortie de mitose, en activant la dégradation de sa sous-unité régulatrice positive, la cycline B (revue par Morgan, 1999). La nécessité de cette inactivation est illustrée par le fait que cdc2/cycline B régule négativement la protéine CENP-E, apparentée à la kinésine, qui permet l'association des kinétochores aux microtubules et, par là-même, la séparation des chromosomes en anaphase (Liao *et al.*, 1994). Tant que cdc2/cycline B est actif, la transition métaphase-anaphase ne peut donc pas avoir lieu. La diminution de l'activité kinase du complexe permettrait également, la décondensation des chromosomes et la formation des nouvelles enveloppes nucléaires (King *et al.*, 1996). Lors de la cytodiérèse des cellules animales, la contraction du cytoplasme se fait par un mécanisme dépendant de la myosine et des microfilaments d'actine. La phosphorylation de la myosine par cdc2 constituerait un des mécanismes par lesquels la cytodiérèse serait retardée jusqu'à l'inactivation du MPF (Satterwhite *et al.*, 1995).

B.3. REGULATION DES CDK

La régulation de la synthèse des CDK constitue un moyen sûr, mais néanmoins lent, pour contrôler l'activité CDK au cours d'événements rapides du cycle. Aussi, les CDK sont-elles majoritairement soumises à des mécanismes de régulation post-traductionnelle. L'association des CDK aux cyclines, constitue la base de la régulation des CDK, à laquelle s'ajoute une régulation par phosphorylation (revue par Morgan, 1995). Ces phosphorylations, activatrices et inhibitrices, s'inscrivent généralement dans le cadre de boucles de rétrocontrôle positif qui permettent une amplification rapide des phénomènes. Enfin, l'intervention d'inhibiteurs de CDK (CKI pour Cyclin-dependent Kinase Inhibitor) qui agissent principalement sur les CDK de G₁, affine encore le contrôle de l'activité CDK (figure 7).

Figure 7 : Régulation des complexes CDK/cycline



Description dans le texte principal.

B.3.1. Structure tridimensionnelle

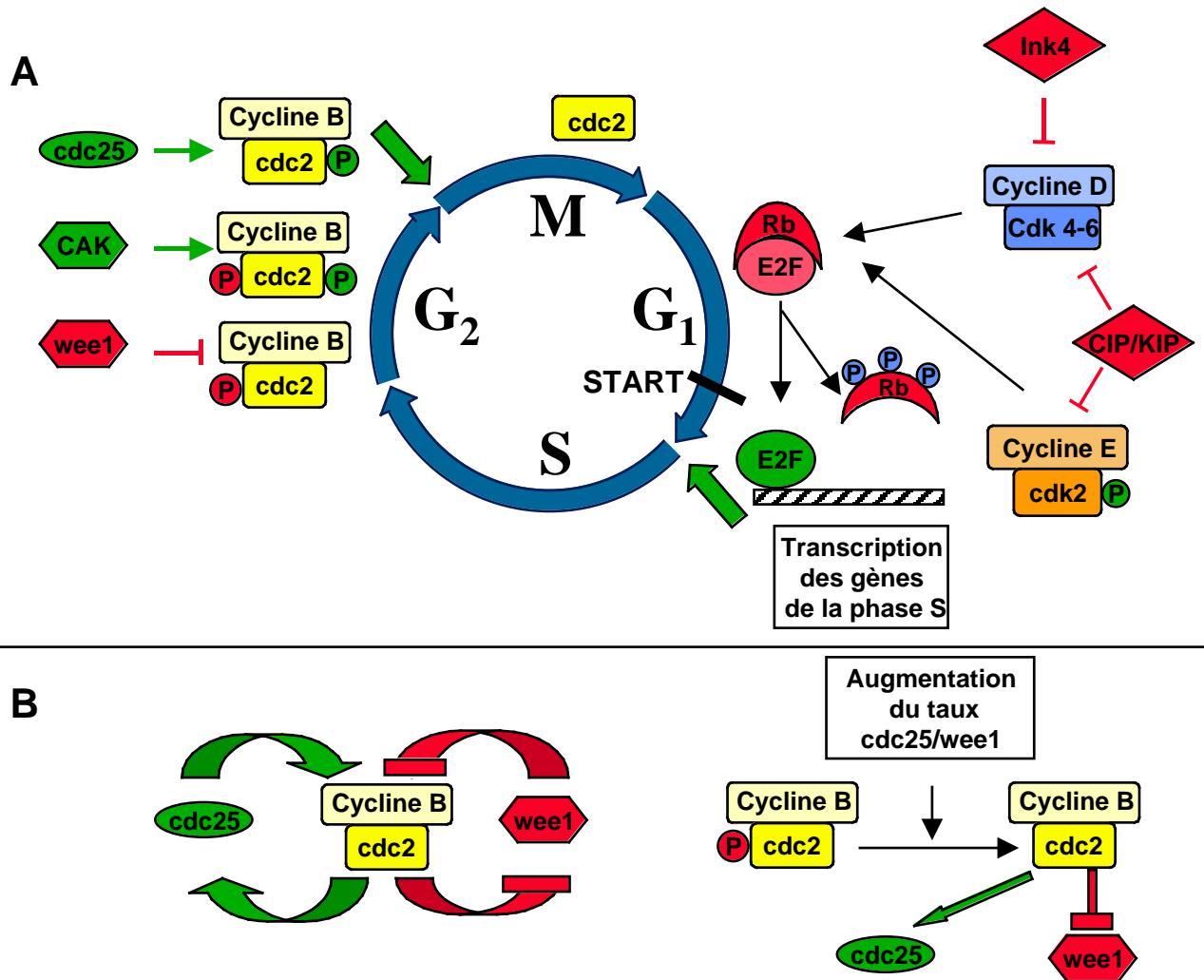
Les CDK possèdent une structure tridimensionnelle très conservée qui permet de mieux appréhender leur régulation. La poche catalytique de la kinase se situe entre deux lobes et comprend le site de fixation de l'ATP et de liaison au substrat. Lorsque la CDK est sous forme monomérique, l'orientation du site de fixation de l'ATP est défavorable au transfert de phosphate. L'accès de ce site est bloqué par une large boucle (T loop) (De Bondt *et al.*, 1993; Jeffrey *et al.*, 1995). Les CDK possèdent des résidus très conservés qui peuvent constituer la cible de phosphatases et de kinases régulatrices de l'activité des CDK. Les phosphorylations activatrices ont lieu, en fonction des CDK, sur des résidus thréonine ou serine placés dans la boucle T, et les phosphorylations inhibitrices sur les résidus tyrosine et/ou thréonine, en position N-terminale, qui se situent dans la poche catalytique (figure 8).

B.3.2. Régulation par les cyclines

L'interaction de la cycline avec la sous-unité catalytique au niveau de l'hélice PSTAIRE (ou équivalent dans les CDK non-PSTAIRE) entraîne un changement de configuration favorable au transfert d'ATP et déplace la boucle T. Le déplacement de la boucle T rend le site catalytique accessible et permet aux phosphorylations activatrices sur les résidus T-161 (ou équivalents) et inhibitrices sur les résidus T-14 et Y-15 (ou équivalents) de certaines CDK, de s'effectuer (Jeffrey *et al.*, 1995).

Des expériences *in vitro* suggèrent que les cyclines seraient impliquées dans la spécificité de substrat. Ainsi les complexes cdk2/cycline A et cdc2/cycline A phosphorylent dix fois plus efficacement la protéine p107 (apparentée à Rb) que les mêmes CDK associées à la cycline B1. En revanche, l'activité du complexe cdc2/ cycline B sur la sous-unité p34 du facteur de réplication et de réparation de l'ADN, RP-A, est cinq fois supérieure à celle du complexe cdc2/cyclineA (Pan *et al.*, 1993; Peeper *et al.*, 1993). Les cyclines dirigeaient également la localisation intracellulaire des complexes, ce qui limiterait l'accès spatial et temporel à leur substrat. Par exemple, les cyclines de type B, au contraire de la cycline A, possède un domaine CRS (Cytoplasmic Retention Signal) qui, en interphase, permet le maintien du complexe dans le compartiment cytoplasmique avant que ce domaine ne soit clivée en fin de phase G₂ (Pines et Hunter, 1994).

Figure 8 : Régulations majeures des complexes CDK/cycline lors de l'entrée en phase S et en phase M



A. Schéma représentant les régulations des complexes CDK/cyclines G1 et cdc2/cycline B, respectivement nécessaires à l'entrée en phase S et à l'entrée en mitose. Le complexe Cdk4-6/cycline D intervient avant le point de restriction, où il promeut la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (Rb), permettant ainsi, la libération des facteurs de transcription E2F et la transcription des gènes nécessaires à la phase S. La cycline E, ainsi transcrise, s'associe à cdk2 et le complexe phosphoryle différents substrats (dont Rb ferait partie ce qui permettrait une amplification du processus) et déclenche la réplication de l'ADN. Cdc2/cycline B est activée par phosphorylation sur T-161 mais inhibée par les phosphorylations T-14 et Y-15 jusqu'à l'entrée en mitose, où la déphosphorylation de ces résidus permet une activation rapide du complexe et l'entrée en mitose. **B.** Deux modèles de régulation de cdc2/cycline B par les enzymes régulatrices cdc25 et wee1 à l'entrée en mitose. A gauche : Mécanisme de retrocontrôle positif. L'activation d'une faible quantité de cdc2/cycline B permet la l'hyperphosphorylation activatrice de cdc25 et inhibitrice de wee1, conduisant à un accroissement de l'activation du complexe. A droite : L'activité interphasique de cdc25 est suffisante à activer complètement cdc2/cycline. L'hyperphosphorylation de cdc25 et wee1 s'effectue en aval, et ne sert qu'à verrouiller l'état déphosphorylé actif du complexe. *D'après Lew et Kornbluth, 1996.*

Le niveau de toutes les cyclines, à l'exception de la cycline D, fluctue au cours du cycle et est régulé par une dégradation périodique, rapide et programmée des cyclines, qui est, dans certains cas, accompagné d'une régulation transcriptionnelle. La formation des complexes actifs dépend, en premier lieu, de l'accumulation périodique des cyclines qui s'effectue, le plus souvent, pendant la phase dans laquelle les cyclines sont impliquées. Chez les animaux, la transcription des cyclines E et A, en phase S, est assurée par le facteur E2F qui est régulé positivement par les cyclines D de phase G₁ (revue par Pines, 1995; Morgan, 1997). Chez *S. cerevisiae*, les cyclines de G₂ sont impliquées dans la dégradation des cyclines de G1 (Blondel et Mann, 1996). D'une manière générale, les cyclines favorisent l'expression des cyclines de la phase suivante et répriment ou favorisent la dégradation des cyclines de la phase précédente. La transcription de la cycline D en phase G₁ dépend, quant à elle, de facteurs extracellulaires (Sherr *et al.*, 1994). De plus, il existe également un rétrocontrôle des complexes cdk/cyclines qui favorisent aussi bien leur activation que leur inactivation. Ainsi, chez la levure les cyclines de G2 activent leur propre transcription (Amon *et al.*, 1993) et chez les animaux il a été montré que les complexes cdk2/cycline E et cdc2/cycline B activent la dégradation de leur cycline (Won et Reed, 1996; Hershko *et al.*, 1994). La dégradation des cyclines s'opère par un phénomène d'ubiquitination faisant intervenir un complexe ligase E3, qui permet la fixation des dernières molécules d'ubiquitine à la cycline. Cette fixation est nécessaire à la reconnaissance de la cycline par le complexe de dégradation proprement dit : le protéasome 26S. Le complexe ligase E3 est spécifique du substrat à dégrader, et correspond au complexe promoteur de l'anaphase (APC) dans le cas des cyclines mitotiques (revue par Hershko, 1997). Le système de protéolyse par ubiquitination, qui assure la dégradation des cyclines mais également celles des CKI, constitue un élément essentiel pour le contrôle du cycle cellulaire (Morgan, 1999).

B.3.3. Régulation par phosphorylation

Phosphorylations activatrices

La phosphorylation sur thréonine T-161 (ou équivalent) serait absolument essentielle à l'activité des CDK chez l'humain et dans de nombreux autres organismes. Ainsi, la mutation du résidu T-167 de cdc2 de levure inhibe l'activation du complexe mitotique (Gould *et al.*, 1991). Chez les animaux, la phosphorylation de cdk2 et cdc2 est essentielle à l'entrée et à la

progression en phase S, G₂ et M (Gu *et al.*, 1992; Gould *et al.*, 1991). Cdk4 semble également être activée par phosphorylation (Matsuoka *et al.*, 1994). Du fait de la situation du résidu cible dans la boucle T qui peut bloquer l'accès au site catalytique, il a été suggéré que la phosphorylation stabilise la conformation active de l'enzyme. Cette phosphorylation favorise l'interaction cycline-CDK dans certains complexes et pourrait constituer une stratégie plus générale de contrôle de l'activité CDK (Ducommun *et al.*, 1991; Desai *et al.*, 1995). Inversement, la liaison de la cycline à la kinase favorise la phosphorylation de cette dernière.

La kinase activatrice des CDK (CAK pour CDK Activating Kinase) a été identifiée chez de multiples organismes, ce qui souligne l'importance de la phosphorylation sur T-161 (ou équivalent), dont la place dans les régulations des CDK reste cependant à préciser. Au cours du cycle, l'activité de la CAK ne fluctue pas (Kaldis, 1999) et les changements de phosphorylation sur T 161 (ou équivalent) pourraient être régulés par la liaison de la cycline à la CDK (revue par Morgan, 1995; Krek et Nigg, 1991a; Gu *et al.*, 1992). L'activité CAK ne semble donc pas limitante au cours de la progression normale, mais il n'est pas exclu que sa régulation puisse intervenir dans des conditions particulières de croissance.

La déphosphorylation du résidu activateur de cdc2 a lieu, *in vivo*, en sortie de mitose et peut être réalisée, *in vitro*, par la S/T phosphatase 2-A (Gould *et al.*, 1991; Lee *et al.*, 1991). *In vivo*, la phosphatase 2-A agirait indirectement sur la CAK ou sur les phosphatases déphosphorylant les résidus activateurs, ce qui conduirait à une inactivation de cdc2, due à l'absence de résidu T-161 phosphorylé (ou équivalent) (Lee *et al.*, 1994). La KAP (CDK Associated Phosphatase), identifiée par la technique du double hybride comme associée à cdc2 et cdk2, est un bon candidat pour assumer le rôle de phosphatase des CDK (Hannon *et al.*, 1994; Poon et Hunter, 1995). En sortie de mitose, la dégradation de la cycline B semble jouer le rôle principal dans l'inactivation de cdc2 par rapport à sa déphosphorylation (revue par Morgan, 1995) mais la déphosphorylation inhibitrice du résidu T-161 pourrait permettre une inactivation complète des CDK. Le rôle exact de cette déphosphorylation reste à préciser pour chacune des CDK.

Phosphorylations inhibitrices

Le mécanisme par lequel les phosphorylations des résidus T-14 et/ou Y-15, situés dans

le site catalytique des CDK, inhibe l'activité kinase, reste discuté. Jeffrey (1995), en désaccord avec De Bondt (1993), rapporte que la phosphorylation de la Y-15 interfère avec la fixation de l'ATP.

Les CDK mitotiques sont inhibées par phosphorylation durant les phases S et G₂ et leur déphosphorylation, à l'entrée en mitose, correspond à leur activation (figure 8). La mutation des sites inhibiteurs de cdc2 en résidus non phosphorylables, provoque l'entrée prématuée de la cellule en mitose (Gould et Nurse, 1989; Krek et Nigg, 1991b). Dans les cellules humaines, des expériences de mutations montrent que le résidu Y aurait un rôle fondamental dans la régulation alors que le résidu T servirait de verrou supplémentaire, empêchant une activation accidentelle de cdc2 par des tyrosines kinases non-spécifiques, au cours du cycle. En effet, la mutation du résidu T-14 de cdc2 n'est pas suffisante pour induire des perturbations de la progression du cycle mais augmente les effets de la mutation Y-15 (revue par Lew et Kornbluth, 1996; Krek et Nigg, 1991b).

La phosphatase cdc25, à double spécificité T/Y, est responsable de l'activation de cdc2. Chez *S. pombe*, la tyrosine-kinase pyp3 semble assister cdc25. L'approche génétique, chez *S. Pombe*, a également permis d'identifier les kinases wee1 et myk1, qui inactivent cdc2 en phosphorylant coopérativement le résidu Y-15. Chez *S. pombe*, le résidu T-14 ne semble pas être phosphorylé au cours du cycle normal mais wee1 a la capacité de phosphoryler cdc2 sur T-14 chez certains mutants (Den Haese *et al.*, 1995). Chez les vertébrés, wee1 phosphoryle uniquement la tyrosine-15 (McGowan et Russell, 1993). La kinase myt1, identifiée dans la membrane d'ovocytes de xénope, possède, quant à elle, une double spécificité T/Y pour cdc2 (Kornbluth *et al.*, 1994; Mueller *et al.*, 1995). Chez l'humain, cette kinase serait spécifique de cdc2 (Booher *et al.*, 1997). Cdc25 et wee1 sont les régulateurs principaux de l'activation de cdc2 par phosphorylation, et engagent la cellule en mitose de manière irréversible tandis que les autres enzymes (pyp3, myk1, myt1) n'interviendraient que lorsque l'activité des premières est compromise (revue par Lew et Kornbluth, 1996).

L'activité de cdc25 oscille durant le cycle. Chez *S. pombe*, son accumulation en interphase est supposée déclencher l'entrée en mitose, après laquelle on observe une chute importante du messager et de la protéine (revue par Coleman et Dunphy, 1994). Cdc25 est

activée par phosphorylation et est substrat de cdc2 *in vitro*, ce qui a conduit à proposer un mécanisme d'amplification en boucle, par rétrocontrôle positif, dans l'activation de cdc2 à l'entrée en mitose (figure 8). De manière similaire, l'activité de wee1, qui décroît en mitose, est inhibée par phosphorylation. Wee1, comme cdc25, est substrat de cdc2 *in vitro* et pourrait également participer à l'activation autocatalytique de cdc2 (figure 8). Ce phénomène d'autoamplification a été appréhendé lors des expériences de microinjection de cdc2 hétérologue dans des oeufs de xénope, où d'infimes quantités d'enzyme suffisent à induire la maturation méiotique (Masui et Markert, 1971; Masui, 1972; Wassermann et Masui, 1975; Wassermann et Masui, 1976). Cependant cdc2 n'est pas le seul responsable de sa propre activation, et d'autres enzymes interviennent dans la régulation de cdc25 et wee1, entraînant leur hyperphosphorylation en mitose et conduisant respectivement à l'activation de cdc25 et l'inhibition de wee1 (Izumi et Maller, 1995; Tang *et al.*, 1993). Nim1 est une kinase inhibitrice de wee1 bien caractérisée chez la levure fissipare, et les kinases de type polo sont également de bons candidats pour réguler cdc25 et wee1 (Coleman *et al.*, 1993; Kumagai et Dunphy, 1996). D'autre part, les complexes CDK/cycline de G₁/S apparaissent réguler l'activité mitotique de cdc2 *via* cdc25. Ainsi, chez le xénope, il a été démontré que cdk2 est nécessaire à l'hyperphosphorylation de cdc25 et est directement impliquée dans l'activation de cdc2 (Guadano et Newport, 1996).

Les phosphorylations inhibitrices sont clairement impliquées dans le contrôle de l'entrée en mitose chez la plupart des organismes. Cependant, chez *Saccharomyces cerevisiae*, bien que la phosphorylation de CDC28 fluctue au cours du cycle, les doubles mutants de CDC28, chez qui les résidus T et Y ont été remplacés par des résidus non phosphorylables, possèdent une activité CDK normale et présentent des cycles identiques à ceux des levures sauvages. Ces résultats suggèrent, que les phosphorylations inhibitrices ne constituent pas un mécanisme de régulation prépondérant de l'activité mitotique de CDC28 au cours de la progression normale dans le cycle chez la levure bourgeonnante (Amon *et al.*, 1992).

Le rôle des phosphorylations inhibitrices sur les complexes non mitotiques reste à préciser (revue par Lew et Kornbluth, 1996). Chez les vertébrés, il existe trois types de cdc25. Cdc25C est impliquée lors de la mitose, tandis que cdc25A présente un pic d'activité en G₁, et pourrait intervenir dans la transition G₁/S (Jinno *et al.*, 1994). Cependant, dans le cas de cdk2,

une corrélation directe entre la phosphorylation sur Y-15 et une inhibition de l'activité n'a pas été établie *in vivo* (Gu *et al.*, 1992).

B.3.4. Régulation par les CKI

Les CKI agissent principalement en phase G₁. Ces inhibiteurs sont induits par des facteurs extracellulaires et assurent l'arrêt du cycle, nécessaire à l'accomplissement d'autres grandes fonctions cellulaires telles que la différenciation ou la conjugaison des levures bourgeonnantes. Ils permettent aussi l'arrêt du cycle lorsque les conditions ne sont pas favorables à la division (inhibition de contact, manque de nutriments) (Mendenhall, 1993; Zavitz et Zipursky, 1997; Peter et Herkowitz, 1994). Ils sont également impliqués dans la régulation intrinsèque du cycle et lors de la surveillance du cycle.

Trois CKI ont été identifiées chez *S. cerevisiae*. FAR1 est activée en réponse aux phéromones et inhibe le complexe CDC28/CLN, provoquant l'arrêt du cycle en G₁ (revue par Peter et Herskowitz, 1994). PHO81 stoppe le cycle en réponse à un manque de phosphate (revue par Lenburg et O'Shea, 1996). P40^{SIC1} est un inhibiteur dont l'activité ne dépend pas des conditions extérieures mais est fonction du cycle. P40^{SIC1}, activé en G₁, se lie spécifiquement à CDC28-CLB5-6 et l'inhibe. En fin de phase G₁, sa phosphorylation par CDC28/CLN entraîne sa dégradation par la voie d'ubiquitination et permet l'initiation de la réplication (Schwob *et al.*, 1994). Chez *S. pombe*, rum1 empêche l'entrée prématuée de la cellule en mitose en inhibant cdc2/cdc13 pendant la phase G₁ (Correa-Bordes et Nurse, 1995).

Chez les eucaryotes supérieurs, les CKI sont répartis en deux groupes : la famille Ink4 ("Inhibitors of cdk4") et la famille Cip/Kip représentée par p21^{Cip}, p27^{Cip} et p57^{Kip2} qui lient et inhibent un large éventail de CDK.

Les inhibiteurs Ink4 auraient deux modes d'actions. Des études *in vitro* démontrent que p19^{Ink4d} peut interagir avec le complexe hétérodimérique CDK/cycline et l'inhiber (Hirai *et al.*, 1995), tandis que p16^{Ink4} se lie à cdk4 monomérique et empêche ainsi la fixation de la cycline D *in vivo* (Serrano *et al.*, 1993; Serrano, 1997). Les complexes cdk4-6/cyclines D activent les facteurs de transcription des gènes de la phase S en phosphorylant la protéine Rb (inhibiteur des facteurs E2F/DP1) (figure 8). Or, p16 n'est associé à cdk4 que dans des cellules mutantes

n'exprimant pas Rb, ce qui suggère que la transcription de p16 est inhibée par Rb. Ceci a conduit à l'hypothèse qu'*in vivo* l'accumulation de p16 durant la phase S permettrait un rétrocontrôle négatif sur les complexes cdk4/cycline D (revue par Peter et Herskowitz, 1994).

Le gène codant la protéine p21 a été cloné indépendamment par différents groupes et est donc connu sous divers noms : *waf1*, *cip1*, *sdi1*, *cap20* ou encore *mda*. Alors que les CDK/cycline contenant une seule molécule de p21 peuvent être actifs, l'addition d'une molécule de p21 au complexe ternaire l'inactive (Harper *et al.*, 1995). Bien que la saturation des complexes par des molécules de p21 bloque leur activation par la CAK, p21 inhibe également l'activité des CDK/cycline phosphorylées (Aprelikova *et al.*, 1995). P21 inhibe les complexes cdk/cycline D et, par là-même, la transcription des gènes nécessaires à la phase S, dont le gène de la cycline E, mais également le complexe cdk2/cycline E empêchant ainsi le fonctionnement correct des complexes de réplication (Zhang *et al.*, 1994). P21 intervient donc à deux niveaux dans l'inhibition de l'entrée en phase S. De plus, p21 se lie directement à l'antigène nucléaire de prolifération cellulaire (PCNA), une sous-unité de l'ADN polymérase , et inhibe ainsi, la transcription selon un mécanisme indépendant des CDK (Luo *et al.*, 1995). La transcription de p21 est sous le contrôle de facteurs de différenciation et également sous celui du suppresseur de tumeur p53, qui est activé en réponse à l'endommagement de l'ADN (voir ci-dessous) .

Le mécanisme d'inhibition des CDK par p27 est similaire à celui de p21. Cependant, p27 est induit par d'autres facteurs que p21 et agirait plus précocement dans le cycle. Le niveau de p27 est notamment plus élevé dans les cellules à l'état quiescent. Sous l'action de facteurs mitogènes, la transcription de cdk4 est favorisée alors que celle de p27 est réprimée, ce qui conduit à la titration de p27 par cdk4 et permet à la cellule d'entrer dans le cycle de division (revue par Sherr, 1994).

B.3.5. Interactions avec les sous-unités p9

Des protéines de faible poids moléculaire, p13^{suc1}, p18^{CKS} (chez les levures) et p9^{CKS} (chez les eucaryotes supérieurs) interagissent avec les sous-unités catalytiques des CDK, en particulier cdc2 et cdk2. Des études génétique ont montré que *suc1* est essentiel à la sortie de la phase M (Moreno *et al.*, 1989) et que *CKS1* (*S. cerevisiae*) intervient en G₁/S et en G₂/M (Tang et Reed, 1993). Par ailleurs, les extraits acellulaires d'ovocytes de xénope en interphase ou en

mitose cessent leur progression lorsqu'ils sont immuno-déplétés en p9 (Patra et Dunphy, 1996). L'analyse de cdc2/cycline B dans ces extraits, montre que lorsqu'ils sont bloqués en interphase la phosphorylation du résidu Y-15 subsiste et que lorsqu'ils sont bloqués en mitose la dégradation de la cycline B n'a pas lieu. Il semblerait que les protéines p9 favorisent l'interaction des CDK avec leurs substrats et régulateurs, à savoir, cdc25 et les molécules responsables de la dégradation des cyclines (Patra et Dunphy, 1996). Les protéines p9 peuvent se dimériser et, en formant des hexamères, sont capables de lier six molécules de CDK, suggérant que la p9 aurait également un rôle stabilisateur des complexes multimériques de CDK (Parge *et al.*, 1993).

B.3.6. Régulation par synthèse

La synthèse et la dégradation coordonnées des cyclines, spécifiques de chaque phase, est un élément essentiel à la régulation de l'activité des CDK et donc à la progression du cycle cellulaire. Chez les levures et les animaux, les régulations transcriptionnelles durant le cycle cellulaire s'adressent uniquement aux cyclines (Durkacz *et al.*, 1986; Mendenhall et Hodge, 1998). En revanche, il existe également une régulation transcriptionnelle des CDK dans les cellules de mammifères. L'exemple le plus évident est le contrôle de la synthèse des CDK à la sortie et à l'entrée des cellules somatiques dans le cycle cellulaire. Lorsque les cellules entrent dans un état quiescent, l'expression des gènes du cycle cellulaire, dont ceux des CDK, est réprimée et le niveau des protéines correspondantes diminue (Zwicker *et al.*, 1995). Nous avons précédemment mentionné que la stimulation des cellules par des mitogènes conduit à la synthèse de cdk4 et qu'en inversement, la synthèse de cdk4 est réprimée par des facteurs qui stoppent le cycle cellulaire, tels que TGF- β (Ewen *et al.*, 1995). Dans les lymphocytes ré-entrant dans le cycle cellulaire, la transcription de cdk4 précède celle de cdk2 selon un mécanisme indépendant de l'interleukine 2, mais le rôle de cdk4 dans l'activation du gène cdk2 n'a pas été déterminé (Modiano *et al.*, 1994). La stimulation des lymphocytes T par l'interleukine 2 active l'expression de cdk2 qui précède celle de cdc2 (Elledge *et al.*, 1992). Cependant, à ma connaissance, la rôle de cdk2 dans la régulation transcriptionnelle de cdc2 n'a pas été étudiée. Dans les cellules humaines, l'expression du gène cdc2 est activée à la transition G₁/S et réprimée à l'entrée en mitose (Furukawa *et al.*, 1990; Dalton, 1992), mais le niveau de la protéine reste constant en raison de la synthèse et de la dégradation coordonnées du produit de gène

(Welch et Wang, 1992). Seules les protéines nouvellement synthétisées contrôlent l'entrée en mitose. La transcription de *cdc2* dépend de plusieurs séquences consensus dans la région promotrice dont une constitue un site de fixation à E2F. Ceci laisse supposer que les CDK de G₁ pourraient jouer un rôle dans la régulation transcriptionnelle de *cdc2* (*via* la phosphorylation de Rb). Le rôle biologique de la régulation transcriptionnelle de *cdc2* dans les cellules en prolifération n'est pas compris. Cependant, les dérégulations de l'expression de *cdc2* sont associées à une cancérisation, suggérant l'importance fondamentale du contrôle transcriptionnel (Furukawa *et al.*, 1995; Tanimoto *et al.*, 1998). Enfin, dans l'oeuf de xénope la traduction du messager de *cdk2* est contrôlée, entre la maturation et la fécondation, par un changement de polyadénylation de l'ARNm, ce qui témoigne de l'existence d'un contrôle traductionnel de certaines CDK (Seydoux, 1996).

C. LES MECANISMES DE SURVEILLANCE DU CYCLE CELLULAIRE

La progression de la cellule dans le cycle est soumise à des contrôle stricts qui permettent de vérifier que tous les événements d'une étape sont réalisés avant le déroulement de l'étape suivante (Russell, 1998; Rudner et Murray, 1996). Si tel n'est pas le cas, ces contrôles empêchent ou retardent le passage à l'étape suivante en agissant sur l'activité des CDK aux transitions G₁/S et G₂/M. Ces deux points majeurs de contrôle, ou "checkpoints", sont activés lorsque l'ADN est endommagé, la réplication incorrecte ou l'attachement des chromosomes au fuseau défectueux (revue par Murray, 1994). Le terme de "checkpoint" est également utilisé par certains auteurs pour désigner les contrôles qui empêchent la progression de la cellule au delà du point de restriction R (ou START).

C.1. INTEGRITE DE L'INFORMATION GENETIQUE

C.1.1. L'endommagement de l'ADN et l'inhibition de la réplication arrêtent la cellule à différents stades du cycle cellulaire

La condition *sine qua non* à la transmission correcte de l'information génétique de la cellule mère aux cellules filles, réside dans la conservation de cette information. Ainsi, les

modifications de l'ADN (modification des bases ou du squelette carboné), dont les causes sont aussi bien extrinsinsèques (radiations ou UV, agents mutagènes) qu'intrinsèques (réactivité propre de l'ADN, métabolisme), doivent-elles être corrigées avant la réPLICATION ou la mitose.

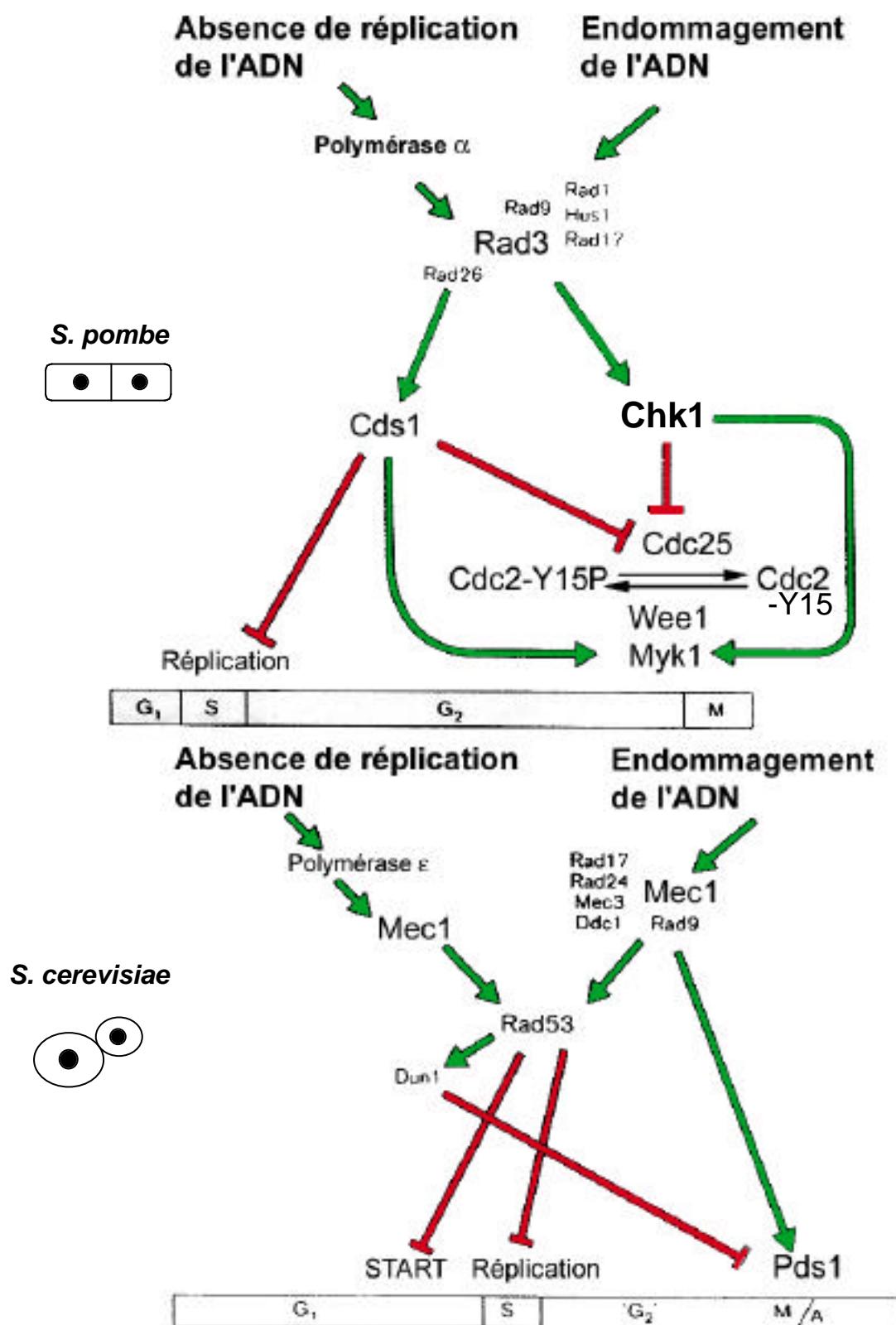
L'existence des mécanismes de surveillance permet que l'endommagement de l'ADN, en G_1 , G_2 ou au cours de la phase S, stoppe les cellules, respectivement avant la phase de réPLICATION, la mitose ou ralentisse la progression en phase S, ce qui autorise la réparation de l'ADN (revue par Paulovich *et al.*, 1997). Il existe, cependant, quelques différences selon les organismes étudiés. Ainsi, le blocage de la mitose s'effectue en phase G_2 tardive chez *S. pombe* et à la transition métaphase-anaphase chez *S. cerevisiae* (figure 9) (revue par Rhind et Russell, 1998). Ces blocages mitotiques s'opèrent également lorsque la réPLICATION de l'ADN est empêchée par des inhibiteurs d'ADN polymérase, tel que l'aphidicoline, ou du métabolisme des acides nucléiques, comme l'hydroxyurée (Ikegami *et al.*, 1978). Dans ce dernier cas, le point de contrôle est appelé S/M en opposition avec le point de contrôle G_2/M , activé lors de l'endommagement de l'ADN après le début de sa réPLICATION.

C.1.2. Voie de transduction

Selon que l'on considère l'inhibition de la réPLICATION ou l'endommagement de l'ADN, certains éléments de la voie de transduction diffèrent, bien que beaucoup d'entre eux soient communs aux deux voies. Dans le premier cas, le signal émanerait directement des ADN polymérases et/ou des fourches de réPLICATION (Navas *et al.*, 1995; D'Urso *et al.*, 1995; D'Urso et Nurse, 1997). Dans le second cas, les lésions de l'ADN (cassures simple ou double brin(s)) ou des variations biochimiques corrélées à ces lésions provoquent des arrêts spécifiques du cycle (Garwick *et al.*, 1995; Hannun, 1996).

Les éléments des voies de transduction qui conduisent à l'arrêt du cycle sont relativement bien conservés quelles que soient les phases du cycle concernées et les organismes étudiés. Ces voies ont été bien caractérisées dans les levures, par approches génétiques (Rhind et Russell, 1998) (figure 9). Les mutants de *S. pombe* *rad1*, *rad3*, *rad9*, *rad17*, *rad26* et *hus1* ne possèdent plus de points de contrôle fonctionnels de la réPLICATION et de la réparation de l'ADN. Ces gènes, dont les homologues ont été identifiés chez l'humain, servent de médiateurs entre les signaux initiaux et la machinerie cellulaire, et pourraient être directement

Figure 9 : Mécanismes de surveillance de l'état de l'ADN



Description dans le texte principal. D'après Rhind et Russel, 1998.

impliqués dans la reconnaissance des lésions de l'ADN car plusieurs d'entre eux possèdent des similarités de séquence avec des exonucléases et des facteurs de réplication. Un acteur central des deux voies de transduction (réplication/réparation) est la protéine rad3 de *S. pombe* (homologue MEC1 chez *S. cerevisiae*). Elle est similaire aux "DNA-protein kinases" (DNA-PK), protéines qui se lient aux cassures simple et double brin de l'ADN et seraient donc directement impliquées dans la reconnaissance des lésions de l'ADN *in vivo*. La protéine ATM de mammifère, une "DNA-PK-like", est également impliquée dans la reconnaissance de l'ADN endommagé (Hoekstra, 1997).

En réponse à un endommagement de l'ADN, un des rôle des protéines rad est d'activer par phosphorylation chk1, une S/T kinase spécifiquement impliquée dans le point de contrôle G₂/M (Walworth et Bernards, 1996). La protéine kinase cds1 joue un rôle analogue à chk1 lors de l'activation du point de contrôle S/M. Chez *S. cerevisiae*, lorsque l'ADN est endommagé, la protéine PDS1 est spécifiquement phosphorylée selon un mécanisme dépendant de MEC1. Le contrôle S/M pourrait également faire intervenir la protéine PDS1. Cependant ce contrôle reste fonctionnel lorsque *PDS1* est muté.

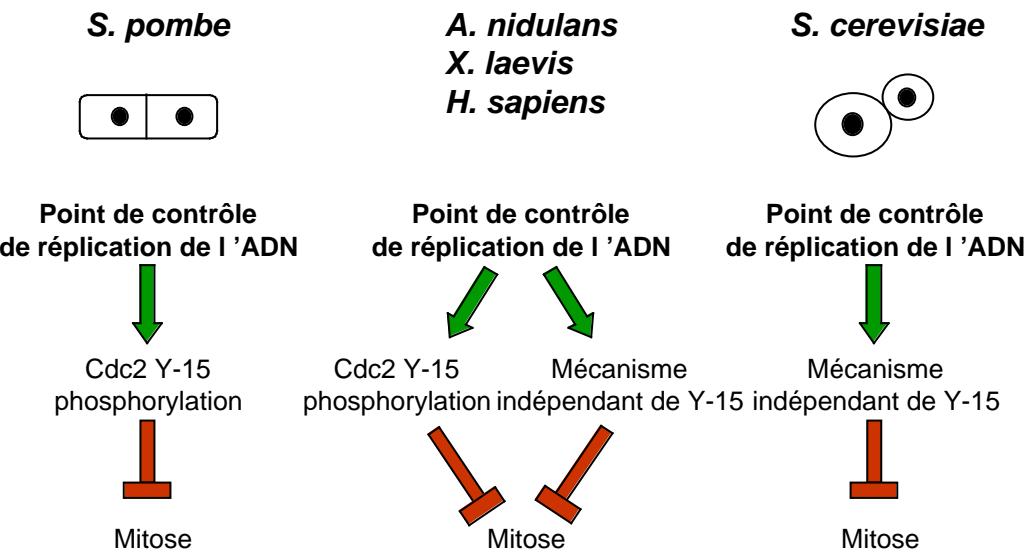
C.1.3.Les cibles moléculaires des points de contrôle dépendants de l'ADN

Les voies de transduction impliquées dans les points de contrôle ont été étudiées principalement lors de blocages en mitose et il n'existe que peu de données sur le mode d'action de ces points de contrôle sur les CDK de G₁ et de phase S. Dans les cellules de mammifères, l'endommagement de l'ADN en G₁ conduit à une augmentation du produit suppresseur de tumeur p53, par stabilisation cette protéine qui active la transcription de la CKI, p21, et, par là-même, inhibe les CDK de G₁ (Maltzman et Czyzyk, 1984; Lu and Lane, 1993; El-Deiry *et al.*, 1993).

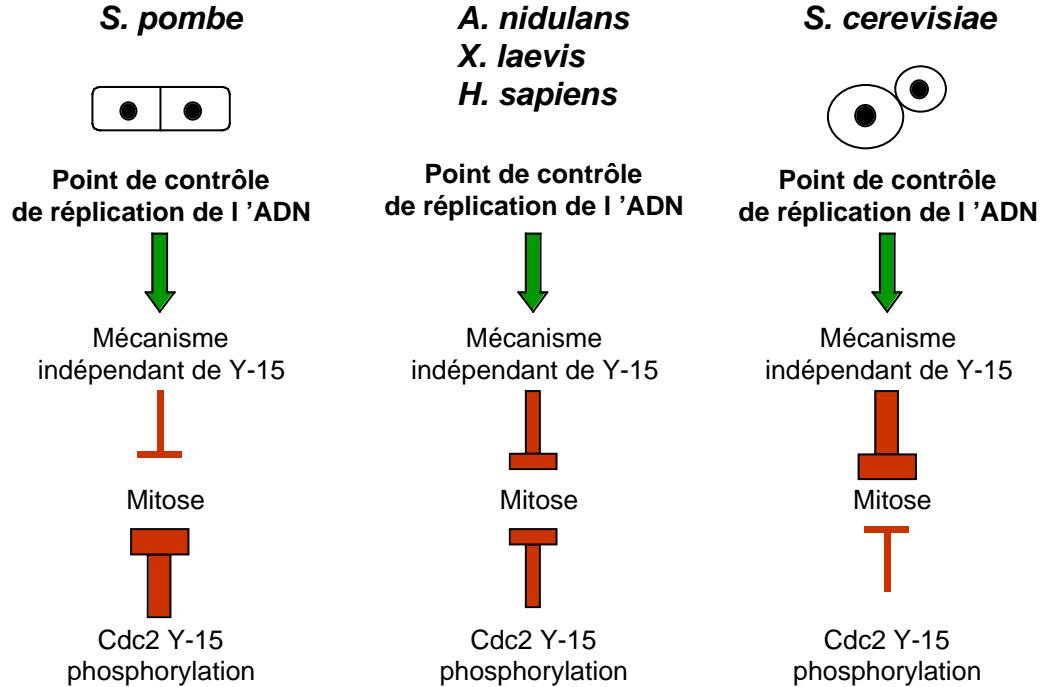
Chez *S. pombe*, la phosphorylation inhibitrice du résidu Y-15 de cdc2 semble avoir un rôle majeur dans la régulation du cycle à l'entrée de mitose, lors de l'activation des points de contrôle de la réplication ou de l'endommagement de l'ADN (revue par Russell, 1998), mais l'importance de cette phosphorylation est quelque peu nuancée en fonction des organismes (figures 9 et 10). En effet, si la mutation du résidu Y en résidu non phosphorylable rend ces points de contrôle non fonctionnels chez *S. pombe* (Rhind *et al.*, 1997) en revanche, chez *Aspergillus nidulans* et *Homo sapiens*, elle ne provoque d'altération du point de contrôle que

Figure 10 : Modèles de fonctionnement du point de contrôle de réPLICATION de l'ADN chez différentes espèces

A



B



A. Le point de contrôle fonctionne par deux mécanismes différents. Le premier module l'activité des enzymes qui régulent la phosphorylation inhibitrice de cdc2 sur le résidu Y (équivalent de Y-15 chez *S. pombe*) et le second agit selon un mécanisme différent. *S. pombe* utilise exclusivement le premier mécanisme tandis que *S. cerevisiae* utilise uniquement le second. Les autres organismes possèdent un mécanisme mixte qui utilise les deux voies. **B.** Toutes les cellules répondent à une réPLICATION incomplète de l'ADN par une voie ne faisant pas intervenir les enzymes régulant la phosphorylation inhibitrice de cdc2. La phosphorylation inhibitrice de cdc2, intervenant durant la progression normale de la cellule dans le cycle, assiste ce mécanisme indépendant de Y-15 en empêchant l'entrée en mitose. L'importance de la phosphorylation sur Y-15 varie selon les espèces (indiquée par l'épaisseur des traits) et fournit, de ce fait, une assistance plus ou moins marquée au fonctionnement du point de contrôle. *D'après Lew et Kornbluth, 1996.*

lorsque la réplication est ralentie (et non lorsqu'elle est bloquée) (revue par Lew et Kornbluth, 1996; Ye *et al.*, 1996). Dans les cellules humaines, le retard en mitose à la suite d'un endommagement de l'ADN dépend également en partie de cette phosphorylation. Chez *S. cerevisiae*, pour qui la phosphorylation sur Y-19 de CDC28 fluctue au cours de la progression normale dans le cycle, l'activation des points de contrôle de l'état de l'ADN ne dépendrait pas de la phosphorylation de Y-19 (Amon *et al.*, 1992; Sorger et Murray, 1992). En effet, si la phosphorylation sur Y-19 augmente lorsque les cellules sont irradiées ou traitées par l'hydroxyurée, les cellules surexprimant une forme de CDC28 non phosphorylable sur tyrosine répondent comme les cellules sauvages lorsque l'état de l'ADN est modifié. CDC28 est néanmoins une cible de ce point de contrôle, dont l'activation conduirait à la stabilisation du complexe mitotique CDC28/CLB actif, empêchant ainsi la transition métaphase-anaphase (Mendenhall et Hodge, 1998).

Chez *S. pombe*, l'activation des points de contrôle dépendant de l'ADN inhibe la déphosphorylation sur Y-15 de cdc2 (Rhind *et al.*, 1997; Rhind et Russell, 1998) et, en conséquence, l'entrée en mitose. La tyrosine-kinase de cdc2, wee1, est substrat de chk1 et cds1 *in vitro*. De plus, chez les doubles mutants *wee1/myk1*, la déphosphorylation de cdc2 est amoindrie en réponse à l'endommagement de l'ADN, suggérant que cdc25 est aussi une cible de ce contrôle *in vivo*. Cdc25, est également phosphorylée par chk1 et cds1 *in vitro*, ce qui la désigne comme une cible potentielle de ces deux régulateurs *in vivo* (figure 9) (Furnari *et al.*, 1999). Des études récentes sur les extraits d'oeufs de xénope et sur des cellules de mammifères, montrent que chk1 régulerait l'activité de cdc25 en contrôlant sa localisation intracellulaire. Les formes de cdc25 phosphorylée sur des résidus S-16 seraient maintenues dans le cytoplasme par leur liaison aux protéines 14-3-3 et ne pourraient agir sur cdc2, localisé dans le noyau au moment de la mitose. En effet, les mutants chez lesquels cdc25C est incapable de lier les protéines 14-3-3, possèdent des points de contrôle défectueux (Kumagai et Dunphy, 1999). Pourtant, les levures fissipares ne possédant ni *wee1* ni *cdc25*, maintiennent leur capacité à stopper le cycle lorsque l'ADN est répliqué de manière incomplète, suggérant que ces deux régulateurs majeurs de la phosphorylation de cdc2 sur Y, ne sont pas les cibles exclusives du point de contrôle (Enoch *et al.*, 1992; Boddy *et al.*, 1998). Les cellules traitées par

l'hydroxyurée présentent un niveau élevé de la kinase mik1, dont l'accumulation dépend des protéines rad3 et cds1, ce qui suggère que l'activation de mik1 pourrait être suffisante au fonctionnement du point de contrôle S/M chez les doubles mutants *wee1/cdc25*.

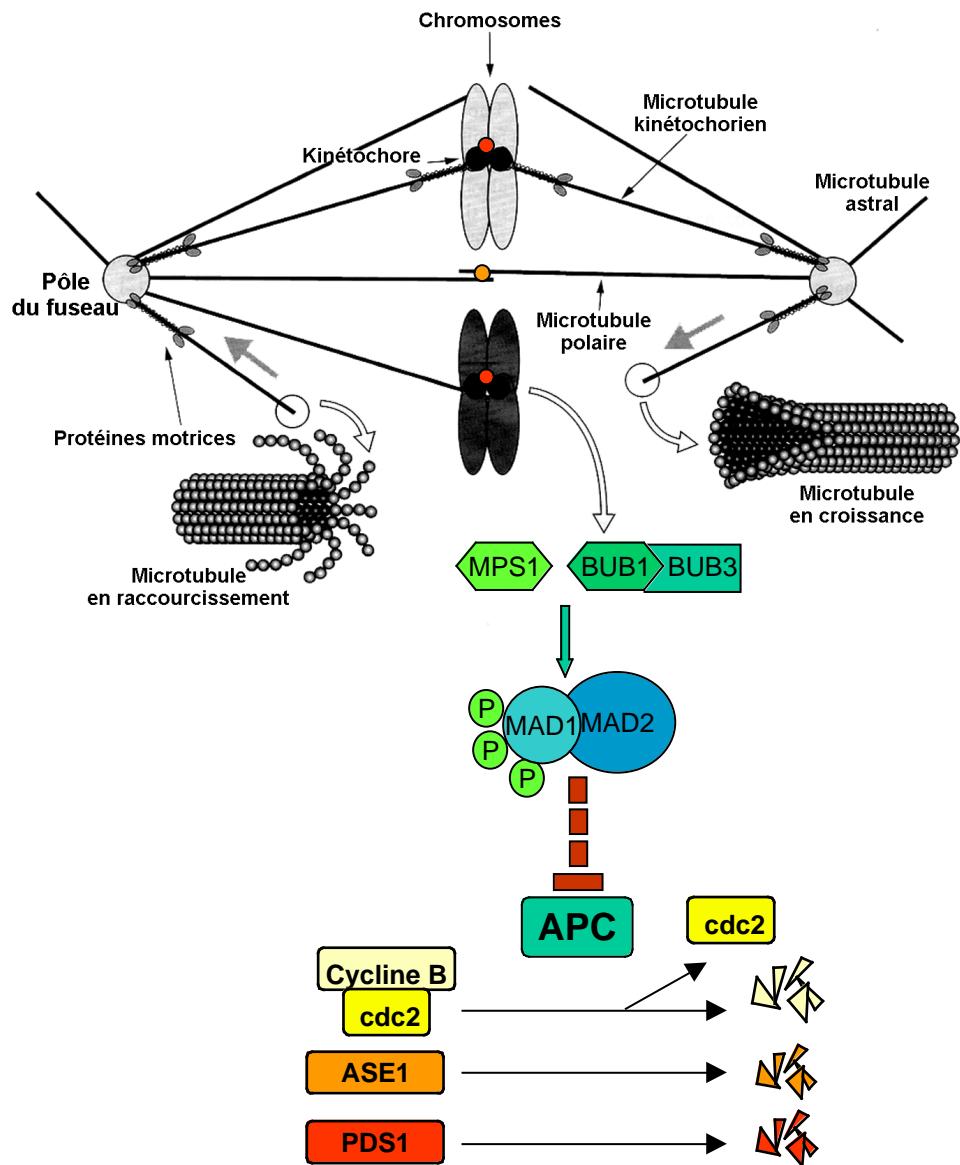
En résumé, chez la plupart des organismes, les points de contrôle G₂/M et S/M agissent sur l'activité de cdc2 en régulant les phosphorylations inhibitrices sur cette enzyme. Chez *S. pombe*, la régulation des kinases, *wee1* et *myk1*, et des phosphatases *cdc25* et *pyp3*, dont cdc2 est le substrat direct, serait réalisée par les effecteurs aval des voies de contrôle tels *chk1* et *cds1*. Cependant, chez les cellules d'animaux, l'étude est d'autant plus complexe qu'il existe d'autres types de régulations, ne faisant pas intervenir la phosphorylation de cdc2.

C.2. ASSEMBLAGE DU FUSEAU MITOTIQUE

L'attachement correct des chromosomes au fuseau est également une condition *sine qua non* pour assurer une égale répartition de l'information génétique entre les cellules filles. Aussi, des mécanismes de surveillance ont été développés pour permettre l'arrêt de la mitose, avant l'anaphase, en réponse à des défauts, qui, s'ils n'étaient pas corrigés, aboutiraient à une répartition anormale des chromosomes. Ainsi, la dépolymérisation des microtubules par des drogues telles que le nocodazole, la colchicine ou le benomyl, la présence de multiples minichromosomes, de chromosomes dicentriques, ainsi que les défectuosités dans les corps polaires du fuseau (équivalent des centrosomes chez les levures), des protéines des kinétochores ou de l'ADN centromérique sont autant de signaux capables d'activer ce mécanisme de contrôle (Rudner et Murray, 1996).

Les kinétochores, qui sont des structures protéiques permettant l'attachement des chromosomes aux microtubules, paraissent jouer un rôle primordial dans la détection des anomalies du fuseau (figure 11) (Nicklas, 1997). En effet, ces structures sont capables de percevoir la tension entre le microtubule et le chromosome, de telle sorte que si l'attachement est défectueux ou si le nombre de microtubules du fuseau est réduit (ce qui abaisse la tension au point d'ancrage), la mitose est inhibée. Les protéines MAD2 (Mitotic arrest defective) et BUB1 (Budding uninhibited by benomyl), initialement identifiées chez les mutants de levures, sont associées aux kinétochores non attachés, ce qui suggère leur implication dans la régulation de la

Figure 11 : Point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique



La polymérisation rapide des microtubules polaires et kinétochoriens, permet la formation du fuseau mitotique et l'alignement des chromosomes sur la plaque métaphasique. La séparation des chromatides soeurs s'opère grâce au raccourcissement des microtubules et à des protéines motrices. Cette dynamique génère une tension sur les structures kinétochoriennes des chromosomes, qui est altérée lorsque l'assemblage du fuseau est défectueux. Le point de contrôle est alors activé et fait intervenir les kinases MPS1 et BUB1 (en interaction avec BUB3). MPS1 hyperphosphoryle MAD1 lorsqu'elle interagit avec MAD2, qui est localisée sur les kinétochores non attachés. La cible ultime de la voie est l'APC, dont l'inhibition empêche la dégradation des cyclines mitotiques et de protéines impliquées dans la cohésion des microtubules ou des chromatides soeurs (PDS1, ASE1). La transition métaphase-anaphase ne peut donc pas s'effectuer. Dessin supérieur d'après Sorger et al., 1997.

liaison kinétochore-microtubule et, notamment, dans la signalisation de défectuosités de ces interactions (figure 11). Chez *S. cerevisiae*, l'hyperphosphorylation de la protéine MAD1 en réponse à l'activation du point de contrôle dépend de plusieurs autres protéines, dont MAD2 avec laquelle MAD1 interagit. *In vivo*, la kinase de MAD1 pourrait être MPS1, (Monopolar spindle), dont la surexpression induit une hyperphosphorylation de MAD1 et l'arrêt mitotique (Hardwick *et al.*, 1996; Lauze *et al.*, 1995). Chez les vertébrés, l'homologue du gène *MAD2* est également requis pour le point de contrôle. Chez le xénope et l'humain, MAD2 est localisée sur les kinétochères en prophase et prométaphase et lorsque les kinétochères ne sont pas attachés aux microtubules. Les protéines kinétochoriennes contenant des phosphoépitopes 3F3/2 se comportent de la même manière : ces protéines sont phosphorylées lorsque les kinétochères ne sont pas attachés aux microtubules et l'application d'une tension sur les kinétochères à l'aide d'une microaiguille, qui suffit à diminuer leur phosphorylation, permet l'entrée en anaphase (Li et Nicklas, 1995). L'ensemble de ces résultats suggère qu'un complexe multiprotéique, localisé au niveau du kinétochore, interviendrait dans la signalisation des défectuosités du fuseau chez les levures comme chez les vertébrés (figure 11). Le mécanisme dépend essentiellement de la tension appliquée par les microtubules au kinétochore, et ferait intervenir des cascades de phosphorylations lors de l'activation du point de contrôle.

Une cible majeure de ce point de contrôle serait le complexe de dégradation APC/cyclosome (revue par Hardwick, 1998). L'inhibition de son activité résulte en un retard ou en une inhibition de la progression à travers la phase M. En effet, à l'anaphase, l'APC permet la dégradation de nombreuses protéines impliquées dans la cohésion des chromatides soeurs (PDS1/cut2) et dans le pontage des microtubules (ASE1) (figure 11) (Funabiki *et al.*, 1996; Cohen-Fix *et al.*, 1996; Juang *et al.*, 1997; Yamamoto *et al.*, 1996a; Yamamoto *et al.*, 1996b). De surcroît, nous avons vu précédemment que l'APC est impliqué dans la dégradation de la cycline B et donc dans l'inactivation du complexe cdc2/cycline B, également nécessaire à la sortie de mitose (figure 11). Le maintien d'une activité CDK élevée dans les cellules traitées par des drogues des microtubules, illustre l'inhibition de l'APC par ce point de contrôle (Irniger *et al.*, 1995). Le fait que chez certains mutants de levure, la séparation des chromatides soeurs s'effectue en l'absence de dégradation de la cycline B suggère que l'accessibilité de l'APC à

certains de ses substrats serait régulée durant la mitose. Les protéines impliquées dans la reconnaissance ou l'accessibilité des substrats de l'APC représentent donc des cibles potentielles du point de contrôle de l'assemblage du fuseau.

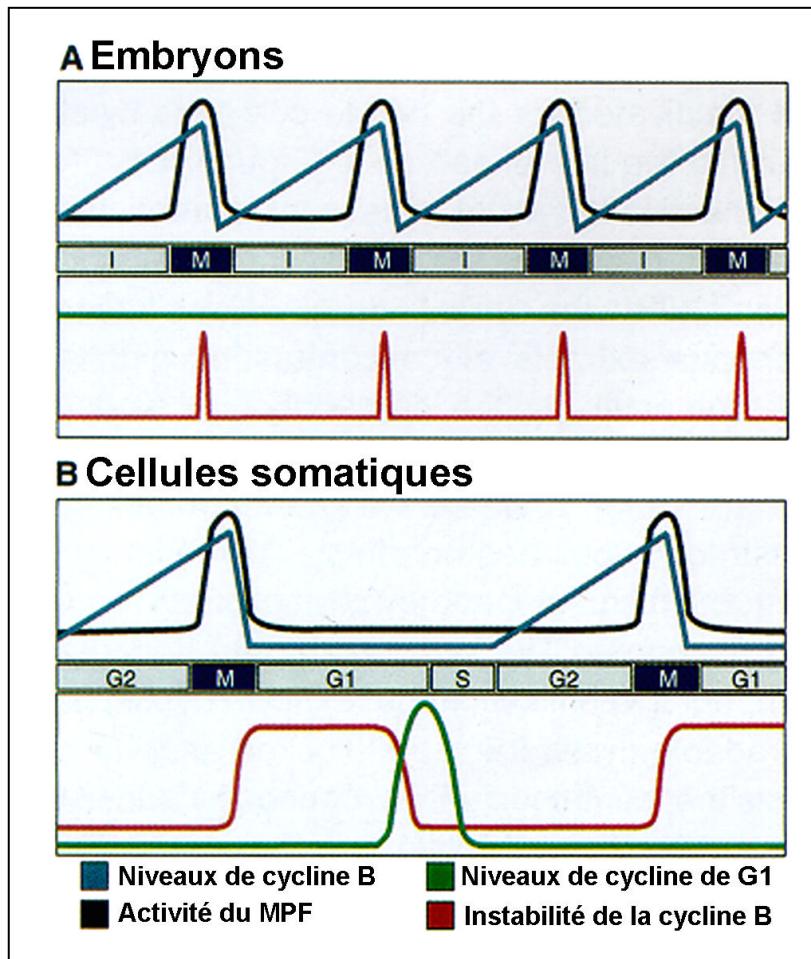
D. PARTICULARITES DU CYCLE CELLULAIRE DANS LES EMBRYONS PRECOCES D'ANIMAUX

Chez les embryons animaux, les premières divisions, qui s'effectuent rapidement, de manière synchrone et sans croissance cellulaire, conduisent au clivage de l'oeuf en de multiples petites cellules appelées blastomères (car elles constituent la blastula). L'ovocyte contient les ARN messagers nécessaires au cycle cellulaire en quantité suffisante pour assurer les cycles de divisions jusqu'au stade mid-blastula, où la transcription zygotique prend le relais. Les premiers cycles cellulaires sont caractérisés par l'alternance de phases S et de phases M (sans phases G séparatrices), qui sont corrélées à l'oscillation de l'activité du complexe cdc2/cycline B ou MPF (figure 12). Ces cycles rapides ne sont pas soumis à toutes les régulations habituelles et certains point de contrôle peuvent être absents. De plus, selon l'organisme considéré, les complexes CDK/cycline n'auraient pas exactement les mêmes fonctions que celles qu'elles assurent dans le cycle somatique. Nous illustrerons ces particularités par les connaissances acquises chez les embryons de mouche, de batracien et d'oursin.

D.1. ROLE ET REGULATION DU MPF

Chez l'oursin et le xénope, durant les premiers cycles embryonnaires, l'activité oscillatoire du MPF (haute en mitose et basse en phase S) suggère que ce complexe est essentiel à la mitose. En effet, la déplétion en ARNm totaux d'extraits acellulaires d'oeufs de xénope résulte en un arrêt de la progression du cycle, qui peut être anihilé par addition d'ARNm de cycline B (Murray et Kirschner, 1989). L'équilibre synthèse-dégradation de la cycline B constitue la régulation principale du MPF chez le xénope, alors que la phosphorylation inhibitrice sur tyrosine de cdc2 ne jouerait un rôle que lors du premier cycle (Ferrel *et al.*, 1991; Hartley *et al.*, 1996). La stabilité de la cycline B dépendrait des cyclines de G₁, dont l'expression

Figure 12 : Modèle de régulation de l'activité MPF dans les embryons et dans les cellules somatiques



L'activité du MPF dépend étroitement de l'équilibre synthèse/dégradation de la cycline B. Chez les jeunes embryons, où les régulations de cdc2 par phosphorylation ne sont pas toujours présentes, la protéolyse de la cycline B serait la régulation principale de l'activité du MPF. La stabilité de la cycline B dépend des cyclines de G1. **A.** Chez les embryons en mitose le MPF active le système de dégradation de la cycline B, et le niveau constant de cyclines de G1 permet une réaccumulation rapide de cycline B en sortie de mitose, ce qui entraîne une activation du MPF, qui permet à nouveau la mitose. Ces régulations produisent de très brèves périodes d'instabilité de la cycline B, et permettent l'alternance rapide des phases S et M. **B.** Dans les cellules somatiques, le niveau de cyclines de G1 est régulé. La cycline E s'accumule en fin de phase G1. De ce fait, la cycline B reste instable durant la plus grande partie de la phase G1. *D'après King et al., 1994.*

constitutive contrecarrerait rapidement l'action de l'APC à la sortie de mitose permettant la réactivation du MPF pour un nouveau cycle (figure 12) (revue par King *et al.*, 1994). Le mécanisme de contrôle par phosphorylation sur tyrosine réapparaît à la transition mid-blastula, tout comme chez la drosophile, où la dégradation des phosphatases cdc25 d'origine maternelle (codées par *string*) permettrait la phosphorylation inhibitrice de cdk1 (Edgar, 1995). En revanche, chez l'oursin les deux types de régulation (phosphorylation sur tyrosine et dégradation de la cycline B) sont conservés au moins pendant les deux premiers cycles (Edgecombe *et al.*, 1991; Meijer *et al.*, 1991). Chez la drosophile, aucune oscillation de l'activité du MPF ni aucune variation de la quantité de cyclines A ou B n'ont été détectées durant les sept premiers cycles, et le mécanisme de contrôle de ces premiers cycles est mal compris. Cependant, l'induction de cyclines A ou B non dégradables stoppe le cycle cellulaire, suggérant que la dégradation d'un pool spécifique de cyclines jouerait un rôle essentiel dans la régulation du cycle, par le biais de la ségrégation intracellulaire des complexes MPF-substrat, plus que par le contrôle biochimique de l'activité enzymatique (Edgar *et al.*, 1994; Edgar, 1995).

D.2.ROLE DU COMPLEXE CDK2/CYCLINE E

Le rôle du complexe cdk2/cycline E est moins bien défini chez les embryons que dans les cellules somatiques. Des expériences de déplétion de la cycline E, dans des extraits acellulaires d'oeufs de xénope et chez l'embryon de drosophile, suggèrent que le complexe cdk2/cycline E est nécessaire à la phase S (Knoblich *et al.*, 1994; Rempel *et al.*, 1995). De plus, le suivi de l'activité du complexe cdk2/cycline E, *in vivo*, révèle une oscillation biphasique au cours de chaque cycle, ce qui suggère un rôle pour ce complexe en phase S mais aussi en mitose (Hartley *et al.*, 1996). Au contraire, lors du premier cycle mitotique de l'oursin, ce complexe ne semble pas être nécessaire à la réplication de l'ADN mais pourrait jouer un rôle dans l'inhibition de la re-réplication de l'ADN (Moreau *et al.*, 1998).

D.3.LES POINTS DE CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE EMBRYONNAIRE

Au cours de la progression normale dans le cycle, la re-réplication de l'ADN est inhibée dans la plupart des cellules embryonnaires, ce qui assure le maintien du niveau de ploïdie (pour revue Heichman et Roberts, 1994; Harland et Laskey, 1980). En revanche, le couplage de la mitose à la réplication de l'ADN est limité voire fait défaut. Ainsi, Genevière-Garrigues (1995) montre que, chez l'oursin, la mitose dépend en partie de la réplication de l'ADN mais les cibles du checkpoint ne semblent pas être des CDK. En effet, chez des embryons traités par l'aphidicoline, la rupture de l'enveloppe nucléaire et la formation correcte du fuseau mitotique sont inhibées mais l'activité CDK, mesurée par la capacité des extraits à phosphoryler l'histone H1 (extrait brut et immunoprecipités, par un anticorps anti-cycline B) s'élève jusqu'à un niveau équivalent, voire supérieur, à l'activité mitotique (Sluder *et al.*, 1995; Genevière-Garrigues *et al.*, 1995). Les centrosomes se positionnent normalement autour du noyau, les microtubules astraux se forment, et les asters adoptent une dynamique similaire à celle observée en anaphase et télophase. Dans certains cas, le clivage a lieu et conduit à une répartition aberrante de l'ADN (Genevière-Garrigues *et al.*, 1995).

Chez les embryon de xénope et de drosophile, les divisions cellulaires continuent lorsque la synthèse de l'ADN est inhibée avant le stade mid-blastula (Raff et Glover, 1988; Dasso et Newport, 1990). De même, l'endommagement de l'ADN par irradiation n'altère pas les divisions chez la drosophile et le xénope (revue par Hartwell et Weinert, 1989; Anderson *et al.*, 1997). Le point de contrôle de l'assemblage du fuseau fait également défaut chez l'embryon précoce de xénope, où la dépolymérisation des microtubules ne stoppe pas le cycle cellulaire (Clute et Masui, 1992). Chez l'oursin, l'anaphase se produit en dépit d'une absence d'attachement ou d'une orientation aberrante des chromosomes (Sluder *et al.*, 1994).

Il a été proposé que le fonctionnement des mécanismes de surveillance dépende de la densité en noyaux dans l'embryon. Ainsi, tant que le rapport nucléoplasme/cytoplasme est faible, ces points de contrôle seraient inopérants (Masui et Wang, 1998; Edgar *et al.*, 1986). Cependant, des études récentes suggèrent que c'est l'âge de l'embryon qui joue un rôle prépondérant (Clute et Masui, 1997). L'absence de certains points de contrôle, avant le stade mid-blastula, permet des divisions synchrones car la progression d'une cellule présentant une

anomalie (au niveau réplicatif par exemple) n'est pas retardée par rapport aux cellules normales. Cependant, ceci comporte l'inconvénient de générer des erreurs pendant les premières divisions, qui, si aucun système de correction n'était mis en place, conduiraient au développement d'embryons anormaux. Chez la drosophile, dont le développement initial est syncitial, un mécanisme de contrôle particulier assure que les noyaux anormaux soient regroupés au centre du syncitium, puis éliminés (revue par Edgar, 1995). Cette élimination a lieu à la transition blastula-gastrula et il est raisonnable de penser que chez les autres embryons des mécanismes de surveillance similaires, qui permettent l'élimination des cellules anormales soient également enclenchés durant cette période, c'est à dire avant la morphogenèse.

E.LE CYCLE CELLULAIRE CHEZ LES VEGETAUX

La remarquable conservation des mécanismes régulateurs du cycle cellulaire chez les eucaryotes, s'étend au règne végétal. En 1989, John et collaborateurs mirent en évidence qu'une protéine homologue de p34^{cdc2} participait à la mitose chez l'algue unicellulaire *Chlamydomonas*. Par la suite, de nombreux gènes potentiellement impliqués dans le cycle cellulaire, notamment des gènes homologues de CDK et de cyclines, furent identifiés mais les efforts pour préciser leur rôle *in planta* n'ont été déployés que récemment et les données fonctionnelles sont assez lacunaires.

E.1.DIVERSITE DES CDK ET DES CYCLINES

Les CDK se répartissent en deux grands groupes : les CDK à motif PSTAIRE définissent la classe A et les CDK non PSTAIRE appartiennent majoritairement à la classe B. Quelques CDK non PSTAIRE n'ont pas d'affiliation particulière et semblent être spécifiques de certaines espèces (revue par Mironov *et al.*, 1999). Les gènes de cyclines, quant à eux, ont été classés et dénommés sur la base d'homologies avec les cyclines animales (conservation dans la "cycline-box") et leur dénomination ne reflète pas forcément leurs propriétés fonctionnelles. Les neuf groupes qui ont été définis se répartissent en trois super-groupes A, B et D (tableau 1).

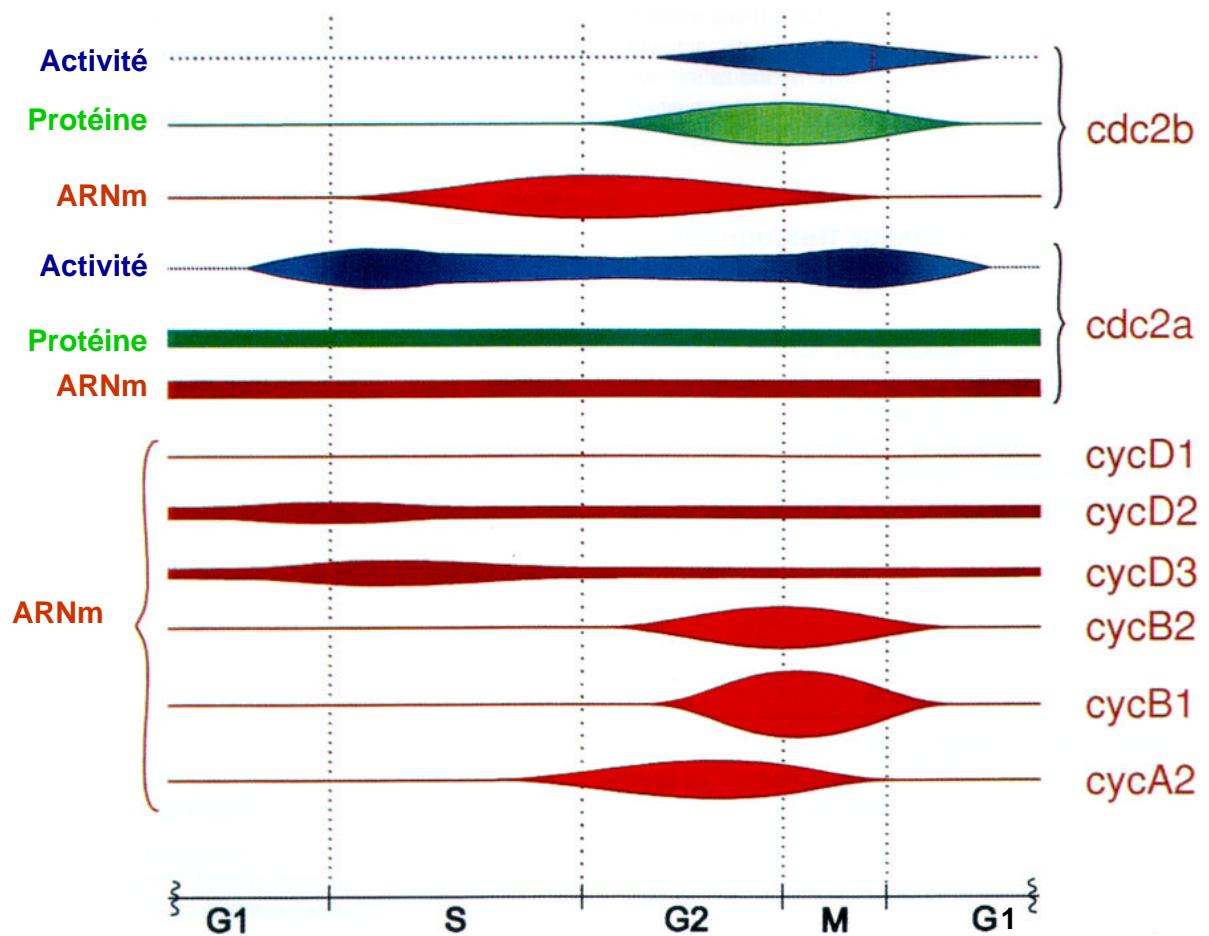
E.2.ROLE DES CDK ET DES CYCLINES

De nombreuses approches expérimentales démontrent que les CDK interviennent dans le contrôle du cycle cellulaire végétal. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de CDK chez plusieurs espèces suggère que les CDK seraient impliquées dans la transition G₁/S et G₂/M (Binarová *et al.*, 1998; Glab *et al.*, 1994). En particulier, chez *Arabidopsis*, l'expression de cdc2aAt et cdc2bAt est limitée aux cellules en prolifération, ou ayant la capacité à proliférer, et l'activité de ces enzymes correspond à des phases spécifiques du cycle (figure 13) (Martinez *et al.*, 1992; Hemerly *et al.*, 1993; Segers *et al.*, 1996). L'activité de cdc2aAt s'accroît lors des deux transitions G₁/S et G₂/M et son inhibition conduit à une diminution des divisions chez la plante, sans que les durées relatives des phases G₁ et G₂ ne soient affectées (Hemerly *et al.*, 1995). Ces résultats suggèrent que cdc2a interviendrait dans le contrôle des transitions G₁/S et G₂/M. La plupart des CDK de classe A, au contraire des CDK de classe B, peuvent complémer des mutants de levures CDC28⁻/cdc2⁻ (tableau 1) (revue par Mironov *et al.*, 1999). Durant la mitose, les CDK de classe A sont associées à de nombreuses structures du cytosquelette microtubulaire comme le fuseau, la bande préprophasique et le phragmoplaste (Stals *et al.*, 1997). De plus, l'inhibition des CDK empêche l'assemblage correct du fuseau mitotique chez *Vicia faba* (Binarová *et al.*, 1998). Il est donc raisonnable de supposer que les CDK auraient une fonction régulatrice dans la réorganisation du cytosquelette lors de la mitose et de la cytodièrèse.

Les cyclines B1 constituent de bons candidats pour remplir la fonction de cyclines mitotiques. En effet, leur niveau d'expression est maximal en mitose et l'expression ectopique de cycline B1;1 favorise la prolifération cellulaire dans les racines d'*Arabidopsis* (figure 13) (Doerner *et al.*, 1996; Mironov *et al.*, 1999) La localisation intracellulaire spécifique des cyclines durant le cycle suggère qu'elles rempliraient des fonctions particulières et pourraient diriger les CDK vers leurs substrats. Notamment, la cycline B1;2 est relocalisée dans le noyau lors de la mitose, à l'image de la cycline B1 animale. Toutefois, les CDK partenaires de ces cyclines ne sont pas identifiées avec certitude.

La cycline A1, qui est localisée au niveau du fuseau mitotique et des microtubules interphasiques, pourrait intervenir dans le contrôle de la dynamique des microtubules. La cycline

Figure 13 : Expression et activité des CDK et expression des cyclines au cours du cycle cellulaire chez *Arabidopsis thaliana*



Description dans le texte principal. D'après Mironov et al., 1999.

A2;1 de luzerne, quant à elle, aurait un rôle dans la transition G₀/G₁ (Meskiene, 1995). Chez les cellules de luzerne en phase S précoce, une kinase phosphorylant l'histone H1 et n'ayant pas d'affinité pour p13 est immunoprécipitée par l'anticorps anti-cycline A, ce qui suggère que les CDK des phases précoce pourraient s'associer à cette classe de cycline (Magyar *et al.*, 1993). Néanmoins, les kinases associées aux cyclines A ne sont actuellement pas identifiées.

L'utilisation du système double-hybrid a permis de mettre en évidence que les cyclines D1;1 et D4;1 interagissent avec cdc2a (De Veylder *et al.*, 1997; De Veylder *et al.*, 1999). La première interaction fonctionnelle cycline CDK n'a été que très récemment mise en évidence chez le tabac, où le complexe cdc2/cycline D phosphoryle la protéine homologue du rétinoblastome (Nakagami *et al.*, 1999). Les cyclines D ont été identifiées par complémentation de mutants de levures et leur expression, quasi-constante dans les cellules en prolifération, peut être induite par des hormones ou les nutriments (figure 13) (Soni *et al.*, 1995; Riou-Khamlich *et al.*, 1999). Aussi, comme leurs homologues animaux, les cyclines D de plantes sont soupçonnées jouer le rôle de médiateur entre les signaux extracellulaire et le contrôle du cycle. De nombreuses expériences suggèrent que les complexes CDK/cyclines permettraient la libération du facteur de transcription EF-2 *via* la phosphorylation de Rb. Chez le maïs, la phosphorylation de Rb est corrélée au phénomène d'endoréplication des cellules de l'endosperme. La protéine Rb de plante inhibe la réplication des geminivirus et des cellules animales en interagissant avec EF-2 (revue par Gutierrez, 1998). La capacité du complexe cdc2/cycline D de tabac à phosphoryler Rb en système homologue, et la mise en évidence des interactions Rb-EF2 en système végétal, suggèrent la fonctionnalité de la voie du rétinoblastome chez les végétaux (Nakagami *et al.*, 1999; Inzé *et al.*, 1999).

E.3. REGULATION DES CDK

E.3.1. Interactions avec les molécules régulatrices du cycle

La multiplicité des cyclines de plantes et leur localisation intracellulaire particulière au cours du cycle suggèrent que ces molécules constituent des régulateurs fondamentaux des CDK. De plus, les CDK monomériques n'ont qu'une très faible activité kinasique, alors que les

complexes immunoprécipités par des anticorps anti-cycline (A et B) possèdent une activité conséquente (Bögre *et al.*, 1997; Magyar *et al.*, 1993; Magyar *et al.*, 1997).

D'autres molécules régulatrices ont été isolées chez les plantes. L'utilisation du système double-hybride a permis l'identification de trois protéines interagissant avec *cdc2aAt* et qui présentent des similarités de séquences réduites avec les CKI humaines, p21 et p27 (Wang *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1998). Ces similitudes sont localisées dans la partie C-terminale de la molécule qui est cruciale pour l'interaction d'*ICK1* (apparenté à p27^{Kip1}) avec *cdc2aAt/cycline D3;1*. Des concentrations de *ICK1* de l'ordre du nanomolaire sont suffisantes pour inhiber de 80% l'activité H1 kinase chez *Arabidopsis*. La transcription de *ICK1* peut être induite par l'acide abscissique, ce qui suggère que *ICK1* serait le médiateur de l'effet cytostatique de cette hormone. L'ensemble de ces résultats indique que les CKI existent chez les plantes et jouent, à l'image de leurs homologues animaux, un rôle dans l'intégration des signaux environnementaux pour la régulation du cycle cellulaire.

L'équilibre synthèse/dégradation des molécules régulatrices du cycle, telles que les cyclines et les CKI, constitue une clé de voûte de la régulation du cycle et est assuré par une régulation transcriptionnelle ainsi que probablement par le fonctionnement du système de dégradation protéolytique dépendant de l'ubiquitine qui est conservé chez les plantes (Plesse *et al.*, 1998).

Enfin, chez *Arabidopsis*, la transcription de l'homologue de *CKS*, *CKS1At*, dont le produit correspondant se lie aux CDK de classe A et B, est élevée dans les cellules en division et dans les tissus polyploïdes. Néanmoins, s'il est probable que *CKS1At* soit nécessaire au fonctionnement des CDK, son rôle est actuellement mal défini (De Veylder *et al.*, 1997).

E.3.2. Phosphorylations

Les CDK de plantes possèdent les résidus conservés, qui sont les cibles des phosphorylations régulatrices chez les autres eucaryotes (Dudits *et al.*, 1998). Deux kinases, présentant des homologies réduites avec la CAK humaine, ont été identifiées chez *Arabidopsis* et le riz (tableau 1). Ces kinases peuvent phosphoryler la protéine humaine cdk2 mais leur rôle n'a pas été démontré *in planta* (Umeda *et al.*, 1998, Yamanuchi *et al.*, 1998). De même, un

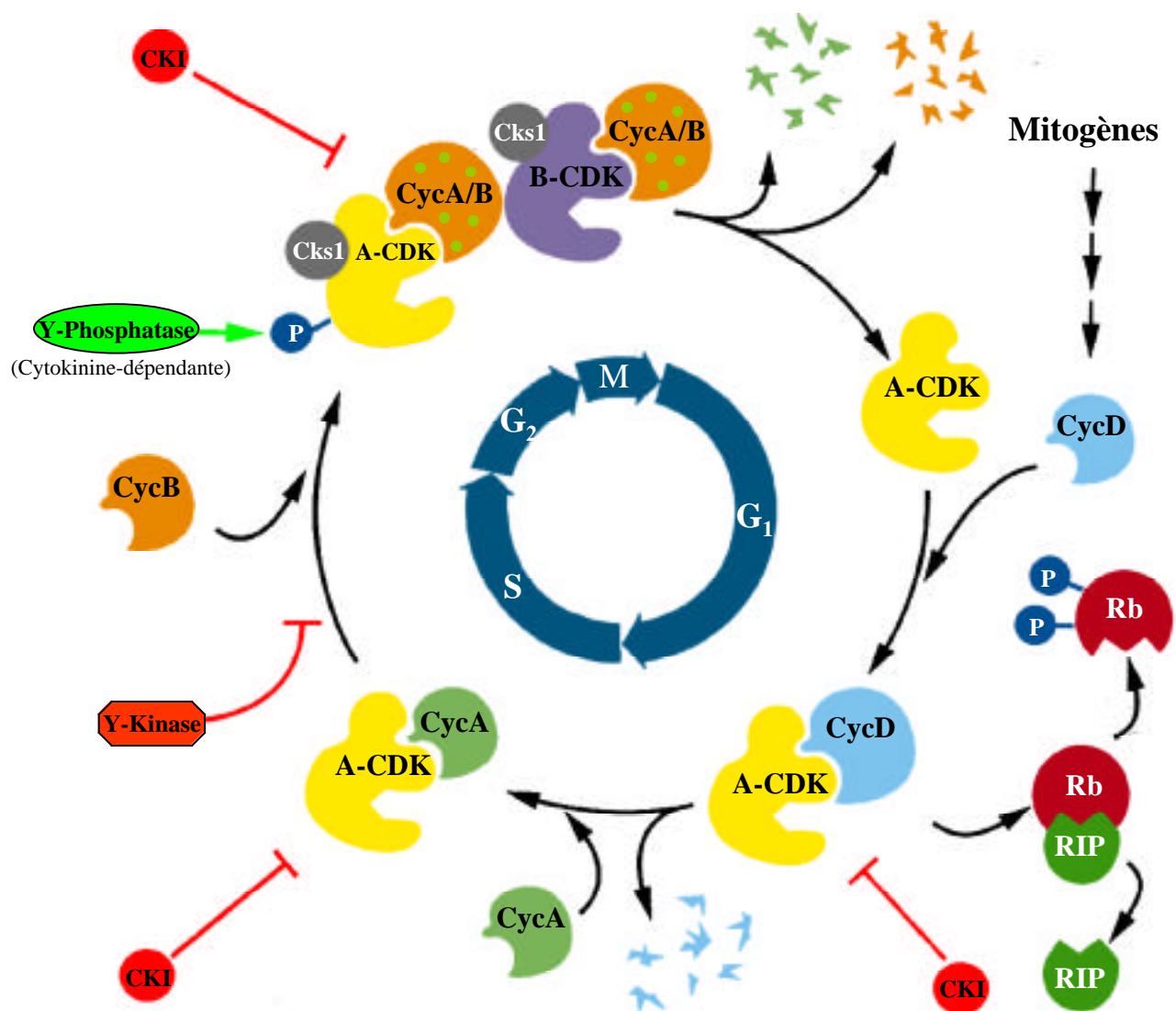
homologue de *wee1* a été isolé chez le maïs et le produit de ce gène inhibe l'activité CDK de maïs *in vitro* (Sun *et al.*, 1999). Enfin, une lignée transgénique de tabac surexprimant *cdc25* de levure, possèdent des cellules de petite taille suggérant que l'expression de *cdc25* favorise la mitose avant que la cellule n'ait atteint la taille requise pour la division (Bell *et al.*, 1993; McKibbin *et al.*, 1998). De plus, l'expression de *cdc25* permet de compenser l'absence de cytokinine, hormone de croissance, du milieu de culture (John, 1998). Cependant, il n'existe que peu d'évidences directes du contrôle des CDK par phosphorylation. A ma connaissance, seul Zhang et collaborateurs (1996) ont montré que, chez le tabac, la protéine reconnue par l'anticorps anti-PSTAIRE est phosphorylée sur tyrosine lorsque les cellules BY-2, cultivées dans un milieu dépourvu de cytokinine, sont arrêtés en G₂. Les CDK purifiées à partir de ces extraits sont activées par *cdc25a* de levure et, de plus, l'ajout de cytokinine au milieu diminue la phosphorylation sur tyrosine de la CDK PSTAIRE, et permet l'activation des CDK. Ces résultats suggèrent l'importance de la phosphorylation sur tyrosine dans la régulation des CDK végétales. Cependant, les plantes transgéniques de tabac et d'*Arabidopsis*, qui expriment l'allèle doublement muté de *cdc2aAt* T14A/Y15F (supposé être constitutivement actif), se développent apparemment normalement. Il apparaît donc probable, qu'à l'instar de ce qui est observé chez *S. cerevisiae*, un autre mécanisme de régulation indépendant des ces phosphorylations existe et soit suffisant au fonctionnement correct des CDK chez les plantes mutantes.

La figure 14 présente un schéma récapitulatif des connaissances acquises sur la régulation des CDK au cours du cycle cellulaire des végétaux.

E.4.LES MECANISMES DE SURVEILLANCE DU CYCLE CELLULAIRE CHEZ LES VEGETAUX

La littérature sur le cycle cellulaire végétal ne fait pas directement état des mécanismes de surveillance existant chez les plantes, à l'exception d'une étude récente qui montre que le stress oxydatif diminue l'activité H1 kinase et stoppe le cycle cellulaire (Reichheld *et al.*, 1999). Cependant, l'utilisation d'inhibiteurs de la réplication de l'ADN ou de la polymérisation des microtubules pour synchroniser les populations, indique implicitement que des mécanismes de

Figure 14 : Modèle du contrôle du cycle cellulaire végétal



Ce modèle prend en considération les différentes connaissances acquises sur les gènes et les protéines intervenant dans le cycle cellulaire végétal et s'appuie sur les fonctions qu'ont ces protéines dans des systèmes hétérologues. La stimulation mitogénique entraîne la synthèse des cyclines D, qui s'associent aux CDK de type A. Ces complexes phosphorylent la protéine du rétinoblastome (Rb), ce qui conduit au relargage de protéines avec lesquelles Rb interagit (RIP) et, en conséquence, à l'entrée en phase S. La synthèse des cyclines A, lors de la phase S, permet la formation des complexes actifs CDK de type A/cycline A. À la fin de la phase S, les complexes CDK/cycline sont inhibés par phosphorylation. Les cyclines B sont synthétisées en G2. Les deux types de CDK A et B sont actives à la transition G2/M et s'associeraient toutes deux, aux cyclines B. Leur activation serait permise par la déphosphorylation du résidu inhibiteur tyrosine. Ce processus a été montré être dépendant des cytokinines. La présence du facteur Cks1 serait également nécessaire à la mitose. Les séquences spécifiques trouvées chez les cyclines A et B, suggèrent qu'elles sont dégradées durant la phase M. L'arrêt du cycle serait provoqué par association de CKI avec les cyclines de types A. *D'après Mironov et al., 1999.*

contrôle empêchant la mitose, lorsque la réplication est incomplète ou l’assemblage du fuseau défectueux, sont présents (Planchais *et al.*, 1997; Binarová *et al.*, 1998). Les cibles et les acteurs de ces mécanismes de contrôle ne sont, à ce jour, pas caractérisés. En ce qui concerne le point de restriction R (START), chez les levures et les animaux, qui peut être considéré comme un mécanisme de surveillance du cycle par rapport aux conditions extérieures, il est important de remarquer que les cellules végétales peuvent sortir et ré-entrer dans le cycle en phase G₂. Ce phénomène, illustré par le blocage des cellules de tabac en G₂ en l’absence de cytokinine (Zhang *et al.*, 1996) est spécifique des cellules végétales et sous-entend que des mécanismes de régulation supplémentaires existent chez les végétaux.

III. DEVELOPPEMENT ET VOIES DE SIGNALISATION PAR PHOSPHORYLATION

A. GENERALITES

Le développement d'un nouvel organisme requiert la différenciation et la croissance coordonnées de ses cellules. Pour ce faire, chaque cellule doit avoir la capacité d'intégrer spécifiquement de nombreux signaux provenant de l'environnement (endosperme chez les plantes à fleurs, utérus chez les mammifères) et des cellules embryonnaires voisines. La réponse cellulaire consiste, le plus souvent, en l'activation de gènes spécifiques, mais réside également dans la régulation post-traductionnelle de protéines qui permettent des changements métaboliques et/ou une réorganisation du cytosquelette. La transduction du signal utilise des mécanismes universels et ubiquitaires qui sont retrouvés aussi lors de l'embryogenèse. Ainsi, dans l'activation des lymphocytes T, la chaîne principale de transduction du signal est analogue à celle intervenant lors de l'établissement de l'axe dorso-ventral chez l'embryon de drosophile (revue par Hoffman *et al.*, 1999).

B. IMPORTANCE DES KINASES

La perception d'un signal extracellulaire se fait généralement à la surface de la cellule *via* un récepteur protéique qui enclenche la phosphorylation en cascade de protéines en aval, et régule, ainsi, leur activité. Les cascades de phosphorylation reposent principalement sur l'activité de deux types de kinases : les serine/thréonine-kinases (S/T-kinases) et les tyrosine-kinases (Y-kinase). Certaines MAP kinases (Mitogene Activated Protein) peuvent phosphoryler les trois résidus (Hanks et Hunter, 1995, Schenk et Snaar-Jagalska, 1999). Plus rarement, les résidus aspartyl, glutamyl ou histidyl peuvent également être phosphorylés par des kinases particulières. Les gènes de kinases représentent entre 1 et 3% du génome eucaryote (Hunter,

1991; Hunter et Plowman, 1997) et une même cellule de mammifère peut contenir une centaine de kinases différentes, dont la plupart sont des S/T-kinases. Chez les animaux, bien que les protéines phosphorylées sur tyrosine représentent moins de 0,1% des phosphoprotéines, les protéines tyrosine-kinases (PTK) jouent un rôle prépondérant dans la signalisation faisant intervenir des récepteurs catalytiques (fonctionnant comme des enzymes ou associés à des enzymes) (Posada et Cooper, 1992) et régulent un large éventail de réponses cellulaires (Parsons et Parsons, 1997). Ainsi, les récepteurs aux facteurs de croissance (EGF, PDGF, NGF pour Epidermal-, Platelet-Derived- et Nerve- Growth Factor) possèdent une activité tyrosine-kinase intrinsèque. Les intégrines, protéines transmembranaires d'adhésion cellulaire, sont couplées à des PTK particulières, les FAK (pour Focal Adhesion Kinase), qui enclenchent les réponses nécessaires à l'adhésion cellulaire. Les réponses sécrétoires font également intervenir des PTK.

Chez les végétaux, aucun gène de PTK n'a pu être isolé, bien que des activités tyrosine-kinases aient été caractérisées (Torruela *et al.*, 1985; Duerr *et al.*, 1993; Islas-Flores *et al.*, 1998). Parmi les quelques 650 séquences de kinases végétales répertoriées à ce jour (sur 3700 séquences de protéines kinases eucaryotes), des kinases typiquement végétales se distinguent des kinases eucaryotes classiques (Stone et Walker, 1995) : les CDPK, pour "Calcium Dependent Protein Kinases", sont directement dépendantes du calcium et ne requièrent aucun intermédiaire (calmoduline, phospholipides ou diacylglycérol) pour être activées. Elles diffèrent, en cela, des kinases dépendantes des complexes calcium/calmoduline (CaMK) et des protéines kinases C (PKC). Les RLK (Receptor Like Kinase) sont des récepteurs transmembranaires catalytiques à activité S/T kinase mais ont une structure analogue aux récepteurs tyrosine-kinase des animaux (revue par Becroft, 1998; Stone et Walker, 1995).

C.LES CASCADES DE PHOSPHORYLATION

C.1.DANS LA POLARISATION CELLULAIRE

L'établissement de la polarité cellulaire réside dans la création et le maintien de domaines subcellulaires particuliers, dont la localisation spécifique oriente des phénomènes cellulaires tels que la croissance, ou encore la différenciation. La polarisation est donc d'une importance capitale pour le contrôle de processus fondamentaux qui interviennent largement dans la morphogenèse.

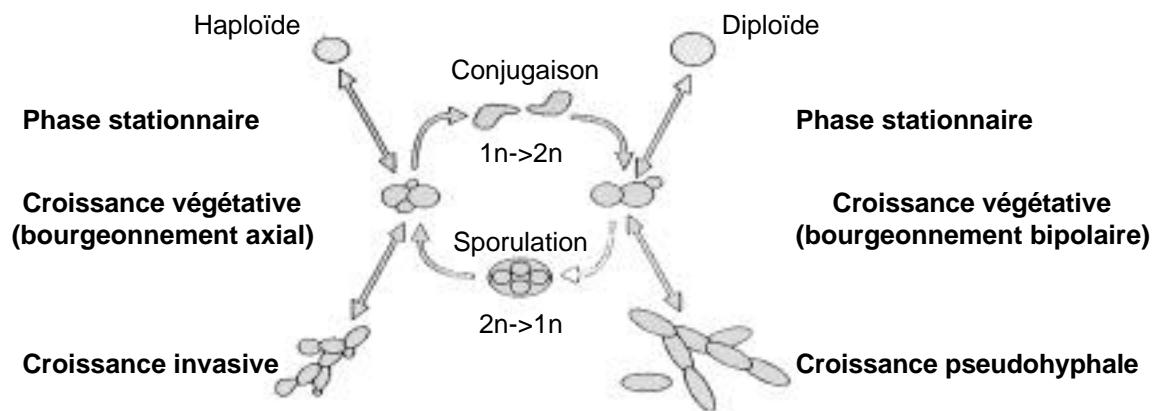
La levure bourgeonnante est soumise à de multiples événements de polarisation au cours de sa vie (bourgeonnement, conjugaison, croissance pseudohyphale) et représente un modèle classique d'étude de la polarisation (revue par Cid *et al.*, 1995). Chez les animaux pluricellulaires, l'adhésion (inter)cellulaire à l'origine de la polarisation cellulaire, joue un rôle fondamental dans les processus de différenciation, de prolifération et de migration cellulaire (Gumbiner, 1996; Drubin et Nelson, 1996). Dans ces systèmes, biologiquement et phylogénétiquement très éloignés, des mécanismes analogues sont utilisés lors de la polarisation cellulaire. La perception du signal conduit au recrutement, en un site défini, de molécules qui vont former un complexe informationnel servant à la réorganisation du cytosquelette d'actine et à l'activation des gènes, dont les produits amplifient le phénomène de polarisation et/ou modifient la physiologie de la cellule (figure 16). La transduction de l'information fait intervenir des cascades de phosphorylation.

C.1.1.Polarisation chez *Saccharomyces cerevisiae*

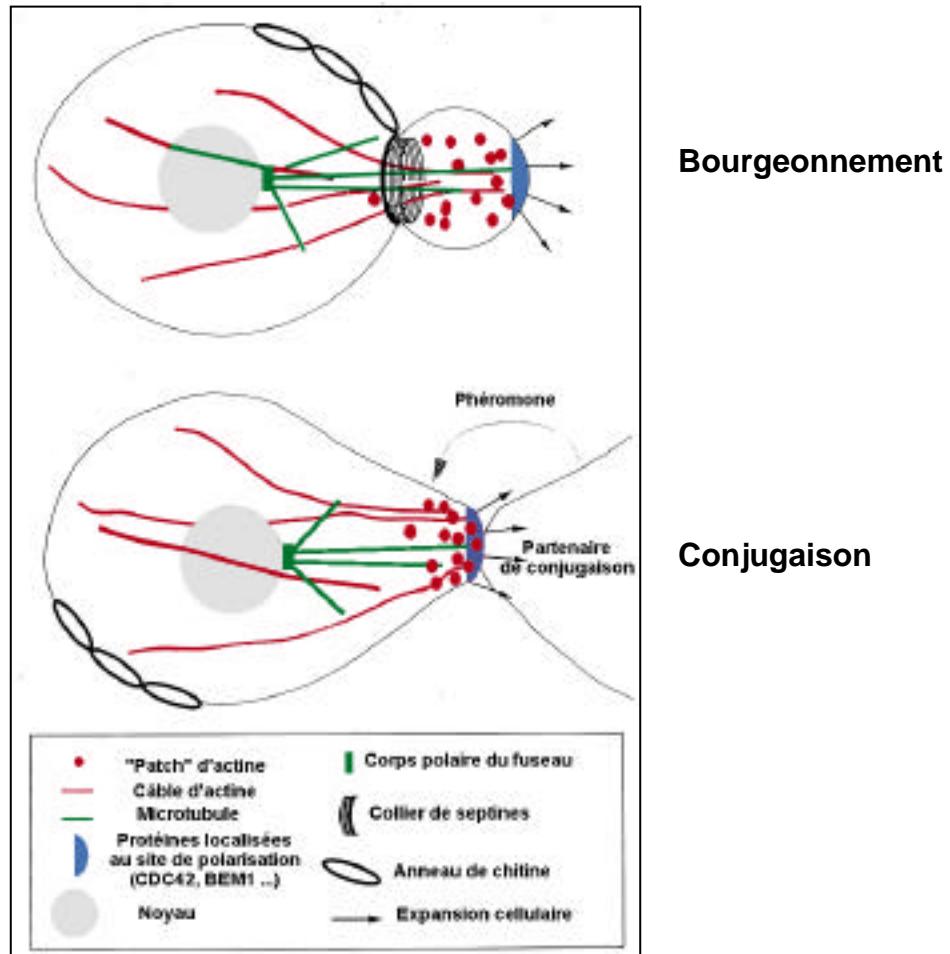
La levure bourgeonnante réalise sa croissance et sa division cellulaire de manière polarisée. Son cycle de vie et sa morphogenèse sont définis par les conditions nutritionnelles du milieu (figure 15) (Cid *et al.*, 1995). Dans des conditions favorables, les organismes diploïdes se multiplient par bourgeonnement d'une cellule fille suivie d'une division asymétrique (croissance végétative). En conditions limitantes, les levures peuvent soit entrer dans une phase stationnaire, soit entamer une croissance pseudohyphale, où des chaînes de cellules sont formées (ce qui facilite l'accès aux nutriments), ou encore sporuler pour donner des levures haploïdes. Ces levures haploïdes se multiplient également de manière végétative et peuvent,

Figure 15 : Cycle de vie et morphogenèse de la levure bourgeonnante, *Saccharomyces cerevisiae*

A



B



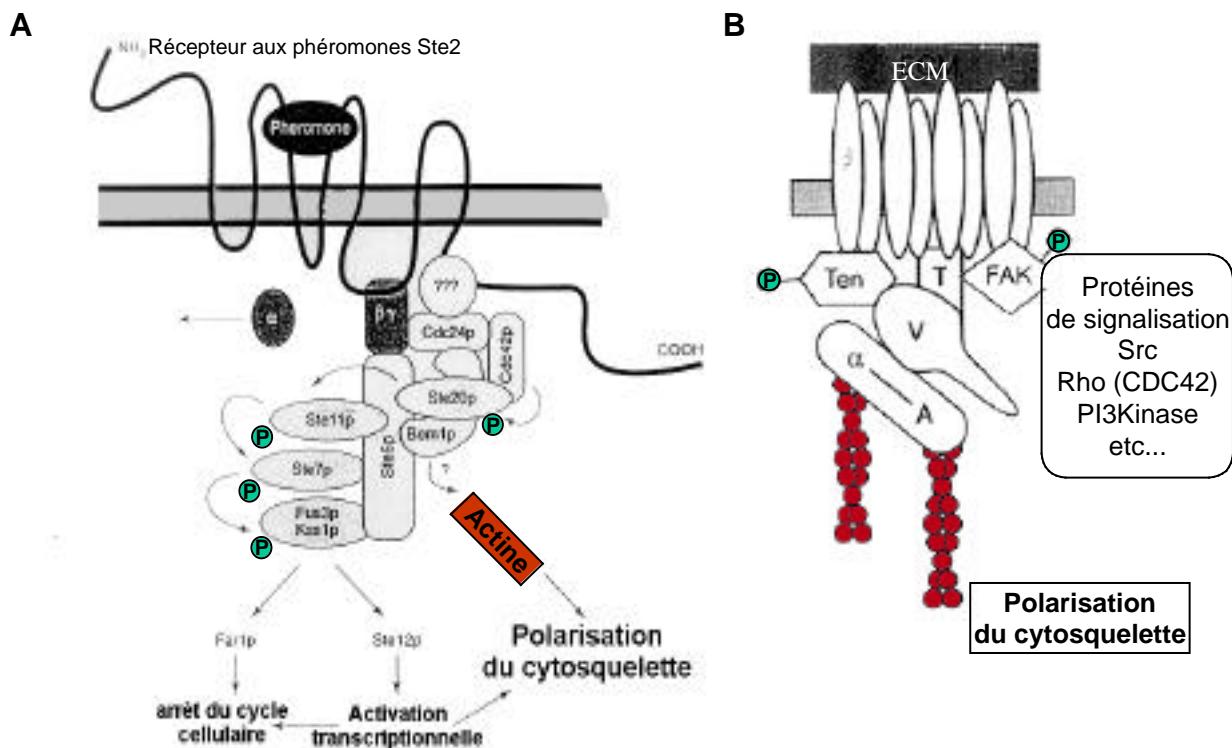
Description dans le texte principal. *D'après Kron et Gow, 1995 et d'après Chant, 1996.*

lorsque les conditions redeviennent favorables, conjuguer pour générer un organisme diploïde (figure 15). La croissance polarisée, qui intervient pour chacun de ces événements morphogénétiques, implique la sélection du site de croissance et son orientation, puis la reconnaissance de ce site par la cellule. La réorganisation du cytosquelette, en conséquence, oriente les sécrétions polarisées et permet l'émergence du bourgeon (figure 15 B). Seuls les microfilaments d'actine (et non les microtubules) sont nécessaires à la croissance polarisée (Roemer *et al.*, 1996). Trois protéines principales sont essentielles à l'organisation du cytosquelette d'actine (figure 16 A) : CDC42, CDC24 et BEM1 (respectivement GTPase, protéine échangeuse GDP-GTP sur CDC42, et protéine à motif SH3 du cytosquelette) servent de relais membranaire pour l'activation de S/T-kinases de la famille PAK (STE20, SKM1 et CLA4) qui régulent la dynamique et l'ancrage du cytosquelette d'actine. Lors de la croissance pseudohyphale ou de la conjugaison, STE20 active des voies de MAP kinases (STE11, STE7, FUS3 ou KSS1) qui activent, à leur tour, la transcription de gènes nécessaires aux événements morphogénétiques (Roemer *et al.*, 1996; Johnson, 1999) (figure 16 A).

C.1.2.Les adhésions focales

Chez les animaux, le contact des cellules avec la matrice extracellulaire (*via* les intégrines) résulte en l'organisation d'un complexe supramoléculaire, dénommé adhésion focale, qui comprend des molécules signalisatrices et des molécules du cytosquelette (figure 16 B). A la taline et aux filaments d'actine qui se localisent précocement, s'ajoutent les molécules de vinculine et d'autres protéines du cytosquelette. Un module GTPase, similaire à celui que nous avons décrit chez la levure, active l'expression de gènes spécifiques par l'intermédiaire de la kinase PAK et de la voie des MAP kinases. En revanche, à la différence de ce qui se passe chez les levures, les adhésions focales contiennent de nombreuses tyrosine-kinases qui sont nécessaires à la signalisation par le complexe. Les deux kinases principales, la FAK (Focal Adhesion Kinase) et la protéine p60^{c-Src}, sont localisées aux adhésions et travaillent de concert pour intégrer les signaux d'adhésion et de division cellulaire (Craig et Johnson, 1996).

Figure 16 : Exemples de cascades de phosphorylation contrôlant la polarisation cellulaire



A. Modèle d'établissement de la croissance polarisée en réponse aux phéromones, lors de la conjugaison chez *S. cerevisiae*. La liaison de la phéromone au récepteur Ste2 conduit à l'activation de gènes spécifiques, à l'arrêt du cycle cellulaire et à la polarisation du cytosquelette ainsi qu'à la croissance au site où la concentration en phéromone est la plus élevée. Ces réponses sont le résultats de l'activation de protéines G et de la voie des MAP kinases (voir texte principal). *D'après Roemer et al., 1996.*

B. Complexe de l'adhésion focale dans les fibroblastes. La liaison des intégrines à la matrice extracellulaire (ECM) provoque leur regroupement au site d'adhésion, et le recrutement de protéines du cytosquelette, telles que la tensine (T), la vinculine (V) et l'alpha-actinine (-A) et de la protéine kinase FAK ainsi que d'autres molécules signalisatrices. La tensine et la FAK sont phosphorylées sur tyrosine, une fois qu'elles sont recrutées. La combinaison de ces événements induit la colocalisation de l'actine et de la paxilline phosphorylée au site d'adhésion. *D'après Craig et Johnson, 1996.*

C.2.DANS L'ETABLISSEMENT DE LA POLARITE EMBRYONNAIRE

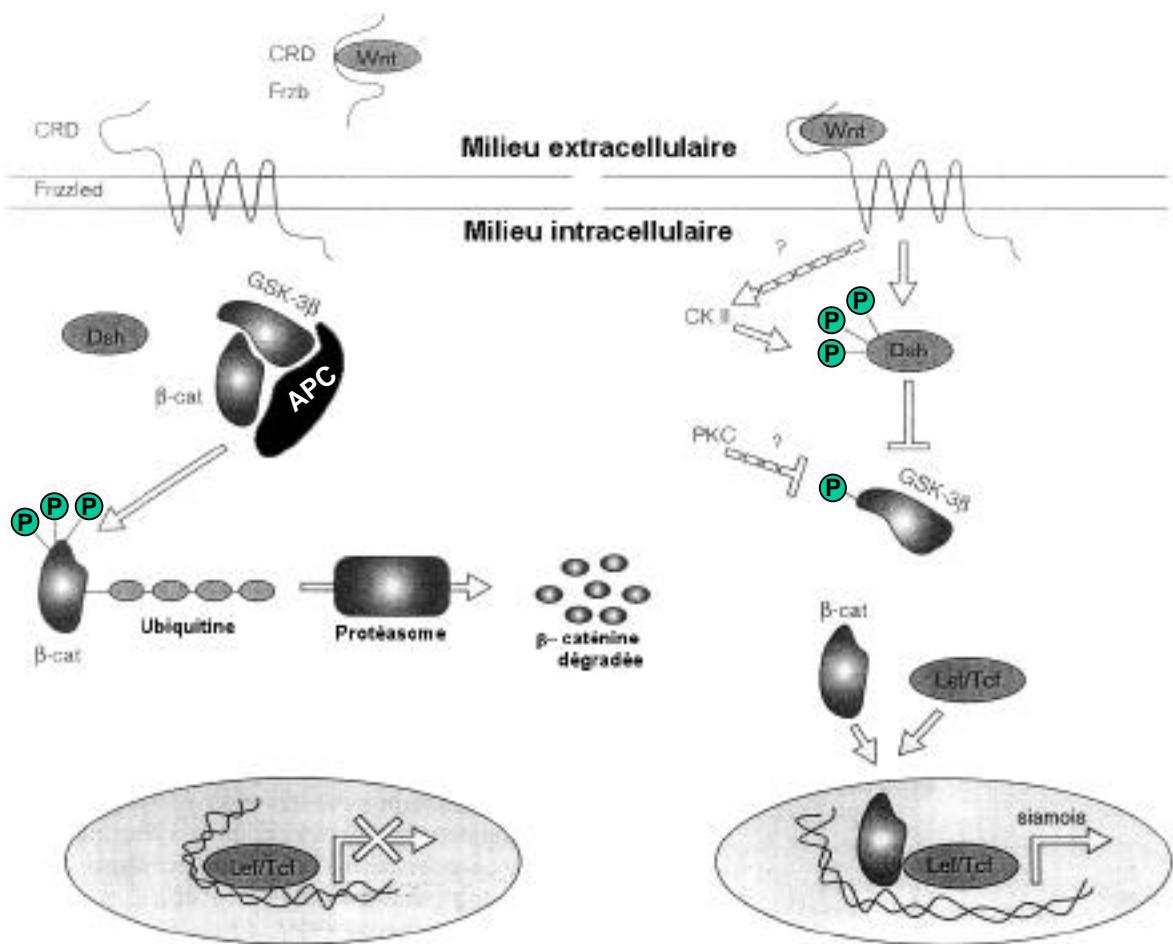
Du fait de leur rôle dans l'adhésion et la migration cellulaire, les récepteurs tyrosine-kinases (RTK) interviennent pour beaucoup dans l'embryogenèse animale, où ces deux fonctions sont essentielles à l'embryogenèse (Tanaka *et al.*, 1998; Partanen *et al.*, 1998). Chez la drosophile, le récepteur Toll, dont la structure extracellulaire est très similaire à celle des récepteurs tyrosine-kinases, est couplé à une S/T kinase, Pelle, et se situe en amont de la voie de transduction conduisant à l'établissement de l'axe dorso-ventral (Galindo *et al.*, 1995).

L'établissement de l'axe dorso-ventral chez le xénope, dépend également d'une voie de signalisation (Wnt) dont les acteurs sont bien caractérisés et qui semble intervenir universellement dans les phénomènes de polarisation embryonnaire, tels que le modelage antéro-postérieur des segments de l'embryon de drosophile ou la formation des appendices embryonnaires chez la souris (figure 17) (Miller et Moon, 1996; Moon *et al.*, 1997; Brown et Moon, 1998). *Wnt-1* code une glycoprotéine sécrétée, qui permet par sa liaison au récepteur Frizzled, la phosphorylation de la protéine Dishevelled. Dihevelled inhibe alors la kinase 3 de la glycogène synthase (GSK-3) et permet ainsi la libération de la β -caténine liée à GSK-3. La β -caténine libre active alors l'expression de morphogènes. Les protéines de la famille Wnt sont capables d'induire, à elles seules, la formation ectopique d'un axe dorso-ventral lorsqu'elles sont injectées dans les embryons de xénope, ce qui démontre le rôle primordial de cette voie dans la polarisation des vertébrés (McMahon et Moon, 1989).

C.3.DANS L'EMBRYOGENESE VEGETALE

La recherche sur l'embryogenèse n'a malheureusement pas connu le même engouement dans le domaine végétal que dans le domaine animal et il n'existe que très peu de données sur la signalisation au cours de l'embryogenèse végétale. Chez *Arabidopsis thaliana*, si la caractérisation de mutants de l'embryogenèse, déficients pour la mise en place de l'axe apico-basal et de l'axe radial, a permis de mieux comprendre les mécanismes du modelage de l'embryon (Mayer *et al.*, 1991; Meinke, 1995), les produits des gènes mutés restent souvent à identifier et les régulations auxquelles ils prennent part restent mal comprises. Ainsi, la mutation *monopteros* concerne un gène codant un facteur de transcription impliqué dans la différenciation

Figure 17 : Voie de signalisation par Wnt-1 lors de l'établissement de la polarité embryonnaire



Voie classique de signalisation par Wnt-1. En l'absence de signal, GSK-3 (Glycogene Synthase Kinase) et l'APC (Adenomatous Polyposis Coli tumor suppressor) sont en complexe avec la β -caténine et provoquent sa dégradation par ubiquitination. Dans le noyau, la transcription du morphogène *siamois* est réprimée par le facteur Lef/Tcf. La liaison de Wnt à son récepteur membranaire Frizzled, conduit à l'hyperphosphorylation de Dishevelled (Dsh), en partie par l'intermédiaire de la caséine kinase CKII. Dsh hyperphosphorylée est active et inhibe par phosphorylation, GSK-3 par un mécanisme qui impliquerait la protéine kinase C (PKC). Le niveau de β -caténine augmente en conséquence et cette protéine est transloquée dans le noyau. Elle interagit avec le répresseur Lef/Tcf, levant l'inhibition de la transcription du morphogène *siamois*, qu'elle active également, en interagissant avec l'ADN. *D'après Brown et Moon, 1998.*

du tissu vasculaire qui a lieu dans la région centrale de l'embryon. Cette mutation affecte pourtant, les embryons dans leur région basale et centrale et, à un moindre degré, dans leur région apicale, selon un mécanisme inconnu (Berleth et Jürgens, 1993; Hardtke et Berleth, 1995). La protéine *gnom*, récemment identifiée comme un facteur échangeur de GDP/GTP, intervient dans le transport polarisé de l'auxine et est importante pour le modelage de l'embryon car les mutants *gnom* ne présentent ni région centrale ni région basale (Mayer *et al.*, 1991; Steinmann *et al.*, 1999).

Inversement, des activités kinases ont été identifiées chez les embryons, mais généralement les gènes et/ou les fonctions correspondants restent à préciser. En particulier, bien qu'aucun gène de tyrosine-kinase classique n'ait été identifié, des activités tyrosine-kinases ont été caractérisées dans l'embryon de noix de coco et fluctuent au cours du développement (Islas-Flores *et al.*, 1998). Des changements dans les profils de protéines phosphorylées sur tyrosine s'opèrent également durant le développement, suggérant que les tyrosine-kinases pourraient jouer un rôle régulateur au cours de l'embryogenèse de la noix de coco. Une étude approfondie sur l'embryogenèse somatique de carotte, visant à identifier des marqueurs de compétence embryonnaire des cellules hypocotylaires, indique que l'initiation de l'embryogenèse est corrélée à l'expression d'un gène codant un récepteur de type kinase (RLK), plutôt qu'à la morphologie des cellules (Schmidt *et al.*, 1997). Ce gène est exprimé transitoirement et exclusivement jusqu'au stade globulaire, aussi bien chez les embryons somatiques que chez les embryons zygotiques. De ce fait, il a été dénommé SERK pour "Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase". Le domaine extracellulaire de liaison au ligand de la protéine SERK présente des homologies de structure avec celui de la protéine Toll, car il possède des régions de répétition de leucine (LRR), tandis que le domaine catalytique est analogue à celui de la S/T kinase Pelle. Ces homologies structurales avec des protéines impliquées dans l'établissement de l'axe dorso-ventral de la drosophile, ne permettent cependant pas de statuer sur la fonction de SERK au cours de l'embryogenèse végétale. L'existence de molécules-signal diffusibles et promotrices de l'embryogenèse, tel le facteur Nod, qui est capable de restaurer l'embryogenèse chez des mutants de carotte thermosensibles *ts11* (revue par Schmidt *et al.*, 1994), laisse supposer la présence de récepteurs à ces molécules.

Les protéines de type SERK constituent de bons candidats pour assumer ce rôle. L'expression de gènes de RLK, *clavata1* et *clavata3* (qui serait le ligand de *clavata1*) débute plus tardivement dans l'embryogenèse et se maintient dans les régions méristématiques. Cette expression est essentielle à la mise en place des régions méristématiques (Clark *et al.*, 1993; Clark *et al.*, 1995; Clark *et al.*, 1997; Lenhard et Laux, 1999). De manière générale, les RLK, dont l'identification est en plein essor, semblent être primordiales lors du développement des végétaux mais les acteurs intervenant dans les voies de phosphorylations qu'elles enclenchent restent à identifier (revue par Becroft, 1998).

D.COORDINATION CYCLE CELLULAIRE ET DEVELOPPEMENT

L'orchestration de la croissance et de la différenciation cellulaire est essentielle à la morphogenèse correcte de tout organisme. Chaque cellule doit ajuster son rythme de division à son état physiologique et inversement, afin de maintenir une taille et des interactions avec les cellules voisines adaptées à son intégration dans l'organisme. Les données qui suivent illustrent, en partie, les connaissances acquises sur les interactions qu'il existe entre les trois grandes fonctions que sont la division, la croissance et la différenciation cellulaire chez les animaux, les végétaux et les levures.

D.1.CYCLE CELLULAIRE ET MORPHOGENESE CHEZ LES ANIMAUX

L'augmentation de masse impressionnante, à laquelle sont soumis la plupart des organismes au cours du développement, est accompagnée d'une augmentation coordonnée et précise du nombre de cellules. La coordination de la division et de la croissance cellulaire confère à chaque organe une densité cellulaire appropriée et assure ainsi, en partie, sa morphologie. Conceptuellement, cette coordination peut s'effectuer de trois manières différentes mais non exclusives : la progression au cours du cycle peut contrôler la croissance, la croissance peut contrôler la progression au cours du cycle, ou ces deux événements peuvent être régulés, à un niveau supérieur, par une voie de signalisation commune (revue par Neufeld et Edgar, 1998). La différenciation cellulaire, quant à elle, est couplée, chez les animaux, à une sortie du cycle

cellulaire, ce qui implique une régulation du cycle par les facteurs de différenciation. Les molécules contrôlant la progression en G_1 , telles que les cyclines D et certaines CKI, précédemment évoquées, jouent le rôle de médiateurs de ces facteurs.

Peu de données de la littérature supportent l'existence d'un contrôle de la croissance et de la différenciation par le cycle cellulaire. La surexpression des cyclines de G_1 (D1 et E) dans les cellules animales provoque la division précoce des cellules, ce qui conduit à la réduction du volume cellulaire (Ohtsubo et Roberts, 1993; Quelle *et al.*, 1993; Resnitzky *et al.*, 1994). De manière similaire, l'expression ectopique de *E2F* ou de son antagoniste *RBF* (apparentée à la protéine du rétinoblastome), dans l'aile de drosophile, mènent respectivement à une augmentation ou à une diminution des taux de divisions mais la taille des territoires occupés par ces petites ou grosses cellules reste similaire. De plus, la surexpression du gène délétér de *cdc2*, dans les ailes de drosophiles, conduit à la formation d'ailes de forme et de taille normales mais qui sont constituées de grosses cellules, dont le nombre est réduit par rapport à la normale (Weigmann *et al.*, 1997). Ce résultat met en évidence un découplage total entre la morphogenèse et la division. Enfin, chez *Caenorhabditis elegans*, la mutation du gène *cul-1*, probablement impliqué dans la dégradation programmée de cyclines de G_1 , conduit à la formation d'un animal avec plus de cellules, mais chez qui la plupart des aspects de la détermination et de la différenciation cellulaire s'effectuent normalement (Kipreos *et al.*, 1996). Ces données suggèrent donc que la croissance et la morphogenèse sont indépendantes du cycle cellulaire.

Il faut néanmoins noter que le ralentissement ou l'arrêt du cycle cellulaire lors du développement précoce de l'aile de drosophile supprime la croissance, ce qui suggère qu'avant que la croissance devienne autonome par rapport au cycle cellulaire, une taille minimale viable doit être atteinte, ou que la croissance est limitée par le nombre de molécules d'ADN matriciel (Weigmann *et al.*, 1997; Neufeld *et al.*, 1998). De plus, chez l'embryon de drosophile, la mutation délétère du gène *dacapo*, qui code une CIP/KIP spécifique du complexe cdk2/cycline E, est létale (Lane *et al.*, 1996). L'importance de la CKI, p27, dans le développement de la souris, vient également nuancer l'idée d'une autonomie totale de la morphogenèse vis à vis du cycle cellulaire. En effet, la mutation p27-/- cause, en plus de multiples anomalies mineures, de

graves désordres dont une absence de différenciation des cellules lutéales, en partie responsable de la stérilité des femelles, et une différenciation anormale des cellules photoréceptrices (Nakayama *et al.*, 1996). Ces anomalies ne peuvent être attribuées à une incapacité des cellules à sortir du cycle cellulaire car les cellules de souris p27/- répondent de la même manière que les cellules normales, au facteur antiprolifératif TGF- β et conservent leurs propriétés d'inhibition de contact. P27 aurait donc un rôle spécifique dans le contrôle de la différenciation.

Le contrôle du développement de l'oeil de drosophile par la protéine roughex, illustre, quant à lui, la nécessité d'une régulation du cycle cellulaire pour la différenciation correcte des cellules de la rétine. La protéine roughex régulerait le niveau de cycline A, ce qui permettrait le maintien des cellules en phase G₁. La mutation du gène *roughex* conduit les cellules à entrer prématulement en phase S, et mène, à terme, à une différenciation anormale et à une mort cellulaire, probablement en raison de la rupture des interactions cellulaires nécessaires au développement (Thomas *et al.*, 1994). Il apparaît donc, que si dans la majorité des cas, le cycle cellulaire ne contrôle pas directement la croissance cellulaire, les régulateurs du cycle cellulaire peuvent être essentiels à la différenciation de cellules particulières.

La croissance cellulaire pourrait, quant à elle, contrôler le cycle cellulaire, notamment en régulant la synthèse de cdk4, des cyclines D et de p27 par un mécanisme similaire à celui opérant sur la synthèse de la cycline CLN 3 de levure (voir ci-dessous). Chez les mammifères, les hormones et les interactions cellulaires pourraient jouer un rôle de médiateur entre la croissance et le cycle cellulaire, en régulant la synthèse des protéines du cycle cellulaire en fonction de l'état physiologique de la cellule, mais ceci reste à démontrer.

Il apparaît probable que la coordination du cycle et de la croissance et/ou de la morphogenèse cellulaire s'effectue par l'intermédiaire de facteurs agissant à des embranchements en aval d'une voie de signalisation commune. La voie de signalisation "ras" activée en réponse à des facteurs mitogènes et lors de nombreux phénomènes de différenciation cellulaire, pourrait coordonner ces trois processus. Ras régule le facteur de traduction eIF4, responsable de l'augmentation de la synthèse protéique globale qui est nécessaire à la croissance, et ras régule également la transition G₁/S via la protéine du

rétinoblastome. En effet, l'expression de dominants négatifs de ras, dans des cellules quiescentes, abolit l'induction des cyclines D1, la dégradation de p27 ainsi que l'activation des gènes sous le contrôle de E2F et, en conséquence, bloque l'entrée des cellules stimulées en phase S (Aktas *et al.*, 1997). La protéine du rétinoblastome apparaît être une cible clé de ras, pour la réalisation de ces événements, puisqu'en son absence l'expression de dominants négatifs de ras ne bloque pas l'entrée en phase S (Peeper *et al.*, 1997). Plus généralement, la protéine du rétinoblastome semble être un bon candidat pour intégrer les différents signaux cellulaires et coordonner le cycle, la croissance et la différenciation cellulaire. En effet, Rb régule les ARN polymérases I et III, qui assurent la synthèse des ribosomes et des ARN de transfert, et exerce de ce fait un contrôle global sur la synthèse protéique nécessaire à la croissance cellulaire (Bartek *et al.*, 1996). De plus, l'interaction entre Rb et le facteur de transcription Myo-D, qui contrôle l'expression de gènes requis pour la différenciation musculaire, est nécessaire à l'activité de Myo-D (Gu *et al.*, 1993).

Nous avons précédemment exposé le cas particulier des embryons précoce animaux, chez lesquels la plupart des contrôles et des mécanismes de surveillance du cycle cellulaire sont absents. Dans les embryons plus âgés, chez qui la différenciation s'opère, la coordination cycle cellulaire-morphogenèse ne semble pas être aussi étroite que dans les cellules somatiques. Ainsi, chez les embryons de xénopé au stade neurula, le blocage de la réplication par des inhibiteurs d'ADN polymérases inhibe la division, mais n'affecte pas le développement pendant les 40 heures suivante (Rollins et Andrews, 1991). De manière analogue, l'embryon d'oursin traité par l'aphidicoline au stade "vegetal-plate", se développe jusqu'au stade pluteus (Stephens *et al.*, 1986). Chez la drosophile, les premiers cycles syncitiaux rapides sont indépendants de la croissance, puis, après la cellularisation, une régulation plus affinée du cycle cellulaire s'instaure progressivement sous l'influence de voies de différenciation (revue par Edgar, 1995). La dégradation des phosphatases cdc25 maternelles serait responsable de l'apparition de la phase G2 dans le quatorzième cycle (transition mid-blastula). Les cycles cellulaires sont alors contrôlés en G₂/M grâce à la régulation transcriptionnelle zygotique de cdc25 (*string*) (Edgar et Lehner, 1996). Ces cycles ne présentent pas de phase G₁, phase habituellement utilisée pour la coordination des contrôles cycle cellulaire-

croissance/morphogenèse, et conduisent à la formation de cellules de plus en plus petites. Par la suite (cycle 17) la déplétion de la cycline E maternelle et l'expression d'une CKI (*dacapo*) agissent de concert pour stopper le cycle en phase G₁ dans la plupart des cellules. Il est intéressant de noter que lors de la morphogenèse l'expression zygotique de *string*, de la *cycline E* et de *dacapo* (CIP/KIP) est contrôlée par des facteurs de différenciation (Duronio et O'Farrel, 1994; Penton *et al.*, 1997; Johnston et Edgar, 1998).

D.2. CYCLE CELLULAIRE ET MORPHOGENÈSE CHEZ LES VÉGÉTAUX

L'absence de migration cellulaire chez les végétaux a longtemps laissé présumer que la morphogenèse végétale était directement dépendante de l'orientation des plans et du taux de division cellulaire. Cependant, les connaissances actuelles tendent à montrer que l'orientation et la fréquence des divisions ne sont pas tant des déterminants de la morphogenèse végétal que des outils utilisés, parmi d'autres, pour façonner l'organisme.

L'orientation transversale des plans de division par rapport à l'axe de croissance semble être, plus souvent, la conséquence que la cause de la croissance polarisée (Green, 1976). En effet, en l'absence de divisions cellulaires, les germes de blé effectuent correctement l'initiation des primordia racinaires latéraux et la morphologie des jeunes feuilles est normale (revue par Hemerly *et al.*, 1999; Foard *et al.*, 1965). L'indépendance entre la morphogenèse et l'orientation des plans de division, est également illustrée par les mutants *fass* d'*Arabidopsis* et *tangled* de maïs. Chez ces mutants, dans lesquels les divisions ne sont pas correctement orientées, la formation de l'axe de polarité apical-basal, la structuration de la plante (*fass*) et la morphologie des feuilles (*tangled*) sont apparemment normales (Torres-Ruiz et Jürgens, 1994; Smith *et al.*, 1996).

L'approche génétique, consistant à manipuler des effecteurs du cycle cellulaire, conforte l'idée selon laquelle la morphogenèse végétale ne dépend pas du cycle cellulaire. En effet, l'expression d'un allèle dominant négatif de *cdc2a* d'*Arabidopsis* (*cdc2aAt*) dans le tabac conduit à la formation de plantes possédant un nombre restreint de cellules mais présentant une morphologie normale (Hemerly *et al.*, 1995). A l'inverse, chez *Arabidopsis*, l'expression du gène de cycline A (*cyc1aAt*), sous le contrôle du promoteur de *cdc2aAt*, résulte en la formation de

longues racines, qui contiennent un nombre accru de cellules, mais dont la morphologie globale n'est pas affectée (Doerner *et al.*, 1996). Les mutants de l'embryogenèse *titan1*, chez lesquels la mitose est affectée, sont constitués de cellules géantes, mais possèdent une forme voisine de celle des embryons normaux, ce qui suggère que la croissance et la morphogenèse seraient également découplées du cycle cellulaire chez les embryons (Liu et Meinke, 1998).

Il faut cependant noter que les jeunes plantules de tabac exprimant le gène *cdc2a* muté non fonctionnel présentent initialement des anomalies prononcées de développement (Hemerly *et al.*, 1995). Des résultats préliminaires indiquent que les embryons d'*Arabidopsis* qui expriment ce même gène muté sous le contrôle d'un promoteur spécifique de l'embryogenèse ne germent pas ou se développent en de jeunes plantules anormales. L'interprétation de ces résultats reste difficile en l'absence d'une analyse détaillée de la morphologie des embryons précoce (De Veylder *et al.*, 1998). Une étude récente démontre le rôle de *cdc2bAt* dans la morphogenèse de la plantule d'*Arabidopsis* à l'obscurité (Yoshizumi *et al.*, 1999). L'expression de *cdc2b* est corrélée à l'elongation de l'hypocotyle et l'inhibition de *cdc2b* par des ARNm antisens conduit, à l'obscurité, à la formation d'une plantule à hypocotyle court et cotylédons ouverts. Ce phénotype correspond à celui que les plantules adoptent normalement en lumière et résulte d'une elongation restreinte de l'hypocotyle plutôt que de la diminution du nombre de cellules. Cdc2b interviendrait également dans la différenciation des plastes. L'expression de *cdc2b* est cantonnée aux cellules en prolifération et fluctue au cours du cycle (Segers *et al.*, 1996), ce qui suggère que *cdc2b* pourrait assurer un rôle de coordinateur entre la régulation du cycle cellulaire et le développement. Néanmoins, le rôle de *cdc2b* dans la progression au cours du cycle cellulaire n'a, à ce jour, pas été clairement défini. Il reste donc à déterminer si cette protéine, apparentée aux CDK, joue un rôle exclusivement lors du développement, à l'image de *cdk5* dans le développement neuronal animal, ou si elle intervient également dans la régulation du cycle cellulaire. L'intervention d'inhibiteurs du cycle dans le contrôle de la différenciation a été récemment illustré chez *Medicago sativa*. L'inhibiteur mitotique *ccs52* est nécessaire à la commutation du programme de division au programme de différenciation des nodules rhizoïdien, lors de la symbiose entre *Rhizobium meliloti* et *Medicago sativa* (Cebolla *et al.*, 1999). Aussi, si la plupart des résultats obtenus à ce jour indique que la morphogenèse serait indépendante du

cycle cellulaire, ces récentes découvertes incitent à la prudence quant à une conclusion définitive.

La coordination entre le cycle cellulaire et le développement pourrait être assurée par des voies de signalisation en amont de la régulation du cycle cellulaire, capables d'intégrer les multiples signaux extérieurs, auxquels les plantes répondent. En effet, le nombre anormalement élevé de cellules dans les méristèmes floraux et apicaux des mutants *clavata*, chez lesquels des désordres morphologiques sont également observés, laisse supposer l'existence de mécanismes de coordination entre cycle cellulaire et développement (Clark *et al.*, 1993). Les mutants *shootmeristem-less* présentent, quant à eux, un nombre réduit de cellules et une réduction des organes floraux et foliaires (Clark *et al.*, 1996). Au sein de l'organisme, les interactions cellulaires et l'information de position, qui apparaissent prépondérantes pour la détermination de la forme cellulaire et le contrôle du cycle cellulaire, pourraient orchestrer cette coordination. Ainsi, l'ablation de cellules spécifiques par faisceau laser, réalisée chez *Arabidopsis* et dans l'embryon de *Fucus*, démontre que les cellules avoisinantes sont capables d'enclencher un nouveau programme de division et de différenciation pour remplacer les cellules manquantes, avec une efficacité variable selon leur position dans la plante ou l'embryon (Van den Berg *et al.*, 1995; Bouget *et al.*, 1998).

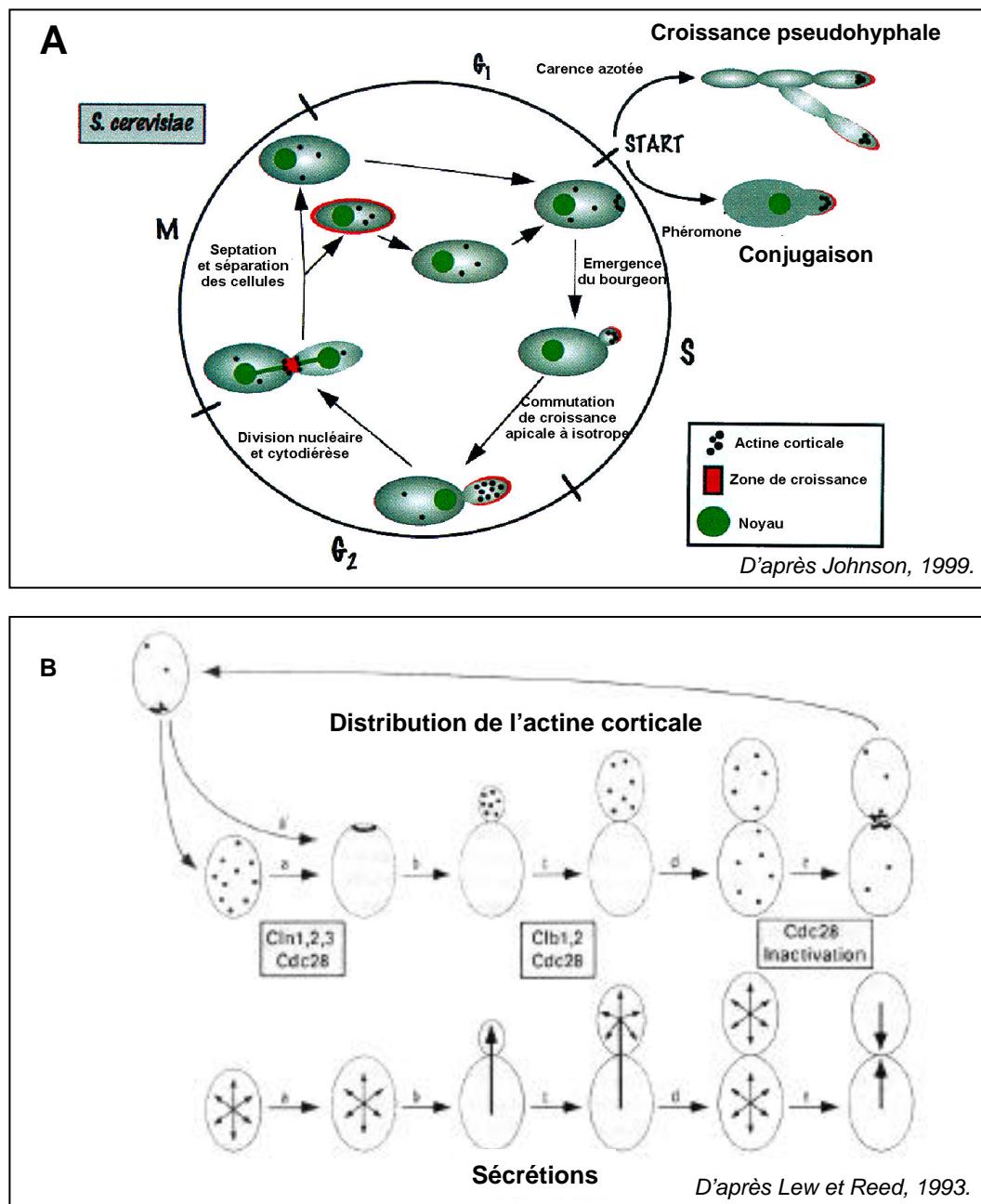
D.3. CYCLE CELLULAIRE ET MORPHOGENESE CHEZ LES ASCOMYCETES

Les levures bourgeonnantes sont des organismes chez lesquels une étroite coordination entre le cycle cellulaire et les événements morphogénétiques a été mise en évidence. Lors de la conjugaison, l'arrêt du cycle cellulaire est rendu possible par l'activation transcriptionnelle de la CKI FAR1, qui est directement enclenchée par la voie des MAP kinases, en réponse aux phéromones (Kron et Gow, 1995) (figure 16). De même, la régulation de la synthèse de la cycline CLN3, en fonction de la qualité du milieu nutritionnel, permet l'arrêt du cycle et du bourgeonnement et l'entrée des levures en phase stationnaire. La qualité du milieu nutritif intervient sur le niveau d'expression de la cycline CLN3, tandis que la croissance cellulaire contrôle le niveau de traduction des ARNm de CLN3 (Polymenis et Schmidt, 1997; Parviz et Heideman, 1998). Le cycle cellulaire et le bourgeonnement sont deux événements très

synchronisés chez la levure (figure 18 A) (revue par Cid *et al.*, 1995). La sélection du site de bourgeonnement a lieu en phase G_1 tardive, l'émergence du bourgeon, qui est précédé par la localisation de l'actine et des autres composants marquant le site de bourgeonnement, s'effectue juste après le point de restriction "START". La croissance du bourgeon s'étend sur les phases G_1 tardive, S, et G_2 et implique une commutation de la croissance apicale en une croissance isotrope du bourgeon. La mutation de *CDC42* ou *CDC24* provoque un retard important à l'entrée en phase G_2 , bien qu'elle autorise le déroulement des événements de division nucléaire. Ce retard constitue un mécanisme de surveillance supplémentaire du cycle cellulaire par la morphogenèse et fonctionne principalement par la phosphorylation inhibitrice de *CDC28*, par la kinase *SWE1*, sur le résidu tyrosine 19 (Lew et Reed, 1995). Une étude récente suggère que les défauts dans l'organisation de l'actine sont à l'origine de l'activation de ce point de contrôle (McMillan *et al.*, 1998).

De plus, il existe chez la levure, un contrôle réciproque de la morphogenèse par les événements du cycle cellulaire (figure 18 B). La polymérisation de l'actine au site de bourgeonnement nécessite l'activité des complexes *CDC28/CLN* à la transition G_1/S (Lew et Reed, 1993). L'activation de *CDC28/CLN* déclenche la polymérisation de l'actine et l'accumulation prématuée de *CLN* conduit au bourgeonnement précoce en G_1 , et ceci en l'absence de traduction, ce qui suggère que *CDC28/CLN* régule directement la mise en place du site de pré-bourgeonnement (figure 18 B). Chez les levures en phase G_2 , l'activation de *CDC28* par les cyclines mitotiques causent la dépolymérisation de l'actine à l'apex du bourgeon. L'absence de cette activation conduit à l'hyperpolarisation et à la formation de bourgeons très allongés. *CDC28/CLB*, semble donc jouer un rôle dans la commutation de la croissance apicale à la croissance isotrope du bourgeon. L'inactivation des complexes mitotiques serait, quant à elle, responsable de la redistribution des structures d'actine du site de bourgeonnement au site de cytodièrèse (sous forme de collier). Ces résultats démontrent le rôle essentiel de *CDC28* dans la régulation du bourgeonnement. Les substrats de *CDC28* intervenant dans la réalisation de ces événements morphogénétiques ne sont pas connus. Il faut cependant noter que la kinase *STE20* est phosphorylée par *CDC28/CLN1-2* au site de bourgeonnement bien que cette phosphorylation ne semble pas influer sur son activité. Cette phosphorylation est, cependant,

Figure 18 : Cycle cellulaire et morphogenèse chez *S. cerevisiae*



A. Représentation schématique des événements morphogénétiques en corrélation avec le cycle cellulaire (voir texte principal). **B.** Modèle du rôle des complexes CDC28/cycline dans le contrôle des transitions morphogénétiques au cours du cycle cellulaire. L'activation de CDC28/CLN au point "START" déclenche la polarisation de l'actine corticale au site de pré-bourgeonnement (a, a'). L'activation de CLB1,2 en G₂ déclenche la dépolarisation de l'actine corticale et des sécrétions (c). L'inactivation de CDC28 en fin de mitose déclenche la redistribution de l'actine corticale et des sécrétions dans la région du collier, ce qui permet la cytokinèse (e). Deux autres transitions, à savoir, (b) la redistribution de l'actine corticale au sein du bourgeon, et (d) dans la cellule mère pourraient également être également sous le contrôle de CDC28.

corrélée à la répression de la voie de la signalisation par les phéromones et pourrait jouer le rôle de commutateur entre les réponses cellulaires mitotiques et celles de la conjugaison (Wu *et al.*, 1998).

Chez *Aspergillus nidulans*, la formation de conidies à partir du mycélium implique des commutations de croissance apicale vers une croissance par bourgeonnement ainsi qu'un découplage entre la mitose et la septation dans certaines parties du conidiophore. Une étude récente, démontre que *NIMX^{cdc2}*, l'homologue de *cdc2*, joue un rôle primordial dans la formation des conidiophores et des conidies. L'activité de *NIMX^{cdc2}* est requise pour la formation de conidies et dépend spécifiquement de la régulation transcriptionnelle de *NIMX^{cdc2}*. De plus, la régulation de *NIMX^{cdc2}* par phosphorylation sur tyrosine est essentielle à la structuration correcte des conidiophores et à la formation des conidies. Cette régulation par phosphorylation n'est pas essentielle pour la progression au cours du cycle cellulaire mais intervient, en partie, lors de l'activation des points de contrôle. Comme chez la levure bourgeonnante, la régulation de *NIMX^{cdc2}* par phosphorylation pourrait constituer un moyen de coordonner le cycle cellulaire et la morphogenèse (Ye *et al.*, 1999).

IV. OBJECTIFS DE LA THESE

Chez le zygote de *Fucus*, la mise en place de l'axe de polarité et son expression morphogénétique (la germination) se produisent au cours du premier cycle cellulaire (0-24 h). De plus, la majorité des traitements inhibant la germination induisent un retard de la division. Ces observations amènent naturellement à se poser la question quant aux liens potentiels existants entre les événements du cycle cellulaire et ceux de la polarisation.

D'autre part, l'ensemble des résultats obtenus sur l'étude de la polarisation donnent une image fragmentaire du phénomène, où le calcium intracellulaire est la seule molécule signalisatrice potentiellement impliquée dans la polarisation. Enfin, l'importance même de la polarisation du zygote pour le modelage de l'embryon, bien qu'implicitement reconnue par les chercheurs travaillant sur ce modèle, reste à préciser. Nous avons donc voulu savoir si des protéines kinases intervenaient dans la polarisation et/ou dans le développement de l'embryon de *Fucus*.

A. CARACTERISATION DU PREMIER CYCLE CELLULAIRE DE *FUCUS SPIRALIS*

Nous nous sommes attachés dans un premier temps à caractériser les phases du cycle cellulaire par l'utilisation conjointe d'outils pharmacologiques, cellulaires et biochimiques. Nous avons évalué le rôle des CDK dans la progression du premier cycle cellulaire et les mécanismes de surveillance intervenant dans ce cycle. Les deux premiers articles répondent donc à des questions s'adressant directement au cycle cellulaire à savoir :

Quelle est la localisation temporelle des phases S et M ? (Chapitre I et II)

Quelles sont les dépendances entre la phase S et M ? (Chapitre I)

Quels événements du cycle cellulaire sont contrôlés par les CDK ? (Chapitre I et II)

Comment ces CDK sont-elles régulées ? (Chapitre I et II)

B. LE CYCLE CELLULAIRE REGULE-T-IL LA POLARISATION ZYGOTIQUE?

Nous nous sommes intéressés aux liens entre le cycle cellulaire et le développement et avons voulu savoir s'il existe un contrôle de la polarité par le cycle cellulaire. Pour ce faire, nous avons défini la corrélation temporelle entre les phases du cycle cellulaire et les événements de polarisation et avons plus particulièrement étudié l'influence de l'activité des CDK sur la polarisation (Chapitre III).

C. EXISTE-T-IL UN CONTROLE DE LA POLARISATION PAR LES KINASES?

Le dernier chapitre relate une étude qui précise le rôle des kinases dans la polarisation précoce du zygote. Les résultats obtenus permettent de déterminer l'importance de l'établissement d'un axe zygotique pour le modelage de l'embryon. Ces travaux, réalisés au cours des premières années de ma thèse, précèdent dans le temps les études concernant la coordination cycle cellulaire et développement. La question de l'existence d'éventuelles interactions entre la polarisation et le cycle cellulaire y apparaît donc peu mais est plus amplement discuté dans la conclusion.

RESULTATS et DISCUSSIONS

ARTICLE 1 :

UN POINT CONTROLE S/M INHIBE LES EVENEMENTS NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES DE LA DIVISION CELLULAIRE, INCLUANT L'ALIGNEMENT DE L'AXE DES CENTROSOMES AVEC L'AXE DE POLARITE, ET INHIBE L'ACTIVATION DES KINASES DEPENDANTES DES CYCLINES DANS LES EMBRYONS PRECOCES DE FUCALES

Cet article met en évidence les relations entre la réplication de l'ADN et la mitose dans les zygotes de Fucales. Alors que dans les cellules somatiques et chez les levures, ces événements sont étroitement dépendants, chez les embryons animaux, le couplage réplication/mitose fait souvent défaut. Nous avons analysé les répercussions de l'inhibition de la réplication sur les événements cellulaires et biochimiques de la mitose. En absence de réplication, la rupture de l'enveloppe nucléaire ainsi que la condensation des chromosomes n'ont pas lieu et la formation du fuseau mitotique est inhibée. Nous avons voulu connaître les cibles moléculaires de ce point de contrôle. Nous avons établi qu'il existe une corrélation entre l'état de phosphorylation sur tyrosine des deux CDK à motif PSTAIRE de 32 et 34 kDa, qui sont liées par la protéine p9^{CKS}, et l'activité CDK au cours de la progression normale dans le cycle. Les événements mitotiques, tels que la rupture de l'enveloppe nucléaire et la formation du fuseau, sont dépendants de l'augmentation de l'activité CDK qui coïncide avec la déphosphorylation sur tyrosine des deux CDK. L'activation du point de contrôle de la réplication empêche la déphosphorylation des deux CDK mitotiques et en conséquence, la mitose. *In vitro*, la déphosphorylation par cdc25 des CDK d'extraits de zygotes dont la réplication est bloquée, résulte en une augmentation de l'activité kinasique jusqu'à un niveau mitotique, ce qui suggère, que la régulation de l'activité des CDK par le point de contrôle de réplication de l'ADN s'opère principalement par un mécanisme faisant intervenir la phosphorylation inhibitrice sur résidu tyrosine. La réplication de l'ADN contrôle, de

surcroît, l'alignement correct du fuseau mitotique avec l'axe de polarité du zygote selon un mécanisme indépendant des CDK.

Cet article est sous presse dans la revue "Development".

RESUME

Le point de contrôle de la réplication de l'ADN, S/M, empêche différents événements de la division cellulaire lorsque l'ADN n'est pas répliqué. Ce point de contrôle est particulièrement efficace chez les levures et dans les cellules somatiques animales mais fait souvent, partiellement ou totalement défaut aux embryons animaux. Du fait du peu de données sur le point de contrôle S/M chez les cellules et les embryons végétaux, nous avons étudié l'effet de l'aphidicoline, un inhibiteur spécifique des ADN polymérases et , sur la division cellulaire et la morphogenèse des zygotes de *Fucus* et *Pelvetia*. La réplication et la division cellulaire sont, toutes deux inhibées par l'aphidicoline, ce qui indique l'existence du point de contrôle S/M chez les zygotes de fucales. Ce point de contrôle empêche la condensation des chromosomes, la formation du fuseau mitotique, l'alignement des centrosomes avec l'axe de croissance du zygote et la cytotétrèse mais n'a pas d'effet sur la germination et l'elongation du rhizoïde. Ce point de contrôle empêche également, la déphosphorylation de résidus tyrosine de kinases apparentées aux kinases dépendantes des cyclines (CDK) lors de l'entrée en mitose. L'activité mitotique des kinases de zygotes traités par l'aphidicoline, est restaurée par un traitement par la phosphatase cdc25. Lorsque l'olomoucine, un inhibiteur spécifique des CDK, est ajouté aux zygotes en phase S, il produit les mêmes effets que l'aphidicoline sur la division cellulaire mais l'axe des centrosomes peut s'aligner avec l'axe de polarité. Nous proposons un modèle de fonctionnement du point de contrôle S/M dans les zygotes et les embryons de Fucales, qui fait intervenir l'inactivation des CDK.

ARTICLE II :

LE CYCLE CELLULAIRE DU ZYGOTE DE *FUCUS* PRÉSENTE DES PARALLELES AVEC LE CYCLE DES CELLULES SOMATIQUES

Dans cet article, nous avons étudié l'importance des CDK pour la réalisation des événements du premier cycle cellulaire de *Fucus* et appréhendé les mécanismes de régulation de l'activité des CDK. Des études similaires ont été réalisées chez les embryons animaux comme l'oursin ou le xénope, en revanche il n'existe que peu de données biochimiques sur les régulations des CDK dans les systèmes végétaux, et aucune en ce qui concerne les embryons végétaux. Aussi, ce travail, apporte-t-il de précieuses informations fonctionnelles sur la régulation du cycle cellulaire embryonnaire chez les végétaux et vient compléter l'étude précédente (chapitre I). Au contraire du cycle cellulaire embryonnaire des animaux, le cycle cellulaire du zygote de *Fucus* présente les caractéristiques d'un cycle cellulaire de cellule somatique, à cette particularité près, que les CDK sont synthétisées progressivement après la fécondation à partir d'ARNm maternels. Au cours du cycle cellulaire, la régulation de l'activité CDK par phosphorylation sur tyrosine, semble occuper une place prépondérante.

Cet article a été soumis au journal "Plant Cell".

RESUME

Lors de la progression dans le cycle cellulaire des cellules eucaryotiques, beaucoup d'événements cellulaires sont contrôlés par les kinases dépendantes des cyclines qui constituent souvent les cibles moléculaires des points de contrôle. Nous avons précédemment caractérisé un point de contrôle de la réplication de l'ADN, S/M, qui, par opposition à ce qui existe dans les embryons animaux, est drastique dans les zygotes de Fucales. Dans cette étude, nous déterminons, plus précisément, l'implication des protéines kinases dépendantes des cyclines

(CDK) dans le contrôle du cycle cellulaire zygotique et leur régulation chez *Fucus*. La synthèse des deux CDK à motif PSTAIRE, p32 et p34, ainsi que l'activité de phosphorylation de l'histone H1, sont toutes deux enclenchées à la suite de la fécondation mais indépendamment de la caryogamie et sont régulées au niveau traductionnel. En revanche, l'activité mitotique des CDK dépend de la transcription d'un régulateur positif. Un dérivé de purine, l'olomoucine, inhibe l'activité des protéines apparentées aux CDK, *in vivo* comme *in vitro*, induit des arrêts du cycle cellulaire aux deux transitions, G₁/S et G₂/M ainsi qu'en mitose et provoque la décondensation de la chromatine chez des zygotes bloqués en mitose. Enfin, quels que soient les arrêts du cycle cellulaire provoqués par l'olomoucine, la synthèse des CDK s'effectue normalement alors que la déphosphorylation activatrice sur tyrosine des CDK est inhibée. *In vitro*, la déphosphorylation par cdc25, des CDK provenant de zygotes bloqués à différents stades par l'olomoucine, conduit à une activation des CDK jusqu'à un niveau comparable au niveau mitotique. L'ensemble des ces résultats suggère, que, chez *Fucus*, le cycle cellulaire zygotique ressemble au cycle cellulaire somatique, c'est à dire, que des CDK, elles-mêmes régulées au niveau de leur synthèse et par phosphorylation, contrôlent étroitement le cycle cellulaire.

ARTICLE III :

LE CONTROLE DU DEVELOPPEMENT PRECOCE DU ZYGOTE DE *FUCUS* EST DEPENDANT DU CYCLE CELLULAIRE PAR L'INTERMEDIAIRE D'UNE PROTEINE DE TYPE CDK.

Savoir comment la morphogenèse et le cycle cellulaire sont coordonnés au cours du développement des organismes est une question cruciale en biologie du développement. Les connaissances actuelles acquises chez les animaux et les végétaux, indiquent que la régulation de ces deux événements fondamentaux, que sont la morphogenèse et le cycle cellulaire, s'effectuerait en amont des acteurs spécifiquement impliqués dans chacun de ces phénomènes et que les interactions directes entre ces acteurs seraient réduites. En revanche, chez les levures, les acteurs principaux du cycle cellulaire tels que CDC28 ou NIMX^{cdc2} interviennent directement dans le contrôle des événements morphogénétiques, à savoir la formation des bourgeons ou des conidies. Il n'existe que très peu de données sur les relations entre le cycle cellulaire et l'embryogenèse des végétaux. Nous avons voulu connaître l'implication du cycle cellulaire dans la polarisation et la morphogenèse précoce du zygote de *Fucus*. Il ressort de cette étude que la formation de l'axe de polarité et la phase S sont concomitantes et vraisemblablement dépendantes de l'activité de la CDK p34.

Cet article sera très prochainement soumis à la revue "Development".

RESUME

Bien que le développement itératif puisse être découplé de la morphogenèse dans les organes de plantes, la relation entre le cycle cellulaire et les événements du développement n'est pas clairement établi chez les embryons. Les zygotes libres des algues de la classe des Fucales, qui comportent les genres *Fucus* et *Pelvetia*, se prêtent bien à l'étude des interactions

entre la progression dans le cycle cellulaire et la morphogenèse précoce, car l'établissement de la polarité embryonnaire, ainsi que son expression morphogénétique, la germination, et le premier cycle cellulaire sont concomitants. Nous avons, récemment démontré que la progression au cours du cycle cellulaire était sous le contrôle étroit de protéines de type CDK, dont deux CDK à motif PSTAIRE, p34 et p32, qui sont synthétisées à la suite de la fécondation. Dans la présente étude, nous montrons que l'inhibition spécifique des protéines de type CDK, soit par des composés dérivés de purine tels que l'olomoucine et le purvalanol, soit par l'inhibiteur p21^{Cip1} microinjecté, empêche la germination et la division cellulaire. L'olomoucine inhibe spécifiquement la formation de l'axe de polarité et l'entrée en phase S, deux événements qui sont concomitants. L'anticorps monoclonal anti-PSTAIRE empêche également la germination et la division cellulaire lorsqu'il est injecté précocement lors du cycle cellulaire et seule p34 présente une affinité pour le purvalanol, ce qui suggère que cette protéine contrôle la polarisation et la morphogenèse. Nous proposons différents modèles pour rendre compte du contrôle simultané de la progression précoce dans le cycle cellulaire et de la polarisation.

ARTICLE IV :

L'INHIBITION DE L'ETABLISSEMENT DE LA POLARITE ZYGOTIQUE PAR DES INHIBITEURS DE PROTEINES TYROSINE-KINASES PERTURBE LE MODELAGE DE L'EMBRYON *CHEZ FUCUS*

L'étude exposée ci-dessous, a été réalisée précédemment aux travaux sur le cycle cellulaire. J'ai jugé opportun de l'insérer dans ce manuscrit pour plusieurs raisons. Tout d'abord elle démontre l'importance de la polarisation précoce pour le modelage de l'embryon et peut être mise en relation avec les résultats du troisième chapitre, qui montrent que la CDK p34 contrôle la formation de l'axe de polarité. De plus, elle met en évidence que des kinases, différentes des CDK, sont impliquées dans le contrôle de la formation de l'axe. En effet, l'inhibition de ces kinases n'empêche pas la division cellulaire. En revanche, il faut souligner ici que l'inhibition de ces kinases et, en conséquence, celle de la formation de l'axe de polarité, retarde significativement la division. Chez *S. cerevisiae*, les défauts de la polarisation du cytosquelette d'actine retardent le cycle cellulaire en agissant sur l'activité de CDC28. A la lumière des données exposées précédemment et des connaissances acquises sur *S. cerevisiae*, le retard de division observé chez les zygotes de *Fucus* dont la polarisation est inhibée, soulève la question d'une régulation du cycle cellulaire par les événements de polarisation. Cette question est discutée dans la conclusion générale de ce manuscrit.

Ce travail fait l'objet d'un article sous presse dans la revue "Developmental Biology".

RESUME

Les algues de la classe des Fucales, qui comprennent les genres *Fucus* et *Pelvetia*, sont des modèles biologiques reconnus pour l'étude de l'embryogenèse végétale. En particulier, les zygotes de Fucales sont très bien adaptés pour étudier l'établissement de la polarité ainsi que

l'importance de la polarisation pour l'embryogenèse. Cependant, les voies de transduction impliquées dans le processus précoce de polarisation sont encore mal définies, et le lien entre la polarisation précoce et le modelage de l'embryon à long terme n'a jamais été démontré de manière expérimentale. En conséquence, nous avons voulu déterminer le rôle potentiel de la phosphorylation des protéines dans la régulation de l'embryogenèse précoce, par l'utilisation combinée d'approches pharmacologiques et biochimiques. Parmi les différents inhibiteurs de protéine kinases que nous avons testés, un sous groupe d'inhibiteurs de protéines tyrosine-kinases (PTK), incluant la génistéine, empêche la germination mais n'a aucun effet sur la croissance rhizoïdienne chez des embryons germés. L'inhibition de la germination apparaît être une conséquence directe de l'inhibition de la polarisation, car la génistéine ainsi que d'autres inhibiteurs de PTK, inhibent spécifiquement la formation de l'axe de polarité, selon un mécanisme indépendant de la lumière. La génistéine inhibe des événements cellulaires associés à la polarisation, tels que la sécrétion polarisée de composés pariétaux sulfatés. L'ancrage du cytosquelette d'actine au pôle rhizoïdien est également inhibé et les microfilaments d'actine se redistribuent en réponse à un nouveau vecteur lumineux. Les zygotes, dont le processus de polarisation est inhibé sur une période couvrant la formation de l'axe, récupèrent du traitement et présentent des structures différencierées quelques jours après le traitement. Toutefois, l'organisation spatiale de ces structures est profondément affectée, ce qui suggère que le processus précoce de polarisation est essentiel au modelage normal de l'embryon. L'analyse en immuno-blot de la phosphorylation des protéines met en évidence que le profil de phosphorylation change au cours du développement et est perturbé chez des zygotes traités par la génistéine. *In vitro*, la génistéine inhibe également l'autophosphorylation des protéines. A la lumière de ces résultats, nous discutons de la nature des kinases sensibles à la génistéine, qui sont requises pour la polarisation et le modelage de l'embryon à long terme.

CONCLUSION et PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

A.1.LES CDK CONTROLENT DE NOMBREUX EVENEMENTS DU CYCLE CELLULAIRE ET CONSTITUENT UNE CIBLE MAJEURE DES MECANISMES DE SURVEILLANCE

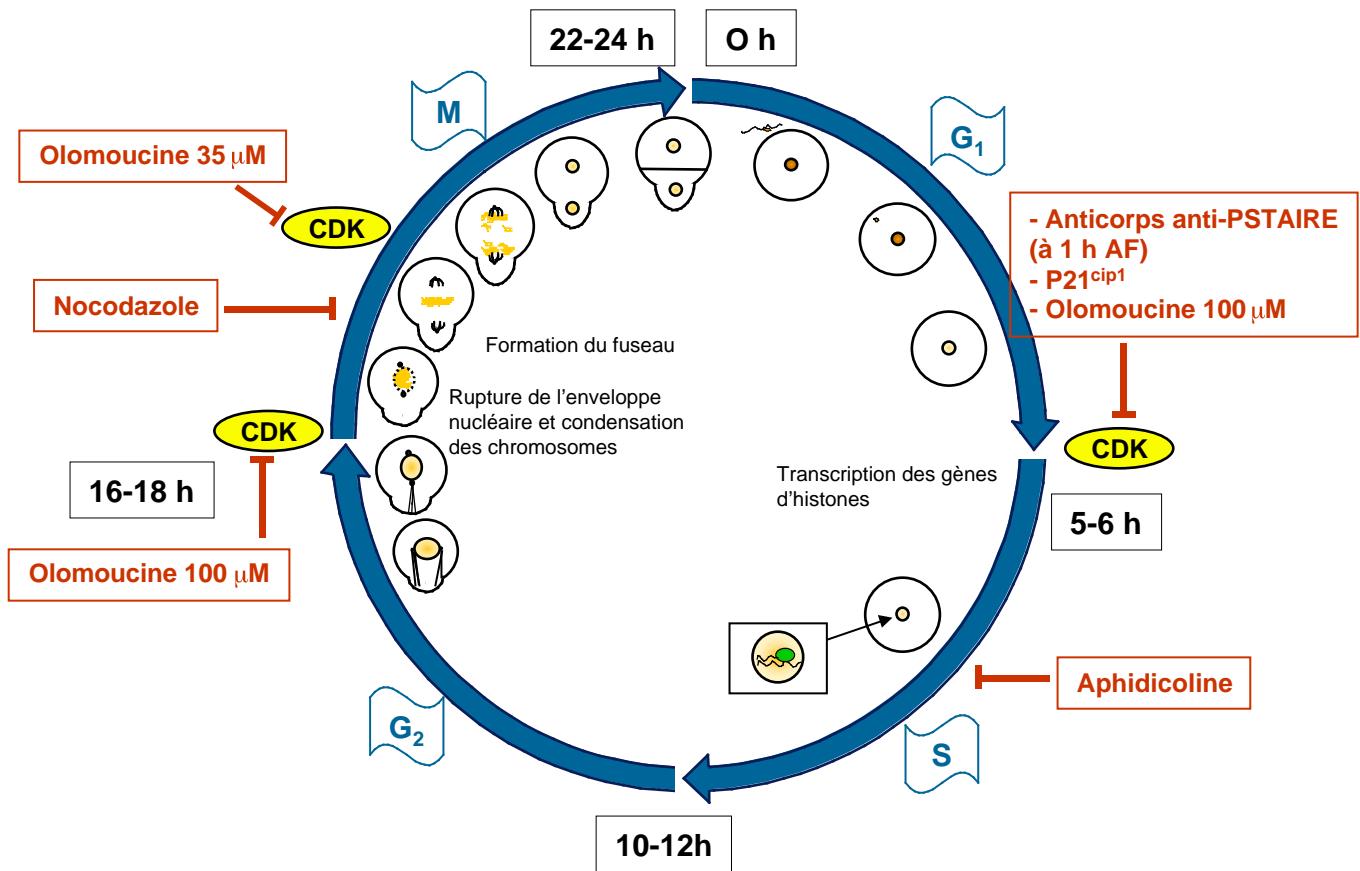
La progression de l'embryon de *Fucus* dans le premier cycle cellulaire est sous le contrôle strict des CDK, dont l'activité est nécessaire à la réplication de l'ADN, la rupture de l'enveloppe nucléaire, la formation du fuseau mitotique, la condensation des chromosomes (et leur décondensation) et la cytodièrèse (articles I et II). L'inhibition de la réplication de l'ADN et de l'assemblage du fuseau mitotique, respectivement par l'aphidicoline et le nocodazole, conduit à un arrêt du cycle cellulaire en phase S et M, et témoigne de l'existence de mécanismes de surveillance usuels chez le zygote de *Fucus*.

La figure 19 récapitule les différents arrêts du cycle cellulaire provoqués par les principaux inhibiteurs pharmacologiques utilisés.

A.2.IDENTITE DES CDK RESPONSABLES DE LA PROGRESSION AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE

L'utilisation de la protéine p9^{CKS} humaine pour la purification des CDK de *Fucus*, et de l'histone H1 comme substrat de ces CDK, est susceptible d'introduire un double biais. En effet, certaines CDK, intervenant essentiellement en G₁ et S, ne possèdent pas d'affinité pour p9^{CKS} et/ou phosphorylent mal l'histone H1 (Magyar *et al.*, 1993; Azzi *et al.*, 1994; Pines, 1996). L'utilisation de l'actinomycine D, inhibiteur transcriptionnel, nous a permis de découpler une activité H1 kinase précoce, qui est indépendante de la transcription, de l'activité mitotique, qui est, pour sa part, dépendante de la transcription d'un régulateur positif (chapitre II). La faible activité H1 kinase, qui ne dépend pas de la transcription, augmente progressivement au cours des phases précoces G₁ et S, ce qui suggère que la protéine p9^{CKS} lie certaines CDK de phases

Figure 19 : Schéma récapitulatif des différents outils pharmacologiques et cellulaires utilisés pour situer et déterminer les événements du cycle cellulaire du zygote de *Fucus spiralis*.



La coloration des noyaux à la mithramycine A permet de suivre les événements nucléaires et de déterminer par quantification au microscope confocal, l'état 2C ou 4C de l'ADN, à la suite des traitements par les inhibiteurs pharmacologiques. Conjointement, l'analyse biochimique des protéines liées à la p9^{Cks} et l'analyse moléculaire de la transcription de l'*histone H3* permettent d'appréhender la progression du zygote dans le cycle cellulaire ainsi que le rôle des CDK pour cette progression. Les résultats sont décrits et discutés dans le texte principal.

précoce. Il serait intéressant d'étudier la capacité des CDK liées à la protéine p9^{CKS} à phosphoryler la protéine du rétinoblastome, qui est un substrat préférentiel des complexes CDK/cycline de phase G₁ et S (Gutierrez, 1998). Ces expériences pourraient nous renseigner sur la fonction des CDK précoce liées à p9^{CKS} et permettre de dissocier les activités des phases G₁/S et M. D'ores et déjà, plusieurs résultats plaident en faveur de l'implication majeure de la CDK à motif PSTAIRE de 34 kDa dans la transition G₁/S. Le purvalanol, inhibiteur de la même famille que l'olomoucine qui bloque la transition G₁/S, lie la CDK PSTAIRE de 34 kDa, p34, et non celle de 32 kDa, tout au long du développement, y compris en phase G₁ et S, ce qui désigne p34 PSTAIRE comme une cible majoritaire de ce type d'inhibiteur. De plus, la microinjection précoce d'anticorps anti-PSTAIRE inhibe la germination et la division, de la même manière que l'application précoce de purvalanol ou d'olomoucine (chapitre III). Il est donc probable que ces zygotes soient stoppés en G₁, ce qui signifierait que la CDK PSTAIRE est essentielle à la transition G₁/S. L'analyse du contenu en ADN des zygotes inhibés par l'anticorps anti-PSTAIRE, qui serait nécessaire à la confirmation de cette hypothèse, est malheureusement difficile.

Les questions énoncées ci-dessus concernent, dans une moindre mesure, les CDK mitotiques. En effet, l'affinité de la protéine p9^{CKS} pour les CDK mitotiques est connue dans la plupart des systèmes biologiques (Brizuela *et al.*, 1987; Hadwiger *et al.*, 1989; Richardson *et al.*, 1990; Patra et Dunphy, 1996; De Veylder *et al.*, 1997). Chez les végétaux, la liaison aux CDK de l'homologue de la p9^{CKS}, CKS1, serait nécessaire au cycle mitotique et lors des cycles d'endoréplication (Jacqmard *et al.*, 1999). Chez *Fucus*, l'activité H1 kinase, liée à p9^{CKS}, présente une activité mitotique importante. D'autre part, l'affinité du purvalanol pour p34 dans les extraits mitotiques (chapitre III), et la similitude de profil d'activité H1 kinase entre les extraits dépourvus de p32 et les extraits témoins au moment de la mitose (chapitre II), laisse supposer que p34 remplirait un rôle majeur, également en mitose. Cette protéine, à l'image de CDC28 de levure et de cdc2a d'*Arabidopsis thaliana*, serait donc essentielle aux deux transitions G₁/S et G₂/M. Son association avec des cyclines spécifiques de chaque phase lui confèreraient sa spécificité. La fonction de la CDK PSTAIRE de 32 kDa, qui n'est pas liée *in vitro* par le purvalanol, reste à élucider.

Il est possible que d'autres CDK non PSTAIRE puissent également participer à la phosphorylation de l'histone H1. En effet, d'autres protéines sont liées par les billes de p9^{CKS}. Notamment, une bande à 31 kDa est visible sur le profil de protéines éluées à partir de billes de p9^{CKS} et à partir de billes de purvalanol. Cependant, les changements majeurs de phosphorylation sur tyrosine, qui sont étroitement corrélés aux variations de l'activité CDK globale, sont observés sur les seules CDK PSTAIRE, pour des poids moléculaires compris entre 30 et 45 kDa (articles I et II). Ces données confortent l'idée que p34 serait la principale protéine liée à p9^{CKS} impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire. Néanmoins, nous ne pouvons pas exclure l'existence éventuelle d'autres CDK non-PSTAIRE, sur lesquelles il n'y aurait pas de phosphorylation sur tyrosine, et/ou de CDK PSTAIRE n'ayant d'affinité ni pour p9^{CKS} ni pour le purvalanol. Dans les deux cas, ces éventuelles CDK pourraient avoir un rôle dans la progression dans le cycle.

A.3.LE CLONAGE DES ADN_c DE CDK DE *FUCUS* OUVRIRAIT DE NOMBREUSES PERSPECTIVES

Chez *Fucus*, les deux bandes reconnues par l'anticorps anti-PSTAIRE ne sont malheureusement pas identifiées avec certitude. Plusieurs essais de microséquençage de ces protéines sont restés infructueux du fait de la faible quantité de matériel disponible et de la pureté insuffisante des extraits protéiques élués à partir des billes de p9^{CKS}. Une analyse en gel d'électrophorèse bidimensionnelle pourrait permettre, dans un premier temps, de savoir s'il n'existe réellement que deux CDK PSTAIRE, mais à terme le clonage d'ADNc de *Fucus* serait primordial pour l'identification des CDK PSTAIRE ainsi que d'éventuelles autres CDK. Le clonage d'ADNc de CDK ouvrirait des champs d'investigation variés, dont l'un des plus intéressants serait d'étudier les potentialités des ADNc des deux CDK PSTAIRE à complémenter les mutants CDC28⁻/cdc2⁻ de levures en G₁/S et G₂/M. Le suivi de la transcription des gènes de CDK, au cours du développement, pourrait également nous renseigner sur l'implication des CDK au cours des différentes phases. En effet, chez plusieurs espèces de végétaux (*Arabidopsis*, *Anthirrhinum*, *Zea*), l'activation transcriptionnelle de certaines CDK précède les phases du cycle cellulaire dans lesquelles elles sont impliquées (Segers *et al.*, 1996; Fobert *et al.*, 1996; Magyar

et al., 1997). Toutefois, les transcrits des CDK PSTAIRE de *Fucus* semblent être présents dans l'oosphère et la nécessité d'une transcription pour la mitose paraît plutôt concerner un régulateur de l'activité CDK (chapitre II).

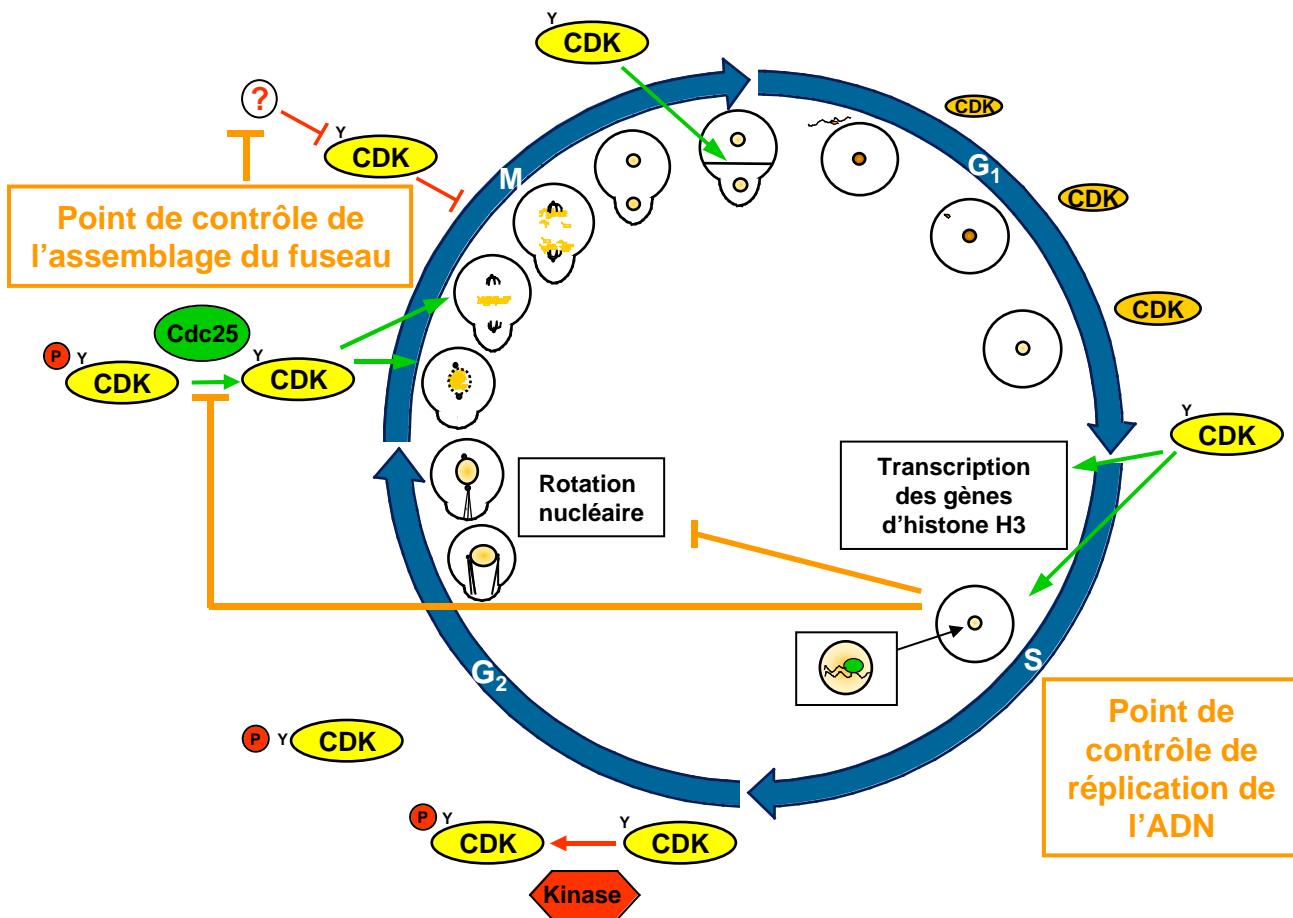
Enfin, le développement d'anticorps spécifiques pourrait permettre d'analyser l'activité et l'expression propre de chaque CDK au cours du cycle et offrirait de nombreuses autres possibilités d'investigations au niveau cellulaire (microinjection, localisation intracellulaire).

A.4. INTERVENTION DES CDK DANS LES EVENEMENTS NUCLEAIRES ET CYTOPLASMIQUES DE LA DIVISION

A.4.1. Intervention des CDK à la transition G₁/S

La réplication est inhibée par de fortes concentration d'olomoucine (chapitre II). De plus, p21^{Cip}, une CKI connue pour intervenir dans l'inhibition des complexes CDK/cycline en G₁ et à l'entrée en phase S, inhibe *in vitro*, l'activité des extraits bloqués en G₁/S et *in vivo* la germination qui dépend de cette transition (chapitre III). Ces résultats suggèrent fortement l'implication des CDK dans la transition G₁/S (figure 20). Dans la plupart des systèmes eucaryotes, le rôle majeur des CDK à cette transition, consiste à phosphoryler la protéine du rétinoblastome pour permettre la transcription des gènes nécessaires à la phase S. Chez le zygote de *Fucus spiralis*, la transcription précoce (jusqu'à 10 h AF) est nécessaire à la division (observation personnelle) mais non à l'activité précoce de CDK liés à p9^{CKS} (chapitre II). L'oosphère contiendrait donc tous les ARNm nécessaires à l'activité CDK au cours des phases précoces, tout comme la plupart des embryons animaux, chez qui les ARNm de cyclines de G₁ (cycline E) sont stockés dans l'oeuf (revue par King et al., 1994). Par analogie à ce qui est observé dans d'autres systèmes, l'initiation de la phase de réplication pourrait dépendre de la transcription de gènes sous le contrôle de facteur de transcription liés à une protéine apparentée à la protéine Rb. Nous avons d'ores et déjà montré que la transcription de l'histone H3 dépend de l'activité des kinases à cette transition (chapitre II). Pour tester cette hypothèse plus en avant, il serait nécessaire de déterminer l'état de l'ADN (2C ou 4C) d'embryons dont la transcription est inhibée en G₁, et d'autre part, de connaître la capacité des CDK à phosphoryler la Rb et à libérer des facteurs de transcription qui y sont liés. La quantification de l'ADN n'est réalisable que sur des embryons de

Figure 20 : Rôle et régulations des CDK au cours du cycle cellulaire et fonctionnement des points de contrôle



Après la fécondation, la synthèse des CDK est activée par régulation traductionnelle. L'accumulation des CDK pourrait participer à l'augmentation de l'activité CDK au dessus d'un niveau seuil requis pour la transition G₁/S : la transcription de gènes nécessaires à la phase S (*histone H3*) s'opère et l'ADN se réplique. La transcription d'un régulateur positif de CDK a lieu avant la fin de cette phase (non représenté). Les CDK sont inactivées par phosphorylation sur tyrosine en phase G₂. En fin de phase G₂, leur activation par déphosphorylation provoque l'entrée en mitose. L'inactivation des CDK nucléaires serait nécessaire à la sortie de mitose, alors que l'activité d'autres CDK serait maintenue ou activée pour assurer la cytodiéresse. Le point de contrôle de réplication de l'ADN inhibe les CDK mitotiques et empêche, indépendamment des CDK, l'alignement du fuseau mitotique avec l'axe de polarité. L'activation du point de contrôle du fuseau, empêche l'inactivation des CDK et la sortie de mitose.

deux cellules. Il faudrait donc préalablement synchroniser les cellules en mitose en utilisant, par exemple, le nocodazole.

A.4.2. L'assemblage du fuseau est régulé par les CDK mitotiques

L'activation du point de contrôle S/M conduit à l'inhibition des CDK mitotiques qui semblent réguler l'assemblage correct du fuseau (figure 20) (chapitre I). En effet, l'inhibition des CDK mitotiques par l'olomoucine, tout comme l'inhibition directe de la réplication, empêche la formation du fuseau. Il est probable que chez *Fucus*, comme c'est le cas dans d'autres systèmes, certaines protéines moteurs, qui sont nécessaires aux pontages des microtubules polaires, soient régulées par les CDK mitotiques (Sorger *et al.*, 1997). L'absence de rupture de l'enveloppe nucléaire, résultant de l'inhibition des CDK mitotiques par de fortes concentrations d'olomoucine, pourrait également empêcher physiquement les interactions microtubules-kinétochores. Cependant, en présence de faibles concentrations d'olomoucine, bien que la rupture de l'enveloppe nucléaire et la condensation des chromosomes aient lieu, la formation du fuseau mitotique pourrait être défectiveuse car l'organisation des chromosomes est altérée. Il n'est pas exclu que le fuseau mitotique se forme à de faibles concentrations d'olomoucine, et dans tous les cas le blocage provoqué par les faibles concentrations d'olomoucine est différent de celui observé avec le nocodazole. En effet, une certaine dynamique est observée. Les asters se séparent normalement et les chromosomes condensés peuvent, au début du blocage, s'organiser en plaque de métaphase, bien que certains d'entre eux puissent être dispersés. Par la suite, ces chromosomes se dispersent ou sont disposés "en cercle" comme s'il existait une tentative de ségrégation. Ces observations amènent à s'interroger sur l'efficacité du point de contrôle de l'assemblage du fuseau et le rôle précis des CDK dans les interactions entre les chromosomes et le fuseau. Il serait important de tester l'effet des traitements par de faibles doses d'olomoucine sur la dynamique des microtubules. De plus, la localisation cellulaire des CDK de *Fucus* apporterait des informations précieuses sur le rôle des CDK dans la dynamique du fuseau mitotique.

La rotation du fuseau dépend, quant à elle, exclusivement des événements de réplication et non des CDK mitotiques (chapitre I). Comme la réplication dépend elle-même des CDK de la transition G₁/S, il est fort probable que l'inhibition des CDK avant la phase S résulte en une

altération similaire de l'orientation du fuseau mitotique (chapitre II). Cependant cette hypothèse ne peut être testée puisque les traitements qui inhibent la transition G₁/S inhibent également la germination. En revanche, il serait intéressant d'étudier l'effet de tels traitements sur la séparation et la duplication des centrosomes.

A.4.3. Sortie de mitose et cytodièrèse

L'activité CDK des zygotes bloqués en mitose par le nocodazole est très élevée et est efficacement inhibée, *in vitro*, par l'olomoucine. Ces zygotes possèdent des chromosomes condensés qui se regroupent au centre de la cellule et s'organisent plus rarement en plaque de métaphase altérée, ce qui suggère un arrêt en pré métaphase (figure 20). Ce blocage résulte très probablement de l'activation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau. L'ajout d'olomoucine provoque une décondensation des chromosomes, ce qui suggère que le maintien d'une activité CDK élevée empêche la sortie de mitose. L'inhibition des CDK de *Fucus* serait donc un événement nécessaire à la sortie de mitose. Lors de l'activation du point de contrôle de l'assemblage du fuseau, l'inactivation des CDK serait inhibée. Dans les autres systèmes biologiques, le complexe de dégradation APC/cyclosome permet la transition métaphase-anaphase et constitue une cible du point de contrôle de l'assemblage du fuseau (Hardwick, 1998).

Ces résultats impliquent que l'inactivation des CDK soit précisément localisée dans le noyau ou dans son voisinage, car l'activité CDK semble être requise pour la cytodièrèse qui est postérieure à la mitose (figure 20). En effet, l'olomoucine inhibe la division lorsqu'elle est ajoutée 22 h AF, alors que le pic d'activité mitotique se situe entre 16 et 20 h AF et que la mitose se produit vers 18 h AF. Chez les végétaux, cdc2a est trouvée en association avec la bande préprophasique et interviendrait dans la formation de cette structure qui détermine le site de clivage avant la mitose (Colasanti *et al.*, 1993). Chez *Fucus*, cette structure n'existe pas et le mécanisme de clivage reste mal compris. L'immunolocalisation des CDK apporterait une information supplémentaire quant à leur rôle dans la régulation de la cytodièrèse.

B. MECANISMES DE REGULATION DES CDK

B.1. REGULATION TRADUCTIONNELLE

Chez *Fucus*, l'activation post-fécondatoire de la synthèse des CDK rappelle celle observée lors de la ré-entrée dans le cycle, observée chez les cellules végétales et animales stimulées par des mitogènes. Cependant, chez *Fucus*, la régulation de la synthèse des CDK s'effectue uniquement au niveau traductionnel tandis que, lors de la transition, G₀/G₁, la régulation s'effectue principalement au niveau transcriptionnel. La régulation traductionnelle des CDK de *Fucus* après la fécondation, est une situation totalement différente de celle observée chez les embryons animaux, chez qui la protéine cdc2 ayant servi à la maturation méiotique de l'ovocyte est en quantité suffisante pour assurer les premiers cycles (Edgar, 1995; Hartley *et al.*, 1996). Chez la plupart des embryons, la synthèse protéique est néanmoins nécessaire à l'accomplissement du premier cycle (Waagenar, 1983; Minshull *et al.*, 1989). La traduction de la cycline B à partir d'ARNm maternels est nécessaire et suffisante pour la réalisation de cycles embryonnaires rapides. En effet, la synthèse de la cycline B est indispensable à l'activité du MPF (Murray *et al.*, 1989; Murray et Kirschner, 1989; Arion et Meijer, 1989; Meijer *et al.*, 1989; Hartley *et al.*, 1996). Dans l'ovocyte de xénope, au cours de la maturation méiotique, le facteur de traduction eIF-4, intervient dans le recrutement spécifique de l'ARNm de la cycline B et de c-mos, deux protéines qui sont nécessaires à la maturation méiotique (Keiper *et al.*, 1999), ce qui suggère que la régulation traductionnelle de la synthèse de certains acteurs du cycle cellulaire pourrait avoir un rôle important dans la régulation de la progression du cycle cellulaire.

Chez *Fucus*, le niveau des CDK augmente jusqu'à 12 heures après la fécondation. La signification de cette régulation traductionnelle par rapport à d'autres régulations post-traductionnelles éventuelles n'est pas déterminée. Il est néanmoins concevable que la régulation traductionnelle de la synthèse des CDK conduise à une accumulation de ces protéines jusqu'à un niveau seuil où leur activité serait suffisante pour déclencher la transition G₁/S. Des expériences préliminaires, réalisées en collaboration avec P. Cormier, suggèrent l'existence du facteur eIF-4F chez *Fucus*, et il serait intéressant d'étudier le rôle de ce facteur dans la régulation de la traduction des CDK après la fécondation.

B.2. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE L'ACTIVITE MITOTIQUE

Nous avons mis en évidence que l'inhibition de la transcription n'influence pas la synthèse des CDK PSTAIRE au cours du développement précoce, mais inhibe le pic mitotique d'activité H1 kinase. Ce résultat suggère que l'activité mitotique dépendrait d'un régulateur positif soumis à une régulation transcriptionnelle. Chez *Fucus spiralis*, la transcription est nécessaire jusqu'à 10 heures pour que le premier clivage puisse s'effectuer (observation personnelle), ce qui laisse supposer que le régulateur mitotique serait transcrit avant la phase G2, mais ne pourrait être efficace qu'en mitose. Dans les cellules somatiques, les cyclines sont soumises à un contrôle transcriptionnel, qui, de concert avec leur dégradation programmée, permet la formation de complexes CDK/cyclines au moment adéquat. A ce mécanisme, s'ajoute un contrôle post-traductionnel du complexe par phosphorylation. Il est concevable que des cyclines mitotiques soient transcrtes durant la phase G₁ et/ou S chez le zygote de *Fucus* et qu'elles s'associent aux CDK pour former des complexes mitotiques. L'inhibition de ces complexes par phosphorylation sur tyrosine, en phase S, permettrait de retarder leur activation jusqu'en mitose (figure 20). Une expérience très préliminaire laisse présager que des cyclines de *Fucus* sont reconnues par un anticorps anti-cycline de large spécificité. Cet anticorps révèle une bande d'environ 60 kDa, dont le niveau, faible jusqu'à 8 h AF, augmente fortement à 12 h AF (début de G₂). Nous projetons de réitérer cette expérience au delà de ce stade de développement et de réaliser une immunoprecipitation avec cet anticorps, afin de réaliser un test d'activité H1 kinase et l'immunodétection d'éventuelles CDK PSTAIRE liées à cette protéine de 60 kDa. Si le résultat est positif, il serait intéressant de connaître l'effet des inhibiteurs de la transcription et de la traduction sur la synthèse de cette protéine.

Une autre possibilité, qui n'exclue pas l'hypothèse précédente, est que la phosphatase responsable de l'activation des complexes mitotiques soit soumise à une régulation transcriptionnelle à l'image des protéines phosphatases cdc25 (Jinno *et al.*, 1994; Zwicker *et al.*, 1995).

B.3. REGULATIONS PAR PHOSPHORYLATION

Les travaux de Zhang (1996) avaient permis de mettre en évidence que les phytohormones régulent l'activité de cdc2 par un mécanisme de phosphorylation inhibitrice sur tyrosine. Chez *Fucus*, nous avons montré que les CDK PSTAIRE mitotiques sont soumises à une régulation négative sur résidu tyrosine en phase G₂ et que leur déphosphorylation en mitose est directement corrélée à une augmentation de leur activité. Ce résultat constitue la première évidence d'une régulation par phosphorylation des CDK au cours de la progression normale dans le cycle chez les végétaux. Nous avons également démontré que le point de contrôle de la réplication de l'ADN utilise cette régulation pour inhiber l'entrée en mitose. Il semble probable que les cibles de ce point de contrôle soient les CDK mitotiques et non les CDK de phase S. En effet, *in vitro*, la déphosphorylation, par cdc25, des CDK d'extraits de zygotes bloqués par l'aphidicoline, résulte en une augmentation de l'activité CDK jusqu'à un niveau mitotique (chapitre I). Il est intéressant de noter que les zygotes bloqués en G₁/S par l'olomoucine, contiennent des CDK phosphorylées sur tyrosine, qui une fois déphosphorylées par cdc25, possèdent également une activité comparable à celle observée en mitose. Il semble qu'*in vivo* l'inhibition des CDK de G₁/S n'empêchent pas la formation des complexes mitotiques. L'alternative selon laquelle des complexes de G₁/S possèdent potentiellement une activité aussi élevée que l'activité mitotique mais sont, *in vivo*, partiellement inhibés par phosphorylation sur tyrosine apparaît improbable mais ne peut être exclue. Afin de connaître l'état de phosphorylation des CDK lors des phases précoce du cycle, nous envisageons d'employer la technique d'isoélectrofocalisation en gel (IEF) qui nous permettrait de séparer les différentes formes phosphorylées des CDK PSTAIRE et de les détecter avec l'anticorps anti-PSTAIRE qui donne un signal bien supérieur à celui de l'anticorps anti-phosphotyrosine (PY-20) en immuno-détection.

L'inhibition directe des complexes mitotiques par de faibles concentrations d'olomoucine, conduit également à une accumulation *in vivo* des CDK sous forme phosphorylée (chapitre II). Ces résultats laissent supposer que l'activité des CDK mitotiques pourrait être nécessaire à leur propre activation, et est en accord avec le mécanisme d'amplification en boucle, où cdc25 et wee1 sont respectivement activée et inhibée par cdc2 (Lew et Kornbluth, 1996). De manière générale, plus les zygotes sont bloqués tôt dans le cycle, plus l'activité *in vitro* des extraits

(débarrassés de l'inhibiteur) est faible, et plus leur activation par déphosphorylation est importante. Ce phénomène est particulièrement net entre l'inhibition en phase G_2 , par de fortes concentrations d'olomoucine et l'inhibition en mitose, par une faible concentration d'olomoucine (chapitre II). Ceci suggère, qu'*in vivo*, les CDK sont progressivement activées au fur et à mesure de la progression vers la mitose. Ce mécanisme d'activation pourrait impliquer la déphosphorylation d'un résidu inhibiteur thréonine par une phosphatase coopérative de cdc25 comme la phosphatase 2A. Chez les ovocytes d'étoile de mer, la déphosphorylation séquentielle de cdc2/cycline B a été décrite lors de la transition prophase/métaphase. Il a été proposé que la forme intermédiaire déphosphorylée sur thréonine et phosphorylée sur tyrosine soit responsable de l'activation de cdc25 et de la répression de wee1 et constitue l'origine du phénomène d'autoamplification de l'activité du MPF (Borgne et Meijer, 1996). Il serait intéressant de savoir si ce mécanisme de déphosphorylation séquentiel est utilisé au cours de la mitose chez *Fucus*.

L'identification de la CAK chez *Orizae sativa* indique que la phosphorylation activatrice des CDK serait également conservée dans le règne végétal (Yamaguchi *et al.*, 1998). De plus une phosphorylation sur thréonine a été détectée sur une protéine de type CDK, chez l'algue unicellulaire *Scenedesmus* en phase G_1 (Zachleder *et al.*, 1999). L'utilisation du même clone d'anticorps pourrait permettre de détecter, sur les CDK, des épitopes phosphorylés sur thréonine au cours du cycle cellulaire de *Fucus*.

C.RELATIONS CYCLE CELLULAIRE ET DEVELOPPEMENT

C.1.IMPORTANCE DE LA DIVISION CELLULAIRE POUR LA POLARISATION ET LA MORPHOGENESE

La coordination entre le cycle cellulaire et la morphogenèse est une question importante en biologie du développement (introduction chapitre III-D). Chez les végétaux, le mode de différenciation cellulaire peut intervenir à tout moment de la vie de l'organisme et peut être réversible. La capacité des cellules à sortir du cycle cellulaire en G_1 ou en G_2 répond probablement à ces exigences de différenciation, et accroît la possibilité d'intervention d'acteurs

du cycle cellulaire dans la différenciation cellulaire, par rapport aux cellules animales qui quittent le cycle, principalement en G₁. Ainsi, les inhibiteurs du cycle tels que ccs52 chez la luzerne, peuvent-ils être considérés comme des acteurs du cycle qui sont nécessaires à la différenciation cellulaire (Cebolla *et al.*, 1999). Chez *Arabidopsis*, *cdc2b* agit plus directement sur la différenciation cellulaire, car il intervient au niveau de la différenciation des chloroplastes et de la croissance hypocotylaire, qui sont responsables d'un phénotype bien particulier adopté par la plante en réponse aux contraintes environnementales (Yoshizumi *et al.*, 1999). *Cdc2b* pourrait donc être considéré comme un médiateur entre le cycle cellulaire et la différenciation, si son rôle dans le cycle était défini au delà des fluctuations de son expression et de son activité.

Chez *S. cerevisiae*, la polarisation, qui précède la division cellulaire, est considérée comme un événement morphogénétique au même titre que la formation du "shmoo" lors de la conjugaison, qui nécessite, pour sa part, l'arrêt du cycle, et fait intervenir la CKI, FAR1. Chez *Aspergillus nidulans*, *NIMX^{cdc2}* intervient également dans la différenciation des conidies. Ces deux CDK d'ascomycètes régulent les événements de division et de croissance polarisée et constituaient, jusqu'à ce jour, les seuls exemples où le contrôle direct de la morphogenèse par un acteur du cycle cellulaire était clairement établi (revue par Mendenhall et Hodge, 1998; Ye *et al.*, 1999).

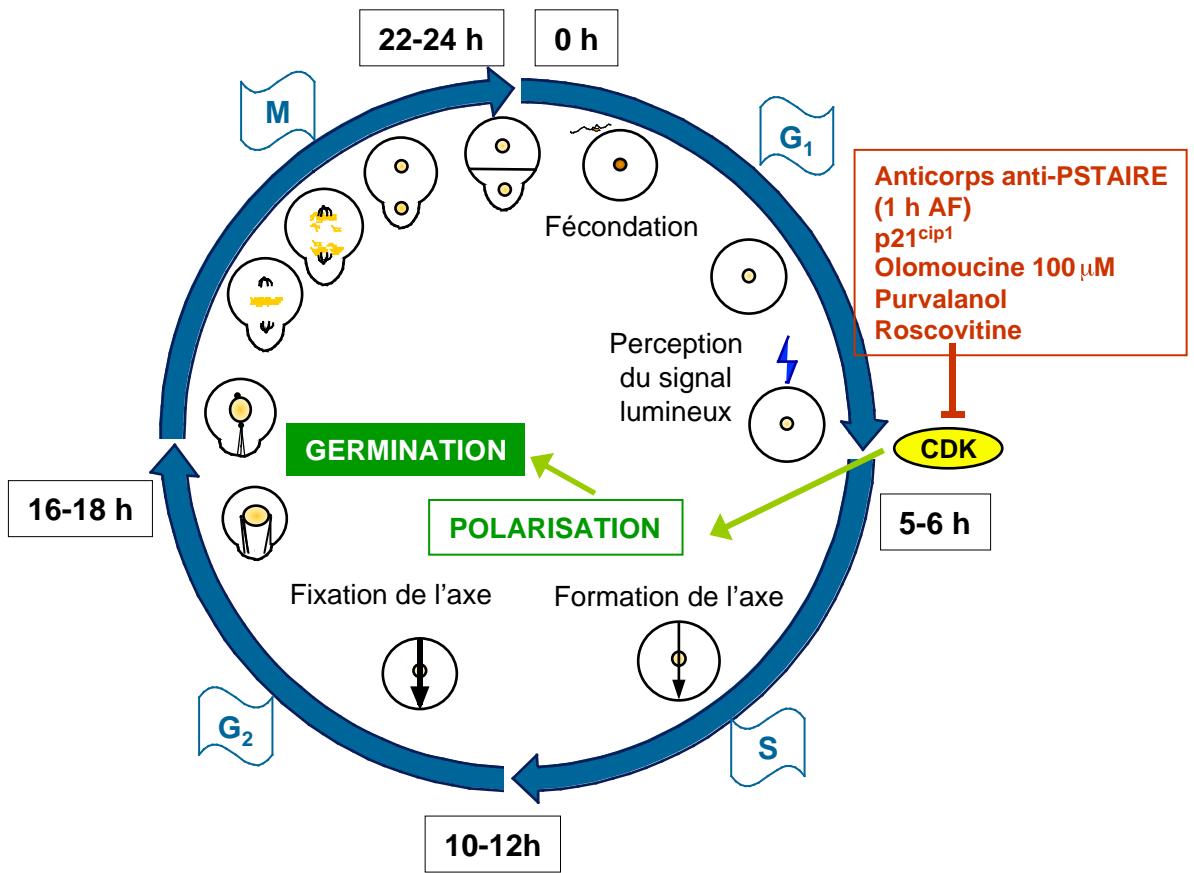
Chez le *Fucus*, la polarisation est un prérequis indispensable à la différenciation initiale des deux premières cellules de l'embryon ainsi qu'au modelage de l'embryon et peut, de ce fait, être considérée comme un événement très précoce de la morphogenèse (chapitre IV, voir ci-dessous). Le fait que l'orientation altérée de la première division n'influence pas l'orientation de la germination des embryons, indique que la polarisation a une importance fondamentale par rapport à la position des clivages dans le modelage initial de l'embryon (revue par Quatrano et Shaw, 1997). Cependant, lorsque l'angle entre le plan de division et l'axe est supérieur à 45°, la croissance apicale est nettement réduite, et des développements anormaux sont attribués à ces altérations trop importantes de la position du clivage. Toutefois, à terme, l'influence de l'orientation des plans de division a peu d'effet sur le modelage. Un cas de figure similaire a été décrit chez les mutants *fass* d'*Arabidopsis*, chez qui l'orientation anormale des plans de divisions embryonnaires a peu d'effet sur le modelage de l'embryon (Torrez-Ruiz et Jürgens, 1994). Chez *Fucus*, lors du

développement normal, l'orientation des divisions initiales est très conservée (transversales dans le rhizoïde et périclines dans le thalle) et permettraient l'organisation correcte des structures différenciées telles que le crampon et la fronde. Ainsi, l'orientation des divisions n'est pas dénuée d'importance pour le développement initial de l'embryon mais n'est pas essentielle à la polarisation zygotique. Cependant, à l'instar des études réalisées chez les plantes supérieures qui s'intéressent au rôle de l'orientation des divisions pour le développement, les études chez *Fucus* ne nous informent pas directement sur le rôle des acteurs du cycle cellulaire dans le développement de l'organisme. Chez *Fucus*, nous avons pu directement montrer qu'il existe une corrélation étroite et précoce entre la morphogenèse et le cycle cellulaire, qui est orchestrée par les CDK. Ce cas de figure ne semble donc pas être l'apanage des levures et pourrait se rencontrer chez d'autres organismes que le *Fucus*.

C.2.LA CDK PSTAIRE DE 34 KDA CONTROLE LA POLARISATION PRECOCE DU ZYGOTE

L'utilisation conjointe d'outils pharmacologiques et de tests classiques de polarisation nous a permis de situer temporellement les phases du cycle cellulaire par rapport aux événements de polarisation du zygote de *Fucus* (figure 21). La phase S est initiée au même moment que la formation de l'axe de polarité qui s'achève avant la phase G₂. La germination s'effectue juste avant, ou pendant la mitose. La corrélation des événements précoce de polarisation et du cycle cellulaire est vraisemblablement assurée par la CDK PSTAIRE de 34 kDa, p34. En effet, l'inhibition de la polarisation par les inhibiteurs de CDK tels que la roscovitine, l'olomoucine et le purvalanol ainsi que par la CKI p21^{cip1} indiquent que les CDK contrôlent la polarisation. Le fait que l'anticorps anti-PSTAIRE, microinjecté précocement dans l'embryon, inhibe la polarisation et que l'olomoucine inhibe la germination seulement lorsqu'elle est ajoutée avant ou pendant la formation de l'axe, précise que ce contrôle est assuré par une CDK PSTAIRE et s'effectue au niveau de la formation de l'axe. La rétention spécifique de p34 sur les billes de purvalanol, désigne cette CDK comme un régulateur potentiel de la formation de l'axe. Ainsi, cette CDK qui serait le contrôleur principal des transitions G₁/S et G₂/M, jouerait à l'image de CDC28 de levure le rôle de contrôleur de la polarisation. Il est également possible que seule

Figure 21 : Relations entre le cycle cellulaire et la polarisation



La formation de l'axe coïncide avec la phase S, et dépend de l'activité de la CDK PSTAIRE p34 à la transition G₁/S. La fixation de l'axe débute en fin de phase S ou en phase G₂. La polarisation est nécessaire à la germination et s'opère pendant la mitose (pour plus de détails voir texte principal).

l'entrée en phase S permette la transcription d'un acteur essentiel à la formation de l'axe et dans ce cas, p34 contrôlerait plus spécifiquement le cycle cellulaire que la polarisation. Enfin, il est concevable que le cycle cellulaire n'interagisse avec les phénomènes de polarisation que dans le cas d'une progression anormale du zygote à la transition G1/S, et inhibe la formation de l'axe tant que cette transition ne s'est pas effectuée (contrôle négatif) (chapitre III). La nature du contrôle de la polarisation par la CDK PSTAIRE de 34 kDa reste donc à définir.

Chez les végétaux, cdc2a intervient aux deux transitions G₁/S et G₂/M mais son rôle pour le développement embryonnaire n'est pas défini. De Veylder décrit que la surexpression du gène muté non fonctionnel de *cdc2aAt* (*cdc2aN147*) sous le contrôle du promoteur du gène 2S2 (seed storage albumin), promoteur qui permet une expression spécifique du gène au cours du développement embryonnaire, conduit à des anomalies du développement telles que l'absence de germination, la fusion de cotylédons, ou des déformations des premières feuilles (De Veylder *et al.*, 1998). Une analyse microscopique des embryons surexprimant *cdc2aN147*, qui devrait permettre de préciser les conséquences précoces de cette surexpression, n'a, pour l'instant, pas été décrite. Il serait, notamment, intéressant de connaître les conséquences de cette surexpression sur le développement de la polarité dans l'embryon. L'interprétation de ces expériences resterait, néanmoins, délicate. En effet, on peut concevoir par exemple que la surexpression de *cdc2aN147* puisse entraîner la déplétion de cyclines devant normalement interagir avec cdc2b, ce qui ne permettrait pas de conclure quant au rôle de cdc2a dans le développement.

Chez le zygote de *Fucus*, l'inhibition de la polarité par les inhibiteurs de CDK s'accompagne d'une inhibition des sécrétions polarisées de composés sulfatés au pôle rhizoïdien. CDC28 contrôle la dynamique du cytosquelette d'actine, chez la levure, et il serait primordial de connaître l'influence de p34 sur la polarisation des microfilaments d'actine au pôle rhizoïdien. Les fenêtres temporelles de sensibilité aux inhibiteurs de PTK et aux inhibiteurs de CDK sont similaires, et ces deux types de kinases (PTK et CDK) contrôlent toutes deux la formation de l'axe de polarité. Il est donc concevable que les voies de transduction faisant intervenir ces kinases coexistent et interagissent. L'analyse des profils de phosphorylation d'extraits de zygotes bloqués dans leur polarisation par des inhibiteurs de CDK, pourrait nous

renseigner sur cette possibilité. Il est probable que les CDK se situent soit en parallèle soit en amont des kinases de type PTK de *Fucus* dans la voie de signalisation aboutissant à la polarisation car l'inhibition de la polarisation par les inhibiteurs de PTK retardent la division mais ne l'empêchent pas.

C.3. IMPORTANCE DE LA POLARISATION POUR L'EMBRYOGENESE

Les zygotes dont la formation de l'axe est inhibée par des inhibiteurs de PTK présentent un développement très perturbé. Des parties rhizoïdiennes et thalle peuvent se différencier mais chez une proportion non négligeable des embryons, elles sont mises en place de manière aléatoire par rapport à l'axe imposé par la lumière. Ces résultats mettent en avant l'importance de la polarisation zygotique pour le développement ultérieur de l'embryon. Les cellules des embryons globulaires sont vraisemblablement non différenciées mais établissent secondairement une polarité permettant d'enclencher les programmes de développement rhizoïdien et thalle. L'influence des inhibiteurs de PTK sur l'établissement secondaire de cette polarité n'est pas connue. Néanmoins, il faut noter que les zygotes ayant dépasser le stade précoce de formation de l'axe peuvent répondre à la lumière en présence de génistéine. Le processus sensible à la génistéine contrôle donc un événement propre à la formation précoce de l'axe de polarité. Comme tous les phénomènes physiologiques détectés lors de la formation de l'axe sont amplifiés au cours de la fixation, il se pourrait que l'initiation et l'amplification d'un ou de plusieurs de ces événements fassent intervenir des voies de signalisation différentes. Ainsi, la création initiale d'un gradient de calcium pourrait faire intervenir des protéines de type PTK puis, la polarité s'autoamplifierait par une activation des canaux calciques. Une relation entre la voie de phosphorylation sur tyrosine et la voie calcique a été mise en évidence dans des lymphocytes T (Mustelin *et al.*, 1990). Lors de l'activation des lymphocytes T, la phosphorylation de PTK-src associées aux récepteurs membranaires, active la phospholipase C (PLC) par l'intermédiaire de protéines G, ce qui enclenche la voie calcique et les réponses dépendantes du calcium. L'effet de l'inhibiteur de PLC (U-73122) sur le zygote de *Fucus*, a été initialement testé par C. Brownlee, qui observa une inhibition de la germination, alors que son analogue inactif (U-73343) n'a aucun

effet (résultats non publiés). Des test cellulaires, similaires à ceux réalisés avec la génistéine, ont par la suite, été réalisé par F.-Y. Bouget dans notre laboratoire. La polarisation des zygotes est inhibée par le U-73122 alors que la division cellulaire n'est pas retardée par l'inhibition. J'ai pu observer qu'à long terme le développement des zygotes, initialement traités par l'inhibiteur de phospholipase C, est très similaire à celui des zygotes traités par la génistéine. La mise au point d'un test d'activité enzymatique pour la PLC, serait un bon moyen de confirmer l'existence d'une activité phospholipase C chez *Fucus* et pourrait préciser les éventuelles interactions entre les PTK-like de *Fucus*, la phospholipase C et le calcium, dans la mise en place de la polarité cellulaire.

D. EXISTE-T-IL UN CONTROLE DU CYCLE CELLULAIRE PAR LES ACTEURS DE LA POLARISATION?

Tandis que les zygotes traités en continu par de faibles doses de cytochalasine B (10 µg/ml) ne germent pas mais sont capables de se diviser, l'altération du cytosquelette d'actine par de fortes concentrations de cytochalasine inhibe la polarisation (Quatrano, 1973; Nelson et Jaffe, 1973). Ceci a conduit à l'idée unanimement acceptée que la première division est indépendante de la polarisation. Cependant, les fortes concentrations utilisées pour bloquer la polarisation (100 µg/ml) inhibent aussi la division (Bouget *et al.*, 1996). La bréfélidine A, pour sa part, inhibe la polarisation et la division. Etant donné l'implication de l'actine et des phénomènes sécrétaires dans la division il n'est pas possible de conclure quant à la dépendance de la division vis à vis de la polarisation, au regard de ces expériences. Le fait que l'inhibiteur de la PLC inhibe la polarisation mais permette la division sans qu'aucun retard ne soit observé corrobore l'hypothèse d'une indépendance de la division vis à vis de la polarisation. Cette vue mérite, néanmoins, quelques nuances. Lors des traitements avec l'inhibiteur de PLC, le découplage observé entre la polarisation et la division cellulaire pourrait être du au fait que la PLC se situe en aval d'un embranchement d'une voie de transduction commune au contrôle du cycle cellulaire et de la polarisation. Il est remarquable, que l'inhibition de la polarisation par les inhibiteurs de PTK autorise, également, la division mais avec un retard conséquent (24 h). Chez

S. cerevisiae, le point de contrôle de la morphogenèse provoque, lui aussi, un retard de division sans pour autant l'inhiber totalement. Ce phénomène pourrait résulter de l'adaptation de la cellule à l'activation prolongée d'un point de contrôle, un mécanisme qui a été observé lors du point de contrôle de l'assemblage du fuseau mitotique. L'utilité de cette adaptation serait de donner à la cellule une chance de survie alors que l'activation continue du point de contrôle empêche la prolifération cellulaire et peut être létale (revue par Rudner et Murray, 1996). Chez la levure bourgeonnante, le point de contrôle de la morphogenèse, assure que l'assemblage de l'actine s'effectue correctement au site de bourgeonnement avant que la division n'ait lieu. Lorsque le point de contrôle est activé, il inhibe CDC28 par phosphorylation sur tyrosine 19. Il serait intéressant d'analyser l'état de phosphorylation des CDK dans des zygotes inhibés dans leur polarisation par la génistéine ou encore par des inhibiteurs de la polymérisation de l'actine. Il se peut que la phosphorylation sur tyrosine des CDK persiste en raison d'un retard général du développement. Toutefois, les points de contrôle que nous avons caractérisés jusqu'à présent, n'agissent pas sur la synthèse des CDK. Aussi, l'analyse de la synthèse des CDK dans des zygotes dont la polarisation est inhibée par la génistéine, devrait nous permettre de faire la distinction entre un retard général du développement et un retard spécifique provoqué par un éventuel point de contrôle de *Fucus*, similaire au point de contrôle de la morphogenèse chez *S. cerevisiae*.

Depuis de nombreuses années, le zygote de *Fucus* est un modèle d'étude de la polarisation cellulaire et permet d'appréhender les mécanismes mis en jeu au cours de l'embryogenèse végétale. Nos travaux ouvrent à présent de nombreuses perspectives pour comprendre les régulations du cycle cellulaire chez les végétaux par une approche biochimique et cellulaire, et étudier les inter-régulations entre le cycle cellulaire et le développement.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adachi, Y. et Laemmli, U. K. (1994) Study of the cell cycle-dependent assembly of the DNA pre-replication centres in *Xenopus* egg extracts. *EMBO J.* **13** 4153-4164.

Aktas, H., Cai, H. et Cooper, G. M. (1997) Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery *via* regulation of cyclin D1 and the cdk inhibitor p27KIP1. *Mol. Cell. Biol.* **17** 3850-3857.

Allen, V. W. et Kropf, D. L. (1992) Nuclear rotation and lineage specification in *Pelvetia* embryos. *Development* **115** 873-883.

Amon, A., Surana, U., Muroff, I. et Nasmyth, K. (1992) Regulation of p34CDC28 tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*. *Nature* **355** 368-371.

Amon, A., Tyers, M., Futcher, B. et Nasmyth, K. (1993) Mechanisms that help the yeast cell cycle clock tick: G2 cyclins transcriptionally activate G2 cyclins and repress G1 cyclins. *Cell* **74** 993-1007.

Anderson, J. A., Lewellyn, A. L. et Maller, J. L. (1997) Ionizing radiation induces apoptosis and elevates cyclin A1-cdk2 activity before but not after the midblastula transition in *Xenopus*. *Mol. Biol. Cell* **8** 1195-1206.

Aprelikova, O., Xiong, Y. et Liu, E. T. (1995) Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. *J. Biol. Chem.* **270** 18195-18197.

Arion, D. et Meijer, L. (1989) M-phase-specific protein kinase from mitotic sea urchin eggs: cyclic activation depends on protein synthesis and phosphorylation but does not require DNA or RNA synthesis. *Exp. Cell Res.* **183** 361-375.

Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L. et Beach, D. (1988) Cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* **55** 371-378.

Azzi, L., Meijer, L., Ostvold, A. C., Lew, J. et Wang, J. H. (1994) Purification of a 15 kDa cdk4- and cdk5-binding protein. *J. Biol. Chem.* **269** 13279-13288.

Bartek, J., Lukas, L. et Strauss, M. (1996) Control mechanisms of cell transition from the G1 phase to the S phase: the R point. *Cas. Lek. Cesk.* **135** 634-635.

Beach, D., Durkacz, B. et Nurse, P. (1982) Functionally homologous cell cycle control genes in budding and fission yeast. *Nature* **300** 706-709.

Beams, H. W. (1937) The air turbine ultracentrifuge, together with some results upon ultracentrifuging the eggs of *Fucus furcatus*. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **21** 571-588.

Becraft, P. W. (1998) Receptor kinase in plant development. *Trends Plant Sc.* **3** 384-388.

Bell, M. H., Halford, N. G., Ormrod, J. C. et Francis, D. (1993) Tobacco plants transformed with *cdc25*, a mitotic inducer gene from fission yeast. *Plant Mol. Biol.* **23** 445-451.

Bentrup, F. et Jaffe, L. F. (1968) Analysing the "group effect": rheotropic responses of developing *Fucus* eggs. *Protoplasma* **65** 25-35.

Berger, F. et Brownlee, C. (1994) Photopolarization of the *Fucus* sp. zygote by blue light involves a plasma membrane redox chain. *Plant Physiol.* **105** 519-527.

Berger, F. et Brownlee, C. (1995) Physiology and development of protoplasts obtained from *Fucus* embryos using laser microsurgery. *Protoplasma* **186** 63-71.

Berger, F., Taylor, A. et Brownlee, C. (1994) Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development. *Science* **263** 1421-1423.

Berleth, T. et Jürgens, G. (1993) The role of *monopteros* gene in organising the basal body region in the *Arabidopsis* embryo. *Development* **118** 575-587.

Binarová, P., Dolezel, J., Dráber, P., Heberle-Bors, E., Strnad, M. et Bögre, L. (1998) Treatment of *Vicia faba* root tip cells with specific inhibitors to cyclin-dependent kinases leads to abnormal spindle formation. *Plant J.* **16** 697-707.

Bisgrove, S. R., Nagasato, C., Motomura, T. et Kropf, D. L. (1997) Immunolocalization of centrin during fertilization and the first cell cycle in *Fucus distichus* and *Pelvetia compressa* (Fucales, Phaeophyceae). *J. Phycol.* **33** 823-829.

Bisgrove, S. R. et Kropf, D. L. (1998) Alignment of centrosomal and growth axes is a late event during polarization of *Pelvetia compressa* zygotes. *Dev. Biol.* **194** 246-256.

Blondel, M. et Mann, C. (1996) G2 cyclins are required for the degradation of G1 cyclins in yeast. *Nature* **384** 279-282.

Boddy, M. N., Furnari, B., Mondesert, O. et Russell, P. (1998) Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science* **280** 909-912.

Bögre, L., Zwerger, K., Meskiene, I., Binarová, P., Csizmadia, V., Planck, C., Wagner, E., Hirt, H. et Heberle-Bors, E. (1997) The cdc2Ms kinase is differentially regulated in the cytoplasm and in the nucleus. *Plant Physiol.* **113** 841-852.

Booher, R. N., Holman, P. S. et Fattaey, A. (1997) Human Myt1 is a cell cycle-regulated kinase that inhibits Cdc2 but not Cdk2 activity. *J. Biol. Chem.* **272** 22300-22306.

Borgne, A. et Meijer, L. (1996) Sequential dephosphorylation of p34(cdc2) on Thr-14 and Tyr-15 at the prophase/metaphase transition. *J. Biol. Chem.* **271** 27847-27854.

Bouget, F. Y., Berger, F. et Brownlee, C. (1998) Position dependent control of cell fate in the *Fucus* embryo: role of intercellular communication. *Development* **125** 1999-2008.

Bouget, F. Y., Gertulla, S., Shaw S, L. et Quatrano R, S. (1996) Localization of actin mRNA during the establishment of Cell polarity and early cell Divisions in *Fucus* embryos. *Plant Cell* **8** 189-201.

Bouget, F. Y., Gertulla, S. et Quatrano, R. S. (1995) Spatial redistribution of poly(A)+ RNA during polarization of the *Fucus* zygote is dependent upon microfilaments. *Dev. Biol.* **171** 258-261.

Brawley, S. H. et Quatrano, R. S. (1979) Effect of microtubule inhibitors on pronuclear migration and embryogenesis in *Fucus distichus* (Pheophyta). *J. Phycol.* **15** 266-272.

Brawley, S. H. (1991) The fast block against polyspermy in fucoid algae is an electrical block. *Dev. Biol.* **144** 94-106.

Brawley, S. H. et Robinson, K. R. (1985) Cytochalasin treatment disrupts the endogenous currents associated with cell polarization in fucoid zygotes: studies of the role of F-actin in embryogenesis. *J. Cell Biol.* **100** 1173-1184.

Brawley, S. H., Quatrano, R. S. et Wetherbee, R. (1977) Fine-structural studies of the gametes and embryo of *Fucus vesiculosus* L. (Phaeophyta). III. Cytokinesis and the multicellular embryo. *J. Cell Sci.* **24** 275-294.

Brawley, S. H., Wetherbee, R. et Quatrano, R. S. (1976) Fine-structural studies of the gametes and embryo of *Fucus vesiculosus* L. (Phaeophyta). II. The cytoplasm of the egg and young zygote. *J. Cell Sci.* **20** 255-271.

Brownley, S. H. et Roberts, D. M. (1989) Calmodulin-binding proteins are developmentally regulated in gametes and embryos of fucoid algae. *Dev. Biol.* **131** 313-320.

Brizuela, L., Draetta, G. et Beach, D. (1987) P13suc1 acts in the fission yeast cell division cycle as a component of the p34cdc2 protein kinase. *EMBO J.* **6** 3507-3514.

Broek, D., Bartlett, R., Crawford, K. et Nurse, P. (1991) Involvement of p34cdc2 in establishing the dependency of S phase on mitosis. *Nature* **349** 388-393.

Brown, J. D. et Moon, R. T. (1998) Wnt signaling: why is everything so negative? *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10** 182-187.

Brownlee, C. et Wood, J. W. (1986) A gradient of free Ca^{2+} in growing rhizoid cells of *Fucus serratus*. *Nature* **320** 624-626.

Cardenas, M. E., Dang, Q., Glover, C. V. et Gasser, S. M. (1992) Casein kinase II phosphorylates the eukaryote-specific C-terminal domain of topoisomerase II *in vivo*. *EMBO J.* **11** 1785-1796.

Cardoso, M. C., Leonhardt, H. et Nadal-Ginard, B. (1993) Reversal of terminal differentiation and control of DNA replication: cyclin A and Cdk2 specifically localize at subnuclear sites of DNA replication. *Cell* **74** 979-992.

Cebolla, A., Vinardell, J. M., Kiss, E., Oláh, B., Roudier, F., Kondorosi, A. et Kondorosi, E. (1999) The mitotic inhibitor ccs52 is required for endoreplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* **18** 4476-4484.

Chant, J. (1996) Generation of cell polarity in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8** 557-565.

Chevalier, S. et Blow, J. (1996) Cell cycle control of replication initiation in eukaryotes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8** 815-821.

Cid, V. J., Duran, A., Del Ray, F., Snyder, M. P., Nombela, C. et Sanchez, M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59** 345-386.

Clark, S. E., Jacobsen, S. E., Levin, J. Z. et Meyerowitz, E. M. (1996) The *clavata* and *shoot meristemless* loci competitively regulate meristem activity in *Arabidopsis*. *Development* **122** 1567-1575.

Clark, S. E., Running, M. P. et Meyerowitz, E. M. (1995) *Clavata3* is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as *clavata1*. *Development* **121** 2057-2067.

Clark, S. E., Running, M. P. et Meyerowitz, E. M. (1993) *Clavata1*, a regulator of meristem and flower development in *Arabidopsis*. *Development* **119** 397-418.

Clark, S. E., Williams, R. W. et Meyerowitz, E. M. (1997) The *clavata1* gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* **89** 575-585.

Clute, P. et Masui, Y. (1997) Microtubule dependence of the chromosomes cycles in *Xenopus laevis* blastomeres under the influence of a DNA synthesis inhibitor, Aphidicolin. *Dev. Biol.* **185** 1-13.

Clute, P. et Masui, Y. (1992) Development of microtubule-dependence of the chromosome cycle at the midblastula transition in *Xenopus laevis* embryos. *Dev. Growth Differ.* **34** 27-36.

Cohen-Fix, O., Peters, J. M., Kirschner, M. W. et Koshland, D. (1996) Anaphase initiation in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the APC-dependent degradation of the anaphase inhibitor Pds1p. *Genes Dev.* **10** 3081-3093.

Colasanti, J., Cho, S. O., Wick, S. et Sundaresan, V. (1993) Localization of the functional p34^{cdc2} homolog of maize in root tip and stomatal complex cells: association with predicted division sites. *Plant Cell* **5** 1101-1111.

Coleman, T. R. et Dunphy, W. G. (1994) Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6** 877-882.

Coleman, T. R., Tang, Z. et Dunphy, W. G. (1993) Negative regulation of the wee1 protein kinase by direct action of the nim1/cdr1 mitotic inducer. *Cell* **72** 919-929.

Correa-Bordes, J. et Nurse, P. (1995) P25rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34cdc2 mitotic kinase. *Cell* **83** 1001-1009.

Craig, S. W. et Jonhson, R. P. (1996) Assembly of focal adhesions: progress, paradigms, and portents. *Curr. Opin. Cell Biol.* 74-75.

Crayton, M. A., Wilson, E. et Quatrano, R. S. (1974) Sulfation of fucoidan in *Fucus* embryos. II. Separation from initiation of polar growth. *Dev. Biol.* **39** 164-167.

D'Urso, G. et Nurse, P. (1997) *Schizosaccharomyces pombe* *cdc20+* encodes DNA polymerase and is required for chromosomal replication but not for the S phase checkpoint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94** 12491-12496.

D'Urso, G., Grallert, B. et Nurse, P. (1995) DNA polymerase , a component of the replication initiation complex, is essential for the checkpoint coupling S phase to mitosis in fission yeast. *J. Cell Sci.* **108** 3109-3118.

Dalton, S. (1992) Cell cycle regulation of the human *cdc2* gene. *EMBO J.* **11** 1797-1804.

Dasso, M. et Newport, J. W. (1990) Completion of DNA replication is monitored by a feedback system that controls the initiation of mitosis *in vitro*: studies in *Xenopus*. *Cell* **61** 811-823.

De Bondt, H. L., Rosenblatt, J., Jancarik, J., Jones, H. D., Morgan, D. O. et Kim, S. H. (1993) Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature* **363** 595-602.

De Veylder, L., Van Montagu, M. et Inzé, D. (1998) Cell cycle control in *Arabidopsis*. Dans: *Plant cell division* (D. Francis D. Dudits D. Inzé Eds). London. Portland Press. 21-45.

De Veylder, L., Segers, G., Glab, N., Casteels, P., Van Montagu, M. et Inzé , D. (1997) The *Arabidopsis* Cks1At protein binds the cyclin-dependent kinases Cdc2aAt and Cdc2bAt. *FEBS Let.* **412** 446-452.

De Veylder, L., de Almeida Engler, J., Burssens, S., Manevski, A., Lescure, B., Van Montagu, M., Engler, G. et Inze, D. (1999) A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. *Planta* **208** 453-462.

Den Haese, G. J., Walworth, N., Carr, A. M. et Gould, K. L. (1995) The *wee1* protein kinase regulates T14 phosphorylation of fission yeast *cdc2*. *Mol. Biol. Cell* **6** 371-385.

Desai, D., Wessling, H. C., Fisher, R. P. et Morgan, D. O. (1995) Effects of phosphorylation by CAK on cyclin binding by *cdc2* and *cdk2*. *Mol. Cell. Biol.* **15** 345-350.

Doerner, P., Jørgensen, J. E., You, R., Steppuhn J, et Lamb, C. (1996) control of root growth and development by cyclin expression. *Nature* **380** 520-523.

Drubin, D. G. et Nelson, W. J. (1996) Origins of cell polarity. *Cell* **84** 335-344.

Ducommun, B., Brambilla, P., Felix, M. A., Franza Br, J. R., Karsenti, E. et Draetta, G. (1991) *cdc2* phosphorylation is required for its interaction with cyclin. *EMBO J.* **10** 3311-3319.

Dudits, D., Magyar, Z., Deak, M., Mészáros, P., Miskolczi, A., Brown, S., Kondorosi, E.,

Athanasisidis, A., Pongor, S., Bako, L., Koncz, C. S. et Györgyey, J. (1998) Cyclin-dependent and calcium-dependent kinase families: response of cell division cycle to hormone and stress signals. Dans: *Plant cell division* (D. Francis D. Duids D. Inzé Eds). London. Portland Press. 21-45.

Duerr, B., Gawienowski, M., Ropp, T. et Jacobs, T. (1993) MsERK1: a mitogen-activated protein kinase from a flowering plant. *Plant. Cell.* **5** 87-96.

Dunphy, W. G., Brizuela, L., Beach, D. et Newport, J. (1988) The *Xenopus* cdc2 protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. *Cell* **54** 423-431.

Durkacz, B., Carr, A. et Nurse, P. (1986) Transcription of the *cdc2* cell cycle control gene of fission yeast *Shizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **5** 369-373.

Duronio, R. J. et O'Farrell, P. H. (1994) Developmental control of a G1-S transcriptional program in *Drosophila*. *Development* **120** 1503-1515.

Edgar, B. (1995) Diversification of cell cycle controls in developing embryos. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7** 815-824.

Edgar, B. A., Kiehle, C. P. et Schubiger, G. (1986) Cell cycle control by the nucleo-cytoplasmic ratio in early *Drosophila* development. *Cell* **44** 365-372.

Edgar, B. A., Sprenger, F., Duronio, R. J., Leopold, P. et O'Farrell, P. H. (1994) Distinct molecular mechanism regulate cell cycle timing at successive stages of *Drosophila* embryogenesis. *Genes. Dev.* **8** 440-452.

Edgar, B. A. et Lehner, C. F. (1996) Developmental control of cell cycle regulators: a fly's perspective. *Science* **274** 1646-1652.

Edgecombe, M., Patel, R. et Whitaker, M. (1991) A cyclin-abundance cycle-independent p34cdc2 tyrosine phosphorylation cycle in early sea urchin embryos. *EMBO J.* **10** 3769-3775.

El-Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W. et Vogelstein, B. (1993) WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppressor. *Cell* **15** 817-825.

Elledge, S. J., Richman, R., Hall, F. L., Williams, R. T., Lodgson, N. et Harper, J. W. (1992) CDK2 encodes a 33-kDa cyclin A-associated protein kinase and is expressed before CDC2 in the cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89** 2907-2911.

Enoch, T., Carr, A. M. et Nurse, P. (1992) Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication. *Genes Dev.* **6** 2035-2046.

Enoch, T. et Nurse, P. (1990) Mutation of fission yeast cell cycle control genes abolishes dependence of mitosis on DNA replication. *Cell* **60** 665-673.

Evans, L. V. (1962) Cytological studies in the genus *Fucus*. *Ann. Bot.* **26** 345-363.

Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D. et Hunt, T. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **33** 389-396.

Ewen, M. E., Oliver, C. J., Sluss, H. K., Miller, S. J. et Peeper, D. S. (1995) P53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. *Genes Dev.* **9** 204-217.

Farmer, J. B. et Williams, J. L. (1898) Contribution to our knowledge of the Fucaceae: their life-history and cytology. *Phil. Trans. Roy. Soc. B* **190** 623-645.

Farmer, J. B. et Williams, J. L. (1896) On fertilisation and segmentation of the spore in *Fucus*. *Proc. Roy. Soc. Lond. B* **60** 188-195.

Ferrel, J. E., Wu, M., Gerhart, J. C. et Marin, G. S. (1991) Cell cycle tyrosine phosphorylation of p34^{cdc2} and a microtubule associated protein kinase homolog in *Xenopus* oocytes and eggs. *Mol. Cell. Biol.* **11** 1965-1971.

Foard, D. E., Haber, A. H. et Fishman, T. N. (1965) Initiation of lateral root primordia without completion of mitosis and without cytokinesis in uniserate pericycle. *Am. J. Bot.* **52** 580-590.

Fobert, P. R., Gaudin, V., Lunness, P., Coen, E. S. et Doonan, J. H. (1996) Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. *Plant Cell* **8** 1465-1476.

Fries, L. (1982) Vanadium an essential element for some marine macroalgae. *Planta* **154** 393-396.

Fries, L. (1977) Growth regulating effects of phenylacetyl acid andp-hydroxyphenylacetic acid on *Fucus spiralis* L. (Phaeophyceae, Fucales) in axenic culture. *Phycologia* **16** 451-455.

Funabiki, H., Yamano, H., Kumada, K., Nagao, K., Hunt, T. et Yanagida, M. (1996) Cut2 proteolysis required for sister-chromatid separation in fission yeast. *Nature* **381** 438-441.

Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M. N., McGowan, C. H. et Russell, P. (1999) Cdc25 inhibited *in vivo* and *in vitro* by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Mol. Biol. Cell* **10** 833-845.

Furukawa, Y., Pinwnica-Worms, H., Ernst, T. J., Kanakura, Y. et Griffinjd, (1990) Cdc2 gene expression at the G1 to S transition in human T lymphocytes. *Science* **250** 805-808.

Furukawa, Y., Terui, Y., Sakoe, K., Ohta, M., Kitagawa, S., Miura, Y. et Saito, M. (1995) Over-expression and amplification of the CDC2 gene in leukaemia cells. *Br. J. Haematol.* **90** 94-99.

Galindo, R. L., Edwards, D. N., Gillespie, S. K. et Wasserman, S. A. (1995) Interaction of the pelle kinase with the membrane-associated protein tube is required for transduction of the dorsoventral signal in *Drosophila* embryos. *Development* **121** 2209-2218.

Garwick, B., Carson, M. et Hartwell, L. (1995) Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may also constitute a specific signal for the *RAD9* checkpoint. *Mol. Cell. Biol.* **15** 6128-6138.

Gautier, J., Minshull, J., Lohka, M., Glotzer, M., Hunt, T. et Maller, J. L. (1990) Cyclin is a component of Maturing-Promoting Factor from *Xenopus*. *Cell* **60** 487-494.

Gautier, J., Norbury, C., Lohka, M., Nurse, P. et Maller, J. (1988) Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2+*. *Cell* **54** 433-439.

Genevière-Garrigues, A. M., Barakat, A., Dorée, M., Moreau, J. L. et Picard, A. (1995) Active cyclin B-*cdc2* kinase does not inhibit DNA replication and cannot drive prematurely fertilized sea urchin eggs into mitosis. *J. Cell Sci.* **108** 2693-2703.

Glab, N., Labidi, B., Qin, L. X., Trehin, C., Bergounioux, C. et Meijer, L. (1994) Olomoucine, an inhibitor of the *cdc2/cdk2* kinases activity, blocks plant cells at the G1 to S and G2 to M cell cycle transitions. *FEBS Let.* **353** 207-211.

Goodner, B. et Quatrano, R. S. (1993) *Fucus* Embryogenesis : A model to study the establishment of polarity. *Plant Cell* **5** 1471-1481.

Gould, K. L., Moreno, S., Owen, D. J., Sazer, S. et Nurse, P. (1991) Phosphorylation at Thr167 is required for *Schizosaccharomyces pombe* p34*cdc2* function. *EMBO J.* **10** 3297-3309.

Gould, K. L. et Nurse, P. (1989) Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2+* protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature* **342** 39-45.

Green, P. B. (1976) Growth and cell pattern formation on an axis: critiques of concepts, terminology, and modes of study. *Bot. Gaz.* **137** 187-202.

Gu, W., Schneider, J. W., Condorelli, G., Kaushal, S., Mahdavi, V. et Nadal-Ginard, B. (1993) Interaction of myogenic factors and the retinoblastoma protein mediates muscle cell commitment and differentiation. *Cell* **72** 1-20.

Gu, Y., Rosenblatt, J. et Morgan, D. O. (1992) Cell cycle regulation of CDK2 activity by phosphorylation of Thr160 and Tyr15. *EMBO J.* **11** 3995-4005.

Guadano, T. M. et Newport, J. W. (1996) Cdk2 kinase is required for entry into mitosis as a positive regulator of Cdc2-cyclin B kinase activity. *Cell* **84** 73-82.

Gumbiner, B. M. (1996) Cell Adhesion: the molecular basis of tissue architecture and

morphogenesis. *Cell* **84** 345-357.

Gutierrez, C. (1998) The retinoblastoma pathway in plant cell cycle and development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1** 492-497.

Hable, W. E. et Kropf, D. L. (2000) Sperm entry induces polarity in fucoid zygotes. *Development* **127** 493-501.

Hable, W. E. et Kropf, D. L. (1998) Roles of secretion and the cytoskeleton in cell adhesion and polarity establishment in *Pelvetia compressa* zygotes. *Dev. Biol.* **198** 45-56.

Hadwiger, J. A., Wittenberg, C., Mendenhall, M. D. et Reed, S. I. (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* *CKS1* gene, a homolog of the *Schisosaccharomyces pombe* *suc1+* gene, encodes a subunit of the *CDC28* protein kinase complex. *Mol. Cell. Biol.* **9** 2034-2041.

Hanks, S. K. et Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* **9** 576-596.

Hannon, G. J., Casso, D. et Beach, D. (1994) KAP: a dual specificity phosphatase that interacts with cyclin-dependent kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** 1731-1735.

Hannun, Y. A. (1996) Functions of ceramide in coordinating cellular responses to stress. *Science* **274** 1855-1859.

Hardtke, C. S. et Berleth, T. (1998) The *Arabidopsis* gene *monopteros* encodes a transcription factor mediating axis formation and vascular development. *EMBO J.* **17** 1405-1411.

Hardwick, K. G., Weiss, E., Luca, F. C., Winey, M. et Murray, A. W. (1996) Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science* **273** 953-956.

Hardwick, K. G. (1998) The spindle checkpoint. *Trends Genet.* **14** 1-4.

Harland, R. M. et Laskey, R. A. (1980) Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *Xenopus laevis*. *Cell* **21** 761-771.

Harper, J. W., Elledge, S. J., Keyomarshi, K., Dynlacht, B., Tsai, L. H., Zhang, P., Dobrowolski, S., Bai, C., Connell-Crowley, L., Swindell, E., Fox, M. P. et Wei, N. (1995) Inhibition of cyclin-dependent kinase by p21. *Mol. Biol. Cell* **6** 387-400.

Hartley, R. S., Rempel, R. E. et Maller, J. L. (1996) *In vivo* regulation of the early embryonic cell cycle in *Xenopus*. *Dev. Biol.* **173** 408-419.

Hartwell, L. H. et Weinert, T. A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* **246** 629-634.

Hartwell, L. H. (1974) *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *Bacteriol. Rev.* **38** 164-198.

Hayles, J., Fisher, D., Woppard, A. et Nurse, P. (1994) Temporal order of S phase and mitosis in fission yeast is determined by the state of the p34cdc2-mitotic B cyclin complex. *Cell* **78** 813-822.

Heichman, K. A. et Roberts, J. M. (1994) Rules to replicate by. *Cell* **79** 557-562.

Hemerly, A., Engler J De, A., Bergounioux, C., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé , D. et Ferreira, P. (1995) Dominant negative mutants of the Cdc2 kinase uncouple cell division from iterative plant development. *EMBO J.* **14** 3925-3936.

Hemerly, A. S., Ferreira, P. C. G., Van Montagu, M. et Inzé, D. (1999) Cell cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link. *BioEssays* **21** 29-37.

Hemerly, A. S., Ferreira, P., de Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G. et Inzé , D. (1993) cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *Plant Cell* **5** 1711-1723.

Henry, C. A., Jordan, J. R. et Kropf, D. L. (1996) Localized membrane-wall adhesions in *Pelvetia* zygotes. *Protoplasma* **190** 39-52.

Hershko, A. (1997) Roles of ubiquitin-mediated proteolysis in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 788-799.

Hershko, A., Ganot, D., Sudakin, V., Dahan, A., Cohen, L. H., Luca, F. C., Ruderman, J. V. et Eytan, E. (1994) Components of a system that ligates cyclin to ubiquitin and their regulation by protein kinase cdc2. *J. Biol. Chem.* **269** 4940-4946.

Hirai, H., Roussel, M. F., Kato, J. Y., Ashmun, R. A. et Sherr, C. J. (1995) Novel INK4 proteins, p19 and p18, are specific inhibitors of the cyclin D-dependent kinases cdk4 and cdk6. *Mol. Cell. Biol.* **15** 2672-2681.

Hoekstra, M. F. (1997) Responses to DNA damage and regulation of cell cycle checkpoint by ATM protein kinase family. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7** 170-175.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. et Ezekowitz, R. A. (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284** 1313-1318.

Horvitz, H. R. et Herskowitz, I. (1992) Mechanisms of asymmetric cell division: two Bs or not two Bs, that is the question. *Cell* **68** 237-255.

Hunt, T. (1989) Maturation promoting factor, cyclin and the control of M-phase. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1** 268-274.

Hunter, T. et Plowman, G. D. (1997) The protein kinases of budding yeast: six score and

more. *Trends. Biochem. Sci.* **22** 18-22.

Hunter, T. (1991) Protein kinase classification. *Methods. Enzymol.* **200** 3-37.

Hurd, A. M. (1920) Effect of unilateral monochromatic light and group orientation on the polarity of germinating *Fucus* spores. *Bot. Gaz.* **70** 25-50.

Hurst, S. R. et Kropf, D. L. (1991) Ionic requirement for establishment of an embryonic axis in *Pelvetia* zygotes. *Planta* **185** 27-33.

Ikegami, S., Taguchi, T., Ohashi, M., Oguro, M., Nagano, H. et Mano, Y. (1978) Aphidicolin prevents mitotic cell division by interfering with the activity of DNA polymerase-alpha. *Nature* **275** 458-460.

Inzé, D., Gutierrez, C. et Chua, N. H. (1999) Trends in plant cell cycle research. *Plant Cell* **11** 991-994.

Irniger, S., Piatti, S., Michaelis, C. et Nasmyth, K. (1995) Genes involved in sister chromatid separation are needed for B-type cyclin proteolysis in budding yeast. *Cell* **77** 1037-1050.

Islas-Flores, I., Oropeza, C. et Hernández-Sotomayor, S. M. T. (1998) Protein phosphorylation during coconut zygotic embryo development. *Plant Physiol.* **118** 257-263.

Izumi, T. et Maller, J. L. (1995) Phosphorylation and activation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase in the absence of cdc2 and cdk2 kinase activity. *Mol. Biol. Cell* **6** 215-226.

Jacqmard, A., de Veylder, L., Segers, G., de Almeida Engler, J., Bernier, G., Van Montagu, M. et Inzé , D. (1999) Expression of *CKS1At* in *Arabidopsis thaliana* indicates a role for the protein in both the mitotic and the endoreduplication cycle. *Planta* **207** 496-504.

Jaffe, L. F. (1968) Localization in the developing *Fucus* egg and the general role of localizing currents. *Adv. Morphog.* **7** 295-328.

Jaffe, L. F. (1956) Effect of polarized light on polarity of *Fucus*. *Science* **123** 1081-1082.

Jaffe, L. F. et Nuccitelli, R. (1974) An ultrasensitive vibrating probe for measuring steady extracellular currents. *J. Cell Biol.* **63** 614-628.

Jaffe, L. F. (1958) Tropistic responses of zygotes of the *Fucaceae* to polarized light. *Exp. Cell Res.* **15** 282-299.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massagué, J. et Pavlevitch, N. P. (1995) Mechanism of cdk activation revealed by the structure of a cyclin A-cdk2 complex. *Nature* **376** 313-320.

Jinno, S., Suto, K., Nagata, A., Igarashi, M., Kanaoka, Y., Nojima, H. et Okayama, H. (1994) Cdc25A is a novel phosphatase functioning early in the cell cycle. *EMBO J.* **13** 1549-1556.

John, P. C. L., Sek, F. J. et Lee, M. G. (1989) A homolog of the cell cycle control protein p34cdc2 participates in the division cycle of *Chlamydomonas*, and a similar protein is detectable in higher plants and remote taxa. *Plant Cell* **1** 1185-1193.

John, P. C. L. (1998) Cytokinin stimulation of cell division: essential signal transduction is *via* cdc25 phosphatase. *J. Exp. Bot. supp.* **49** 91.

Johnson, D. I. (1999) An essential Rho-type GTPase controlling eucaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63** 54-105.

Johnston, L. A. et Edgar, B. A. (1998) Wingless and Notch regulate cell-cycle arrest in the developing *Drosophila* wing. *Nature* **394** 82-84.

Juang, Y. L., Huang, J., Peters, J. M., McLaughlin, M. E., Tai, C. Y. et Pellman, D. (1997) APC-mediated proteolysis of Ase1 and the morphogenesis of the mitotic spindle. *Science* **275** 1311-1314.

Kaldas, P. (1999) The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell. Mol. Life. Sci.* **55** 284-296.

Katsaros, C. et Galatis, B. (1992) Immunofluorescence and electron microscopic studies of microtubules organization during the cell cycle of *Dictyota dichotoma* (Phaeophyceae, Dictyotales). *Protoplasma* **169** 75-84.

Keiper, B. D. et Rhoads, R. E. (1999) Translational recruitment of *Xenopus* maternal mRNAs in response to poly(A) elongation requires initiation factor eIF4G-1. *Dev. Biol.* **206** 1-14.

King, R. W., Deshaies, R. J., Peters, J. M. et Kirschner, M. W. (1996) How proteolysis drives the cell cycle. *Science* **274** 1652-1659.

King, R. W., Jackson, P. K. et Kirschner, M. W. (1994) Mitosis in transition. *Cell* **79** 563-571.

Kipreos, E. T., Lander, L. E., Wing, J. P., He, W. W. et Hedgecock, E. M. (1996) Cul-1 is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* **85** 829-839.

Kishimoto, T. (1994) Cell reproduction: induction of M-phase events by cyclin-dependent cdc2 kinase. *Int. J. Dev. Biol.* **38** 185-191.

Kishimoto, T. (1988) Regulation of metaphase by maturation promoting factor. *Dev. Growth Differ.* **30** 105-115.

Kloareg, B. et Quatrano, R. S. (1988) Structure of the cell walls of marine algae and ecophysiological functions of the matrix polysaccharides. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* **26** 259-315.

Knapp, E. (1931) Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Fucaceen-Eiern. I. Zur Kenntnis der Polarität der Eier von *Cystosira barbata*. *Planta* **14** 731-751.

Kniep, H. (1907) Beiträge zur Keimung-Physiologie und -Biologie von *Fucus*. *Jahrb. Wiss. Bot.* **44** 635-724.

Knight, M. et Parke, M. (1950) A biological study of *Fucus vesiculosus* and *Fucus serratus*. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* **29** 439-501.

Knoblich, J. A., Sauer, K., Jones, L., Richardson, H., Saint, R. et Lehner, C. F. (1994) Cyclin E controls S phase progression and its down-regulation during *Drosophila* embryogenesis is required for the arrest of cell proliferation. *Cell* **77** 107-120.

Koehler, L. D. et Linskens, H. F. (1967) Incorporation of protein and RNA precursors into fertilized *Fucus* eggs. *Protoplasma* **64** 209-212.

Kornbluth, S., Sebastian, B., Hunter, T. et Newport, J. (1994) Membrane localization of the kinase which phosphorylates p34cdc2 on threonine 14. *Mol. Biol. Cell* **5** 273-282.

Krek, W., Ewen, M. E., Shidodkar, S., Arany, Z., Kaelin Jr, W. G. et Livingston, D. M. (1994) Negative regulation of the growth-promoting transcription factor E2F by a stably bound cyclin A-dependent protein kinase. *Cell* **78** 161-172.

Krek, W. et Nigg, E. A. (1991) Differential phosphorylation of vertebrate p34cdc2 kinase at the G1/S and G2/M transitions of the cell cycle: identification of major phosphorylation sites. *EMBO J.* **10** 305-316.

Krek, W. et Nigg, E. A. (1991) Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates. *EMBO J.* **10** 3331-3341.

Kron, S. J. et Gow, N. A. R. (1995) Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* **7** 845-855.

Kropf, D. L., Maddock, A. et Gard, D. L. (1990) Microtubule distribution and function in early *Pelvetia* development. *J. Cell Sci.* **97** 545-552.

Kropf, D. L. et Quatrano, R. S. (1987) Localization of membrane-associated calcium during development of fucoid alga using chlorotetracycline. *Planta* **171** 158-170.

Kropf, D. L. (1997) Induction of polarity in fucoid zygotes. *Plant Cell* **9** 1011-1020.

Kropf, D. L. (1992) Establishment and expression of cellular polarity in fucoid zygotes. *Microbiol. Rev.* **56** 316-339.

Kropf, D. L., Hopkins, R. et Quatrano, R. S. (1989) Protein synthesis and morphogenesis are not tightly linked during embryogenesis in *Fucus*. *Dev. Biol.* **134** 451-461.

Kropf, D. L., Kloareg, B. et Quatrano, R. S. (1988) Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in *Fucus* zygotes. *Science* **239** 187-190.

Kumagai, A. et Dunphy, W. G. (1999) Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev.* **13** 1067-1072.

Kumagai, A. et Dunphy, W. G. (1996) Purification and molecular cloning of Plx1, a Cdc25-regulatory kinase from *Xenopus* egg extracts. *Science* **273** 1377-1380.

La Claire, J. W. (1982) Light and electron microscopic studies on growth and reproduction in *Culeria* (Phaeophyta). III. Nuclear division in the trichothallic meristem of *C. cylindrica*. *Phycologia* **21** 273-287.

Labbé, J. C., Picard, A., Peaucellier, G., Cavadore, J. C., Nurse, P., Dorée, M. et Morin, N. (1989) Purification of MPF from starfish: identification as the H1 histone kinase and a possible mechanism for its periodic activation. *Cell* **57** 253-263.

Lamb, T. D. et Pugh Jr, E. N. (1992) G protein cascades: gain and kinetics. *Trends Neurosc.* **15** 291-298.

Lane, M. E., Sauer, K., Wallace, K., Jan, Y. N., Lehner, C. F. et Vaessin, H. (1996) Dacapo, a cyclin-dependent kinase inhibitor, stops cell proliferation during *Drosophila* development. *Cell* **87** 1225-1235.

Lauze, E., Stoelcker, B., Luca, F. C., Weiss, E., Schutz, A. R. et Winey, M. (1995) Yeast spindle pole body duplication gene MPS1 encodes an essential dual specificity protein kinase. *EMBO J.* **14** 1655-1663.

Lee, T. H., Turck, C. et Kirschner, M. W. (1994) Inhibition of cdc2 activation by INH/PP2A. *Mol. Biol. Cell* **5** 323-338.

Lee, T. H., Solomon, M. J., Mumby, M. C. et Kirschner, M. W. (1991) INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A. *Cell* **64** 415-423.

Lehner, C. F. et O'Farrel, P. H. (1990) Drosophila cdc2 homologs: A functional homolog is coexpressed with cognate variant. *EMBO J.* **9** 3573-3581.

Lenburg, M. E. et O'Shea, E. K. (1996) Signaling phosphate starvation. *Trends Biochem. Sci.* **21** 383-387.

Lenhard, M. et Laux, T. (1999) Shoot meristem formation and maintenance. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2** 44-50.

Levrin, T. (1952) Remarks on the submicroscopical structure of eggs and spermatozoids of *Fucus* and related genera. *Physiologia Pl.* **5** 528-539.

Lew, D. J. et Reed, S. (1995) A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J. Cell Biol.* **129** 739-749.

Lew, D. J. et Kornbluth, S. (1996) Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8** 795-804.

Lew, D. J. et Reed, S. (1993) Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by CDC28 and cyclins. *J. Cell Biol.* **120** 1305-1320.

Li, X. et Nicklas, R. B. (1995) Mitotic forces control a cell cycle checkpoint. *Nature* **373** 630-632.

Liao, H., Li, G. et Yen, T. J. (1994) Mitotic regulation of microtubule cross-linking activity of CENP-E kinetochore protein. *Science* **265** 394-398.

Liu, C. M. et Meinke, D. W. (1998) The *titan* mutants of *Arabidopsis* are disrupted in mitosis and the cell cycle control during seed development. *Plant J.* **16** 21-31.

Love, J., Brownlee, C. et Trewavas, A. J. (1997) Ca^{2+} and calmodulin dynamics during photopolarization in *Fucus serratus* zygotes. *Plant Physiol.* **115** 249-261.

Lowrance E, W. (1937) Effect of temperature gradients upon polarity in eggs of *Fucus furcatus*. *J. Cell Comp. Physiol.* **10** 321-337.

Lu, X. et Lane, D. P. (1993) Differential induction of transcriptionally active p53 following UV or ionizing radiation: defects in chromosome instability syndromes? *Cell* **75** 765-778.

Lund, E. J. (1923) Electrical control of organic polarity in the egg of *Fucus*. *Bot. Gaz.* **76** 288-301.

Luo, Y., Hurwitz, J. et Massagué, J. (1995) Cell cycle inhibition by independent cdk and PCNA binding domains in p21Cip1. *Nature* **375** 159-161.

Magyar, Z., Bakó, L., Bögrel, L., Dedeoglu, D., Kapros, T. et Dudits, D. (1993) Active *cdc2* gene and cell cycle phase-specific *cdc2*-related kinase complexes in hormone-stimulated alfalfa cells. *Plant J.* **4** 151-161.

Magyar, Z., Meszaros, T., Miskolczi, P., Deak, M., Feher, A., Brown, S., Kondorosi, E., Athanasiadis, A., Pongor, S., Bilgin, M., Bako, L., Koncz, C. et Dudits, D. (1997) Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. *Plant*

Cell. **9** 223-235.

Maltzman, W. et Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in non transformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.* **4** 1689-1694.

Markley, D. R. et Wilce, R. T. (1975) The ultrastructure of reproduction in the brown alga *Pyliella littoralis*. I. Mitosis and cytokinesis in the plurilocular gametangia. *Protoplasma* **85** 219-241.

Martinez, M. C., JØrgensen, J. E., Lawton, M. A., Lamb, C. J. et Doerner, P. W. (1992) Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 7360-7364.

Masui, Y. (1972) Distribution of the cytoplasmic activity inducing vesicle breakdown in frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **179** 365-378.

Masui, Y. et Markert, C. L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* **177** 129-146.

Masui, Y. et Wang, P. (1998) Cell cycle transition in early embryonic development of *Xenopus laevis*. *Biol. Cell* **90** 537-548.

Matsuoka, M., Kato, J. Y., Fisher, R. P., Morgan, D. O. et Sherr, C. J. (1994) Activation of cyclin-dependent kinase 4 (cdk4) by mouse MO15-associated kinase. *Mol. Cell. Biol.* **14** 7265-7275.

Mayer, U., Torres-Ruiz R, A., Berleth, T., Miséra, S. et Jürgens, G. (1991) Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* **353** 402-407.

McGowan, C. H. et Russell, P. (1993) Human wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34^{cdc2} exclusively on Tyr-15. *EMBO J.* **12** 75-85.

McKibbin, R. S., Halford, N. G. et Francis, D. (1998) Expression of fission yeast *cdc25* alters the frequency of lateral root formation in transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* **36** 601-612.

McLachlan, J. et Chen, L. C. M. (1972) Formation of adventive embryos from rhizoidal filaments in sporelings of four species of *Fucus* (Phaeophyceae). *Can. J. Bot.* **50** 1841-1844.

McLachlan, J., Chen, L. C. M. et Edelstein T, (1971) The culture of four species of *Fucus* under laboratory conditions. *Can. J. Bot.* **49** 1463-1469.

McMahon, A. P. et Moon, R. T. (1989) Ectopic expression of the proto-oncogene *int-1* in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell* **58** 1075-1084.

McMillan, J. N., Sia, R. A. L. et Lew, D. J. (1998) A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast. *J. Cell Sci.* **142** 1487-1499.

Meijer, L., Ostvold, A. C., Walass, S. I., Lund, T. et Laland, S. G. (1991) High-mobility-group proteins P1, I and Y as substrates of the M-phase-specific p34cdc2/cyclincdc13 kinase. *Eur. J. Biochem.* **196** 557-567.

Meijer, L., Azzi, L. et Wang, J. Y. (1991) Cyclin B targets p34cdc2 for tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* **10** 1545-1554.

Meijer, L., Arion, D., Golsteyn, R., Pines, J., Brizuela, L., Hunt, T. et Beach, D. (1989) Cyclin is a component of the sea urchin egg M-phase specific histone H1 kinase. *EMBO J.* **8** 2275-2282.

Meinke, D. W. (1995) Molecular genetic of plant embryogenesis. *Ann. Rev. Mol. Biol.* **46** 369-394.

Mendenhall, M. D. (1993) An inhibitor of p34CDC28 protein kinase activity from *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **259** 216-219.

Mendenhall, M. D. et Hodge, A. E. (1998) Regulation of Cdc28 Cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62** 1191-1243.

Meskiene, I., Bogre, L., Dahl, M., Pirck, M., Ha, D. T., Swoboda, I., Heberle-Bors, E., Ammerer, G. et Hirt, H. (1995) CycMs3, a novel B-type alfalfa cyclin gene, is induced in the G0-to-G1 transition of the cell cycle. *Plant Cell* **7** 759-771.

Meyerson, M., Enders, G. H., Wu, C. L., Su, L. K., Gorka, C., Nelson, C., Harlow, E. et Tsai, L. H. (1992) A family of human cdc2-related protein kinases. *EMBO J.* **11** 4933-4991.

Miller, D. D., Callaham, D. A., Gross, D. J. et Hepler, P. K. (1992) Free Ca²⁺ gradient in growing pollen tube of Lilium. *J. Cell Sci.* **101** 7-12.

Miller, J. R. et Moon, R. T. (1996) Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev.* **10** 2527-2539.

Mironov, V., de Veylder, L., Van Montagu, M. et Inzé , D. (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants- the nexus. *Plant. Cell.* **11** 509-522.

Modiano, J. F., Domenico, J., Szepesi, A., Lucas, J. J. et Gelfand, E. W. (1994) Differential requirements for interleukin-2 distinguish the expression and activity of the cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk2 in human T cells. *J. Biol. Chem.* **269** 32972-32978.

Moon, R. T., Brown, J. D. et Torres, M. (1997) WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet.* **13** 157-162.

Moreau, J. L., Marques, F., Barakat, A., Schatt, P., Lozano, J. C., Peaucellier, G., Picard, A. et Geneviere, A. M. (1998) Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication

during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. *Dev. Biol.* **200** 182-197.

Moreno, S., Hayles, J. et Nurse, P. (1989) Regulation of p34cdc2 protein kinase during mitosis. *Cell* **58** 361-372.

Morgan, D. O. (1999) Regulation of the APC and the exit from mitosis. *Nat. Cell. Biol.* **1** E47-E53.

Morgan, D. O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** 261-291.

Morgan, D. O. (1995) Principles of CDK regulation. *Nature* **374** 131-134.

Motomura, T. (1994) Electron and immunofluorescence microscopy on the fertilization of *Fucus distichus* (Fucales, Phaeophyceae). *Protoplasma* **178** 97-110.

Motomura, T. (1995) Premature chromosome condensation of the karyogamy-blocked sperm pronucleus in the fertilization in zygotes of the brown alga *Fucus distichus*. *J. Phycol.* **31** 108-113.

Mueller, P. R., Coleman, T. R., Kumagai, A. et Dunphy, W. G. (1995) Myt1: a membrane-associated inhibitory kinase that phosphorylates Cdc2 on both threonine-14 and tyrosine-15. *Science* **270** 86-90.

Müller D, G. et Jaenicke, L. (1973) Fucoserraten, the female sex attractant of *Fucus Serratus*. *FEBS Let.* **30** 137-139.

Müller, R. (1995) Transcriptional regulation during the mammalian cell cycle. *Trends Genet.* **11** 173-178.

Mulner-Lorillon, O., Cormier, P., Labbe, J. C., Doree, M., Poulhe, R., Osborne, H. et Belle, R. (1990) M-phase-specific cdc2 protein kinase phosphorylates the beta subunit of casein kinase II and increases casein kinase II activity. *Eur. J. Biochem.* **193** 529-534.

Murray, A. et Hunt, T. (1993). Dans: *The cell cycle*. Oxford U. K. Oxford university Press

Murray, A. (1994) Cell cycle checkpoints. *Curr. Opin. Cell Biol.* **6** 872-876.

Murray, A. W. et Kirschner, M. W. (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* **339** 275-280.

Murray, A. W. (1989) Cyclin synthesis and degradation and the embryonic cell cycle. *J. Cell Sci. Suppl.* **12** 65-76.

Mustelin, T., Coggeshall, K. M., Isakov, N. et Altman, A. (1990) T cell antigen receptor-mediated activation of phospholipase C requires tyrosine phosphorylation. *Science* **247** 1584-

Nagasato, C., Motomura, T. et Ichimura, T. (1999) Influence of centriole behavior on the first spindle formation in zygotes of the brown alga *Fucus distichus* (Fucales, Phaeophyceae). *Developmental Biology (orlando)* **208** 200-209.

Nakagami, H., Sekine, M., Murakami, H. et Shimmyo, A. (1999) Tobacco retinoblastoma-related protein phosphorylated by a distinct cyclin-dependent kinase complex with cdc2/cyclin D *in vitro*. *Plant J.* **18** 243-252.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Ionomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D. Y. et Nakayama, K. (1996) Mice lacking p27(Kip 1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell* **85** 707-720.

Nasmyth, K. et Nurse, P. (1981) Cell division cycle mutants altered in DNA replication and mitosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **182** 119-124.

Navas, T. A., Zhou, Z. et Elledge, S. J. (1995) DNA polymerase links the DNA replication machinery to the S phase checkpoint. *Cell* **80** 29-39.

Nelson, D. R. et Jaffe, L. F. (1973) Cell without cytoplasmic movements respond to cytochalasin. *Dev. Biol.* **30** 206-208.

Neufeld, T. P., de La Cruz, A. F., Johnston, L. A. et Edgar, B. A. (1998) Coordination of growth and cell division in the *Drosophila* wing. *Cell* **93** 1183-1193.

Neufeld, T. P. et Edgar, B. A. (1998) Connections between growth and the cell cycle. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10** 784-790.

Nicklas, R. B. (1997) How cells get the right chromosomes. *Science* **275** 632-637.

Nienburg, W. (1931) Die Entwicklung der Keimlige von *Fucus vesiculosus* und ihre Bedeutung für die Phylogenie der Phaeophyceen. *Wiss. Meerunt. Abt. Kiel* **1** 52-62.

Nigg, E. A. (1991) The substrates of the cdc2 kinase. *Sem. Cell Biol.* **2** 261-270.

Novotny, A. M. et Forman, M. (1974) The relationship between changes in cell wall composition and the establishment of polarity in *Fucus* embryos. *Dev. Biol.* **40** 162-173.

Nuccitelli, R. et Jaffe, L. F. (1974) Spontaneous current pulses through developing fucoid eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71** 4855-4859.

Nuccitelli, R. (1978) Ooplasmic segregation and secretion in the *Pelvetia* egg is accompanied by a membrane-generated electrical current. *Dev. Biol.* **62** 13-33.

Nurse, P. et Bissett, Y. (1981) Gene required in G1 for commitment to cell cycle and in G2

for control of mitosis in fission yeast. *Nature* **292** 558-560.

Nurse, P., Thuriaux, P. et Nasmyth, K. (1976) Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* **146** 167-178.

Ohtsubo, J. T. et Roberts, J. M. (1993) Cyclin-dependent regulation of G1 in mammalian fibroblasts. *Science* **259** 1908-1912.

Oltmanns, F. (1922) Dans: *Morphologie und Biologie der Algen*. Jena. Jena Verlag

Pan, Z. Q., Amin, A. et Hurwitz, J. (1993) Characterisation of the in vitro reconstituted cyclin A or B1-dependent cdk2 and cdc2 kinase activities. *J. Biol. Chem.* **268** 682-685.

Parge, H. E., Arvai, A. S., Murtari, D. J., Reed, S. I. et Tainer, J. A. (1993) Human CksHs2 atomic structure: a role for its hexameric assembly in cell cycle control. *Science* **262** 387-395.

Paris, J., Le Guellec, R., Couturier, A., Le Guellec, K., Omilli, F., Camonis, J., MacNeill, S. et Phillippe, M. (1991) Cloning by differential screening of *Xenopus* cDNA coding for a protein highly homologous to cdc2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** 1039-1043.

Parsons, J. T. et Parsons, S. J. (1997) Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 187-192.

Partanen, J., Schwartz, L. et Rossant, J. (1998) Opposite phenotypes of hypomorphic and Y766 phosphorylation site mutations reveal a function for Fgfr1 in anteroposterior patterning of mouse embryos. *Genes Dev.* **12** 2332-2344.

Parviz, F. et Heideman, W. (1998) Growth-independent regulation of CLN3 mRNA levels by nutrients in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **180** 225-230.

Patra, D. et Dunphy, W. G. (1996) Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks homolog, has multiple essential roles in cell cycle control. *Genes Dev.* **10** 1503-1515.

Paulovich, A. G., Toczyski, D. P. et Hartwell, L. H. (1997) When checkpoints fail. *Cell* **88** 315-321.

Pepper, D. S., Parker, L. L., Ewen, M. E., Toebe, M., Hall, F. L., Xu, M., Zantema, A., Van Der Eb, A. J. et Piwnica-Worms, H. (1993) A- and B-cyclins differentially modulate substrate specificity of cyclin-cdk complexes. *EMBO J.* **10** 1535-1544.

Pepper, D. S., Upton, T. M., Ladha, M. H., Neuman, E., Zalvide, J., Bernards, R., Decaprio, J. A. et Ewen, M. E. (1997) Ras signaling linked to the cell cycle by the retinoblastoma protein. *Nature* **386** 177-181.

Penton, A., Selleck, S. B. et Hoffmann, F. M. (1997) Regulation of cell cycle synchronization by decapentaplegic during *Drosophila* eye development. *Science* **275** 203-206.

Peter, M. et Herskowitz, I. (1994) Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. *Cell* **79** 181-184.

Peter, M., Nakagawa, J., Dorée, M., Labbé, J. C. et Nigg, E. A. (1990) *In vitro* disassembly of the nuclear lamina and M phase-specific phosphorylation of lamins by cdc2 kinase. *Cell* **61** 591-602.

Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J. et Helin, K. (1999) Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. *EMBO J.* **18** 396-410.

Pines, J. et Hunter, T. (1991) The differential localization of humans cyclins A and B is due to a cytoplasmic retention signal in cyclin B. *EMBO J.* **13** 3772-3782.

Pines, J. (1996) Cell cycle: reaching for a role for Cks proteins. *Curr. Biol.* **6** 1399-1402.

Pines, J. (1995) Cyclins and cyclin-dependent kinases: a biochemical view. *Biochem. J.* **308** 697-711.

Planas-Silva, M. D. et Weinberg, R. A. (1997) The restriction point and control of cell proliferation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 768-772.

Planchais, S., Glab, N., Trehin, C., Perennes, C., Bureau, J. M., Meijer, L. et Bergounioux, C. (1997) Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension. *Plant J.* **12** 191-202.

Plesse, B., Fleck, J. et Genschik, P. (1998) The ubiquitin-dependent proteolitic pathway and cell cycle control. Dans: *Plant Cell division* (D. Francis D. Dudits D. Inzé Eds). London. Portland Press. 145-163.

Polymenis, M. et Schmidt E, V. (1997) Coupling of cell division to cell growth by translational control of the G1 cyclin CLN3 in yeast. *Genes Dev.* **11** 2522-2531.

Poon, R. Y. et Hunter, T. (1995) Dephosphorylation of Cdk2 Thr160 by the cyclin-dependent kinase-interacting phosphatase KAP in the absence of cyclin. *Science* **270** 90-93.

Posada, J. et Cooper, J. A. (1992) Molecular signal integration. Interplay between serine, threonine, and tyrosine phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* **3** 583-592.

Pu, R. et Robinson, K. R. (1998) Cytoplasmic calcium gradients and calmodulin in the early development of the fucoid alga *Pelvetia compressa*. *J. Cell. Sci.* **111** 3197-3207.

Quatrano, R. S. et Shaw, S. L. (1997) Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends Plant Sc.* **2** 15-21.

Quatrano, R. S. (1990) Polar axis fixation and cytoplasmic localization in *Fucus*. Dans:

Genetics of pattern formation and growth control (A Mahowald Eds) 31-46.

Quatrano, R. S. (1974) Developmental biology: development in marine organisms. Dans: *Experimental marine biology* 303-344..

Quatrano, R. S., Brian, L., Aldridge, J. et Schultz, T. (1991) Polar axis fixation in *Fucus* zygotes: components of the cytoskeleton and extracellular matrix. *Development - Supp.* **1** 11-16.

Quatrano, R. S. (1973) Separation of processes associated with differentiation of two-celled *Fucus* embryos. *Dev. Biol.* **30** 209-213.

Quatrano, R. S. (1972) An ultrastructural study of the determined site of rhizoid formation in *Fucus* zygotes. *Exp. Cell Res.* **70** 1-12.

Quatrano, R. S. (1968) Rhizoid formation in *Fucus* zygotes: dependence on protein and ribonucleic acid syntheses. *Science* **162** 468-470.

Quelle, D. E., Ashmun, R. A., Shurtleff, S. A., Kato, J. Y., Bar, S. D., Roussel, M. F. et Sherr, C. J. (1993) Overexpression of mouse D-type cyclins accelerates G1 phase in rodent fibroblasts. *Genes Dev.* **7** 1559-1571.

Raff, J. W. et Glover, D. M. (1988) Nuclear and cytoplasmic mitotic cycles continue in *Drosophila* embryos in which DNA synthesis is inhibited with aphidicolin. *J. Cell Biol.* **107** 2009-2019.

Rao, P. N. et Johnson, R. T. (1970) Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. *Nature* **225** 159-164.

Rathore, K. S., Cork, R. J. et Robinson, K. R. (1991) A cytoplasmic gradient of Ca^{2+} is correlated with the growth of lily pollen tubes. *Dev. Biol.* **148** 612-619.

Reed, E. A. et Whitaker, D. M. (1941) Polarized plasmolysis of *Fucus* eggs with particular reference to ultraviolet light. *J. Cell Comp. Physiol.* **18** 329-338.

Reichheld, J. P., Vernoux, T., Lardon, F., Van Montagu, M. et Inzé , D. (1999) Specific checkpoints regulate plant cell cycle progression in response to oxidative stress. *Plant J.* **17** 647-656.

Rempel, R. E., Sleight, S. B. et Maller, J. L. (1995) Maternal *Xenopus* Cdk2-cyclin E complexes function during meiotic and early embryonic cell cycles that lack a G1 phase. *J. Biol. Chem.* **270** 6843-6855.

Resnitzky, D., Gossen, M., Bujard, H. et Reed, S. I. (1994) Acceleration of the G1/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* **14** 1669-1679.

Rhind, N. et Russell, P. (1998) Mitotic DNA damage and replication checkpoints in yeast. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10** 749-758.

Rhind, N., Furnari, B. et Russell, P. (1997) Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes Dev.* **11** 504-511.

Richardson, H. E., Stueland, C. S., Thomas, J. et Reed, S. I. (1990) Human cDNAs encoding homologs of the small p34 cdc28/cdc2-associated protein of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev.* **4** 1332-1344.

Riou-Khamlich, C. ., Huntley, R. ., Jacqmar, A. et Murray, J. A. H. (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* **283** 1541-1544.

Roberts, J. M. (1993) Turning DNA replication on and off. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **5** 201-206.

Roberts, S. et Brownlee, C. (1995) Calcium influx, fertilisation potential and egg activation in *Fucus serratus*. *Zygote* **3** 191-197.

Roberts, S. K., Berger, F. et Brownlee, C. (1993) The role of Ca^{2+} in signal transduction following fertilization in *Fucus serratus*. *J. Exp. Biol.* **184** 197-212.

Robinson, K. R. (1996a) Fucoid zygotes germinate from their darkest regions, not their brightest ones. *Plant Physiol.* **112** 1401-1401.

Robinson, K. R. et Cone, R. (1980) Polarization of fucoid eggs by calcium ionophore gradient. *Science* **207** 77-78.

Robinson, K. R. et Jaffe, L. F. (1974) Polarizing fucoid eggs drive a calcium current through themselves. *Science* **187** 70-72.

Robinson, K. R. (1996b) Calcium and the photopolarization of *Pelvetia* zygotes. *Planta* **198** 378-384.

Robinson, K. R., Lorenzi, R., Ceccarelli, N. et Gualtieri, P. (1998) Retinal identification in *Pelvetia fastigiata*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243** 776-778.

Robinson, K. R., Wozniak, M., Pu, R. et Messerli, M. (1999) Symmetry breaking in the zygotes of the fucoid algae: controversies and recent progress. *Curr. Top. Dev. Biol.* **44** 101-125.

Robinson, K. R. et Miller, B. J. (1997) The coupling of cyclic GMP and photopolarization of *Pelvetia* zygotes. *Dev. Biol.* **187** 125-130.

Roemer, T., Vallier, L. G. et Snyder, M. (1996) Selection of polarized growth sites in yeast. *Trends Cell Biol.* **6** 434-441.

Rollins, M. B. et Andrews, M. T. (1991) Morphogenesis and regulated gene activity are independent of DNA replication in *Xenopus* embryos. *Development* **112** 559-569.

Rosenvinge, K. L. (1889) Influence des agents extérieurs sur l'organisation polaire et dorsoventrale des plantes. *Rev. Gen. Bot.* **1** 53-62.

Roth, S. Y. et Allis, C. D. (1992) Chromatin condensation: does histone H1 dephosphorylation play a role? *Trends Biochem. Sci.* **17** 93-98.

Rudner, A. D. et Murray, A. W. (1996) The spindle assembly checkpoint. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8** 773-780.

Russell, P. (1998) Checkpoints on the road to mitosis. *Trends Biochem. Sci.* **23** 399-402.

Satterwhite, L. L., Lohka, M. J., Wilson, K. L., Scherson, T. Y., Cisek, L. J., Corden, J. L. et Pollard, T. D. (1992) Phosphorylation of myosin-II regulatory light chain by cyclin-p34cdc2: a mechanism for the timing of cytokinesis. *J. Cell Biol.* **118** 595-605.

Sauer, K. et Lehner, C. F. (1995) The role of cyclin E in the regulation of entry into S-phase. Dans: *Progress in Cell Cycle Research* (L. Meijer S. Guidet H.Y.L. Tung Eds) **1** 125-139.

Schenk, P. W. et Snaar-Jagalska, B. E. (1999) Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim. Biophys. Acta* **1449** 1-24.

Schmidt, E. D. L., Guzzo, F., Toonen, M. A. J. et Devries, S. C. (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* **124** 2049-2062.

Schmidt, E. D. L., Dejong, A. J. et Devries, S. C. (1994) Signal molecules involved in plant embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* **26** 1305-1313.

Schwanbeck, R. et Wisniewski, J. R. (1997) Cdc2 and mitogen-activated protein kinases modulate DNA binding properties of the putative transcriptional regulator *Chironomus* high mobility group protein I. *J. Biol. Chem.* **272** 27476-27483.

Schwob, E., Bohm, T., Mendenhall, M. D. et Nasmyth, K. (1994) The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79** 233-244.

Segers, G., Gadisseur, I., Bergounioux, C., de Almeida Engler, J., Jacqmard, A., Van Montagu, M. et Inzé , D. (1996) The *Arabidopsis* cyclin-dependent kinase gene *cdc2bAt* is preferentially expressed during S and G2 phases of the cell cycle. *Plant J.* **10** 601-612.

Serrano, M., Hannon, G. J. et Beach, D. (1993) A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* **366** 704-707.

Serrano, M. (1997) The tumor suppressor protein p16^{Ink4a}. *Exp. Cell Res.* **237** 7-13.

Seydoux, G. (1996) Mechanisms of translational control in early development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6** 555-561.

Shaw, S. L. et Quatrano, R. S. (1996a) The role of targeted secretion in the establishment of cell polarity and the orientation of the division plane in *Fucus* zygotes. *Development* **122** 2623-2630.

Shaw, S. L. et Quatrano, R. S. (1996b) Polar localization of a dihydropyridine receptor on living *Fucus* zygotes. *J. Cell. Sci.* **109** 335-342.

Sherr, C. J. (1994) G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79** 551-555.

Sherr, C. J., Kato, J., Quelle, D. E., Matsuoka, M. et Roussel, M. F. (1994) D-type cyclins and their cyclin-dependent kinases: G1 phase integrators of the mitogenic response. *Cold. Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* **59** 11-19.

Sluder, G., Thompson, E. A., Rieder, C. L. et Miller, F. J. (1995) Nuclear envelope breakdown is under nuclear not cytoplasmic control in sea urchin zygotes. *J. Cell. Biol.* **129** 1447-1458.

Sluder, G., Miller, F. J., Thompson, E. A. et Wolf, D. E. (1994) Feedback control of the metaphase-anaphase transition in sea urchin zygotes: role of maloriented chromosomes. *J. Cell Sci.* **117** 189-198.

Smith, L. G., Hake, S. et Sylvester, A. W. (1996) The *tangled-1* mutation alters cell division orientations throughout maize leaf development without altering leaf shape. *Development* **122** 481-489.

Soni, R., Carmichael, J. P., Shah, Z. H. et Murray, J. A. (1995) A family of cyclin D homologs from plants differentially controlled by growth regulators and containing the conserved retinoblastoma protein interaction motif. *Plant Cell* **7** 85-103.

Sorger, P. K., Dobles, M., Tournebize, R. et Hyman, A. A. (1997) Coupling cell division and cell death to microtubule dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 807-814.

Sorger, P. K. et Murray, A. W. (1992) S-phase feedback control in budding yeast independent of tyrosine phosphorylation of p34cdc28. *Nature* **355** 365-368.

Speksnijder, J. E., Miller, A. L., Weisenseel, M. H., Chen, T. H. et Jaffe, L. F. (1989) Calcium buffer injections block fucoid egg development by facilitating calcium diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86** 6607-6611.

Staehelin, L. A. et Hepler, P. K. (1996) Cytokinesis in higher plants. *Cell* **84** 821-824.

Stals, H., Bauwens, S., Traas, J., Van Montagu, M., Engler, G. et Inzé , D. (1997) Plant CDC2 is not only targeted to the pre-prophase band, but also co-localizes with the spindle,

phragmoplast, and chromosomes. *FEBS Let.* **418** 229-234.

Steinmann, T., Geldner, N., Mangold, S., Jackson, C. L., Paris, S., Galweiler, L., Palme, K. et Jürgens, G. (1999) Coordinated polar localization of auxin efflux carrier by GNOM ARF GEF. *Science* **286** 316-318.

Stephens, L., Hardin, J., Keller, H. et Wilt, F. (1986) The effects of aphidicolin on morphogenesis and differentiation in the sea urchin embryo. *Dev. Biol.* **118** 64-69.

Stern, B. et Nurse, P. (1996) A quantitative model for the cdc2 control of S phase and mitosis in fission yeast. *Trends Genet.* **12** 345-350.

Stone, J. M. et Walker, J. C. (1995) Plant protein kinase families and signal transduction. *Plant Physiol.* **108** 451-457.

Strasburger, E. (1897) Kernteilung und Befruchtung bei *Fucus*. *Jahrb. Wiss. Bot.* **30** 351-374.

Sun, Y., Dilkes, B. P., Zhang, C., Dante, R. A., Carneiro, N. P., Lowe, K. S., Jung, R., Gordon-Kamm, W. J. et Larkins, B. A. (1999) Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** 4180-4185.

Swope, R. E. et Kropf, D. L. (1993) Pronuclear positioning and migration during fertilization in *Pelvetia*. *Dev. Biol.* **157** 269-276.

Tanaka, M., Wang, D. Y., Kamo, T., Igarashi, H., Wang, Y., Xiang, Y. Y., Tanioka, F., Naito, Y. et Sugimura, H. (1998) Interaction of EphB2-tyrosine kinase receptor and its ligand conveys dorsalization signal in *Xenopus laevis* development. *Oncogene* **17** 1509-1516.

Tang, Y. et Reed, S. I. (1993) The CDK-associated protein CKS1 functions both in G1 and G2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **7** 822-832.

Tang, Z., Coleman, T. R. et Dunphy, W. G. (1993) Two distinct mechanisms for negative regulation of the Wee1 protein kinase. *EMBO J.* **12** 3427-3436.

Tanimoto, A., Kao, C. Y., Chang, C. C., Sasaguri, Y. et Padmanabhan, R. (1998) Deregulation of cdc2 gene expression correlates with overexpression of a 110 kDa CCAAT box binding factor in transformed cells. *Carcinogenesis* **19** 1735-1741.

Taylor, A. R. et Brownlee, C. (1993) Calcium and potassium currents in the *Fucus* egg. *Planta* **189** 109-119.

Taylor, A. R., Manison, N. F. H., Fernandez, C., Wood, J. et Brownlee, C. (1996) Spatial organization of calcium signaling involved in cell volume control in the *Fucus* rhizoid. *Plant Cell* **8** 2015-2031.

Thomas, B. J., Gunning, D. A., Cho, J. et Zipursky, L. (1994) Cell cycle progression in the developing *Drosophila* eye: roughex encodes a novel protein required for the establishment of G1. *Cell* **77** 1003-1014.

Thuret, G. (1854) Recherches sur la fécondation des fucacées. *Ann. Sci. Nat. (Bot)* **4** 197-214.

Torrez-Ruiz, R. A. et Jürgens, G. (1994) Mutations in the *fass* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* **120** 2967-2978.

Torruela, M., Casano, L. M. et Vallejos, R. H. (1985) Evidence of the activity of tyrosine kinase(s) and of the presence of phosphotyrosine protein in pea plantlets. *J. Biol. Chem.* **261** 6651-6653.

Umeda, M., Bhalerao, R. P., Schell, J., Uchimiya, H. et Koncz, C. (1998) A distinct cyclin-dependent kinase-activating kinase of *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95** 5021-5026.

Van Den Berg, C., Willemsen, V., Hage, W., Weisbeek, P. et Scheres, B. (1995) Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* **378** 62-65.

Verde, F., Labbé, J. C., Dor  e, M. et Karsenti, E. (1990) Regulation of microtubule dynamics by cdc2 protein kinase in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. *Nature* **343** 233-238.

Vreeland, V., Grotkopp, E., Espinosa, S., Quiroz, D., Laetsch, W. M. et West, J. (1993) The pattern of cell wall adhesive formation by *Fucus* zygotes. *Hydrobiologia* **261** 485-491.

Waagenar, E. B. (1983) The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Exp. Cell Res.* **144** 393-403.

Wagner, V. T., Brian, L. et Quatrano, R. S. (1992) Role of a vitronectin-like molecule in embryo adhesion of the brown alga *Fucus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** 3644-3648.

Walworth, N. C. et Bernards, R. (1996) Rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science* **271** 353-356.

Wang, H., Fowke, L. C. et Crosby, W. L. (1997) Plant cyclin-dependent kinase inhibitor gene. *Nature* **386** 451-452.

Wang, H., Qi, Q., Schorr, P., Cutler, A. J., Crosby, W. L. et Fowke, L. C. (1998) ICK1, a cyclin-dependent protein kinase inhibitor from *Arabidopsis thaliana* interacts with both Cdc2a and CycD3, and its expression is induced by abscisic acid. *Plant. J.* **15** 501-510.

Wassermann, W. J. et Masui, Y. (1976) A cytoplasmic factor promoting oocyte maturation: its extraction and preliminary characterisation. *Science* **191** 1266-1268.

Wassermann, W. J. et Masui, Y. (1975) Effects of cycloheximide on a cytoplasmic factor initiating meiotic maturation in *Xenopus* oocytes. *Exp. Cell Res.* **91** 381-388.

Weigmann, K., Cohen, S. M. et Lehner, C. F. (1997) Cell cycle progression, growth and patterning in imaginal discs despite inhibition of cell division after inactivation of *Drosophila* cdc2 kinase. *Development* **124** 3555-3563.

Welch, P. J. et Wang, J. Y. (1992) Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89** 3093-3097.

Wells, N. J. et Hickson, I. D. (1995) Human topoisomerase II alpha is phosphorylated in a cell-cycle phase-dependent manner by a proline-directed kinase. *Eur. J. Biochem.* **231** 491-497.

Whitaker D. M. (1931) On the rate of oxygen consumption by fertilized and unfertilized *Fucus* eggs. *J. Gen. Physiol.* **15** 167-182.

Whitaker D. M. (1940) The effects of ultra-centrifuging and of pH on the development of *Fucus* eggs. *J. Cell Comp. Physiol.* **15** 173-188.

Whitaker, D. M. et Lowrance, E. W. (1936) On the period of susceptibility in the egg of *Fucus furcatus* when polarity is induced by brief exposure to directed white light. *J. Cell Comp. Physiol.* **7** 417-424.

Whitaker, D. M. (1938) The effect of hydrogen ion concentration upon the induction of polarity in *Fucus* eggs III. Gradients of hydrogen ion concentration. *J. Gen. Physiol.* **21** 833-845.

Whitaker, D. M. (1937) Determination of polarity by centrifuging eggs of *Fucus furcatus*. *Biol. Bull.* **73** 249-260.

Won, K. A. et Reed, S. I. (1996) Activation of cyclin E/cdk2 is coupled to site-specific autophosphorylation and ubiquitin-dependent degradation of cyclin E. *EMBO J.* **15** 4182-4193.

Wu, C., Leeuw, T., Leberer, E., Thomas, D. Y. et Whitenay, M. (1998) Cell-cycle- and Cln2p-Cdc28p-dependent phosphorylation of the yeast Ste20p protein kinase. *J. Biol. Chem.* **273** 28107-28115.

Xu, M., Sheppard, K. A., Peng, C. Y., Yee, A. S. et Piwnica-Worms, H. (1994) Cyclin A/CDK2 binds directly to E2F-1 and inhibits the DNA-binding activity of E2F-1/DP-1 by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **14** 8420-8431.

Yamaguchi, M., Umeda, M. et Uchimiya, H. (1998) A rice homolog of Cdk7/MO15 phosphorylates both cyclin-dependent protein kinases and the carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Plant. J.* **16** 613-619.

Yamamoto, A., Guacci, V. et Koshland, D. (1996a) Pds1 is required for faithful execution of anaphase in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **133** 85-97.

Yamamoto, A., Guacci, V. et Koshland, D. (1996b) Pds1p, an inhibitor of anaphase in budding yeast, plays a critical role in the APC and checkpoint pathway(s). *J. Cell Biol.* **133** 99-110.

Yamanouchi, S. (1909) Mitosis in *Fucus*. *Bot. Gaz.* **47** 173-197.

Ye, X. S., Lee, S. L., Wolkow, T. D., McGuire, S. L., Hamer, J. E., Wood, G. C. et Osmani, S. A. (1999) Interaction between developmental and cell cycle regulators is required for morphogenesis in *Aspergillus nidulans*. *EMBO J.* **18** 6994-7001.

Ye, X. S., Fincher, R. R., Tang, A., O'Donnell, K. et Osmani, S. A. (1996) Two S-phase checkpoint systems, one involving the function of both BIME and Tyr 15 phosphorylation of p34cdc2, inhibit NIMA and prevent premature mitosis. *EMBO J.* **15** 3599-3610.

Yoshizumi, T., Nagata, N., Shimada, H. et Matsui, M. (1999) An *Arabidopsis* cell cycle-dependent kinase-related gene, *cdc2b*, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *Plant Cell* **11** 1883-1895.

Zachleder, V., Bisova, K. et Vitova, M. (1999) Cyclin-dependent kinase activity in the alga *Scenedesmus quadricauda* under block of reproductive processes by fluorodeoxiuridine. 164-164: Second European Phycological Congress (Congrès).

Zavitz, K. H. et Zipursky, S. L. (1997) Controlling cell proliferation in differentiating tissues: genetic analysis of negative regulators of G1->S-phase progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9** 773-781.

Zhang, K. et Kumar, R. (1994) Interferon-alpha inhibits cyclin E- and cyclin D1-dependent CDK-2 kinase activity associated with RB protein and E2F in Daudi cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **200** 522-528.

Zhang, K., Letham, D. S. et John, P. C. (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta* **200** 2-12.

Zwicker, J., Lucibello, F. C., Wolfram, L. A., Gross, C., Truss, M., Engelhard, K. et Müller, R. (1995) Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression. *EMBO J.* **14** 45814-4522.