



**HAL**  
open science

# Activité traductionnelle et dynamique mitotique induites par la fécondation chez l'oursin

Florian Pontheaux

► **To cite this version:**

Florian Pontheaux. Activité traductionnelle et dynamique mitotique induites par la fécondation chez l'oursin. Embryologie et organogenèse. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS209 . tel-03813684

**HAL Id: tel-03813684**

**<https://theses.hal.science/tel-03813684>**

Submitted on 13 Oct 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Sorbonne Université

Ecole doctorale 'Complexité du Vivant'

*Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins (UMR8227)*

*Equipe Traduction Cycle Cellulaire et Développement*

## **Activité traductionnelle et dynamique mitotique induites par la fécondation chez l'oursin.**

**Par Florian Pontheaux**

Thèse de doctorat de Biologie cellulaire et moléculaire

Dirigée par Pr Patrick Cormier

Présentée et soutenue publiquement le 23 mars 2022

Devant un jury composé de :

Dr Pascale Crépieux	(Directrice de Recherche - CNRS)	Rapportrice
Dr Stéphane Pyronnet	(Directeur de Recherche - INSERM)	Rapporteur
Pr Elisabeth Christians	(Professeure - SU)	Examinatrice
Dr Dominique Weil	(Directrice de Recherche - CNRS)	Examinatrice
Dr Jacek Kubiak	(Directeur de Recherche - CNRS)	Examineur
Pr Patrick Cormier	(Professeur - SU)	Directeur de Thèse





## **Remerciements**

Je tiens tout d'abord à remercier Pascale Crépieux et Stéphane Pyronnet pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteur et membre du jury de thèse. Je remercie également Elisabeth Christians, Dominique Weil et Jacek Kubiak pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je souhaite aussi remercier mon comité de thèse, à savoir Jean-Pierre Bouly, Thierry Lepage et Oliver Jean-Jean, pour m'avoir suivi durant ces années de thèse et pour m'avoir donné conseils et soutiens.

Patrick, je vous remercie pour ces quatre années, d'abord en stage puis en thèse. Vous êtes un directeur de thèse plein de ressources. Je peux dire que j'ai eu beaucoup de chance d'avoir un directeur de thèse aussi impliqué que vous l'avez été. Toujours optimiste, vous avez été là pour me soutenir et m'encourager, en étant attentif à chaque instant à mes besoins. De notre premier entretien à 'Pause-café' pour discuter stage, formation et CV, jusqu'à aujourd'hui avec ce manuscrit, vous avez toujours été de très bons conseils autant sur l'aspect scientifique et professionnel que sur l'aspect personnel. Vous m'avez fait confiance pour prendre la barre de ce projet, tout en m'indiquant les amers à viser. Merci aussi pour les initiations à l'enseignement en TP qui m'ont mené au monitorat, cela a confirmé mon attirance pour l'enseignement. J'ai vraiment apprécié partager avec vous ces journées malgré les aléas de western-blot. J'ai énormément appris à vos côtés. Vous avez su me transmettre votre enthousiasme, votre attention et votre passion pour la recherche et l'enseignement. De cette expérience je retiendrais surtout votre implication tout au long de ma thèse.

Julia, merci pour l'accueil chaleureux dans l'équipe et pour ton implication durant toute ma thèse. Tu as été là pour me guider dans la littérature, dans le laboratoire mais aussi pour comprendre le monde de la recherche. Encore aujourd'hui, merci pour ta bienveillance et tes retours constructifs concernant ce manuscrit.

Merci aussi Stéphane, en tant que directeur de laboratoire mais aussi en tant que professeur. Merci de m'avoir fait confiance pour le monitorat. J'ai particulièrement apprécié monitorer tes TP à tes côtés.

J'aimerais dire un grand merci à l'ensemble de l'équipe. Même si ce manuscrit est le mien, il n'est possible que par le travail collectif et l'ensemble des interactions que j'ai eues avec vous.

J'ai pu travailler « à la paillasse » quasiment avec chacun d'entre vous. J'ai pu apprendre de vous tous, sur votre manière de travailler, les techniques, les réflexions ou votre vision personnelle de la recherche. Il y a un peu de vous tous dans cette thèse, vous y avez contribué par votre épaulement et votre bienveillance. Merci d'avoir été présent pour moi à chaque instant.

Je souhaite aussi remercier plus largement les personnes du laboratoire avec qui j'ai interagi durant cette thèse. Vous avez tous, de prêt ou de loin, participé à cette thèse, que ce soit pour le soutien, les conseils scientifiques, votre disponibilité, ou votre bonne humeur qui m'ont permis de travailler dans les meilleures conditions scientifiques et sociales.

Merci à vous tous ! Agnès, merci pour toutes les discussions stimulantes que l'on a pu avoir, pour la confiance que tu m'as accordée pour t'accompagner en TP et les nombreux encouragements et conseils que tu m'as donnés. Merci Anne-Catherine pour tes précieux conseils, ton partage de tes compétences et de tes connaissances. Fernando, merci d'avoir montré tant d'enthousiasme et quelques fois du scepticisme mais toujours avec de très bons conseils afin de m'aider à progresser. Merci à François pour tes conseils de jeune chercheur dont « Vas-y et dis-toi que t'es le meilleur », un conseil difficile à appliquer mais qui fait son effet. Omid, merci pour ta sympathie, je suis ravi d'avoir travaillé avec toi et du résultat de notre collaboration. Frédérique, merci pour la préparation au concours ED, les entraînements et conseils ont été décisifs.

Merci à vous aussi, qui m'ont aidé à évoluer « de crevette à homard ». Virginie, prof de biomol au laboratoire, coloc de bureau, voisine et même partageuse de paillasse, de grande qualité, merci pour ton soutien et ces moments, toutes ces longues discussions qui permettent de se changer les idées le temps d'un moment et tout cela en rythme \*tic-tic-Bip\*. Sandrine, merci aussi pour ton implication au laboratoire, ton soutien tout au long de la thèse et surtout ta bonne humeur constante. Merci pour toutes tes attentions envers moi, tes conseils scientifiques et personnels. Laurent, on peut dire qu'en toi, grande est la force. Je te remercie pour ton soutien et toutes ces discussions stimulantes que l'on a pu avoir. Tu as aussi été un coloc d'exception dans ce bureau. Tu m'as rendu beaucoup de services, pas seulement à la station. Merci à tous les trois pour votre soutien, à la station et en dehors et ce, depuis mon arrivée.

Un grand merci aussi à vous que j'ai côtoyé et qui ont été une source d'encouragements et d'évasion. Elodie, merci d'avoir été là, plaisanter avec toi m'a permis de décompresser, mais il faut l'avouer, c'est surtout notre goût commun pour le Gulf Stream qui nous a rassemblé. Merci

aussi Nathalie pour tous tes précieux conseils et surtout ton enthousiasme revigorant. Merci Yacine aussi pour tes conseils de jeune chercheur et ton moral qui transmet 'la grosse ambiance'.

Yasmine, j'ai été ravi de partager ces années de thèse à tes côtés au laboratoire. Une pensée aussi pour Sonia. Bon courage à vous pour la suite. J'ai aussi de supers souvenirs avec ma première stagiaire, Jeanne. Merci de t'être impliquée aussi intensément dans ces longs relais photographiques et surtout avec autant d'enthousiasme.

Merci à vous tous, vous m'avez permis de passer une thèse mémorable et particulièrement agréable ! Vous avez été des collègues avec qui j'ai lié une amitié sincère. J'ai vécu de très belles expériences de vie à vos côtés. Je ne cite pas tout le monde mais merci à tous ceux que j'ai côtoyé pendant ces années, pour votre soutien, votre aide et votre disponibilité. Vous avez tous participé de près ou de loin à ces travaux et je suis fière d'avoir réalisé cette thèse à vos côtés dans la station.

À mes parents, mon frère Thomas et toute ma famille, vous m'avez élevé et toujours encouragé à donner le meilleur de moi-même, à continuer sur ma lancée. Merci à vous de m'avoir soutenu durant ces longues années d'études. Merci de m'avoir inscrit à mes premiers cours de plongée, passion qui m'a orienté vers l'étude du marin.

Emeline, même si tu ne veux pas l'admettre, sache que tu as considérablement participé à mon avancée jusqu'ici. C'est grâce à ton soutien, tes encouragements mais aussi grâce à toutes ces attentions que tu as envers moi que j'ai pu me concentrer sur ce long travail de thèse. Tu m'as aidé à avancer dans la thèse et dans la vie en général, tout en me supportant au quotidien. Merci !



## Liste des abréviations

<b>4E-BP</b> eIF4E Binding Protein	<b>LARP1</b> La-Related Protein 1
<b>4E-IP</b> eIF4E Interacting Protein	<b>LH</b> Luteinizing Hormone
<b>ADN</b> Acide DésoxyriboNucléique	<b>MAPK</b> Mitogen-Activated Protein Kinases
<b>AGO</b> Argonaute	<b>MCC</b> Mitotic Checkpoint Complex
<b>APC</b> Anaphase Promoting Complex	<b>MIH</b> Maturation Initiation Hormones
<b>ARNi/m/mi/r/t/si</b> Acide RiboNucléique (interférent, messenger, micro, ribosomal, transfert, small interfering)	<b>Mo</b> Morpholino
<b>ATP</b> Adénosine Tri-Phosphate	<b>MPF</b> M-phase/Maturing Promoting Factor
<b>CDC</b> Cell Division Cycle	<b>MRE</b> miRNA Response Element
<b>CPE/CPEB</b> Cytoplasmic Polyadenylation Element - Binding Protein	<b>mRNP</b> messenger RiboNucleoprotein Particles
<b>CPC</b> Chromosomal Passenger Complex	<b>mTOR</b> mechanistic Target Of Rapamycin
<b>CrPV</b> Cricket Paralysis Virus	<b>MZT</b> Maternal-Zygotic Transition
<b>CSF</b> Cytostatic Factor	<b>nCBC</b> nuclear Cap-Binding Complex
<b>CYC</b> Cycline	<b>nCBP</b> nuclear Cap-Binding Protein
<b>DAP5/p97/NAT1</b> (Death Associated Protein, novel APOBEC-1 target no. 1)	<b>NEBD</b> Nuclear Envelope BreakDown
<b>dGRN</b> developmental Gene Regulatory Network	<b>NMD</b> Non-Sens Mediated Decay
<b>dNTP</b> désoxyribo-Nucléotides Tri-Phosphate	<b>NGD</b> No-Go Decay
<b>eIF/eEF/eRF</b> eukaryotic Initiation/Elongation/Release factor	<b>NSD</b> Non-Stop Decay
<b>EJC</b> Exon Junction Complex	<b>ORF</b> (dORF, uORF) Open Reading Frame (downstream/upstream)
<b>EMCV</b> EncephaloMyoCarditis Virus	<b>PABP</b> Poly(A)-Binding Protein
<b>FSH</b> Follicle Stimulating Hormone	<b>Paip2</b> PABP-interacting protein 2
<b>GAP</b> GTPas-Activating Protein	<b>PDCD4</b> Programmed Cell Death protein 4
<b>GCN2</b> General Control Nonderepressible 2	<b>PHAS-I</b> Phosphorylated Heat- and Acid-Stable protein induced by Insulin
<b>GDP/GTP</b> Guanosine Di/Tri-Phosphate	<b>PLK1</b> Polo-Like Kinase 1
<b>GEF</b> Guanine nucleotide Exchange Factor	<b>Pol I</b> ARN polymérase I
<b>GPCR</b> G Protein-Coupled Receptors	<b>PP1/PP2A</b> Protein Phosphatase
<b>GSG2</b> Germ cell-Specific Gene 2	<b>PTC</b> Premature Termination Codon
<b>GSK</b> Glycogen Synthase Kinase	<b>RBP</b> RNA Binding Protein
<b>GVBD</b> Germinal Vesicle Break Down	<b>RSK</b> Ribosomal S6 Kinase
<b>Gwl</b> Greatwall	<b>S6K</b> S6 Kinase
<b>Haspine</b> Haploid germ cell-specific nuclear protein kinase	<b>TIRN</b> Translation Regulatory Network
<b>HCV</b> Hepatitis C Virus	<b>TNF<math>\alpha</math></b> Tumor Necrosis Factor-alpha
<b>IRES</b> Internal Ribosome Entry Sites	<b>TOP</b> Terminal OligoPyrimidine
<b>ITAF</b> IRES Trans-Acting Factors	<b>TSC1/2</b> Tumour Suppressor Complex
	<b>UTR</b> UnTranslated Region
	<b>ZGA</b> Zygotic Genome Activation



# Table des matières

<b>LISTE DES ABREVIATIONS .....</b>	<b>5</b>
<b>TABLE DES MATIERES .....</b>	<b>7</b>
<b>I. INTRODUCTION .....</b>	<b>9</b>
<b>A. LE CYCLE CELLULAIRE .....</b>	<b>10</b>
1. <i>Les phases du cycle cellulaire</i> .....	10
a. La phase S .....	11
b. La phase M.....	12
c. Les phases G1 et G2.....	14
d. La méiose .....	14
2. <i>Les contrôles moléculaires du cycle cellulaire</i> .....	16
a. Contrôles et dynamique du cycle cellulaire.....	16
i. Identification des contrôleurs du cycle .....	16
ii. Régulation de l'activité cycline B/CDK1 .....	17
iii. Contrôles par les CKI.....	19
iv. Cyclité des cyclines .....	19
v. Régulation globale d'un cycle par les complexes cycline/CDK .....	19
b. Contrôle par checkpoints.....	21
i. Le checkpoint G1/S d'entrée en phase S .....	21
ii. Le checkpoint G2/M d'entrée en mitose.....	23
iii. Les checkpoints de sortie de mitose .....	24
3. <i>Arrêts méiotiques et Fécondation</i> .....	27
a. Le premier arrêt universel .....	27
b. Le second arrêt méiotique .....	28
c. Arrêts méiotiques selon les espèces.....	28
d. La fécondation.....	31
<b>B. CONTROLE TRADUCTIONNEL DES ARNM .....</b>	<b>32</b>
1. <i>L'ARNm, messenger de l'expression</i> .....	33
a. Structure générale et maturation d'un ARNm .....	33
b. Contrôle qualité des ARNm avant traduction.....	35
c. Agrégation des mRNP.....	35
2. <i>La traduction</i> .....	37
a. Initiation canonique de la traduction .....	38
b. Initiation non-canonique de la traduction .....	42
c. Elongation de la traduction.....	43
d. Terminaison, Recyclage et Ré-initiation .....	45
3. <i>Régulations de la traduction</i> .....	46
a. Eléments cis-régulateurs intrinsèques des ARNm.....	46
i. Eléments pour réguler l'initiation de la traduction .....	46
ii. Eléments de régulation de la stabilité de l'ARNm.....	49
b. Voies de signalisation.....	51
i. La voie mTOR.....	51
ii. La voie MAPK .....	52
c. Régulations des acteurs de la synthèse protéique .....	54
i. Acteurs de l'initiation .....	55
ii. Les ribosomes.....	59
iii. Acteurs de l'élongation.....	60
<b>C. RELATION CYCLE ET TRADUCTION.....</b>	<b>62</b>
1. <i>Traduction et prolifération</i> .....	62
a. La traduction régule le cycle cellulaire.....	62
b. Influence du cycle cellulaire sur la traduction .....	63
2. <i>Traduction et phase M</i> .....	64
a. Diminution de la traduction en phase M.....	64
b. Une traduction d'ARNm spécifique en mitose.....	67
3. <i>Traduction localisée au fuseau</i> .....	68



a.	Machinerie de traduction locale au niveau du fuseau .....	68
b.	Traduction localisée et spécifique au fuseau mitotique .....	68
<b>D.</b>	<b>L'OURSIN ET LA RELATION CYCLE-TRADUCTION .....</b>	<b>70</b>
<b>E.</b>	<b>OBJECTIFS/PLAN DES TRAVAUX DE THESE .....</b>	<b>73</b>
<b>II.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>75</b>
	<b>CHAPITRE 1 : L'OURSIN, UN MODELE HISTORIQUE POUR L'ETUDE DE LA FECONDATION ET DU DEVELOPPEMENT .....</b>	<b>75</b>
	Article 1 : <i>Echinoderms : Focus on the Sea Urchin Model in Cellular and Developmental Biology.....</i>	77
	Discussion, perspectives et données préliminaires .....	107
	<b>CHAPITRE 2 : ÉTUDE DE LA DYNAMIQUE DU CYCLE CELLULAIRE EN REPONSE A LA FECONDATION.....</b>	<b>113</b>
	Article 2 : <i>A Peak of H3T3 Phosphorylation Occurs in Synchrony with Mitosis in Sea Urchin Early Embryos.....</i>	115
	Discussion, perspectives et données préliminaires .....	131
	<b>CHAPITRE 3 : INFLUENCE DES 5'UTR DANS LE RECRUTEMENT DES ARNm A LA FECONDATION.....</b>	<b>133</b>
	Article 3 : <i>In vivo analysis of protein translation activity in sea urchin eggs and embryos .....</i>	135
	Discussion, perspectives et données préliminaires .....	155
	<b>CHAPITRE 4 : LA NEO-TRADUCTION D'eIF4B CONTROLE LA DYNAMIQUE DU CLIVAGE EMBRYONNAIRE.....</b>	<b>159</b>
	Article 4 : <i>The translation of eIF4B mRNA drives cell cleavage dynamics in sea urchin embryos.....</i>	163
	Discussion et perspectives.....	191
<b>III.</b>	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>193</b>
<b>A.</b>	<b>ACTIVITE TRADUCTIONNELLE ET DYNAMIQUE DU CYCLE .....</b>	<b>193</b>
1.	<i>La kinase mitotique CDK1 et contrôle de la traduction.....</i>	193
2.	<i>Contrôle de la dynamique du cycle par la néo-traduction d'ARNm .....</i>	195
3.	<i>Contrôles des néo-recrutements d'ARNm .....</i>	198
<b>B.</b>	<b>UN RESEAU DE REGULATION DE LA TRADUCTION : LE TLRN.....</b>	<b>200</b>
1.	<i>TLRN et dynamique mitotique à la fécondation chez l'oursin .....</i>	200
2.	<i>Le TLRN dans d'autres contextes cellulaires .....</i>	203
3.	<i>Oursin, TLRN et environnement .....</i>	203
<b>IV.</b>	<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>205</b>
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>207</b>
	<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS.....</b>	<b>237</b>
	<b>TABLE DES TABLEAUX .....</b>	<b>238</b>
	<b>RESUME.....</b>	<b>239</b>

# I. Introduction

La multiplication des cellules eucaryotes et le développement d'un organisme multicellulaire nécessitent le contrôle coordonné de la production de l'ensemble des protéines constituant ces cellules. Depuis LUCA (Last Universal Common Ancestor), dont l'apparition est estimée entre 4,1 et 3,5 milliards d'années, le cycle cellulaire est un mécanisme perfectionné qui permet la multiplication de ces cellules (Glansdorff et al. 2008; Bell et al. 2015; Schopf et al. 2018). Le cycle cellulaire est caractérisé par une succession de phases bien identifiées et nécessite des points de contrôle finement régulés dans le temps et l'espace, ceci afin d'assurer la distribution pérenne du patrimoine génétique d'une cellule mère à ses cellules filles. La réalisation correcte de l'ensemble de ces phases requière la coordination de l'expression du génome. Pour cela, plusieurs contrôles existent depuis l'ADN (Acide Désoxyribonucléique) jusqu'à la traduction des ARNm (Acide Ribonucléique messenger) en protéine. Notamment, cette dernière étape permet une adaptation rapide, voire une localisation intracellulaire, de la production des protéines.

Mes travaux de thèse se sont consacrés à comprendre comment l'activité traductionnelle est susceptible d'influencer la dynamique du cycle cellulaire. Mon manuscrit aborde donc ces deux mécanismes biologiques et tend à mettre en valeur leurs interactions. Comment la traduction agit en amont du cycle cellulaire en général et de la mitose en particulier, et à l'inverse, comment la traduction est susceptible d'être contrôlée durant la mitose ?

D'un point de vue expérimental, j'ai abordé ces deux processus avec l'ambition de pouvoir, au final, mieux comprendre leurs interrelations au cours des premières mitoses de l'embryon d'oursin. Comme je l'expliquerai plus tard, j'ai d'abord cherché à mettre en évidence des marqueurs phénotypiques de la mitose. Ces marqueurs me permettraient de suivre scrupuleusement les étapes de la mitose et ils pourraient être utilisés en aval du suivi de l'activité traductionnelle stimulée par la fécondation. Nous verrons que si cette approche a pu être finalisée par deux articles, dont une revue (article 1) et un papier de recherche (article 2), l'objectif final de faire le lien avec le contrôle traductionnel n'a pas pu aboutir dans le temps imparti de la thèse. Néanmoins, ce lien est discuté et mis en perspective en dernière partie de chacun des deux premiers chapitres des résultats dédiés à l'analyse de ces marqueurs phénotypiques.

Je me suis ensuite focalisé sur les mécanismes traductionnels susceptibles de contrôler la traduction d'ARNm spécifiques en réponse à la fécondation et au cours de l'entrée en mitose.

J'ai ainsi étudié l'influence sur la traduction des 5'UTR (UnTranslated Region) d'ARNm de différents acteurs du cycle cellulaire et de la traduction. Ces données originales ont demandé un effort de développement expérimental dont l'approche est décrite dans une partie d'un troisième article qui présente les méthodes de mesures de l'activité traductionnelle dans l'œuf d'oursin. Là encore, les perspectives de faire le lien avec le cycle cellulaire sont discutées à la suite de l'article.

Enfin, j'ai analysé l'implication fonctionnelle des acteurs moléculaires d'intérêts dans le contrôle de la dynamique du cycle cellulaire. La quatrième partie expérimentale décrit ainsi le rôle de la néo-traduction d'un ARNm codant pour le facteur de traduction eIF4B (eukaryotic initiation factor 4B) sur la dynamique des deux premières mitoses de l'embryon d'oursin. Cette dernière partie me permet d'apporter un nouvel éclairage sur les relations intimes qui existent entre les dynamiques traductionnelles et l'entrée en mitose.

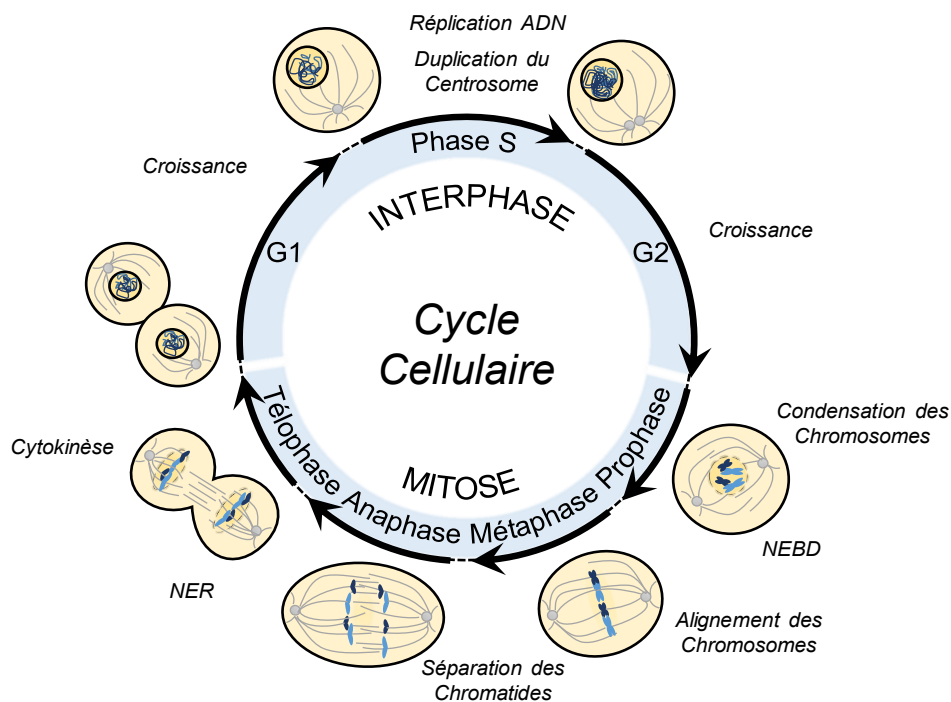
L'ensemble de ces quatre approches est discuté dans un dernier chapitre des résultats qui met en perspective l'impact des travaux dans le cadre de la compréhension des relations entre traduction et mitose.

L'introduction de ce manuscrit vous mènera ainsi dans l'étude du cycle cellulaire, de la traduction et de la relation entre ces deux processus. La fin de l'introduction apportera les informations nécessaires pour appréhender la question dans le modèle de l'embryon d'oursin.

## **A. Le cycle cellulaire**

### **1. Les phases du cycle cellulaire**

Le cycle cellulaire se divise en quatre grandes phases illustrées en Figure 1. La phase S consiste en la réplication du génome. La phase M de mitose consiste à la division d'une cellule en deux. Entre ces deux phases, se déroulent les « gap phases » G1 et G2 permettant la croissance cellulaire. La phase S et les phases G1 et G2 forment l'Interphase. L'ensemble de ces étapes permet alors la croissance cellulaire, la prolifération et la transmission du génome à l'identique. Après la présentation de ces phases, nous verrons dans les paragraphes suivants combien les modifications post-traductionnelles, et en particulier les activités kinases, jouent un rôle important dans le contrôle de la dynamique de ces événements.



*Figure 1 Le cycle cellulaire mitotique*

*Le cycle cellulaire mitotique est caractérisé par quatre phases permettant la prolifération des cellules. Les phases G1 et G2 sont les phases majoritaires pour la croissance cellulaire entre lesquelles la phase S de réplication de l'ADN se déroule. Les phases G1, G2 et S forment alors l'Interphase. La phase de mitose consiste en la division de la cellule et la répartition contrôlée des constituants de la cellule dont le patrimoine génétique. Se référer au texte pour plus de détails. La durée relative des phases n'est pas à l'échelle. Cette figure représente le cycle d'une cellule à deux paires de chromosomes. (NEBD : désassemblage de l'enveloppe nucléaire ; NER : réassemblage de l'enveloppe nucléaire).*

### **a. La phase S**

La phase S a pour but la réplication à l'identique du génome nucléaire, c'est la phase qui permet la synthèse d'ADN et ainsi le passage d'un double brin d'ADN à deux doubles brins. Cette réplication se fait selon le modèle semi-conservatif de Watson et Crick où chaque brin d'ADN sert de modèle pour la réplication d'un nouveau brin. La machinerie de réplication peut être simplifiée à quelques protéines et enzymes essentielles. A savoir : les hélicases, les protéines définissant les origines de réplication, les enzymes primases et polymérases et enfin les ligases. Les travaux de thèse étant orientés autour de la mitose, je ne rentrerai pas dans les détails de la réplication.

Le génome nucléaire est composé de longues chaînes d'ADN enroulées autour de structures composées d'Histones. Cet assemblage consiste en l'association en nucléosome d'une portion d'ADN enroulée autour d'un octamère d'Histones et de deux Histones de liaison. L'octamère est composé de deux dimères d'Histones H2A, H2B et d'un tétramère de deux Histones H3 et deux H4. Les Histones 'linker' sont les H1 et H5. L'ensemble d'Histones et du

brin d'ADN forment alors la chromatine. Ces Histones, déplacées pendant la réplication, sont remises en place sur l'ADN double brin nouvellement produit. Leur synthèse a donc besoin d'être contrôlée pour doubler les quantités d'ADN durant cette phase. Ces Histones principales sont ainsi produites en phase S, cependant des variants d'Histones existent aussi et sont produits lors des phases G mais ne sont pas encore suffisamment étudiés. C'est aussi pendant la phase S que le centrosome à deux centrioles se duplique pour avoir quatre centrioles (Fu et al. 2015).

### **b. La phase M**

La phase M correspond à la distribution égale du génome répliqué, lors de la séparation d'une cellule en deux cellules filles. Pour cela, les constituants présents en excès dans le cytoplasme vont être répartis de manière passive dans les deux cellules. Les éléments présents en copies limitées (génomés, organelles, centrosomes, etc.) vont quant à eux avoir une répartition régulée et précise lors de cette étape. C'est dans les années 1870-80 que Flemming fait des observations détaillées des différentes étapes qui mènent à l'apparition de deux cellules filles (Revue du contexte historique et scientifique dans (Paweletz 2001). Il y décrit une apparition de 'fils squelettiques' dans le noyau, qui s'épaississent, se positionnent en étoile puis s'alignent et enfin se séparent en deux groupes. Il décrit ensuite la séparation en deux cellules avec un élément à la zone de contact. Finalement les 'fils squelettiques' se réorganisent et redeviennent alors un noyau au repos. Il a ainsi décrit et dessiné ce qui sera ensuite appelé prophase, métaphase, anaphase et télophase.

La prophase consiste en la séparation du centrosome dupliqué en deux centrosomes qui migrent aux pôles opposés de la cellule. La chromatine y subit des niveaux d'enroulements supérieurs jusqu'à un stade de condensation pour former des structures discernables : les chromosomes. Ainsi, un brin d'ADN condensé forme une chromatide, qui après la réplication, forme un chromosome à deux chromatides sœurs, maintenues entre elles par la Cohésine. La région centromérique du chromosome, plus ou moins étendue selon l'espèce, est une région de forte condensation participant aussi au maintien des deux chromatides sœurs lorsque l'ADN est répliqué. Finalement, chez les eucaryotes (excepté Dinoflagellés et Fungi), la mitose est dite ouverte car l'enveloppe nucléaire se désagrège (NEBD - Nuclear Envelope BreakDown) en vésicules et libère ainsi les chromosomes condensés dans le cytoplasme lors de la prométaphase. Il est à noter que dans les cellules germinales, la dynamique de l'enveloppe nucléaire est conservée et est appelée GVBD (Germinal Vesicle Break Down). Chez les eucaryotes à mitose fermée (Dinoflagellés et Fungi), l'enveloppe nucléaire ne se désassemble pas et le fuseau se forme à l'intérieur ou au travers du noyau (Boettcher and Barral 2013).

Afin d'aligner les chromosomes le long de la plaque métaphasique, un autre complexe multi-protéique spécialisé s'organise au niveau des centromères : les kinétochores. Ces derniers sont formés d'un sous-complexe interne constitutif et un second externe formé à la mitose permettant l'association avec notamment le réseau de microtubules mitotique. Ce réseau de microtubules s'organise en un fuseau et allonge ainsi la cellule ou le noyau dans le cas des mitoses fermées. Ce fuseau émane des centrosomes et va s'associer aux chromosomes par les kinétochores. Par des phénomènes de polymérisation et dépolymérisation du fuseau, les chromosomes vont s'aligner à la plaque métaphasique. Cette plaque est positionnée au centre lors de divisions symétriques ou décentrée lors de divisions asymétriques pour le développement ou pour les divisions méiotiques.

Lorsque l'alignement des chromosomes est correct (voir la partie Spindle Assembly Checkpoint), l'anaphase peut débuter. La cohésine est dégradée et les chromatides sœurs se séparent au cours de l'ascension polaire. Le kinétochore permet à la chromatide d'être fixée aux microtubules kinétochoriens, mais aussi de s'y accrocher *via* un moteur moléculaire, la Dynéine. A l'extrémité du microtubule kinétochorien qui se dépolymérise, la Dynéine consomme de l'ATP (Adénosine triphosphate) pour 'tirer' la chromatide en direction du pôle, lors de l'anaphase A. Par la suite, au cours de l'anaphase B, l'éloignement des centrosomes participe à la meilleure répartition des chromosomes. Des microtubules du fuseau provenant des deux pôles sont en contact au centre de la cellule. A l'aide d'autres moteurs moléculaires, les kinésines, ces microtubules antiparallèles polaires vont se repousser. Les chromatides sœurs sont ainsi ségréguées rapidement et efficacement dans l'espace qui correspondra ensuite à la cellule fille.

Enfin, lors de la télophase, les chromatides commencent à se décondenser pendant que l'enveloppe nucléaire se reforme. Les microtubules kinétochoriens disparaissent et laissent place aux microtubules polaires. Dans les cellules animales, un anneau contractile de myosine et d'actine se forme de manière sous-corticale et dans l'axe de l'ancienne plaque métaphasique. Cet anneau va alors se contracter, créant le sillon de division, et va regrouper les microtubules polaires en un corps intermédiaire (mid-body). L'étranglement continue jusqu'à séparation totale des deux cellules, c'est la cytotélerèse.

### **c. Les phases G1 et G2**

Les phases G1 et G2 sont les principales phases de croissance cellulaire. L'euchromatine est décondensée et disponible pour initier la transcription. Ces phases préparent les phases suivantes du cycle tout en contrôlant la réalisation de la précédente. La phase G1 prépare la duplication du génome en synthétisant les enzymes polymérase, la machinerie de production des dNTP (désoxyribonucléotides triphosphate) et tous les autres acteurs de la phase S. La phase G2 prépare la division de la cellule en synthétisant également les acteurs nécessaires aux contrôles des phases, les constituants du fuseau, les moteurs moléculaires, etc. Les acteurs de contrôle qualité et de réparation du génome doivent aussi être correctement produits. La phase G1 permet aussi de rendre compte des signaux moléculaires exogènes, la santé et la taille de la cellule. En effet, c'est durant cette phase que la cellule peut, en réponse à des signaux exogènes, entrer dans un nouveau cycle et démarrer une réplication pour aller ensuite vers une mitose. Lors de l'absence de ces signaux, la cellule peut sortir du cycle et passer dans une phase de quiescence, appelée G0, en attendant des signaux de prolifération suffisants.

### **d. La méiose**

Mes travaux de thèse se focalisent sur le cycle mitotique dans les œufs d'oursin. Dans le cadre de ce manuscrit, la terminologie 'œuf' définit un gamète mature fécondé. Le paragraphe suivant décrit brièvement le cycle méiotique, permettant la production de ces gamètes.

Les organismes multicellulaires sont apparus à de multiples reprises au cours de l'évolution des eucaryotes (Niklas and Newman 2013; 2020) et l'association avec la reproduction sexuée a permis de faire des organismes multicellulaires à reproduction sexuée les plus diversifiés (Niklas et al. 2014; Speijer et al. 2015; Chen and Wiens 2021). La reproduction sexuée nécessite un cycle cellulaire spécialisé, qui peut être associé à une différenciation extrême de la cellule lors de la méiose. En parallèle de Flemming et sa description du cycle cellulaire, Oskar Hertwig en 1976 chez l'oursin, a publié des premières observations de méiose. Cette méiose, que ce soit pour produire un gamète femelle (ovule) ou un spermatozoïde, a pour but de produire des cellules haploïdes.

La méiose est très bien décrite par (Ohkura 2015) dont voici un résumé, illustré en Figure 2. Après une phase de réplication pré-méiotique, la méiose I débute. La prophase I est différente d'une prophase de mitose de par le fait qu'une recombinaison doit avoir lieu entre les chromosomes homologues, c'est le crossing-over. La prophase, détaillée par (Zickler and Kleckner 2015), comporte classiquement cinq phases appelées leptotène, zygotène, pachytène,

diplotène et diakinèse. La phase leptotène consiste à connecter les chromosomes homologues ensemble. En zygotène, les chromosomes homologues sont reliés (synaptés) par un complexe synaptonémal et regroupés en contact de l'enveloppe nucléaire. Au stade pachytène, les crossing-over ont lieu. La phase diplotène consiste au désassemblage du complexe synaptonémal. Les chromosomes homologues sont alors reliés seulement par ces régions de crossing-over. Enfin, le stade de diakinèse correspond à la prophase de mitose. Les chromosomes vont se condenser davantage, permettant de distinguer facilement les quatre bras d'un chromosome. En fin de prophase I, l'enveloppe de la vésicule germinale va se désassembler (GVBD) et le fuseau de microtubule se met en place. Cependant, lors de la méiose, le centrosome n'est pas présent. Le centre d'organisation des microtubules (MTOC) se retrouve donc être acentriolaire et implique également les chromosomes eux-mêmes pour la nucléation des microtubules chez l'Homme (Mogessie et al. 2018). Les chromosomes sont fixés par les microtubules sur leurs kinétochores. Aidés des mêmes systèmes qu'en mitose, les deux chromosomes homologues encore liés par la région du crossing-over sont placés le long de la plaque métaphasique pour donner la métaphase I. Les tensions nécessaires pour passer au stade anaphase I s'appliquent aux kinétochores mais aussi au niveau des crossing-over. Par la suite, de la même façon qu'en mitose, l'allongement des microtubules centriques et le raccourcissement des microtubules kinétochoriens font s'éloigner les deux lots de chromosomes à deux chromatides. En effet, au cours de cette division nommée réductionnelle, les chromosomes homologues se séparent et les chromatides sœurs restent associées grâce à la cohésine qui n'est pas dégradée au niveau des centromères. Finalement, la télophase I termine la méiose I en décondensant temporairement les chromosomes, pour initier le réassemblage de l'enveloppe nucléaire et la cytodierèse. Enfin, en méiose II ou division équationnelle, comme en mitose, les chromatides sœurs sont séparées et la cohésine est dégradée dans son ensemble. Le reste se déroule de façon similaire à une mitose.

Contrairement à une mitose, qui une fois commencée doit se terminer dans les temps sous peine de déclencher une mort cellulaire, la méiose peut stopper sa dynamique et s'arrêter indéfiniment. Ainsi, les arrêts méiotiques sont des processus régulés dans le cadre de la maturation méiotique des gamètes et peuvent durer des dizaines d'années selon les espèces. Ces contrôles d'arrêts méiotiques seront décrits plus tard, après description des contrôles de cycles cellulaires mitotiques.



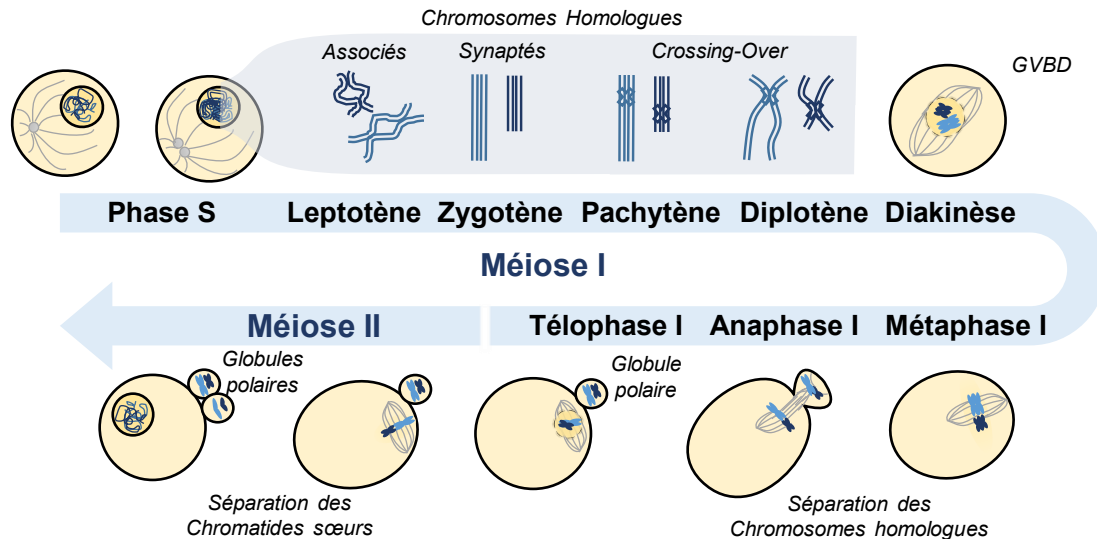


Figure 2 Le cycle cellulaire méiotique

*Le cycle cellulaire méiotique est caractérisé par deux phases M successives permettant de produire des gamètes haploïdes contenant des chromosomes à une chromatide. La figure présente une méiose d'ovocyte de métazoaires. Cette méiose asymétrique mène à la production de deux globules polaires. Se référer au texte pour plus de détails. Les étapes de la méiose 2 ne sont pas détaillées car elles sont semblables à la mitose présentée en Figure 1. La durée relative des phases n'est pas à l'échelle. La figure représente une méiose de cellule au génome de deux paires de chromosomes. (GVBD : rupture de l'enveloppe germinale).*

## 2. Les contrôles moléculaires du cycle cellulaire

La coordination de ces phases passe par le contrôle de leur dynamique. Il existe ainsi des acteurs permettant le contrôle de chaque phase spécifiquement pour coordonner les différents événements nécessaires à la phase. Différents points de contrôle sont mis en place pour réguler la dynamique du cycle en ne permettant de passer d'une phase à une autre qu'à certaines conditions (croissance cellulaire suffisante, pas de dommages à l'ADN, etc.). Le contrôle de la dynamique de ces événements est notamment permis par des modifications post-traductionnelles essentielles, et en particulier des activités kinases.

### a. Contrôles et dynamique du cycle cellulaire

Les différentes phases du cycle sont contrôlées de manière ordonnée par de nombreux éléments et les acteurs moléculaires principaux ont été découverts dans les années 1970-80.

#### i. Identification des contrôleurs du cycle

La découverte du principe de ces régulateurs a d'abord eu lieu en 1971 chez le xénope, au cours de l'étude des mécanismes de la maturation méiotique de l'ovocyte. Les ovocytes de xénope sont physiologiquement bloqués en prophase de la première division de méiose. La

progestérone déclenche la maturation méiotique qui correspond ici au déroulement de la première division méiotique et au blocage en métaphase de la seconde division méiotique. Un facteur MPF, pour ‘Maturation Promoting Factor’, est présent dans le cytoplasme d’ovocytes en cours de maturation. Expérimentalement, le cytoplasme contenant le MPF peut être transféré dans des ovocytes bloqués en prophase I, non stimulés à la progestérone, ce qui déclenche la maturation méiotique sans ajout d’hormones (Smith and Ecker 1971; Masui and Markert 1971). Le MPF a également été décrit ensuite au cours de la méiose de l’ovocyte d’étoile de mer par transfert de cytoplasme (Kishimoto and Kanatani 1976), chez la souris par fusion d’ovocytes (Fulka et al. 1985), puis à l’aide d’hétérocaryons lors de la mitose de cellules de mammifères (Bałakier 1979; Jost et al. 1979). Le principe du MPF est donc universel au mécanisme de division cellulaire et prend alors le nom de ‘M-phase Promoting Factor’. Les acteurs moléculaires du MPF ont été identifiés dans la même période comme étant les régulateurs du cycle cellulaire. Ces identifications ont abouti à l’obtention du Prix Nobel 2001 de physiologie et médecine pour Tim Hunt, Leland Hartwell et Paul Nurse.

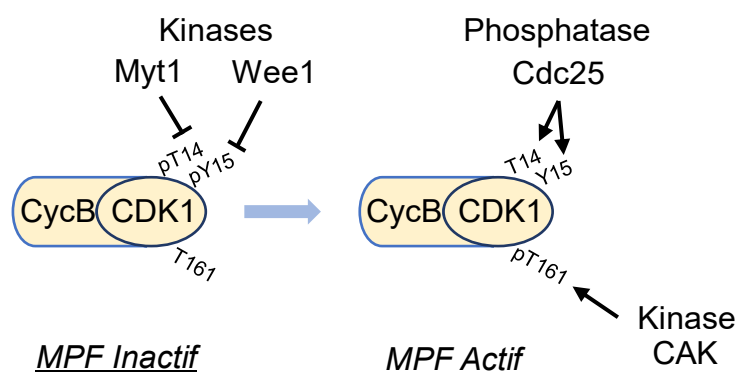
Leland Hartwell a étudié chez la levure bourgeonnante, *Saccharomyces cerevisiae*, des mutants thermosensibles contrôlant spécifiquement le cycle cellulaire. Cette approche a permis la découverte des gènes *cdc* (cell division control). Plus d’une centaine de gènes *cdc* ont été identifiés, notamment *CDC28* qui une fois muté bloque le cycle en phase G1 (Hartwell et al. 1970). Paul Nurse, travaillant sur la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*, a mis en avant une mutation dans le gène *cdc2* qui cause un arrêt de cycle en phase G2 (Nurse et al. 1976). En 1983, Tim Hunt a identifié chez l’oursin (*Arbacia punctulata*) une protéine qui s’accumule et se dégrade en amont de chaque clivage, après fécondation. Le comportement cyclique de cette protéine lui a valu son nom de cycline (Evans et al. 1983). La protéine *cdc2* se révélera ensuite être la sous-unité catalytique du MPF, possédant une activité kinase (présentée dans le paragraphe suivant) et contrôlée spécifiquement par la cycline, sous-unité régulatrice du complexe hétérodimérique. Enfin, l’orthologue humain des gènes *cdc2* et *CDC28*, dont la cycline B est la sous-unité régulatrice, sera alors dénommé CDK1 (Cyclin Dependent Kinase) (Lee and Nurse 1987).

## ii. Régulation de l’activité cycline B/CDK1

C’est à la fin des années 1980 que l’activité kinase fut associée à CDK1. En effet, Arion et ses collaborateurs purifièrent d’abord un complexe de l’ovocyte d’étoile de mer, contenant un homologue de *cdc2*, responsable de la phosphorylation de l’Histone H1 (H1Kinase) qui

oscillait et dont le signal était maximal en phase M de méiose (Arion et al. 1988). Puis Labbé et ses collaborateurs purifièrent le MPF, chez l'étoile de mer toujours, qui s'est avéré contenir également l'homologue de cdc2 et toujours responsable de l'activité H1K (Labbé et al. 1988; 1989). L'identification de l'activité kinase des homologues MPF s'est rapidement faite ensuite chez l'oursin (Meijer et al. 1989), le rat, l'humain, le xénope, la levure ou encore la palourde. Marcel Doré et ses collaborateurs résument ces découvertes dans les revues (Dorée et al. 1989; Dorée 1990; Dorée and Hunt 2002).

Si le niveau protéique de CDK1 dans la cellule semble stable au cours du cycle cellulaire, son activité kinase est maximale lors de la phase M. Cette activité, très restreinte temporellement, corrèle avec la dynamique de l'expression de la cycline B. L'association des deux facteurs en un complexe permet un contrôle de l'activité kinase. La cycline n'a pas d'activité catalytique en elle-même et CDK est inactive en absence de cycline. Différentes phosphorylations régulatrices de CDK1 ont été identifiées pour le contrôle précis de l'activité du complexe (Figure 3). Trois sites de phosphorylations principaux sont identifiés sur CDK1 et conservés chez les métazoaires. Les Thréonine 14 et Tyrosine 15 (Thr14, Tyr15) sont phosphorylées respectivement par les kinases Myt1 et Wee1 (Fattaey and Booher 1997; Ayeni and Campbell 2014). Ces deux phosphorylations sont inhibitrices. La phosphatase Cdc25 est nécessaire pour supprimer cette inhibition. Une troisième phosphorylation sur la Thréonine 161 (Thr161) se fait par la kinase CAK (cycline H/CDK7) et est nécessaire pour l'activité kinase de la sous-unité catalytique CDK1 complexée à la cycline B.



*Figure 3 Régulation de l'activité du complexe cycline B/CDK1*

*L'activité MPF du complexe CycB/CDK1 est contrôlée par plusieurs sites de phosphorylations. Deux phosphorylations inhibitrices en Thréonine 14 et Tyrosine 15 sont induites respectivement par les kinases Myt1 et Wee1. Un site activateur en Thréonine 161 est phosphorylé par la kinase CAK. La phosphorylation en T161 doit être associée à la déphosphorylation des T14 et Y15 par la phosphatase Cdc25 pour permettre l'activation du complexe CycB/CDK1. Se référer au texte pour plus de détails.*

### iii. Contrôles par les CKI

La phosphorylation des CDKs n'est pas le seul moyen de réguler leur activité. Trois familles d'inhibiteurs de CDK (CKI) existent et ont des fonctions spécifiques (revue par (Besson et al. 2008; Lim and Kaldis 2013). Les protéines Cip et Kip (p21<sup>CIP1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, p57<sup>Kip2</sup>, ...) vont interagir avec les cyclines (D, E, A, B) et les CDK de leur complexe. Les protéines INK4 (p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup>, p19<sup>INK4d</sup>) vont quant à elles interagir avec les CDK4 et CDK6 spécifiquement pour bloquer la fixation à la cycline D. Ces interactions vont moduler l'activité des complexes pour notamment restreindre la prolifération cellulaire pendant le développement, les différenciations ou en réponse à un stress (de dommage à l'ADN par exemple). Ces inhibiteurs ont également des rôles dans l'inhibition de l'apoptose, de régulations de facteurs de transcription ou de régulations épigénétiques, etc. En effet, il y a un réseau complexe de phosphorylations qui régulent ces peptides inhibiteurs et qui vont ainsi altérer leur localisation intracellulaire, leur interactions protéine-protéine ou encore leur stabilité. Ils ont ainsi des rôles qui oscillent entre supresseurs de tumeurs et oncogènes.

### iv. Cyclicité des cyclines

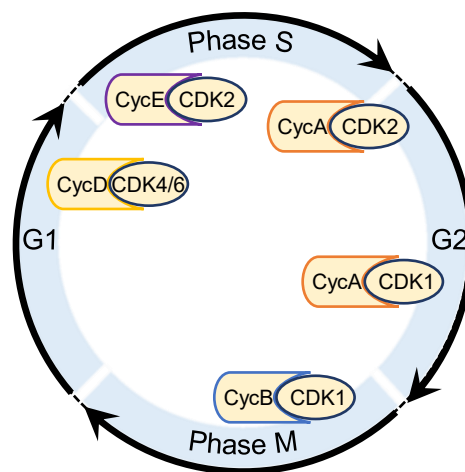
Le comportement cyclique des cyclines est contrôlé par leur synthèse et leur dégradation. La dégradation des cyclines passe par l'ubiquitination (ou ubiquitinylation) des cyclines pour les diriger vers la machinerie de dégradation des protéines : le Protéasome (Suski et al. 2021). La dégradation de la cycline B induit l'inactivation de CDK1 et l'induction de l'anaphase qui permettra la sortie de mitose. L'expression d'un mutant de la cycline B, déletée de la partie N terminale contenant le domaine de destruction (Dbox) conservé entre cyclines, arrête le cycle en mitose (Luo et al. 1994). Dès la découverte de la cycline B dans l'oursin et la palourde (Evans et al. 1983) la dégradation de la protéine est pointée comme étape fondamentale de la dynamique de la sortie de mitose. Evans et ses collaborateurs proposent que la synthèse de cette protéine soit constante au cours du cycle. Cependant un contrôle de la traduction de la protéine est également nécessaire pour la bonne transition de phase (Kang and Pomerening 2011). Le contrôle de cette traduction essentielle pour la réalisation du cycle cellulaire sera d'ailleurs mis en évidence dans le premier chapitre des résultats de ce manuscrit, par l'inhibition *in vivo* de la traduction entre autres de la cycline B.

### v. Régulation globale d'un cycle par les complexes cycline/CDK

Plus de vingt cyclines et CDK ont été identifiées chez les mammifères (Malumbres 2014; Goodman 2021). L'interaction d'un type de cycline à sa sous-unité catalytique permet de

spécifier le substrat cible lors de la phase en question. La spécificité des cibles de la kinase CDK est donc contrôlée par la cycline qui lui est associée et qui va aller fixer spécifiquement ses cibles (Örd et al. 2019). Les principaux hétérodimères CDK/cycline permettent de contrôler spécifiquement la dynamique des différentes phases du cycle cellulaire et sont illustrés en Figure 4 .

Chez les mammifères, en réponse à des facteurs de croissance ou de prolifération, la cycline D est exprimée dans la cellule. Le complexe cycline D – CDK4/6 (CycD/CDK4/6) est alors activé en fin de phase G1. Ce complexe va activer l'expression de cycline E qui va s'associer à CDK2 pour contrôler les différents acteurs de la réplication ainsi que la cycline A. En fin de phase S, la cycline E est dégradée, remplacée par la cycline A accumulée, qui va ensuite être transférée de la CDK2 à CDK1 pour contrôler alors la phase G2. La cycline B s'exprime tout au long de cette phase G2. Lorsque suffisamment de CycB/CDK1 est actif, la transition G2/M se produit et la mitose débute. La dégradation de la cycline B enclenche la transition métaphase/anaphase et la sortie de mitose. L'ensemble des régulations (transcription, translocation, association, dissociation (dé-)phosphorylation, dégradation) est résumé par Andrew Burgess (Burgess et al. 2017; 2019). Ce processus de régulation de cycle cellulaire somatique est universel et retrouvé dans l'ensemble des espèces étudiées. Il reste cependant adaptable aux différents contextes physiologiques de différents types cellulaires, comme dans le cadre de la méiose ou du développement embryonnaire précoce.



*Figure 4 Régulation du cycle cellulaire par les complexes cycline/CDK*

*Différentes associations spécifiques des kinases CDK et de cyclines forment des complexes spécifiques de phases du cycle. Se référer au texte pour plus de détails. La durée relative des phases n'est pas à l'échelle.*

## **b. Contrôle par checkpoints**

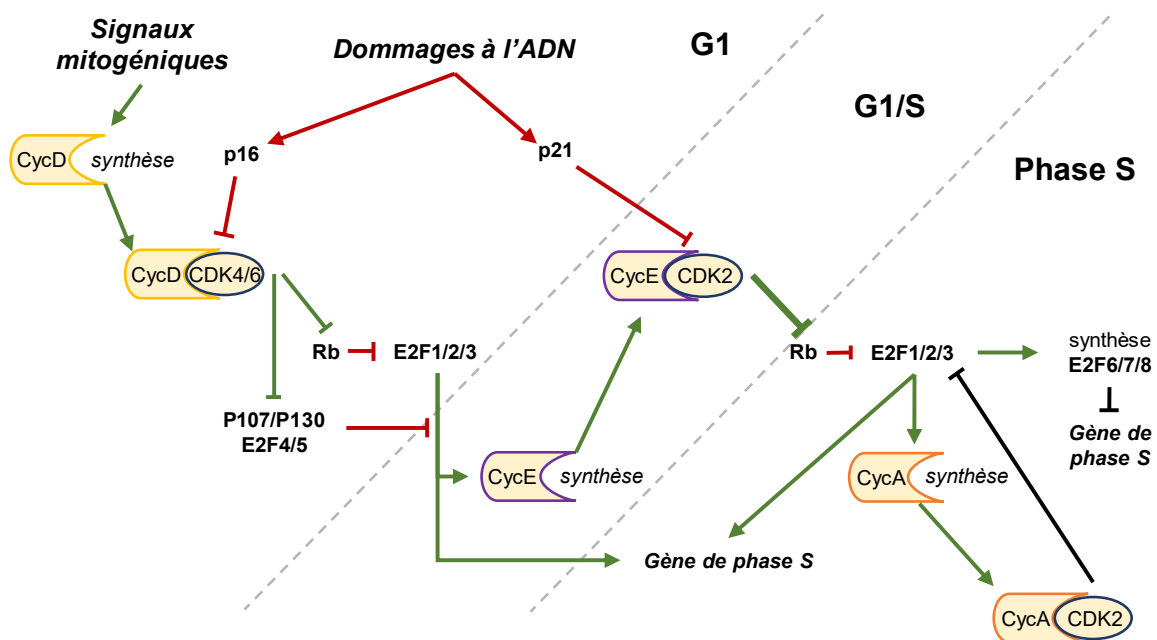
Les régulations opposées (boucles de rétroactions positives ou négatives) des différents complexes de kinase CDK et leur partenaire cycline (Hernansaiz-Ballesteros et al. 2021) permettent la mise en place de contrôles plus globaux au niveau d'une transition de phase. Des erreurs, des retards ou encore des dommages peuvent être détectés par ces points de contrôles (checkpoints) qui envoient en retour un signal aux contrôleurs cycline/CDK pour maintenir la phase en cours et corriger si besoin le problème. Trois grands points de contrôles sont identifiés : G1/S (démarrage d'un cycle et entrée en phase S), G2/M (entrée en mitose) et la sortie de mitose.

L'ADN est la seule molécule qui possède un système de réparation. Si des dommages à l'ADN sont détectés, le système se met en place pour réparer mais aussi pour bloquer le cycle au niveau des différents checkpoints. Si cela prend trop de temps, ou ne peut se réparer, la mort cellulaire peut être engagée (Ruiz-Losada et al. 2021; Fragouli and Garrido 2020). Ces dommages à l'ADN peuvent être une erreur de réplication, une erreur de ségrégation de chromosomes, un agent extérieur (UV, molécules, etc) induisant des mutations ou encore des cassures de brins d'ADN. Ce processus de détection des dommages à l'ADN ne sera pas développé, cependant j'indiquerai rapidement comment ils entrent en jeu dans les différents checkpoints.

### **i. Le checkpoint G1/S d'entrée en phase S**

Le point de contrôle en G1/S est le point de restriction d'entrée dans un cycle (Bertoli et al. 2013). Selon des signaux externes et internes que la cellule va recevoir, elle va soit retarder le cycle, soit démarrer un cycle. Si elle se trouve en condition défavorable pour entreprendre un cycle, ou en absence de signaux mitotiques, elle va entrer dans une phase de quiescence appelée G0 (Hume et al. 2020). Cette phase peut être définitive, c'est le cas de cellules différenciées, ou elle peut être temporaire. Dans cette phase G0, le contrôle par Cyc/CDK est démantelé et les cyclines sont dégradées. De manière résumée, ce point de restriction est présenté en Figure 5. Des dommages à l'ADN activent la protéine p16<sup>INK4a</sup> pour inhiber le complexe CycD/CDK4/6, ainsi que la voie p53 – p21<sup>CIP1</sup> qui vont alors inhiber le complexe CycE/CDK2 (Bartek and Lukas 2001). En absence de ces signaux de dommages et en présence de signaux mitotiques, le complexe CycD/CDK4/6 est actif et inhibe Rb (Retinoblastoma), un inhibiteur des facteurs de transcription E2F1/2/3 (Kaulich et al. 2021). CycD/CDK4/6 inhibe également les co-facteurs p107 et p130 des inhibiteurs E2F4/5 (Narasimha et al. 2014). Les facteurs E2F1/2/3 peuvent

alors induire l'expression de gènes d'acteurs de cette transition G1/S ; comme la cycline E qui va alors s'associer à CDK2 (non inhibé par p21). CycE/CDK2 va dans un premier temps inhiber totalement Rb par son hyperphosphorylation (Bertoli et al. 2013; Skotheim et al. 2008). La cycline A va ainsi pouvoir être aussi transcrite, *via* les facteurs E2F1/2/3, pour s'associer à CDK2 également (Narasimha et al. 2014). Pour compléter le passage définitif dans l'entrée d'un cycle cellulaire, CycA/CDK2 va maintenant inhiber les facteurs E2F1/2/3 pour ne plus pouvoir être dans l'entre-deux phases et définitivement passer en phase de réplication du génome. Parmi les gènes ayant eu le temps d'être exprimés, les facteurs de transcriptions inhibiteurs E2F6/7/8 vont pouvoir remplacer les E2F1/2/3 (Skotheim et al. 2008).



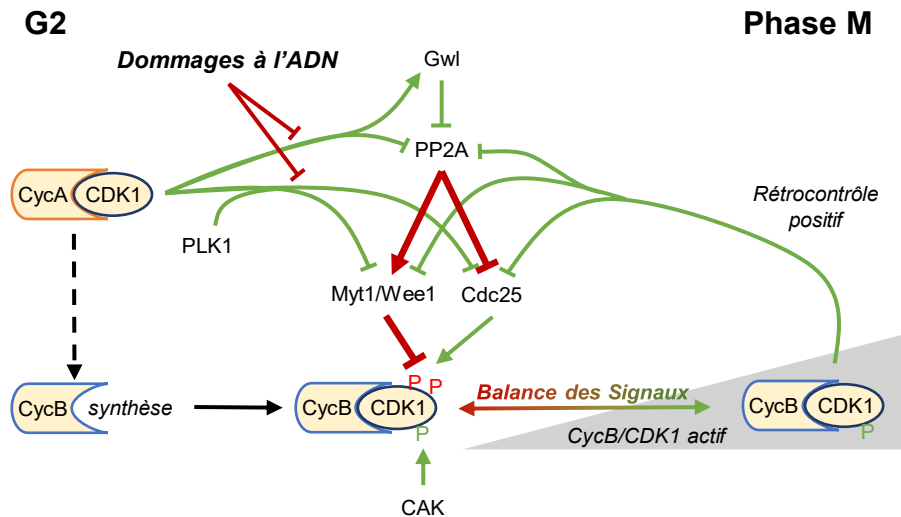
*Figure 5 Point de contrôle G1/S du contrôle de l'entrée dans un cycle cellulaire*

La transition G1/S correspond au point de restriction. C'est l'étape qui définit l'entrée ou non dans un nouveau cycle cellulaire. Ce contrôle consiste en une balance entre signaux mitogéniques et signaux anti-mitogéniques tels que les dommages à l'ADN. La synthèse de cycline D permet l'activation du complexe CycD/CDK4/6 qui va alors induire la synthèse de cycline E et des acteurs de la phase S. Si la balance penche en faveur de l'entrée dans un cycle, le complexe CycE/CDK2 est alors actif pour stimuler fortement la synthèse des acteurs de la phase S et la synthèse de cycline A. La cellule entre donc en phase S. La cycline A va alors activer le complexe CycA/CDK2 qui va alors induire la répression de ce système pour éviter un retour en arrière (flèches noires). Les régulations négatives de la transition sont indiquées en rouge et les régulations activatrices sont en vert. Les flèches à pointes désignent des activations des cibles tandis que les flèches plates indiquent une inhibition de la cible. Se référer au texte pour plus de détails. (Rb : retinoblastoma).

## ii. Le checkpoint G2/M d'entrée en mitose

Ce point de contrôle est également régulé négativement par les potentiels dommages à l'ADN. Pour passer ce point de contrôle, elle doit accumuler suffisamment de complexe CycB/CDK1 actif (Figure 6). En résumé, en phase G2, le complexe CycA/CDK1 induit l'expression de la cycline B qui va alors s'associer à CDK1. Comme expliqué ci-dessus, ce complexe subit deux phosphorylations inhibitrices par Myt1 et Wee1 et une activatrice par CAK. Pour permettre l'activation de ce complexe et démarrer la mitose, les deux phosphorylations inhibitrices doivent être enlevées par la phosphatase Cdc25. C'est sur cette balance entre signaux activateurs et inhibiteurs que le contrôle se fait. Les deux kinases inhibitrices sont notamment activées par la phosphatase PP2A qui en parallèle inhibe la phosphatase Cdc25. Pour contrer ces signaux forts, plusieurs signaux s'additionnent sur les trois acteurs, pour inhiber Myt1/Wee1 et activer Cdc25. Le complexe CycA/CDK1 agit directement sur ces trois acteurs mais aussi indirectement en activant la kinase Greatwall (Gwl) (Hégarat et al. 2020; Nasa et al. 2020). De même, les kinases AuroraA/Bora et PLK1 (Polo-like kinase 1) sont accumulées en G2 (Seki et al. 2008). AuroraA/Bora va alors activer PLK1 qui va agir sur les trois acteurs. Ce contrôle par PLK1 est aussi régulé par la signalisation liée aux dommages à l'ADN. Grâce à ces différents éléments, une petite quantité de complexe CycB/CDK1 commence à pouvoir être actif. Une boucle de rétrocontrôle actif très efficace se met alors en place. Le complexe actif CycB/CDK1 peut aussi agir négativement sur PP2A, Myt1, Wee1 et positivement sur Cdc25 par phosphorylation. Cette activation massive de CycB/CDK1 permet alors le passage définitif du checkpoint et le démarrage de la mitose (O'Farrell 2001). Un exemple de cible pour CycB/CDK1 est l'Histone H1 pour initier la condensation des chromosomes.





*Figure 6 Point de contrôle G2/M de l'entrée en mitose*

*Ce point de contrôle consiste en une balance entre signaux inhibiteurs (rouge) et activateurs (vert) du complexe CycB/CDK1. En phase G2, le complexe CycA/CDK1 induit la production de cycline B mais aussi l'activation du complexe CycB/CDK1 en opposition aux signaux inhibiteurs tels que les dommages à l'ADN. Lorsque suffisamment de CycB/CDK1 est actif, le complexe induit un rétrocontrôle positif et l'induction des événements de la mitose. Se référer au texte pour plus de détails.*

### iii. Les checkpoints de sortie de mitose

Le point de contrôle pour la sortie de mitose est centré autour de la bonne répartition des chromosomes par l'ensemble centrosomes/microtubules/kinétochores formant le fuseau mitotique (revue par (McIntosh 2016)). Le but étant d'avoir deux cellules filles avec le nombre approprié de chromosomes. Un défaut de nombre de chromosomes dans une cellule est une aneuploïdie. Evidemment, avant cette étape, il faut que la duplication du centrosome se soit bien déroulée en phase S. Un défaut de duplication de centrosome peut mener à des fuseaux monopolaires ou multipolaires problématiques pour une ségrégation en deux groupes de chromosomes. Ce point de contrôle est découpé en deux sous contrôles au niveau des transitions métaphase/anaphase (Spindle Assembly Checkpoint - SAC) et anaphase/télophase (Chromosome Separation Checkpoint).

#### Le Spindle Assembly Checkpoint (SAC)

En début de phase M, les deux centrosomes se positionnent chacun d'un côté de la cellule. Des microtubules sont polymérisés à partir de ces centrosomes (pôle négatif des microtubules). Le noyau est d'abord positionné au centre de la cellule par ce réseau jusqu'à ce qu'il y ait rupture de l'enveloppe nucléaire. Les pôles positifs des microtubules peuvent alors

rejoindre les chromosomes. C'est ici que débute le SAC et qui restera actif jusqu'à l'alignement des chromosomes en plaque métaphasique (Figure 7). Cependant, pour résumer, chaque chromatide sœur doit être connectée aux microtubules émanant d'un centrosome chacun afin d'assurer la répartition d'une chromatide par cellule fille. De nombreux éléments entrent en jeu dans ce contrôle, y compris kinases et phosphatases telles que Aurora B, CDK1, PLK1, PP1, PP2A (Protein Phosphatase 1/2A) (Saurin 2018; Hayward et al. 2019). Un problème avec un seul élément peut causer des défauts de répartition de chromosomes (revue par (Hardwick et al. 1999)). Tout se passe principalement au niveau du centromère des chromosomes.

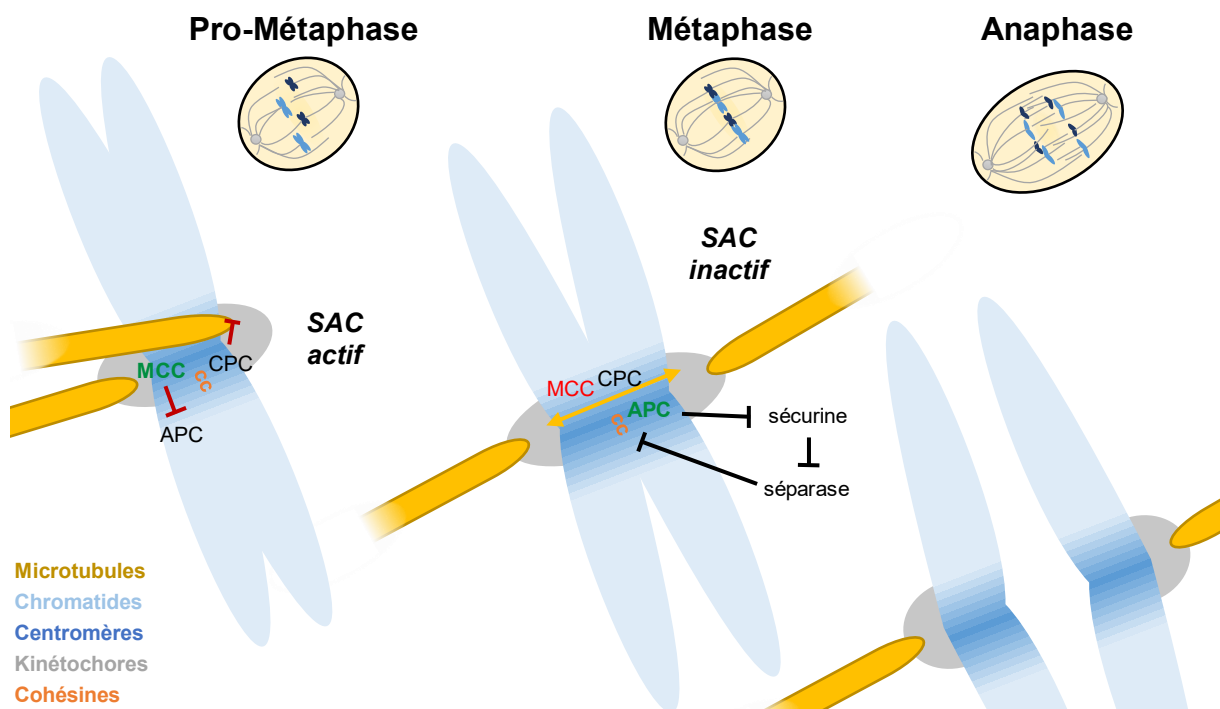


Figure 7 Le Spindle Assembly Checkpoint (SAC)

*Durant la mitose, les chromosomes doivent être alignés à la plaque métaphasique pour permettre leur répartition correcte durant l'anaphase. Le SAC est ainsi actif en prométaphase jusqu'au correct alignement de l'ensemble des chromosomes. Pour cela, au sein des kinétochores, le complexe MCC permet le maintien du complexe APC inhibé tant que le kinétochore n'est pas fixé correctement par le fuseau de microtubule. De plus, de mauvaises fixations (ici une fixation synthétique est représentée) vont également être déstabilisées par le complexe CPC. Une fois fixées de manière amphitellique, la tension (symbolisée par la double flèche jaune) créée par le fuseau va empêcher le CPC d'avoir son action déstabilisatrice. Les chromosomes vont pouvoir s'aligner en métaphase. Enfin, l'APC va pouvoir être activé et induire la dégradation des cohésines qui maintiennent les chromatides sœurs ensemble. L'anaphase débute alors. Se référer au texte pour plus de détails.*

Dans un premier temps, le centromère permet l'assemblage d'une structure, le kinétochore. Au sein de ce kinétochore, des modifications d'Histones particulières ont lieu, notamment la phosphorylation de l'Histone H3 (pT3H3) par la kinase haspine (haploid germ cell-specific nuclear), que nous étudierons au sein du chapitre 2 de la partie des résultats du manuscrit ou encore la phosphorylation de l'Histone HA2 (pH2AS121). Ainsi aux kinétochores sont recrutés différents éléments : le CPC (Chromosomal Passenger Complexe) *via* les pT3H3 et pH2AS121 et un complexe multiprotéique MCC (Mitotic Checkpoint Complexe). Le MCC contient notamment une sous-unité activatrice de l'ubiquitine ligase APC (Anaphase Promoting Complexe) : cdc20. Cdc20 est ainsi séquestrée dans le MCC et ne peut donc pas activer l'APC, qui est le premier élément résolutif de ce checkpoint. La fixation de microtubules sur le kinétochore va déstabiliser le MCC, libérer cdc20 et activer l'APC. Cependant, cette déstabilisation nécessite la bi-orientation du chromosome avec la liaison d'un centrosome par chromatide sœur (fixation amphitéliques). Des fixations non correctes (fixation latérale, synthétique ou mérotelique) peuvent avoir lieu et seront déstabilisées par le CPC pour retenter une fixation (Cimini et al. 2006). Cette fixation amphitélique permet ainsi la déstabilisation du MCC. Cependant, il faut que l'ensemble des chromosomes soit correctement fixé pour permettre l'activation complète de l'APC/C avec sa sous-unité cdc20. Enfin, l'APC/C actif va causer la dégradation de différents acteurs par ubiquitination. La cycline B est dégradée, désactivant le complexe avec CDK1. APC/C va également causer la dégradation de la Sécurine, un inhibiteur de la protéase Séparase, qui laisse alors cette dernière active. Finalement, la Séparase va cibler les Cohésines aux centromères, les cliver, libérant ainsi les chromatides sœurs. Les chromatides, attachées toujours aux microtubules, vont alors être tirées de chaque côté de la cellule à l'aide des moteurs moléculaires Dynéine. C'est l'anaphase qui débute.

### **Le Chromosome Separation Checkpoint**

Ce second checkpoint du fuseau mitotique permet le contrôle de la bonne ségrégation des chromosomes durant l'anaphase. Des contrôles ont notamment été précisés récemment. En effet, il s'agit de détecter les chromosomes en retard (« lagging chromosomes ») et de là, retarder la télophase, c'est-à-dire la décondensation des chromosomes et le ré-assemblage de l'enveloppe nucléaire. Ce checkpoint de la bonne ségrégation des chromosomes permet alors d'éviter des aneuploïdies ou encore la formation de micronoyaux (Orr et al. 2021). Ce contrôle se met en place au déclenchement de l'anaphase. Aurora B (la kinase du CPC) est transférée du centromère au fuseau central. Depuis cette position, Aurora B aura alors un gradient d'activité possible qui se réduit en s'éloignant du fuseau central (Fuller et al. 2008). De là, plusieurs

actions ont été démontrées pour retarder la télophase en agissant sur les chromosomes encore proches de cette région centrale et pour résoudre les soucis causant le retard d'un chromosome (Sen et al. 2021). Aurora B permet le maintien de la condensation des chromosomes, empêche toute reformation d'enveloppe nucléaire (Afonso et al. 2014), maintient le complexe CycB/CDK1 (non dégradé) et ses activités sur les chromosomes en retard (Afonso et al. 2019) et stabilise les kinétochores et les microtubules associés pour favoriser la ségrégation (Papini et al. 2021; Orr et al. 2021).

L'ensemble de ces moyens de contrôle du cycle cellulaire permet son bon déroulement, afin d'obtenir deux cellules identiques et sans défauts d'intégrité du génome. Ces contrôles permettent la réalisation de ces phases de manière ordonnée, par étapes et sans retour en arrière. La réalisation de ce cycle cellulaire permet une prolifération des cellules. Dans un organisme multicellulaire, cette prolifération très contrôlée est nécessaire jusqu'au moment où la cellule se différenciera. Le maintien de l'intégrité de la cellule, génome compris, au fur et à mesure des cycles est donc essentiel pour permettre leur fonction une fois différenciée. Chez les organismes multicellulaires à reproduction sexuée, la production des gamètes par méiose, la fécondation et les premiers cycles mitotiques du zygote illustrent ce besoin crucial d'un maintien de l'intégrité de la cellule puisque les cellules qui en découlent sont à l'origine d'un organisme entier.

### **3. Arrêts méiotiques et Fécondation**

Comme présenté ci-dessus, la méiose consiste en deux phases M successives sans phase S entre deux, afin de produire les gamètes. Cependant, ces deux cycles peuvent temporellement s'étaler sur des dizaines d'années. La production des gamètes passe par deux arrêts méiotiques, variables selon les espèces.

#### **a. Le premier arrêt universel**

Le premier arrêt se met en place au stade diplotène de la prophase I : chromosomes condensés et reliés à leur homologue. Cet arrêt est universel malgré des variations sur le système de maintien en arrêt selon les espèces. Le point commun est l'inactivation du complexe CycB/CDK1, ici nommé MPF comme lors de sa mise en évidence dans ce contexte méiotique justement. Le système permettant la réactivation consiste en un signal venant en amont, d'une hormone MIH (Maturation Initiation Hormones) qui varie également selon les espèces.

### **b. Le second arrêt méiotique**

Le stade physiologique auquel le second arrêt se fait est variable selon les espèces (Figure 8). Cependant, le principe de blocage reste commun. Un élément dans le cytoplasme des cellules bloque l'avancée dans le cycle, c'est le Cytostatic-Factor (CSF). Pendant longtemps, différents acteurs ont été identifiés chacun comme le CSF. Cependant, l'étude de ce mécanisme a mené à identifier une voie de signalisation et notamment une kinase : Mos qui induit alors la voie de signalisation MEK-MAPK-RSK (Masui 2000). Son action va donc avoir lieu à différents moments du cycle de production des gamètes selon les espèces : en métaphase I, en métaphase II ou au stade post-méiose G1 du premier cycle mitotique.

### **c. Arrêts méiotiques selon les espèces**

Chez les mammifères, la méiose est principalement induite par l'acide rétinoïque (dérivé de la Vitamine A) durant la vie fœtale pour les femelles et à la puberté chez les mâles pour atteindre l'arrêt en prophase I où le MPF est inactivé (Feng et al. 2014; Pan and Li 2019). Chez les femelles, à chaque début de cycle (menstruel chez les primates, et œstral chez les autres animaux), une production de l'hormone FSH (Follicle Stimulating Hormone) est induite. La FSH va stimuler la folliculogénèse jusqu'au stade pré-ovulatoire. Un pic de LH (Luteinizing Hormone) déclenchera l'ovulation et la maturation de l'ovocyte jusqu'au stade métaphase II *via* la voie MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) (Prochazka and Blaha 2015). La fécondation déclenchera la finalisation de sa maturation méiotique. Chez le mâle à la puberté, la FSH va induire chez les cellules nutritives de Sertoli, une traduction spécifique d'acteurs (Musnier et al. 2012) permettant notamment la production d'acide rétinoïque qui induit la méiose des spermatogonies.

Chez le xénope, pendant l'arrêt en prophase I causé par l'absence de cycline B, l'ovocyte va maturer en réalisant la vitellogénèse, c'est-à-dire l'accumulation de vitellus pour construire son stock de nutriments maternels. Lorsque la maturation a été suffisante, l'ovocyte acquiert une compétence à être stimulé par la progestérone. La Progestérone va ainsi activer la réentrée en méiose jusqu'au stade métaphase II en induisant la traduction des acteurs cycline B, ou encore Mos (Jesus et al. 2020). La fécondation induit ensuite la sortie de blocage en métaphase II et ainsi la fin de méiose.

Chez les invertébrés marins, plusieurs stades de second arrêt méiotique sont possibles (Costache et al. 2014). Le premier blocage en prophase I consiste à bloquer également le MPF par les phosphorylations inhibitrices de son activité ou encore *via* la phosphatase antagoniste

PP2A déphosphorylant les cibles du MPF. La réentrée en méiose est ensuite induite par une réactivation du MPF. Enfin, le CSF est activé selon l'espèce à différents stades.

Plusieurs seconds arrêts méiotiques sont retrouvés au sein des mollusques. Chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, l'huître *Crassostrea gigas* et la patelle *Patella vulga*, après la ponte, le second arrêt méiotique est en métaphase I où la voie MAPK et la synthèse protéique sont impliquées pour maintenir l'arrêt jusqu'à la fécondation (Portillo-López et al. 2003). La traduction des cyclines A et B est notamment impliquée dans cet arrêt méiotique (van Loon et al. 1991). En revanche, chez la palourde *Spisula solidissima* et la pholade *Barnea candida*, le premier arrêt en prophase I est l'unique arrêt méiotique et la fécondation induit la maturation complète (Colas and Dubé 1998).

Les Ascidies sont également bloquées en métaphase I pour le second arrêt méiotique, par la voie Mos-MAPK qui inhibe l'APC/C. La fécondation va induire l'activation de l'APC/C pour sortir de cette métaphase (Dumollard et al. 2011).

L'amphioxus, comme le xénopé, est arrêté en métaphase II (Holland and Holland 1992). Cependant, ce qui est induit par la fécondation pour désactiver le MPF chez l'amphioxus est encore inconnu.

Chez les étoiles de mer, le blocage en prophase I par inhibition du MPF (Kishimoto 1998) est libéré par la production de l'hormone 1-MéthylAdénine (1-MeAd) qui active la voie Greatwall ou désactive la PP2A (Terasaki and Runft 2010; Swartz et al. 2021). Ensuite, l'arrêt par CSF diffère selon les espèces d'étoiles mais toujours sous contrôle de la voie Mos (Tachibana et al. 2000; Costache et al. 2014). *Asterina pectinifera* présente un arrêt en métaphase I avec un MPF actif et l'APC/C inhibé qui sera activé à la ponte. Un arrêt en G1 a lieu chez *Asterina pectinifera* et *Patiria miniata* où la phase S est inhibée par la séquestration de cdc45 (facteur du complexe de pré-réplication) dans le cytoplasme. Enfin, chez les espèces *Astropecten aranciacus* et *Marthasterias glacialis*, l'induction de la maturation amène le gamète femelle jusqu'au stade G2 du premier cycle mitotique, avec une phase S complétée sans même que la fécondation ait eu lieu. La fécondation nécessite cependant d'avoir lieu durant ces phases de méiose II et de début de premier cycle pour pouvoir démarrer les premiers clivages embryonnaires et dépasser cet arrêt en G2 (Fisher et al. 1998). L'arrêt en G2 est associé à une activité MAPK importante dont la fécondation induira son inhibition et une synthèse de cycline B.

Chez la méduse *Clytia Hemisphaerica* (Jesus et al. 2020), c'est en réponse au changement de lumière (ombre/jour) qu'un peptide (W/RPRPa) est produit dans les gonades et va induire la

reprise de la méiose des ovocytes (Takeda et al. 2018). Le MPF est ainsi activé jusqu'au stade G1 où Mos néo-traduit va bloquer le cycle par l'inhibition du MPF de nouveau, que la fécondation réactivera (Amiel et al. 2009).

Enfin, chez l'oursin, l'arrêt est en phase G1 par une voie Mos-MAPK active. La maturation méiotique est terminée et le premier cycle mitotique est prêt à être induit. La fécondation induit la phase S. La fécondation active également la synthèse protéique (Chassé et al. 2016; Mulner-Lorillon et al. 2017) notamment d'acteurs spécifiques. Nous verrons notamment cette spécificité par l'étude du traductome à la transition ovule-embryon à la dernière partie de l'introduction de ce manuscrit.

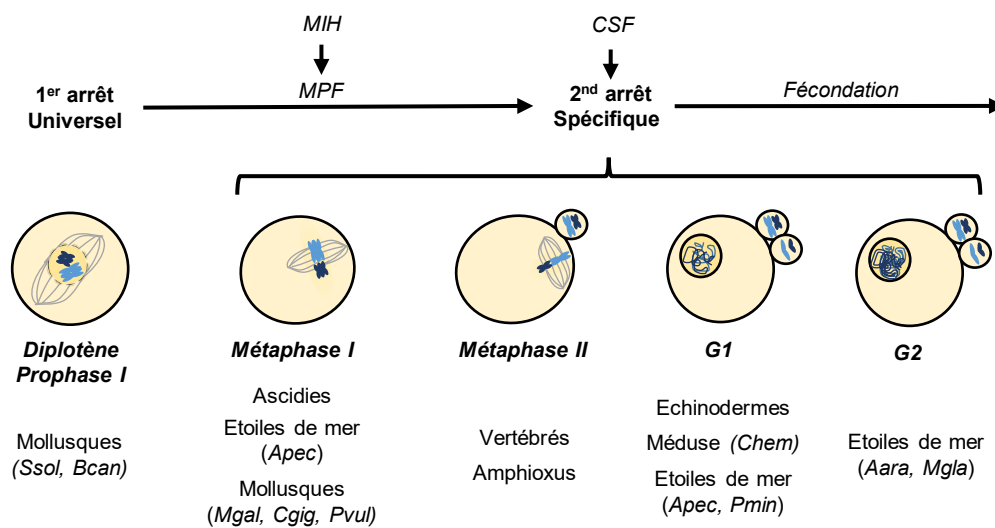


Figure 8 Arrêts méiotiques et fécondation

Physiologiquement, la maturation méiotique passe par des arrêts méiotiques à différents stades. Le premier arrêt en prophase I est universel. La reprise du cycle est induite lorsqu'une activité du MPF est retrouvée (production de la cycline B et/ou activation du complexe), en réponse à un signal hormonal (MIH). Le second arrêt, enclenché par le CSF, se déroule ensuite à un stade spécifique selon les espèces où la fécondation viendra redémarrer le cycle. Ainsi, des ascidies et mollusques s'arrêtent en métaphase I. Chez les vertébrés et amphioxus, c'est un arrêt en métaphase II. Chez les échinodermes en général et la méduse, la maturation s'arrête en phase G1 du premier cycle mitotique. Les étoiles de mer présentent des arrêts selon les espèces en métaphase I, en G1 ou G2. Enfin, certains mollusques ne présentent pas de second arrêt méiotique et la fécondation a lieu directement en prophase. Se référer au texte pour plus de détails. (MIH : maturation initiation hormone ; MPF : m-phase promoting factor ; CSF : cytotatic factor) Les espèces sont indiquées entre parenthèses : (Apec : *Asterina pectinifera* ; Pmin : *Patiria miniata* ; Aara : *Astropecten aranciacus* ; Mgl : *Marthasterias glacialis* ; Mgal : *Mytilus galloprovincialis* ; Cgig : *Crassostrea gigas* ; Pvul : *Patella vulga* ; Ssol : *Spisula solidissima* ; Bcan : *Barnea candida* ; Chem : *Clytia Hemisphaerica*)

#### **d. La fécondation**

Selon l'espèce, la fécondation a ainsi lieu dans un ovocyte arrêté en prophase I, métaphase I/II ou bien un ovule arrêté en G1/G2. Cela va permettre la reprise du cycle méiotique ou mitotique et lancer le programme du développement embryonnaire. C'est notamment encore Oskar Hertwig en 1976, qui a publié les premières observations de la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovule d'oursin. On passe alors de deux cellules extrêmement différenciées à un zygote totipotent qui n'attend que d'exprimer son génome (la notion de totipotence est discutée par (Boiani et al. 2019)). Cette fusion de cellule et la reprise de cycle se font alors grâce aux constituants (nutriments, ARNm, Protéines) acquis lors de la gamétogénèse, c'est-à-dire selon le matériel maternel (Sheets et al. 2017; Kipryushina and Yakovlev 2020). Ces constituants maternels régulent alors l'embryogenèse précoce selon deux aspects du contrôle de la destinée cellulaire : un contrôle déterministe où les constituants présents dans la cellule déterminent son futur et un contrôle par régulations où les signaux des cellules autour favorisent ou non une voie de différenciation. Ainsi, selon les espèces, les premiers clivages se font sur les réserves maternelles et la transcription du génome zygotique n'est pas forcément directement active à la fécondation (Tableau 1). Lorsque l'embryon n'utilise plus ces éléments maternels et ne compte que sur l'expression de ses propres constituants depuis son génome, on parle de transition maternelle-zygotique (MZT) ou d'activation du génome zygotique (ZGA). Cette MZT consiste en plusieurs processus. Une réorganisation de la chromatine a lieu avec un nettoyage et remplacement des marques épigénétiques des parents (méthylation de l'ADN, modifications d'Histones). Ensuite, débute la transcription sur ce nouveau génome (fusion des deux génomes parentaux haploïdes) ainsi que la dégradation des ARNm maternels qui sont encore présents. Le stade identifié de la MZT varie selon les espèces et peut varier légèrement selon l'étude. Cependant, ce qui est commun est qu'il y ait une transcription minoritaire rapidement après fécondation et une mise en route globale de la transcription dans un second temps plus tardivement. Les articles suivants présentent les MZT de différentes espèces (Tadros and Lipshitz 2009; Siefert et al. 2015; Jukam et al. 2017; Schulz and Harrison 2019) et le Tableau 1 les récapitule. Ainsi, les premiers transcrits apparaissent dès le stade une cellule fécondée chez la souris, au deuxième cycle chez l'oursin, entre le troisième et sixième cycle chez le xénope et au huitième cycle chez la Drosophile. La MZT globale quant à elle se déroule au deuxième cycle chez la souris, au douzième ou treizième cycle chez le xénope, ou encore au quatorzième cycle chez la Drosophile. Chez l'oursin, la MZT globale se déroule au huitième cycle, mais l'inhibition de la transcription dès la fécondation perturbe les divisions dès le quatrième cycle (Gross and Cousineau 1963a).

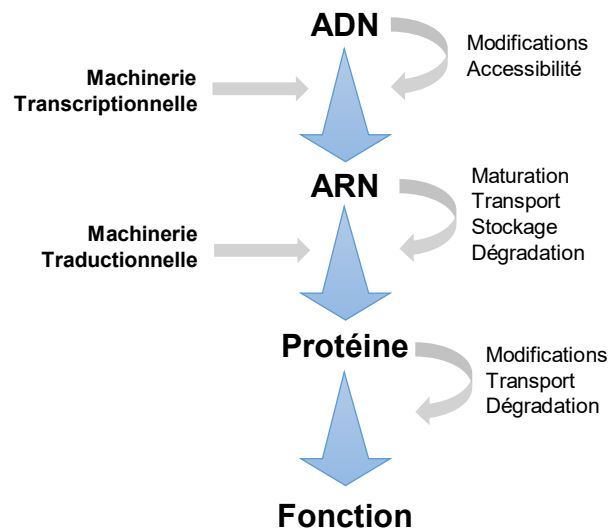


<b>Tableau 1 : Transition Maternelle à Zygotique (MZT) selon les espèces</b>		
<b>Espèces</b>	<b>Stade de la 1<sup>ère</sup> transcription minoritaire</b>	<b>Stade de la MZT</b>
<i>S. purpuratus</i>	2 cellules [1]	Jeune blastula (~120cellules) [1]
<i>C. elegans</i>	4 cellules [1]	Gastrula, 32 cellules [1]
<i>D. melanogaster</i>	Blastoderme syncitial, 128 noyaux [1]	Blastoderme cellularisé, ~8000 noyaux [1]
<i>D. rerio</i>	Clivages, 64 cellules [1,3]	Blastula [1,2,3]
<i>X. laevis</i>	Morula [1,3]	Blastula [1,2,3]
<i>M. musculus</i>	1 cellule fécondée [1,3,4]	2 cellules [1,3,4]
<i>H. sapiens</i>	1 cellule fécondée [3] ; 4 cellules [4]	4 cellules [3] ; 8 cellules [4]
<i>Selon les études, l'identification du stade exacte peut varier légèrement. [1] (Tadros and Lipshitz 2009) [2] (Siefert, Clowdus, and Sansam 2015) [3] (Jukam et al. 2017) [4] (Schulz and Harrison 2019).</i>		

A partir de ce zygote, un organisme entier peut alors se développer. Comme on l'a vu, le contrôle du cycle cellulaire est extrêmement important pour assurer la prolifération correcte des cellules. La bonne expression des acteurs est donc primordiale pour effectuer ces niveaux de contrôles. L'expression du génome passe par de nombreux contrôles. Je vais ainsi vous présenter rapidement l'expression du génome et ses grandes étapes mais approfondir les régulations traductionnelles des ARNm qui sont au cœur de ma thématique de recherche.

## **B. Contrôle traductionnel des ARNm**

L'expression du génome inclut de nombreux contrôles depuis l'ADN jusqu'à la protéine encodée (Figure 9). Les ARN non codants ne seront pas traités ici. La chromatine peut présenter des modifications épigénétiques ou des changements d'accessibilité, de compaction, qui vont influencer la transcription. La machinerie de transcription et les facteurs de transcription sont eux-mêmes modulés dans leur activité, leur localisation ou leur capacité à fixer de l'ADN. Cependant ces contrôles ne permettent pas une adaptation rapide du contenu protéique en réponse à un stimulus. C'est notamment l'ARNm, après sa maturation, qui va présenter une régulation fine de sa traduction. Nous verrons alors dans cette partie l'ARNm et ses éléments de régulation intrinsèque mais également le processus de traduction et les régulations de ces acteurs.



*Figure 9 L'expression du génome est un processus extrêmement régulé*

*La production d'une protéine et sa fonction associée passe par un long processus d'expression contrôlée à de nombreuses étapes. Depuis l'ADN et la transcription, jusqu'à la régulation fonctionnelle de la protéine, en passant par l'ARN et sa traduction, l'ensemble peut être modulé.*

## 1. L'ARNm, messenger de l'expression

### a. Structure générale et maturation d'un ARNm

Un ARNm est une séquence d'acide ribonucléique possédant plusieurs parties. Le cadre ouvert de lecture ORF (Open Reading Frame) est la partie qui encode la protéine. Cette portion est encadrée en 5' et en 3' par des régions qui ne seront pas traduites 5'UTR et 3'UTR ('UnTranslated Region'). Ces régions UTR portent principalement les éléments cis de régulation. Je ne discuterai dans ce manuscrit que des systèmes eucaryotes, dans lesquels une coiffe ( $m^7GTP$ ) caractérise le 5' de l'ARNm. Il s'agit d'une guanine méthylée liée par une liaison 5'-5' au premier nucléotide encodé de l'ARNm. L'extrémité 3' de l'ARNm est caractérisée par une queue poly(A).

La coiffe et la queue poly(A) servent notamment d'accroche à la machinerie de traduction mais aussi de protection des extrémités de l'ARNm. Ces éléments en 5' et 3' sont ajoutés à l'ARN dès sa transcription et sont fixés par des protéines nucléaires spécifiques à savoir les protéines de liaison à la coiffe CBP20/CBP80 (nCBP - nuclear Cap-Binding Protein formant le nCBC – nuclear Cap-Binding Complexe) mais aussi les facteurs cytoplasmiques et nucléaires eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) et PABP (poly(A)-binding protein) (Mars et al. 2021). eIF4E est notamment importé au noyau par la protéine navette 4E-T dont nous rediscuterons au moment des régulations d'eIF4E. Aussi, après la transcription, des complexes appelés

Spliceosomes vont épisser les introns de l'ARN pré-messager. L'épissage peut être alternatif. Cela peut permettre à un ARNm de varier et parfois de posséder ou non des éléments de régulations que nous verrons plus tard. L'épissage alternatif est surtout mis en évidence dans l'obtention, après traduction, de protéines variables à partir d'un même gène. Des complexes protéiques EJC (Exon Junction Complex) sont maintenus aux jonctions d'épissage jusqu'au premier tour de traduction.

Ainsi dès la transcription, un ARNm est associé à des protéines de liaison à l'ARN (RBP) dans des mRNP (messenger RiboNucleoprotein Particles). Après ces processus de maturation, l'ARNm est exporté du noyau notamment grâce à ses RBP fixées par des protéines d'export nucléaire (Carmody and Wentz 2009; De Magistris 2021).

La transcription a longtemps été perçue comme le contrôle majoritaire de l'expression du génome. Pourtant le transcriptome n'est pas le reflet du contenu en protéines de la cellule. En effet, les variations de quantité de protéines ne sont pas simplement attribuées à des variations de quantité d'ARNm (Schwanhäusser et al. 2011). Ainsi, l'ARNm se retrouve dans le cytoplasme où d'autres régulations ont lieu avant même sa traduction. La destinée de ces ARNm va ainsi pouvoir être régulée lors de différents contrôles : le contrôle qualité de l'ARNm ou le ciblage par ARN interférents pouvant mener à sa dégradation, le stockage temporaire en structures non-vésiculaires, ou enfin être dirigé vers la machinerie de traduction (Figure 10).

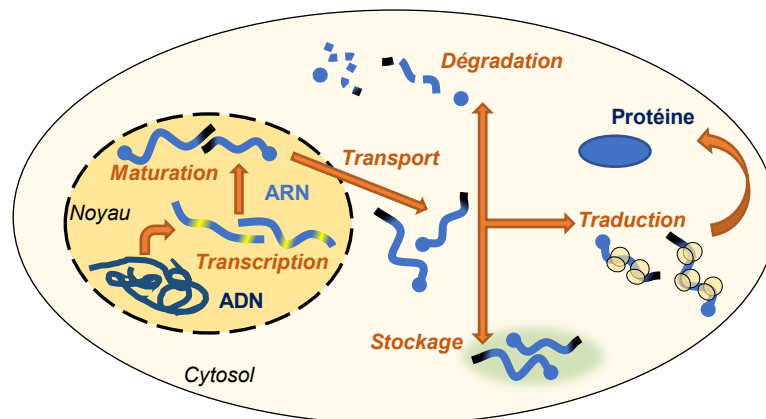


Figure 10 Régulation générale d'un ARNm

*Au sein du noyau, les ARN sont transcrits et subissent des maturations (ajout de la coiffe, polyadénylation et épissage). L'ARNm est ensuite exporté et transporté au sein du cytoplasme. L'ARNm peut ensuite être dirigé vers trois destinées. Il peut être traduit au sein de la machinerie de traduction. Il peut également alterner entre traduction et stockage au sein de structures d'agrégation non vésiculaires. Enfin l'ARNm peut aussi être dégradé. L'ensemble des ARN de la cellule détermine le transcriptome, tandis que le traductome est déterminé par les ARNm au sein de la machinerie de traduction. Se référer au texte pour plus de détails.*

## **b. Contrôle qualité des ARNm avant traduction**

Des erreurs qui impactent la qualité et la fidélité de l'ARNm doivent être évitées par la cellule. Un ARNm aberrant et un ribosome en cours d'élongation lors du premier tour de traduction vont déclencher un signal qui mène à la dissociation du ribosome, ainsi que la dégradation du peptide et de l'ARNm. Trois systèmes sont clairement détaillés dans la revue (Powers et al. 2020).

Un codon stop prématuré (PTC) introduit par une mutation non-sens dans la séquence de l'ARNm mène à l'obtention d'une protéine tronquée. Ces protéines peuvent avoir un effet délétère pour la cellule. On parle d'une dégradation de l'ARNm par **NMD (Non-sens Mediated Decay)** (Karousis and Mühlemann 2019) où la proximité avec un EJC d'un ribosome arrêté à un PTC, va être détectée et induire la dégradation de l'ARNm.

Le **NSD (Non-Stop Decay)** et le **NGD (No-Go Decay)** font intervenir des ribosomes arrêtés ou ralentis par différents éléments possibles. Le NSD est déclenché par un ribosome stoppé suite à la traduction d'une suite de Lysines encodées par la queue poly(A) lorsqu'une mutation a supprimé le codon stop (Jamar et al. 2017). Le NGD est induit par un ribosome bloqué qui ne peut plus avancer dans l'ORF. Cela peut venir d'une structure trop rigide pour être déstabilisée par le ribosome, un acide aminé et/ou son ARNt (acide ribonucléique de transfert) associé trop limité en quantité, ou bien encore un ciblage par un système d'ARN interférant que nous reverrons plus tard. L'arrêt du ribosome et la collision par le ribosome suivant (disome) vont être détectés et déclencher la dégradation de l'ARNm, du peptide et la dissociation de l'ensemble (Powers et al. 2020).

## **c. Agrégation des mRNP**

Une fois dans le cytoplasme, les ARNm ne sont pas systématiquement dirigés vers la machinerie de traduction. En effet des mRNP uniques vont pouvoir s'accumuler dans la cellule et former des granules/foci de mRNP. Différents granules existent et les protéines qui y sont présentes définiront la fonction de ce granule (Decker and Parker 2012). Cela peut être du stockage temporaire, du transport ou de la dégradation des ARNm associés. Ces structures peuvent passer d'un type à un autre par le changement des protéines qui les composent (Layana et al. 2012).

Les granules les plus conservés, présents chez les animaux, plantes ou levures, sont les **P-bodies (Processing bodies)**. Ils sont composés de nombreuses enzymes, notamment celles pour la dégradation des ARNm ou l'inhibition de leur traduction. Ainsi, un ARNm pour lequel

un système de NMD, NGD ou NSD est enclenché et doit être dégradé, va se retrouver associé à ces granules (Sheth and Parker 2003; Hubstenberger et al. 2017). Cependant, il est maintenant compris que l'activité des P-Bodies n'est pas seulement la dégradation (Shyu et al. 2008; Ayache et al. 2015; Standart and Weil 2018). Un ARNm au sein des P-bodies n'est pas forcément dégradé, il a la possibilité de retourner en traduction active (Bhattacharyya et al. 2006). Un ARNm peut alors voir sa traduction inhibée au sein des P-bodies. Deux récentes méthodes de purifications de ces P-bodies ont révélé des protéines préférentiellement associées aux P-bodies (Hubstenberger et al. 2017; Youn et al. 2018; 2019). Plus d'1/5 d'ARNm d'une cellule semble passer par ces P-Bodies pour y voir leur traduction inhibée, servant ainsi de réservoir d'ARNm prêt à être traduit. De plus, il semblerait qu'il y ait sélection de certaines catégories d'ARNm. Les ARNm qui encodent des protéines impliquées dans des fonctions de régulation, seraient spécifiquement présents dans les P-bodies (Hubstenberger et al. 2017).

En parallèle de ces P-bodies, certains granules ne se forment qu'en cas de stress (Hoyle et al. 2007). Ce sont les **Granules de Stress**. Lorsque la cellule est soumise à un stress, elle doit ralentir son métabolisme et cela passe par l'inhibition de la traduction. Les ARNm qui étaient jusque-là traduits, vont être regroupés dans ces Granules de Stress. De manière non spécifique, ~10% des ARNm de la cellule y sont envoyés pour empêcher toute ré-initiation de traduction de ces ARNm (Khong et al. 2017) sans pour autant pouvoir procéder à leur dégradation. Les protéines d'initiation de traduction, les répresseurs de traductions, ou des composants de la voie d'interférence par ARN (aussi présent dans les P-bodies) y sont localisés (Leung et al. 2006; Youn et al. 2018; 2019). De plus, il a été montré que certains éléments de répressions diffèrent selon le stress subi par la cellule (Aulas et al. 2017; Markmiller et al. 2018). Comme énoncé plus haut, les ARNm de ces structures macro-moléculaires peuvent passer de l'une à l'autre. Cependant un sens semble être privilégié. Un ARNm quittant la machinerie de traduction va se retrouver dans les P-bodies où sa traduction est inhibée et dans une moindre mesure, peut être dégradé. À la suite de cela, un ARNm peut retourner parmi les polysomes après un passage plus ou moins long en Granules de Stress (Mollet et al. 2008).

Aussi, des **granules de transport** de mRNP ont été identifiés dans des types cellulaires particuliers (Mofatteh and Bullock 2017), notamment présents dans les neurones (revue dans (Fernandopulle et al. 2021)) ou encore dans des fibroblastes. Ils servent notamment à localiser et traduire des ARNm à un endroit particulier de la cellule lié à une fonction particulière, synapses ou protrusions *versus* le corps cellulaire principal (Khlebodarova et al. 2018; Meservey et al. 2021). Dans ces cellules à traduction localisée, les ARNm nécessaires aux

extrémités de la cellule possèdent différents éléments de régulations cis, surnommés ‘Zipcodes’ reconnus par des RBP particulières et spécifiques à une localisation (Kislauskis et al. 1994; Ross et al. 1997). Ce ‘Zipcode’ permet l’assemblage d’un granule de transport autour de l’ARNm. Ce granule va ensuite être transporté le long des microtubules. Une fois arrivés au lieu ciblé, des signaux locaux, comme les voies de signalisation issues des GPCR (G Protein-Coupled Receptors), permettront d’enclencher la traduction de ces ARNm (Tréfier et al. 2018). Une traduction locale dynamique permet ainsi une réponse rapide et adaptée aux signaux exogènes, comme c’est nécessaire au niveau des synapses pour une plasticité neuronale (Khlebodarova et al. 2018). Une traduction localisée est également présente sur le fuseau mitotique mais ne requiert pas de granules de transport. Nous reverrons cela dans le cadre de la traduction en phase-M en troisième partie de l’introduction de ce manuscrit.

## **2. La traduction**

La traduction est un processus complexe impliquant de nombreux acteurs pour contrôler finement la production d’une protéine au bon endroit et au bon moment, et dans les bonnes quantités. Cela permet à la cellule d’adapter rapidement son contenu protéique aux différentes étapes du cycle cellulaire, aux différents signaux micro-environnementaux ou encore lorsque la transcription est impossible comme au sein du zygote avant la MZT. Le modèle classique de ce processus est découpé en quatre phases : initiation, élongation, terminaison et recyclage dont les acteurs sont répertoriés dans le Tableau 2.

<b>Tableau 2 : Facteurs de la traduction eucaryotes</b>		
<b>Facteurs d'initiation</b>	eIF1	Participe au placement du complexe ternaire et de la sélection du codon initiateur
	eIF1A	Participe au placement du complexe ternaire
	eIF2	Associé à un GTP et au Met-ARN <sub>t</sub> <sub>i</sub> , ils forment le complexe ternaire pour s'associer à la sous-unité ribosomale 40S
	eIF2B	GEF (Guanosine nucleotide Exchange Factor) pour l'échange GDP-GTP du facteur eIF2
	eIF3	Participe à l'assemblage général du complexe d'initiation de la traduction par interaction avec les complexes 43S, complexe ternaire et complexe eIF4F
	eIF4A	ARN hélicase pour déplier les structures secondaires de l'ARNm
	eIF4B	Potentialisateur d'eIF4A et liaison à l'ARNm, eIF3 et PABP
	eIF4E	Protéine de liaison à la coiffe m <sup>7</sup> GTP de l'ARNm
	eIF4G	Protéine d'échafaudage au complexe eIF4F
	eIF5	GAP (GTPase-Activating Protein) pour provoquer l'hydrolyse du GTP du facteur eIF2-GTP pour l'accommodation du Met-ARN <sub>t</sub> <sub>i</sub>
	eIF5B	GTPase permettant l'association des sous-unités ribosomales 40S et 60S
	eIF6	Facteur de maturation de la sous-unité ribosomale 60S et bloque l'association avec la sous-unité 40S avant la reconnaissance de l'AUG
PABP	Protéine de liaison à la queue poly(A) et favorisant la circularisation de l'ARNm par interaction avec eIF4G et eIF4B	
<b>Facteurs d'élongation</b>	eEF1A	GTPase pour l'accommodation de son aminoacyl-ARN <sub>t</sub> lors de la correspondance codon/anticodon
	eEF1B	GEF pour l'échange du GDP-GTP du facteur eEF1A
	eEF2	Favorise la translocation du ribosome sur le codon suivant
	eEF5A	Favorise l'activité peptidyl-transférase de la sous-unité ribosomale 60S
<b>Facteurs de terminaison et recyclage</b>	eRF1	Facteur de reconnaissance du codon stop
	eRF3	GTPase pour la libération du peptide
	ABCE1	Facteur de recyclage des éléments 40S/60S/ARNm
Récapitulatif des facteurs énoncés dans le texte. Les différentes isoformes ne sont pas précisées ici pour simplification.		

### a. Initiation canonique de la traduction

L'initiation de la traduction d'un ARNm consiste en son recrutement au sein de la machinerie de traduction. Pour cela, l'ARNm est activé par l'assemblage de facteurs de traduction permettant sa circularisation. Un complexe de pré-initiation, composé de facteurs de traduction et de la petite sous-unité du ribosome, est alors recruté sur cet ARNm activé. Après le scan de la région 5'UTR, l'anticodon du ARN<sub>t</sub> initiateur (Met-ARN<sub>t</sub><sub>i</sub>) interagit avec le codon initiateur pour définir l'ouverture du cadre de lecture. La grande sous-unité ribosomale est alors recrutée. Au moins 11 facteurs d'initiation eIF (eukaryotic Initiation Factors) sont nécessaires pour réaliser une initiation. L'énergie consommée dans ce processus est fournie par l'hydrolyse de l'ATP et GTP (Guanosine tri-phosphate). Cette étape d'initiation est la plus régulée, et est

souvent présentée comme l'étape limitante de la traduction (Krystosek et al. 1975) ; revue dans (Jackson et al. 2010).

Huit étapes principales peuvent être identifiées au cours de l'initiation et sont représentées en Figure 11. (Etape 1) Un premier complexe ternaire se compose du facteur eIF2( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ), un GTP et le ARNt qui porte la méthionine initiatrice (Met-ARNt<sub>i</sub>). (Etape 2) Ce complexe ternaire s'associe à la petite sous-unité 40S du ribosome avec les facteurs eIF3, eIF1A et eIF1. Ces deux derniers prennent place respectivement dans les sites accepteur (A) et de sortie (E) de la sous-unité ribosomale 40S et restreignent ainsi l'accès, ne laissant que le site peptidique (P) libre pour placer le Met-ARNt<sub>i</sub> (qui est alors le peptidyl-ARNt). eIF3 est composé de nombreuses sous-unités (11 et 13 sous-unités respectivement chez l'oursin et l'Homme (Morales et al. 2006; Gomes-Duarte et al. 2018)) et participe à l'assemblage général avec de nombreuses interactions. eIF3 interagit ainsi dès cette étape avec la 40S, eIF1 et recrute eIF5 qui est une GAP (GTPas-Activating Protein) nécessaire pour l'association prochaine des deux sous-unités ribosomales. Cet ensemble des deux premiers complexes 40S/eIF3/eIF1/eIF1A/eIF5 et eIF2/Met-ARNt<sub>i</sub>/GTP forme alors le complexe de pré-initiation 43S. Ce complexe est prêt à être recruté sur un ARNm.

(Etape 3) En parallèle, un troisième complexe se forme sur l'ARNm : le complexe eIF4F qui est composé d'eIF4E, eIF4G et eIF4A auquel s'ajoute eIF4B. La protéine de liaison à la coiffe eIF4E va se lier à la coiffe et recruter la protéine d'échafaudage eIF4G. Cette dernière permet le recrutement de l'ARN hélicase eIF4A et son potentialisateur eIF4B mais aussi de PABP. PABP se lie à la queue poly(A) de l'ARNm. Cet ensemble ARNm/eIF4F/PABP permet alors de circulariser l'ARNm, d'où la régulation de la traductibilité par la queue poly(A) qui a été énoncée plus tôt. Cet aspect est important pour plusieurs raisons, notamment participer à des ré-initiations de traduction ou encore permettre de rapprocher des éléments de régulations des 5' et 3'UTR de l'ARNm (Alekhina et al. 2020). L'ARNm est ainsi activé.

(Etape 4) Le complexe 43S va ensuite être chargé sur l'ARNm grâce aux interactions entre eIF4G, eIF4B et le facteur eIF3. L'ensemble est maintenant identifié en tant que complexe d'initiation 48S. (Etape 5) Le complexe va ensuite scanner la région 5'UTR jusqu'à atteindre le codon initiateur. Pour cela, l'hélicase d'ARN eIF4A du complexe eIF4F permet de scanner l'ARN au sein du complexe d'initiation tout en le déstructurant si nécessaire. Une fois arrivé au codon initiateur, celui-ci est reconnu par le Met-ARNt<sub>i</sub> ainsi que par des interactions entre



les facteurs eIF2 $\alpha$ , eIF1, eIF1A et la protéine ribosomale rpS26 avec le contexte Kozak du codon initiateur (Hernández et al. 2019).

(Etape 6) Une fois le codon AUG en face de l'anti-codon du Met-ARN<sub>t</sub>, le GTP porté par eIF2 est hydrolysé sous l'influence d'eIF5 pour accommoder le ARN<sub>t</sub>. Le facteur eIF2 lié au GDP (Guanosine di-phosphate) est ainsi libéré du complexe et sera rechargé par eIF2B (sa GEF pour Guanine nucleotide Exchange Factor) pour un cycle de traduction suivant.

(Etape 7) À ce moment, la sous-unité ribosomale 60S se libère de son facteur de maturation eIF6 et, accompagnée du facteur eIF5B (lié à un GTP), est recrutée pour s'associer à la sous-unité ribosomale 40S positionnée au codon initiateur. Les facteurs eIF5, eIF3 et eIF1 sont déplacés par ce 60S. (Etape 8) eIF5B-GTP se place alors dans l'espace accepteur de ARN<sub>t</sub>, avec eIF1A qui s'y trouve, pour aider au positionnement correct des deux sous-unités ribosomales. Après hydrolyse du GTP, eIF1A et eIF5B sont déplacés à leur tour. Il ne reste alors que les deux sous-unités ribosomales 60S et 40S encadrant un ARNm avec le Met-ARN<sub>t</sub> positionné. Cet ensemble forme le complexe 80S qui peut alors débiter l'élongation.

De multiples initiations successives peuvent avoir lieu sur un même ARNm. Ainsi plusieurs ribosomes peuvent être en train de traduire un même ARNm en parallèle. L'ensemble forme alors un polysome. Sachant qu'un ribosome a une empreinte nucléotidique d'environ 30 nucléotides, l'initiation suivante se fera une fois que le ribosome aura parcouru au moins 40 nt (Ingolia et al. 2014).

# INITIATION DE LA TRADUCTION

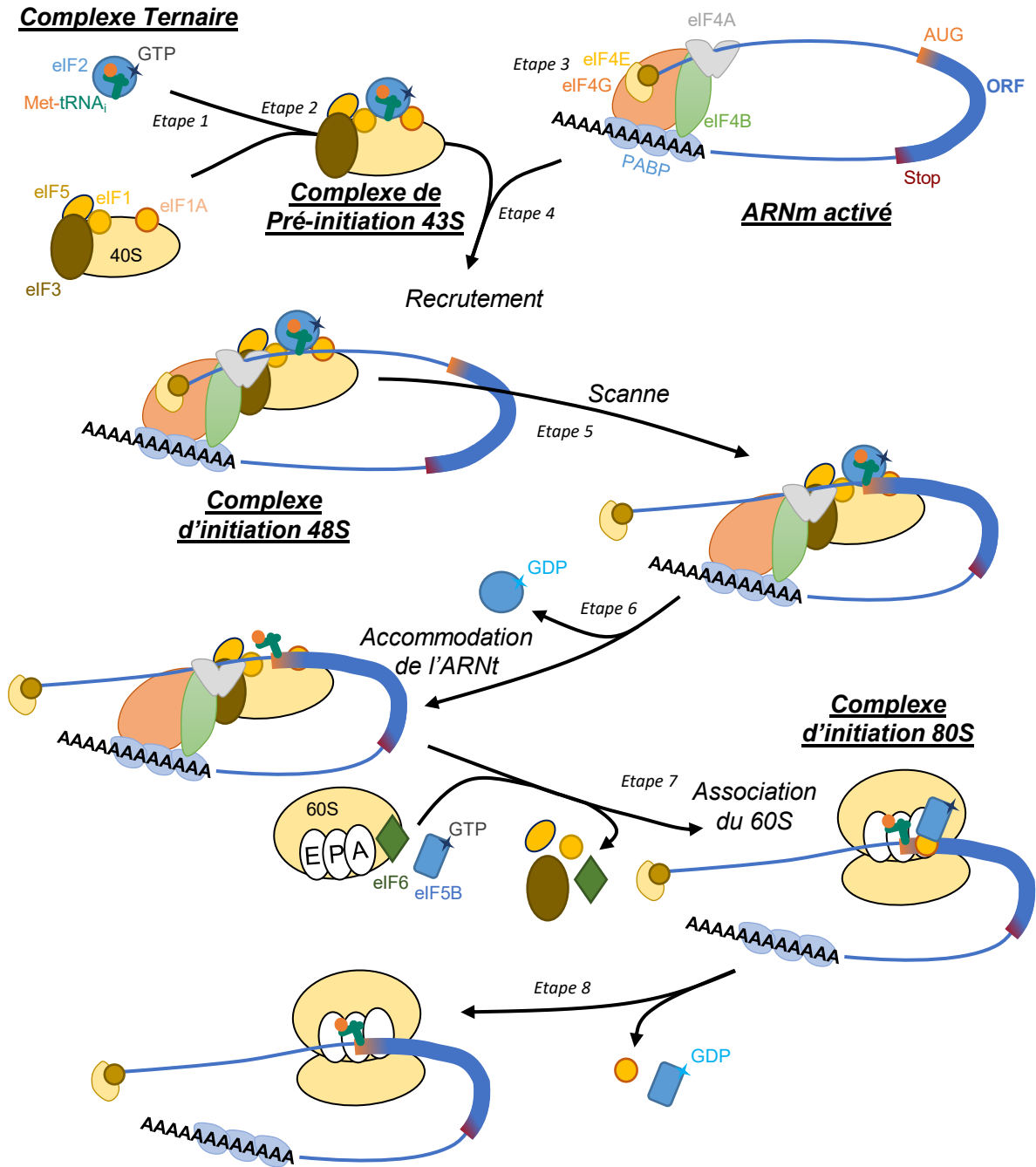


Figure 11 Initiation de la traduction

L'initiation de la traduction canonique peut être découpée en 8 étapes décrites précisément dans le texte. De manière résumée, l'ARNm est activé lors de sa circularisation à l'aide du complexe eIF4F. Cet ensemble est recruté au sein du complexe de pré-initiation 43S. Ce complexe d'initiation 48S va ensuite scanner la région 5'UTR de l'ARNm jusqu'au codon initiateur. Une fois l'AUG reconnu, la sous-unité ribosomale 60S est recrutée pour former le complexe 80S. L'élongation peut ensuite débuter. (A/P/E : sites accepteur, peptidique et d'export des ARNt)

## b. Initiation non-canonique de la traduction

En parallèle de ce système d'initiation canonique, d'autres systèmes permettent le recrutement d'un ARNm au sein de la machinerie de traduction. Il y a notamment les IRES (Internal Ribosome Entry Sites) qui permettent de recruter la machinerie directement sur le 5'UTR de l'ARNm sans utiliser la coiffe. Il existe aussi des systèmes passant par la coiffe, ou au moins l'extrémité 5', mais sans intervention d'eIF4E. Ces mécanismes sont développés dans la revue (Pelletier and Sonenberg 2019) dont voici un rapide résumé.

Les **IRES** ont d'abord été identifiés sur les ARNm viraux. Dans le cadre d'infection, ces IRES permettent à l'ARNm viral d'être traduit malgré l'inhibition de la synthèse protéique globale de la cellule infectée. Ces IRES viraux, présents dans le 5'UTR de l'ARNm, arborent des structures qui vont permettre le recrutement de facteurs protéiques nommés **ITAF** (IRES trans-acting factors) de la cellule hôte. Quatre familles d'IRES viraux sont identifiées et classifiées selon les structures et les ITAFs recrutés (Tableau 3) (Mailliot and Martin 2018; Yang and Wang 2019). Le type I est représenté par les IRES de *Poliovirus* (PV), pouvant recruter l'ensemble des facteurs d'initiation sauf eIF4E, *via* une interaction avec eIF4G. Le ribosome est alors recruté dans le 5'UTR et nécessite ensuite de scanner l'UTR jusqu'au codon initiateur. Les types II représentés par les IRES d'EMCV (*Encephalomyocarditis virus*) recrutent également tous les facteurs d'initiation par des interactions avec eIF4G mais amènent directement le ribosome au niveau du codon initiateur. Les types III d'IRES de HCV (*Hepatitis C Virus*) n'ont besoin que de quelques eIF dont eIF2, eIF3 et eIF5 pour recruter la sous-unité 40S directement à l'AUG. Enfin, la classe IV d'IRES représentée par le CrPV (*Cricket Paralysis Virus*) ne nécessite aucun eIF et recrute directement les sous-unités ribosomales et facteurs d'élongation au codon initiateur AUG ou même non-AUG.

Tableau 3 : Classes d'IRES viraux		
Classe d'IRES	ITAF requis	Virus type
I	eIF3, eIF1A, eIF1, eIF5, eIF2 eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF5B	<i>Poliovirus</i> (PV)
II	eIF3, eIF1A, eIF1, eIF5, eIF2 eIF4G, eIF4A, eIF4B, eIF5B	<i>Encephalomyocarditis Virus</i> (EMCV)
III	eIF2, eIF3, eIF5	<i>Hepatitis C Virus</i> (HCV)
IV	eEF2, eEF1A, ARNt	<i>Cricket Paralysis Virus</i> (CrPV)

Des IRES cellulaires ont ensuite été mis en évidence. Cependant, aucune structure ou séquence consensus n'est encore identifiée. Ces IRES cellulaires présents dans des 5'UTR longs et structurés sont identifiés par leur capacité à traduire un ARNm malgré un stress cellulaire

bloquant la traduction globale de la cellule et par le biais de systèmes rapporteurs bicistroniques (Yang and Wang 2019). En revanche, les ITAFs régulant ces IRES cellulaires peuvent être identifiés. Godet et ses collaborateurs ont notamment récapitulé l'implication de ces ITAFs, leurs cibles, leurs stimuli induisant la traduction des cibles et leur rôle physio-pathologique (Godet et al. 2019). Le facteur de traduction DAP5/p97/NAT1 (Death Associated Protein ; novel APOBEC-1 target no. 1) fait notamment partie des ITAFs utilisés dans le cadre d'IRES cellulaires dont nous reparlerons (Henis-Korenblit et al. 2000; Pelletier and Sonenberg 2019). Il s'agit d'un homologue d'eIF4G tronqué dans sa partie N terminale, qui ne contient alors pas les domaines de fixation à eIF4E et PABP. Les facteurs d'initiation canonique eIF3, eIF4A, eIF4G et eIF5B sont également impliqués dans la traduction d'IRES cellulaires (Spriggs et al. 2009).

D'autres mécanismes d'initiation non canoniques ont été aussi décrits. Ainsi, une modification épigénétique N6-méthyladenosine (m6A) peut participer au recrutement du facteur eIF3 sur des ARNm spécifiques, ceci sans participation du complexe eIF4F (Meyer et al. 2015; Coots et al. 2017). De plus, des initiations dépendantes de la coiffe, mais eIF4E-indépendantes, sont possibles. En effet, la sous-unité eIF3d est capable de lier la coiffe d'ARNm et le facteur DAP5 pour recruter le complexe d'initiation (Parra et al. 2018). C'est également le cas *via* le nCBC qui fixe la coiffe dans le noyau, participant à l'exportation de l'ARNm dans le cytoplasme et recrute le premier complexe d'initiation en s'associant à eIF3 et eIF4G (Mars et al. 2021). Également, des peptides notamment viraux fixent des extrémités 5' non coiffées et recrutent le complexe d'initiation par des interactions avec eIF4G (Leen et al. 2016).

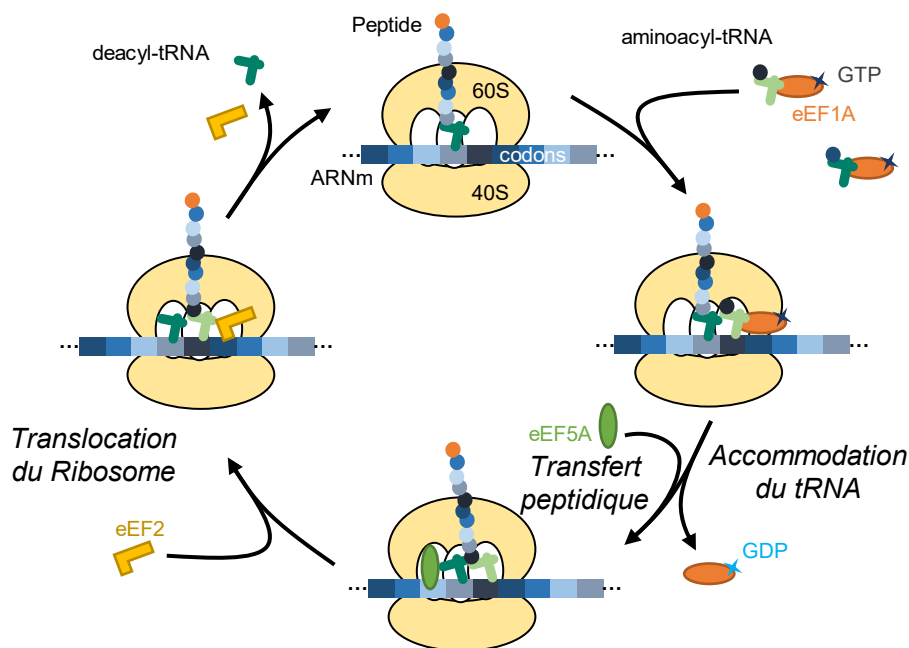
### **c. Elongation de la traduction**

L'étape d'élongation du peptide est un cycle de différentes conformations du complexe 80S, impliquant peu de facteurs d'élongation eEF (eukaryotic Elongation Factor). Illustrées en Figure 12, les étapes de l'élongation sont présentées dans la revue (Dever et al. 2018). Aléatoirement, un aminoacyl-ARNt associé à eEF1A-GTP se place dans le site A du ribosome. Si le codon de l'ARNm et la région anti-codon du ARNt ne correspondent pas, rien de particulier ne se passe et le ARNt finit par s'enlever pour être remplacé par un autre. Si le codon/anti-codon correspond, alors eEF1A va hydrolyser son GTP pour accommoder le ARNt au site A. Ensuite, aidée par le facteur eEF5A, l'activité peptidyl-transférase de la grande sous-unité ribosomale permet la liaison peptidique du peptide en cours d'élongation porté par le peptidyl-ARNt du site P vers l'acide aminé apporté en site A. L'ARNt du site P devient alors un déacyl-ARNt et le ARNt du site A devient le nouveau peptidyl-ARNt. eEF2, dont la structure

mime un ARNt, vient alors dans l'espace accepteur du ribosome pour procéder à la translocation de l'ensemble, décalant les ARNt d'un site. Le déacyl-ARNt en site E quitte alors le complexe et un nouveau ARNt peut entrer dans le site A. Il est important de noter que ce système est très précis, le face-à-face codon/anti-codon ne laisse que très peu de chance d'erreur. Cependant, la balance entre fidélité et vitesse d'exécution n'est pas forcément équilibrée (Wohlgemuth et al. 2011). En culture de cellules humaines et de souris, la vitesse d'élongation est estimée à 240aa/min soit environ 26kDa/min (Argüello et al. 2018). Des ARNt peu nombreux vont pouvoir rester plus longtemps dans le site A et augmenter leur chance de déclencher l'hydrolyse. Si le ARNt ne correspond pas au codon, une erreur peut apparaître.

En parallèle, le facteur eEF1A est rechargé par sa GEF, eEF1B (Le Sourd et al. 2006) et les ARNt sont de nouveau associés à leur acide aminé correspondant, par les Aminoacyl-ARNt synthétases (Rubio et al. 2020).

## ELONGATION DE LA TRADUCTION

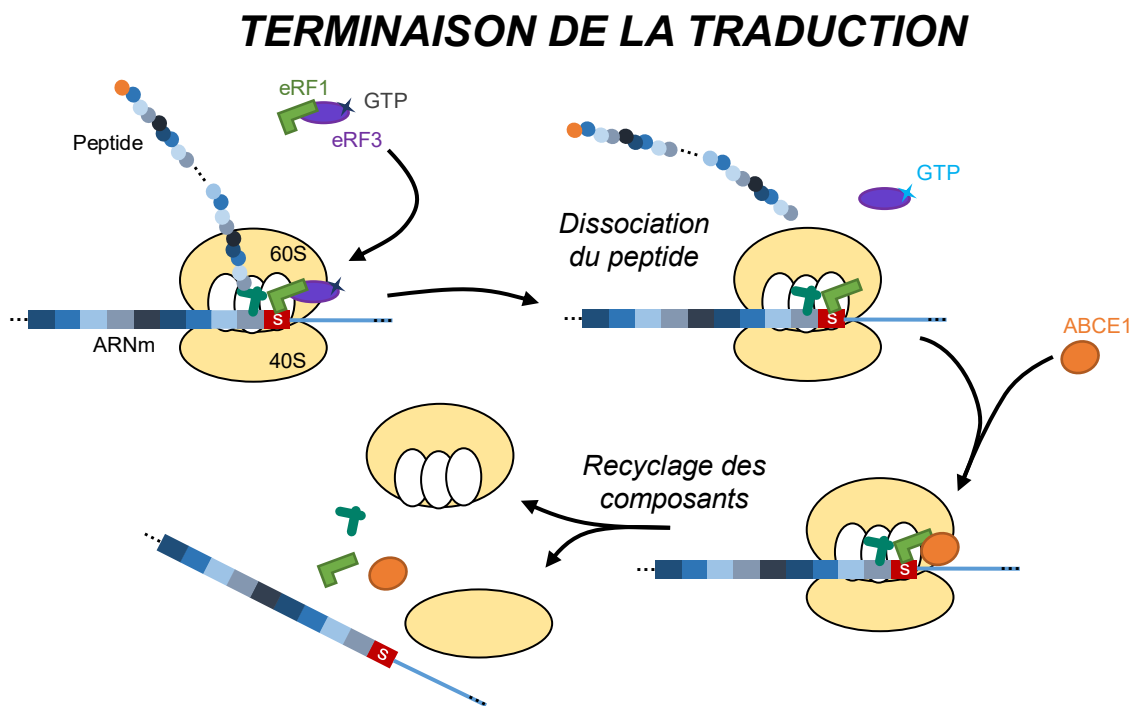


*Figure 12 Elongation de la traduction*

*L'élongation du peptide lors de la traduction consiste en un cycle répété à chaque codon de l'ARNm. Les étapes sont détaillées dans le texte. De manière résumée, le codon en cours de lecture au site accepteur du ribosome est reconnu par l'anticodon du ARNt correspondant. Après accommodation du ARNt valide, l'activité peptidyl-transférase du ribosome est activée permettant d'associer le peptide au nouvel acide aminé. Ensuite, le ribosome est transloqué au codon suivant et redémarre un cycle.*

#### d. Terminaison, Recyclage et Ré-initiation

Une fois que le ribosome arrive au niveau du codon stop, la terminaison débute à l'aide des facteurs de terminaison eRF (eukaryotic Release Factor) (Figure 13) (Hellen 2018). eRF1 mime lui aussi un ARNt dans sa structure et est amené par eRF3-GTP. Si eRF1 reconnaît un codon stop, il induit alors l'hydrolyse du GTP d'eRF3 qui permet alors la libération du peptide produit. Ensuite, le facteur ABCE1 est recruté sur eRF1 et va induire le recyclage des éléments du complexe 40S/60S/ARNm.



*Figure 13 Terminaison de la traduction*

*La terminaison de la traduction se déroule à la reconnaissance d'un codon stop par les facteurs de terminaison qui induisent alors la libération du peptide produit. Un dernier facteur vient alors désassembler le reste du complexe qui peut alors être recyclé pour un prochain cycle de traduction.*

Des phénomènes de ré-initiation sont également possibles sans le désassemblage complet de la machinerie. Dans les cas des uORF relativement petits (sORF – short ORF), une terminaison a rapidement lieu après l'initiation et il semblerait que les facteurs d'initiations resteraient liés un certain temps à la sous-unités 40S avant d'être éjectés (Pöyry et al. 2004). S'ils restent suffisamment longtemps, ils peuvent ainsi permettre une ré-initiation directement sur l'AUG qui suit l'uORF (Kozak 2001). De même, le modèle de circularisation de l'ARNm grâce aux liaisons entre le 5' et le 3'UTR permettrait de faciliter le transfert d'un ribosome terminant un tour de traduction vers une nouvelle initiation. Alekhina et ses collaborateurs

démontrent notamment que ce modèle ne stimule la traduction qu'après au moins un tour de traduction et est dépendant de la taille des 5' et 3'UTR ainsi que de la queue poly(A) (Alekhina et al. 2020).

### 3. Régulations de la traduction

Cette partie décrit les éléments cis-régulateurs intrinsèques des ARNm leur permettant une régulation de leur traduction spécifique, ainsi que les régulations des acteurs de la traduction modifiant leur activité traductionnelle, principalement par deux voies de signalisation.

#### a. Eléments cis-régulateurs intrinsèques des ARNm

Les ARNm possèdent des motifs, des structures ou encore des modifications chimiques qui permettent de réguler leur traduction, leur stabilité ou leur localisation. Les motifs et les structures sont définis par une séquence de nucléotides qui peut être reconnue par différents RBPs. Ces éléments sont présents notamment sur l'ensemble de la séquence de l'ARNm et principalement au sein des UTR (Leppek et al. 2018). Présentés par la Figure 14, nous allons ainsi voir certains de ces éléments potentiels d'un ARNm, impliqués dans l'initiation de la traduction canonique et non canonique de l'ORF principal, ou de petits ORF supplémentaires, ainsi qu'impliqués dans la stabilité des ARNm.

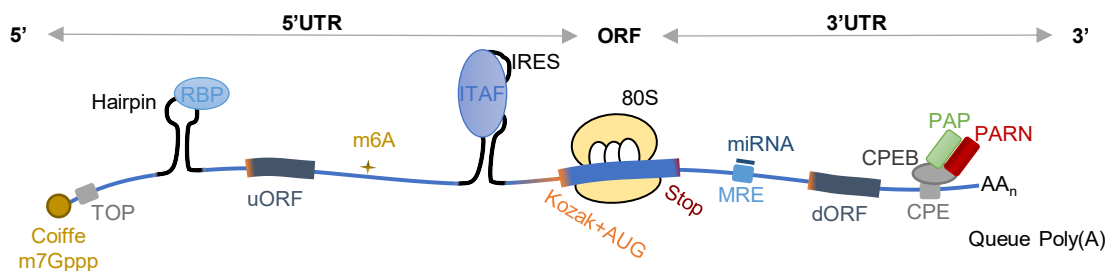


Figure 14 Eléments de régulations intrinsèques à l'ARNm présentés dans l'introduction

Un ARNm est composé d'une région codante (ORF) et de régions non codantes (5' et 3'UTR). Un ARNm présente de nombreux éléments pouvant influencer sa traduction. La séquence Kozak et l'AUG régulent ainsi le début de la séquence codante. La maturation de l'ARNm permet notamment la fixation d'une coiffe et la polymérisation de sa queue poly(A) participant à l'initiation de la traduction. L'ARNm peut posséder également des motifs au sein de sa séquence tels que les motifs TOP, MRE ou CPE qui sont alors ciblés par diverses protéines de liaison à l'ARNm. Des structures peuvent également être présentes comme les hairpin ou les IRES et recrutent aussi des protéines spécifiques qui modulent alors la traduction de l'ARNm. Des modifications épigénétiques sont également possibles. Enfin de petits ORF sont possibles au sein des UTR. Chacun de ces éléments sont présentés plus en détails dans le texte de ce manuscrit. (TOP : terminal oligopyrimidine ; RBP : RNA binding protein ; u/dORF : upstream/downstream open reading frame ; IRES/ITAF : internal ribosome entry site – transacting factors; MRE : miRNA response element ; CPE/CPEB : cytoplasmic polyadenylation element – binding protein ; PAP: poly(A)polymerase ; PARN : poly(A)ribonuclease)

#### i. Eléments pour réguler l'initiation de la traduction

Lors de l'initiation de la traduction, le **codon initiateur 'AUG'** d'un ARNm doit être efficacement reconnu par la machinerie de traduction dont le Met-ARN<sub>t</sub>. Pour cela, le contexte nucléotidique est important. Dans les années 1980, le **motif Kozak** a été identifié comme étant le contexte optimal pour la reconnaissance du codon initiateur. Il s'agit d'une purine (Adénine ou Guanine) en position -3 et une Guanine en +4 (l'Adénine de l'AUG étant le n°1). Cependant, sur l'ensemble des ARNm, le contexte peut varier et cela permet de réguler l'efficacité de la traduction d'un ORF. En effet, ce contexte optimal n'est pas forcément le plus conservé (Hernández et al. 2019). Les nucléotides autour de l'AUG vont permettre des contacts avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF2 $\alpha$ , eIF1, eIF1A et la protéine ribosomale rpS26. Ces contacts favoriseront ou non la reconnaissance du codon initiateur et par conséquent la synthèse de la protéine. De même, le codon initiateur peut varier (Kearse and Wilusz 2017). Le profilage des ribosomes et des systèmes rapporteurs met en évidence des codons initiateurs différents du 'AUG' canonique parfois associé à des facteurs de traduction et ARN<sub>t</sub> non-canoniques. L'utilisation de ces codons non-AUG semble notamment favorisée dans des conditions de stress cellulaire et associée à une initiation de la traduction non-canonique. C'est notamment le cas du facteur d'initiation de traduction non canonique DAP5 dont le codon initiateur est un GUG (Smirnova et al. 2019) et dont la protéine participe en tant qu'ITAF à sa propre traduction par initiation non-canonique de type IRES ou coiffe-dépendante\_eIF4E-indépendant en condition de stress (Lieberman et al. 2015; Parra et al. 2018).

L'ARNm possède des structures qui participent à la régulation de sa traduction en recrutant des activateurs ou inhibiteurs de la traduction. C'est le cas des **IRES** décrits ci-dessus, qui recrutent les ITAF (DAP5, eIF3, etc) et ainsi la machinerie de traduction. Un cas extrême d'ARNm nécessitant ces systèmes de traduction coiffe-indépendante sont les ARN circulaires (circARN) (Prats et al. 2020). Produit à partir des introns épissés lors de la maturation de l'ARNm, un circARN ne possède pas de coiffe ou d'extrémité 3' impliquant des initiations de traduction interne à l'ARN. D'autres structures stables peuvent être présentes au sein des UTR. La structure en elle-même peut inhiber, ou du moins réduire, la translocation du ribosome le long de l'ARNm. Un ARNm le plus linéaire / déstructuré facilitera sa traduction. Les structures de type « hairpin » (portion d'ARN double brin interne à l'ARNm, en forme d'épingle à cheveux) peuvent aussi recruter des RBP et agir sur la machinerie. C'est notamment le cas de l'IRE (Iron Response Element) qui permet la fixation de l'IRP (Iron Response Protein). Cette protéine est active en présence de Fer dans la cellule et sa fixation sur un ARNm portant l'IRE



(notamment celui codant la ferritine, le transporteur de fer) va inhiber sa traduction, réduisant ainsi l'importation de Fer dans la cellule.

L'initiation de la traduction est également régulée par la région 3'UTR. Un **motif CPE** (Cytoplasmic Polyadenylation Element) permet le recrutement d'un système de contrôle de la longueur de la queue poly(A) au sein du cytoplasme (Kronja and Orr-Weaver 2011). Le CPE est fixé par la protéine CPEB (Cytoplasmic Polyadenylation Element-Binding Protein) qui elle-même fixe une poly(A)-ribonuclease (PARN) et/ou une poly(A)-polymérase (PAP). L'ovocyte non mature du xénope présente des ARNm non polyadénylés engendrés par la présence de la PARN. En réponse à la progestérone, CPEB est phosphorylée, perdant son interaction avec PARN, et recrute PAP pour polyadényler l'ARNm. C'est donc la polyadénylation des ARNm, et notamment de la cycline B, qui est nécessaire pour permettre la maturation de l'ovocyte de xénope. Nous discuterons notamment de ce contrôle plus tard. La queue **poly(A)** est alors un élément de régulation effectif où l'état de la queue poly(A) est couplé à l'efficacité traductionnelle des ARNm (Subtelny et al. 2014). Cela est notamment montré chez l'ovocyte de xénope comme précisé ci-dessus mais aussi dans les cycles embryonnaires précoces de Zebrafish. Cependant Park et ses collaborateurs démontrent en mitose somatique de cellules humaines qu'une variation de taille seulement autour des 20 premières adénines corrèle avec l'efficacité traductionnelle de messagers (Park et al. 2016).

Des motifs de séquence participent aussi à la traduction d'ARNm spécifiques. Les **5'TOP-ARNm** possèdent en 5' un motif TOP (Terminal OligoPyrimidine) formé d'une cytosine suivie de 4 à 15 pyrimidines. Ces 5'TOP-ARNm codent notamment pour des composants de la machinerie de traduction comme les facteurs de traduction ou les protéines ribosomales. Ce motif TOP est souvent associé à l'inhibition de la traduction de ces ARNm en conditions de stress cellulaire, cependant certains acteurs semblent avoir une double casquette activant ou inhibant la traduction selon les conditions (Meyuhas and Kahan 2015; Cockman et al. 2020). En effet, dans le cycle cellulaire somatique de cellules humaines étudié par Park et ses collaborateurs, un groupe d'ARNm montre une réduction de leurs queues poly(A). Certains sont associés à une baisse de leur traduction, en revanche, ceux contenant ces motifs TOP maintiennent leur traduction effective (Park et al. 2016).

La traduction de l'ORF principal de l'ARNm est parfois accompagnée de petits ORF supplémentaires. Il y a ainsi des **uORF** (upstream ORF) sur le 5'UTR et des **dORF** (downstream ORF) dans le 3'UTR. Les uORF ont tendance à inhiber la traduction de l'ORF

principal. Les uORF qui ont ainsi leur codon initiateur détecté en premier initient la traduction et réduisent le nombre de ribosomes atteignant l'ORF principal. C'est le cas des uORF les plus connus de GCN4 de levure et son homologue mammifère ATF4 qui possèdent même plusieurs uORF inhibant l'initiation de l'ORF principal (Renz et al. 2020). Un stress cellulaire va induire l'absence d'initiation des uORF et permettre la traduction de l'ORF principal de ce facteur de transcription de réponse aux stress. Aussi, la lecture d'un uORF peut induire la dégradation de l'ARNm par NMD si un EJC se trouve suffisamment rapproché (Aliouat et al. 2019). Parfois, l'uORF est superposé à l'ORF principal, c'est le cas de l'ARNm d'eIF1A chez le rat (Andreev et al. 2018) où, en conditions de stress et notamment de privation d'oxygène ou de glucose, l'uORF est dans ce cas préférentiellement traduit et réduit ainsi la traduction d'eIF1A. Les petits uORF (sORF) énoncés plus tôt facilitent quant à eux la réinitiation à l'ORF principal (Pöyry et al. 2004). De même, les dORF activent la traduction de l'ORF principal *via* la ré-initiation lors de la circularisation de l'ARNm (Wu et al. 2020). eIF1B possède un dORF qui n'est notamment plus lu en condition de stress (privation d'oxygène et de glucose) réduisant alors la traduction de l'ORF principal d'eIF1B (Andreev et al. 2018). La diminution d'expression d'eIF1A et eIF1B, avec leur uORF et dORF respectifs, participent à la réduction de la traduction en conditions de stress.

## ii. Éléments de régulation de la stabilité de l'ARNm

Le contrôle de l'expression de la protéine finale passe aussi par la stabilité des ARNm. Notamment, des microARN non codants (**miARN**) ont des sites cibles de fixation **MRE** (miRNA Response Element) présents dans les 3'UTR d'ARNm. Ces miARN sont des ARN non codants simple brin, associés au complexe Dicer, qui vont ainsi interférer (ARNi - acide ribonucléique interférant) avec un ARNm cible inhibant sa traduction voire en déclenchant sa dégradation. Le principe est décrit dans (Hammond 2005; Iwakawa and Tomari 2015). L'inhibition voire la dégradation par NGD peut être induite lorsque la cible est partiellement complémentaire, et ralentie voire bloque l'avancée du ribosome. La dégradation passe cependant par le clivage de ce duplex ARN-ARN par l'enzyme AGO (argonaute) et déclenche ensuite la dégradation des fragments d'ARN. Ces miARN sont issus de transgènes, séquences répétées, séquences introniques (ou intron lui-même : « Mirtron »). Lorsqu'ils sont encodés par le génome de la cellule, ces miARN sont un contrôle physiologique des ARNm cibles. Les miARN peuvent également être encodés par un génome viral. Découvert chez *C. elegans*, le premier miARN contrôlait temporellement l'expression d'une protéine induisant la différenciation de cellules de l'embryon. Un ensemble de miARN a ensuite été aussi identifié

chez l'embryon de *C. elegans*, ce qui a mené au Prix Nobel de Physiologie et Médecine de 2006. Les ARNm peuvent posséder plusieurs MRE de miARN identiques ou différents. L'effet inhibiteur ne sera que plus stable. À l'inverse, un miARN peut cibler plusieurs ARNm, potentiellement impliqués dans les mêmes fonctions cellulaires. D'autres ARNi existent (short-hairpin-ARN, small-interfering-ARN, piwi-ARN) et passent également par le système Dicer. Le knock-out du système Dicer est létal chez la souris, signifiant l'importance de ce système dans le contrôle de la stabilité des ARNm. Evidemment les oncogènes, les répresseurs de tumeurs ou facteurs de différenciation sont des cibles de ce système d'ARNi. Dans des cas de cancers du sein, le miR337-3p a été identifié comme suppresseur de tumeur en ciblant l'ARNm de CDK1 qui favorise la progression tumorale (Kong et al. 2021). Ces systèmes d'ARNi sont couramment utilisés en laboratoire ou en pharmacologie afin de réduire la quantité de l'ARNm cible (Pushparaj et al. 2008). Concernant l'oursin, il est nécessaire ici de préciser que le système Dicer semble n'intervenir qu'à partir de 48h post-fécondation (Song et al. 2012). Des knockdowns d'ARNm avant cette période nécessitent alors l'utilisation de morpholino. Il s'agit d'un oligonucléotide possédant un squelette morpholine à la place des riboses et les uraciles sont remplacés par des thymines. Le morpholino est ainsi plus stable après fixation sur sa cible, empêchant le ribosome d'avancer le long de l'ARNm (Angerer and Angerer 2004).

Enfin, la stabilité de l'ARNm est aussi régulée par des modifications chimiques : l'**épitranscriptomique**. Plus de 330 modifications de résidus sont déjà répertoriées permettant de nombreuses variations d'un ARN (Modomics Database : (Boccaletto and Bagiński 2021)). Il peut s'agir d'ajout, de suppression ou d'échange de groupe chimique. La **coiffe** de l'ARNm est elle-même une modification chimique (N7-methylguanosine cap, m7GpppN, où pppN est l'extrémité 5' d'un oligo ARN), certainement la plus importante, permettant stabilité et traductibilité de l'ARNm. Une autre modification a été très étudiée : la N6-methyladenosine (**m6A**), très présente sur les ARNm et notamment les 3'UTR (Shengdong et al. 2015), est impliquée dans de nombreuses fonctions allant du développement embryonnaire pour la dégradation m6A-dépendante des ARNm maternels de l'embryon de Zebrafish, à l'infection virale (HIV et Influenza) en passant par la tumorigénèse (détaillé dans (Zhao et al. 2017) [Box1]). Grâce aux développements des techniques de détections, six autres modifications (pseudouridine Ψ, 5-methylcytidine m5C, N1-methyladenosine m1A, N4-acetylcytidine ac4C, ribose methylations Nm, N7-methylguanosine m7G) ont été particulièrement identifiées sur des ARNm de mammifères (Wiener and Schwartz 2021).

Tous ces éléments présents sur l'ARNm vont permettre un contrôle spécifique de la stabilité et/ou de la traduction de cet ARNm. La machinerie de traduction est elle aussi fortement contrôlée *via* des modifications post-traductionnelles et en particulier par des mécanismes de phosphorylation / déphosphorylation des protéines. La partie suivante illustre les voies principales qui agissent en amont de ces contrôles.

## **b. Voies de signalisation**

La plupart des facteurs de traduction peuvent être régulés pour leur disponibilité ou leur activité. Deux grandes voies de signalisation prennent part aux régulations : les voies mTOR (mechanistic Target Of Rapamycin) et MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases).

### **i. La voie mTOR**

La voie mTOR est une voie de régulation majeure au sein de la cellule et la voie de régulation principale de la synthèse protéique. En effet, cette voie de signalisation est à la croisée de réseaux d'intégration de signaux et participe à la régulation de nombreux processus (Figure 15) (Laplante and Sabatini 2012). Cette voie s'articule autour de deux complexes multi-protéiques (mTORC1 et mTORC2) formés autour de la Ser/Thr kinase mTOR. Le complexe **mTORC1** est ainsi composé de mTOR, raptor, deptor, mLST8, tti1/tel2 et pras40, tandis que mTORC2 est composé de mTOR, rictor, deptor, mLST8, tti1/tel2, Sin1 et protor. Le facteur deptor et le facteur spécifique pras40 sont des inhibiteurs de la kinase mTOR. Les facteurs spécifiques raptor et rictor sont des protéines d'échafaudage pour l'assemblage des complexes, la localisation et le ciblage des substrats. De même, tti1/tel2 participe à l'assemblage et la stabilité des complexes. Sin1 et protor, spécifiques de mTORC2 permettent l'interaction aux kinases cibles.

Des deux complexes, mTORC1 est le plus étudié. Ce complexe est notamment contrôlé en amont par Rheb (Ras homolog enriched in brain) qui, lié à un GTP, va stimuler l'activité kinase de mTORC1. Rheb est lui-même contrôlé par l'hétérodimère TSC1/2 (tuberous sclerosis 1 et 2) qui agit en tant que GAP sur Rheb, agissant alors négativement sur la voie mTORC1. De façon globale, mTORC1 participe au contrôle de l'homéostasie cellulaire. En effet, cette voie de signalisation permet d'intégrer des signaux exogènes et endogènes : de prolifération, de croissance, du statut métabolique et énergétique avec notamment la voie PI3K/PiP3/Akt qui va agir positivement sur mTORC1 par inactivation de TSC1/2 (Gingras et al. 1998; Zoncu et al. 2011; Laplante and Sabatini 2012). La voie mTOR peut également être contrôlée négativement en réponse aux stress cellulaires tels que l'hypoxie, les dommages à l'ADN ou le manque

d'énergie par le biais de l'activation de TSC1/2 (Laplane and Sabatini 2012; Sesma et al. 2017). Cette intégration des signaux permet en retour de réguler l'homéostasie cellulaire par le contrôle de plusieurs processus. mTORC1 participe notamment au contrôle du métabolisme en stimulant la synthèse lipidique ou la production énergétique liée au glucose ou mitochondriale (Csibi et al. 2014). À l'inverse, mTORC1 est inhibiteur de l'autophagie (Ode et al. 2021). mTORC1 est cependant inhibé dans le cadre de la quiescence cellulaire (Saba et al. 2021) et permet à l'opposé la prolifération ou la différenciation cellulaire (Lund-Ricard et al. 2020). En effet, la synthèse protéique est largement contrôlée par cette voie de signalisation comme nous le verrons en détails ci-après *via* le contrôle de la ribogénèse ou des facteurs de traduction (Ma and Blenis 2009; Laplane and Sabatini 2012; Nandagopal and Roux 2015).

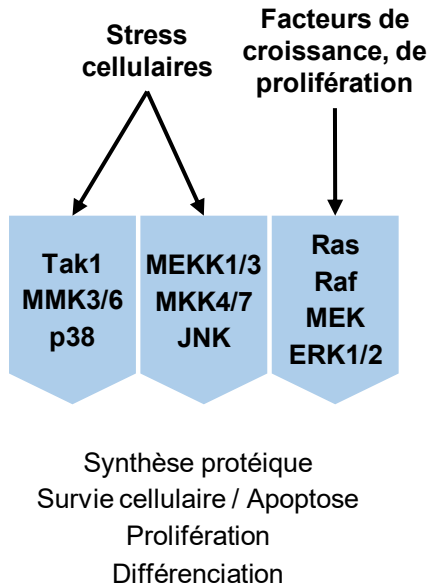
Le complexe mTORC2 est quant à lui moins étudié. Il va tout de même participer aux contrôles de la survie cellulaire en inhibant les pro-facteurs apoptotiques et en stimulant le métabolisme cellulaire. mTORC2 va également stimuler la prolifération et contrôler le cytosquelette en conséquence (Laplane and Sabatini 2012).

## ii. La voie MAPK

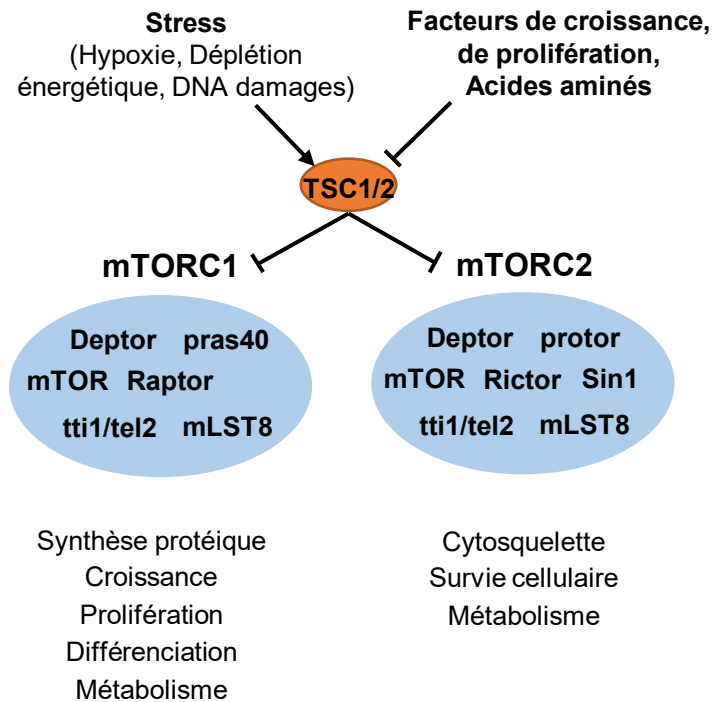
Les MAPK sont des Ser/Thr kinases impliquées dans de nombreux processus au sein de la cellule et agissent en cascade afin de spécifier les cibles (Figure 15). Trois cascades principales sont identifiées. La voie p38/MAPK faisant intervenir en cascade Tak1, MKK3/6 et p38, et la voie Junk avec la cascade MEKK1/3, MKK4/7 et JNK, interviennent notamment en réponse à des stress cellulaires et régulent l'apoptose et l'autophagie (Sui et al. 2014). La voie **MAPK/ERK** fait intervenir les kinases Ras, Raf, MEK, ERK1/2 et est principalement induite par des signaux de croissance ou de prolifération cellulaire. C'est notamment par cette voie MAPK/ERK que la synthèse protéique est contrôlée comme le verrons en détails ci-après (Kalous et al. 2018).

De plus, les deux voies de signalisation mTOR et MAPK/ERK se coordonnent avec des régulations croisées (Mendoza et al. 2011; Roux and Topisirovic 2018). L'importance de ces contrôles est mise en évidence dans les cas de dérégulations de ces voies et des acteurs ciblés qui conduisent à de nombreuses pathologies métaboliques (Laplane and Sabatini 2012), tumorales (El-Naggar and Sorensen 2018), neurologiques (Fernandopulle et al. 2021; Laguesse and Ron 2020) ou encore de régénérations (Lund-Ricard et al. 2020).

## Voies de signalisation MAPK



## Voies de signalisation mTOR



*Figure 15 Les voies de signalisation mTOR et MAPK*

Les voies de signalisation MAPK consistent en différentes cascades de kinases régulées en amont par les stress cellulaires et les signaux mitogéniques que reçoit la cellule. En aval, la prolifération, la différenciation cellulaire, l'apoptose et la survie cellulaire sont alors modulées. La voie mTOR se concentre autour de deux complexes spécifiques mTORC1 et mTORC2. Les stress et les facteurs mitogéniques vont contrôler ces complexes notamment par le biais de l'inhibiteur TSC1/2 (Tumour Suppressor Complex). Les deux complexes ont ensuite des cibles de régulations spécifiques. Les voies MAPK/ERK1/2 et mTORC1 sont les voies qui régulent principalement la synthèse protéique. Plus de détails sont présentés dans le texte et en Figure 16.

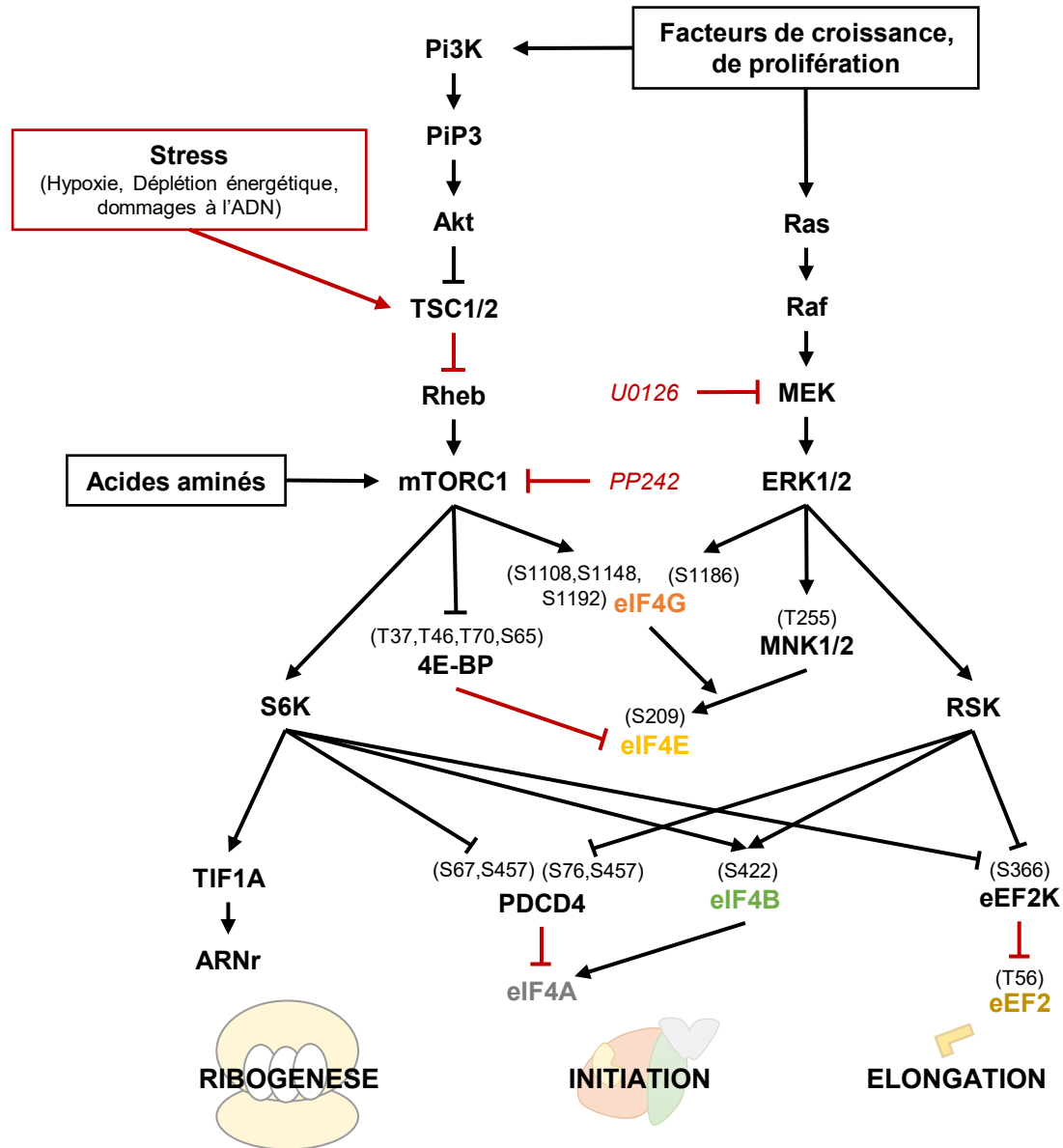


Figure 16 Régulations de la traduction par les voies mTOR et MAPK

La traduction est régulée à plusieurs niveaux, détaillés dans le texte, par les deux voies de signalisation mTORC1 et MAPK/ERK. Les deux voies de signalisations sont régulées par les signaux encadrés en amont. Les régulations activatrices et inhibitrices de la traduction sont affichées respectivement par les flèches noir et rouge. Les flèches à pointes indiquent une activation de la cible tandis que les flèches à extrémités plates indiquent une inhibition de la cible. PP242 et U0126 sont des drogues inhibitrices respectivement des voies mTOR et MAPK. Ces drogues ont notamment été utilisées dans le cadre de travaux de la thèse.

### c. Régulations des acteurs de la synthèse protéique

La synthèse protéique est un processus impliquant de nombreux acteurs et les deux voies de signalisation mTORC1 et MAPK/ERK régulent nombre de ces acteurs Figure 16. Des revues très complètes de ces régulations sont disponibles (Ma and Blenis 2009; Nandagopal and Roux 2015; Cormier et al. 2016; Kalous et al. 2018; Roux and Topisirovic 2018; Pelletier and Sonenberg 2019). Cette partie en extrait les aspects principaux et les résume dans le Tableau 4.

## **i. Acteurs de l'initiation**

### **eIF4E**

La protéine de liaison à la coiffe eIF4E est la cible de plusieurs régulations. L'assemblage du complexe eIF4F à partir d'eIF4E fixé à la coiffe d'ARNm est négativement régulé par une famille de répresseurs nommée 4E-BP (eIF4E Binding Protein). En effet, eIF4E possède des interactions particulières avec eIF4G qui peuvent être en compétition avec ces acteurs (Peter et al. 2015). eIF4E est souvent décrite comme une protéine en forme de gant de baseball avec une face ventrale du côté de la paume et à l'opposé la face dorsale. La coiffe est fixée au côté ventral d'eIF4E. Les interactions d'eIF4E avec ses partenaires sont médiées par un motif principal YXXXXLΦ (où Φ est un résidu hydrophobe) au sein d'eIF4G et des 4E-BP, qui sert de site de liaison au côté dorsal d'eIF4E. Plus largement, de nombreuses protéines ont finalement ce motif et la capacité de fixer eIF4E. Ce groupe d'acteurs est alors dénommé 4E-IP (eIF4E Interacting Protein) (Hernández et al. 2016; Gillespie et al. 2016).

Il existe trois familles d'eIF4E chez les eucaryotes : eIF4E1, eIF4E2 et eIF4E3 dont un seul gène de chaque famille chez l'oursin (Morales et al. 2006; Pelletier and Sonenberg 2019). La forme majoritaire est eIF4E1. La famille eIF4E2 (ou 4E-HP pour Homologous Protein) présente 30% d'identité avec la forme eIF4E1, est moins abondant, a moins d'affinité pour la coiffe et ne possède pas de site d'interaction avec eIF4G. La famille eIF4E3 chez l'Homme présente 29% d'identité avec eIF4E1, est la moins étudiée de par son expression dans des tissus spécifiques et a également moins d'affinité pour la coiffe que eIF4E1. eIF4E3 peut se fixer à eIF4G mais ne peut se fixer à 4E-BP malgré le motif principal YXXXXLΦ conservé (Pelletier and Sonenberg 2019). Concernant le facteur 4E-BP, les mammifères possèdent 3 isoformes (4E-BP1, 4E-BP2, 4E-BP3) tandis que l'oursin n'en possède qu'une.

4E-BP a été la première 4E-IP identifiée et nommée dans un premier temps PHAS-I (Phosphorylated Heat- and Acid-Stable protein induced by Insulin) de par sa phosphorylation en réponse à un traitement à l'insuline en cellules humaines (Pause et al. 1994; Lin et al. 1994). De plus, cette phosphorylation permet alors d'activer la synthèse protéique. En effet, en condition non stimulée, 4E-BP est sous une forme hypo-phosphorylée avec deux sites de phosphorylation par mTOR (Thr37 et Thr46 chez l'Homme). Ces deux phosphorylations sont ensuite nécessaires pour permettre les deux phosphorylations supplémentaires (Ser65 et Thr70) en condition de stimulation de la voie mTOR (Gingras et al. 1999). En réponse à l'insuline, la voie Pi3K/Akt/mTOR est activée et le complexe mTORC1 va phosphoryler 4E-BP sur les



Ser65 et Thr70 pour l'inhiber et faire passer 4E-BP d'une forme hypo-phosphorylée à une forme hyper-phosphorylée (Gingras et al. 1998). Les phosphorylations pT37 et pT46 séquestrent le motif de liaison réduisant son interaction avec eIF4E mais cette conformation n'est pas stable et ne permet pas la libération d'eIF4E. C'est alors les phosphorylations pS65 et pT70 qui vont stabiliser la structure et complètement inhiber la liaison à eIF4E (Bah et al. 2015). Ce contrôle est notamment un des éléments principaux de la désinhibition de la traduction chez l'œuf d'oursin après la fécondation (Cormier et al. 2001). Le facteur 4E-BP y est dégradé en plus d'être inhibé (Salaün et al. 2003), permettant la synthèse de protéine et notamment de la cycline B chez l'oursin (Chassé et al. 2016). Chez des fibroblastes embryonnaires de souris, l'inhibition de la voie mTOR par la drogue Torin, dérègle la traduction d'ARNm et particulièrement les TOP-ARNm (Thoreen et al. 2012).

Parmi les 4E-IP autres qu'eIF4G ou 4E-BP, il y a 4E-T et la maskine. Le facteur 4E-T est une protéine navette permettant le transport d'eIF4E au noyau *via* le système Importin- $\alpha\beta$  (Dostie et al. 2000). Au noyau, eIF4E participe à la maturation des ARNm néo-transcrits et semble permettre des maturations spécifiques et différentes de celles permises par les nCBP20/80 (Mars et al. 2021). Au noyau aussi, le facteur eIF4E est inhibé par une fraction de 4E-BP1 s'y trouvant (Rong et al. 2008). Chez le xénope, 4E-T a également été montré comme impliqué dans le cadre d'inhibition de la traduction d'ARNm par agrégation au sein de P-bodies que nous avons vu plus tôt. 4E-T permet alors une circularisation de l'ARNm (non traductible ici) en faisant se rejoindre eIF4E coté 5' et CPEB coté 3' de l'ARNm (Minshall et al. 2007). De la même manière, chez le xénope encore, la maskine permet la circularisation (non traductible aussi) de l'ARNm cycline B notamment, et permet sa localisation au fuseau mitotique, en maintenant une queue poly(A) courte (Groisman et al. 2000).

La liaison de la coiffe d'un ARNm peut également être régulée par la voie MAPK *via* les kinases MNK1/2 (Kalous et al. 2018). En effet, la voie MAPK/ERK active par phosphorylation les kinases MNK1/2. Ces kinases vont pouvoir alors s'associer à l'extrémité C terminale d'eIF4G pour alors stimuler par phosphorylation eIF4E en Ser209 (numérotation chez l'Homme) (Pyronnet et al. 1999). Cette phosphorylation va ainsi favoriser l'affinité d'eIF4E pour la coiffe et influencer la traduction d'acteur du cycle cellulaire, de la survie cellulaire ou la mobilité cellulaire (Proud 2015).

Le facteur eIF4E est également régulé par ubiquitination. En cellules humaines, une ubiquitination en Lys159 n'altère pas sa capacité à se lier à la coiffe de l'ARNm mais altère sa

phosphorylation ainsi que sa liaison à eIF4G (Murata and Shimotohno 2006). Cette ubiquitination mène de plus à sa dégradation.

## **eIF2**

Le facteur eIF2 $\alpha$  du complexe ternaire est également une cible privilégiée. En effet, plusieurs kinases dont GCN2 (General Control Nonderepressible 2) peuvent phosphoryler ce facteur en Ser52 (numérotation chez l'Homme). La phosphorylation d'eIF2 $\alpha$  induit alors sa séquestration par eIF2B (GEF de eIF2 $\alpha$ ) et l'empêche alors de participer à l'initiation de la traduction. GCN2 est notamment un senseur de la disponibilité d'acides aminés de par sa fixation à des ARNt non chargés qui induisent alors son activation. Il permet ainsi d'intégrer un signal de stress par manque d'acides aminés (Hernández et al. 2010), également chez les plantes (Sesma et al. 2017). Dans un contexte embryonnaire, l'augmentation d'aminocyl-ARNt à la fécondation chez l'oursin participe à l'inactivation de GCN2 et ainsi la déphosphorylation d'eIF2 $\alpha$  nécessaire à la synthèse protéique (Costache et al. 2012). La déphosphorylation du facteur eIF2 $\alpha$  est également nécessaire à la synthèse protéique de l'ovocyte de souris (Alves et al. 2009), xénope (Lee et al. 2014) ou encore la drosophile (Krauchunas et al. 2012).

De plus, la GEF eIF2B peut elle-même être inhibée par phosphorylation par GSK3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ). Récemment, il a été montré chez *S. cerevisiae* qu'une privation en nutriment induit l'agrégation en filaments d'eIF2B, indépendamment de GCN2, et inhibe ainsi son activité sur eIF2 $\alpha$  et par conséquent la traduction (Nüske et al. 2020).

## **eIF4G**

La famille de protéines d'échafaudage eIF4G est composée de trois membres chez les eucaryotes. Les membres eIF4GI et eIF4GII dont je fais référence dans ce manuscrit sous le nom général de eIF4G peuvent fixer les protéines PABP, eIF4E, eIF4A, eIF3 et MNK. Le troisième membre DAP5/p97/NAT1, impliqué dans les initiations non-canoniques, ne possède pas les sites de fixations à eIF4E et PABP (Pelletier and Sonenberg 2019). Un seul gène codant eIF4G et un codant DAP5 sont présents chez l'oursin (Morales et al. 2006).

La protéine eIF4G est régulée par de multiples phosphorylations. Les phosphorylations des résidus Ser1108, S1148 et S1192 sont sensibles à la voie mTOR (Raught et al. 2000) et participent à la régulation de ses interactions. Une phosphorylation en Ser1186 en réponse à PKC qui active la voie MAPK/ERK permet l'accessibilité de MNK1/2 sur son C-terminale

(Dobrikov et al. 2011) ou encore la Ser1232, phosphorylée en mitose par le complexe CycB/CDK1 semble réduire l'activité hélicase d'eIF4A (Dobrikov et al. 2014). De plus, il a été montré chez l'oursin, l'apparition et disparition de multiples isoformes en réponse à la fécondation qui n'apparaissent pas sensibles à l'inhibition de la voie mTOR, impliquant des régulations autres (Oulhen et al. 2007). Récemment, eIF4G s'est révélé sensible au protéasome par le biais de motifs PEST (séquences enrichies en proline, glutamate, serine et thréonine) impliquant potentiellement l'ubiquitination dans ce système (Alard et al. 2019). D'autres isoformes d'eIF4G n'impliquant pas de modifications chimiques ont également été identifiées. Il y a notamment plusieurs promoteurs, des épissages alternatifs mais aussi l'utilisation de codons non-AUG qui permettent la production de multiples variants (Coldwell et al. 2012). De plus, eIF4G possède des sites de clivage par la Caspase 3, participant à l'arrêt définitif de la traduction en cas de mort cellulaire par apoptose (Coldwell et al. 2012).

### **eIF4A**

L'ARN hélicase eIF4A permet la déstructuration des séquences ARN grâce à son changement de conformation couplé à une hydrolyse d'ATP. Cette activité, stimulée en présence des facteurs eIF4G et principalement eIF4B, est quant à elle inhibée par fixation de PDCD4 (Programmed Cell Death protein 4). Cette fixation bloque alors le changement de conformation d'eIF4A et inhibe alors son activité hélicase (LaRonde-LeBlanc et al. 2007). Cependant, les voies mTOR et MAPK convergent, respectivement *via* S6K (S6 kinase) et RSK (ribosomal S6 kinase), pour inhiber PDCD4 par phosphorylation en Ser67 et Ser457 et induisent alors son ubiquitination et dégradation par la suite (Dorrello et al. 2006). La perte de PDCD4 permet l'augmentation de la traduction d'une sélection d'ARNm liés au cycle cellulaire, la survie cellulaire ou encore la migration cellulaire (Cuesta and Holz 2016).

Deux paralogues d'eIF4A sont présents chez les mammifères : eIF4A1 et eIF4A2 (Pelletier and Sonenberg 2019). Ces deux paralogues possèdent la même fonction d'hélicase mais sont détectés dans des contextes cellulaire différents et avec des ARNm cibles spécifiques (Lu et al. 2014). eIF4A1 est exprimé en phase de croissance cellulaire tandis qu'eIF4A2 est exprimé lors d'arrêts du cycle. Chez l'oursin, un seul gène codant pour eIF4A est présent (Morales et al. 2006).

### **eIF4B**

Le facteur eIF4B, potentialisateur de l'hélicase eIF4A, possède comme eIF4G un site de clivage par la Caspase 3. En plus de cela, eIF4B possède plusieurs sites de phosphorylations

dont la Ser422 participant à la stimulation de l'association avec eIF3. Ce site est ciblé par les RSK et S6K (Shahbazian et al. 2006). Empêcher cette phosphorylation par l'utilisation de mutants non phosphorylables, impacte l'interaction avec eIF3 et réduit la traduction d'ARNm. L'inhibition de la production d'eIF4B par ARNi inhibe la traduction d'ARNm ayant des 5'UTR structurés dont des ARNm de facteurs de survie et prolifération cellulaire (Shahbazian et al. 2010). Il existe également un paralogue à eIF4B : eIF4H. Ce facteur eIF4H présente les mêmes capacités de potentialisateur de l'hélicase malgré une séquence peu identique. Plus de détails concernant eIF4B et eIF4H, leur activité, leur régulation et leur contrôle de la traduction spécifique seront donnés dans le cadre du quatrième chapitre des résultats.

## **PABP**

Le facteur PABP favorise la traduction d'un ARNm par le fait de le circulariser en faisant le lien entre la queue poly(A) et eIF4G. Cette fonction du facteur PABP peut également être modulée. En effet, la protéine Paip2 (PABP-interacting protein) fixe PABP sur ses domaines de liaison à l'ARN, empêchant alors la circularisation de l'ARNm.

### **ii. Les ribosomes**

Comme énoncé dans la partie précédente, la voie mTOR-S6K participe à la régulation de la ribogénèse. En effet, la S6K stimule par phosphorylation des facteurs de transcription (UBF et TIF1A) induisant la transcription des ARNr (acide ribonucléique ribosomal) *via* l'ARN polymérase I (Pol I) (Saba et al. 2021). Aussi, dans le cas d'un stress subi par la machinerie de traduction (pause d'élongation, limitation en ARNt, ARNm tronqués, etc.), un signal est déclenché par la voie PI3K-mTOR. Celle-ci active la traduction du facteur de transcription E2F1 pour produire le facteur cMyc qui contrôle alors l'expression des éléments de la ribogénèse (Vadivel G. and Fåhraeus 2018).

De récentes études révèlent également que les ribosomes possèdent des éléments de contrôle autres que la régulation de leur production. Ainsi, certains ARNr possèdent des portions spécifiques à une espèce en termes de séquences et de taille nommées « expansions de segment ». Ces expansions permettent le ciblage et la traduction efficace d'ARNm particuliers (Leppek et al. 2020). De plus, des modifications post-transcriptionnelles des ARNr telles que des 2'O-méthylations, participent à la traduction spécifique de certains ARNm. L'altération de ces modifications résulte en un défaut de traduction de ces ARNm et l'obtention des phénotypes associés à la perte des ARNm des acteurs spécifiquement (Jansson et al. 2021). Cette hétérogénéité des ribosomes permet alors la mise en place de ribosomes spécialisés.

### iii. Acteurs de l'élongation

#### eEF1

Les facteurs d'élongation sont également la cible de régulations. eEF1B (la GEF du facteur eEF1A) possède plusieurs sites de phosphorylations sur ses sous-unités (présenté par (Le Sourd et al. 2006)) dont certains sont la cible du complexe CycB/CDK1 (Mulner-Lorillon et al. 1994; Monnier et al. 2001). Ces phosphorylations conduisent ainsi à la diminution de l'affinité d'eEF1B pour eEF1A (Sivan et al. 2011) altérant alors l'efficacité de l'élongation de peptides (Monnier et al. 2001). De plus, eEF1A et eEF1B ont été montrés comme localisés au sein du fuseau mitotique participant probablement à une traduction d'acteurs localisés (Boulben et al. 2003; Kuriyama et al. 1990).

#### eEF2

La kinase eEF2K phosphoryle eEF2 sur le résidu Thr56 pour l'inhiber et eEF2K est elle-même inhibée par phosphorylation. La kinase S6K qui agit en aval de la voie mTOR et la RSK en aval de la voie MAPK, phosphorylent eEF2K sur le résidu Ser366 (Ma and Blenis 2009). eEF2K est aussi inhibé par phosphorylation en Ser359 par le complexe CycB/CDK1 (Smith and Proud 2008).

**Tableau 4 : Régulations des acteurs de la traduction**

(Régulations non exhaustives citées dans le texte)

Facteurs	Régulations	Effets
<b>eIF4E</b>	Fixation par 4E-BP hypo-phosphorylée	Inhibition de la formation du complexe eIF4F
	Fixation par la maskine	Inhibition de la traduction d'ARNm spécifique par circularisation inhibitrice
	Fixation par 4E-T	Transport d'eIF4E au noyau
	Phosphorylation (S209) par MNK1/2	Favorise l'affinité d'eIF4E pour la coiffe
	Ubiquitination (L159)	Réduction de sa phosphorylation et de la fixation par eIF4G, sans impact sur la liaison à la coiffe
<b>MNK1/2</b>	Phosphorylation (T255) par ERK1/2	Activation
<b>4E-BP</b>	Deux états, phosphorylés par mTORC1, CDK1 et CDK12 - Hypo-phosphorylé (T37,46) par mTORC1 - Hyper-phosphorylé (T37,46,70; S65) Phosphorylation supplémentaire (S83) par CDK1	Inhibition d'eIF4E par la forme hypo-phosphorylée et dissociation d'eIF4E sous forme hyper-phosphorylée
	Dégradation	Libération définitive d'eIF4E
<b>eIF2<math>\alpha</math></b>	Phosphorylation (S52) par GCN2	Séquestration par eIF2B
<b>GCN2</b>	Fixation à un ARNt non chargé	Activation de son activité kinase
<b>eIF2B</b>	Phosphorylation (S540) par GSK3 $\beta$ Agrégation en filament	Inhibition du recyclage d'eIF2
<b>eIF4G</b>	Phosphorylations (S1108,1148,1192) par mTORC1	Déstabilisation des interactions avec les facteurs du complexe eIF4F

	Phosphorylation (S1186) par ERK1/2	Favorise l'accessibilité à MNK1/2
	Phosphorylation (S1232) par CDK1	Réduction de l'activité hélicase d'eIF4A au sein du complexe eIF4F
<b>eIF4A</b>	Fixation de PDCD4	Inhibition de l'activité hélicase
<b>PDCD4</b>	Phosphorylations (S67,457) par S6K Phosphorylations (S76,457) par RSK	Inhibition et dégradation
<b>eIF4B</b>	Phosphorylation (S422) par S6K et RSK	Favorise l'association à eIF3 et l'homodimérisation
	Phosphorylation (S406) par Pim et MELK	Favorise la stimulation de l'activité hélicase d'eIF4A
<b>eEF2</b>	Phosphorylation (T56) par eEF2K	Inhibition
<b>eEF2K</b>	Phosphorylation (S366) par S6K et RSK	Inhibition
	Phosphorylation (S359) par CDK1	
<b>eEF1B</b>	Phosphorylation par CDK1	Inhibition du recyclage d'eEF1A par diminution d'affinité

*Sites de phosphorylations sur Ser/Thr selon la séquence humaine (Roux and Topisirovic 2018) ; S6K et RSK sont respectivement activées par phosphorylation par mTORC1 et ERK1/2; Se référer au texte pour plus de références.*

Ces régulations de la traduction en général, associées aux signaux de régulations présents sur un ARNm, vont ainsi permettre une régulation spécifique des ARNm. L'ensemble conduit donc à poser un regard nouveau sur l'activité traductionnelle avec une hétérogénéité de la traduction au sein d'une cellule (Sonneveld et al. 2020) et non plus l'idée qu'un ARNm est traduit dès qu'il est présent au sein de la cellule. Un des aspects encore très discuté est l'état de l'activité traductionnelle et son contrôle pendant le cycle cellulaire en général et la mitose en particulier.

## C. Relation Cycle et Traduction

La première partie de l'introduction de ce manuscrit souligne que le cycle cellulaire est un processus ordonné, régulé de façon spatio-temporelle et nécessaire au développement de tout organisme. La seconde partie met en évidence que la traduction d'un ARNm est un élément majeur du contrôle de l'expression des gènes. La troisième partie, ici, va mettre l'emphase sur cette relation entre la traduction et le cycle cellulaire et ensuite plus particulièrement la mitose.

### 1. Traduction et prolifération

#### a. La traduction régule le cycle cellulaire

La prolifération cellulaire nécessite la synthèse de protéines afin de produire l'ensemble des constituants pour que la cellule puisse croître suffisamment puis se diviser. La synthèse protéique est notamment indispensable pour la bonne production des acteurs de la régulation du cycle cellulaire et *in fine* de la réalisation et la bonne dynamique du cycle (Cormier et al. 2003). En 1961, Hultin T. montre que l'inhibition de la traduction par incubation de puromycine sur des œufs d'oursins intacts et en extraits, arrête le développement avant même la première division et ralentit l'incorporation en acides aminés (Hultin 1961). En 1963, Taylor E. montre la même chose sur des cellules mammifères en suspension. L'inhibition de la traduction réduit la prolifération et l'incorporation en acides aminés (Taylor 1963).

La synthèse protéique est notamment un élément critique de l'entrée dans un cycle cellulaire lors de la transition G1/S : le point de restriction (Zetterberg et al. 1995). En effet, dans des cellules de mammifères, une inhibition de la traduction par cycloheximide en phase G1 du cycle empêche la réplication de l'ADN. Un seuil minimum de traduction doit être atteint pour permettre l'entrée en phase S. Zetterberg et ses collaborateurs montrent alors que cette inhibition de la traduction induit les cellules à entrer en phase G0, phase de quiescence (Zetterberg and Larsson 1985).

La synthèse protéique coiffe-dépendante joue un rôle important dans cette transition G1/S. En effet, chez la levure bourgeonnante, une perturbation de l'assemblage du complexe eIF4F par mutation de *cdc33*, qui code pour eIF4E, provoque un arrêt du cycle à la transition G1/S. C'est notamment la synthèse de la cycline Cln3 qui permet de redémarrer le cycle chez ces mutants (Danaie et al. 1999). En réponse à la fécondation chez l'oursin, la désinhibition d'eIF4E par la phosphorylation et dégradation de 4E-BP est nécessaire pour induire une synthèse protéique qui est nécessaire pour le premier cycle mitotique (Salaün et al. 2003).

La traduction d'acteurs particuliers est nécessaire pour permettre l'avancée dans le cycle, notamment la cycline B, qui doit être synthétisée de nouveau à chaque cycle après sa dégradation à la sortie de la phase M. Chez l'ovocyte de xénope, l'ARNm de la cycline B a une traduction qui est régulée lors de la maturation méiotique par le système de polyadénylation à la fécondation afin de redémarrer le cycle (Groisman et al. 2002). Les protéines CPEB1 et CPEB4 ont également été montrées comme nécessaires pour une polyadénylation d'ARNm dont celui de cycline B pour des cycles mitotiques de cellules humaines (Novoa et al. 2010).

Chez l'oursin *Lytechinus variegatus*, lors de maturation méiotique, l'inhibition de la traduction de la cycline B par morpholino empêche la progression du cycle méiotique. Cependant, l'inhibition de la traduction de cycline B à la première division mitotique ne semble pas bloquer le cycle mais serait compensée par la traduction de la cycline A (Voronina et al. 2003). Ces derniers résultats seront notamment discutés dans le chapitre 1 de la partie des résultats où les traductions spécifiques des cyclines A et B chez *Sphaerechinus granularis* ont été inhibées également.

L'impact de la traduction sur le cycle est également mis en évidence par l'observation de dérégulation de facteurs de traduction. Lors d'une mutation causant une surexpression ou une perte de fonction d'acteurs de la traduction, la traduction d'ARNm parfois spécifiques va également être impactée. C'est notamment le cas dans de nombreux cas de cancers. Les facteurs de traduction ou leurs inhibiteurs vont ainsi jouer le rôle respectif d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeur par le biais du contrôle de la traduction des acteurs du cycle qu'ils régulent (Cormier et al. 2003; Chu et al. 2016).

#### **b. Influence du cycle cellulaire sur la traduction**

À l'inverse des régulations de la traduction qui influent sur le cycle cellulaire et la prolifération des cellules, le cycle cellulaire influence également la traduction. Notamment, un dérèglement de la prolifération cellulaire ou un stress arrêtant le cycle réduit l'activité traductionnelle.

En effet, relativement tôt dans l'étude du cycle cellulaire (revue historique (P. Nurse 2000)), la mesure de l'incorporation d'acides aminés radioactifs a mis en évidence une corrélation entre taux de prolifération et taux de synthèse protéique. Ainsi, en culture de fibroblastes arrivés à confluence, la synthèse protéique est réduite (Levine et al. 1965; Rudland 1974). Ces conditions d'arrêt du cycle mènent alors aux différents contrôles des facteurs de traduction que nous avons vu ci-dessus, pour permettre de réduire la traduction. La synthèse protéique est un processus



couteux en énergie, les facteurs d'initiation ou d'élongation sont alors inhibés, réduisant la progression du cycle cellulaire. Ces facteurs peuvent même être clivés par les caspases lorsqu'un stress arrête le cycle et mène à l'apoptose de la cellule (revue par (Lasfargues et al. 2013; Yamasaki and Anderson 2008)). En revanche, un arrêt de cycle ne signifie pas seulement une baisse de traduction. En effet, des traductions spécifiques peuvent avoir lieu. Vasudevan et ses collaborateurs montrent notamment que dans les cellules de mammifères en culture, la privation de sérum induit l'arrêt du cycle cellulaire et induit également une traduction spécifique du facteur TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor-alpha). C'est un microARN miR369-3 qui, en condition d'arrêt de cycle, va induire la traduction de l'ARNm du TNF $\alpha$ , tandis qu'il induit sa dégradation lors d'un cycle prolifératif (Vasudevan et al. 2007).

À l'instar de l'entrée du cycle, de l'interphase et de cycles arrêtés, la phase M possède également des régulations particulières de la traduction que nous allons voir dans les parties suivantes et résumées dans la Figure 17.

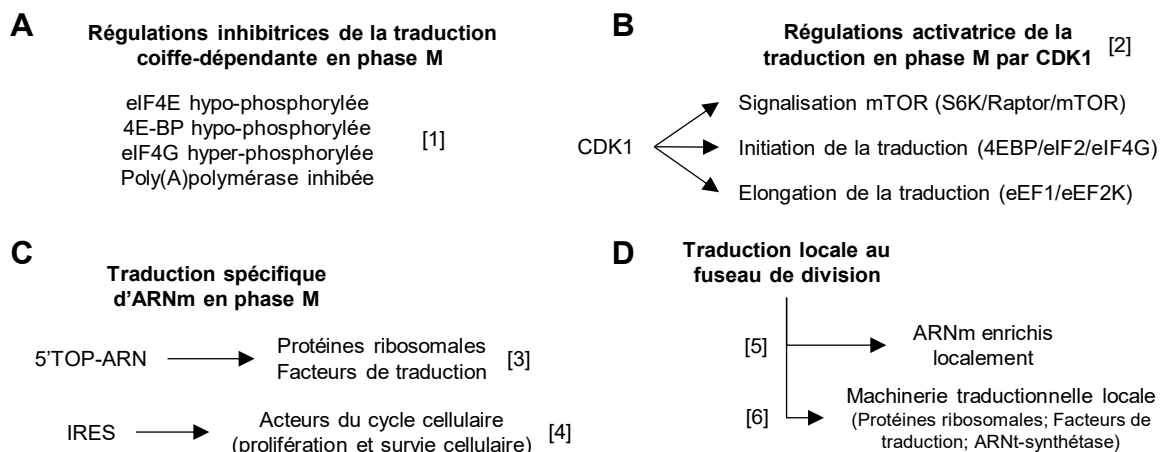


Figure 17 Régulation de la traduction en phase M : locale et spécifique

(A) La traduction coiffe dépendante est inhibée durant la phase M, diminuant ainsi la synthèse protéique globale. (B) Cependant des régulations activatrices de la traduction ont été caractérisées notamment en réponse à la kinase mitotique CDK1. (C) De plus des traductions d'ARNm spécifiques ont été détectées. (D) La machinerie de traduction et des ARNm spécifiques sont particulièrement enrichis aux fuseaux mitotiques et méiotiques. [1] (Colgan et al. 1998; Pyronnet et al. 2001; Cormier et al. 2003) [2] (Kalous et al. 2020) [3] (Park et al. 2016) [4] (Pyronnet and Sonenberg 2001) [5] (Blower et al. 2007; Jansova et al. 2021) [6] (Liska et al. 2004; Sauer et al. 2005; Le Sourd et al. 2006) Se référer au texte pour plus de références.

## 2. Traduction et phase M

### a. Diminution de la traduction en phase M

La traduction peut aussi subir différents contrôles selon le stade du cycle. L'étude de la phase M précisément, a rapidement révélé une synthèse protéique réduite comparée au reste du

cycle, l'interphase. En cellules humaines, il a été montré que le taux de synthèse protéique en mitose est de 25% de celui en phase S. En extraits acellulaires, les facteurs de traduction sont pourtant capables de traduire au même niveau dans les deux phases. Cependant les ribosomes semblent inhibés par un ARN nucléaire U1 (plus tard identifié comme composant du système de spliceosome) en mitose après le désassemblage de l'enveloppe nucléaire, empêchant alors l'initiation de traduction (Tarnowka and Baglioni 1979). Des acteurs de l'initiation de la traduction ont également été montrés comme inhibés durant la mitose de cellules humaines (Pyronnet et al. 2001). En effet, l'inhibiteur 4E-BP est hypo-phosphorylé en mitose, lui permettant d'inhiber la protéine de liaison à la coiffe eIF4E. eIF4E est également sous sa forme hypo-phosphorylé, non stimulé par MNK1/2. L'isoforme eIF4GII est quant à lui montré comme hyper-phosphorylé, réduisant alors son interaction avec eIF4E. Cet ensemble de régulation implique alors l'impossibilité de former le complexe d'initiation eIF4F (Pyronnet et al. 2001). Cependant des travaux indiquent le contraire avec une hyper-phosphorylation de 4E-BP et sa dissociation d'eIF4E en mitose (Heesom et al. 2001). Ces deux travaux n'ont cependant pas testé la présence des formes hyper-phosphorylées de la même manière, expliquant certainement les différences observées. Ces travaux illustrent l'importance des modifications post-traductionnelles des facteurs de traduction au cours de la mitose, mais aussi de l'importance des outils pour leurs études spécifiques, en l'occurrence, les anticorps.

Malgré tout, l'efficacité de l'initiation coiffe-dépendante est réduite quand les cellules sont arrêtées en métaphase (Bonneau and Sonenberg 1987). Chez le xénope aussi la synthèse protéique est diminuée en phase M. Cette diminution est également causée par une inhibition de l'initiation et non de l'élongation (Kanki and Newport 1991). La poly(A)polymérase notamment, est inhibée par CDK1 en métaphase de méiose (Colgan et al. 1998).

La mitose est donc une phase du cycle généralement associée à une synthèse protéique diminuée. Cependant, il ne s'agit pas d'un système tout ou rien et la quantification de la synthèse protéique en mitose varie grandement selon les études. Dans les cellules de mammifères en mitose, de 35% à 70% d'inhibition de la traduction peut être observée par rapport à l'interphase (Fan and Penman 1970; Tanenbaum et al. 2015). Paradoxalement, certains éléments de régulation observés en phase de mitose se révèlent être en faveur de la synthèse protéique. En effet, la S6K, cible de mTOR en interphase, est activée par phosphorylation en Ser434 (qui correspond à la Ser411 étudiée dans les références suivantes) par la kinase mitotique CycB/CDK1 (Papst et al. 1998; Shah et al. 2003). De plus, plus récemment, 4E-BP a été montré comme phosphorylé par CDK1 aux sites canoniques (même

phosphorylation que par mTOR : Thr37, Thr46, Ser65, Thr70) et un site supplémentaire non canonique en Ser83. Cette phosphorylation non canonique est impliquée notamment dans la transformation des cellules et est spécifiquement accumulée au fuseau (Velásquez et al. 2016).

Ainsi plusieurs systèmes semblent être présents en parallèle au sein de cellules en phase M. Cependant, de récentes études remettent en question le contrôle traductionnel comme cible direct des événements mitotiques. Les baisses majeures de synthèse protéique en cellules humaines ont en effet été observées dans des contextes cellulaires particuliers, à savoir des cycles synchronisés par l'utilisation de drogues (discuté par (Anda and Grallert 2019)). Les cellules ont généralement été synchronisées à un checkpoint par des inhibiteurs de CDK1 ou de polymérisation de microtubules pour un arrêt en G2/M. Ces drogues et la synchronisation associée déclencheraient en réalité des stress cellulaires (Lockhead et al. 2020). Un stress cellulaire est susceptible d'induire alors une inhibition de la traduction accompagnée de l'arrêt de la prolifération. Récemment, la mesure du taux de synthèse protéique, au sein de cellules non synchronisées et individuelles par cytométrie, a révélé un taux de traduction sans variation majeure au cours du cycle (Stonyte et al. 2018). Également, la croissance cellulaire durant la mitose a été montrée comme non négligeable et seulement réduite durant le court laps de temps entre métaphase et anaphase (Miettinen et al. 2019). Ces dernières études appuient donc sur le fait de prendre également en compte les aspects méthodologiques pour synchroniser les cultures cellulaires.

L'utilisation des drogues pourrait entraîner un biais. Des méthodes permettant l'étude de cellules mammifères synchrones seraient à privilégier. Plusieurs techniques sont ainsi utilisables pour étudier des cellules à des stades spécifiques. La privation de sérum synchronise les cellules au stade G0 de quiescence, l'inhibition par contact arrête les cellules en stade G1, tandis que l'élutriation par centrifugation permet la sélection des stades de cellules selon leur taille (Davis et al. 2001). Les techniques optimisées récentes de FACS permettent de sélectionner sur la taille également mais aussi selon des marqueurs spécifiques de phase, modifications d'histones, quantité d'ADN, et tous autres marqueurs pouvant être détectés par fluorescence (Potashnikova et al. 2018). Le FACS, technique idéale pour les cellules en suspension, nécessite que les cellules initialement cultivées sur boîte soient détachées de leur support. La technique de 'shake-off' permet d'isoler les cellules en mitose par décollement physique manuel de ces cellules (Schorl and Sedivy 2007). Le plus simple techniquement, et le plus physiologique aussi, reste l'utilisation de modèles synchronisés naturellement, comme le

xénope pour le cycle méiotique ou l'oursin pour le cycle mitotique. Ces modèles présentent donc un avantage majeur à l'étude des régulations de la traduction liée au cycle cellulaire.

### **b. Une traduction d'ARNm spécifique en mitose**

L'analyse spécifique des ARNm traduits en mitose confirme un changement qualitatif des ARNm traduits. Tanenbaum et ses collaborateurs ont montré qu'une faible quantité d'ARNm variait de manière spécifique à la mitose de cellules humaines, dont une majorité voyait sa traduction totalement diminuée. C'est le cas notamment pour l'ARNm codant Emi1, un inhibiteur de l'APC qui est nécessaire pour la sortie de mitose (Tanenbaum et al. 2015). Park et ses collaborateurs ont quant à eux montré une traduction spécifique des ARNm arborant des 5'TOP dans un contexte de diminution de traduction en mitose de cellules humaines (Park et al. 2016). De même, CDK12 dans des cellules humaines transformées, inhiberait 4E-BP1 et permettrait de traduire spécifiquement des ARNm de facteurs du fuseau mitotique, du centromère aux centrosomes, ce qui augmenterait la stabilité des chromosomes (Choi et al. 2019). L'ensemble de ces travaux impliquent alors que la traduction est en fait plus spécialisée et les facteurs de la traduction semblent aussi plus spécialisés lors de la phase M. En effet, des modes de traduction coiffe indépendante, tels que les IRES, sont aussi favorisés en phase M (revue par (Pyronnet and Sonenberg 2001)). Le facteur de traduction non canonique DAP5, impliqué dans la traduction notamment d'IRES en condition de stress, a également été montré impliqué dans la traduction d'acteurs de survie cellulaire en absence de stress (Lieberman et al. 2009; Lieberman et al. 2015).

Ainsi, il ne suffit pas de savoir si la traduction est diminuée ou non en mitose, il faut savoir ce qui est justement traduit dans ce contexte mitotique (Anda and Grallert 2019). Certains ARNm, dont la cycline A sont spécifiquement traduits en réponse au complexe CycB/CDK1 dans l'embryon d'oursin (Le Breton et al. 2003; 2005). Plusieurs contrôles d'acteurs de la synthèse protéique par la kinase CDK1 en mitose ont notamment été détectés. Kalous et ses collaborateurs résument ainsi les contrôles en mitose par CDK1 de la voie mTOR (S6K, raptor), de l'initiation de la traduction (4E-BP, eIF4G, eIF2) et de l'élongation (eEF2K, eEF1) (Kalous et al. 2020). Ainsi en mitose, CDK1 permettrait le maintien d'une traduction coiffe-dépendante par son action sur 4E-BP énoncé plus tôt (Velásquez et al. 2016) et permettrait alors une traduction insensible à l'inhibition de la voie mTOR comme par la drogue PP242 (Shuda2015). De plus, CDK1 par son action activatrice sur eIF2 et inhibitrice de LARP1 (La-related protein 1) (inhibiteur de traduction des TOP-ARNm) permettrait la traduction spécifique des TOP-ARNm (Haneke et al. 2020; Kalous et al. 2020).

### **3. Traduction localisée au fuseau**

En plus d'un contrôle temporel spécifique des phases du cycle, il a également été montré que la traduction peut être localisée. La traduction localisée au sein de l'appareil mitotique est une notion discutée depuis longtemps (revue chronologique par (Waldron and Yajima 2020). En effet, dès 1963, l'incorporation d'acides aminés marqués ainsi que de l'ARN ont été détectés au sein de la région du fuseau mitotique chez l'œuf d'oursin (Gross and Cousineau 1963b).

#### **a. Machinerie de traduction locale au niveau du fuseau**

Les ribosomes ont d'abord été montrés comme capables d'interagir avec le cytosquelette d'interphase chez l'oursin ce qui impliquait à l'époque surtout la possibilité d'un transport de la machinerie (Hamill et al. 1994). Puis, le fuseau mitotique est identifié comme une structure de traduction localisée. La localisation des facteurs de traductions et leur contrôle par les acteurs du cycle sont nécessaires à la bonne progression de la phase M (revues (Susor et al. 2016; Susor and Kubelka 2017). Les premiers protéomes des fuseaux méiotiques de xénope et mitotiques humains ont permis d'identifier l'enrichissement de protéines ribosomales, de ARNt-synthétase, de RBP et de facteurs de traductions (Liska et al. 2004; Sauer et al. 2005). On retrouve ainsi les facteurs d'élongation eEF1A et eEF1B régulés par CycB/CDK1 chez le xénope (Mulner-Lorillon et al. 1994; Le Sourd et al. 2006). Ces facteurs d'élongation sont d'ailleurs relocalisés au fuseau mitotique lors de la NEBD chez l'oursin (Ryoko et al. 1985; Kuriyama et al. 1990; Boulben et al. 2003). Le facteur 4E-BP est également présent au fuseau méiotique d'ovocytes humains et de souris, et notamment dans son état inhibé *via* les voies CDK1/mTOR (Velásquez et al. 2016), nécessaire au maintien de l'intégrité du fuseau (Jansova et al. 2017). Ainsi, l'activation locale de l'initiation de la traduction, permet la traduction spécialisée de protéines nécessaire à l'assemblage du fuseau, l'alignement et la ségrégation des chromosomes (Susor et al. 2015).

#### **b. Traduction localisée et spécifique au fuseau mitotique**

Chez le xénope, l'ARNm de cycline B, et les protéines maskine, cycline B et CPEB ont été colocalisées dans la région du fuseau mitotique. De plus, la traduction *via* la polyadénylation et sa localisation sont nécessaires pour le bon assemblage de l'appareil mitotique (Groisman et al. 2000). La traduction de la cycline B a également été observée localisée au fuseau chez l'oursin par le biais de l'ARN hélicase Vasa. La localisation de Vasa est elle-même sous dépendance de l'activité de CDK1 (Yajima and Wessel 2011; 2015). Il est également montré, par un système de détection de traduction par OP-puromycine en cellules humaines normales ou transformées, qu'une traduction localisée au fuseau était dépendante de la protéine Staufen1

(Hassine et al. 2020) récemment identifiée comme ITAF (Ramos et al. 2022). Ce contrôle localisé débute dès l'étape de prophase. En effet, des ARNm autour des chromosomes et autour du fuseau mitotique sont détectés et semblent concentrés par un système semi-perméable de réticulum endoplasmique, mitochondries et de lamines (Susor et al. 2015). De même, dans la vésicule germinale d'ovocytes et les noyaux d'embryons de mammifères, des ARNm et ribosomes sont détectés. Les ARNm de cycline B et Mos non traduits en arrêt de prophase I, sont traduits à la reprise de méiose (Jansova et al. 2018; 2021). Des microarray (*in vitro*) de ces fuseaux mitotiques et méiotiques révèlent aussi une conservation des ARNm qui y sont recrutés et traduits (Blower et al. 2007). La traduction active de ces ARNm localisés n'est cependant pas nécessaire à leur recrutement au sein des fuseaux, suggérant que l'ARNm lui-même, et non le peptide en cours d'élongation, permettrait sa localisation.

Le fuseau mitotique pourrait aussi participer à la traduction d'acteurs spécifiques. La kinase CDK1 pourrait faire le lien et elle est présente au fuseau comme nous l'avons vu précédemment. L'activité de CDK1 est nécessaire pour coordonner les acteurs du fuseau et notamment les attachements des microtubules aux kinétochores (Song et al. 2021). La kinase est également susceptible d'agir sur les différents acteurs de la traduction comme nous l'avons vu ci-dessus. La traduction en phase M pourrait être ainsi localisée et sélective par rapport à une traduction plus globale en interphase.

L'étude de la relation entre le cycle cellulaire et la traduction reste donc une question d'actualité. Il est encore nécessaire d'étudier l'impact des traductions d'ARNm spécifiques sur le cycle et sa dynamique mais il faut aussi comprendre comment le recrutement de ces ARNm est contrôlé pour produire la protéine au bon moment. C'est dans ce contexte que j'ai travaillé au cours de ma thèse en utilisant les premières divisions mitotiques de l'embryon d'oursin comme modèle.

## D. L'oursin et la relation Cycle-Traduction

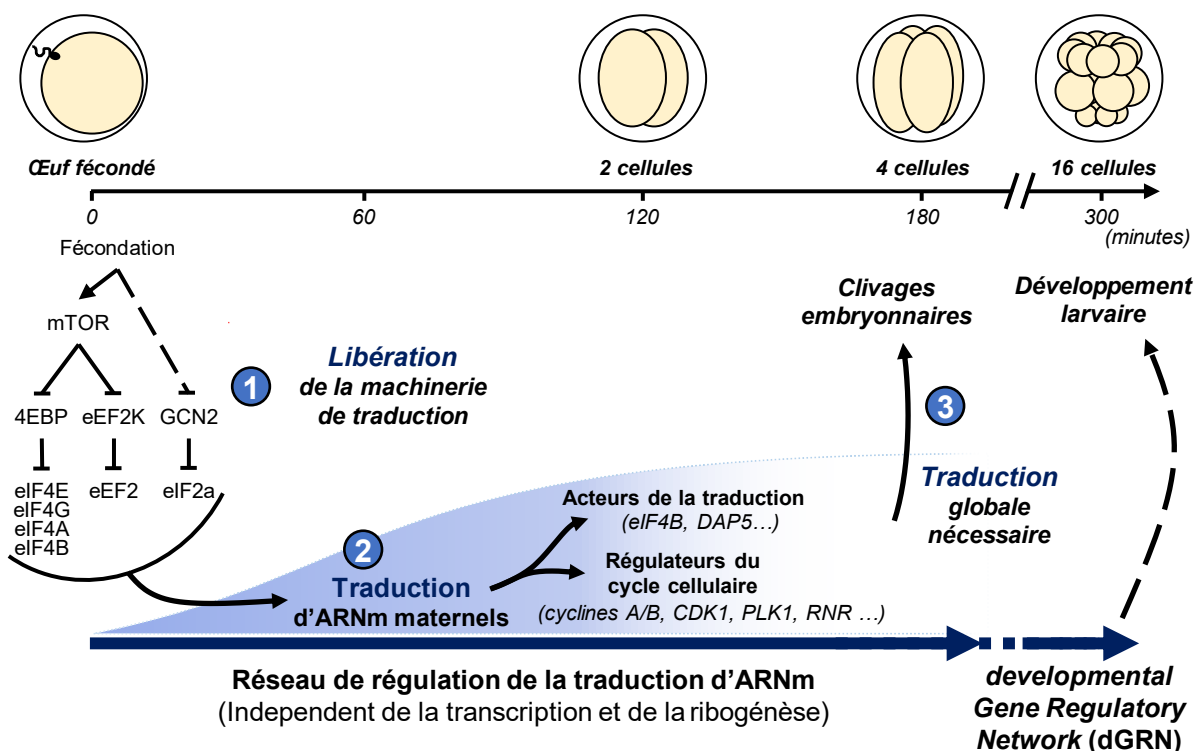
Comme nous l'avons vu précédemment, le modèle oursin a précocement mis en lumière une relation entre le cycle cellulaire et l'activité traductionnelle (Gross and Cousineau 1963a). C'est en 2006 que le génome de l'oursin a été obtenu pour l'espèce *Strongylocentrotus purpuratus* (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al. 2006). Ce génome a ainsi révélé que l'oursin possède l'ensemble de la machinerie traductionnelle, du cycle cellulaire et des voies de signalisation (Morales et al. 2006; Fernandez-Guerra et al. 2006), un ensemble déjà largement étudié avant l'obtention du génome. Cette partie de l'introduction se focalise sur ce qui fait des œufs d'oursin, un modèle intéressant pour l'étude de la relation entre la traduction et le cycle cellulaire.

L'étude du cycle cellulaire dans l'oursin est favorisée par plusieurs aspects biologiques des gamètes femelles matures : notamment la ponte massive des ovules ( $10^8$  cellules/femelle), leur taille (80-100 $\mu$ m de diamètre), leur fécondation externe ainsi que les premières divisions embryonnaires rapides (de l'ordre de deux heures) et synchrones des œufs. Ces éléments seront discutés plus en détails au sein du chapitre 1 des résultats. D'un point de vue physiologique, comme précisé plus tôt, l'ovule est bloqué en G1 du cycle cellulaire et la fécondation enclenche les processus liés au cycle cellulaire, avec l'entrée en phase S suivie de la mitose. Les premiers transcrits zygotiques n'apparaissent qu'au second cycle. Un traitement à l'Actinomycine D, inhibiteur de transcription, ne bloque le développement embryonnaire qu'à partir du quatrième cycle (Gross and Cousineau 1963a). Ainsi les trois premières divisions ne nécessitent pas de nouveaux transcrits et sont contrôlées par des régulations de la traduction des ARNm maternels. Chez l'ovule non fécondé d'oursin, l'activité traductionnelle est maintenue à son minimum, certainement pour maintenir l'homéostasie de la cellule. La fécondation provoque une augmentation globale et importante de la synthèse protéique et cela de manière indépendante de la transcription. Le stock d'ARNm maternels va permettre la néo-synthèse de protéines. Lors d'un traitement à l'émétine, un inhibiteur général de la traduction qui agit au niveau de l'élongation, la phase S n'est pas affectée mais la première mitose est totalement inhibée (Hultin 1961; Wagenaar 1983; Dubé 1988). La traduction d'ARNm maternels est donc indispensable pour le déroulement de la mitose embryonnaire. Ce système est ainsi idéal pour étudier *in vivo* les régulations de la traduction dans un contexte physiologique et d'analyser l'impact de l'activité traductionnelle sur la dynamique de la mitose.

L'augmentation importante de la traduction en réponse à la fécondation est le résultat de la désinhibition de plusieurs facteurs de traduction impliquant 4E-BP, eIF2 $\alpha$  et eEF2 (Figure 18). Revue dans (Cormier et al. 2016), la dynamique de désinhibition en réponse à la fécondation peut être modélisée en prenant en compte les différents éléments affectés (Laurent et al. 2014; Picard et al. 2016; Moundoyi et al. 2018). À la fécondation de l'œuf d'oursin, la formation du complexe eIF4F est permise par l'inhibition et la dégradation d'4E-BP. La stimulation de la traduction passe également par l'inhibition de GCN2, l'inhibiteur d'eIF2. Enfin, l'élongation de la traduction est également stimulée par l'inhibition d'eEF2K, l'inhibiteur d'eEF2. La libération de ces acteurs engendre ainsi une augmentation drastique de la traduction dans l'œuf (Figure 18). La question de savoir si l'ensemble des ARNm maternels ou au contraire seule une fraction est traduite, est restée sans réponse jusqu'à l'avènement des approches holistiques. Le premier transcriptome obtenu à la transition ovule-embryon de *P. lividus* a ainsi révélé que sur 14002 ARNm différents présents dans l'ovule et l'œuf, seuls 2514 (soit 18%) sont effectivement recrutés dans la machinerie traductionnelle (Chassé et al. 2018). Ces ARNm néo-recrutés étaient initialement libres dans le cytoplasme. En revanche, 13% des ARNm supplémentaires révèlent un passage de mRNP non traduits à traduits en réponse à la fécondation. D'autres ARNm sont au contraire dé-recrutés des polysomes (10%). Enfin, la majorité des ARNm maternels ne présentent pas de changement dans leur présence ou non au sein des polysomes. Ce transcriptome représente donc la première vision qualitative de ce qui est activement traduit en réponse à la fécondation et a permis de mettre en évidence une sélection de 18% d'ARNm néo-recrutés. Il est intéressant de noter que l'efficacité de recrutement de ces ARNm est montrée comme non dépendante de leur quantité initiale. Ce dernier point argue pour l'existence de mécanismes de contrôles traductionnels efficaces et spécifiques.

L'analyse des ARNm néo-recrutés permet aussi d'identifier dans quels processus biologiques ils sont impliqués comme le cycle cellulaire, le métabolisme ou encore l'épissage d'ARNm. Parmi les ARNm codants des acteurs du cycle cellulaire nous retrouvons la petite sous-unité R2 de la Ribonucleotide-reductase (**RNR**), la **cycline B**, la **cycline A**, **CDK1** ainsi que **PLK1**, des acteurs clés que nous avons vu dans l'introduction. Le processus biologique de la traduction n'est quant à lui pas surreprésenté parmi les ARNm, cependant la spécificité des ARNm recrutés interpelle. En effet, les ARNm d'acteurs de la traduction canonique, notamment eIF4E, eIF4G, eIF4A, ou PABP ne sont pas recrutés tandis que seul le facteur canonique **eIF4B** ainsi que d'autres non canoniques, tel que **DAP5**, le sont chez *P. lividus* (Chassé, Boulben, Cormier, et al. 2019).





*Figure 18 Contrôle des premières divisions par augmentation de la synthèse protéique en réponse à la fécondation*

(1) La fécondation d'un ovule d'oursin induit la libération de la machinerie de traduction par inhibition des inhibiteurs GCN2, 4E-BP et eEF2K. (2) La synthèse protéique est alors induite pour une sélection d'ARNm dont des acteurs de la traduction, du cycle cellulaire et d'autres catégories fonctionnelles. (3) La synthèse globale de ces acteurs est nécessaire à la progression du cycle. Ces premières étapes en réponse à la fécondation sont indépendantes de toute transcription et de la ribogénèse.

De plus, l'analyse de gradients de polysomes réalisés en présence d'inhibiteur de la voie mTOR (PP242) met en évidence un recrutement d'ARNm par une régulation alternative à celles déclenchées par la voie de signalisation mTOR (Chassé, Boulben, Cormier, et al. 2019; Chassé et al. 2018). En effet, l'inhibition de la voie mTOR dans ce traductome, affecte différemment le recrutement polysomal des ARNm. Certains ARNm ont un recrutement sensible et d'autres insensible à l'inhibition de la voie mTOR. Ainsi, les ARNm ayant un recrutement mTOR dépendant suivraient un recrutement classique coiffe-dépendant (RNR, cycline A, PLK1) tandis que les ARNm avec un recrutement mTOR-indépendant suivraient un recrutement alternatif au mode coiffe-dépendant (DAP5). Parmi les ARNm déjà cités, la cycline B, eIF4B et CDK1 montrent en revanche une sensibilité partielle à l'inhibition de mTOR. L'ensemble permet de proposer l'hypothèse qu'il y ait une traduction initiée indépendamment de mTOR. Des études approfondies du recrutement de ces acteurs, ainsi que leur impact sur les premières divisions du zygote sont donc nécessaires.

## E. Objectifs/Plan des travaux de thèse

J'ai choisi de présenter l'ensemble de mon travail expérimental en quatre chapitres principaux. Mes travaux de recherche se sont notamment concentrés sur l'étude du cycle cellulaire et la traduction d'ARNm au moment de la transition ovule-embryon à la fécondation. Mes travaux ayant fait appel à de nombreuses connaissances établies au cours des dernières décennies sur le modèle expérimental que représente l'oursin et son développement embryonnaire, j'ai participé à l'élaboration d'un article général sur l'utilisation de ce modèle présenté dans le premier chapitre (article 1 (Pontheaux et al. 2021)). Nous y verrons une description générale des Echinodermes, leur phylogénie et biogéographie et particulièrement l'oursin avec son cycle de vie et son embryogénèse. Ce chapitre détaille les avancées dans les domaines de la biologie cellulaire et développementale que le modèle oursin a permis de faire depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, ainsi que les nouveaux outils génétiques disponibles pour étendre les possibilités d'étude.

Concernant les cibles moléculaires, mon travail s'est principalement articulé autour des acteurs précédemment cités (RNR, cyclines A et B, CDK1, PLK1, eIF4B, DAP5) afin d'étudier deux aspects distincts : leur dynamique de traduction en réponse à la fécondation et l'influence de leur traduction sur les premières divisions de l'embryon d'oursin. Ces deux questions étant posées dans le contexte de la dynamique du cycle cellulaire embryonnaire précoce de l'oursin, j'ai saisi en parallèle l'occasion d'analyser la dynamique d'activités kinases spécifiques au cours des premières divisions mitotiques de l'embryon d'oursin. Des données originales de l'étude de la dynamique des premiers cycles à la fécondation avec la localisation d'une phosphorylation de PP1 (marqueur d'activité du complexe CycB/CDK1) sont notamment présentées en fin de l'article 1 du premier chapitre (Pontheaux et al. 2021). Le chapitre 2 présentera plus amplement l'étude de cette dynamique du cycle cellulaire. Cette étude devait initialement permettre d'étudier des marqueurs d'activités d'acteurs du cycle qui pouvaient nous être utiles pour analyser l'impact des recrutements spécifiques des ARNm sur le cycle cellulaire. Parmi ces marqueurs, la phosphorylation sur la Thréonine 3 de l'Histone 3 (pT3H3) est un signal reconnu de l'étape de mitose. Ce marqueur est identifié chez les mammifères comme le résultat de l'activité de la kinase haspine, elle-même sous le contrôle des kinases PLK1 et CDK1/CycB. Son étude a ainsi permis de démontrer la conservation de la kinase haspine et son marqueur d'activité chez l'oursin. Des tests pharmacologiques d'inhibiteurs des kinases haspine et CDK1 mènent cependant à discuter la conservation des relations entre ces kinases chez l'oursin (article 2 (Feizbakhsh et al. 2020)).

Les résultats de ces deux premiers chapitres dédiés à l'analyse de ces marqueurs phénotypiques de la mitose dans l'embryon d'oursin seront discutés en dernière partie de ces chapitres. Ces résultats seront mis en perspectives par des données préliminaires sur l'étude de l'impact des néo-traductions spécifiques d'acteurs sur les premières divisions en réponse à la fécondation. Ainsi, la micro-injection de morpholino dirigés contre ces ARNm a permis de révéler un impact non significatif de la traduction de CDK1 ou PLK1. À l'inverse, un effet significatif est détecté pour les cyclines A et B impliquant des rôles dans le contrôle de la dynamique du cycle cellulaire.

Je me suis aussi questionné, au sein du troisième chapitre, sur comment les ARNm spécifiques sont recrutés dans les polysomes en réponse à la fécondation. Plus précisément, j'ai étudié l'influence des 5'UTR dans la traduction spécifique de ces acteurs à l'aide d'un système rapporteur Luciférase micro-injecté dans l'œuf d'oursin. Ainsi, j'ai pu obtenir des données préliminaires *in vivo* sur l'activité traductionnelle portée par les 5'UTR de différents ARNm en condition physiologique (contrôle) ou en condition inhibitrice de la voie mTOR. Ces données sont également discutées dans le cadre du lien entre traduction et cycle cellulaire. Le développement de la technique du suivi *in vivo* de l'activité traductionnelle des 5'UTR est notamment publiée au sein d'un article sur les méthodes de mesures de l'activité traductionnelle dans l'œuf d'oursin (article 3 (Chassé, Boulben, Glippa, et al. 2019)).

Enfin, j'ai étudié l'implication fonctionnelle de la néo traduction du facteur de traduction eIF4B en réponse à la fécondation. Le suivi de l'impact de l'inhibition de sa néo-synthèse a révélé un effet significatif sur la dynamique du cycle. L'étude, plus développée sur ce facteur qui fait le lien entre traduction et dynamique de cycle cellulaire, est ainsi présentée dans le chapitre 4 dans un article en préparation (article 4 – en préparation). J'ai ainsi pu caractériser son recrutement, son influence *in vivo* sur la dynamique des divisions mitotiques mais aussi sur la traduction *in vivo* dans le cadre de la fécondation de deux oursins séparés évolutivement d'au moins 30 millions d'années.

L'ensemble de ces approches seront finalement discutées dans un cadre commun de compréhension des relations entre traduction et mitose. Ces deux processus cellulaires présentent de nombreuses régulations croisées et permettent d'agrémenter l'idée d'un réseau de régulation de la traduction à la fécondation chez l'oursin. Ce réseau sera notamment discuté dans le cadre d'autres contextes cellulaires.

## II. Résultats

### Chapitre 1 : L'oursin, un modèle historique pour l'étude de la fécondation et du développement

L'oursin est un modèle d'étude largement utilisé depuis la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. C'est notamment pour ses gamètes, ainsi que son embryologie, qu'il est un modèle privilégié. En effet, de nombreuses particularités avantageuses lui ont permis d'être mis en avant pour des recherches au niveau écologique, développemental, cellulaire et moléculaire.

Le chapitre de revue ci-dessous présente ainsi la phylogénie très diversifiée et la biogéographie très étendue du grand phylum des Echinodermes. Sa position au sein des Deutérostomes fait de ce groupe un modèle intéressant pour y découvrir des processus biologiques ancestraux, conservés chez les vertébrés et mammifères. Les Echinodermes n'ont pas subi de duplication globale de leur génome. Par conséquent, cela réduit la complexité des analyses fonctionnelles concernant de potentielles redondances géniques, comme chez les vertébrés et encore plus particulièrement chez les téléostéens qui ont subi une troisième duplication globale de leur génome. Dans le contexte de mes travaux de thèse, cette notion est intéressante. En effet, le génome a révélé que l'oursin possède l'ensemble des familles d'acteurs du cycle cellulaire représentée par une seule isoforme chacune (Fernandez-Guerra et al. 2006). De même pour la machinerie traductionnelle, l'oursin possède un exemplaire de chaque famille d'acteurs (Morales et al. 2006), dont par exemple un seul 4E-BP et une seule isoforme des trois familles d'eIF4E (voir la partie 'Régulations des acteurs de la traduction' dans l'introduction de ce manuscrit). L'oursin possède donc un avantage génétique à l'étude d'acteurs moléculaires.

Les avantages biologiques du modèle oursin et particulièrement de ses gamètes femelles matures sont multiples. La quantité de matériel biologique homogène et synchronisé physiologiquement permet des études de biochimie. Aussi, la taille des ovocytes, autour de 80 à 100 $\mu$ m de diamètre pour les espèces d'oursins étudiées en laboratoire permet des études fonctionnelles de micro-dissection ou micro-injection. De plus, le cytoplasme de l'ovule et de l'œuf, relativement pauvre en vitellus (oligolécithe), est transparent et facilite ainsi les études de microscopies. Historiquement, le modèle a permis les premières études de la fécondation avec l'observation de la fusion des gamètes puis des pronuclei. Sont venues ensuite des données expliquant la protection contre la polyspermie mais aussi le rôle du calcium dans cet événement

biologique. Un premier prix Nobel concernant l'oursin a été attribué en 1931 à Heinrich Warburg pour ses études du processus de respiration cellulaire en réponse à la fécondation.

De même, les premiers clivages embryonnaires présentent leurs avantages. Les ovules d'oursin en phase G1 permettent d'étudier les processus exclusivement liés à la mitose en réponse à la fécondation. De plus, ces premières divisions sont synchrones naturellement (sans utilisation de drogues) permettant l'étude précise et quantitative du cycle cellulaire et de processus moléculaires tels que la dynamique de traduction des ARNm en réponse à la fécondation et au cours de l'embryogénèse précoce. Un second prix Nobel a été décerné en 2001 pour les découvertes des acteurs clés du cycle cellulaire et notamment Tim Hunt pour la découverte des cyclines. Le développement embryonnaire est lui aussi très étudié et a permis l'élaboration du premier dGRN (developmental Gene Regulatory Network). Ce dGRN décrit les réseaux des différents acteurs qui définissent dans un contexte temporel et spatial, les axes de polarité des bilatériens (axe primordial animal/végétatif puis antéro-postérieur, dorso-ventral et droite/gauche).

De nos jours, l'oursin est toujours très présent au sein de la recherche avec de nombreuses avancées, de nombreux génomes et transcriptomes disponibles, et l'utilisation des techniques les plus récentes comme l'édition du génome par CRISPR/Cas9, etc. Ce modèle biologique permet donc de répondre à des questions autour de nombreuses thématiques physiologiques : l'embryologie et le cycle cellulaire mais aussi la génétique et le métabolisme. L'oursin est également étudié dans un cadre écologique, toxicologique ou d'adaptation au changement climatique global.

L'écriture de ce chapitre se focalisant sur le modèle oursin, a permis de mettre en lumière l'historique mais aussi le potentiel, toujours d'actualité, de ce modèle d'étude. Ce chapitre se termine par l'étude de la dynamique du cycle cellulaire en réponse à la fécondation avec une figure originale par immunofluorescence du marqueur d'activité du complexe CycB/CDK1 (Article 1 – Figure 6). Durant la mitose, le complexe CycB/CDK1 phosphoryle la phosphatase PP1C, au résidu T318 chez l'oursin, afin d'inhiber et réduire l'activité phosphatase, antagoniste à l'activité du complexe mitotique. Le signal pT318PP1C reflète donc l'activité de CycB/CDK1, montré ici pour la première fois dans un contexte spatial dans l'embryon précoce de l'oursin.

Article 1 :

*Echinoderms :*

*Focus on the Sea Urchin Model in  
Cellular and Developmental Biology*

Florian Pontheaux, Fernando Roch,  
Julia Morales and Patrick Cormier

In *Handbook of Established and Emerging Marine Model Organisms in Experimental Biology*.  
Eds. A. Boutet et B. Schierwater, CRC Press, 2021. DOI : 10.1201/9781003217503-17

## **ABSTRACT**

Echinoderms, a sister group of chordates, is a group of exclusively marine animals. The Echinodermata is an ancient phylum dating to at least 450 million years old and including more than 10,000 extant species present throughout the world's oceans. The modern echinoderms belong to five classes: Echinoidea (e.g., sea urchins and sand dollars), Asteroidea (e.g., starfishes), Ophiuroidea (e.g., brittle stars), Holothuroidea (e.g., sea cucumbers) and Crinoidea (e.g., sea lilies and feather stars).

Sea urchin represents a well-established marine model in biological sciences. This chapter provides a general description of echinoderms and focuses on the significant advances in cell and developmental biology that the study of sea urchins has made possible. During the last decade, many genomic data concerning echinoderms and sea urchins, in particular, have become available. These new molecular tools have facilitated gene regulation analysis during development and have boosted the possibilities offered by sea urchins as experimental models.

---

# 17 Echinoderms

## *Focus on the Sea Urchin Model in Cellular and Developmental Biology*

*Florian Pontheaux, Fernando Roch, Julia Morales and Patrick Cormier*

### CONTENTS

17.1	Historical Contributions of Sea Urchin Gametes and Embryos .....	307
17.1.1	How Did the Optical Transparency of Sea Urchin Eggs Foster Significant Advances in the Understanding of Fertilization?.....	307
17.1.2	Sea Urchin's Contribution to Our Understanding of the Role Played by Calcium Signalling during Fertilization.....	309
17.1.3	Sea Urchin Egg Abundance and Synchronous Early Embryonic Development Are Optimal for Biochemistry and Cell Biology Analyses.....	309
17.1.4	Embryonic and Larval Development of the Sea Urchin in the Age of Molecular Biology.....	310
17.2	Echinoderm Phylogeny.....	311
17.3	Geographical Location of Echinoderms .....	313
17.4	Sea Urchin Life Cycle.....	314
17.5	Sea Urchin Embryogenesis.....	316
17.6	Anatomy of the Adult Sea Urchin.....	321
17.7	Genomic Data of Echinoderms.....	322
17.8	Functional Approaches: Tools for Molecular and Cellular Analyses.....	323
17.9	Challenging Questions.....	325
	Acknowledgements and Funding.....	325
	Bibliography .....	325

### 17.1 HISTORICAL CONTRIBUTIONS OF SEA URCHIN GAMETES AND EMBRYOS

Sea urchins, and in particular their gametes, have been an important experimental model since the end of the 19th century and throughout the 20th century (reviewed in Monroy 1986; Briggs and Wessel 2006; Pederson 2006; Hamdoun et al. 2018). From Aristotle's description of sea urchins' feeding apparatus (350 BCE) to the genome sequencing of *Strongylocentrotus purpuratus* in the 21st century, echinoderms on many occasions have been the involuntary protagonists of the history of science (Sodergren et al. 2006; Pederson 2006). Indeed, as we will discuss in detail in the following sections, sea urchins have played a paramount role in the fields of embryology and cell biology (Pederson 2006; Briggs and Wessel 2006).

#### 17.1.1 HOW DID THE OPTICAL TRANSPARENCY OF SEA URCHIN EGGS FOSTER SIGNIFICANT ADVANCES IN THE UNDERSTANDING OF FERTILIZATION?

As early as 1840, Derbès, like Dufossé or von Baër, was probably seduced by the transparency of the sea urchin egg, which makes these animals an excellent experimental model system for the study of fertilization (Derbès 1847).

Sea urchins are gonochoric, and their gametes can be easily obtained in large quantities: a single female can produce millions of eggs, and males release an even greater quantity of functional gametes. In addition, both eggs and sperm are immediately competent to accomplish fertilization without any complementary maturation. Consequently, the simple mixing of sperm and eggs initiates fertilization and development, which take place externally. Using this material, Derbès was able to produce accurate descriptions of fertilization, holoblastic radial cleavages and larval development. The size of the sea urchin eggs ( $\approx 100 \mu\text{m}$  diameter, see Table 17.1) and the optical characteristics of their oligolecithal cytoplasm make them a valuable system for manipulation, microinjection and observation under optical microscopy (Angione et al. 2015; Stepicheva and Song 2014). Derbès was the first scientist to hypothesize the existence of a transparent layer surrounding the unfertilized eggs: the egg-jelly. However, he did not properly grasp the importance of this protective coat, as he suggested that it was dispensable for fertilization (Briggs and Wessel 2006). We now know that this glycoprotein meshwork has several functions, which include attracting and activating the sperm and providing a carbohydrate-based mechanism to allow species-specific recognition (Vilela-silva et al. 2008). In fact, jelly layers



secrete chemo-attractants that drive sperm swimming, and more than 100 sperm-activating peptides have been identified in the egg-jelly of various sea urchin species (Darszon et al. 2005).

Two of these peptides are known as Resact, isolated from *Arbacia punctulata*, and Speract, purified from *Strongylocentrotus purpuratus*. They bind to their respective receptors that are placed on the sperm's outer membrane and trigger changes in sperm metabolism and motility by regulating its membrane potential (Darszon et al. 2005). Sperm swimming toward the egg is controlled by flagellar curvature modifications, which depend on oscillations in the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration  $[Ca^{2+}]_i$  (Böhmer et al. 2005). The egg-jelly is also responsible for the induction of the acrosome reaction of the sperm (Santella et al. 2012). In *S. purpuratus*, fucose-sulfate polymers are the jelly-coat specific components prompting acrosome reaction (SeGall and Lennarz 1979), a process that can be separated in consecutive phases (Vacquier 2012). First, the outer acrosomal membrane fuses with the plasma membrane of the sperm head, triggering actin polymerization. Then, the acrosomal vesicle releases its contents. Finally, the Bindin protein present on the acrosomal membrane is exposed to the egg surface. The acrosome reaction is essential for fertilization and ensures that it only occurs between gametes of homologous species. Fucose-sulfate polymers are central components of the egg-jelly, and their diversity seems to confer specificity to egg and sperm interactions (Pomin 2015).

The most remarkable and accurate observations of Derbès concern the establishment of the fertilization envelope. He documented the effects elicited by sperm on the egg for the first time, including the separation of the vitelline membrane from the egg plasma membrane. He interpreted the formation of this fertilization envelope as a landmark of fertilization (Derbès 1847), and high school, community college and university practical courses still use fertilization envelope elevation as the first visible sign of sperm-mediated egg activation (Vacquier 2011). Ernest Everett Just proposed that fertilization envelope elevation occurs within one minute after sperm-egg fusion and acts as a mechanical block to polyspermy (Just 1919) (reviewed in Byrnes and Newman 2014). E. E. Just was an African American cell biologist and embryologist of international renown who can be considered an early ecological developmental biologist (Just 1939) (reviewed in Byrnes and Eckberg 2006). Fertilization envelope elevation is accomplished by the cortical granule reaction occurring at the egg's surface. Several organelles are present on the cortex of unfertilized eggs, including cortical granules (Vacquier 1975), acidic vesicles (Sardet 1984; Morgan 2011) and endoplasmic reticulum (Sardet 1984). Cortical granules, about 1  $\mu\text{m}$  in diameter, are especially abundant and are present immediately beneath the cytoplasmic membrane. Following sperm entry, their content is released into the space between the cell membrane and the structured mesh of proteins that forms the vitelline envelope. This exocytosis process releases several biological compounds. A trypsin-like protease called cortical granule

serine-protease digests the proteins linking the cell membrane to the vitelline membrane and degrades the Bindin receptors, immediately removing any sperm (Haley and Wessel 1999). However, the cortical granules also release mucopolysaccharides, highly hydrophilic compounds generating an osmotic gradient that pumps water into the space between the cell membrane and the vitelline membrane, which swells and detaches from the egg (reviewed in the textbook Gilbert 2006). Finally, a peroxidase enzyme present in the cortical granules hardens the fertilization envelope by crosslinking the tyrosine residues of neighbouring proteins (Foerder and Shapiro 1977; Wong et al. 2004).

In 1876, Oskar Hertwig published the first observations indicating that only one sperm enters the egg during fertilization (Hertwig 1876; Fol 1879). Using the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* (named at the time *Toxopneustes lividus*), he was also the first to observe the fusion of egg and sperm pronuclei (Hertwig 1876; Clift and Schuh 2013). Three years later, Hermann Fol further characterized the mechanism of sperm entry and made similar observations, primarily the gametes from the starfish *Marthasterias glacialis* (named at the time *Asterias glacialis*) and to a lesser extent *Paracentrotus lividus* (Fol 1879). Ever since, technical developments in optical microscopy have made it possible to refine these observations, and ultimately electron microscopy has enabled ultrastructural investigation of sea urchin fertilization. The surface of the fertilized egg changes abruptly during cortical granule exocytosis. Two minutes after insemination, actin filaments assemble and participate in the formation of the so-called fertilization cone (Tilney and Jaffe 1980). In *Arbacia punctulata*, the sperm passes through this structure, makes a 180° U-turn and comes to rest lateral to its penetration site (Longo and Anderson 1968). This process has been carefully documented using scanning electron microscopy (Schatten and Mazia 1976). The male pronucleus and its centriole separate from the mitochondria and flagellum, which then disassemble in the cytoplasm. According to Monroy (Monroy 1986), Friedrich Meves was the first to observe that sperm mitochondria do not proliferate in the egg, leading him to propose that embryonic mitochondria have a maternal origin (Meves 1912). After mitochondria and flagellum dissolution, the centriole localizes between the male pronucleus and the egg pronucleus. This centriole extends its microtubules to form an aster so that the two pronuclei migrate toward each other and occupy a central position in the egg, where karyogamy proceeds. DNA synthesis can occur during the migration of the two pronuclei or after their fusion into the zygote nucleus (Gilbert 2006). Centrosome inheritance in echinoderms is exclusively paternal (Zhang et al. 2004). The two sperm centrioles duplicate concomitantly with DNA synthesis and end up producing the centrosomes that will steer embryonic development (Longo and Plunkett 1973; Sluder 2016).

Embryonic development proceeds normally only if a single sperm enters the egg. Fertilization by two sperms leads to a triploid nucleus, where each sperm's centriole divides independently to form four centrosomes. Theodor

Boveri already observed in 1902 that dispermic sea urchin eggs develop abnormally or die, and based on these observations, he was the first scientist to speculate that malignant tumours could be the consequence of an abnormal chromosome constitution (Boveri 1902, translated in Boveri 2008; Maderspacher 2008; Scheer 2018). His contributions to the elucidation of the role played by chromosomes as the vectors of the genetic inheritance are widely acknowledged among cell biologists.

### 17.1.2 SEA URCHIN'S CONTRIBUTION TO OUR UNDERSTANDING OF THE ROLE PLAYED BY CALCIUM SIGNALLING DURING FERTILIZATION

The term “egg activation” designates the multiple changes—both biochemical and morphological—that transform the egg cytoplasm after sperm penetration and prepare the cell for mitosis. In sea urchins, egg meiotic maturation occurs in the female gonads before gamete spawning. Thus, the activation of the sea urchin egg, which already possesses a haploid pronucleus, is independent of meiotic maturation. The events triggered by the activation of the sea urchin egg can be classified as early responses, occurring within seconds, and late responses, taking place several minutes after fertilization (Allen and Griffin 1958; Gilbert 2006). The early responses include the fast block of polyspermy and the exocytosis of the cortical granules. Among the late responses, we can cite the activation of mRNA translation and the duplication of DNA. Strikingly, all these events can occur independently of fertilization and are also triggered by artificial activation or parthenogenesis, which was discovered in the sea urchin by Jacques Loeb (Loeb 1899; Monroy 1986). Analyzing the effect of ions on the sea urchin egg, he observed that a treatment with a hypertonic solution of  $MgCl_2$  provokes the elevation of the fertilization envelope (Loeb 1899). As Monroy points out (Monroy 1986), Loeb's work prompted Otto Heinrich Warburg to use sea urchins to develop his work on oxygen consumption in living cells (Warburg 1908). He observed that the fertilization of sea urchin eggs resulted in a rapid and nearly six-fold increase in oxygen consumption. Refining this observation to the metabolic abnormalities of cancer cells, Warburg was awarded the Nobel Prize in 1931 for his discovery of the “nature and mode of action of the respiratory enzyme”. In the context of fertilization, a specific NADPH oxidase of the egg's surface uses oxygen and produces a burst of hydrogen peroxide (Wong et al. 2004; Finkel 2011). Rather than damaging the egg, the hydrogen peroxide hardens the fertilization envelope and contributes to blocking polyspermy.  $H_2O_2$  is produced by a  $Ca^{2+}$ -dependent mechanism that involves the reduction of one molecule of oxygen and the oxidation of two proton donors. Parthenogenetic activation by A23187 ionophore is sufficient to trigger this oxidative burst by using free cytosolic calcium (Wong et al. 2004).

The hypothesis of  $Ca^{2+}$  release following sea urchin fertilization was first proposed in the mid-20th century (Mazia 1937). The  $Ca^{2+}$  ion is essential for egg activation in all metazoans but more specifically in marine invertebrate

deuterostomes, which has been extensively discussed (Runft et al. 2002; Whitaker 2006; Ramos and Wessel 2013; Costache et al. 2014; Swann and Lai 2016). Calcium release triggered by fertilization or ionophore treatment was first demonstrated in sea urchin eggs using the luminescent calcium sensor aequorin (Steinhardt and Epel 1974; Steinhardt et al. 1977). Two independent types of  $Ca^{2+}$  waves have been observed following fertilization in sea urchins. The first one, a small initial cortical flash, results from an action potential-mediated influx of extracellular  $Ca^{2+}$ . A second cytosolic wave, due to the release of  $Ca^{2+}$  from the intracellular stores, begins at the sperm entry point and travels throughout the cytoplasm to encompass the entire egg (Parrington et al. 2007; Whitaker and Steinhardt 1982). The initial cortical flash does not automatically provoke the second  $Ca^{2+}$  wave, which is a distinct process exclusively triggered by sperm arrival. Notably, fertilization elicits a single  $Ca^{2+}$  wave in the sea urchin, whereas it provokes multiple  $Ca^{2+}$  oscillations in ascidians and mammals (Whitaker 2006; Sardet et al. 1998; Dupont and Dumollard 2004).

Research into the mechanisms triggering the calcium wave in sea urchins has given rise to abundant literature (reviewed in Ramos and Wessel 2013). Just after fertilization, the  $Ca^{2+}$  rise occurs as a result of inositol 1,4,5-triphosphate (IP3)-mediated release of  $Ca^{2+}$  from the endoplasmic reticulum (Terasaki and Sardet 1991). Other intracellular second messengers, including nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP), cyclic ADP-ribose (cADPR) and nitric oxide (NO), were shown to increase at fertilization and could trigger  $Ca^{2+}$  release (Kuroda et al. 2001). However, in contrast to IP3, none of these second messengers is indispensable to the fertilization wave in the sea urchin egg.

### 17.1.3 SEA URCHIN EGG ABUNDANCE AND SYNCHRONOUS EARLY EMBRYONIC DEVELOPMENT ARE OPTIMAL FOR BIOCHEMISTRY AND CELL BIOLOGY ANALYSES

Unfertilized sea urchin eggs are physiologically blocked at the G1 stage of the cell cycle. Fertilization thus triggers entry into the S-phase and completion of the first mitotic division. Thanks to the large number of cells that can be recovered from a single female and their embryonic mitotic division synchronicity, these gametes have been crucial for the development of biochemical approaches studying cell cycle progression and protein translation (Evans et al. 1983; Humphreys 1969).

Unravelling the mechanisms controlling protein synthesis has been a central area of research in the 20th century (Thieffry and Burian 1996). In the 1940s, it was generally admitted that thymonucleic acid (DNA) existed only in animals and zymonucleic acid (RNA) in plants. However, Jean Brachet was the first biologist to localize both nucleic acids first in sea urchin and then in other animals (Brachet 1941). This critical observation led him to conclude that both

nucleic acids could be present in all cells. To study this issue, Jean Brachet made several visits to the Biological Station of Roscoff, and he liked to describe the exciting atmosphere of this place in the early 30s (Brachet 1975). His results led him to suggest that there is a strong correlation between RNA levels and protein synthesis activity. Sea urchin eggs thus played a crucial role in demonstrating that RNAs are present in all cells and that they are implicated in the synthesis of proteins, as proposed by the central dogma of Francis Crick (DNA makes RNA, which in turn makes protein).

Sea urchin eggs permeability to radioactive precursors has helped elucidate the mechanisms controlling protein synthesis in relationships with the entry into mitosis in response to fertilization. Incorporation of exogenous amino acids into protein occurs only after fertilization in sea urchin. Indeed, RNA synthesis is negligible both before and after fertilization (Schmidt et al. 1948). Moreover, the inhibition of RNA transcription by actinomycin D alters neither protein synthesis rate nor the first mitotic divisions of early sea urchin embryos (Gross and Cousineau 1963), demonstrating that the zygotic genome activity is not required for early protein synthesis (Gross et al. 1964). These observations indicated for the first time that maternal mRNAs are already present in unfertilized eggs and strongly supported the notion that their translation is tightly controlled. Furthermore, the work of Hultin showed that the synthesis of specific proteins is required for mitosis entry (Hultin 1961), heralding the future discovery of Cyclins (Ernst 2011).

In late July 1982, once the teaching in the Woods Hole Marine Station was over and the sea urchin season was coming to an end, Tim Hunt performed the critical experiment that led to the discovery of Cyclins (Hunt 2002). Cyclins form complexes with Cyclin-dependent kinases (CDKs), a family of conserved serine/threonine kinases that phosphorylate substrates throughout the cell cycle (reviewed in Malumbres 2014). Before working on cell cycle control, Tim Hunt was interested in the regulation of protein synthesis. He wanted to compare the protein synthesis rates observed in normally fertilized and parthenogenetically activated eggs, using the calcium ionophore A23187. For this purpose, he studied the sea urchin *Arbacia punctulata*. Adding [<sup>35</sup>S] methionine to an egg suspension and separating proteins by gel electrophoresis, he produced an autoradiogram where one specific band, which was later identified as a Cyclin, showed an unexpected behaviour (Evans et al. 1983). Whereas most bands became stronger and stronger with time, this protein accumulated after fertilization but disappeared rapidly just before blastomere cleavage. In 2001, Tim Hunt shared the Nobel Prize in physiology or medicine with Leland Hartwell and Paul Nurse for discovering the key regulators of the cell cycle.

#### 17.1.4 EMBRYONIC AND LARVAL DEVELOPMENT OF THE SEA URCHIN IN THE AGE OF MOLECULAR BIOLOGY

In the late 60s and early 70s, the rapid expansion of molecular biology was about to impact all the biology domains, including developmental biology. Notably, the first eukaryotic gene fragment isolated and introduced into the bacteria *E. coli*

was obtained from unfractionated DNA from *Lytechinus pictus* and *Strongylocentrotus purpuratus* (Kedes et al. 1975). These fragments encoded for histones, making these sea urchin genes the first protein-coding eukaryotic genes ever cloned (Ernst 2011).

The study of sea urchin has provided many descriptions of developmental gene regulatory networks (dGRNs). These logic structures depict the sequential regulatory events determining cell fate in different tissues and embryonic layers. The genes involved in dGRNs encode for transcription factors and components of signalling pathways but also for effector genes acting downstream of cell fate determinants and for different cell state-specific markers. The configuration adopted by dGRNs, based on empirical data, provides a dynamic picture of the genetic interactions controlling spatial and temporal aspects of development (Martik et al. 2016). dGRNs are thus predictive and testable models which help in understanding why and when developmental functions take place. The dGRN controlling the specification of *S. purpuratus* endodermal and mesodermal layers was originally described before its genomic sequence was available (Davidson 2002). However, with the completion of the sea urchin genome (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al. 2006), these original descriptions have never ceased to be enriched with new components and functional data (Davidson 2006; Oliveri et al. 2008; Su et al. 2009; Saudemont et al. 2010; Peter and Davidson 2010; Li et al. 2014). Different diagrams of dGRNs are available on the E. H. Davidson's laboratory webpage (<http://grns.biotapestry.org/SpEndomes/>). Eric Davidson was a US developmental biologist working at the California Institute of Technology and an inspiring figure for the community of developmental biologists, particularly those working with multicellular marine organisms (Ben-Tabou de-Leon 2017). He is renowned for his pioneering work on the characterization of regulatory networks and their roles in body plan evolution.

Here, we will summarize the mechanisms that initiate cell specification and the establishment of the main layers of the sea urchin embryo. More complete descriptions of these dGRNs are available in reviews (Arnone et al. 2015; Martik et al. 2016; Ben-Tabou de-Leon 2016). In sea urchins, the embryonic body plan is rapidly established after fertilization. At the 16-cell stage, maternal inputs plus zygotic transcription determine at least three distinctive dGRN states that control ectoderm, endoderm, and micromere determination (Martik et al. 2016). Ectoderm emanates from the animal pole, and endoderm and mesoderm derive from the vegetal pole. The canonical Wnt- $\beta$ -catenin signalling pathway is involved in primary axis formation and endoderm specification (Wikramanayake et al. 1998; Logan et al. 1999; Wikramanayake et al. 2004).  $\beta$ -catenin is active in the vegetal pole and controls polarization along the animal-vegetal axis. When  $\beta$ -catenin enters the nucleus, it forms an active complex with the transcription factor Tcf, which initiates the specification of endoderm in the sea urchin vegetal half. At the 16-cell stage, the future endoderm and mesoderm are still assuming a common endomesodermic identity. A Delta-Notch signal controls the separation of these two embryonic



territories. The Delta-ligand expression is activated indirectly by the  $\beta$ -catenin-Tcf input in the skeletogenic mesoderm (Oliveri et al. 2008). Cells receiving the Delta signal are specified as mesoderm, and the others acquire an endodermal fate (Sherwood and McClay 1997; Sherwood and McClay 1999; Sweet et al. 2002). The reception of Delta in the cells initiates the expression of the transcription factor GCM (*glial cell missing*) (Ransick and Davidson 2006; Croce and McClay 2010). Then, a triple positive feedback circuit involving GCM, GataE and Six1/2 is responsible for GCM expression maintenance in the mesoderm (Ransick and Davidson 2012; Ben-Tabou de-Leon 2016). Once the original endomesoderm and ectoderm GRN states are defined, further specification and signalling come into play to generate at least 15 different cell types, which are already distinguishable by early gastrulation (Peter and Davidson 2010; Peter and Davidson 2011; Martik et al. 2016).

For instance, the dorsal–ventral (DV) axis, also referred to as the oral–aboral axis, is morphologically distinguishable at the gastrula stage (Cavalieri and Spinelli 2015) and forms thanks to the activity of the Nodal and BMP ligands, which specify respectively ventral (oral) and dorsal (aboral) ectoderm (Duboc et al. 2004; reviewed in Molina et al. 2013). Nodal activates the expression of the BMP2/4 in the ventral ectoderm, but it also elicits the production of Chordin, which blocks the activation of the BMP receptors in this region. BMP2/4 of ventral origin can then diffuse to the dorsal side (Lapraz et al. 2009), where it specifies dorsal fates activating the phosphorylation of the transcription factor Smad1/5/8 (Floc’hlay et al. 2021).

In sea urchins, activation of the zygotic genome begins at the 16-cell stage. Thus, previous development is driven by maternal factors (reviewed in Kipryushina and Yakovlev 2020). Among the post-transcriptional processes involved in early embryonic development, mRNA translation regulation deserves particular attention (Morales et al. 2006; Cormier et al. 2016). By polysome profiling and RNA sequencing, the translome, which gives a complete picture of the polysomal recruitment dynamics, has been investigated in the sea urchin *P. lividus* (Chassé et al. 2017). This translome represents the first step to an inclusive analysis of the translational regulatory networks (TRNs) that control the egg-to-embryo transition as well as the early events patterning the sea urchin embryo (Chassé et al. 2018). Future challenges for sea urchin embryology will include deciphering the molecular mechanisms linking TRN and dGRN activities after fertilization.

## 17.2 ECHINODERM PHYLOGENY

The echinoderms are an ancient and successful taxon of marine animals grouping together more than 10,000 living species. The first representatives of this phylum, which has left behind an extensive fossil record, have been found in the Cambrian Stage 3 (520 Mya) (Zamora et al. 2013). The echinoderms are deuterostome organisms belonging to the Ambulacraria clade, which also includes the Hemichordata (Figure 17.1). Estimates based on molecular clocks indicate

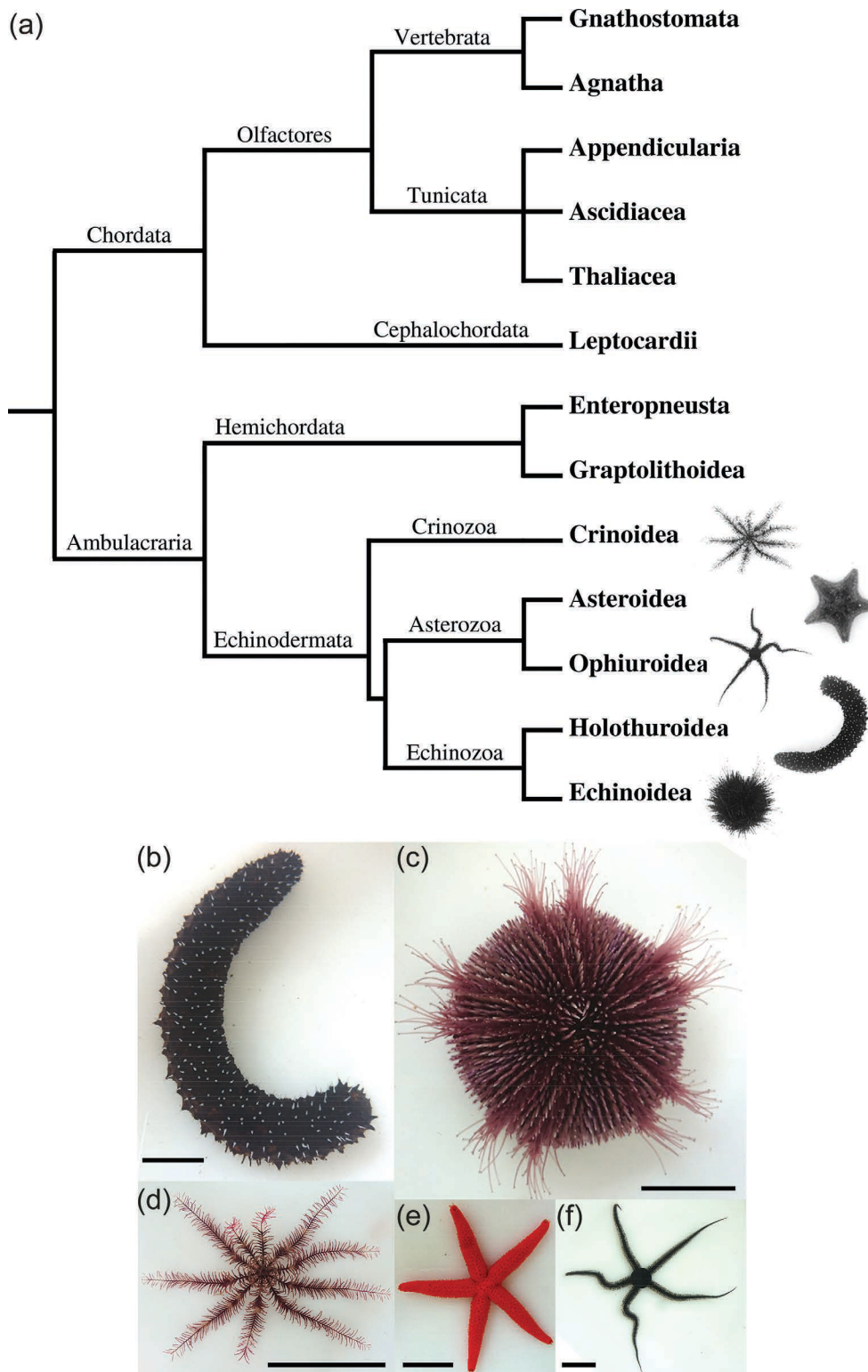
that these two taxa could have separated 580 Mya, during the Ediacaran (Erwin et al. 2011). The other branch of the deuterostomes, the Chordata, split even earlier and gave rise to the cephalochordates, the tunicates and the vertebrates (Lowe et al. 2015; Simakov et al. 2015).

The Paleozoic seas hosted at least 35 separate echinoderm clades presenting extremely diverse body plans. Most of them appeared during the Great Ordovician Biodiversification Event (GOBE), but only five of them made their way into the Mesozoic and have found a place in the modern faunas. These five clades correspond to the Crinoidea (sea lilies and feather stars), the Asterozoa (sea stars), the Ophiurozoa (brittle stars), the Holothurozoa (sea cucumbers) and the Echinozoa (sea urchins). Their representatives are all characterized by a typical pentaradial symmetry that is thought to have secondarily evolved from a bilateral ancestral form (Smith and Zamora 2013; Topper et al. 2019).

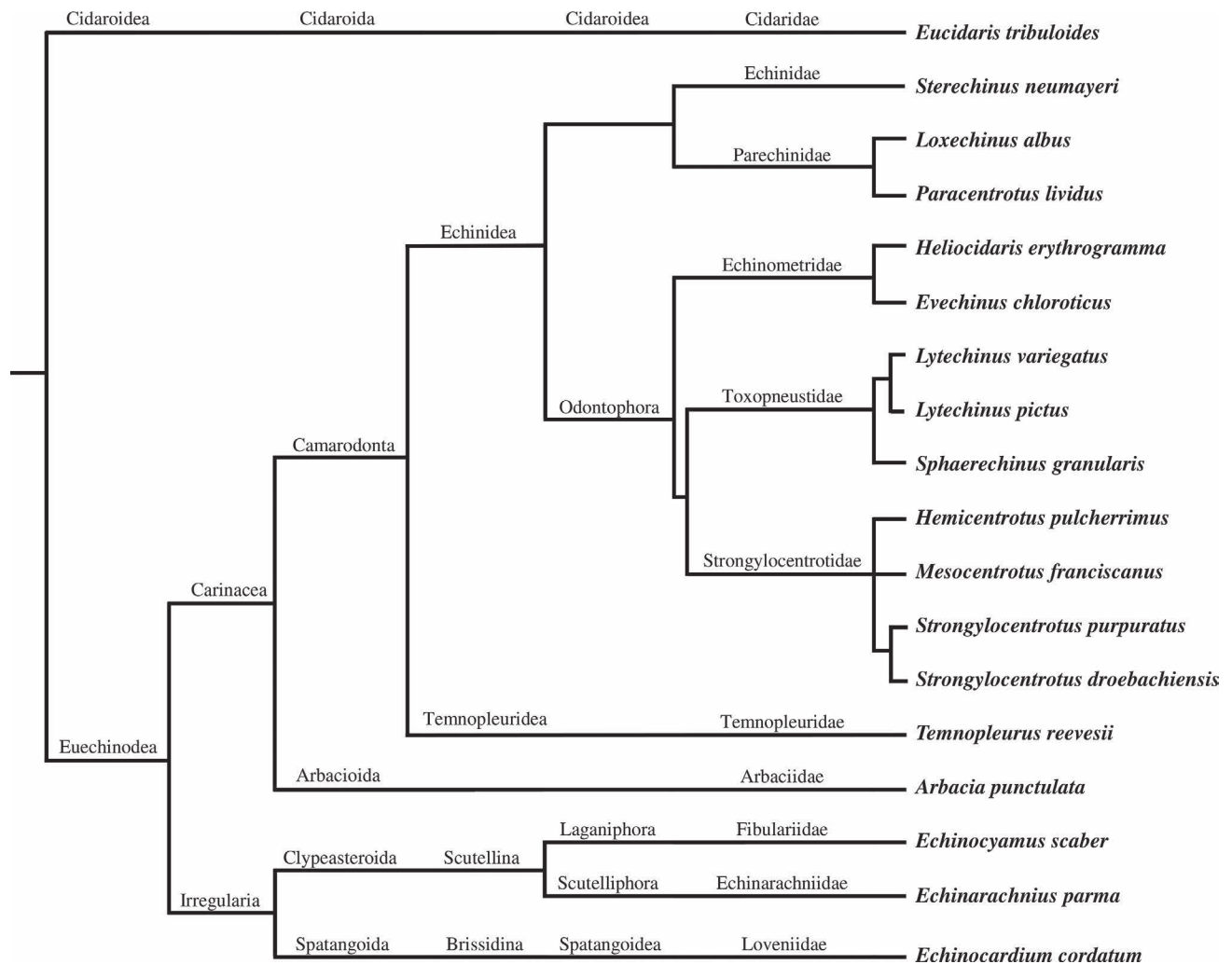
The ancient origin of the different echinoderm groups, which appeared during the Ordovician, has been a major obstacle to ascertaining their phylogenetic relationships. However, recent molecular phylogenies strongly support the so-called Asterozoan hypothesis that places the Ophiurozoa as the sister group of the Asterozoa (Reich et al. 2015; Telford et al. 2014; Cannon et al. 2014). According to these molecular phylogenies, Crinoidea appears as the basal branch of all the Echinoderms, with Holothurozoa being the closest relatives of Echinozoa (Figure 17.1). This last group underwent further diversification during the late Permian, the Mesozoic and the Cenozoic (Kroh and Smith 2010), producing a vast array of forms that have adopted remarkably different lifestyles and have adapted to all sorts of marine environments and climates.

The majority of the Echinozoa currently studied in the laboratory, including several edible species of commercial interest, belong to the order Camarodonta. The presence of this taxon in the fossil record has been dated back to the Miocene (Kroh and Smith 2010), but its different families may have originated earlier during the Middle Eocene and the Oligocene (45–23 Mya) (Láruson 2017). The recent characterization of the mitochondrial genomes and transcriptomes of several Camarodonta representatives (see Figure 17.2) have allowed researchers to establish the phylogeny of this group (Bronstein and Kroh 2019; Láruson 2017; Mongiardino Koch et al. 2018). At the same time, these molecular tools have provided an opportunity to develop comparative genomic approaches aimed at studying the molecular basis of the many anatomical, developmental, physiological and ecological specializations that characterize the different members of this taxon. Indeed, the density of available landmarks allows for the comparison of closely related species, such as the various Strongylocentrotidae representatives (divergence time estimated at 15–10 Mya) but also more distant species, such as the members of the Toxopneustidae, the Echinometridae, the Parechinidae or the Echinidae families (see Figure 17.2).

From a macroevolutionary perspective, these comparisons can nowadays be extended to other sea urchins



**FIGURE 17.1** (a) Deuterostome group taxonomy: The deuterostome group includes two main lineages, Chordata and Ambulacraria. Chordata include cephalochordates, vertebrates and tunicates. Vertebrates are subdivided into Agnatha (e.g., myxines, lamprey) and Gnathostomata, which include Chondrichthyes (e.g., sharks, sawfish) and Osteichthyes (e.g., ray-finned fish, tetrapods). Tunicates are represented by ascidians, larvaceans (appendicularians) and thaliaceans. Ambulacraria include hemichordates and echinoderms, which are subdivided into five classes (crinoids, asteroids, ophiuroids, holothuroids and echinoids). Nodes and branches represent splits between taxa without any relative time reference. Each class of echinoderms is represented by black and white unscaled photographs. (b–f) Living adult representative echinoderms. (b) The holothuroid *Holothuria forskali*; (c) the echinoid *Sphaerechinus granularis*; (d) the crinoid *Antedon bifida*; (e) the asteroid *Echinaster sepositus*; (f) the ophiuroid *Ophiocomina nigra*. Animals were collected and maintained by the Roscoff Aquarium Service at the Roscoff Marine Station, France. Animals are shown at different scales and bars positioned at the bottom represent 5 cm.



**FIGURE 17.2** Echinozoa classification. The taxon of Echinozoa is mostly represented in laboratories by the Camarodonta order, but studies are also made on irregular sea urchins (Irregularia) and the most distant group Cidaroida. Nodes and branches represent speciation without any relative time reference. Each column corresponds to the classification (subclass, infraorder, order, infraorder, superfamily, family, species) identified on the World Register of Marine Species (WoRMS). (From Schwentner et al. 2018.)

commonly used in the laboratory that belong to more distant orders, such as the different members of the genus *Arbacia*, the Scutellina *Echinarachnius parma* (sand burrowing sea urchin) and the primitive forms of the order Cidaroida, a basal group that separated from the rest of Echinozoa during the late Permian (250 Mya) (Kroh and Smith 2010). Notably, a draft of the genomic sequence of the Cidaroida *Eucidaris tribuloides* is also available, allowing comparisons with the two fully sequenced Camarodonta *Strongylocentrotus purpuratus* and *Lytechinus variegatus* (Kudtarkar and Cameron 2017).

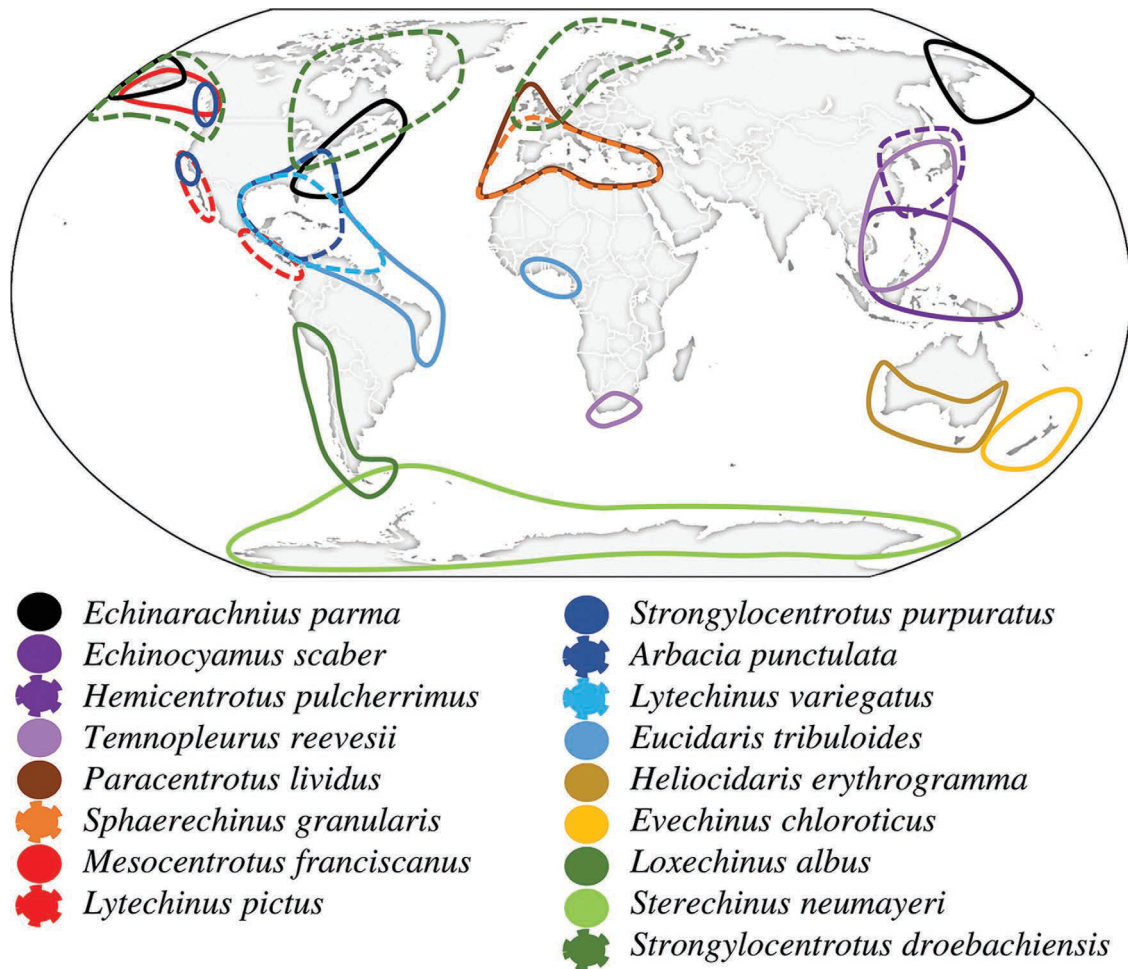
### 17.3 GEOGRAPHICAL LOCATION OF ECHINODERMS

Echinoderms, with their large diversity of species (>2,000 Asterozoa, >2,000 Ophiurozoa, >600 Crinozoa, >4,000 Echinozoa and >1,700 Holothurozoa species) inhabit all

the oceans and seas of the planet (see Figure 17.3). This group is exclusively marine and is absent from freshwater, although some species can be found in brackish waters (Pagett 1981).

Echinoderms are benthic, and some are considered sub-soil species, since they can burrow a few tens of centimetres in the sand (e.g., *Echinocardium cordatum*). Echinoderms have managed to adapt to a wide variety of environments, ranging from the warm waters of the tropics to the coldest waters of the poles (McClintock et al. 2011). For instance, all five classes of echinoderms are present in the Arctic Ocean (Smirnov 1994), and the Antarctic Ocean hosts the sea urchin *Sterechinus neumayeri*, which is studied for its biological mechanisms adapted to sub-zero temperatures (Pace et al. 2010). Echinoderms are also found at all depths, with some sea urchins inhabiting environments as deep as 7,300 meters (Mironov 2008), starfish and brittle stars at 8,000 m (Mironov et al. 2016) and feather stars at 9,000 m (Oji et al.





**FIGURE 17.3** Geographic distribution of the main sea urchin species cited in this chapter. Geographical locations represent the major place where each species is found. Particular single occurrences in other areas can be found in the World Register of Marine Species (WoRMS). The cryptic species *Echinocardium cordatum* is widely distributed on the planet (not shown on the figure for clarity), divided into four distinct geographical lineages: one in the north-east and north-west Atlantic Ocean, one in the Mediterranean Sea and the north-east Atlantic Ocean, one in the Mediterranean Sea and one in the North and South Pacific Ocean avoiding the equatorial zone. Close colour shapes do not represent a taxonomic relationship between species but are here to help distinguish between species in the same region. (From Horton et al. 2020; Chenuil and Feral 2003; Egea et al. 2011.)

2009). Holothurians are though the record holders, as some specimens have been observed below 10,000 m (Mironov et al. 2019).

The most popular species in the laboratories (*A. punctulata*, *P. lividus*, *S. purpuratus*, *L. variegatus*, *L. pictus*, *H. pulcherrimus*) come mainly from the northern hemisphere. However, sea urchin species have been described in all oceans, including the Indian Ocean, the deep Pacific and the Arctic (Smirnov 1994; Price and Rowe 1996; Rowe and Richmond 2004; Filander and Griffiths 2017; Mironov et al. 2015; Mulochau et al. 2014). Other species cited in this chapter (e.g., *S. granularis*, *H. erythrogramma*, *S. neumayeri*, *M. franciscanus*, *S. droebachiensis*) illustrate different aspects of sea urchin diversity and facilitate the study of many biological questions, from phylogeny, adaptation and evolution to species conservation, community interactions and ecology.

## 17.4 SEA URCHIN LIFE CYCLE

Sea urchins are gonochoric with an average sex ratio of 1:1. Both sexes release their gametes (eggs or sperm) directly into the water column once a year, although in some species, a second period of spawning has also been reported, such as in *Paracentrotus lividus* (González-Irusta et al. 2010). In this animal, the mature season varies from January to June, and the spring equinox usually marks the height of the breeding season. In all echinoderms, the reproductive cycle and time of breeding (Table 17.1) may fluctuate, based on geographical (Figure 17.3) and local conditions. For example, *P. lividus* is found in the Mediterranean Sea and in the eastern Atlantic Ocean, from Scotland and Ireland to Southern Morocco and the Canary Islands. This species lives mainly in areas where winter water temperatures range from 10–15°C and summer temperatures from

**TABLE 17.1**  
**Breeding Season and Egg Diameter in Different Echinoidea Species**

Echinoidea Species	Breeding Season	Egg Diameter	References
<i>Eucidaris tribuloides</i>	—	94 µm	(McAlister and Moran 2012; Lessios 1988; Lessios 1990)
<i>Sterechinus neumayeri</i>	September–November	180 µm	(Bosch et al. 1987; Stanwell-Smith and Peck 1998)
<i>Paracentrotus lividus</i>	May–September (AO) April–June and September–November (MS)	75 µm	(Hamdoun et al. 2018; Ouréns et al. 2011; Rocha et al. 2019; Byrne 1990)
<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	November–February (SEA) February–May (SWA)	400–450 µm	(Binks et al. 2012; Foo et al. 2018; Raff 1987)
<i>Evechinus chloroticus</i>	November–February	—	(Delorme and Sewell 2016)
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	January–March	—	(Kiyomoto et al. 2014)
<i>Mesocentrotus franciscanus</i>	June–September	130 µm	(Bernard 1977; Bolton et al. 2000)
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	November–March	80 µm	(Bolton et al. 2000; Hamdoun et al. 2018)
<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	March–May	145 µm	(Himmelman 1978; Levitan 1993; Meidel and Scheibling 1998)
<i>Lytechinus variegatus</i>	May–September	100 µm	(Hamdoun et al. 2018; Lessios 1990, 1988; Schatten 1981)
<i>Lytechinus pictus</i>	May–September	120 µm	(Hamdoun et al. 2018)
<i>Sphaerechinus granularis</i>	April–June (Brittany) June–November (MS)	100 µm	(Guillou and Lumingas 1998; Guillou and Michel 1993; Vafidis et al. 2020)
<i>Temnopleurus reevesii</i>	July–January	100 µm	(Hamdoun et al. 2018)
<i>Arbacia punctulata</i>	June–August	69 µm	(Bolton et al. 2000; Gianguzza and Bonaviri 2013)
<i>Echinarachnius parma</i>	March–July (NWP)	110–135 µm	(Costello and Henley 1971; Drozdov and Vinnikova 2010; Summers and Hylander 1974)
<i>Echinocardium cordatum</i>	May–July (NWP) April–October (MS) May–October (AO)	110 µm	(Drozdov and Vinnikova 2010; Egea et al. 2011; Hibino et al. 2019)

AO: Atlantic Ocean, MS: Mediterranean Sea, NWP: North-West Pacific Ocean, SWA: South-West Australia, SEA: South-East Australia

18–25°C. Several factors, like temperature, photoperiod, resource availability and water turbulence contribute to the regulation of gametogenesis in these populations (Gago and Luís 2011). On the other hand, records from the North Pacific, Arctic and North Atlantic Oceans show that spawning of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* may also be synchronized with the spring phytoplankton increase (Himmelman 1978; Starr et al. 1990). However, the main environmental factors triggering spawning and the molecular mechanisms that mediate this response are not yet known.

During the reproductive cycle, *P. lividus* gonads go through different development stages, which have been exhaustively characterized (Byrne 1990). Observation of gametogenesis in *P. lividus* through histological examinations allows us to classify the annual reproductive cycle of this species in six developmental stages: 1) recovery, 2) growing, 3) premature, 4) mature, 5) partly spawned and 6) spent. In turn, in *Strongylocentrotus droebachiensis*, four stages have been recognized by examining the activity of the two main cell populations composing the germinal epithelium (Walker et al. 2007, 2013). These populations are the germinal cells, which are either ova in the ovary or spermatogonia in the testis, and a group of somatic cells called nutritive phagocytes (NPs), which are functionally equivalent to the vertebrate Sertoli cells and are present

in both sexes. Stage 1, called inter-gametogenesis, occurs directly after spring spawning and lasts for about three months. Residual reproductive cells are present, but otherwise, the gonads look empty. Toward the end of this stage, NP cells increase in number and resume nutrient storage, doubling their size by the end of this phase. In addition, reproductive cells begin to appear. NPs are involved in the phagocytosis of residual ova and spermatozoa, and thus participate in the recycling of derived nutrients. Stage 2 is called pre-gametogenesis and NP renewal. This stage begins in summer and lasts for approximately three to four months. Reproductive cells, present at the periphery of the gonad, increase both in number and size. Stage 3, gametogenesis and NP utilization, takes place during five winter months. The reproductive cells continue to develop and migrate into the centre of the gonad. Conversely, the NPs cells shrink, and their number decreases. Stage 4 corresponds to pre-spawning and spawning. This stage occurs in late winter and lasts around three months. The lumen of the gonad is packed with fully differentiated gametes, and the NP cells are barely observable. At the end of stage 4, spawning occurs, and gametes are released from the gonads by the gonopores.

Several holistic approaches have been generated to understanding the molecular mechanisms of gametogenesis and the events of the life cycle. Whole-genome and Q-PCR



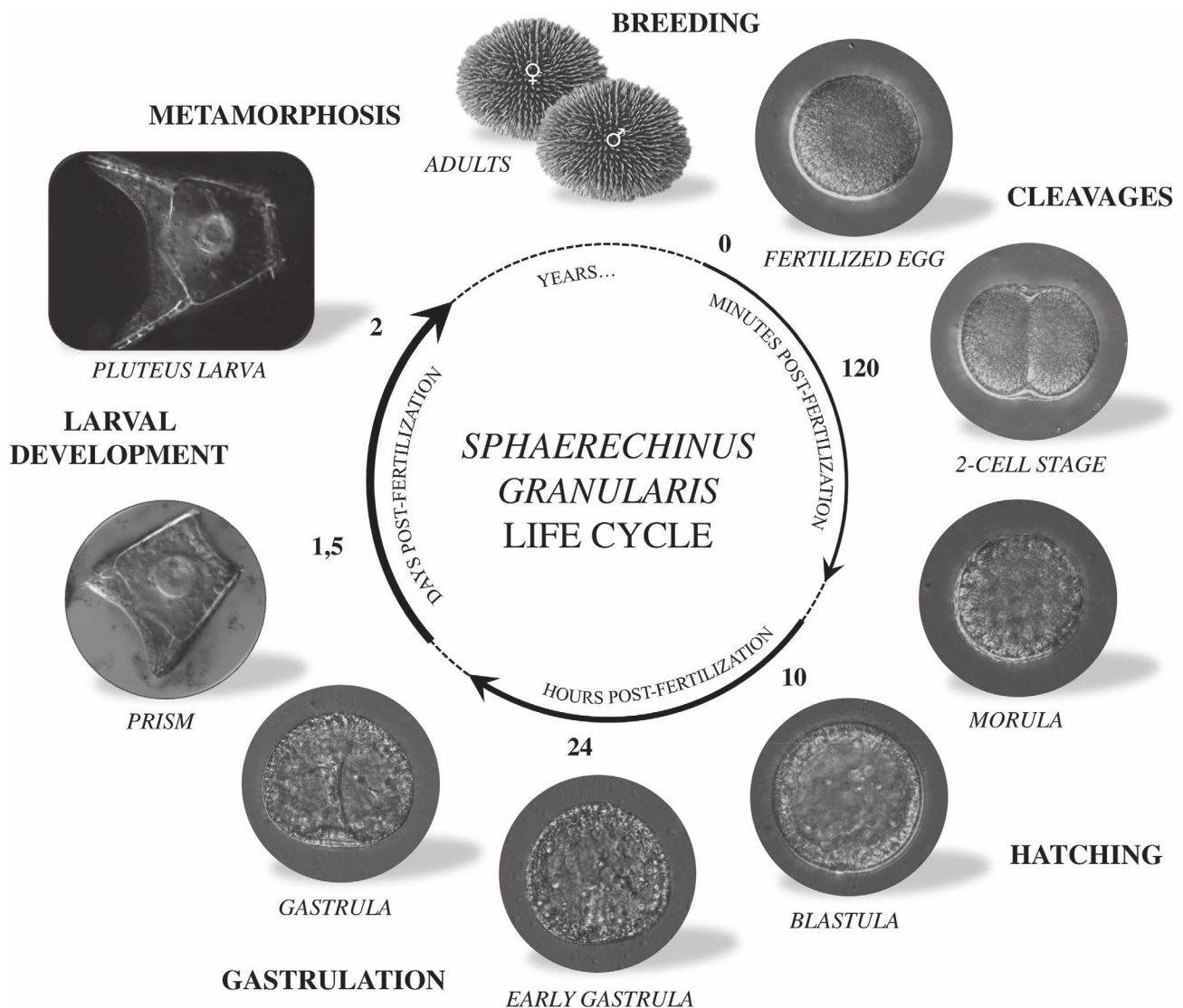
data have been obtained to identify genes expressed by *S. purpuratus* during oogenesis (Song et al. 2006). A general picture of protein abundance changes occurring during *P. lividus* gonad maturation has been generated by the proteomic approach (Ghisaura et al. 2016).

In Figure 17.4, we show the life cycle of the sea urchin *Sphaerechinus granularis*, which can be found at high densities in some locations of Brittany, such as the Glénan Islands and the Bay of Concarneau (Guillou and Michel 1993). However, captured adults maintained in appropriate conditions can release a large number of gametes from September to early July. Consequently, the availability of mature adults during most of the year makes this species a choice organism for cellular and biochemical studies (Feizbakhsh et al.

2020; Chassé et al. 2019). In the laboratory, gamete spawning may be induced artificially using several methods, such as intracoelomic injection of 0.1 M acetylcholine or of 0.5 M KCl. During the breeding season, when adults are mature, the expulsion of a small number of gametes may be obtained by a gentle shaking or by weak electrical stimulation, which facilitates the sexing of different individuals.

## 17.5 SEA URCHIN EMBRYOGENESIS

Sea urchins were one of the first animals to be used for embryological studies, that is, the development of a multicellular organism from a single cell (the fertilized egg) (reviewed in Ettensohn 2017). Therefore, the particular



**FIGURE 17.4** Life cycle of the sea urchin *Sphaerechinus granularis*. The sea urchin life cycle is composed of three periods of time with embryology (cleavages, hatching, gastrulation) taking minutes to hours, larval development taking days and growing individuals following the metamorphosis taking years. *Sphaerechinus granularis* development is synchronous, and times are noted. Microscopy pictures of *S. granularis* stages were taken with DIC filter on a Leica DMi8 microscope. Fertilized egg diameter is around 100  $\mu\text{m}$  ( $\times 20$  objectives) and slightly increases to prism and pluteus larva stage ( $\times 40$  objectives). (From Delalande et al. 1998.)

development of a large set of species has been characterized in detail (see Table 17.2 and reviewed in Arnone et al. 2015; Hamdoun et al. 2018).

Sea urchin eggs are typically 80–200 µm in diameter and present an evenly distributed yolk (isolecithal; see Table 17.1). When released through the female gonoducts, unfertilized eggs are blocked at the G1 stage of the cell cycle, having completed their meiotic maturation in the ovary. Unfertilized eggs are polarized along a primordial axis, the animal–vegetal axis (A-V), which is specified during oogenesis and consequently is maternally established (Goldstein and Freeman 1997). Classically, the position of the animal pole corresponds to the extrusion site of the polar bodies. In some batches of *Paracentrotus lividus* eggs, a pigment band, initially described by Theodor Boveri (Schroeder 1980) and corresponding to a subequatorial accumulation of pigment granules, can be used as a visible marker of A-V polarity (Sardet and Chang 1985). A surface blister marking the animal pole has also been described in *Echinocardium cordatum* (Sardet and Chang 1985).

Bisection of an unfertilized egg through the equator, followed by independent fertilization of the two halves, results

in an animal half that gives rise to an undifferentiated epithelial ball and a vegetal half that develops into a relatively normal pluteus (Horstadius 1939; Maruyama et al. 1985). The fates of the two halves are explained by the presence of genetic determinants in the vegetal pole and the subsequent participation of regulative interactions that implement the formation of the missing animal blastomeres in the vegetal half (reviewed in Angerer and Angerer 2000; Kipryushina and Yakovlev 2020).

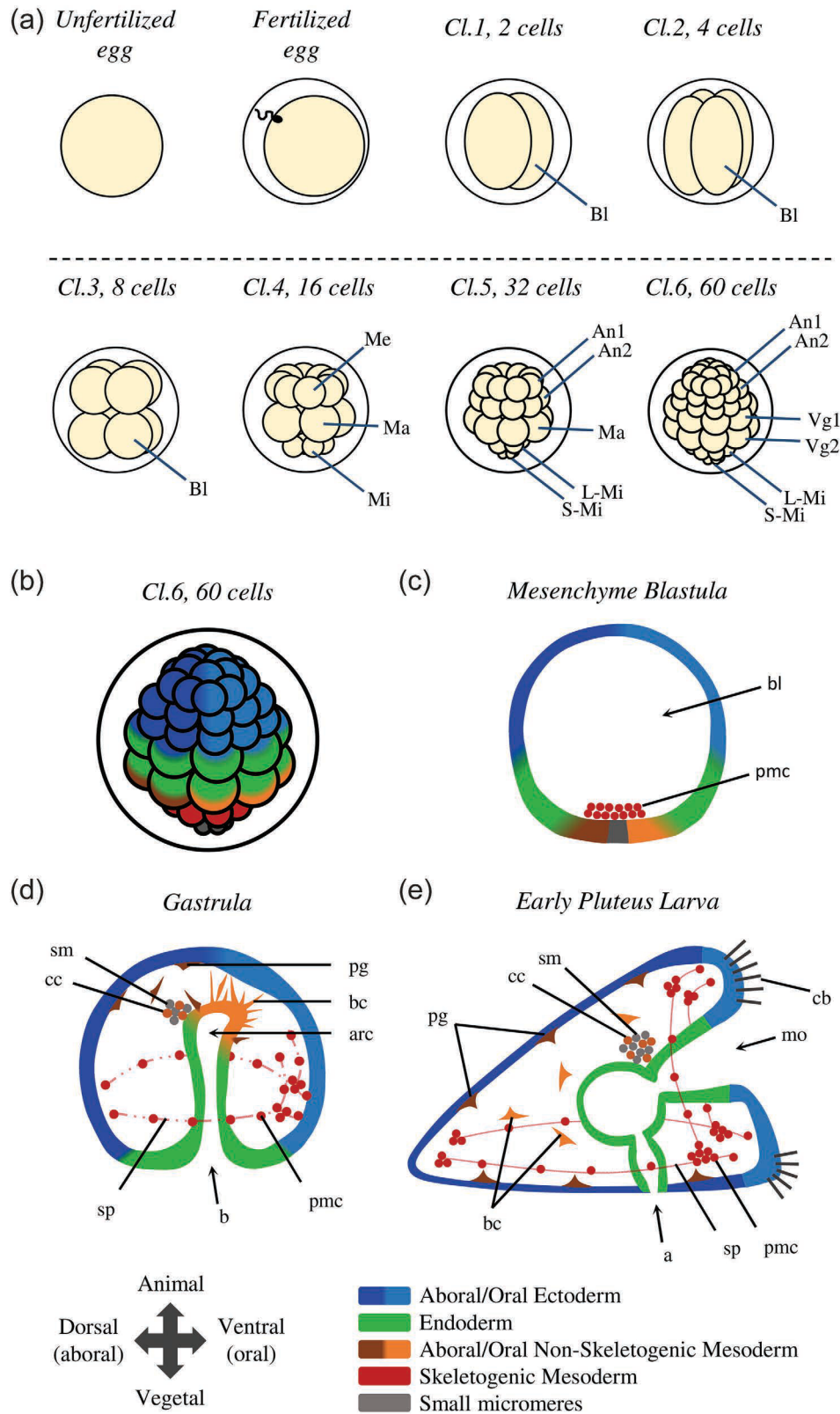
Sea urchin embryos exhibit holoblastic cleavages; that is, they undergo a complete partition subdividing the whole egg into separate blastomeres. Cleavages are radial: the division planes form a right angle with respect to the previous division. The cleavage rate and the development speed usually depend on temperature. At 18°C, *Sphaerechinus granularis* zygotes reach the first division by 120 minutes, and each subsequent division occurs at regular intervals of nearly 60 minutes. In *Paracentrotus lividus*, the first cleavage is faster, occurring at 70–90 minutes post-fertilization. The first cleavage (Cl.1, 2 cells) is meridional (in the polar axis) and divides the egg into two equally sized blastomeres (Figure 17.5). The second cleavage (Cl.2, 4 cells) is perpendicular to the first but also

**TABLE 17.2**

**Availability of Omics in Different Echinoidea Species and Their Main Research Thematics**

	<b>Omics Data</b>	<b>Main Research Thematics</b>	<b>References</b>
<i>Eucidaris tribuloides</i>	G./T. available (Echinobase/NCBI)	Embryogenesis, Development, Global changing	(Erkenbrack et al. 2018)
<i>Sterechinus neumayeri</i>	T. available (NCBI)	Toxicity, Fertilization, Genetics, Global changing	(Dilly et al. 2015)
<i>Loxechinus albus</i>	T. available (NCBI)	Ecology, Genetics, Global changing	(Gaitán-Espitia et al. 2016)
<i>Paracentrotus lividus</i>	G. in progress (European consortium); T./Trl. available (NCBI)	Ecology, Toxicity, Fertilization, Embryogenesis, Development, Global changing, Economy	(Chassé et al. 2018; Gildor et al. 2016)
<i>Heliocidaris erythrogramma</i>	T. available (NCBI)	Fertilization, Embryogenesis, Development, Global changing	(Wygoda et al. 2014)
<i>Evechinus chloroticus</i>	T. available (NCBI)	Ecology, Toxicity, Global changing	(Gillard et al. 2014)
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	G./T. available (HpBase/NCBI)	Toxicity, Fertilization, Embryogenesis, Metabolism, Development, Genetics	(Kinjo et al. 2018)
<i>Mesocentrotus franciscanus</i>	T. available (NCBI)	Ecology, Fertilization, Genetics	(Wong et al. 2019)
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	G./T. available (Echinobase/NCBI)	Toxicity, Fertilization, Embryogenesis, Development, Genetics, Global changing	(Kudtarkar and Cameron 2017; Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al. 2006; Tu et al. 2014)
<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	Transcriptome available (NCBI)	Toxicity, Fertilization, Metabolism, Development, Global changing	(Runcie et al. 2017)
<i>Lytechinus variegatus</i>	G./T. available (Echinobase/NCBI)	Ecology, Toxicity, Fertilization, Development, Global changing	(Davidson et al. 2020; Hogan et al. 2020)
<i>Lytechinus pictus</i>	G. in progress; Transcriptomes available (Echinobase/NCBI)	Toxicity, Fertilization, Embryogenesis, Development	(Nesbit et al. 2019)
<i>Sphaerechinus granularis</i>	T. from ovaries available (Echinobase/NCBI)	Toxicity, Fertilization, Embryogenesis	(Reich et al. 2015)
<i>Temnopleurus reevesii</i>	See chapter 18	Genetics	(Suzuki and Yaguchi 2018)
<i>Arbacia punctulata</i>	T. available (NCBI)	Toxicity, Fertilization, Embryogenesis, Metabolism, Development	(Janies et al. 2016)
<i>Echinarachnius parma</i>	T. from ovaries available (Echinobase/NCBI)	Toxicity, Fertilization, Development	(Reich et al. 2015)
<i>Echinocardium cordatum</i>	T. available (NCBI)	Ecology, Toxicity, Development	(Romiguier et al. 2014)

G: Genome, T: Transcriptome, G./T: Genome and Transcriptome, Trl: Translatome



**FIGURE 17.5** Diagrams of sea urchin embryo development. (a) The six first cleavages of a sea urchin embryo. (b) Diagram of the 60-cell stage, (c) mesenchyme blastula, (d) gastrula and (e) pluteus larva stage with the colouring of presumptive cell fates. See embryogenesis text part for more details on cleavage axis, cell fate and migration. (Cl: cleavage, Bl: blastomeres, Me: mesomeres, An: animal, Ma: macromeres, Vg: vegetal, Mi: micromeres, S/L-Mi: small/large micromeres, bl: blastocoel, pmc: primary mesenchyme cells, b: blastopore, arc: archenteron, cb: ciliary/ciliated bands, pg: red-pigmented cells, bc: blastocoel cells, cc: coelomic cells, sm: small micromeres, sp: larval spicules, mo: mouth, a: anus.)



occurs in a meridional plane, resulting in the production of four equally sized blastomeres. The third cleavage (Cl.3, 8 cells) is equatorial (at right angles of the polar axis), resulting in four upper and four lower blastomeres, all of equal sizes. The fourth cleavage (Cl.4, 16 cells) exhibits a complex and characteristic pattern that reveals the basic A-V polarity of the embryo. In the vegetal pole, the four blastomeres divide asymmetrically and horizontally, forming four small cells placed in the egg's pole (the micromeres) and four larger cells situated above (the macromeres). In the animal pole, the four blastomeres divide meridionally and symmetrically, resulting in eight equally sized cells (the mesomeres). At the fifth cleavage (Cl.5, 32 cells), the eight mesomeres at the animal half divide equatorially and symmetrically, resulting in two layers of cells called "an1" for the upper one and "an2" for the lower one. In the vegetal pole, the four macromeres instead divide meridionally, forming a tier of eight cells. The four micromeres divide horizontally and asymmetrically, resulting in four small micromeres at the extreme vegetal pole hemisphere and four large micromeres above. At the sixth cleavage (Cl.6, 60 cells), all the cleavage furrows are equatorial. The macromeres divide, giving rise to two eight-cell tiers called "vg1" and "vg2". The large micromeres divide as well, but not the small micromeres. In total, the 60-cell embryo shows, from top to bottom, 16 "an1" cells distributed in two layers of 8 cells each, 16 "an2" cells forming also two layers of 8 cells each, 8 "vg1", 8 "vg2", 8 large micromeres and 4 small micromeres.

The macromeres producing the "vg1" and "vg2" cells are the endomesoderm progenitors. The large micromeres contribute instead to the skeletogenic mesenchyme, and the small micromeres to the primordial germ cells (PGCs) (Okazaki 1975; Yajima and Wessel 2012). In the Echinoderm phylum, micromeres are only observed in echinoids and are thus considered a derived character. Asymmetric cell division is directed by the control of spindle and furrow cleavage position and by uneven repartition of molecules. Although the precise molecular mechanisms that orchestrate these asymmetric divisions are still poorly understood, it has been shown that the AGS/Pins proteins (activator of G-protein signalling/partner of Inscuteable) are required for normal asymmetrical division during micromere formation (Voronina and Wessel 2006; Poon et al. 2019).

As soon as the eight-cell stage is reached, a small central cavity forms in the centre of the embryo. As cleavage proceeds, this space enlarges and forms the blastocoel. A morula appears roughly six hours after fertilization, but at the 120-cell stage, the smooth-surfaced blastula becomes a continuous spherical monolayer surrounded by an outer hyaline layer. The epithelium sits on an inner basal membrane; cell adhesion is mediated by tight junctions. Cilia develop on the surface of the blastula, and their coordinated action triggers the rotation of the blastula within the fertilization envelope. Ten hours after fertilization, the blastula is composed of about 600 cells. Cell division rates decrease as the cell cycle lengthens. At the end of segmentation, the blastula is covered by cilia, presents a conspicuous apical ciliary tuft

in the animal pole and starts secreting a hatching enzyme that digests the fertilization envelope. The synthesis of this hatching enzyme takes place in the animal-most two-thirds of the blastula and is likely to be restricted to the presumptive ectoderm territory (Lepage et al. 1992a, 1992b). Finally, a swimming blastula is released into the sea.

The blastula wall thickens at the vegetal pole, forming the vegetal plate. In the central region of this vegetal plate, the micromere descendants display pulsatile movements and start developing filopodia in their basal face. These cells lose their affinity for the outer hyaline structure and gain affinity for the fibronectin present in the basal lamina and the extracellular matrix lining the blastocoel (Fink and McClay 1985). Eventually, they detach from the epithelium and enter the blastocoel, forming the primary mesenchyme (Peterson and McClay 2003). As these cells are the first ones to ingress into the blastocoel, they are called primary mesenchyme cells (PMCs) (Burke et al. 1991). Adhering to the blastocoel matrix, these cells progress from the vegetal pole toward the animal pole and then reverse their trajectory. Finally, the PMCs reach an area located between the vegetal pole and the equator and form a ring pattern consisting of two ventrolateral cell clusters and dorsal and ventral interconnected chains of cells (Malinda and Etensohn 1994). Then their filopodia coalesce, and the characteristic syncytial bridges of the larval skeleton appear. The primary mesenchyme cells of the sea urchin represent one of the best developmental models for studying mesodermal migration (Anstrom 1992; Etensohn 1999; Etensohn and Sweet 2000; Peterson and McClay 2003), and the cellular basis of skeletogenic cells has been characterized in detail (Okazaki 1975; Etensohn and McClay 1988; Armstrong and McClay 1994). Moreover, the gene regulatory network (GRN) that controls their formation has also been described not only in species of the order Camarodonta (Oliveri and Davidson 2004; Oliveri et al. 2008) but also in other echinoid orders (Minokawa 2017).

In euechinoids, the ingression of the PMCs marks the onset of gastrulation. The invagination of the Vg2 territory in the blastocoel gives rise to the archenteron (primitive gut), opened to the outside by a circular blastopore (the future anus). Invagination of the vegetal plate, a universal feature of echinoderm gastrulation, is traditionally divided into "primary" and "secondary" invagination (Gustafson and Kinnander 1956). The "primary" invagination corresponds to an initial phase of gut extension that involves extensive extracellular matrix remodelling and cell shape changes (reviewed in Kominami and Takata 2004). Three hypotheses have been advanced to explain the "primary" invagination (reviewed in Etensohn 2020). First, according to the so-called apical constriction hypothesis, a ring of vegetal plate cells become bottle shaped, compressing their apical ends (Kimberly and Hardin 1998). This cell shape modification causes the cells to pucker inward. However, bottle cells could be a specialized feature of euechinoids and not a general characteristic of all echinoderms (Etensohn 2020). A second hypothesis proposes that invagination could be

driven by changes in extracellular matrix composition (Lane et al. 1993). In fact, the hyaline layer is made up of two layers: an outer lamina composed of hyalin protein and glycoproteins and an inner lamina composed of fibropellin proteins (Hall and Vacquier 1982; Bisgrove et al. 1991). After PMC ingression, the vegetal plate cells secrete chondroitin sulfate proteoglycans into the inner lamina of the hyaline layer. As these chondroitin sulfate proteoglycans capture abundant water, the inner layer expands even if the outer layer remains stiff. The result is a force pushing the epithelium toward the blastocoel (Lane et al. 1993). A third hypothesis suggests another force arising from the concerted movement of cells toward the vegetal pole that may facilitate the invagination by drawing the buckled layer inward (Burke et al. 1991).

The “secondary” invagination ensues after a brief pause. During this stage, the archenteron extends and produces a long thin tube. The cells of the archenteron, which are organized as a monolayered epithelium, move over one another and flatten (Ettensohn 1985; Hardin 1989). In *Lytechinus variegatus*, gastrulation has been analyzed at a high resolution by live imaging and using transplantation techniques (Martik and McClay 2017). In this species, the process of archenteron elongation is mainly driven by the elongation of Vg2 endoderm cells. In fact, even if oriented cell divisions also contribute to gut elongation, cell proliferation inhibition does not preclude gastrulation, indicating that cell proliferation is not essential for this process (Stephens et al. 1986; Martik and McClay 2017).

The oral ectoderm of the gastrula flattens as the gastrula becomes roughly triangular, forming the prism larva. The embryonic radial symmetry is gradually replaced by a bilateral symmetry. An early sign of this transformation consists in the aggregation of primary mesenchyme cells into two clusters that develop in the opposite posterolateral–ventral angles of the prism larva. The cells of the primary mesenchyme form then a syncytium, in which two calcitic spicules develop. These spicules, flanking the primitive digestive tract, will constitute the endoskeleton of the pluteus larva. For this, the primary mesenchyme cells endocytose seawater from the larval internal body cavity and form a series of vacuoles where calcium can concentrate and precipitate as amorphous calcium carbonate (Kahil et al. 2020).

Once the archenteron reaches about two-thirds of its final length, the third and last stage of archenteron elongation begins (Hardin 1988). This phase is driven by the secondary mesenchyme cells, which extend filopodia through the blastocoel cavity to reach a specific area in the inner surface of the blastocoel roof (Hardin and McClay 1990). These filopodia pull the archenteron toward the animal pole and contact the region where the mouth will form. The mouth forms in the future ventral side of the larva after the fusion of the archenteron and the ectoderm epithelium. Typical of the deuterostomes, the mouth and the archenteron create a continuous digestive tube that joins the blastopore, which coincides with the anus.

During the processes of archenteron elongation, the secondary mesenchyme cells spread into the blastocoel fluid,

where they form at least four non-skeletogenic mesoderm cells (Ettensohn and Ruffins 1993). Early in gastrulation, a population of red-pigmented cells forms (Gustafson and Wolpert 1967; Gibson and Burke 1985). It is interesting to note that independent knock out of the genes encoding for polyketide synthase, flavin monooxygenase family 3, and the glial cells missing (*gcm*) protein results in the disappearance of red-pigmented cells throughout the body of the larva (Wessel et al. 2020).

Later in gastrulation, a group of cells coming from the tip of the archenteron moves into the blastocoel and adopts a fibroblast-like morphology: they are the so-called basal cells (Cameron et al. 1991), or blastocoel cells (Tamboline and Burke 1992). At the end of gastrulation, two coelomic cavities appear as a bilateral out-pocketing of the foregut (Gustafson and Wolpert 1963). Afterwards, secondary mesenchymal cells move out of these coelomic cavities and produce the circumesophageal musculature of the pluteus larvae (Ishimoda-Takagi et al. 1984; Burke and Alvarez 1988; Wessel et al. 1990; Andrikou et al. 2013). While the right coelomic pouch remains rudimentary, the left coelomic pouch undergoes massive development to build many of the structures of the future adult sea urchin. The left side of the pluteus contributes to the formation of the future oral surface of the sea urchin adult (Aihara and Amemiya 2001). The left pouch splits into three smaller sacs. A duct-like structure, the hydroporic canal, extends from the anterior left coelomic pouch to the aboral ectoderm where the hydropore forms (Gustafson and Wolpert 1963). This hydroporic canal is covered by cilia and could be an excretory organ of the larvae (Hara et al. 2003) and later differentiates into a part of the adult water vascular system (Hyman 1955). The hydroporic canal formation constitutes the first morphological signature of left–right asymmetry in the pluteus larva (Luo and Su 2012). An invagination from the ectoderm fuses with the intermediate sac to form the imaginal rudiment, from which the pentaradial symmetry of the adult body plan is established (Smith et al. 2008). To facilitate the observation and the study of complex phases of development, a larval staging schematic of *Strongylocentrotus purpuratus* has been proposed (Smith et al. 2008). This schematic subdivides larval life into seven stages: 1) four-arm stage, 2) eight-arm stage, 3) vestibula invagination stage, 4) rudiment initiation stage, 5) pentagonal disc stage, 6) advanced rudiment stage and 7) tube-foot protrusion stage.

In the late gastrula, primary germ cells located in the archenteron tip incorporate into the imaginal rudiment. Skeletogenic mesenchyme cells penetrate the rudiment to produce the first skeletal plates of the future adult endoskeleton (Gilbert 2006). The rudiment separates from the rest of the larva during metamorphosis, reorganizes its digestive tract and then settles on the ocean floor, where the miniature sea urchin juvenile starts a benthic life.

This mode of development, however, is not universal among echinoids (reviewed in Raff 1987). Indeed, many sea urchins endowed with large eggs bypass the pluteus stage and directly form a non-feeding larva. For instance, *Peronella*

*japonica*, a species that possesses 300- $\mu\text{m}$ -diameter eggs, produces a partial pluteus with a variable skeleton but no larval gut. *Heliocidaris erythrogramma* produces from a 450- $\mu\text{m}$ -diameter egg a free-floating larva but lacks any relic pluteus structure except for the vestibule. The sea urchin *Abatus cordatus*, with a 1,300- $\mu\text{m}$ -diameter egg, undergoes direct development in a brood chamber placed inside the mother.

## 17.6 ANATOMY OF THE ADULT SEA URCHIN

A regular adult sea urchin resembles a sphere densely covered with spines. Animal size usually varies between 5 and 12 cm, but *Echinocyamus scaber*, an irregular echinoid, is the smallest known species (6 mm in size). The largest one is the red sea urchin *Mesocentrotus franciscanus* (syn. *Strongylocentrotus franciscanus*), with a body diameter of 15 to 17 cm and spines up to 30 cm.

Adult sea urchins exhibit a pentaradial symmetry with five equally sized parts radiating out of a central axis. The body is divided into radial (= ambulacral) and interradial (= interambulacral) alternate sectors. The mouth is present in the ventral side, and the anus appears in the dorsal—or aboral—region. The body plan is therefore organized around an oral–aboral axis, with no cephalic structures. Irregular echinoids, which include many species used for biological studies (Hibino et al. 2019), deviate from this regular pattern and belong to different clades such as the cidaroids (Order Cidaroida), the clypeasteroids (also known as sand dollars; Order Clypeasteroida) and the spatangoids (also known as heart urchins; Order Spatangoida). In these species, the anus and often also the mouth are no longer present in the two poles of the animal, generating a bilateral symmetry. Whereas regular sea urchins live often on rocky or sandy substrates, most of the irregular sea urchins are burrowing animals that dig in the sediment thanks to their specialized spines.

Sea urchins—like other echinoderms—have a dermaskelton, which is a thin shell consisting of separate plates of hard calcite that is produced by mesenchyme cells of mesodermal origin. This dermaskelton, called the test, is made of living cells surrounded by both organic and inorganic extracellular matrices. This calcium carbonate shell (mainly formed by  $\text{CaCO}_3$ ) displays a specific three-dimensional organization known as stereom (an echinoderm synapomorphy). The cells constituting the stroma fill the open spaces of these stereomic structures with their mineral secretions. In echinoids, the plates forming the test are tightly apposed and bound together by connective tissue, generating a resistant armoured structure. A thin dermis and epidermis cover the dermaskelton, which often bears protruding tubercles and rows of spines (in fact, the term echinoderm means in Greek “spiny skin”). The form and size of these spines are extremely variable. The base of the spine is attached by different sets of muscles capable of orienting the spine in different directions. The spine base contains a collagen matrix that can reversibly change its configuration

and become flexible or rigid, which allows immobilizing the spine in one particular direction.

The ambulacra of most echinoderms, including echinoids, consist of longitudinal rows of tube feet (podia) protruding out of the test. Sea urchin adoral podia are highly specialized organs that have evolved to provide an efficient attachment to the substratum. These feet generally secrete in their tips a series of adhesive proteins sticking to different supports. Podia are the external appendages of the water vascular system and consequently can be hydraulically extended or contracted. This sophisticated hydraulic system consists of five radially arranged channels connected to a central ring channel surrounding the mouth. Water enters the system through the madreporite, a plate with a light-colored calcareous opening placed on the aboral side. The madreporite filters the seawater, which passes over a short stone channel and joins the ring channel. The tube feet are connected to five main radial channels by a network of lateral branches. Feet have two parts: the ampulla and the podium. The ampulla is a water-filled sac located inside the test and is flanked by circular and longitudinal muscles. The podium protrudes out of the test and is surrounded by a sheet of longitudinal muscles. When the muscles around the ampulla contract, water flows into the connected podium, inducing elongation. On the contrary, when the podia muscles contract, water returns to the ampulla and the podia retract. Differing from adoral podia, peristomal podia are not involved in adhesion and locomotion and have a sensory role. A large family of genes predicted to act in both chemo- and photoreception is expressed in tube feet or pedicellariae and reveals a complex sensory system in sea urchins (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al. 2006). Pedicellariae are small claw-shaped structures found on the echinoderm endoskeleton, particularly in Asterozoa and Echinozoa. In some taxa, they are presented as cleaning appendages thought to keep the animal’s surface free of parasites, debris and algae. Four primary forms of pedicellariae can be found in sea urchins: globiferous, triphyllous, ophicephalous and tridactylous. They typically present a claw shape consisting of three valves that have inspired the production of micro-actuated forceps (Leigh et al. 2012). Appendages, including tube feet, spines, pedicellariae and gills, are all present on the surface of the sea urchin. They present a broad diversity of shapes and offer a fantastic and strange spectacle under a simple dissecting microscope (for an excellent illustration of the different appendage types classified according to Hyman 1955, see Figure 4 of Burke et al. 2006).

These appendages are richly innervated sensory organs allowing sea urchins to interact with their environment (Yoshimura et al. 2012). Like other echinoderms, the sea urchin nervous system is dispersed, but it cannot be reduced to a loose neuron network. Although the adult is not cephalized, the radial nerve presents a segmental organization. The adult sea urchin nervous system is composed of five radial cords. They extend underneath the ambulacra and join their base by commissures that form the circumoral nerve ring, placed around the oesophagus next to the

mouth (for a review, see Burke et al. 2006; Yoshimura et al. 2012). The radial nerve produces a series of extensions that pass through the test's pores and innervate the base of each appendage. Almost all tissues, including the viscera, are innervated (Burke et al. 2006), but the echinoderm nervous system is one of the least well studied among metazoans. Until the publication of a genomic view of the sea urchin nervous system (Burke et al. 2006), our knowledge about the echinoid nervous system relied exclusively on morphological studies. Now new lines of investigation have opened (Garcia-Ararras et al. 2001). The sea urchin genome encodes for all the regulatory proteins involved in neuronal specification, and many potential neuro-modulators, neuropeptides and growth factors have been described, indicating that the echinoids use these modes of cell communication and regulation (Wood et al. 2018). While tube feet are non-ocular appendages, they do show localized expression of a set of retinal genes and many chemoreceptors, suggesting that they could be involved in light perception (Burke et al. 2006) and a wide range of other sensory modalities.

The digestive tract of echinoids is classically subdivided into different sections: mouth, buccal cavity, pharynx, oesophagus, stomach, intestine, rectum and anus (Hinman and Burke 2018). Sea urchins are benthic animals and eat organic matter that settles down from the column water, mainly preferring kelp, algae and sponges present in their habitat. Most of the irregular sea urchins, which live within the sediment, feed on its organic fraction. Sea urchins living in seaweed meadows graze and ingest macroalgae, including associated epibionts and microbiota (Burke et al. 2006). Echinoids possess a very sophisticated chewing apparatus, the lantern of Aristotle, which encircles the mouth opening and the pharynx. The lantern is composed of a pentamerous skeleton, including five teeth animated by a well-developed musculature (Ziegler et al. 2010). Sea urchins have an open circulatory system with an extensive body cavity filled with coelomic fluid. Passive gas exchange in the coelomic fluid takes place through gill-like appendages located around the mouth. Coelomocytes are free cells that are found in coelomic fluid and also among the tissue of various body parts. These cells are believed to play different functions, including nutrient transport and immune defence (Hakim et al. 2016).

In regular echinoids, sexes are separated, but the external morphology of males and females is indistinguishable. In the case of spatangoids, sexual dimorphism is apparent in the genital papillae; however, observing these structures is challenging, as they hide between the spines forming the apical system (Stauber 1993). The most prominent structures of the internal cavity of sea urchins are their five gonads (ovary or testis). These organs differentiate from a group of cells—the gonadal primordium—located in the dorsal mesentery of the newly metamorphosed juvenile (Chia and Xing 1996; Houk and Hinegardner 1980). The gonads are distinct organs delimited by a peritoneum; their innermost tissue layer contains the germinal epithelium. Each gonad

forms a gonoduct joining the genital pore, an opening in the genital plates present on the aboral side of the animal. At the spawning period, eggs or sperm are released through these five genital pores. The group of Gary Wessel has extensively studied germ cell formation during echinoid development (for reviews, see Wessel et al. 2014; Swartz and Wessel 2015). The specification of these cells seems to be regulated by a conserved set of genes that include several classic germline markers such as *Vasa*, *Nanos* and *Piwi*. The germline cells derive from the small micromeres (Yajima and Wessel 2011), which appear early in embryogenesis during the fifth cleavage.

## 17.7 GENOMIC DATA OF ECHINODERMS

*Strongylocentrotus purpuratus* was the first fully sequenced echinoderm (Sea Urchin Genome Sequencing Consortium et al. 2006). It was also the first non-chordate deuterostome genome, allowing the characterization of gene family evolutionary dynamics within the Bilateria and Deuterostomia. The sea urchin genome contains roughly 23,300 genes representing nearly all vertebrate gene families without extensive redundancy. Some genes previously considered vertebrate exclusive were found in the sea urchin genome, tracing their origin back to the deuterostome lineage. Since its first release, the genome's assembly has been improved, and the latest release in 2019 is the v5.0 genome. Other echinoderm genomes have been sequenced following this pioneering work, including different representatives of each class. The echinoderm genomes available in the NCBI genome dataset are listed in Table 17.3.

The genome dataset is completed by a vast amount of RNA-Seq data that are accumulating at a steady pace. There are currently over 4,000 Echinodermata high-throughput datasets archived in the NCBI Sequence Read Archive (SRA) database. They are organized in 345 BioProjects (search in November 2020) concerning both nuclear and mitochondrial genomes and are useful for phylogenomic analysis, transcriptome analysis of developmental stages and adaptation to stress or climate change. Table 17.2 presents the omics availability in the different Echinoidea species listed in the biogeographic map and phylogenetic tree shown previously.

An important resource for biologists working on echinoderms is the Echinoderm genome database EchinoBase ([www.echinobase.org](http://www.echinobase.org), and its former version at [legacy.echinobase.org](http://legacy.echinobase.org); Kudtarkar and Cameron 2017). Originally set up for the annotation of the *S. purpuratus* genome, it has incorporated data for several other echinoderm species, and nowadays, it constitutes a crucial tool for studies on gene regulation, evolution and developmental and cellular biology.

Other useful databases are HpBase (devoted to the Asian sea urchin *H. pulcherrimus*; [cell-innovation.nig.ac.jp/Hpul](http://cell-innovation.nig.ac.jp/Hpul); Kinjo et al. 2018, and EchinoDB, comparative transcriptomics on 42 species of echinoderms; [echinodb.uncc.edu](http://echinodb.uncc.edu); Janies et al. 2016).



**TABLE 17.3**  
**Echinodermata Genomes Available at the NCBI Genome Database (www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/)**

	Genome Size (Mbp)	NCBI Latest Assembly	Year	Other Database
<b>Echinoidea</b>				
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	921	Spur_5.0	2019	Echinobase: www.echinobase.org*
<i>Lytechinus variegatus</i>	1061	Lvar_3.0	2021	www.echinobase.org*
<i>Eucidaris tribuloides</i>	2187	Etri_1.0	2015	legacy.echinobase.org*
<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	568	HpulGenome_v1	2018	HpBase: cell-innovation.nig.ac.jp/Hpul/**
<b>Holothuroidea</b>				
<i>Actinopyga echinites</i>	899	ASM1001598v1	2020	—
<i>Apostichopus japonicus</i>	804	ASM275485v1	2017	—
<i>Apostichopus leukothele</i>	480	ASM1001483v1	2020	—
<i>Australostichopus mollis</i>	1252	assembly_1.0	2020	—
<i>Holothuria glaberrima</i>	1128	ASM993650v1	2020	—
<i>Paelopatides confundens</i>	1128	ASM1131785v1	2020	—
<i>Stichopus horrens</i>	689	UKM_Sthorr_1.1	2019	—
<b>Asteroidea</b>				
<i>Acanthaster planci</i>	384	OKI-Apl_1.0	2016	Echinobase: www.echinobase.org*
<i>Asterias rubens</i>	417	eAstRub1.3	2020	www.echinobase.org*
<i>Patiria miniata</i>	811	Pmin_3.0	2020	www.echinobase.org*
<i>Patiriella regularis</i>	949	assembly_1.0	2017	—
<i>Pisaster ochraceus</i>	401	ASM1099431v1	2020	—
<b>Ophuroidea</b>				
<i>Ophionereis fasciata</i>	1185	assembly_1.0	2017	—
<i>Ophiothrix spiculata</i>	2764	Ospi_un_1.0	2015	legacy.echinobase.org*
<b>Crinoidea</b>				
<i>Anneissia japonica</i>	589	ASM1163010v1	2020	Echinobase: www.echinobase.org*

\*(Kudtarkar and Cameron 2017);

\*\* (Kinjo et al. 2018)

## 17.8 FUNCTIONAL APPROACHES: TOOLS FOR MOLECULAR AND CELLULAR ANALYSES

Their external fertilization, the large number of gametes, the easy access to all stages of embryogenesis and the transparency of both eggs and embryos make echinoderms suitable organisms for different approaches in cellular biology, biochemistry and molecular biology. The availability of genome and transcriptome data (see genomic resources section) has facilitated gene expression analysis and manipulation in many sea urchin species and other echinoderms.

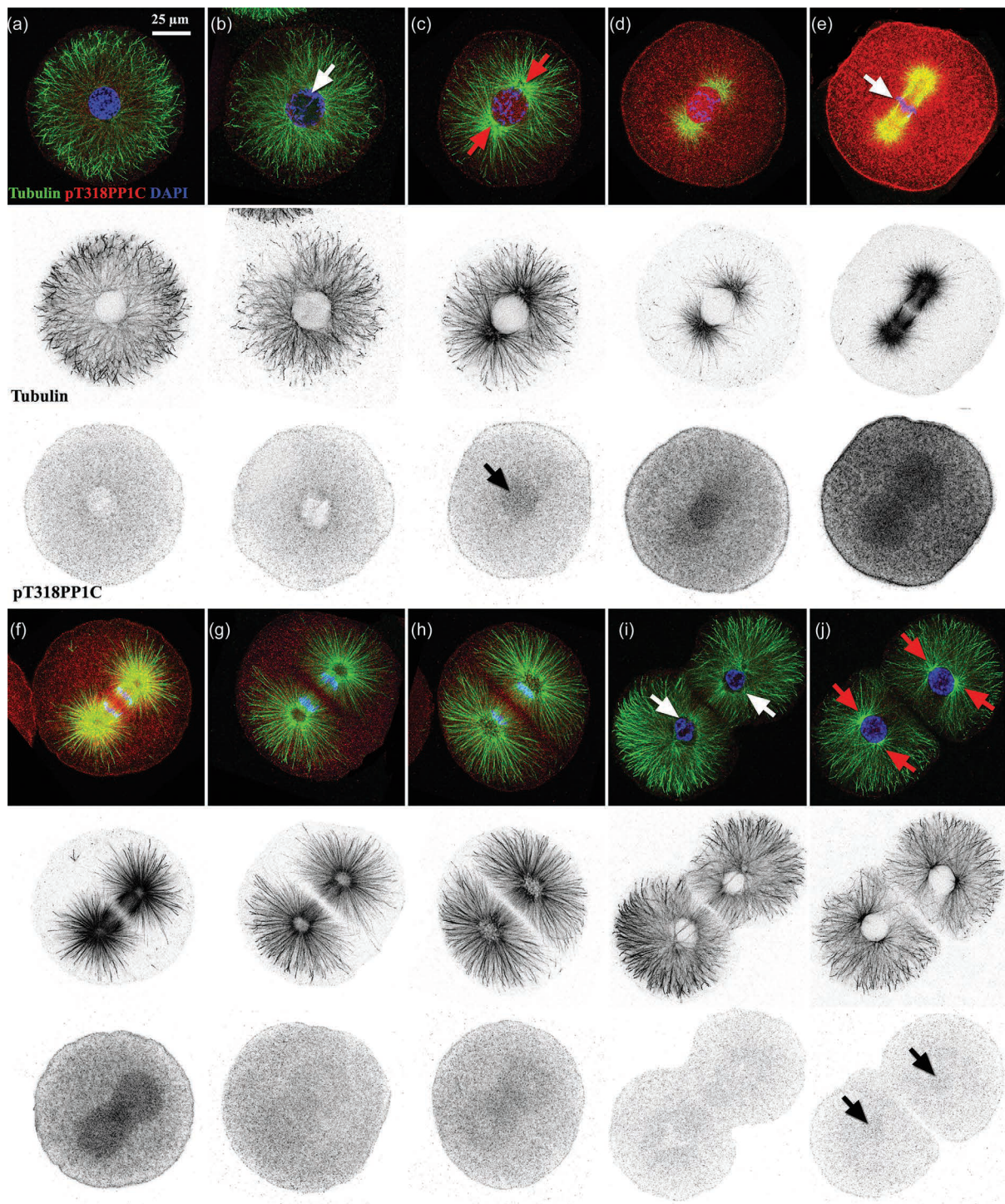
Spatial and temporal localization of mRNAs has been investigated by *in situ* hybridizations in several sea urchin species (Erkenbrack et al. 2019), as well as in other echinoderms (Fresques et al. 2014; Dylus et al. 2016; Yu et al. 2013). Localization of proteins at the cellular and embryonic levels by immunolocalization is often dependent on the availability of cross-reacting antibodies directed against vertebrate homologs of the protein of interest. Many commercial antibodies against mammalian proteins have indeed helped to decipher different molecular processes in sea urchins, such as microtubule dynamics and Cyclin B/CDK1 complex activity during embryonic divisions (see Figure 17.6). However, some specific antibodies directed against sea urchin proteins have also been developed in many laboratories (Venuti et

al. 2004). The function of many molecular players and signalling pathways has also been investigated using different pharmacological inhibitors or activators (Mulner-Lorillon et al. 2017; Molina et al. 2017; Feizbakhsh et al. 2020). Finally, labelling of eggs and embryos with radioactive and non-radioactive precursors allows for the monitoring of metabolic activities (for example, protein synthesis; Chassé et al. 2019).

Manipulation of gene function and/or expression during embryogenesis is achieved by the microinjection of various reagents, such as exogenous mRNA coding for native proteins and dominant-negative forms, morpholinos that interfere with the translation or splicing of endogenous mRNAs and, more recently, CRISPR-Cas9 reagents permitting gene knock-out. Microinjection represents, thus far, the only way to efficiently introduce reagents into the sea urchin eggs or blastomeres. Several recently published methods have described microinjection techniques and applications (von Dassow et al. 2019; Molina et al. 2019; Chassé et al. 2019).

The genome-editing CRISPR/Cas9 technology has been successfully implemented in sea urchin to efficiently knockout developmental genes. So far, the genes targeted by CRISPR/Cas9 were selected because of a visible F0 phenotype: disruption of dorsoventral patterning for Nodal knockdown (Lin and Su 2016) or albinism as a visual readout for polyketide synthase 1 (Oulhen and Wessel 2016). Recently, the successful





**FIGURE 17.6** First mitotic division in *Sphaerechinus granularis* embryos. (a–j) Confocal micrographs describing progression through the first mitotic division in *S. granularis*. Embryos belonging to consecutive stages were labelled with anti-tubulin (shown in green, top panels; b/w, middle panels) and with an antibody against the T318 phosphorylated form of the phosphatase PP1C (red, top panels; b/w, bottom panels). The levels of this phospho-epitope reflect the activity of the Cyclin B/CDK1 complex (Chassé et al. 2016; Feizbakhsh et al. 2020). Nuclear DNA was labelled with DAPI (blue, top panels). (b) Chromatin condensation starts during early prophase (white arrow). (c) Later on, the pT318PP1C signal starts to accumulate in the nucleus (black arrow). The position of the MTOCs also becomes visible (red arrows). (d) Following the collapse of the microtubule radial network, the mitotic spindle begins to form. (e) During metaphase, the pT318PP1C levels reach their maximum, and the chromosomes align in the metaphasic plate (white arrow). The nuclear envelope has disappeared. (f–h) As sister chromatids separate during anaphase, the astral microtubules fill the entire cytoplasm. In parallel, the levels of pT318PP1C decrease dramatically. (i) Chromatin de-condensation begins in early telophase (white arrows). (j) By late telophase, the MTOCs of each daughter cell are apparent (red arrows). A faint pT318PP1C signal in the nuclei heralds the second mitotic division (black arrows).

production of a homozygous F2 mutant using the CRISPR-Cas9 system was obtained in *Temnopleurus reevesii*, which takes advantage of the relatively short life cycle of this species (Yaguchi et al. 2020; see also Chapter 18). This breakthrough gives us the possibility to implement genetic analyses in the sea urchin model (in species with short generation time) and study the function of many maternal factors and mRNAs.

## 17.9 CHALLENGING QUESTIONS

During their long evolutionary trajectory, echinoderms have adapted to all sorts of climatic conditions and have colonized most of the ocean floor, from the intertidal areas to the deep-sea benthos. The study of this adaptation capacity has just begun and should foster many exciting discoveries. Moreover, it has become evident that echinoderms constitute a valuable biological system to analyze the potential of marine species to adapt to anthropogenic disturbance. Their population densities are very sensitive to climate change, ocean acidification, eutrophication, overfishing, predatory removal and the introduction of alien species (Uthicke et al. 2009). In addition, this group of animals plays a crucial role in many marine habitats and food webs, and several members of this clade have been recognized as “keystone species” in different ecosystems (Power et al. 1996). Echinoderms have thus acquired an essential place in experimental marine ecology.

As detailed previously, many genomic resources are available nowadays for the researchers studying this clade, in particular for those interested in the analysis of the echinoids. These resources have greatly facilitated the development of comparative approaches aimed at understanding the genetic basis of adaptive traits. The density of available landmarks, including closely related species but also different groups separated by increasing phylogenetic distances, allows dissection at the molecular level of both micro- and macroevolutionary processes.

In echinoderms, many studies have focused on the acquisition of evolutionary novelties and the diversification of life strategies. For instance, it has been shown that several species have significantly accelerated their life cycles, reprogramming their ancestral planktotrophic larvae into non-feeding lecithotrophic forms (Raff and Byrne 2006). These evolutionary transitions have obvious adaptive roles. In lecithotrophic species, the life cycle becomes independent of fluctuations in plankton levels since their development relies on the nutrients supplied by their mothers. Indeed, it has been argued that the disturbance of planktonic food chains could contribute in the near future to the decline of planktotrophic species (Uthicke et al. 2009). At the same time, these developmental transitions can now be analyzed in great detail both at the cellular and molecular levels.

For instance, it has been shown in the *Heliocidaris* genus that the eggs of lecithotrophic species have undergone an outstanding increase in size, driven by a thorough remodelling of their oogenesis program (Byrne et al. 1999). Moreover, the comparison of gene regulatory networks controlling early development, like in the lecithotrophic

*Heliocidaris erythrogramma* and the planktotrophic *Heliocidaris tuberculata*, provides important hints about the identity of the molecular players participating in evolutionary change (Israel et al. 2016). These approaches have greatly benefited from the deep knowledge of developmental networks acquired thanks to the study of early development in *Strongylocentrotus purpuratus* and other echinoderm species (Cary and Hinman 2017).

Echinoderm biology stands now at the intersection between ecology, cell and developmental and evolutionary biology and should greatly profit from this privileged position.

## ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

We apologize to those whose work was not cited or discussed here because of the broad scope of this review and space limitations. We are indebted to the Marine and Diving Facility and the Aquarium Service of the Roscoff Marine Station for echinoderm collection and rearing. We are also grateful to the imaging platform of the FR2424 (Plateforme MerImage, SU/CNRS). We thank H. Flom for manuscript corrections. The authors acknowledge the support of “La Ligue contre le Cancer (coordination du Grand Ouest: comités Finistère, Côtes d’Armor, Deux-Sèvres, Morbihan, Ille-et-Villaine, Loire Atlantique, Charente, Sarthe)”, the Brittany Regional Council (Région Bretagne), the Finistère Department Council (CG29). Florian Pontheaux is funded by a PhD fellowship from the French Education Ministry [SU; Doctoral School ED515].

## BIBLIOGRAPHY

- Aihara, M. and S. Amemiya. 2001. Left-right positioning of the adult rudiment in sea urchin larvae is directed by the right side. *Development* 128:4935–4948.
- Allen, R.D. and J.L. Griffin. 1958. The time sequence of early events in the fertilization of sea urchin eggs. *Experimental Cell Research* 15:163–173.
- Andrikou, C., Iovene, E., Rizzo, F., Oliveri, P. and M.I. Arnone. 2013. Myogenesis in the sea urchin embryo: The molecular fingerprint of the myoblast precursors. *EvoDevo* 4:33–48.
- Angerer, L.M. and R.C. Angerer. 2000. Animal-vegetal axis patterning mechanisms in the early sea urchin embryo. *Developmental Biology* 218:1–12.
- Angione, S.L., Oulhen, N., Brayboy, L.M., Tripathi, A. and G.M. Wessel. 2015. Simple perfusion apparatus for manipulation, tracking, and study of oocytes and embryos. *Fertility and Sterility* 103:281–290.
- Anstrom, J.A. 1992. Microfilaments, cell shape changes, and the formation of primary mesenchyme in sea urchin embryos. *Journal of Experimental Zoology* 264:312–322.
- Armstrong, N. and D.R. McClay. 1994. Skeletal pattern is specified autonomously by the primary mesenchyme cells in sea urchin embryos. *Developmental Biology* 162:329–338.
- Arnone, M.I., Byrne, M. and P. Martinez. 2015. Echinodermata. In *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates*, ed. A. Wanninger, 6:1–58. Springer-Verlag, Wien.
- Ben-Tabou de-Leon, S. 2017. The network remains. *History and Philosophy of the Life Sciences* 39:32.



- Ben-Tabou de-Leon, S. 2016. Robustness and accuracy in sea urchin developmental gene regulatory networks. *Frontiers in Genetics* 7:16–21.
- Bernard, F.R. 1977. Fishery and reproductive cycle of the red sea urchin, *strongylocentrotus franciscanus*, in British Columbia. *Journal of the Fisheries Board of Canada* 34:604–610.
- Binks, R.M., Prince, J., Evans, J.P. and W.J. Kennington. 2012. More than bindin divergence: Reproductive isolation between sympatric subspecies of a sea urchin by asynchronous spawning. *Evolution* 66:3545–3557.
- Bisgrove, B.W., Andrews, M.E. and R.A. Raff. 1991. Fibropellins, products of an EGF repeat-containing gene, form a unique extracellular matrix structure that surrounds the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 146:89–99.
- Böhmer, M., Van, Q., Weyand, I., Hagen, V., Beyermann, M., Matsumoto, M., Hoshi, M., Hildebrand, E. and U.B. Kaupp. 2005. Ca<sup>2+</sup> spikes in the flagellum control chemotactic behavior of sperm. *EMBO J* 24:2741–2752.
- Bolton, T.F., Thomas, F.I. and C.N. Leonard. 2000. Maternal energy investment in eggs and jelly coats surrounding eggs of the echinoid *Arbacia punctulata*. *The Biological Bulletin* 199:1–5.
- Bosch, I., Beauchamp, K.A., Steele, M.E. and J.S. Pearse. 1987. Development, metamorphosis, and seasonal abundance of embryos and larvae of the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *The Biological Bulletin* 173:126–135.
- Boveri, T. 2008. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri: Translated and annotated by Henry Harris. *Journal of Cell Science* 121:1–84.
- Boveri, T. 1902. Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. [Concerning multipolar mitoses as a means of analysing the cell nucleus]. *Verhandlungen der Physikalisch-Medizinischen Gesellschaft zu Würzburg* 35:67–90.
- Brachet, J. 1975. From chemical to molecular sea urchin embryology. *American Zoologist* 15:485–491.
- Brachet, J. 1941. La localisation des acides pentose-nucléiques dans les tissus animaux et les oeufs d'amphibiens en voie de développement. *Archive de Biologie* 53:207–257.
- Briggs, E. and G.M. Wessel. 2006. In the beginning . . . animal fertilization and sea urchin development. *Developmental Biology* 300:15–26.
- Bronstein, O. and A. Kroh. 2019. The first mitochondrial genome of the model echinoid *Lytechinus variegatus* and insights into Odontophoran phylogenetics. *Genomics* 111:710–718.
- Burke, R.D. and C.M. Alvarez. 1988. Development of the esophageal muscles in embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Cell Tissue Research* 252:411–417.
- Burke, R.D., Angerer, L.M., Elphick, M.R., Humphrey, G.W., Yaguchi, S., Kiyama, T., Liang, S., Mu, X., Agca, C., Klein, W.H., Brandhorst, B.P., Rowe, M., Wilson, K., Churcher, A.M., Taylor, J.S., Chen, N., Murray, G., Wang, D., Mellott, D., Olinski, R., Hallböök, F. and M.C. Thorndyke. 2006. A genomic view of the sea urchin nervous system. *Developmental Biology* 300:434–460.
- Burke, R.D., Myers, R.L., Sexton, T.L. and C. Jackson. 1991. Cell movements during the initial phase of gastrulation in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 146:542–557.
- Byrne, M. 1990. Annual reproductive cycles of the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* from an exposed intertidal and a sheltered subtidal habitat on the west coast of Ireland. *Marine Biology* 104:275–289.
- Byrne, M., Villinski, J.T., Cisternas, P., Siegel, R.K., Popodi, E. and R.A. Raff. 1999. Maternal factors and the evolution of developmental mode: Evolution of oogenesis in *Heliocidaris erythrogramma*. *Developmental Genes and Evolution* 209:275–283.
- Byrnes, W.M. and W.R. Eckberg. 2006. Ernest Everett Just (1883–1941): An early ecological developmental biologist. *Developmental Biology* 296:1–11.
- Byrnes, W.M. and S.A. Newman. 2014. Ernest Everett Just: Egg and embryo as excitable systems. *Journal of Experimental Zoology. Part B, Molecular and Developmental Evolution* 322B:191–201.
- Cameron, R.A., Fraser, S.E., Britten, R.J. and E.H. Davidson. 1991. Macromere cell fates during sea urchin development. *Development* 113:1085–1091.
- Cannon, J.T., Kocot, K.M., Waits, D.S., Weese, D.A., Swalla, B.J., Santos, S.R. and K.M. Halanych. 2014. Phylogenomic resolution of the hemichordate and echinoderm clade. *Current Biology* 24:2827–2832.
- Cary, G.A. and V.F. Hinman. 2017. Echinoderm development and evolution in the post-genomic era. *Developmental Biology* 427:203–211.
- Cavaliere, V. and G. Spinelli. 2015. Symmetry breaking and establishment of dorsal/ventral polarity in the early sea urchin embryo. *Symmetry* 7:1721–1733.
- Chassé, H., Aubert, J., Boulben, S., Le Corguille, G., Corre, E., Cormier, P. and J. Morales. 2018. Translatome analysis at the egg-to-embryo transition in sea urchin. *Nucleic Acids Research* 46:4607–4621.
- Chassé, H., Boulben, S., Costache, V., Cormier, P. and J. Morales. 2017. Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Research* 45:e15. doi: 10.1093/nar/gkw907.
- Chassé, H., Boulben, S., Glippa, V., Pontheaux, F., Cormier, P. and J. Morales. 2019. In vivo analysis of protein translation activity in sea urchin eggs and embryos. In *Methods in Cell Biology, Echinoderms, Part B*, ed. A. Hamdoun and K.R. Foltz, 150:335–352. Elsevier; Academic Press, London UK.
- Chassé, H., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Glippa, V., Morales, J. and P. Cormier. 2016. Cyclin B translation depends on mTOR activity after fertilization in sea urchin embryos. *PLoS One* 11:e0150318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150318>.
- Chenuil, A. and J.-P. Féral. 2003. Sequences of mitochondrial DNA suggest that *Echinocardium cordatum* is a complex of several sympatric or hybridizing species: A pilot study. In *Echinoderm Research 2001*, ed. J.-P. Féral and B. David, 15–21. Proc. 6th Eur. Conf. Echinoderm, Banyuls-sur-mer, France. Swets & Zeitlinger Publishers, Lisse, NL.
- Chia, F.S. and Xing, J. 1996. Echinoderm coelomocytes. *Zoological Studies* 35:231–254.
- Clift, D. and Schuh, M. 2013. Restarting life: Fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology* 14:549–562.
- Cormier, P., Chassé, H., Cosson, B., Mulner-Lorillon, O. and J. Morales. 2016. Translational control in echinoderms: The calm before the storm. In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, ed. G. Hernandez and R. Jagus, 413–434. Springer International Publishing, Switzerland.
- Costache, V., McDougall, A. and R. Dumollard. 2014. Cell cycle arrest and activation of development in marine invertebrate deuterostomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 450:1175–1181.
- Costello, D.P. and C. Henley. 1971. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. *Marine Biological Laboratory*. <https://hdl.handle.net/1912/295>.
- Croce, J.C. and D.R. McClay. 2010. Dynamics of Delta/Notch signaling on endomesoderm segregation in the sea urchin embryo. *Development* 137:83–91.
- Darszon, A., Nishigaki, T., Wood, C., Treviño, C.L., Felix, R. and C. Beltrán. 2005. Calcium channels and Ca<sup>2+</sup> fluctuations

- in sperm physiology. *International Review of Cytology* 243:79–172.
- Davidson, E.H. 2006. Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science* 311:796–800.
- Davidson, E.H. 2002. A genomic regulatory network for development. *Science* 295:1669–1678.
- Davidson, P.L., Guo, H., Wang, L., Berrio, A., Zhang, H., Chang, Y., Soborowski, A.L., McClay, D.R., Fan, G. and G.A. Wray. 2020. Chromosomal-level genome assembly of the sea urchin *Lytechinus variegatus* substantially improves functional genomic analyses. *Genome Biology and Evolution* 12:1080–1086.
- Delalande, C., Monnier, A., Minella, O., Genevriere, A.M., Mulner-Lorillon, O., Belle, R. and P. Cormier. 1998. Developmental regulation of elongation factor-1 delta in sea urchin suggests appearance of a mechanism for alternative poly(A) site selection in gastrulae. *Experimental Cell Research* 242:228–234.
- Delorme, N.J. and M.A. Sewell. 2016. Effects of warm acclimation on physiology and gonad development in the sea urchin *Evechinus chloroticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 198:33–40.
- Derbès, A.A. 1847. Observations sur le mécanisme et les phénomènes qui accompagnent la formation de l'embryon chez l'oursin comestible. *Annales des Sciences Naturelles (Zool)* 8:80–98.
- Dilly, G.F., Gaitán-Espitia, J.D. and G.E. Hofmann. 2015. Characterization of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) transcriptome and mitogenome: A molecular resource for phylogenetics, ecophysiology and global change biology. *Molecular Ecology Resources* 15:425–436.
- Drozdov, A.L. and V.V. Vinnikova. 2010. Morphology of gametes in sea urchins from Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Ontogenez* 41:47–57.
- Duboc, V., Röttinger, E., Besnardeau, L. and T. Lepage. 2004. Nodal and BMP2/4 signaling organizes the oral-aboral axis of the sea urchin embryo. *Developmental Cell* 6:397–410.
- Dupont, G. and R. Dumollard. 2004. Simulation of calcium waves in ascidian eggs: Insights into the origin of the pacemaker sites and the possible nature of the sperm factor. *Journal of Cell Science* 117:4313–4323.
- Dylus, D.V., Czarkwiani, A., Stångberg, J., Ortega-Martinez, O., Dupont, S. and P. Oliveri. 2016. Large-scale gene expression study in the ophiuroid *Amphiura filiformis* provides insights into evolution of gene regulatory networks. *EvoDevo* 7:2.
- Egea, E., Mérigot, B., Mahé-Bézac, C., Féral, J.-P. and A. Chenuil. 2011a. Differential reproductive timing in *Echinocardium* spp.: The first Mediterranean survey allows interoceanic and interspecific comparisons. *Comptes Rendus Biologies* 334:13–23.
- Erkenbrack, E.M., Croce, J.C., Miranda, E., Gautam, S., Martinez-Bartolome, M., Yaguchi, S. and R.C. Range. 2019. Whole mount in situ hybridization techniques for analysis of the spatial distribution of mRNAs in sea urchin embryos and early larvae. In *Methods in Cell Biology: Echinoderms, Part B*, ed. A. Hamdoun and K.R. Foltz, 150:177–196. Elsevier; Academic Press, London UK.
- Erkenbrack, E.M., Davidson, E.H. and I.S. Peter. 2018. Conserved regulatory state expression controlled by divergent developmental gene regulatory networks in echinoids. *Development* 145:1–11.
- Ernst, S.G. 2011. Offerings from an urchin. *Developmental Biology* 358:285–294.
- Erwin, D.H., Laflamme, M., Tweedt, S.M., Sperling, E.A., Pisani, D. and K.J. Peterson. 2011. The Cambrian conundrum: Early divergence and later ecological success in the early history of animals. *Science* 334:1091–1097.
- Ettensohn, C.A. 2020. The gene regulatory control of sea urchin gastrulation. *Mechanisms of Development* 162:103599.
- Ettensohn, C.A. 2017. Sea urchins as a model system for studying embryonic development. In *Reference Module in Biomedical Sciences*, ed M.J. Caplan. Elsevier, Amsterdam.
- Ettensohn, C.A. 1999. Cell movements in the sea urchin embryo. *Current Opinion in Genetics & Development* 9:461–465.
- Ettensohn, C.A. 1985. Gastrulation in the sea urchin embryo is accompanied by the rearrangement of invaginating epithelial cells. *Developmental Biology* 112:383–390.
- Ettensohn, C.A. and D.R. McClay. 1988. Cell lineage conversion in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 125:396–409.
- Ettensohn, C.A. and S.W. Ruffins. 1993. Mesodermal cell interactions in the sea urchin embryo: Properties of skeletogenic secondary mesenchyme cells. *Development* 117:1275–1285.
- Ettensohn, C.A. and H.C. Sweet. 2000. Patterning the early sea urchin embryo. *Current Topics in Developmental Biology* 50:1–44.
- Evans, T., Rosenthal, E.T., Youngblom, J., Distel, D. and T. Hunt. 1983. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33:389–396.
- Feizbakhsh, O., Pontheaux, F., Glippa, V., Morales, J., Ruchaud, S., Cormier, P. and F. Roch. 2020. A peak of H3T3 phosphorylation occurs in synchrony with mitosis in sea urchin early embryos. *Cells* 9:898.
- Filander, Z. and C. Griffiths. 2017. Illustrated guide to the echinoid (Echinodermata: Echinoidea) fauna of South Africa. *Zootaxa* 4296:1–72.
- Fink, R.D. and D.R. McClay. 1985. Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells. *Developmental Biology* 107:66–74.
- Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* 194:7–15.
- Floc'hlay, S., Molina, M.D., Hernandez, C., Haillot, E., Thomas-Chollier, M., Lepage, T. and D. Thieffry. 2021. Deciphering and modelling the TGF- $\beta$  signalling interplays specifying the dorsal-ventral axis of the sea urchin embryo. *Development* 148:dev189944.
- Foerster, C.A. and B.M. Shapiro. 1977. Release of ovoperoxidase from sea urchin eggs hardens the fertilization membrane with tyrosine crosslinks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:4214–4218.
- Fol, H. 1879. Recherches sur la fécondation et le commencement de l'hénogénie chez divers animaux. *Mémoires de la Société de Physique et d'Histoire Naturelle (Geneve)* 26:89–250.
- Foo, S.A., Deaker, D. and M. Byrne. 2018. Cherchez la femme impact of ocean acidification on the egg jelly coat and attractants for sperm. *Journal of Experimental Biology* 221:jeb177188.
- Fresques, T., Zazueta-Novoa, V., Reich, A. and G.M. Wessel. 2014. Selective accumulation of germ-line associated gene products in early development of the sea star and distinct differences from germ-line development in the sea urchin: Sea star germ-line gene expression. *Developmental Dynamics* 243:568–587.
- Gago, J. and O.J. Luís. 2011. Comparison of spawning induction techniques on *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) broodstock. *Aquaculture International* 19:181–191.
- Gaitán-Espitia, J.D., Sánchez, R., Bruning, P. and L. Cárdenas. 2016. Functional insights into the testis transcriptome of the edible sea urchin *Loxechinus albus*. *Scientific Reports* 6:36516.

- García-Ararras, J.E., Rojas-Soto, M., Jimenez, L.B. and L. Diaz-Miranda. 2001. The enteric nervous system of echinoderms: Unexpected complexity revealed by neurochemical analysis. *Journal of Experimental Biology* 204:865–873.
- Ghisaura, S., Loi, B., Biosa, G., Baroli, M., Pagnozzi, D., Roggio, T., Uzzau, S., Anedda, R. and M.F. Addis. 2016. Proteomic changes occurring along gonad maturation in the edible sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Journal of Proteomics* 144:63–72.
- Gianguzza, P. and C. Bonaviri. 2013. Chapter 19: Arbacia. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Sea Urchins: Biology and Ecology*, ed. J.M. Lawrence, 275–283. Elsevier, London UK.
- Gibson, A.W. and R.D. Burke. 1985. The origin of pigment cells in embryos of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental Biology* 107:414–419.
- Gilbert, S.F. 2006. *Developmental Biology*, eighth ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland, MA, USA.
- Gildor, T., Malik, A., Sher, N., Avraham, L. and S. Ben-Tabou de-Leon. 2016. Quantitative developmental transcriptomes of the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Genomics* 25:89–94.
- Gillard, G.B., Garama, D.J. and C.M. Brown. 2014. The transcriptome of the NZ endemic sea urchin *Kina (Evechinus chloroticus)*. *BMC Genomics* 15:45.
- Goldstein, B. and G. Freeman. 1997. Axis specification in animal development. *Bioessays* 19:105–116.
- González-Irusta, J.M., Goñi de Cerio, F. and J.C. Canteras. 2010. Reproductive cycle of the sea urchin *Paracentrotus lividus* in the Cantabrian Sea (Northern Spain): Environmental effects. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 90:699–709.
- Gross, P.R. and G.H. Cousineau. 1963. Effects of actinomycin D on macromolecule synthesis and early development in sea urchin eggs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 10:321–326.
- Gross, P.R., Malkin, L.I. and W.A. Moyer. 1964. Templates for the first proteins of embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51:407–414.
- Guillou, M. and L.J.L. Lumingas. 1998. The reproductive cycle of the ‘blunt’ sea urchin. *Aquaculture International* 6:147–160.
- Guillou, M. and C. Michel. 1993. Reproduction and growth of *Sphaerechinus granularis* (Echinodermata: Echinoidea) in Southern Brittany. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 73:179–192.
- Gustafson, T. and H. Kinnander. 1956. Microaquaria for time-lapse cinematographic studies of morphogenesis in swimming larvae and observations on sea urchin gastrulation. *Experimental Cell Research* 11:36–51.
- Gustafson, T. and L. Wolpert. 1967. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. *Biological Reviews* 42:442–498.
- Gustafson, T. and L. Wolpert. 1963. Studies on the cellular basis of morphogenesis in the sea urchin embryo: Formation of the coelom, the mouth, and the primary pore-canal. *Experimental Cell Research* 29:561–582.
- Hakim, J.A., Koo, H., Kumar, R., Lefkowitz, E.J., Morrow, C.D., Powell, M.L., Watts, S.A. and A.K. Bej. 2016. The gut microbiome of the sea urchin, *Lytechinus variegatus*, from its natural habitat demonstrates selective attributes of microbial taxa and predictive metabolic profiles. *FEMS Microbiology Ecology* 92:146–157.
- Haley, S.A. and G.M. Wessel. 1999. The cortical granule serine protease CGSP1 of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*, is autocatalytic and contains a low-density lipoprotein receptor-like domain. *Developmental Biology* 211:1–10.
- Hall, H.G. and V.D. Vacquier. 1982. The apical lamina of the sea urchin embryo: Major glycoproteins associated with the hyaline layer. *Developmental Biology* 89:168–178.
- Hamdoun, A., Schrankel, C.S., Nesbit, K.T. and J.A. Espinoza. 2018. Sea urchins as lab animals for reproductive and developmental biology. *Encyclopedia of Reproduction* 6:696–703.
- Hara, Y., Kuraishi, R., Uemura, I. and H. Katow. 2003. Asymmetric formation and possible function of the primary pore canal in plutei of *Temnopleurus hardwicki*. *Development, Growth & Differentiation* 45:295–308.
- Hardin, J. 1989. Local shifts in position and polarized motility drive cell rearrangement during sea urchin gastrulation. *Developmental Biology* 136:430–445.
- Hardin, J. 1988. The role of secondary mesenchyme cells during sea urchin gastrulation studied by laser ablation. *Development* 103:317–324.
- Hardin, J. and D.R. McClay. 1990. Target recognition by the archenteron during sea urchin gastrulation. *Developmental Biology* 142:86–102.
- Hertwig, O. 1876. Beitrage zur Erkenntnis der Bildung, Befruchtung, und Theilung des tierischen Eies. *Morphologisches Jahrbuch* 1:347–352.
- Hibino, T., Minokawa, T. and A. Yamazaki. 2019. Chapter 4: Cidaroids, clypeasteroids, and spatangoids: Procurement, culture, and basic methods. In *Methods in Cell Biology: Echinoderms, Part B*, ed. A. Hamdoun and K.R. Foltz, 150:81–103. Elsevier; Academic Press, London UK.
- Himmelman, J.H. 1978. Reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Canadian Journal of Zoology* 56:1828–1836.
- Hinman, V.F. and R.D. Burke. 2018. Embryonic neurogenesis in echinoderms. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology* 7:e316.
- Hogan, J.D., Keenan, J.L., Luo, L., Ibn-Salem, J., Lamba, A., Schatzberg, D., Piacentino, M.L., Zuch, D.T., Core, A.B., Blumberg, C., Timmermann, B., Grau, J.H., Speranza, E., Andrade-Navarro, M.A., Irie, N., Poustka, A.J. and C.A. Bradham. 2020. The developmental transcriptome for *Lytechinus variegatus* exhibits temporally punctuated gene expression changes. *Developmental Biology* 460:139–154.
- Horstadius, S. 1939. The mechanics of sea urchin development, studied by operative methods. *Biological Reviews* 14:132–179.
- Horton, T., Kroh, A., Ahyong, S., Bailly, N., Boyko, C.B., et al. 2020. *World Register of Marine Species (WoRMS)*. <https://doi.org/10.14284/170>.
- Houk, M.S. and R.T. Hinegardner. 1980. The formation and early differentiation of sea urchin gonads. *The Biological Bulletin* 159:280–294.
- Hultin, T. 1961. The effect of puromycin on protein metabolism and cell division in fertilized sea urchin eggs. *Experientia* 17:410–411.
- Humphreys, T. 1969. Efficiency of translation of messenger-RNA before and after fertilization in sea urchins. *Developmental Biology* 20:435–458.
- Hunt, T. 2002. Nobel lecture: Protein synthesis, proteolysis, and cell cycle transitions. *Bioscience Reports* 22:465–486.
- Hyman, L.H. 1955. *The invertebrates, echinodermata (4)*. McGraw-Hill Education, New York, NY.
- Ishimoda-Takagi, T., Chino, I. and H. Sato. 1984. Evidence for the involvement of muscle tropomyosin in the contractile



- elements of the coelom-esophagus complex in sea urchin embryos. *Developmental Biology* 105:365–376.
- Israel, J.W., Martik, M.L., Byrne, M., Raff, E.C., Raff, R.A., McClay, D.R. and G.A. Wray. 2016. Comparative developmental transcriptomics reveals rewiring of a highly conserved gene regulatory network during a major life history switch in the sea urchin genus *Heliocidaris*. *PLoS Biology* 14:e1002391.
- Janies, D.A., Witter, Z., Linchangco, G.V., Foltz, D.W., Miller, A.K., Kerr, A.M., Jay, J., Reid, R.W. and G.A. Wray. 2016. EchinoDB, an application for comparative transcriptomics of deeply-sampled clades of echinoderms. *BMC Bioinformatics* 17:48.
- Just, E.E. 1939. *The Biology of the Cell Surface*. The Technical Press LTD; Ave Maria Lane, Ludgate Hill, E.C., London.
- Just, E.E. 1919. The fertilization reaction in *Echinarachnius parma*: I. Cortical response of the egg to insemination. *The Biological Bulletin* 36:110.
- Kahil, K., Varsano, N., Sorrentino, A., Pereiro, E., Rez, P., Weiner, S. and L. Addadi. 2020. Cellular pathways of calcium transport and concentration toward mineral formation in sea urchin larvae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117:30957–30965.
- Kedes, L.H., Chang, A.C.Y., Houseman, D. and S.N. Cohen. 1975. Isolation of histone genes from unfractionated sea urchin DNA by subculture cloning in *E. coli*. *Nature* 255:533–538.
- Kimberly, E.L. and J. Hardin. 1998. Bottle cells are required for the initiation of primary invagination in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 204:235–250.
- Kinjo, S., Kiyomoto, M., Yamamoto, T., Ikeo, K. and S. Yaguchi. 2018. HpBase: A genome database of a sea urchin, *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Development, Growth & Differentiation* 60:174–182.
- Kipryushina, Y.O. and K.V. Yakovlev. 2020. Maternal control of early patterning in sea urchin embryos. *Differentiation* 113:28–37.
- Kiyomoto, M., Hamanaka, G., Hirose, M. and M. Yamaguchi. 2014. Preserved echinoderm gametes as a useful and ready-to-use bioassay material. *Marine Environmental Research* 93:102–105.
- Kominami, T. and Takata. 2004. Gastrulation in the sea urchin embryo: A model system for analyzing the morphogenesis of a monolayered epithelium. *Development, Growth & Differentiation* 46:309–326.
- Kroh, A. and A.B. Smith. 2010. The phylogeny and classification of post-Palaeozoic echinoids. *Journal of Systematic Palaeontology* 8:147–212.
- Kudtarkar, P. and R.A. Cameron. 2017. Echinobase: An expanding resource for echinoderm genomic information. *Database* 2017:bax074.
- Kuroda, R., Kontani, K., Kanda, Y., Katada, T., Nakano, T., Satoh, Y., Suzuki, N. and H. Kuroda. 2001. Increase of cGMP, cADP-ribose and inositol 1,4,5-trisphosphate preceding Ca<sup>2+</sup> transients in fertilization of sea urchin eggs. *Development* 128:4405–4414.
- Lane, M.C., Koehl, M.A., Wilt, F. and R. Keller. 1993. A role for regulated secretion of apical extracellular matrix during epithelial invagination in the sea urchin. *Development* 117:1049–1060.
- Lapraz, F., Besnardeau, L. and T. Lepage. 2009. Patterning of the dorsal-ventral axis in echinoderms: Insights into the evolution of the BMP-chordin signaling network. *PLoS Biology* 7:e1000248.
- Láruson, Á.J. 2017. Rates and relations of mitochondrial genome evolution across the Echinoidea, with special focus on the superfamily Odontophora. *Ecology and Evolution* 7:4543–4551.
- Leigh, S.J., Bowen, J., Pursell, C.P., Covington, J.A., Billson, D.R. and D.A. Hutchins. 2012. Rapid manufacture of monolithic micro-actuated forceps inspired by echinoderm pedicellariae. *Bioinspiration & Biomimetics* 7:044001.
- Lepage, T., Ghiglione, C. and C. Gache. 1992a. Spatial and temporal expression pattern during sea urchin embryogenesis of a gene coding for a protease homologous to the human protein BMP-1 and to the product of the *Drosophila* dorsal-ventral patterning gene tolloid. *Development* 114:147–163.
- Lepage, T., Sardet, C. and C. Gache, C. 1992b. Spatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 150:23–32.
- Lessios, H.A. 1990. Adaptation and phylogeny as determinants of egg size in echinoderms from the two sides of the isthmus of panama. *The American Naturalist* 135:1–13.
- Lessios, H.A. 1988. Temporal and spatial variation in egg size of 13 Panamanian echinoids. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 114:217–239.
- Levitán, D.R. 1993. The importance of sperm limitation to the evolution of egg size in marine invertebrates. *The American Naturalist* 141:517–536.
- Li, E., Cui, M., Peter, I.S. and E.H. Davidson. 2014. Encoding regulatory state boundaries in the pregastrular oral ectoderm of the sea urchin embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:E906–E913.
- Lin, C.-Y. and Y.-H. Su. 2016. Genome editing in sea urchin embryos by using a CRISPR/Cas9 system. *Developmental Biology* 409:420–428.
- Loeb, J. 1899. On the nature of the process of fertilization and the artificial production of normal larvæ (plutei) from the unfertilized eggs of the sea urchin. *American Journal of Physiology* 3:135–138.
- Logan, C.Y., Miller, J.R., Ferkowicz, M.J. and D.R. McClay. 1999. Nuclear beta-catenin is required to specify vegetal cell fates in the sea urchin embryo. *Development* 126:345–357.
- Longo, F.J. and E. Anderson. 1968. The fine structure of pronuclear development and fusion in the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *The Journal of Cell Biology* 39:339–368.
- Longo, F.J. and W. Plunkett. 1973. The onset of DNA synthesis and its relation to morphogenetic events of the pronuclei in activated eggs of the sea urchin, *Arbacia punctulata*. *Developmental Biology* 30:56–67.
- Lowe, C.J., Clarke, D.N., Medeiros, D.M., Rokhsar, D.S. and J. Gerhart. 2015. The deuterostome context of chordate origins. *Nature* 520:456–465.
- Luo, Y.-J. and Y.-H. Su. 2012. Opposing nodal and BMP signals regulate left right asymmetry in the sea urchin larva. *PLoS Biol* 10:e1001402.
- Maderspacher, F. 2008. Theodor Boveri and the natural experiment. *Current Biology* 18:R279–R286.
- Malinda, K.M. and C.A. Etensohn. 1994. Primary mesenchyme cell migration in the sea urchin embryo: Distribution of directional cues. *Developmental Biology* 164:562–578.
- Malumbres, M. 2014. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biology* 15:122.
- Martik, M.L., Lyons, D.C. and D.R. McClay. 2016. Developmental gene regulatory networks in sea urchins and what we can learn from them. *F1000Research* 5:203.
- Martik, M.L. and D.R. McClay. 2017. New insights from a high-resolution look at gastrulation in the sea urchin, *Lytechinus variegatus*. *Mechanisms of Development* 148:3–10.
- Maruyama, Y.K., Nakaseko, Y. and S. Yagi. 1985. Localization of cytoplasmic determinants responsible for primary

- mesenchyme formation and gastrulation in the unfertilized egg of the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus*. *Journal of Experimental Zoology* 236:155–163.
- Mazia, D. 1937. The release of calcium in *Arbacia* eggs on fertilization. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 10:291–304.
- McAlister, J.S. and A.L. Moran. 2012. Relationships among egg size, composition, and energy: A comparative study of geminate sea urchins. *PLoS One* 7:e41599.
- McClintock, J.B., Amsler, M.O., Angus, R.A., Challener, R.C., Schram, J.B., Amsler, C.D., Mah, C.L., Cuce, J. and B.J. Baker. 2011. The Mg-calcite composition of Antarctic echinoderms: Important implications for predicting the impacts of ocean acidification. *The Journal of Geology* 119:457–466.
- Meidel, S.K. and R.E. Scheibling. 1998. Annual reproductive cycle of the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, in differing habitats in Nova Scotia, Canada. *Marine Biology* 131:461–478.
- Meves, F. 1912. Verfolgung des sogenannten Mittelstückes des Echinidenspermiums im befruchteten Ei bis zum Ende der ersten Furchungstheilung. [Tracking of the so-called middle section of the echinid sperm in the fertilized egg until the end of the first cleavage division]. *Archiv für mikroskopische Anatomie* 80:811–823.
- Minokawa, T. 2017. Comparative studies on the skeletogenic mesenchyme of echinoids. *Developmental Biology* 427:212–218.
- Mironov, A.N. 2008. Pourtalesiid sea urchins (Echinodermata: Echinoidea) of the northern Mid-Atlantic Ridge. *Marine Biology Research* 4:3–24.
- Mironov, A.N., Dilman, A.B., Vladychenskaya, I.P. and N.B. Petrov. 2016. Adaptive strategy of the Porcellanasterid sea stars. *Biology Bulletin Russian Academic Science* 43:503–516.
- Mironov, A.N., Minin, K.V. and A.B. Dilman. 2015. Abyssal echinoid and asteroid fauna of the North Pacific. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 111:357–375.
- Mironov, A.N., Minin, K.V. and A.V. Kremenetskaia. 2019. Two new genera of the family Myriotrochidae (Echinodermata, Holothuroidea). *Progress in Oceanography* 178:102195.
- Molina, M.D., de Crozéz, N., Haillet, E. and T. Lepage. 2013. Nodal: Master and commander of the dorsalventral and left-right axes in the sea urchin embryo. *Current Opinion in Genetics & Development* 23:445–453.
- Molina, M.D., Gache, C. and T. Lepage. 2019. Expression of exogenous mRNAs to study gene function in echinoderm embryos. In *Methods in Cell Biology: Echinoderms, Part B*, ed. A. Hamdoun and K.R. Foltz, 150:239–282. Elsevier; Academic Press, London UK.
- Molina, M.D., Quirin, M., Haillet, E., Jimenez, F., Chessel, A. and T. Lepage. 2017. p38 MAPK as an essential regulator of dorsal-ventral axis specification and skeletogenesis during sea urchin development: A re-evaluation. *Development* 144:2270–2281.
- Mongiardino Koch, N., Coppard, S.E., Lessios, H.A., Briggs, D.E.G., Mooi, R. and G.W. Rouse. 2018. A phylogenomic resolution of the sea urchin tree of life. *BMC Evolutionary Biology* 18:189.
- Monroy, A. 1986. A centennial debt of developmental biology to the sea urchin. *The Biological Bulletin* 171:509–519.
- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Belle, R., Bradham, C.A., Beane, W.S. and P. Cormier. 2006. Translational control genes in the sea urchin genome. *Developmental Biology* 300:293–307.
- Morgan, A.J. 2011. Sea urchin eggs in the acid reign. *Cell Calcium* 50:147–156.
- Mulner-Lorillon, O., Chassé, H., Morales, J., Belle, R. and P. Cormier. 2017. MAPK/ERK activity is required for the successful progression of mitosis in sea urchin embryos. *Developmental Biology* 421:194–203.
- Mulochau, T., Conand, C., Stöhr, S., Eléaume, M. and P. Chabanet. 2014. First inventory of the echinoderms from Juan de Nova (Iles Eparses, France) in the Mozambique Channel, south western Indian Ocean. *Western Indian Ocean Journal of Marine Science* 13:23–30.
- Nesbit, K.T., Fleming, T., Batzel, G., Pouv, A., Rosenblatt, H.D., Pace, D.A., Hamdoun, A. and D.C. Lyons. 2019. The painted sea urchin, *Lytechinus pictus*, as a genetically-enabled developmental model. In *Methods in Cell Biology: Echinoderms, Part A*, ed. A. Hamdoun and K.R. Foltz, 150:105–123. Elsevier; Academic Press, London UK.
- Oji, T., Ogawa, Y., Hunter, A.W. and K. Kitazawa, K. 2009. Discovery of dense aggregations of stalked crinoids in Izu-Ogasawara Trench, Japan. *Zoological Science* 26:406–408.
- Okazaki, K. 1975. Spicule formation by isolated micromeres of the sea urchin embryo. *American Zoologist* 15:567–581.
- Oliveri, P. and E.H. Davidson. 2004. Gene regulatory network controlling embryonic specification in the sea urchin. *Current Opinion in Genetics & Development* 14:351–360.
- Oliveri, P., Tu, Q. and E.H. Davidson. 2008. Global regulatory logic for specification of an embryonic cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105:5955–5962.
- Oulhen, N. and G.M. Wessel. 2016. Albinism as a visual, in vivo guide for CRISPR/Cas9 functionality in the sea urchin embryo: Albinism as a visual metric for gene disruption in the sea urchin. *Molecular Reproduction and Development* 83:1046–1047.
- Ouréns, R., Fernández, L. and J. Freire. 2011. Geographic, population, and seasonal patterns in the reproductive parameters of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Marine Biology* 158:793–804.
- Pace, D.A., Maxson, R. and D.T. Manahan. 2010. Ribosomal analysis of rapid rates of protein synthesis in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *The Biological Bulletin* 218:48–60.
- Pagett, R.M. 1981. The penetration of brackish-water by the echinodermata. In *Feeding and Survival Strategies of Estuarine Organisms*, ed N. V. Jones and W. J. Wolff, 135–151. Marine Science. Springer US, Boston, MA.
- Parrington, J., Davis, L.C., Galione, A. and G. Wessel. 2007. Flipping the switch: How a sperm activates the egg at fertilization. *Developmental Dynamics* 236:2027–2038.
- Pederson, T. 2006. The sea urchin's siren. *Developmental Biology* 300:9–14.
- Peter, I.S. and E.H. Davidson. 2011. A gene regulatory network controlling the embryonic specification of endoderm. *Nature* 474:635–639.
- Peter, I.S. and E.H. Davidson. 2010. The endoderm gene regulatory network in sea urchin embryos up to mid-blastula stage. *Developmental Biology* 340:188–199.
- Peterson, R.E. and D.R. McClay. 2003. Primary mesenchyme cell patterning during the early stages following ingress. *Developmental Biology* 254:68–78.
- Pomin, V.H. 2015. Sulfated glycans in sea urchin fertilization. *Glycoconjugate Journal* 32:9–15.
- Poon, J., Fries, A., Wessel, G.M. and M. Yajima. 2019. Evolutionary modification of AGS protein contributes to formation of micromeres in sea urchins. *Nature Communications* 10:3779.

- Power, M.E., Tilman, D., Estes, J.A., Menge, B.A., Bond, W.J., Mills, L.S., Daily, G., Castilla, J.C., Lubchenco, J. and R.T. Paine. 1996. Challenges in the quest for keystones: Identifying keystone species is difficult: But essential to understanding how loss of species will affect ecosystems. *BioScience* 46:609–620.
- Price, A.R.G. and F.W.E. Rowe. 1996. Indian Ocean echinoderms collected during the Sindbad Voyage (1980–81): 3. Ophiuroidea and echinoidea. *Bulletin of the Natural History Museum: Zoology Series* 62:71–82.
- Raff, R.A. 1987. Constraint, flexibility, and phylogenetic history in the evolution of direct development in sea urchins. *Developmental Biology* 119:6–19.
- Raff, R.A. and M. Byrne. 2006. The active evolutionary lives of echinoderm larvae. *Hereditas* 97:244–252.
- Ramos, I. and G.M. Wessel. 2013. Calcium pathway machinery at fertilization in echinoderms. *Cell Calcium* 53:16–23.
- Ransick, A. and E.H. Davidson. 2012. Cis-regulatory logic driving glial cells missing: Self-sustaining circuitry in later embryogenesis. *Developmental Biology* 364:259–267.
- Ransick, A. and E.H. Davidson. 2006. Cis-regulatory processing of Notch signaling input to the sea urchin glial cells missing gene during mesoderm specification. *Developmental Biology* 297:587–602.
- Reich, A., Dunn, C., Akasaka, K. and G. Wessel. 2015. Phylogenomic analyses of echinodermata support the sister groups of asterozoa and echinozoa. *PLoS One* 10:e0119627.
- Rocha, F., Rocha, A.C., Baião, L.F., Gadelha, J., Camacho, C., Carvalho, M.L., Arenas, F., Oliveira, A., Maia, M.R.G., Cabrita, A.R., Pintado, M., Nunes, M.L., Almeida, C.M.R. and L.M.P. Valente. 2019. Seasonal effect in nutritional quality and safety of the wild sea urchin *Paracentrotus lividus* harvested in the European Atlantic shores. *Food Chemistry* 282:84–94.
- Romiguier, J., Gayral, P., Ballenghien, M., Bernard, A., Cahais, V., Chenuil, A., Chiari, Y., Dernet, R., Duret, L., Faivre, N., Loire, E., Lourenco, J.M., Nabholz, B., Roux, C., Tsagkogeorga, G., Weber, A.A.-T., Weinert, L.A., Belkhir, K., Bierne, N., Glémin, S. and N. Galtier. 2014. Comparative population genomics in animals uncovers the determinants of genetic diversity. *Nature* 515:261–263.
- Rowe, F. and M. Richmond. 2004. A preliminary account of the shallow-water echinoderms of Rodrigues, Mauritius, Western Indian Ocean. *Journal of Natural History* 38:3273–3314.
- Runcie, D.E., Dorey, N., Garfield, D.A., Stumpp, M., Dupont, S. and G.A. Wray. 2017. Genomic characterization of the evolutionary potential of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis* facing ocean acidification. *Genome Biology and Evolution* 8:3672–3684.
- Runft, L.L., Jaffe, L.A. and L.M. Mehlmann. 2002. Egg activation at fertilization: Where it all begins. *Developmental Biology* 245:237–254.
- Santella, L., Vasilev, F. and J.T. Chun. 2012. Fertilization in echinoderms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425:588–594.
- Sardet, C. 1984. The ultrastructure of the sea urchin egg cortex isolated before and after fertilization. *Developmental Biology* 105:196–210.
- Sardet, C. and P. Chang. 1985. A marker of animal-vegetal polarity in the egg of the sea urchin *Paracentrotus lividus*. *Experimental Cell Research* 160:73–82.
- Sardet, C., Roegiers, F., Dumollard, R., Rouviere, C. and A. McDougall. 1998. Calcium waves and oscillations in eggs. *Biophysical Chemistry* 72:131–140.
- Saudemont, A., Haillot, E., Mekpoh, F., Bessodes, N., Quirin, M., Lapraz, F., Duboc, V., Röttinger, E., Range, R., Oisel, A., Besnardeau, L., Wincker, P. and T. Lepage. 2010. Ancestral regulatory circuits governing ectoderm patterning downstream of nodal and BMP2/4 revealed by gene regulatory network analysis in an echinoderm. *PLOS Genetics* 6:e1001259.
- Schatten, G. 1981. The movements and fusion of the pronuclei at fertilization of the sea urchin *Lytechinus variegatus*: Time-lapse video microscopy. *Journal of Morphology* 167:231–247.
- Schatten, G. and D. Mazia, D. 1976. The penetration of the spermatozoon through the sea urchin egg surface at fertilization: Observations from the outside on whole eggs and from the inside on isolated surfaces. *Experimental Cell Research* 98:325–337.
- Scheer, U. 2018. Boveri's research at the Zoological Station Naples: Rediscovery of his original microscope slides at the University of Würzburg. *Marine Genomics* 40:1–8.
- Schmidt, G., Hecht, L. and S.J. Thannhauser. 1948. The behavior of the nucleic acids during the early development of the sea urchin egg (Arbacia). *The Journal of General Physiology* 31:203–207.
- Schroeder, T.E. 1980. Expressions of the prefertilization polar axis in sea urchin eggs. *Developmental Biology* 79:428–443.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, Sodergren, E., Weinstock, G.M., Davidson, E.H., et al. The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science* 314:941–952.
- SeGall, G.K. and W.J. Lennarz. 1979. Chemical characterization of the component of the jelly coat from sea urchin eggs responsible for induction of the acrosome reaction. *Developmental Biology* 71:33–48.
- Sherwood, D.R. and D.R. McClay. 1999. LvNotch signaling mediates secondary mesenchyme specification in the sea urchin embryo. *Development* 126:1703–1713.
- Sherwood, D.R. and D.R. McClay. 1997. Identification and localization of a sea urchin Notch homologue: Insights into vegetal plate regionalization and Notch receptor regulation. *Development* 124:3363–3374.
- Simakov, O., Kawashima, T., Marlétaz, F., et al. 2015. Hemichordate genomes and deuterostome origins. *Nature* 527:459–465.
- Sluder, G. 2016. Using sea urchin gametes and zygotes to e centrosome duplication. *Cilia* 5:20.
- Smirnov, A. 1994. Arctic echinoderms: Composition distribution and history of the fauna. In *Echinoderms through Time*, ed. B. David, A. Guille, J.P. Féral and M. Roux, 135–143. A.A. Balkema, Rotterdam, Brookfield.
- Smith, A.B. and S. Zamora. 2013. Cambrian spiral-plated echinoderms from Gondwana reveal the earliest pentaradial body plan. *Proceedings of the Royal Society B* 280:20131197.
- Smith, M.M., Smith, L.C., Cameron, R.A. and L.A. Urry. 2008. The larval stages of the sea urchin, *Strongylocentrotus purpuratus*. *Journal of Morphology* 269:713–733.
- Sodergren, E., Shen, Y., Song, X., Zhang, L., Gibbs, R.A. and G.M. Weinstock. 2006. Shedding genomic light on Aristotle's lantern. *Developmental Biology* 300:2–8.
- Song, J.L., Wong, J.L. and G.M. Wessel. 2006. Oogenesis: Single cell development and differentiation. *Developmental Biology* 300:385–405.
- Stanwell-Smith, D. and L.S. Peck. 1998. Temperature and embryonic development in relation to spawning and field occurrence of larvae of three Antarctic echinoderms. *The Biological Bulletin* 194:44–52.
- Starr, M., Himmelman, J.H. and J.-C. Therriault. 1990. Direct coupling of marine invertebrate spawning with phytoplankton blooms. *Science* 247:1071–1074.



- Stauber, M. 1993. The lantern of Aristotle: Organization of its coelom and origin of its muscles (Echinodermata, Echinoidea). *Zoomorphology* 113:137–151.
- Steinhardt, R.A. and D. Epel. 1974. Activation of sea-urchin eggs by a calcium ionophore. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71:1915–1919.
- Steinhardt, R.A., Zucker, R. and G. Schatten. 1977. Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. *Developmental Biology* 58:185–196.
- Stephens, L., Hardin, J., Keller, R. and F. Wilt. 1986. The effects of aphidicolin on morphogenesis and differentiation in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 118:64–69.
- Stepicheva, N.A. and J.L. Song. 2014. High throughput micro-injections of sea urchin zygotes. *Journal of Visualized Experiments JoVE* e50841.
- Su, Y.-H., Li, E., Geiss, G.K., Longabaugh, W.J.R., Krämer, A. and E.H. Davidson. 2009. A perturbation model of the gene regulatory network for oral and aboral ectoderm specification in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 329:410–421.
- Summers, R.G. and B.L. Hylander. 1974. An ultrastructural analysis of early fertilization in the sand dollar, *Echinarachnius parma*. *Cell and Tissue Research* 150:343–368.
- Suzuki, H. and S. Yaguchi. 2018. Transforming growth factor- $\beta$  signal regulates gut bending in the sea urchin embryo. *Development, Growth & Differentiation* 60:216–225.
- Swann, K. and F.A. Lai. 2016. Egg activation at fertilization by a soluble sperm protein. *Physiological Reviews* 96:127–149.
- Swartz, S.Z. and G.M. Wessel. 2015. Germ line versus soma in the transition from egg to embryo. *Current Topics in Developmental Biology* 113:149–190.
- Sweet, H.C., Gehring, M. and C.A. Etensohn. 2002. LvDelta is a mesoderm-inducing signal in the sea urchin embryo and can endow blastomeres with organizer-like properties. *Development* 129:1945–1955.
- Tamboline, C.R. and R.D. Burke. 1992. Secondary mesenchyme of the sea urchin embryo: Ontogeny of blastocoelar cells. *Journal of Experimental Zoology* 262:51–60.
- Telford, M.J., Lowe, C.J., Cameron, C.B., Ortega-Martinez, O., Aronowicz, J., Oliveri, P. and R.R. Copley. 2014. Phylogenomic analysis of echinoderm class relationships supports Asterozoa. *Proceedings of the Royal Society B* 281:20140479.
- Terasaki, M. and C. Sardet. 1991. Demonstration of calcium uptake and release by sea urchin egg cortical endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology* 115:1031–1037.
- Thieffry, D. and R.M. Burian. 1996. Jean Brachet's alternative scheme for protein synthesis. *Trends in Biochemical Sciences* 21:114–117.
- Tilney, L.G. and L.A. Jaffe. 1980. Actin, microvilli, and the fertilization cone of sea urchin eggs. *The Journal of Cell Biology* 87:771–782.
- Topper, T.P., Guo, J., Clausen, S., Skovsted, C.B. and Z. Zhang. 2019. A stem group echinoderm from the basal Cambrian of China and the origins of Ambulacraria. *Nature Communications* 10:1366.
- Tu, Q., Cameron, R.A. and E.H. Davidson. 2014. Quantitative developmental transcriptomes of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental Biology* 385:160–167.
- Uthicke, S., Schaffelke, B. and M. Byrne. 2009. A boom: Bust phylum? Ecological and evolutionary consequences of density variations in echinoderms. *Ecological Monographs* 79:3–24.
- Vacquier, V.D. 2012. The quest for the sea urchin egg receptor for sperm. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 425:583–587.
- Vacquier, V.D. 2011. Laboratory on sea urchin fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 78:553–564.
- Vacquier, V.D. 1975. The isolation of intact cortical granules from sea urchin eggs: Calcium ions trigger granule discharge. *Developmental Biology* 43:62–74.
- Vafidis, D., Antoniadou, C. and V. Ioannidi. 2020. Population density, size structure, and reproductive cycle of the comestible sea urchin *Sphaerechinus granularis* (Echinodermata: Echinoidea) in the Pagasitikos Gulf (Aegean Sea). *Animals* 10:1506.
- Venuti, J.M., Pepicelli, C. and Flowers, V.L. 2004. Analysis of sea urchin embryo gene expression by immunocytochemistry. In *Methods in Cell Biology: Development of Sea Urchins, Ascidians, and Other Invertebrate Deuterostomes: Experimental Approaches*, ed. C.A. Etensohn, G.A. Wray and G.M. Wessel, 74:333–369. Elsevier; Academic Press, London UK.
- Vilela-silva, A.-C.E.S., Hirohashi, N. and P.A.S. Mouro. 2008. The structure of sulfated polysaccharides ensures a carbohydrate-based mechanism for species recognition during sea urchin fertilization. *The International Journal of Developmental Biology* 52:551–559.
- von Dassow, G., Valley, J. and K. Robbins. 2019. Microinjection of oocytes and embryos with synthetic mRNA encoding molecular probes. In *Methods in Cell Biology: Echinoderms, Part B*, ed. A. Hamdoun and K.R. Foltz, 150:189–222. Elsevier; Academic Press, London UK.
- Voronina, E. and G.M. Wessel. 2006. Activator of G-protein signaling in asymmetric cell divisions of the sea urchin embryo. *Development, Growth & Differentiation* 48:549–557.
- Walker, C.W., Lesser, M.P. and T. Unuma. 2013. Sea urchin gametogenesis: Structural, functional and molecular/genomic biology. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science: Sea Urchins: Biology and Ecology*, ed. J.M. Lawrence, 38:25–43. Elsevier, London UK.
- Walker, C.W., Unuma, T. and M.P. Lesser. 2007. Chapter 2: Gametogenesis and reproduction of sea urchins. In *Developments in Aquaculture and Fisheries Science, Edible Sea Urchins: Biology and Ecology*, ed. J.M. Lawrence, 37:11–33. Elsevier, London, UK.
- Warburg, O. 1908. Beobachtungen über die Oxydationsprozesse im Seeigel. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie* 57:1–16.
- Wessel, G.M., Brayboy, L., Fresques, T., Gustafson, E.A., Oulhen, N., Ramos, I., Reich, A., Swartz, S.Z., Yajima, M. and V. Zazueta. 2014. The biology of the germ line in echinoderms: The germ-cell lineage in echinoderms. *Molecular Reproduction and Development* 81:679–711.
- Wessel, G.M., Kiyomoto, M., Shen, T.-L. and M. Yajima. 2020. Genetic manipulation of the pigment pathway in a sea urchin reveals distinct lineage commitment prior to metamorphosis in the bilateral to radial body plan transition. *Scientific Reports* 10:1973.
- Wessel, G.M., Zhang, W. and W.H. Klein. 1990. Myosin heavy chain accumulates in dissimilar cell types of the macromere lineage in the sea urchin embryo. *Developmental Biology* 140:447–454.
- Whitaker, M.J. 2006. Calcium at fertilization and in early development. *Physiological Reviews* 86:25–88.
- Whitaker, M.J. and R.A. Steinhardt. 1982. Ionic regulation of egg activation. *Quarterly Reviews of Biophysics* 15:593–666.
- Wikramanayake, A.H., Huang, L. and W.H. Klein. 1998.  $\beta$ -catenin is essential for patterning the maternally specified animal-vegetal axis in the sea urchin embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:9343–9348.
- Wikramanayake, A.H., Peterson, R., Chen, J., Huang, L., Bince, J.M., McClay, D.R. and W.H. Klein. 2004. Nuclear  $\beta$ -catenin-

- dependent Wnt8 signaling in vegetal cells of the early sea urchin embryo regulates gastrulation and differentiation of endoderm and mesodermal cell lineages. *Genesis* 39:194–205.
- Wong, J.L., Créton, R. and G.M. Wessel. 2004. The oxidative burst at fertilization is dependent upon activation of the dual oxidase *udx1*. *Developmental Cell* 7:801–814.
- Wong, J.M., Gaitán-Espitia, J.D. and G.E. Hofmann. 2019. Transcriptional profiles of early stage red sea urchins (*Mesocentrotus franciscanus*) reveal differential regulation of gene expression across development. *Marine Genomics* 48:100692.
- Wood, N.J., Mattiello, T., Rowe, M.L., Ward, L., Perillo, M., Arnone, M.I., Elphick, M.R. and P. Oliveri. 2018. Neuropeptidergic systems in pluteus larvae of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*: Neurochemical complexity in a “simple” nervous system. *Frontiers in Endocrinology* 9:628.
- Wygoda, J.A., Yang, Y., Byrne, M. and G.A. Wray. 2014. Transcriptomic analysis of the highly derived radial body plan of a sea urchin. *Genome Biology and Evolution* 6:964–973.
- Yaguchi, S., Yaguchi, J., Suzuki, H., Kinjo, S., Kiyomoto, M., Ikeo, K. and T. Yamamoto. 2020. Establishment of homozygous knock-out sea urchins. *Current Biology* 30:R427–R429.
- Yajima, M. and G.M. Wessel. 2012. Autonomy in specification of primordial germ cells and their passive translocation in the sea urchin. *Development* 139:3786–3794.
- Yajima, M. and G.M. Wessel. 2011. Small micromeres contribute to the germline in the sea urchin. *Development* 138:237–243.
- Yoshimura, K., Iketani, T. and T. Motokawa. 2012. Do regular sea urchins show preference in which part of the body they orient forward in their walk? *Marine Biology* 159:959–965.
- Yu, L., Yan, M., Sui, J., Sheng, W.-Q. and Z.-F. Zhang. 2013. Gonadogenesis and expression pattern of the vasa gene in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* during early development. *Molecular Reproduction and Development* 80:744–752.
- Zamora, S., Lefebvre, B., Javier Álvaro, J., Clausen, S., Elicki, O., Fatka, O., Jell, P., Kouchinsky, A., Lin, J.-P., Nardin, E., Parsley, R., Rozhnov, S., Sprinkle, J., Sumrall, C.D., Vizcaíno, D. and A.B. Smith. 2013. Chapter 13 Cambrian echinoderm diversity and palaeobiogeography. *Geological Society, London, Memoirs* 38:157–171.
- Zhang, Q.Y., Tamura, M., Uetake, Y., Washitani-Nemoto, S. and S. Nemoto. 2004. Regulation of the paternal inheritance of centrosomes in starfish zygotes. *Developmental Biology* 266:190–200.
- Ziegler, A., Mooi, R., Rolet, G. and C. De Ridder. 2010. Origin and evolutionary plasticity of the gastric caecum in sea urchins (Echinodermata: Echinoidea). *BMC Evolutionary Biology* 10:313.



## Discussion, perspectives et données préliminaires

Cet article donne un aperçu des connaissances accumulées sur le modèle oursin au cours du siècle dernier. L'utilisation de ce modèle dans le cadre de l'étude du contrôle du cycle cellulaire a été couronnée de nombreux succès qui ont donné un éclairage nouveau sur les mécanismes qui président à la vie des cellules. Durant cette thèse, je me suis intéressé à la dynamique des premières divisions de l'embryon de cet organisme suite à la fécondation.

Les premiers clivages de l'embryon sont des événements phénotypiques faciles à observer et à quantifier au travers d'une cinétique qui exprime le pourcentage d'embryons divisés (premier ou second clivage) en fonction du temps. La courbe classique est une sigmoïde qui illustre les divisions rapides et synchrones d'une population d'œufs. Le suivi de la cinétique de division est informatif pour comprendre l'impact de différents acteurs sur la dynamique des divisions mitotiques de l'embryon d'oursin. Une des approches classiques que j'ai utilisée pour étudier l'effet de la traduction d'un ARNm sur la dynamique du cycle cellulaire a été d'introduire un morpholino par micro-injection au sein d'une population d'œufs et de suivre la cinétique de division. Cependant, au cours de ma thèse j'ai réalisé combien il était important de développer d'autres approches pour suivre de manière plus spécifique l'effet des différents acteurs sur le cycle cellulaire. En effet, contrairement aux approches utilisant des drogues ciblant des voies de signalisation spécifiques, les approches de micro-injection ne permettent pas d'envisager de suivre l'effet de la molécule injectée par des techniques classiques de Western-blot. Ce point s'explique par le nombre relativement faible d'embryons injectés (allant de 10 à 100 œufs par conditions expérimentales) et le faible volume d'un œuf (0,5nL pour 80 à 100µm de diamètre). Ainsi le suivi classique par Western-blot, tel que la production de la cycline B ou de la phosphorylation de CDK1 sur un site de phosphorylation inhibiteur n'est pas accessible après micro-injection.

Dans ce contexte, je me suis attaché à rechercher des marqueurs du cycle cellulaire observables en immunofluorescence au sein même de la cellule. À la fin de cette revue nous visualisons pour la première fois, dans le temps et l'espace, l'activité du complexe CycB/CDK1 au cours des premières divisions de l'embryon d'oursin (Article 1 - Figure 6). Nous utilisons la capacité de CDK1 à phosphoryler *in vivo* la sous-unité catalytique de la phosphatase 1 sur la Thréonine 318 (pT318PP1C). Cette phosphorylation, analysée par Western blot, avait été préalablement démontrée comme étant un marqueur de l'activité CDK1 dans l'embryon d'oursin (Chassé et al. 2016). Nous mettons en évidence ici que cette activité peut être visualisée spatialement et suivie au sein d'un seul embryon. Ce marqueur révèle une activité accumulée particulièrement

dans la région du fuseau mitotique, déterminée par le marquage tubuline, avec une apparition lors de la prophase, un maximum de signal en métaphase et une disparition au cours de l'anaphase. Ces résultats impliquent aussi que l'activité localisée de CDK1 en mitose est conservée de l'embryon d'oursin aux cellules somatiques chez l'homme (Kwon et al. 1997). Comme nous l'avons vu en troisième partie de l'introduction, les phases M impliquent de nombreux contrôles de la traduction temporellement, mais aussi spatialement (Waldron and Yajima 2020). CDK1 est notamment l'un des acteurs qui contrôle ces régulations de la traduction en phase M (Kalous et al. 2020). Il est donc nécessaire de développer l'étude de l'activité de CDK1 à la mitose chez l'oursin et plus particulièrement l'impact de la part de CDK1 néo-traduit en réponse à la fécondation (Chassé et al. 2018).

Comme je l'ai expliqué en introduction, l'équipe a produit le premier traductome à la transition ovule-embryon chez l'oursin (Chassé et al. 2018). La synthèse protéique, qui est nécessaire pour la progression même du premier cycle post-fécondation, induit la néo-traduction sélective d'ARNm, notamment ceux de la kinase CDK1 et ses cyclines associées A et B. Il est donc maintenant important d'étudier le rôle fonctionnel de la néo-traduction de ces acteurs sur les divisions embryonnaires. Tester directement l'effet de l'inhibition des néo-traductions sur l'activité CDK1/CycB n'a pas pu se faire durant le temps de la thèse. En revanche dans le cadre d'une approche préliminaire, la dynamique des premières divisions embryonnaires de l'oursin a été analysée, par l'injection de morpholinos (Mo) dirigés spécifiquement contre les ARNm de ces acteurs. Les morpholinos sont prévus pour fixer les régions 5'UTR et/ou l'AUG de l'ARNm ciblé. Comme précisé dans l'introduction, le morpholino est un oligonucléotide dont la fixation à sa cible complémentaire est plus stable que les siARN. Cela crée un blocage de l'avancée du ribosome lors de l'initiation de la traduction (Angerer and Angerer 2004). De plus, chez l'oursin, le système Dicer impliqué dans le fonctionnement des siARN, ne semble pas intervenir avant 48h post-fécondation, empêchant l'utilisation classique de siARN (Song et al. 2012).

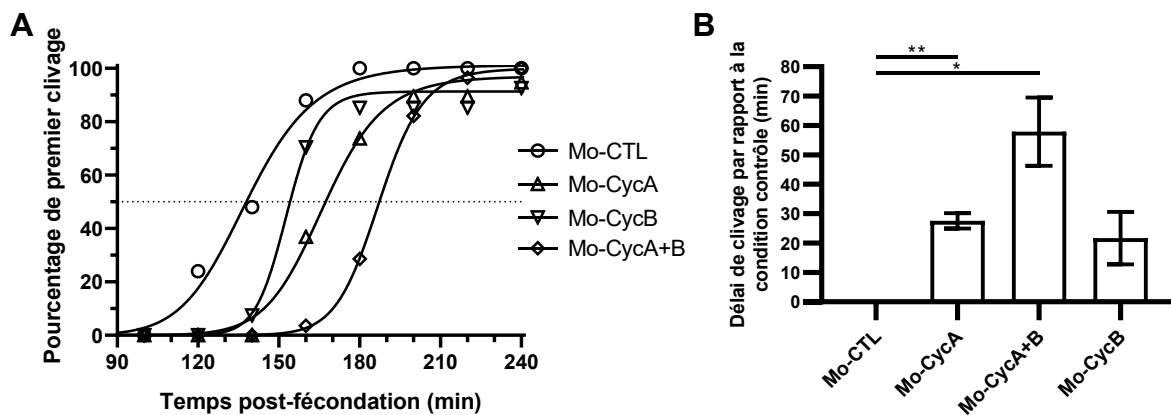
Préalablement à mes travaux, lors de la maturation méiotique *in vitro* des ovocytes de l'oursin *Lytechinus variegatus*, Voronina et ses collaborateurs ont étudié l'impact des traductions des cyclines A et B (Voronina et al. 2003). Ils ont montré une accumulation importante de l'ARNm et de la protéine cycline B pendant l'ovogénèse et un stock de cycline B dans l'ovule mature. Ils ont alors injecté des morpholinos dirigés contre les cyclines A et B afin d'inhiber leur traduction. L'inhibition de traduction de cycline B lors de l'ovogénèse ne bloque pas l'entrée en méiose (stade GVBD détecté) mais bloque sa progression. L'inhibition

de la traduction de cycline A ne montre pas d'effet notable lors de l'ovogénèse. En revanche, d'une manière surprenante, dans un blastomère d'embryon à deux cellules, l'inhibition pendant un cycle mitotique de la traduction de cycline B ne bloque pas l'avancée mais semble simplement le retarder. Ce comportement, évitant une inhibition totale de la mitose en absence de cycline B, peut s'expliquer par la compensation par la cycline A néo-synthétisée. En effet, il faut inhiber la traduction des deux cyclines pour réussir à bloquer la division mitotique. Cette étude révèle donc des différences de nécessité de traduction des cyclines A et B, selon qu'il s'agit d'un cycle mitotique ou méiotique. Il est à noter que dans cette étude, les critères qui définissent le retard ou le blocage du cycle ne sont pris qu'à un temps donné et un suivi plus continu semble nécessaire. De plus, dans ces expériences, le faible nombre d'œufs par conditions (<15, voire <10 pour la majorité des conditions) est un élément limitant pour de potentielles analyses statistiques. C'est dans ce contexte que j'ai développé une approche quantitative et statistique du dynamisme du cycle cellulaire, en absence de traduction d'ARNm recrutés dans les polysomes actifs.

Le protocole final de cette approche sera notamment détaillé au sein de l'article 4 (en préparation) du chapitre 4 qui présente des données obtenues pour l'étude fonctionnelle de la traduction du facteur eIF4B en réponse à la fécondation. Dans le cadre de ce paragraphe, je me focalise sur le suivi des cinétiques de divisions après inhibition de la néo-traduction des acteurs cyclines A et B et CDK1 en réponse à la fécondation. Pour résumer le protocole : les ovules d'oursins dégangués sont alignés et collés sur une lamelle traitée à la protamine dans une boîte de Petri contenant de l'eau de mer. Les différentes solutions contenant les morpholinos sont introduites par micro-injection dans les ovules (100 par condition) qui sont ensuite fécondés. Le suivi des divisions est réalisé par prises de vue manuelles pour la Figure 19, puis optimisé par suivi au vidéomicroscope et comptage semi-informatique pour la Figure 20. Les cinétiques sont ainsi déterminées (graphique A) puis le temps auquel il y a 50% de divisions est comparé avec la condition contrôle (graphique B).

L'effet de l'inhibition de la traduction des cyclines A et B a été étudié par l'injection de morpholinos dirigés contre la cycline A (Mo-CycA, 3,33nM intracellulaire), la cycline B (Mo-CycB, 3,33nM<sub>ic</sub>) ou les deux (Mo-CycA+B, 1,67nM<sub>ic</sub> de chaque). Les résultats sont présentés en Figure 19. L'inhibition des néo-traductions des cyclines A et B révèlent un changement dans la dynamique de la première division. L'injection des Mo-Cyc A et B injectés indépendamment, induit un retard moyen de 21 min en présence du Mo-CycB, 27 min pour le Mo-CycA alors que la micro-injection conjointe provoque un retard moyen de 58 min de la première division. Ce

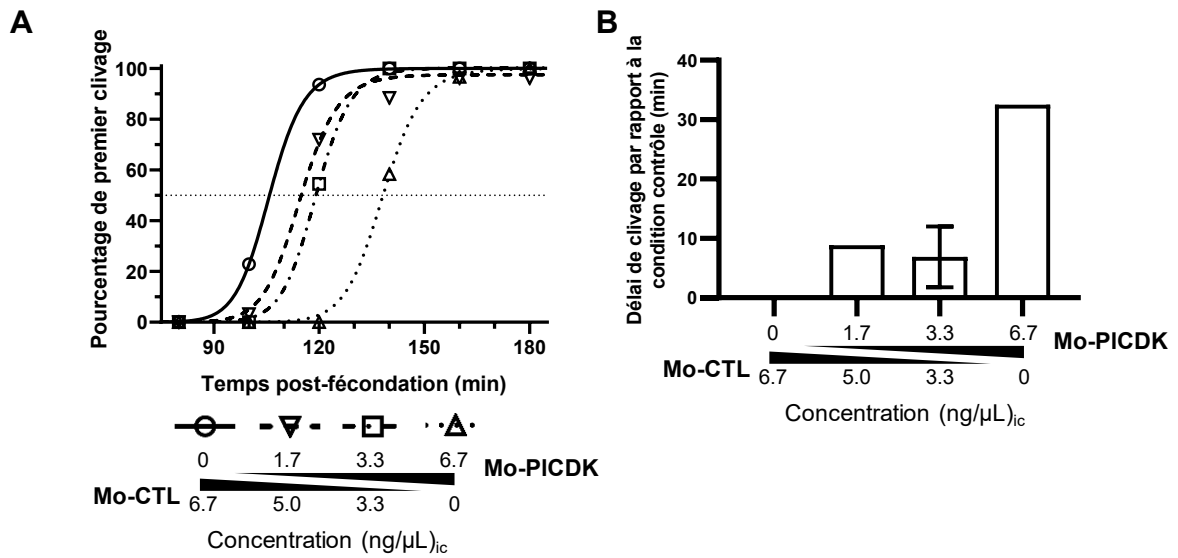
comportement démontre l'importance du suivi de la dynamique des divisions. Un retard aussi important pour la condition Mo-CycA+B aurait pu passer pour une incapacité à se diviser si la mesure avait été faite au point 160 mpf. Ces résultats confirment cependant, dans le contexte de divisions mitotiques comme Voronina en 2003, que les cyclines A et B semblent permettre leur compensation à la vue de l'effet de synergie lors de l'inhibition des deux cyclines. Néanmoins, il reste à comprendre comment, en absence de production de ces deux régulateurs clés, le clivage finit par avoir lieu. L'existence d'un stock protéique maternel de cycline peut expliquer ce comportement. Un autre point qui n'a jamais été pris en compte est le rôle potentiel de la néo-synthèse de la cycline B3, dont l'ARNm est montré comme recruté dans les polysomes en réponse à la fécondation (Chassé et al. 2018).



*Figure 19 La néo-traduction de cycline A et B en réponse à la fécondation est nécessaire pour la bonne dynamique de la première division chez *S. granularis**

La première division après fécondation est retardée par la micro-injection de morpholinos dirigés contre la cycline A (Mo-CycA), la cycline B (Mo-CycB) ou les deux cyclines A et B (Mo-CycA+B). Les courbes de divisions représentatives des embryons injectés sont présentées en (A). Le temps auquel 50% d'œufs se sont divisés, a été identifié et est exprimé en délai (en minutes) par rapport à la condition d'injection avec un morpholino contrôle (Mo-CTL). Les injections sont faites à la concentration intracellulaire de 3.33 nM totale, soit 1.67 nM de chaque morpholino pour la condition Mo-CycA+B. Trente œufs ont été injectés par condition. N=3 réplicats indépendants. Les barres d'erreurs représentent la SEM. (t-test: \*p-value < 0.05 ; \*\*p-value < 0.01 ; Mo-CycB\_p-value = 0.072).

La néo-traduction de CDK1 a été inhibée par injection d'un morpholino spécifique (Mo-CDK) (1,67/3,33/6,66 nM<sub>ic</sub>). Une dose réponse est présentée dans la Figure 20. La dynamique du premier clivage est également affectée avec un délai de clivage moyen de 7 min pour 3,33nM<sub>ic</sub> de Mo-CDK. Un effet dose dépendant peut également être observé notamment à la concentration de 6,66nM<sub>ic</sub> retardant le premier cycle de plus de 30min. L'effet sur la seconde division a été testé et est similaire à la première division (résultats non montrés).



*Figure 20 La néo-traduction de CDK1 en réponse à la fécondation semble nécessaire pour la bonne dynamique de la première division chez P. lividus*

La première division après fécondation est retardée par la micro-injection de morpholinos dirigés contre CDK1 (Mo-CDK). Les courbes de divisions représentatives des embryons injectés sont présentées en (A). Le temps auquel 50% d'œufs se sont divisés, a été identifié et est exprimé en délai (en minutes) par rapport à la condition d'injection avec un morpholino contrôle (Mo-CTL). Les injections sont faites avec les deux morpholinos à la concentration intracellulaire de 6.66 nM totale selon les proportions indiquées. Cent œufs ont été injectés par condition. N=5 réplicats indépendants à 3.33 nM, dont un réplicat associé à la dose réponse. Les barres d'erreurs représentent la SEM.

Ces données sur l'inhibition de traduction des cyclines A et B et CDK1 sont préliminaires et nécessitent des contrôles supplémentaires, en particulier, des contrôles de spécificité avec des sauvetages phénotypiques. Mais l'objectif final sera de suivre l'effet de l'inhibition de la néo-synthèse de ces acteurs sur la répartition spatiale de l'activité du complexe CDK1/CycB en suivant *in toto* l'état de phosphorylation de la sous-unité catalytique de la PP1.





## Chapitre 2 : Étude de la dynamique du cycle cellulaire en réponse à la fécondation

Afin de compléter la panoplie de marqueurs de la dynamique de la cinétique de division, j'ai cherché à suivre d'autres marqueurs mitotiques que la p318PP1C.

Les modifications d'Histones sont des marqueurs pour commander la condensation ou participer à l'assemblage des éléments permettant le SAC. Les kinases ciblant les Histones ont un rôle majeur pour influencer le comportement et le devenir d'un chromosome durant un cycle cellulaire. Aurora B est notamment la kinase majoritaire des phosphorylations Ser10 et Ser28 de l'Histone H3 en mitose pour induire la condensation et la cohésion des chromosomes (Chen et al. 2017; Prigent and Dimitrov 2003; Dai et al. 2006). L'Histone H3 est également phosphorylée sur la Thréonine 3 (pT3H3). Cette phosphorylation participerait à la compaction et l'alignement correcte des chromosomes à la mitose. La kinase haspine a été identifiée comme la kinase qui phosphoryle spécifiquement la T3H3 (Dai et al. 2006). De plus, chez les mammifères, l'haspine est une cible des kinases CDK1 et PLK1 (Zhou et al. 2014). La pT3H3 pourrait ainsi servir de marqueurs en aval de la signalisation de ces kinases.

Décrit pour la première fois en 1994 chez les cellules germinales de souris, l'ARNm codant pour l'haspine a d'abord été nommé GSG2 (Germ cell-Specific Gene 2) puis renommé haspine (Haploid germ cell-specific nuclear protein kinase) (Tanaka et al. 1994; 1999). Il s'agit d'une kinase de serine/thréonine atypique dans le sens où le domaine kinase n'a pas besoin d'une phosphorylation pour être actif contrairement aux autres groupes de kinases. La structure plus rigide de ce domaine lui permet d'être constitutivement actif. Cependant, un segment basique de la protéine sert d'auto-inhibiteur lors de l'interphase du cycle. Ce segment auto-inhibiteur est désactivé en mitose par les phosphorylations successives de CDK1, créant un site de fixation pour PLK1 (priming) qui elle aussi la phosphoryle (Ghenoiu et al. 2013). Haspine peut ainsi, spécifiquement en mitose, phosphoryler son substrat : la T3H3. D'autres éléments modulent son activité. En effet, des modifications épigénétiques sur l'Histone H3 (méthylation sur Arg2 et Acétylation/Méthylation sur Lys4) réduisent fortement l'activité d'haspine sur la T3H3 (Eswaran et al. 2009; Han et al. 2011). Les phosphorylations par CDK1 et PLK1 permettent de moduler l'activité d'haspine essentielle pour les étapes de mitose. En effet, la pT3H3, n'apparaissant qu'en mitose, permet le recrutement du CPC (pour rappel, élément essentiel pour la bonne interaction fuseau-kinétochore en pro-métaphase). Ainsi, la kinase du CPC, Aurora B, est recrutée aux kinétochores *via* la Survivine qui reconnaît cette pT3H3. De plus, ce recrutement se déroule aux centromères des chromosomes, car l'haspine y est recrutée

par deux éléments (revue par (Feizbakhsh et al. 2017), à savoir les cohésines présentes aux centromères avec la protéine Pds5 faisant le lien, ainsi que la topoisomérase II présente sur l'ADN des centromères. L'haspine participe au bon attachement des microtubules aux kinétochores pour réaliser un alignement correct des chromosomes par le fuseau (Kelly et al. 2010). Des modulations de l'activité ou de quantité d'haspine par l'utilisation de drogues ou d'ARNi causent des arrêts du cycle cellulaire en pro-métaphase avec des chromosomes non alignés dans les cellules de mammifères.

À la fécondation chez l'oursin, les ARNm de différents acteurs du cycle cellulaire, et notamment agissant sur des contrôles de chromosomes (condensation et SAC), sont recrutés pour être traduit (Chassé et al. 2018). L'embryon d'oursin est d'ailleurs compétent au SAC contrairement aux embryons de Chordés (Chenevert et al. 2020). Les modifications post-traductionnelles d'Histones sont peu étudiées chez l'oursin (Green et al. 1995) et la pT3H3 n'avait jamais encore été examinée dans un embryon de métazoaire. Dans cet article, nous avons ainsi étudié les dynamiques de l'activité de CycB/CDK1 par le suivi de la pT318PP1C et de l'activité de la kinase haspine par le statut de phosphorylation de la T3H3. Cette étude est réalisée selon deux approches : une approche de biologie moléculaire pour laquelle j'ai principalement participé et une approche d'immunofluorescence. Nous avons pu montrer pour la première fois la dynamique de l'activité de l'haspine aux cours des premières divisions de l'embryon d'oursin, de manière spatiale et temporelle. Nous avons également réalisé des tests pharmacologiques avec l'utilisation des drogues inhibitrices CHR-6494 (analogue de l'ATP) publiée comme étant spécifique d'haspine (Huertas et al. 2012), ainsi que la Roscovitine spécifique de la kinase CDK1 couramment utilisée chez l'oursin (Chassé et al. 2016).

Article 2 :

*A Peak of H3T3 Phosphorylation  
Occurs in Synchrony with Mitosis in  
Sea Urchin Early Embryos*

Omid Feizbakhsh †, Florian Pontheaux †,  
Virginie Glippa, Julia Morales, Sandrine Ruchaud,  
Patrick Cormier \* and Fernando Roch \*

*Cells*, 2020. DOI : 10.3390/cells9040898



Article

# A Peak of H3T3 Phosphorylation Occurs in Synchrony with Mitosis in Sea Urchin Early Embryos

Omid Feizbakhsh <sup>†</sup>, Florian Pontheaux <sup>†</sup>, Virginie Glippa, Julia Morales , Sandrine Ruchaud , Patrick Cormier \* and Fernando Roch \*

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Sorbonne Université, Integrative Biology of Marine Models (LBI2M), Station Biologique de Roscoff, CS 90074, 29680 Roscoff CEDEX, France

\* Correspondence: patrick.cormier@sb-roscoff.fr (P.C.); fernando.roch@sb-roscoff.fr (F.R.)

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Received: 28 February 2020; Accepted: 2 April 2020; Published: 7 April 2020



**Abstract:** The sea urchin embryo provides a valuable system to analyse the molecular mechanisms orchestrating cell cycle progression and mitosis in a developmental context. However, although it is known that the regulation of histone activity by post-translational modification plays an important role during cell division, the dynamics and the impact of these modifications have not been characterised in detail in a developing embryo. Using different immuno-detection techniques, we show that the levels of Histone 3 phosphorylation at Threonine 3 oscillate in synchrony with mitosis in *Sphaerechinus granularis* early embryos. We present, in addition, the results of a pharmacological study aimed at analysing the role of this key histone post-translational modification during sea urchin early development.

**Keywords:** histone phosphorylation; Haspin; mitosis; cell division; CDK1; CHR-6494; Roscovitine; fertilisation; sea urchin embryo; *Sphaerechinus granularis*

## 1. Introduction

Fertilisation is not just the encounter of two gametes; it is also a decisive event triggering the transformation of a quiescent egg into an actively developing embryo. Sea urchins constitute a powerful model system to study the molecular mechanisms orchestrating this radical conversion, which is a key step in the early life of all metazoan organisms [1]. In sea urchins, mature eggs are haploid cells arrested in the G1-phase of the cell cycle. As meiosis has been completed before fertilisation, sperm entry can be thus regarded as a proliferative signal promoting cell division. In addition, mRNA transcription and ribosome biogenesis seem largely dispensable for the three first mitotic divisions [2,3]. From a mechanistic perspective, this implies that cell cycle progression relies on the temporal and spatial control of maternal mRNA translation and a complex cascade of post-translational modifications. Consistently, the dramatic rise in mRNA translation observed in fertilised eggs has been shown to be essential for M-phase completion [4,5], and the contribution of protein phosphorylation to the first mitotic cell cycles has been recognised as crucial [6].

Cell division is the result of a complex series of coordinated events, including chromatin condensation, formation of a bipolar spindle, chromosome alignment and separation of sister chromatids [7]. The Cyclin B/CDK1 (Cyclin Dependent Kinase 1) complex is the key factor orchestrating these different processes, acting upstream of a cascade of post-translational regulatory events [8]. For instance, the contribution of this complex is essential for the activation of the multiple kinases and phosphatases participating during kinetochore assembly and chromosome segregation [9,10]. However, despite the fact that Cyclins were first described in sea urchin embryos [11], little is known in these animals about the identity of the Cyclin B/CDK1 targets, especially at the chromatin level.

In fact, although the regulation of histone activity via post-translational modifications is likely to play a central role during chromatin condensation and chromatid separation [12,13], the dynamics of these modifications and their functional significance have not been studied in depth during sea urchin development [14].

The presence of high levels of phosphorylated histone H3 is one of the unequivocal signatures of cell division, and it is well established that the H3 Ser10 and Ser28 residues are phosphorylated during chromosome condensation in multiple species [15–17]. However, the H3 also becomes phosphorylated at Thr3 during mitosis in many different taxa, including mammals [18,19], insects [20], plants [21] and fungi [22]. In mammalian cells, the levels of the T3H3 phosphorylated form (T3H3ph) oscillate following a strict temporal and spatial pattern. T3H3ph appears during early prophase in areas of condensed chromatin, occupies the pericentromeric chromatin and the chromosome arms during prometaphase and metaphase, and disappears by late anaphase [18,19].

The Haspin protein (Haploid Germ Cell-specific Nuclear Protein Kinase) was originally characterised in mammalian cells as the main kinase responsible for T3H3 phosphorylation during mitosis [18,23]. In addition, different Haspin homologs have been described in animals, plants and fungi, indicating that this kinase appeared early during eukaryotic evolution [24,25]. Interestingly, H3T3 phosphorylation also depends on the activity of a Haspin kinase in the fission yeast *S. pombe* [22] and the plant *A. thaliana* [26,27], suggesting that this protein could participate in a highly conserved regulatory circuit.

The use of genetic tools and the discovery of specific inhibitors targeting Haspin have contributed decisively to the functional characterisation of this kinase, offering in parallel an opportunity to study the biological significance of H3T3 phosphorylation [28]. Haspin depletion by RNA interference in mitotically active cells results in low levels of T3H3ph and promotes the accumulation of cells assuming a late prometaphase aspect [18]. Another study has shown that Haspin depletion prevents normal chromosome alignment and thus activates the spindle assembly checkpoint [29]. In addition, Haspin-depleted mitotic cells show extra centrosome-like foci that nucleate microtubules [30]. Therefore, Haspin is required for the normal alignment of chromosomes, participates in the regulation of kinetochore assembly and contributes to the formation of bipolar spindles. Moreover, the use of Haspin inhibitors has shown that this kinase is also required during meiosis [31,32]. However, much remains to be done, as Haspin is likely to play a biological role also during interphase [33] and H3 might not be its sole relevant substrate [34,35].

In this study, we examined the dynamics and the localisation of T3H3ph during the first cleavage of the *Sphaerechinus granularis* embryo. We showed that sea urchins have a single Haspin homolog and we found that their first mitotic division is strongly delayed in the presence of the Haspin CHR-6494 inhibitor (Huertas et al., 2012). However, our results indicate that this drug could be targeting the activity of the Cyclin B/CDK1 complex. Our observations are nevertheless consistent with the idea that T3H3 phosphorylation is tightly coupled to cell cycle progression and Cyclin B/CDK1 activity during the early embryogenesis of sea urchins.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Antibodies and Reagents

To detect the T3H3ph form, we used the monoclonal antibody JY325 (Merck) directed against the human phosphorylated Histone 3.1 variant. The human and sea urchin Histone 3 homologs present virtually identical sequences (Figure S1a), and this antibody detects a ~17 kDa single band in *S. granularis* embryonic protein extracts (Figure S1b). Other antibodies used include anti-PP1C $\alpha$  (ab66955; Abcam), anti-Actin (20-30, Sigma-Aldrich France), anti-H3 (865R2, Invitrogen), anti-CDK1 PSTAIR (P7962, Sigma-Aldrich France) and anti-Tubulin ascites 3F3 (a kind gift of Chloë Bulinsky, Columbia University, New York). We also used the anti-PP1C $\alpha$ T320ph (ab62334, Abcam) to detect the

corresponding T318PP1Cph form in *S. granularis* [36]. CHR-6494, Roscovitine and other chemicals used were purchased from Sigma-Aldrich France, unless otherwise stated.

## 2.2. Handling of Gametes and Embryos

*S. granularis* adult specimens collected in the Brest area (France) were supplied by the CRBM (Centre de Ressources Biologiques Marines) of the Roscoff Biological Station. Gamete spawning was induced by intracoelomic injection of 0.1 M acetylcholine and eggs were raised in 0.22 µm Millipore-filtered seawater (FSW). Eggs were de-jellied for one minute in 3.5 mM citric acid pH 5 and rinsed subsequently three times with fresh FSW. For fertilisation, a 2.5% *v/v* egg suspension was mixed with freshly diluted dry sperm. Fertilisation rates observed were always higher than 90% and experiments run in parallel were performed using the gametes of a single female. Embryo cultures were maintained under constant agitation in FSW at 16 °C. When required, CHR-6494, Roscovitine or DMSO were added at different concentrations and time points, as indicated.

## 2.3. Quantification of Cleavage Rates and Phenotypic Analysis

Live embryos were inspected with a phase-contrast microscope at regular intervals during the 5 h following fertilisation. For each time point, the proportion of cleaved eggs was determined in a random sample containing roughly a hundred embryos. For analysis of immunostained samples, we defined five phenotypic categories corresponding to the different stages of mitosis: Prophase; Prometaphase; Metaphase; Anaphase and Telophase. Their relative proportions were estimated in each sample by visually inspecting  $n \geq 233$  embryos in a series of randomly chosen optical fields, using a Leica fluorescence microscope.

## 2.4. Embryo Protein Extracts and Western Blot Analyses

We collected 500 µL samples from each embryo culture at different time points. Embryos were subsequently pelleted by quick centrifugation, immediately frozen in liquid nitrogen and kept at −80 °C. Cell lysates were obtained by incubating pellets for 10 min at 4 °C in 100 µL of a buffer containing 50 mM Tris (pH 8), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH 8), 1% Triton X-100, 1% Sodium-Deoxycholate, 1% Sodium Dodecyl-sulfate (SDS), 1/100 phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and a 1/1000 dilution of a protease inhibitor cocktail containing 100 mM 4-[2-aminoethyl] benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF), 800 mM aprotinin, 50 mM bestatin, 15 mM E-64, 20 mM leupeptin and 10 mM pepstatin. After HCl addition to a final concentration of 0.2 N, cell lysates were incubated for 30 min at 4 °C and then centrifuged at 12,000× *g* for 10 min at 4 °C. Supernatants were transferred into new tubes and acid neutralisation was performed adding NaOH to a final concentration of 0.2 N. Then, 125 µL of 2× loading buffer were added (NuPAGE™ LDS Sample Buffer 4× and 200 mM DTT). Proteins were resolved by SDS-PAGE on 12% acrylamide gels and their levels analysed by Western blot, using the T3H3ph (1/8000), H3 (1/1000), Actin (1/1000), T318PP1Cph (1/1000) and PP1C (1/10,000) antibodies. We used horseradish peroxidase-coupled secondary antibodies (Dako SA) and the ECL kit (Thermo-Fisher) to produce a signal that was detected with a Fusion FX camera (Vilber-Lourmat). Results were quantified using the ImageJ software (written by Wayne Rasband at the US National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2015.).

## 2.5. Immunostaining and Confocal Microscopy

We followed a protocol specifically developed to image the cytoskeleton in echinoderm embryos [37]. Briefly, we collected 1.6 mL samples from each embryo culture at the indicated times. Embryos were rinsed with 1.8 mL of a solution containing 80 mM PIPES (pH 7.2), 5 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub> and 1 M glycerol, and immediately fixed for 1 h at room temperature in 2 mL of the same solution supplemented with 3.7% formaldehyde and 0.1% Igepal CA630. Subsequently, embryos were rinsed three times with 1× PBS, 0.1% Triton X-100 (PBT). Blocking for 1 h, overnight primary antibody incubation at 4 °C and subsequent washings were carried out in PBT supplemented with 1% BSA.

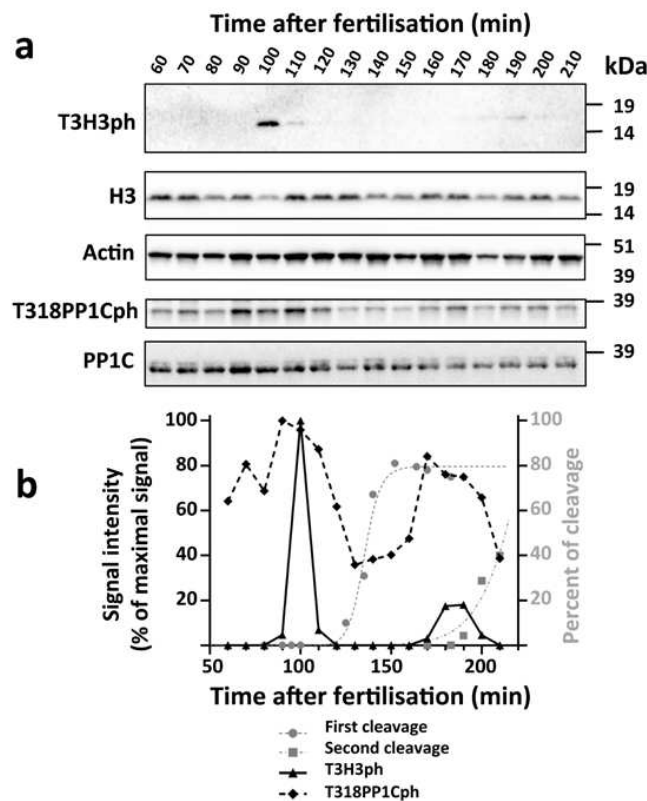


We used as primary antibodies T3H3ph and anti-Tubulin 3F3, both at a 1/600 dilution. Goat anti-rabbit AlexaFluor 555 and donkey anti-mouse AlexaFluor 488 (Invitrogen) were used as secondary antibodies, diluted 1/1000 in PBT 1% BSA. After incubation for 2 h in the dark, embryos were washed three times for 45 min in PBS and mounted in a drop of Vectashield® medium (Vector) containing DAPI. Images were acquired with a Leica SP5 confocal microscope and processed using ImageJ and Photoshop.

### 3. Results

#### 3.1. The Levels of T3H3ph Cycle in Synchrony with Cell Division in Sea Urchin Early Embryos

First, we sought to establish if the levels of T3H3ph oscillate during the early embryogenesis of *S. granularis*. For this, embryo protein extracts were prepared at different times post-fertilisation (PF) and analysed by Western blot, taking advantage of an antibody recognising specifically the T3H3 phosphorylated form (see Materials and Methods and Figure S1). The T3H3ph signal was first detected at 90 min PF, reached its maximal levels at 100 min PF and decayed abruptly by 110 min PF (Figure 1). This peak of T3H3 phosphorylation was followed by a second one taking place at 180–190 min PF (Figure 1).

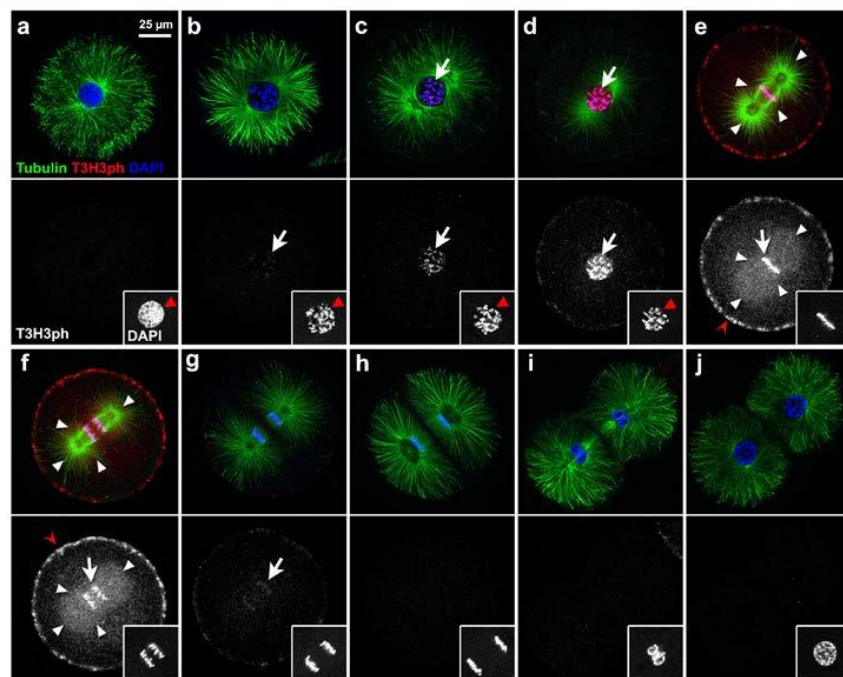


**Figure 1.** A peak of T3H3 phosphorylation precedes cell cleavage in *S. granularis* early embryos. (a) Western blots showing the relative levels of T3H3ph, H3, Actin, T318PP1Cph and PP1C at different times during the first and second embryonic divisions. (b) Quantitative analysis of the above results. For each lane, the T3H3ph (black triangles) and T318PP1Cph (black diamonds) intensity scores were normalised against the amount of Actin signal detected. The values obtained were expressed as a percentage of the maximal signal observed. The graph includes as a visual reference the proportion of embryos that have completed either the first cleavage (grey dots) or the second cleavage (grey squares) at different time points.

We observed that both T3H3ph peaks occurred roughly 30 min before half of the embryos completed cell cleavage (Figure 1b). Accordingly, and despite the fact that the precise timing of cell

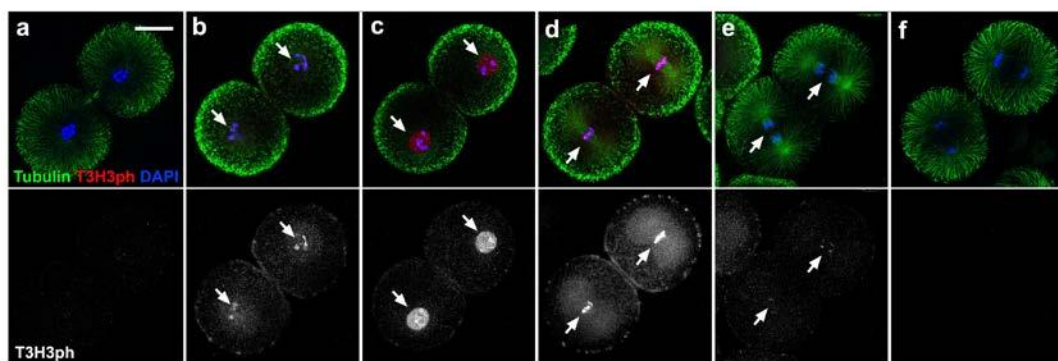
division can vary in the progeny of different individuals, we found similar dynamics in the offspring of other *S. granularis* couples (Figure S2). The observed fluctuations in the T3H3ph signal correspond to a post-translational modification of H3, as we observed that the levels of this protein remained stable during early embryonic development (Figure 1a and Figure S2). We also examined in the same embryo cultures the temporal activation profile of the Cyclin-dependent kinase CDK1 (Figure 1 and Figure S2). One of the substrates of this key cell cycle regulator is the PP1C phosphatase [38]. In sea urchin embryos, this protein becomes phosphorylated at T318 and its levels can thus provide a read-out of the CDK1 global activity [36]. We observed a peak of T318PP1Cph at 90 min PF, prior to the first embryonic division, and another one at 170 min PF, before the second division (Figure 1). In contrast, the levels of PP1C displayed little variation during the examined period (Figure 1a). Altogether, our observations indicate that cell cleavage is preceded in *S. granularis* embryos by a wave of CDK1 activity and a sharp peak of T3H3 phosphorylation.

To further confirm that T3H3 phosphorylation oscillates in synchrony with cell division, we also studied the spatio-temporal distribution of T3H3ph in immunostained embryos. To analyse the first embryonic division, fertilised eggs were recovered at 70, 110 and 150 min PF and co-labelled with Tubulin antibodies and the nuclear marker DAPI, to allow simultaneous visualisation of their cytoskeletal architecture and their chromatin organisation (Figure 2).



**Figure 2.** A wave of T3H3 phosphorylation/de-phosphorylation occurs in synchrony with mitotic division in *S. granularis* early embryos. (a–j) Pictures correspond to confocal equatorial optical sections obtained by imaging embryos immunostained for Tubulin (shown in green, top panels) and T3H3ph (red in the top panels, greyscale in bottom panels). Samples were also labelled with DAPI (blue in top panels, grey-scale in small insets). Images present consecutive stages illustrating progression through the first embryonic division. Scale bar, 25  $\mu\text{m}$ . (a–d) The T3H3ph signal (white arrows) appeared when chromatin condensation was already apparent in the cell nucleus (red arrowheads, insets). (e,f) A strong T3H3ph signal (white arrows) was observed in association with chromatin, both during the metaphase (e) and early anaphase (f). In these stages, a fluorescent signal associated with the cell cortex (red open arrowheads) and the mitotic spindle (white arrowheads) was also visible. (g–h) During the anaphase, the T3H3ph signal (white arrows) rapidly faded away. (i,j) No T3H3ph signal was detected during the telophase.

During mitosis, chromatin condensation was accompanied by a thorough reorganisation of the microtubule network, which culminated by prometaphase with the formation of the spindle apparatus (Figure 2a–d). The T3H3ph signal was first detected during this condensation phase, in small foci associated with the forming chromosomes (Figure 2b–d). Later on, chromatin acquired a uniform and bright T3H3ph staining characteristic of cells in prometaphase (Figure 2d and Figure S3). We also detected high levels of T3H3ph throughout the metaphase (Figure 2e and Figure S3), but by early anaphase, signal intensity dropped abruptly and became undetectable (Figure 2f–j). Besides the T3H3ph signal detected at the chromatin level, we also observed during the metaphase and anaphase a conspicuous staining associated with the egg's cortex and a central region occupied by the mitotic spindle (Figure 2e,f). Whether this signal reflected the presence of H3 in these subcellular compartments or was the result of an unspecific binding of our antibody could though not be determined. Finally, we analysed embryos harvested at 160, 180 and 200 min PF and observed that the levels of T3H3ph also peak during the second mitotic division (Figure 3). Altogether, our results confirm that a wave of T3H3 phosphorylation/dephosphorylation accompanies cell division in *S. granularis* early embryos.

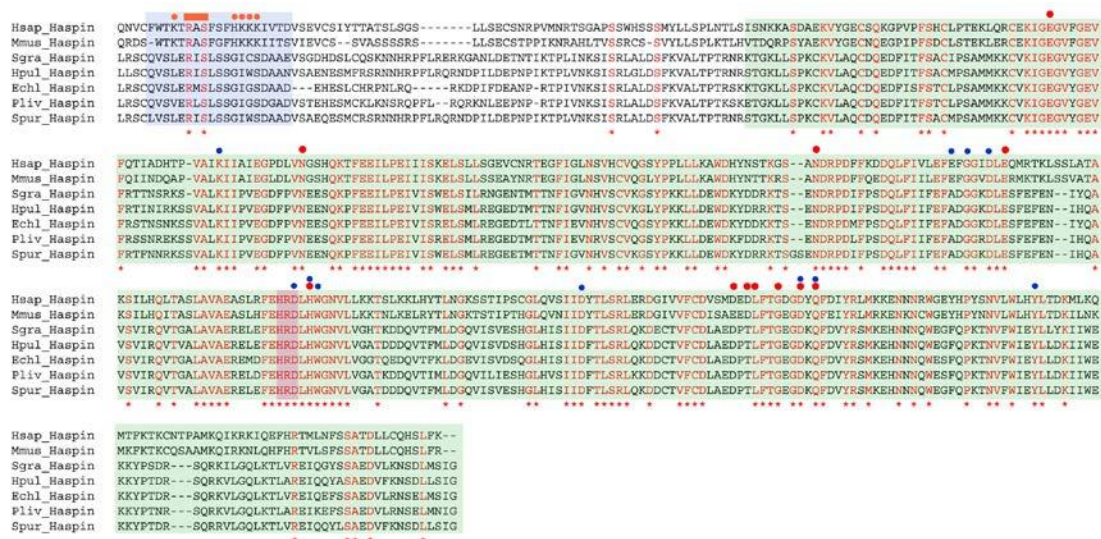


**Figure 3.** A peak of T3H3 phosphorylation accompanies the second mitotic division in *S. granularis* embryos. (a–f) Pictures correspond to confocal equatorial optical sections obtained by imaging embryos immunostained for Tubulin (shown in green, top panels), T3H3ph (red in the top panels, greyscale in bottom panels) and DAPI (blue in top panels). Images present consecutive stages illustrating progression through the second embryonic division. Scale bar, 30  $\mu$ m. (a,b) The T3H3ph signal (white arrows) appeared during chromatin condensation. (c,d) A strong T3H3ph signal (white arrows) was observed during the prometaphase (c) and metaphase (d). (e,f) The T3H3ph signal (white arrows) disappears during the anaphase.

### 3.2. The Haspin Inhibitor CHR-6494 Delays Entry into Mitosis

It has been shown that the activity of the Haspin kinase is essential for T3H3 phosphorylation in different animal, yeast and plant species [18,22,26,27]. Taking advantage of available transcriptome databases, we conducted a search for Haspin representatives among the echinoidea and identified a single homolog of this gene in several sea urchin species (Figure 4). The echinoidea Haspin proteins harbour in their C-terminus a Ser/Thr kinase domain displaying the typical features of Haspin kinases. Indeed, most of the residues known to be involved in substrate recognition in the human protein [34,39,40] are conserved in the sea urchin Haspin homologs (Figure 4). These structural similarities prompted us to examine whether Haspin is implicated in T3H3 phosphorylation during the *S. granularis* first cell division. For this, we used the Haspin inhibitor CHR-6494 [41]. This small molecule behaves as an ATP competitor and is thought to act at the level of the Haspin catalytic cleft [41]. Moreover, CHR-6494 administration is known to prevent *in vivo* T3H3 phosphorylation in different species [31,32,41].





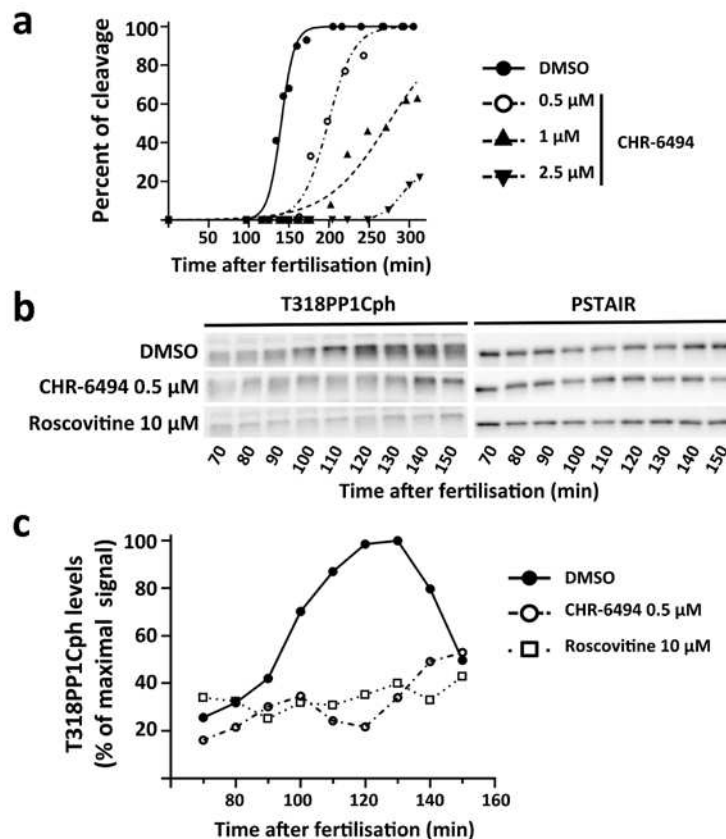
**Figure 4.** The echinoidea Haspin homologs display a conserved Ser/Thr kinase domain. Clustal-W protein alignment showing the C-terminal portion of Haspin in different mammalia and echinoidea species. Invariant amino acid positions are shown in red and labelled with asterisks. The Haspin Ser/Thr kinase domain is shaded in green and its HRD catalytic loop is shown in red. Residues implicated in H3 recognition and/or interacting with ATP/Mg<sup>2+</sup> in the human Haspin are respectively marked with red and blue dots [34,39,40]. The vertebrate HBIS motif and its homolog region in sea urchins are shaded in blue. The positively charged residues of the vertebrate motif are marked with orange dots [42], but do not appear to be conserved. The RAS motif, where the Ser is one of the residues phosphorylated by the Polo-kinase during Haspin activation is indicated by an orange rectangle [42]. We aligned the following sequences: Hsap, *Homo sapiens* (NP\_114171.2); Mmus, *Mus musculus* (NP\_038578.2); Spur, *Strongylocentrotus purpuratus* (JT120475.1); Sgra, *Sphaerechinus granularis* (GAVR01006044.1 and (GAVR01015122.1); Echl, *Evechinus chloroticus* (GAPB01047772.1); Pliv, *Paracentrotus lividus* (GEDS01040703.1) and Hpul, *Hemicentrotus pulcherrimus* (IACU01096736.1).

Fifteen minutes after fertilisation, we added increasing concentrations of CHR-6494 to different batches of the same embryo culture. We observed that drug addition delayed cell cleavage in a dose-dependent manner (Figure 5a). Moreover, the levels of the T318PP1Cph marker increased significantly during mitosis in control batches (Figure 5b,c), but failed to do so in the presence of 0.5 μM CHR-6494 (Figure 5b,c). Therefore, CHR-6494 addition hinders cell cycle progression in *S. granularis* embryos.

Our observations indicate that Haspin could play a major role during the *S. granularis* first cleavage, but we cannot rule out the possibility that CHR-6494 may inhibit in vivo the activity of other kinases involved in cell cycle progression, like CDK1 [41]. In fact, the CDK1 inhibitor Roscovitine [43,44] elicited a reduction in the T318PP1Cph levels comparable to that observed upon CHR-6494 addition (Figure 5b,c and [36]). We should nonetheless stress that in these experiments both CHR-6494 and Roscovitine were administered way before the Cyclin B/CDK1 activity could attain its maximal levels (Figures 1 and 5). Therefore, we wondered if the same inhibitors could elicit different effects if added after the initial Cyclin B/CDK1 activation phase, in particular immediately before T3H3 becomes phosphorylated. Such an assay could provide an opportunity to compare the effects of CHR-6494 with those resulting from a genuine CDK1 inhibition, thus allowing a better assessment of CHR-6494 specificity.

Embryos belonging to a synchronised culture were distributed in nine different batches and the two drugs were added separately at 70, 90 and 110 min PF. Then, the behaviour of each resulting cohort was analysed using two different methods. First, we compared the cleavage rates observed in each assay (Figure 6). Second, we monitored cell cycle progression by inspecting embryo morphology (Figure 7). For this, a sample was collected from each cohort 20 min after drug addition and immediately

processed for immunostaining and confocal imaging, using Tubulin, T3H3ph and DAPI as cellular markers (Figure 7).

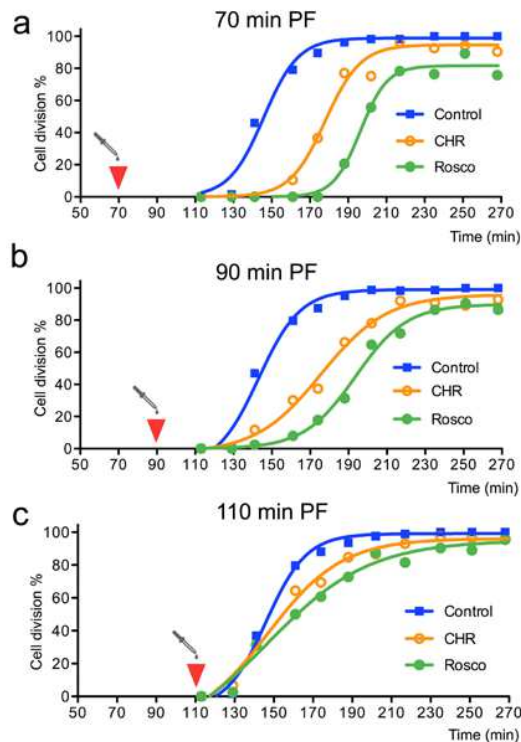


**Figure 5.** Exposure to the CHR-6494 inhibitor delays cell division in *S. granularis* early embryos. (a) Graph representing the proportion of embryos that have completed the first cleavage at different time points (min after fertilisation). The different curves describe culture behaviour in the presence of increasing concentrations of CHR-6494 or its vehicle DMSO, all added at 15 min after fertilisation. (b) Relative levels of T318PP1Cph observed at different time points in embryos treated with DMSO, 0.5 μM CHR-6494 or 10 μM Roscovitine. The T318PP1Cph form was detected by Western blot using a specific antibody. The levels of CDK1 were visualised in the same membrane with the PSTAIR antibody and used as a loading control. (c) Quantitative analysis of the above results. Plotted values were normalised against the CDK1 levels and expressed as a percentage of the maximal signal observed.

When drugs were added at 70 min PF, embryos exposed to either 0.5 μM CHR-6494 or 10 μM Roscovitine reached the cleavage stage with an obvious delay (Figure 6a). However, these batches exhibited the same degree of synchronicity observed in the corresponding control, and embryos proceeded eventually through cleavage at a similar pace (Figure 7a). A comparison of the corresponding immunostained samples revealed that 26% of the control embryos had reached the prometaphase stage by 90 min PF (Figure 7a). As expected, these cells displayed high levels of the T3H3ph marker (Figure 7a). In contrast, all the cells exposed to the inhibitors were in prophase and presented a similar morphology to that observed in embryos harvested right before drug addition, at 70 min PF (Figure 7a). Moreover, no cell presenting a robust T3H3ph signal could be observed in these samples (Figure 7a).

When drugs were added at 90 min PF, cleavage onset was also delayed. However, this treatment seemed to perturb culture synchronicity as well (Figure 6b). We could estimate this parameter measuring the time elapsed between cleavage onset and the moment in which 90% of the embryos completed cell division. This interval lasted for 59 min in a control population and 56 min when CHR-6494 was added at 70 min PF. However, in embryos treated with the same drug at 90 min PF,

it lasted for 94 min (Figure 6a,b). Therefore, sample dispersion increased when drugs were added at 90 min PF. In these batches, immunostained samples were collected at 110 min PF. We observed again that the cells in prophase were overrepresented in the samples treated with CHR-6494 or Roscovitine (Figure 7b). Moreover, 52% of the embryos were in metaphase in the control population, whereas only 16% and 1% of the cells had respectively reached this stage in cultures exposed to CHR-6494 or Roscovitine (Figure 7b). Surprisingly, all cells exposed to the drugs presented normal T3H3ph levels during the prometaphase and metaphase (Figure 7b). However, we noticed that the mitotic apparatus assumed an aberrant morphology during the metaphase in all the cells treated with Roscovitine. Indeed, our images revealed in these embryos the presence of ectopic spindle poles (Figure 7b).

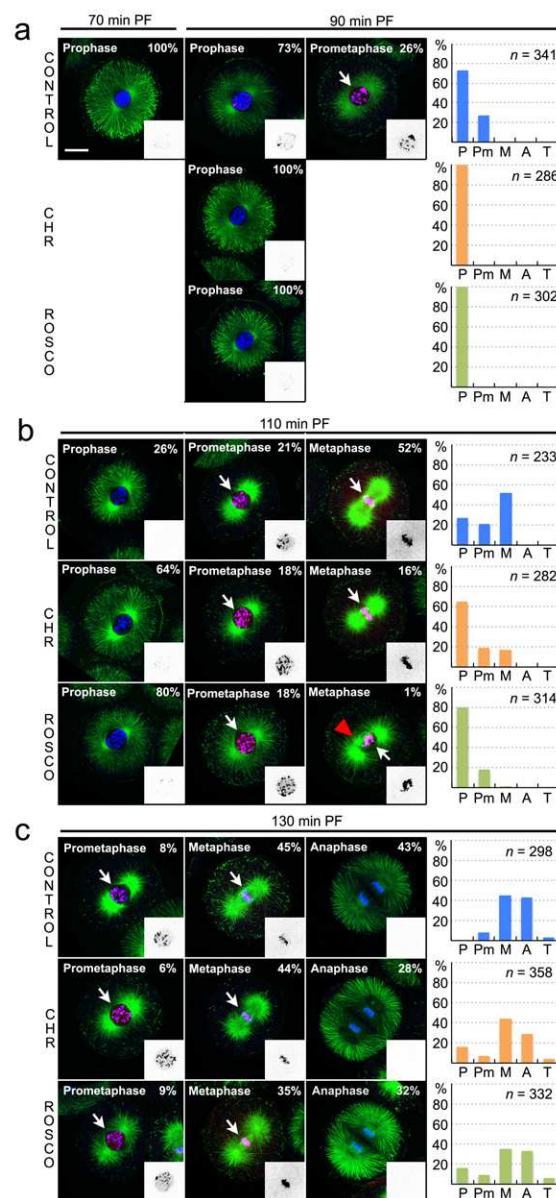


**Figure 6.** CHR-6494 and Roscovitine administration delays cell division and impacts cleavage rates in *S. granularis* embryos. (a–c) Plots represent the proportion of embryos that have completed their first cleavage at different time points (minutes PF). Final concentrations for CHR-6494 and Roscovitine were respectively 0.5  $\mu$ M and 10  $\mu$ M. For each experimental condition, a culture sample was collected 20 min after drug addition and processed for T3H3ph immunostaining (see Figure 7). (a) Drug addition at 70 min PF (red arrowhead) caused a general delay in the cleavage onset. (b) Drug addition at 90 min PF delayed cleavage onset and perturbed culture synchronicity. (c) No delay in cleavage onset was observed, but culture synchronicity was still perturbed in embryos treated at 110 min PF.

Finally, we analysed cell behaviour upon drug addition at 110 min PF (Figures 6c and 7c). In these batches, drug exposure did not delay cleavage onset significantly, but culture synchronicity was again perturbed (Figure 6c). In fact, although virtually no prophase embryos could be found in the control group at 130 min PF, this category was well represented in cultures exposed to either CHR-6494 or Roscovitine (Figure 7c). Besides this, the embryos in prometaphase and metaphase displayed comparable levels of T3H3ph in all the conditions analysed. In addition, no obvious aberrant mitotic figures could be detected (Figure 7c).

In summary, our data show that CHR-6494 and Roscovitine affect cell cycle progression in a similar way. Both inhibitors delay cleavage onset and seem to act primarily by retarding entry into prometaphase. However, drug presence does not directly impact the levels of T3H3ph when cells reach the prometaphase or posterior stages.





**Figure 7.** Neither CHR-6494 nor Roscovitine prevent T3H3 phosphorylation during the first embryonic division in *S. granularis*. (a–c) Embryos were assigned to five different phenotypic categories, according to their morphology. For each sample, representative images illustrating the different phenotypes found are shown in the same row. Pictures correspond to confocal equatorial optical sections obtained imaging embryos immunostained for Tubulin (shown in green), T3H3ph (red and inverted grey-scale in the small insets) and DAPI (blue). Scale bar, 25  $\mu$ m. The relative proportions of the different categories are reported on each image and have been plotted as a series of histograms shown on the right panel of each row. The number of embryos considered for the quantitative analyses is also shown on the corresponding graphs. Abbreviations used: P, Prophase; Pm, Prometaphase; M, Metaphase; A, Anaphase; T, Telophase. (a) All embryos were in prophase in a sample collected before drug addition, at 70 min PF. In the control batch, samples collected at 90 min PF included 26% of embryos in prometaphase, all displaying high levels of T3H3ph (white arrow). This phenotypic category was absent in the drug-exposed batches. (b) Samples collected at 110 min PF contained embryos in prometaphase and metaphase, all showing a bright T3H3ph staining (white arrows). In the batch exposed to Roscovitine, all the embryos in metaphase presented ectopic spindle poles (red arrowhead). (c) In the 130 min PF samples, embryos in prometaphase and metaphase displayed normal levels of T3H3ph (white arrows) and the staining disappeared during the anaphase.

#### 4. Discussion

Although it has been shown that the levels of T3H3ph cycle during mitosis in different somatic and germ line cells, the phosphorylation state of T3H3 has not been examined during the early embryogenesis of a metazoan organism. In this work, we have characterised the dynamics of this histone post-translational modification during the two first cell cycles of a sea urchin embryo.

Our results show that a sharp peak of T3H3 phosphorylation coincides with mitosis in *S. granularis* early embryos. Comparing the levels of T3H3ph and the activity of the Cyclin B/CDK1 complex at different time points, we could establish that this peak of T3H3 phosphorylation precedes cleavage by about 30 min and occurs once the CDK1 activity has reached its maximal levels (Figure 1 and Figure S2). We could also show that T3H3 phosphorylation starts during the prophase in small foci associated with the chromatin (Figure 2). As the compaction of the nuclear material is already evident at this stage, our observations are thus consistent with the notion that this histone modification is not directly coupled to chromatin condensation. Later on, we observe a bright T3H3ph signal distributed along the chromosome arms, both during the prometaphase and metaphase (Figure 2 and Figure S3). Sea urchins thus differ significantly from other invertebrates, such as dipterans and tunicates, in which T3H3ph occupies the pericentromeric region during the metaphase [20,45]. In fact, our results reveal that the subcellular distribution of T3H3ph during the sea urchin first cell division is similar to that observed in mammalian somatic cells [18,19].

In summary, our findings indicate that the sea urchin embryos could become an informative experimental system to analyse the role of T3H3 phosphorylation in a developmental context. First, the observed timing and distribution of the T3H3ph signal suggests that this histone modification could accomplish similar functions in echinoderm and mammalian cells. Second, the natural synchronicity of cell division in sea urchin embryos provides a suitable context to study how the activity of the Cyclin B/CDK1 complex regulates the T3H3ph levels. To progress in this direction, we have attempted to identify the kinases responsible for T3H3 phosphorylation in *S. granularis*.

We have shown that the echinoidea species have a single Haspin homolog and that this protein contains a Ser/Thr kinase domain exhibiting all the typical structural features of its mammalian counterparts, including a well-conserved catalytic region (Figure 4). We have thus tried to block the activity of this kinase *in vivo* using the CHR-6494 inhibitor, a small molecule known to prevent T3H3 phosphorylation in both human and murine cells [31–33,41]. We found that the administration of this inhibitor does not have a direct impact on the T3H3ph levels displayed during mitosis (Figure 7). In parallel, we examined if CDK1 inhibition by Roscovitine perturbs the levels of T3H3 phosphorylation. In fact, it has been shown that Haspin activation depends on the activities of both CDK1 and the Polo-like kinase 1 (Plk1) [42,46]. If this regulatory circuit is conserved in sea urchins, we could then expect that CDK1 inhibition may indirectly impact the levels of T3H3 phosphorylation by down-regulating Haspin activity. However, the administration of Roscovitine did not elicit the presence of mitotic cells lacking a T3H3ph signal (Figure 7).

Before attempting an interpretation of these results, we should take into account two additional aspects. First, both CHR-6494 and Roscovitine consistently retard cell cycle progression, indicating that these molecules are not excluded from the egg and interfere with a biological activity necessary for cell division (Figures 6 and 7). Second, our findings reveal that both drugs behave in a similar way: they delay cleavage onset (Figure 6), retard entry into the prometaphase (Figure 7) and prevent the phosphorylation of T318PP1C (Figure 5). Thus, whereas our observations are in line with the CHR-6494 anti-proliferative effects previously reported in human cancer lines and xenografted mice [41,47], they suggest that this drug could have other *in vivo* targets besides Haspin, such as CDK1. Our findings may thus contribute to encourage empirical studies addressing the selectivity of commonly used Haspin kinase inhibitors, like CHR-6494 or 5-Iodotubercidin (5-ITu). Indeed, a recent study has shown that 5-ITu has several *in vivo* off-targets and elicits a complex Haspin-independent response in mouse embryonic stem cells [48].



Putting aside the issue of drug selectivity, our results are consistent with the idea that a checkpoint system could delay the G2/M transition in sea urchin embryos until the cellular machinery is capable of implementing a robust T3H3 phosphorylation and cells can enter mitosis. According to this scenario, T3H3 phosphorylation would be tightly coupled with cell cycle progression, thus explaining why we have failed to observe cells lacking a T3H3ph signal in the prometaphase or posterior stages when Roscovitine or CHR-6494 were added to our embryo cultures. In CHR-6494 treated embryos, we cannot exclude though the possibility that the *S. granularis* Haspin kinase may be insensitive to this drug. In addition, other kinases could also phosphorylate T3H3 in the absence of Haspin activity. Given the strong phylogenetic conservation of the functional links tying Haspin activity and T3H3 phosphorylation, this latter scenario seems a priori unrealistic. However, it has been shown that the Vaccinia-Related Kinase 1 (VRK1) can also phosphorylate H3 at Thr3 and Ser10 during mitosis in human cells [49], and a VRK1 homolog is present in the genome of the sea urchin *S. purpuratus* (SPU\_016006, [50]). Testing these different hypotheses will thus require the future development of specific Haspin and VRK1 inhibitors and/or targeted manipulation of their respective levels and activities during early embryogenesis.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/898/s1>, Figure S1: The JY325 antibody recognises specifically the T3H3ph form in sea urchin protein extracts. Figure S2: A peak of T3H3 phosphorylation precedes cell cleavage in *S. granularis* early embryos. Figure S3: The T3H3ph signal is uniformly distributed over the chromatin during prometaphase and metaphase.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.C., F.R., S.R. and J.M.; investigation, O.F., F.R., F.P., P.C., V.G. and S.R.; writing—original draft preparation, P.C. and F.R.; writing—review and editing, O.F., F.P., P.C., F.R., J.M. and S.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by La Ligue contre le Cancer (Coordination du Grand Ouest, Comités Finistère, Côtes d’Armor, Deux-Sèvres, Charente, Morbihan, Ille-et-Vilaine, Sarthe), the Brittany Regional Council (Région Bretagne), the Finistère Department Council (CG29) and by an internal grant of the Laboratory of Integrative Biology of Marine Models. O.F. and F.P. were respectively funded by a post-doctoral fellowship from Sorbonne University and a PhD fellowship from the French Education Ministry [SU; Doctoral School ED515].

**Acknowledgments:** We are indebted to the Marine and Diving Facility and the Aquarium Service of the Roscoff Marine Station for sea urchin collection and rearing. We are also grateful to the imaging platform of the FR2424 (Plateforme MerImage, SU/CNRS) and to Sophie Le Panse and Sébastien Colin for advice on imaging techniques. We would also like to thank Chloë Bulinsky (Columbia University, New York) for kindly sharing reagents, to Samuel Chauvin, Ninnog Kerbiquet, Sandrine Boulben and Nathalie Desban for their skilful technical assistance and to all the members of the TCCD team for many stimulating scientific discussions.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Moundoyi, H.; Demouy, J.; Le Panse, S.; Morales, J.; Sarels, B.; Cormier, P. Toward Multiscale Modeling of Molecular and Biochemical Events Occurring at Fertilization Time in Sea Urchins. *Results Probl. Cell Differ.* **2018**, *65*, 69–89. [PubMed]
2. Brandhorst, B.P. Two-dimensional gel patterns of protein synthesis before and after fertilization of sea urchin eggs. *Dev. Biol.* **1976**, *52*, 310–317. [CrossRef]
3. Epel, D. Protein synthesis in sea urchin eggs: A “late” response to fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1967**, *57*, 899–906. [CrossRef] [PubMed]
4. Dubé, F. Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin embryos. *J. Cell. Physiol.* **1988**, *137*, 545–552. [CrossRef] [PubMed]
5. Wagenaar, E.B. The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Exp. Cell Res.* **1983**, *144*, 393–403. [CrossRef]
6. Néant, I.; Charbonneau, M.; Guerrier, P. A requirement for protein phosphorylation in regulating the meiotic and mitotic cell cycles in echinoderms. *Dev. Biol.* **1989**, *132*, 304–314. [CrossRef]
7. Nurse, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **2000**, *100*, 71–78. [CrossRef]
8. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 122. [CrossRef]
9. Hayward, D.; Alfonso-Perez, T.; Gruneberg, U. Orchestration of the spindle assembly checkpoint by CDK1-cyclin B1. *FEBS Lett.* **2019**, *593*, 2889–2907. [CrossRef]

10. Saurin, A.T. Kinase and Phosphatase Cross-Talk at the Kinetochore. *Front. Cell Dev. Biol.* **2018**, *6*, 62. [[CrossRef](#)]
11. Evans, T.; Rosenthal, E.T.; Youngblom, J.; Distel, D.; Hunt, T. Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* **1983**, *33*, 389–396. [[CrossRef](#)]
12. Cerutti, H.; Casas-Mollano, J.A. Histone H3 phosphorylation: Universal code or lineage specific dialects? *Epigenetics* **2009**, *4*, 71–75. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Schmitz, M.L.; Higgins, J.M.G.; Seibert, M. Priming chromatin for segregation: Functional roles of mitotic histone modifications. *Cell Cycle* **2020**, 1–17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Green, G.R.; Collas, P.; Burrell, A.; Poccia, D.L. Histone phosphorylation during sea urchin development. *Semin. Cell Biol.* **1995**, *6*, 219–227. [[CrossRef](#)]
15. Hendzel, M.J.; Wei, Y.; Mancini, M.A.; Van Hooser, A.; Ranalli, T.; Brinkley, B.R.; Bazett-Jones, D.P.; Allis, C.D. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma* **1997**, *106*, 348–360. [[CrossRef](#)]
16. Prigent, C.; Dimitrov, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for? *J. Cell Sci.* **2003**, *116*, 3677–3685. [[CrossRef](#)]
17. Wei, Y.; Yu, L.; Bowen, J.; Gorovsky, M.A.; Allis, C.D. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. *Cell* **1999**, *97*, 99–109. [[CrossRef](#)]
18. Dai, J.; Sultan, S.; Taylor, S.S.; Higgins, J.M. The kinase haspin is required for mitotic histone H3 Thr 3 phosphorylation and normal metaphase chromosome alignment. *Genes Dev.* **2005**, *19*, 472–488. [[CrossRef](#)]
19. Polioudaki, H.; Markaki, Y.; Kourmouli, N.; Dialynas, G.; Theodoropoulos, P.A.; Singh, P.B.; Georgatos, S.D. Mitotic phosphorylation of histone H3 at threonine 3. *FEBS Lett.* **2004**, *560*, 39–44. [[CrossRef](#)]
20. Escribá, M.C.; Goday, C. Histone H3 phosphorylation and elimination of paternal X chromosomes at early cleavages in sciarid flies. *J. Cell. Sci.* **2013**, *126*, 3214–3222. [[CrossRef](#)]
21. Caperta, A.D.; Rosa, M.; Delgado, M.; Karimi, R.; Demidov, D.; Viegas, W.; Houben, A. Distribution patterns of phosphorylated Thr 3 and Thr 32 of histone H3 in plant mitosis and meiosis. *Cytogenet. Genome Res.* **2008**, *122*, 73–79. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Yamagishi, Y.; Honda, T.; Tanno, Y.; Watanabe, Y. Two histone marks establish the inner centromere and chromosome bi-orientation. *Science* **2010**, *330*, 239–243. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Dai, J.; Higgins, J.M. Haspin: A mitotic histone kinase required for metaphase chromosome alignment. *Cell Cycle* **2005**, *4*, 665–668. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Higgins, J.M. Haspin-like proteins: A new family of evolutionarily conserved putative eukaryotic protein kinases. *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1677–1684. [[CrossRef](#)]
25. Higgins, J.M. Structure, function and evolution of haspin and haspin-related proteins, a distinctive group of eukaryotic protein kinases. *Cell Mol. Life Sci.* **2003**, *60*, 446–462. [[CrossRef](#)]
26. Ashtiyani, R.K.; Moghaddam, A.M.; Schubert, V.; Rutten, T.; Fuchs, J.; Demidov, D.; Blattner, F.R.; Houben, A. AtHaspin phosphorylates histone H3 at threonine 3 during mitosis and contributes to embryonic patterning in Arabidopsis. *Plant J.* **2011**, *68*, 443–454. [[CrossRef](#)]
27. Kurihara, D.; Matsunaga, S.; Omura, T.; Higashiyama, T.; Fukui, K. Identification and characterization of plant Haspin kinase as a histone H3 threonine kinase. *BMC Plant Biol.* **2011**, *11*, 73. [[CrossRef](#)]
28. Feizbakhsh, O.; Place, M.; Fant, X.; Buron, F.; Routier, S.; Ruchaud, S. The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors. In *Protein Phosphorylation*, 1st ed.; Prigent, C., Ed.; InTech: Rijeka, Croatia, 2017; pp. 31–47.
29. Dai, J.; Sullivan, B.A.; Higgins, J.M. Regulation of mitotic chromosome cohesion by Haspin and Aurora B. *Dev. Cell* **2006**, *11*, 741–750. [[CrossRef](#)]
30. Dai, J.; Kateneva, A.V.; Higgins, J.M. Studies of haspin-depleted cells reveal that spindle-pole integrity in mitosis requires chromosome cohesion. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 4168–4176. [[CrossRef](#)]
31. Kang, H.; Park, Y.S.; Cho, D.-H.; Kim, J.-S.; Oh, J.S. Dynamics of histone H3 phosphorylation at threonine 3 during meiotic maturation in mouse oocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *458*, 280–286. [[CrossRef](#)]
32. Nguyen, A.L.; Gentilello, A.S.; Balboula, A.Z.; Shrivastava, V.; Ohring, J.; Schindler, K. Phosphorylation of threonine 3 on histone H3 by haspin kinase is required for meiosis I in mouse oocytes. *J. Cell Sci.* **2014**, *127*, 5066–5078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wang, P.; Hua, X.; Bryner, Y.H.; Liu, S.; Gitter, C.B.; Dai, J. Haspin inhibition delays cell cycle progression through interphase in cancer cells. *J. Cell Physiol.* **2020**, *235*, 4508–4519. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

34. Maiolica, A.; de Medina-Redondo, M.; Schoof, E.M.; Chaikuad, A.; Villa, F.; Gatti, M.; Jeganathan, S.; Lou, H.J.; Novy, K.; Hauri, S.; et al. Modulation of the chromatin phosphoproteome by the Haspin protein kinase. *Mol. Cell. Proteom.* **2014**, *13*, 1724–1740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Panigada, D.; Grianti, P.; Nespoli, A.; Rotondo, G.; Castro, D.G.; Quadri, R.; Piatti, S.; Plevani, P.; Muzi-Falconi, M. Yeast haspin kinase regulates polarity cues necessary for mitotic spindle positioning and is required to tolerate mitotic arrest. *Dev. Cell* **2013**, *26*, 483–495. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Chassé, H.; Mulner-Lorillon, O.; Boulben, S.; Glippa, V.; Morales, J.; Cormier, P. Cyclin B Translation Depends on mTOR Activity after Fertilization in Sea Urchin Embryos. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0150318. [[CrossRef](#)]
37. Strickland, L.; von Dassow, G.; Ellenberg, J.; Foe, V.; Lenart, P.; Burgess, D. Light microscopy of echinoderm embryos. *Methods Cell Biol.* **2004**, *74*, 371–409.
38. Kwon, Y.G.; Lee, S.Y.; Choi, Y.; Greengard, P.; Nairn, A.C. Cell cycle-dependent phosphorylation of mammalian protein phosphatase 1 by cdc2 kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 2168–2173. [[CrossRef](#)]
39. Eswaran, J.; Patnaik, D.; Filippakopoulos, P.; Wang, F.; Stein, R.L.; Murray, J.W.; Higgins, J.M.G.; Knapp, S. Structure and functional characterization of the atypical human kinase haspin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20198–20203. [[CrossRef](#)]
40. Villa, F.; Capasso, P.; Tortorici, M.; Forneris, F.; de Marco, A.; Mattevi, A.; Musacchio, A. Crystal structure of the catalytic domain of Haspin, an atypical kinase implicated in chromatin organization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 20204–20209. [[CrossRef](#)]
41. Huertas, D.; Soler, M.; Moreto, J.; Villanueva, A.; Martinez, A.; Vidal, A.; Charlton, M.; Moffat, D.; Patel, S.; McDermott, J.; et al. Antitumor activity of a small-molecule inhibitor of the histone kinase Haspin. *Oncogene* **2012**, *31*, 1408–1418. [[CrossRef](#)]
42. Ghenoiu, C.; Wheelock, M.S.; Funabiki, H. Autoinhibition and Polo-dependent multisite phosphorylation restrict activity of the histone H3 kinase Haspin to mitosis. *Mol. Cell* **2013**, *52*, 734–745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. De Azevedo, W.F.; Leclerc, S.; Meijer, L.; Havlicek, L.; Strnad, M.; Kim, S.H. Inhibition of cyclin-dependent kinases by purine analogues: Crystal structure of human cdk2 complexed with roscovitine. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 518–526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Meijer, L.; Borgne, A.; Mulner, O.; Chong, J.P.; Blow, J.J.; Inagaki, N.; Inagaki, M.; Delcros, J.G.; Moulinoux, J.P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *243*, 527–536. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Feng, H.; Raasholm, M.; Moosmann, A.; Campsteijn, C.; Thompson, E.M. Switching of INCENP paralogs controls transitions in mitotic chromosomal passenger complex functions. *Cell Cycle* **2019**, *18*, 2006–2025. [[CrossRef](#)]
46. Zhou, L.; Tian, X.; Zhu, C.; Wang, F.; Higgins, J.M. Polo-like kinase-1 triggers histone phosphorylation by Haspin in mitosis. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 273–281. [[CrossRef](#)]
47. Han, L.; Wang, P.; Sun, Y.; Liu, S.; Dai, J. Anti-Melanoma Activities of Haspin Inhibitor CHR-6494 Deployed as a Single Agent or in a Synergistic Combination with MEK Inhibitor. *J. Cancer* **2017**, *8*, 2933–2943. [[CrossRef](#)]
48. Karanika, E.; Soupsana, K.; Christogianni, A.; Stellas, D.; Klinakis, A.; Politou, A.S.; Georgatos, S. Haspin-dependent and independent effects of the kinase inhibitor 5-Iodotubercidin on self-renewal and differentiation. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 232. [[CrossRef](#)]
49. Kang, T.H.; Park, D.Y.; Choi, Y.H.; Kim, K.J.; Yoon, H.S.; Kim, K.T. Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* **2007**, *27*, 8533–8546. [[CrossRef](#)]
50. Tu, Q.; Cameron, R.A.; Worley, K.C.; Gibbs, R.A.; Davidson, E.H. Gene structure in the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* based on transcriptome analysis. *Genome Res.* **2012**, *22*, 2079–2087. [[CrossRef](#)]



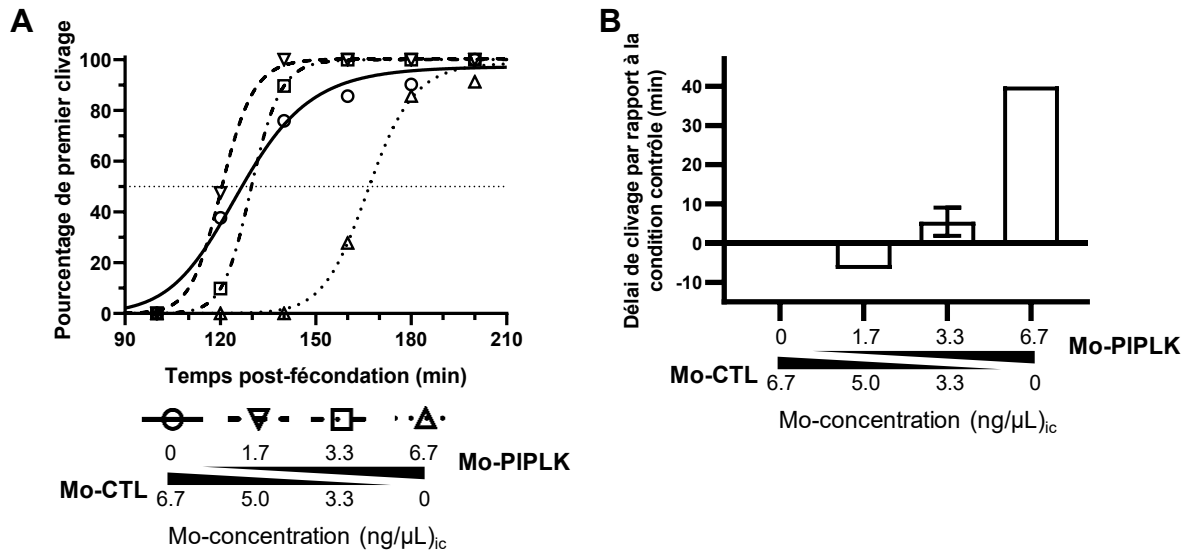
## Discussion, perspectives et données préliminaires

Cet article présente pour la première fois une étude de la pT3H3 chez un embryon de métazoaire. Nous avons démontré que cette phosphorylation est très finement contrôlée dans le temps et l'espace durant les premières mitoses de l'embryon de l'oursin *Sphaerechinus granularis*. Ce signal apparaît après l'activation du complexe CycB/CDK1 (signalé par la pT318PP1C) et avant le clivage des première et secondes divisions. De plus, comme chez les mammifères, la pT3H3 est détectée sous forme de points (foci) sur les chromosomes déjà condensés en prophase puis le long des chromosomes (sans accumulation claire dans la région centromérique) jusqu'à sa disparition en anaphase. La forte homologie des domaines de la protéine entre mammifère et oursin suggère que son contrôle et sa fonction puissent être conservés chez l'oursin. Cependant, les tests pharmacologiques, à l'aide du CHR-6494 pour confirmer l'implication de l'haspine, amènent une certaine réserve. Cela doit relever le niveau d'attention que l'on porte à la spécificité du CHR-6494 dans les études utilisant cette drogue, d'autant plus dans les essais cliniques associés. La pT3H3 reste tout de même un marqueur mitotique conservé chez l'oursin. Il est donc possible d'utiliser ce marqueur pour suivre la dynamique de la mitose.

Différents acteurs de ce SAC voient leur ARNm recrutés dans la machinerie de traduction en réponse à la fécondation : CDK1, PLK1, Aurora A, RCC1, etc (Chassé et al. 2018). Les œufs d'oursins étant compétents à la réalisation de ce checkpoint (Chenevert et al. 2020), il serait intéressant d'étudier cet aspect en aval de la pT3H3, lorsqu'un inhibiteur plus spécifique sera identifié, du moins chez l'oursin. Ainsi, la localisation des protéines Mad ou du CPC, le suivi parallèle de la pS10H3 ou encore le réassemblage de l'enveloppe nucléaire pourraient être étudiées à la même manière de Chenevert et ses collaborateurs.

La kinase PLK1 est montrée comme agissant en amont d'haspine (Zhou et al. 2014) et l'ARNm de PLK1 est recruté dans les polysomes actifs à la fécondation (Chassé et al. 2018). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de PLK1 néo-traduit sur la pT3H3, ainsi que son influence sur la dynamique du cycle. De la même manière que pour les cyclines ou CDK1, la néo-traduction de PLK1 a été inhibée par injection d'un morpholino spécifique à différentes concentrations (Mo-PLK à 1,67/3,33/6,66nM<sub>ic</sub>) (Figure 21). La dynamique du premier clivage semble ici affectée de manière importante seulement par la concentration forte de morpholino injectés avec un délai de clivage qui passe de 5 min à plus de 35min. Après répétition de cette expérience, les mêmes contrôles de spécificité par sauvetage ou utilisation de morpholinos présentant une identité plus faible seront nécessaires. Il est possible que la protéine PLK1 soit

déjà en quantité importante, et que la quantité néo-traduite n'impacte que peu ce stock de l'œuf. Néanmoins, l'analyse spatio-temporelle de l'expression de la pT3H3 en absence de la néo-synthèse de PLK1 ou d'autres acteurs du SAC pourrait ouvrir des perspectives intéressantes pour comprendre leur implication dans la dynamique mitotique des embryons d'oursins.



*Figure 21 La néo-traduction de PLK1 en réponse à la fécondation semble nécessaire pour la bonne dynamique de la première division chez P. lividus*

La première division après fécondation est affectée par la micro-injection de morpholinos dirigés contre PLK1 (Mo-PLK). Les courbes de divisions représentatives des embryons injectés sont présentées en (A). Le temps auquel 50% d'œufs se sont divisés a été identifié et est exprimé en délai (en minutes) par rapport à la condition d'injection avec un morpholino contrôle (Mo-CTL). Les injections sont faites avec les deux morpholinos à la concentration intracellulaire de 6.66 nM totale selon les proportions indiquées. Cent œufs ont été injectés par condition. N=5 réplicats indépendants à 3.33 nM, dont un réplicat associé à la dose réponse. Les barres d'erreurs représentent la SEM.

### **Chapitre 3 : Influence des 5'UTR dans le recrutement des ARNm à la fécondation**

La traduction d'un ARNm est un processus très contrôlé, que ce soit par les facteurs de traduction ou par l'ARNm lui-même. Dans le cadre de la fécondation chez l'oursin, l'activation de la traduction n'est pas globale à l'ensemble des ARNm et présente un recrutement de 18% d'ARNm maternels spécifiquement (Chassé et al. 2018). L'ARNm de la cycline B est abondant et fortement traduit en réponse à la fécondation, ce qui a sans doute aidé à sa découverte en 1983 (Evans et al. 1983). Le recrutement de son ARNm dans les polysomes possède notamment une sensibilité à la voie mTOR. Cependant, si l'inhibiteur PP242 affecte sensiblement son recrutement, une fraction résiduelle de ce messager reste non affectée par l'inhibition de mTOR (Chassé et al. 2016; 2018). Ce résultat suggère que la dynamique de la traduction de l'ARNm cycline B est sous influence de mécanismes sensibles et insensibles de la voie mTOR. La voie MAPK est aussi susceptible d'influencer la production de la cycline B (Mulner-Lorillon et al. 2017), en revanche, il n'est pas connu si cette voie agit sur l'activité traductionnelle de l'ARNm. Comprendre les mécanismes susceptibles d'influencer la sensibilité de traduction de l'ARNm à la voie mTOR et savoir si la voie MAPK est capable de contrôler l'efficacité de traduction de l'ARNm cycline B sont deux questions importantes pour expliquer la dynamique qui relie le contrôle traductionnel au cycle cellulaire.

J'ai voulu étudier l'impact de la région 5'UTR des ARNm d'intérêts recrutés à la fécondation chez l'oursin, sur le contrôle de leur traduction *in vivo*. Chez l'oursin, la micro-injection est la seule approche qui permette de délivrer avec une efficacité de 100% des molécules au sein de l'œuf. L'équipe a précédemment utilisé comme rapporteur un ARNm codant pour la Firefly luciférase sous contrôle du 5'UTR d'ARNm de Globine de xénope pour suivre l'activité traductionnelle d'un ARNm *in vivo* (Costache et al. 2012). J'ai adapté ce système rapporteur *in vivo* pour réduire la complexité de l'expérimentation et augmenter la reproductibilité, comme décrit dans l'article publié, ci-dessous. L'article 3 regroupe plusieurs méthodes d'analyses de la synthèse protéique chez l'oursin dont la mesure d'activité de traduction par un ARNm rapporteur *in vivo*. L'article a été publié dans un ouvrage collectif rassemblant des techniques d'analyses cellulaires et moléculaires sur les modèles échinodermes (Hamdoun and Foltz 2019). Ce système a ensuite été appliqué pour tester *in vivo* l'efficacité traductionnelle sous contrôle de 5'UTR d'ARNm d'intérêt.

L'article présente en détail le protocole de cette technique et permet la visualisation de cette approche expérimentale (Article 3 – Figure 4), dont voici un résumé. L'ARNm rapporteur

est composé des 5'UTR et 3'UTR de Globine entourant l'ORF de la Firefly luciférase (5'Glob-Fluc) et produit *in vitro*. Le système expérimental consiste en des boîtes de Petri dans lesquelles un système de lamelles permet une manipulation aisée des œufs une fois injectés. L'originalité de la méthode permet de réaliser des expériences reproductibles en triplicat. Les ovules dégangés sont ainsi attachés aux lamelles par un prétraitement des lamelles à la protamine. Une fois les ovules injectés avec les différentes constructions, et fécondés, la lecture de la luminescence se fait par transfert des lamelles dans le substrat de la luciférase. La lumière émise est détectée au luminomètre.

Afin d'affiner les résultats et pouvoir les comparer rigoureusement entre les différentes conditions expérimentales, il est important de réduire les sources de variations de signaux de luminescence dus aux aléas des volumes introduits par micro-injection. Deux aspects qualitatifs ont été pris en compte dans l'ensemble des approches utilisant la micro-injection : la standardisation du volume introduit et la qualité de la micro-injection en termes de blessure infligée à la membrane de l'œuf. La co-injection de fluorescéine permet de standardiser le volume introduit. De même, la perte significative de fluorescence une heure après injection, permet d'éliminer les œufs abîmés par l'aiguille. De plus, dans le cadre des comparaisons des efficacités traductionnelles de différents UTR, un second ARNm est co-injecté pour servir de standard pour l'activité traductionnelle. Il s'agit d'une construction ayant l'ORF d'une Renilla Luciférase dont on ne fera pas varier la région UTR. Le ratio du signal de la Firefly sur le signal de la Renilla reflète donc l'efficacité de traduction relative contrôlée par les différents 5'UTR.

La capacité de mesurer l'activité traductionnelle dans une population allant de 5 à 30 œufs en fonction des temps de mesure (1 à 4 heures post-fécondation) nous a permis d'adapter notre protocole à l'analyse simultanée dans plusieurs conditions physiologiques, tout en nous permettant une approche statistique satisfaisante (article 3 (Chassé, Boulben, Glippa, et al. 2019)).

Article 3 :

*In vivo analysis of protein  
translation activity in sea urchin  
eggs and embryos*

Héloïse Chassé, Sandrine Boulben,  
Virginie Glippa, Florian Pontheaux,  
Patrick Cormier, Julia Morales

*In Methods in Cell Biology.*

Eds. A. Hamdoun et K. R. Foltz, Elsevier, 2019. DOI : 10.1016/bs.mcb.2018.10.008





# In vivo analysis of protein translation activity in sea urchin eggs and embryos

Héloïse Chassé, Sandrine Boulben, Virginie Glippa, Florian Pontheaux,  
Patrick Cormier, Julia Morales\*

CNRS, Sorbonne Université, Integrative Biology of Marine Models (LBI2M), Station Biologique de Roscoff (SBR), Roscoff, France

\*Corresponding author: e-mail address: morales@sb-roscoff.fr

## Chapter outline

<b>1 Overview</b> .....	<b>2</b>
<b>2 General fertilization and embryo culture</b> .....	<b>3</b>
<b>3 Global protein translation analysis</b> .....	<b>4</b>
3.1 [ <sup>35</sup> S]-methionine labeling method.....	4
3.1.1 Pulse labeling.....	4
3.1.2 Continuous labeling.....	4
3.1.3 Quantification of labeled proteins.....	5
3.2 Non-radioactive alternative methods.....	7
3.2.1 Puromycin labeling.....	7
3.2.2 Click reaction.....	8
<b>4 Polysome profiling using sucrose gradients</b> .....	<b>8</b>
4.1 Cell lysis.....	9
4.2 Gradient preparation.....	10
4.3 Gradient running and fractionation.....	10
4.4 Analysis of mRNAs associated to polysomes.....	11
<b>5 Luciferase reporter genes</b> .....	<b>13</b>
5.1 Preparation of the mRNA.....	13
5.2 Experimental injection system.....	14
5.2.1 Glassware preparation for eggs alignment.....	14
5.2.2 Preparation of eggs.....	14
5.2.3 Alignment and microinjection of the eggs.....	16
5.3 Detection of the Luciferase translated in vivo.....	16
<b>6 Conclusion</b> .....	<b>16</b>
<b>Acknowledgments</b> .....	<b>17</b>
<b>References</b> .....	<b>17</b>

---

## Abstract

Protein synthesis is a major regulatory step of gene expression in different physiological processes including development. Translation of proteins in sea urchin is stimulated upon fertilization and is necessary for cell cycle progression and development. Translational control is exerted through multifactorial mechanisms, including mRNA recruitment into polysomes and increased rates of translational activity. In this chapter, we review the methods used in sea urchin eggs and embryos to analyze translation activity *in vivo* both from perspectives of the proteins and of the mRNAs. First, we describe methods to quantify or visualize newly synthesized proteins with radioactive and non-radioactive labeling techniques. Next we present the polysome isolation and profiling on sucrose gradients, allowing the identification of translated mRNAs. Finally, we outline a procedure to follow the translation of a reporter luciferase protein from an mRNA microinjected into the egg.

---

## 1 Overview

Translation of mRNA is a complex and highly coordinated process, critical for protein production; both global protein synthesis rates and translational efficiencies of specific mRNAs are finely regulated to respond to a number of pathological and physiological situations, such as oocyte-to-embryo transition and early development (Hershey & Merrick, 2000; Horner & Wolfner, 2008). In eukaryotes, protein synthesis is mostly regulated at the initiation step of translation. Initiation predominantly depends on recognition of the mRNA 5' cap by the translation initiation factor 4E (eIF4E), controlled by the master regulator mTOR (mechanistic target of rapamycin) kinase (Jackson, Hellen, & Pestova, 2010). Eukaryotic mRNAs have structural *cis*-acting elements predominately located in 5' and 3' untranslated regions, providing more opportunities for specific regulation by *trans*-acting RNA binding proteins.

The sea urchin embryo is an interesting model organism in that context, since a clear switch of translation regulation occurs at fertilization, from a repressed state in the unfertilized eggs to an increase in protein synthesis activity triggered by fertilization. The protein synthesis activity increase is independent of ribosome biogenesis and transcription, utilizes stored maternal mRNAs, and is absolutely necessary for the entry into cell cycle. Translation inhibitors such as emetine block the cell cycle progression whereas transcription inhibitors have no effects on the first three cell divisions following fertilization (Dube, 1988; Gross & Cousineau, 1963; Wagenaar, 1983). Using [<sup>35</sup>S]-methionine to label newly synthesized proteins after fertilization, Tim Hunt discovered a protein that was synthesized continuously and destroyed at each cell division (Evans, Rosenthal, Youngblom, Distel, & Hunt, 1983) which turned out to be the mitotic protein cyclin. This discovery led Tim Hunt to share, with Lee Hartwell and Paul Nurse, the Nobel Prize in Physiology and Medicine in 2001 for uncovering cell cycle master regulators.

Translation in eukaryotes is regulated by more than 20 translation factors, all of which are present in the sea urchin genome (Morales et al., 2006). Several translation factors, such as eIF2 (eukaryotic Initiation Factor 2), eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E) and eEF2 (eukaryotic Elongation Factor 2) are activated following fertilization and participate to the general increase of translation activity triggered by fertilization (review in Cormier, Chassé, Cosson, Mulner-Lorillon, & Morales, 2016). The importance of mTOR-mediated regulation of translation during development has emerged using the sea urchin early development as a model (Cormier et al., 2016). For instance, fertilization triggers rapidly the degradation of 4E-BP, the main inhibitor of cap-dependent translation. The 4E-BP degradation is blocked by rapamycin or PP242 treatment, suggesting that the translational switch induced by fertilization is dependent on mTOR activity. This pathway plays a major role in the fine-tuning orchestration of cyclin B mRNA translation following fertilization (Chassé et al., 2018, 2016; Salaun et al., 2003).

The sea urchin model was also instrumental in the discovery of translational regulation at the level of mRNA recruitment onto polysomes, with the identification of several mRNAs using polysome gradients following fertilization such as cyclins, ribonucleotide reductase, histones (Alexandraki & Ruderman, 1985; Kelso-Winemiller & Winkler, 1991; Wells, Showman, Klein, & Raff, 1981). The sequencing and annotation of the sea urchin genome (Sodergren et al., 2006) and the deep-sequencing analysis of the polysomal fractions give access to the full set of translated mRNAs. Recently, we have identified the set of mRNA that are specifically translated during the egg-to-embryo transition (Chassé et al., 2018). Functional analysis of these mRNA should help establishing translational regulatory networks that control the first mitotic and early events of the embryonic development.

In this chapter, we review the methods to analyze translation activity *in vivo* in sea urchin eggs and embryos. First, we describe methods to analyze global rates of protein synthesis, to quantify or to visualize newly synthesized proteins by the classical incorporation of radioactive amino acid and by newly developed non-radioactive labeling techniques. Next we present the polysome isolation and profiling on sucrose gradients, allowing the identification of translated mRNAs at specific times of development or in response to signaling pathways activated at fertilization. Finally, we present a procedure to follow the translation of a reporter luciferase protein from an mRNA microinjected into the egg. This method makes possible the investigation of the functional *cis*-acting elements in the untranslated regions of mRNAs responsible for temporally regulated translation.

---

## 2 General fertilization and embryo culture

Protocols presented here were developed and used with the European species *Paracentrotus lividus* and *Sphaerechinus granularis*, two species evolutionary separated by 20 million years. Sea urchins, collected in the Brest area in France, were obtained

## 4 In vivo analysis of protein translation activity

from EMBRC-France at the Roscoff Marine Station. Spawning of gametes is induced by intracoelomic injection of 0.1 M acetylcholine. Eggs are collected in natural filtered seawater (NFSW) and rinsed twice by centrifugation (2 min at  $2000 \times g$ ). Eggs are dejellied by swirling 20 s in 0.7 mM citric acid/NFSW (pH 5) and rinsed three times with fresh NFSW. For fertilization, eggs are suspended in NFSW (5% (v/v) suspension). Diluted sperm is added to the eggs. Cultures are performed at 16 °C under constant agitation. For the luciferase-reporter gene assay, the preparation, alignment and fertilization of the eggs are described in the specific section.

---

### 3 Global protein translation analysis

#### 3.1 [<sup>35</sup>S]-methionine labeling method

Metabolic labeling of eggs and embryos with low-energy  $\beta$ -emitting radioisotopes such as [<sup>35</sup>S]-methionine is used to follow the biosynthesis of proteins *in vivo*. All labeling reactions are done at 16 °C (or at the appropriate culture temperature for a given species).

##### 3.1.1 Pulse labeling

The pulse labeling of eggs or embryos allows analysis of protein synthesis activity at a specific time point.

- Eggs are dejellied and fertilized as described earlier. Embryos are cultured at a 5% (v/v) suspension in NFSW.
- At the desired time after fertilization, retrieve 500  $\mu$ L of embryo suspension from the culture to a safe-lock Eppendorf tube.
- Add 10  $\mu$ Ci/mL final of [<sup>35</sup>S]-methionine.
- Incubate 10–15 min, under constant rotation on a rotating wheel.
- Pellet the eggs or embryos in a microspin centrifuge for 5 s. Discard the supernatant. Samples can be frozen in liquid nitrogen and kept at  $-20$  °C at this point until sample processing. Proceed to step 3.1.3 for lysis and radioactivity incorporation measurement.

##### 3.1.2 Continuous labeling

- To measure the fold increase of protein synthesis at fertilization, dejellied eggs are pre-loaded with [<sup>35</sup>S]-methionine (10  $\mu$ Ci/mL final) for 1 h with gentle agitation. Let the eggs settle by sedimentation and wash in NFSW. Then fertilize the eggs.
- Alternatively, dejellied eggs are fertilized and [<sup>35</sup>S]-methionine (10  $\mu$ Ci/mL final) is added to the embryo suspension 5 min after fertilization. Both methods give equivalent results.
- At the desired time after fertilization, retrieve 500  $\mu$ L of embryo suspension from the culture to a safe-lock Eppendorf tube.

- Pellet the eggs or embryos in a microspin centrifuge for 5 s. Discard the supernatant. Samples can be frozen in liquid nitrogen and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  at this point until sample processing. Proceed to step 3.1.3.

### 3.1.3 Quantification of labeled proteins

- Lyse the cell pellets with 300  $\mu\text{L}$  of ice-cold lysis buffer (or your favorite one) by five passages through a 1-mL syringe fitted with a G25 needle. Centrifuge the lysates 10 min at  $13,000 \times g$  in a microfuge at  $4^{\circ}\text{C}$ . Recover the supernatant containing the cytosoluble fractions.
- Spot 10  $\mu\text{L}$  of the supernatant on a Whatman 3 M filter ( $2 \times 1$  cm), using four filters per sample.
- To measure the [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine incorporated into proteins, two filters are washed as follows:
  - 10% TCA at  $4^{\circ}\text{C}$  for a minimum of 2 h up to overnight
  - 5% TCA at  $4^{\circ}\text{C}$  for 15 min
  - 5% TCA at  $100^{\circ}\text{C}$  for 30 min
  - 5% TCA at room temperature for 15 min
- Strain excess liquid from filters. Place each paper in a scintillation vial and add 1 mL scintillant.
- The two untreated filters are used to measure total radioactivity: place each filter in a scintillation vial with 1 mL of scintillant.
- Count the radioactivity with a scintillation counter. The results are expressed as a percentage of [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine incorporation into proteins over total radioactivity recovered in cells for each time point or condition.
- To identify/visualize the labeled proteins, add SDS-PAGE loading buffer to the supernatant and load 10–15  $\mu\text{L}$  on an SDS-PAGE. The separated proteins are revealed by X-ray film or PhosphorImager autoradiography.

The protein activity can be followed during normal development by continuous labeling for the first 3 h of development. If a longer kinetic analysis or a later development time point is needed, pulse labeling is more appropriate. The effect of drugs, inhibitors or chemical agents on translation activity can be studied by this method. Add the reagents to be tested to the eggs or embryos culture at several concentrations, before and/or after fertilization. Use emetine, a translation elongation inhibitor effective in sea urchin, at  $100\mu\text{M}$  to block completely the incorporation of methionine into proteins.

Typical labeling experiments at fertilization are shown in [Fig. 1](#). Incorporation of [ $^{35}\text{S}$ ]-methionine into proteins is low in unfertilized eggs, as expected. Protein synthesis activity increases after fertilization as shown by continuous ([Fig. 1A](#)) and pulse labeling ([Fig. 1B](#)). When the embryos are cultured in presence of the mTOR inhibitor PP242, protein synthesis activity was strongly inhibited while some proteins remained translated ([Chassé et al., 2018, 2016](#)). The pattern of newly synthesized proteins is presented [Fig. 2A](#).

## 6 In vivo analysis of protein translation activity

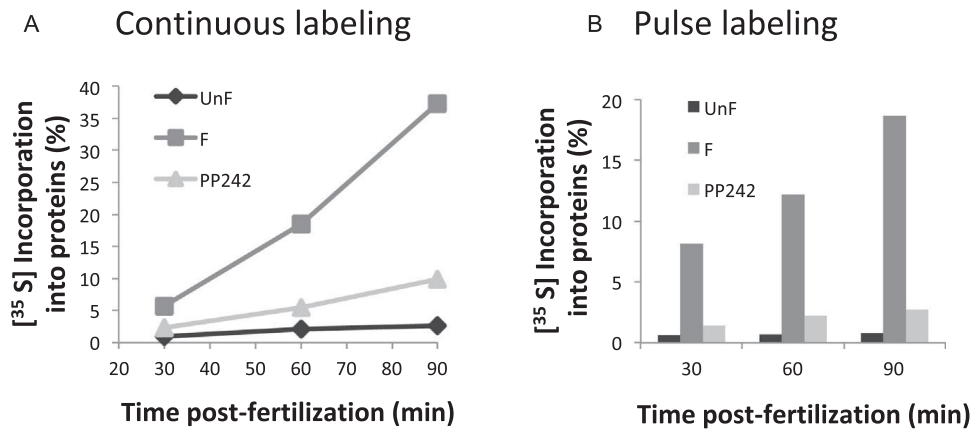


FIG. 1

Detection of protein synthesis activity in sea urchin. The rate of *in vivo* protein synthesis was monitored by the kinetics of [<sup>35</sup>S]-methionine incorporation into proteins after continuous (A) or pulse (B) labeling, in unfertilized eggs (UnF), and after fertilization in the absence (F) or presence (PP242) of 10 μM PP242. Radioactivity incorporation into TCA-precipitated proteins was determined at indicated times.

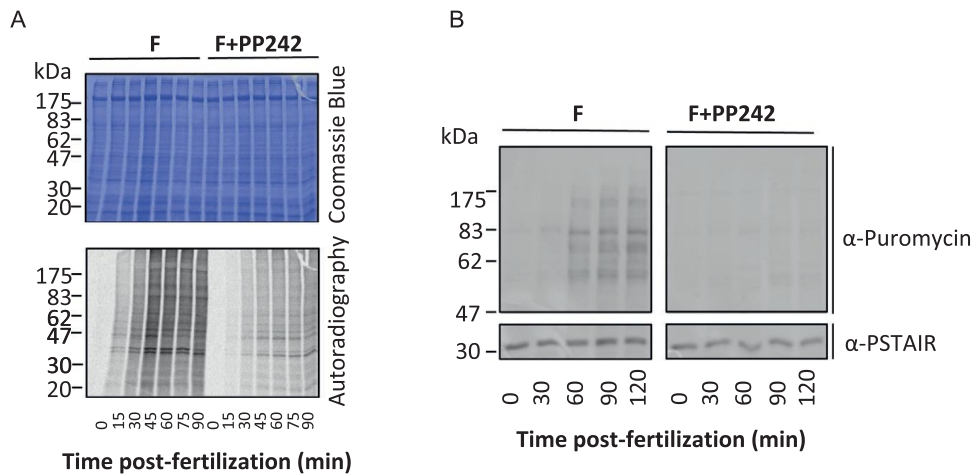


FIG. 2

Pattern of newly synthesized proteins detected by [<sup>35</sup>S]-methionine (A) or puromycin (B) incorporation. (A) Control (F) or PP242-treated embryos were incubated with [<sup>35</sup>S]-methionine by continuous labeling following fertilization. The pattern of proteins obtained is shown after separation on an SDS-PAGE. Total proteins are stained by Coomassie blue, and newly synthesized proteins are detected by autoradiography. (B) After puromycin incorporation into control (F) or PP242-treated embryos, total protein extracts are separated on SDS-PAGE and the newly synthesized peptides are analyzed by Western blot with an antibody directed against puromycin. CDK1 immunoblot (revealed with the anti-PSTAIR antibody, Sigma) is shown as a loading control.



**Lysis buffer**

40mM HEPES pH 7.6  
100mM NaCl  
0.4mM EDTA  
2mM DTT  
0.2mM sodium orthovanadate  
20mM PPI  
100mM sodium fluoride  
100mM  $\beta$ -glycerophosphate  
10  $\mu$ g/mL Protease Inhibitor Cocktail (P2714, Sigma-Aldrich).

*Notes:* Radioactive material should be used according to your institution's regulation and safety procedures, in an area designated for radioactive work. Discard liquid and solid radioactive waste in appropriate containers. [ $^{35}$ S]-Methionine at 10mCi/mL is supplied by several companies as a colored solution stored at 4 °C, which is easier to use and to detect possible contamination than a frozen, colorless product.

**3.2 Non-radioactive alternative methods****3.2.1 Puromycin labeling**

An alternative to classical radioactive labeling methods was recently developed for the study of mRNA translation (Schmidt, Clavarino, Ceppi, & Pierre, 2009), based on the use of puromycin to detect nascent proteins, called SunSET. The antibiotic puromycin is a structural analog of aminoacyl tRNAs that provokes dissociation of the ribosomes in the elongation step of translation and is incorporated into the newly synthesized protein. When it is used at a concentration that does not block completely translation, puromycin incorporation reflects directly the rate of mRNA translation. Puromycin labeled peptides are detected with an antibody directed against puromycin (clone 12D10; Merck Millipore MABE343)

- Eggs are dejellied and fertilized as described earlier.
- At the desired time after fertilization, retrieve 200  $\mu$ L of embryo suspension from the culture to an Eppendorf tube.
- Add puromycin at 100  $\mu$ M final.
- Incubate on a rotating wheel for 10 min.
- Pellet the eggs or embryos by a short spin, resuspend the pellet in 100  $\mu$ L SDS-FIX.
- Add SDS-PAGE loading buffer to the samples and denature at 95 °C for 5 min, load 15  $\mu$ L on an SDS-PAGE gel, transfer onto nitrocellulose membrane. Saturate the membrane with TBST-BSA 1% for 1 h at room temperature.
- Incubate overnight at 4 °C with anti-puromycin antibody diluted at 1:1000 in TBST-BSA1% with gentle agitation.
- After three 10min washes with TBST, add the secondary antibody coupled with HRP (1:5000) for 1 h at room temperature. Wash 10 min three times with TBST and detect the puromycin-labeled proteins with chemiluminescent HRP substrate detection kit.

As shown in Fig. 2B, the incorporation of puromycin into proteins as revealed by Western blot analysis, increases after fertilization and is inhibited by the mTOR inhibitor PP242, similarly to the results obtained with the [<sup>35</sup>S]-methionine radioactive labeling. Note that radioactive labeling allows the observation of full-length newly synthesized proteins, whereas puromycin labels only peptides.

**SDS-FIX**

2% sodium dodecyl sulfate (SDS)  
10% glycerol  
100mM DTT  
62.5 mM Tris pH 6.8

**TBST**

20mM Tris pH 7.6  
150mM NaCl  
0.1% Tween20

**3.2.2 Click reaction**

Another non-radioactive alternative for protein synthesis detection relies on the *in vivo* incorporation of aminoacids or puromycin homologs containing reactive azide or alkyne groups into proteins followed by chemoselective ligation (“Click-iT” reaction) of a fluorescent dye or biotin group. Similar to [<sup>35</sup>S]-methionine, methionine analogs HPG (homopropargylglycine) and AHA (L-azidohomoalanine), or modified translational inhibitor OPP (O-propargyl-puromycin) are added to cultured eggs or embryos and incorporated into proteins during active protein synthesis. Protein synthesis can be detected by performing the click reaction with the corresponding click detection reagent suitable for biochemical analyses by SDS-PAGE, identification by mass spectrometry or for *in situ* analysis at the cellular level. Using the Click-iT reaction with HPG and OPP coupled with AlexaFluor 488 detection, Oulhen and colleagues recently showed that translation activity is turned off in the primordial germ cells at the blastula stage and is restored to an activity similar to that of neighbor cells at the gastrula stage (Oulhen, Swartz, Laird, Mascaro, & Wessel, 2017). The reader is referred to chapter 11 (this volume) for detailed protocols using the Click-iT reaction.

---

**4 Polysome profiling using sucrose gradients**

Polysome profiling is the classical standard for translation analysis from the perspective of the mRNA (King & Gerber, 2016). The translation rate is associated with the number of ribosomes translating simultaneously the same mRNA. Translated mRNAs which associate to several ribosomes (polysomes) are separated from untranslated mRNAs on sucrose gradient. A critical point is to verify that mRNAs present in polysome fractions are associated with *bona fide* translating polysomes, and not with co-sedimenting mRNPs (messenger ribonucleoparticles) or stalled

polysomes. Before application to the sucrose gradient, samples are treated with puromycin, which only dissociates active polysomes. The mRNAs associated with active translating polysomes shift from the polysome fractions to the middle of the sucrose gradient after puromycin treatment, whereas co-sedimenting untranslated mRNAs are unaffected (Blobel & Sabatini, 1971; Kang & Pomerening, 2012). The RNA samples can be used for targeted analyses on a specific mRNA as well as for the identification of the cellular subset of translated mRNAs by deep-sequencing (Chassé, Boulben, Costache, Cormier, & Morales, 2017).

#### 4.1 Cell lysis

- Remove the eggs jelly as described earlier and fertilize the eggs as a 5% suspension in NFSW.
- 5 min before sample collection, treat the eggs or embryos with 100  $\mu$ M emetine. Emetine, a translation elongation inhibitor, is used to effectively prevent ribosomes from running off the mRNA and therefore to accurately reflect the translational status of the cell.
- If a puromycin-treated sample is needed, add 0.6 mM puromycin in sea urchin embryo culture 20 min before collection, then proceed as above.
- Collect 5 mL embryos suspension at the required time or condition by brief centrifugation.
- Resuspend the pellet in 1 mL of cold Polysome lysis buffer and transfer to a Dounce homogenizer. 10 strokes of B (tight) pestle are enough to lyse 100% of the cells. All steps should be done at 4 °C, on ice or in the cold room.
- Centrifuge the lysate for 10 min at 13,000 rpm in a tabletop centrifuge to remove nuclei and cellular debris. Then transfer the supernatant to a clean microtube.
- 500  $\mu$ L aliquots are frozen in liquid nitrogen and kept at –80 °C until further use for polysome fractionation (step 4.3).
- Measure the absorbance at  $A_{260\text{nm}}$  of a 5  $\mu$ L sample of lysate diluted in 1 mL of water using a spectrophotometer. Typical yield for sea urchin samples is usually between 20 and 40  $\text{OD}_{A_{260}}$  per mL of lysate.
- Check the quality of your polysome lysate: purify total RNA from a 100  $\mu$ L aliquot of lysate by phenol-chloroform (pH 4) extraction and isopropanol precipitation. RNA pellet is resuspended in RNase-free water and separated on a TBE-agarose gel. The 28S and 18S ribosomal RNAs must be intact.

##### **Polysome lysis buffer: (prepare in RNase-free water)**

10mM Tris pH 7.4  
250mM KCl  
10mM  $\text{MgCl}_2$   
25mM EGTA  
0.4% Igepal  
5% Sucrose

##### **Add extemporaneously**

1 mM DTT  
10  $\mu$ g/mL aprotinin

2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin  
100  $\mu\text{M}$  emetine  
40 U/mL RNase Inhibitor

## 4.2 Gradient preparation

To obtain a linear gradient for the polysome fractionation, we use the Gradient Master device (BioComp) and tubes fitted for a Beckman SW41 rotor.

- Prepare two gradient buffers containing 15% or 40% sucrose (make 6 mL of each solution per gradient). The gradients are prepared at room temperature.
- Trace a line on the ultracentrifuge SW41 tube using the marker block (upper edge for short gradient caps). Pour 15% sucrose buffer into the tube up to 2 mm above the line (roughly 6 mL). Load the 40% sucrose buffer into a 10-mL syringe with a layering cannula attached, introduce the cannula vertically to the bottom of the tube and slowly layer the heavy sucrose solution (roughly 6 mL) until the interphase is exactly at the level of the line.
- Carefully remove the needle from the tube. Cap the tube with the “short gradient cap” so the excess 15% sucrose and air can go through the cap’s escape hole. No air bubble should be left inside the tube. Remove the excess of sucrose buffer in the cap by pipetting it out. Repeat for desired number of tubes (2, 4 or 6 total) and place filled tubes in magnetic tube rack.
- Choose the “SW41 Short Gradient” program with the corresponding range of sucrose percentage following the manufacturer’s instructions. The program lasts a few minutes (2 min 21 s for a 15–40% gradient) and produces up to six reproducible linear gradients in one run.
- Store the gradients at 4 °C for at least 1 h before spin. The gradients should be handled with care to avoid disturbance. Remove the cap before loading the lysate.
- Prepare 50% sucrose chase solution in RNase-free water and store at 4 °C until use. 100 mL of solution is enough for six gradients fractionation.

### Gradient sucrose buffers: (prepare in RNase-free water)

10 mM Tris pH 7.4  
10 mM  $\text{MgCl}_2$   
250 mM KCl  
25 mM EGTA  
1 mM DTT  
15% or 40% (w/v) sucrose

## 4.3 Gradient running and fractionation

- Load the cell lysate prepared in step 4.1 by gently pipetting it carefully on top of the sucrose gradient prepared in step 4.2. Optimal separation of the 40S, 60S and

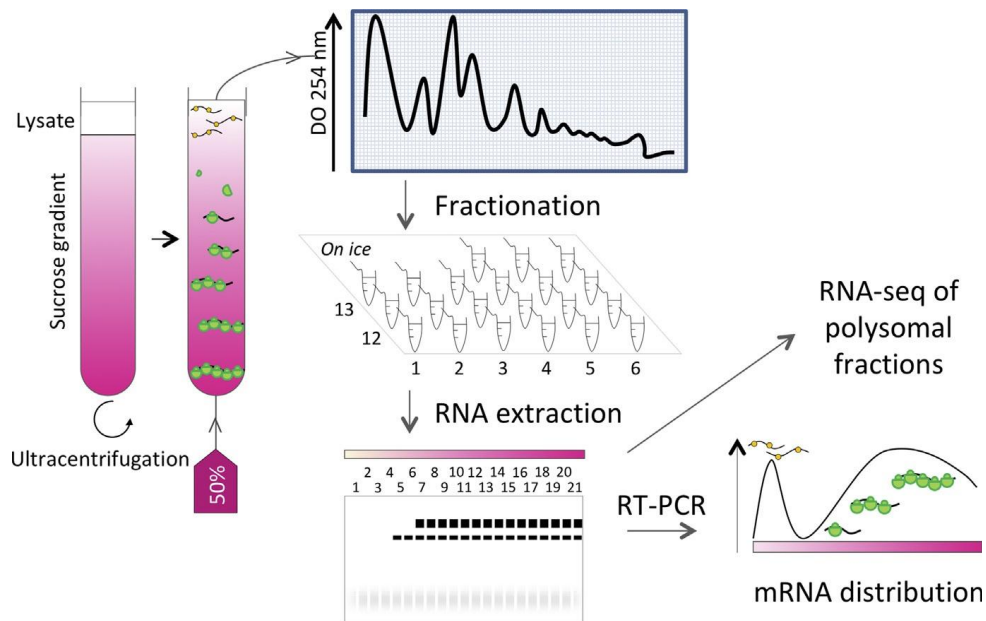
ribosome peaks in sea urchin is obtained with 10 OD<sub>A260</sub> loaded on the gradient. The maximum volume of lysate that can be deposited on the gradient is 500  $\mu$ L, with a maximum of 25 OD<sub>A260</sub>.

- The puromycin-treated lysates are incubated with 0.5 M KCl for 15 min at 4 °C then for 15 min at 37 °C, before applying them on the sucrose gradient.
- Run the ultracentrifuge at 38,000 rpm for 2.5 h in a Beckman SW41 Ti rotor at 4 °C. Set the acceleration to its maximum value, and the deceleration to its minimum value. Keep the gradients at 4 °C for immediate fractionation.
- During ultracentrifugation, prepare the ISCO Density Gradient Fractionation System (or similar fractionation system), wash first with 0.1 M NaOH, and then rinse thoroughly with DEPC-treated water. Set the peristaltic pump at a speed corresponding to 0.9 mL/min. Fill the system with the 50% sucrose chase solution up to the piercing needle, avoiding the introduction of air bubbles, which will disturb the gradient. Connect the centrifuge tube to the piercing apparatus and inject the 50% sucrose chase solution by puncturing the tube from the bottom, pushing out the gradient in a continuous manner into the flow cell. Collect 21 fractions (600  $\mu$ L) on ice to avoid RNA degradation. At this point, proceed to phenol-chloroform extraction or freeze in liquid nitrogen and store at –80 °C until use.
- Extract the RNAs of each fraction with one volume of acid phenol-chloroform (pH 4, vol:vol), precipitate with 1  $\mu$ L of glycogen (20 mg/mL stock) and one volume of isopropanol overnight at –20 °C or 2–3 h at –80 °C.
- Pellet the RNAs at 13,000 rpm for 10 min at 4 °C in a tabletop centrifuge, wash the pellet with 1 mL of 70% ethanol, pellet again and leave it to air-dry for 20 min. Resuspend the RNA pellet in 30  $\mu$ L RNase-free water. The RNAs are stored at –80 °C.
- Check the quality of the RNA and the polysome profile on an agarose gel.

**Fig. 3** outlines the polysome gradient experiment. A typical polysome gradient profile first shows a peak of A<sub>254</sub> absorbing material, containing the untranslated mRNAs, then the two peaks of the small and large ribosomal subunits, the monosome peak, and finally the polysomal peaks. Polysome peaks intensity will vary according to the general translation activity, the peaks will be very small shortly after fertilization, and will increase as development proceed. The reader is referred to a recent publication ([Chassé et al., 2017](#)) for more details.

#### 4.4 Analysis of mRNAs associated to polysomes

The presence of an mRNA in the polysomal fractions is an indication of its translation. The repartition of an mRNA along the polysome gradient is analyzed by RT-PCR using an equal RNA volume (5  $\mu$ L) of each polysome gradient fraction as template. mRNAs are first reverse transcribed using random primers and amplified by PCR using specific primers. Dilute the cDNA in RNase-free water for the

**FIG. 3**

Overview of the polysome isolation and profiling. Lysates from eggs or embryos are loaded on a linear sucrose gradient and untranslated mRNAs are separated from polysome-associated mRNAs by ultracentrifugation. The gradient, monitored using a flow cell coupled to a spectrophotometer, is fractionated into equal fractions from which RNA is extracted. The presence of a given mRNA species is analyzed by RT-PCR amplification in each fraction, and the distribution of the mRNA along the gradient reflects its translational status. The RNAs present in the polysomes fractions may be sequenced to have access to the full subset of translated mRNAs.

PCR reaction so that amplification is in the linear range; test RT-PCR must be conducted for each primer pair. PCR products are then analyzed on 2% agarose-TBE gels, scanned on a Typhoon Trio (GE Healthcare Life Sciences), and quantified using ImageJ software. Express the repartition of the mRNA along the gradient as a percentage of mRNA in each fraction over total mRNA.

Furthermore, the polysome gradients allow access to all translated mRNAs by sequencing the mRNAs present in the polysomal fraction compared with the total RNA pool. The pool of translated mRNAs identified across the genome represents the translome. Following gradient fractionation, polysome fractions are pooled and RNAs are precipitated twice first using isopropanol precipitation and then ethanol-sodium acetate precipitation. This pure high-quality RNA is used to prepare the RNA-seq library for deep-sequencing. The translome at the egg-to-embryo transition in sea urchin has been described recently (Chassé et al., 2018). The reader is referred to this publication for sequencing data treatment and results from polysome gradient analysis.

## 5 Luciferase reporter genes

General translation can be studied at the cellular level by following the production of an enzyme encoded by a reporter gene, which is introduced as an mRNA after *in vitro* transcription by microinjection into the egg. Luciferase is a popular choice as a reporter because enzyme is functional immediately upon translation and the detection assay is rapid, sensitive and quantitative. Firefly luciferase catalyzes the mono-oxygenation of the substrate luciferin with emission of light, detected with a luminometer. Until now, microinjection represents the only technical means to efficiently deliver an mRNA at a defined concentration into the sea urchin egg. The protocol given below allows the detection of translation activity after microinjection of luciferase reporter mRNAs into only five sea urchin eggs, in triplicates.

### 5.1 Preparation of the mRNA

We use the pT7TS-Fluc plasmid, which contains the firefly luciferase coding region flanked with the 5' and 3' untranslated regions of the *Xenopus*  $\beta$ -globin mRNA, under the T7 promoter (Costache et al., 2012). The plasmid containing the Firefly luciferase is first linearized with *Bam*HI, a restriction enzyme that cuts downstream of the 3'UTR and poly(A) signal, then synthetic mRNA is transcribed *in vitro* with bacteriophage T7 RNA polymerase (chapter 9 volume 150 and chapter 10 this volume), in the presence of 7'-methylguanosine, necessary for efficient *in vivo* translation. Finally, the mRNA produced is purified to remove unincorporated nucleotides, quantified and quality-checked on an agarose gel.

- Digest 20  $\mu$ g of highly pure plasmid with the appropriate enzyme to linearize. Check complete linearization of a 200 ng-aliquot by agarose gel electrophoresis.
- Purify the linearized DNA by phenol-chloroform (pH 8) extraction followed by ethanol precipitation in presence of 100  $\mu$ M sodium acetate. Centrifuge the pellet, wash with ice-cold 70% ethanol, dry the pellet for 10 min and resuspend in 40  $\mu$ L RNase-free water.
- Assemble the 20  $\mu$ L *in vitro* transcription reaction using the T7 mMACHINE kit (Ambion AM1344).

Linearized DNA template	6 $\mu$ L (1 $\mu$ g)
2 $\times$ NTP/CAP mixture	10 $\mu$ L
10 $\times$ reaction buffer	2 $\mu$ L
Enzyme mix	2 $\mu$ L

- Incubate 2 h at 37  $^{\circ}$ C. Add 1  $\mu$ L (2U) of TurboDNase, to remove DNA template, and incubate 15 min at 37  $^{\circ}$ C.
- Purify the RNA using the MegaClear kit (Ambion AM1908) according to the supplier.



- Quantify 2  $\mu\text{L}$  of the purified RNA on a NanoDrop, analyze the quality of a 300 ng aliquot on an agarose gel. The RNA should migrate as a sharp band.
- Keep the RNAs at  $-80^\circ\text{C}$  until use.
- Prepare the injection solution with 150 ng/ $\mu\text{L}$  RNA and 1 mM Alexa Fluor 488-dextran (Molecular Probes) in RNase-free water. Centrifuge the mix at  $13,000 \times g$  for 5 min before loading in the microinjection pipettes.

## 5.2 Experimental injection system

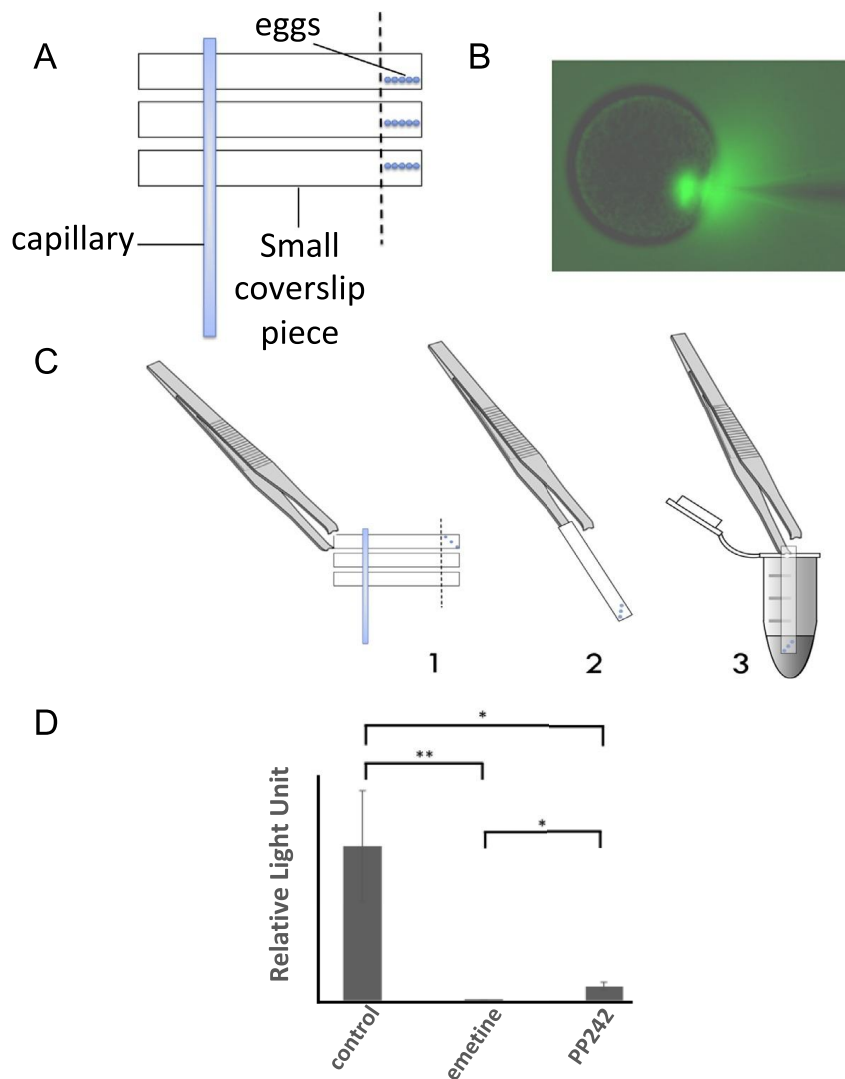
The main objective of this step is to be able to measure sufficient translational activity in intensity and reproducibility in a limited number of eggs. For this reason, we have developed a procedure that allows triplicate measurement of translational activity in batches containing five unfertilized eggs. Since we want to follow the translational activity in the first minutes after fertilization, the eggs are microinjected just before fertilization.

### 5.2.1 Glassware preparation for eggs alignment

In order to easily manipulate a small number of microinjected eggs to measure *in vivo* the translational activity, we have developed glassware assemblies that make it possible to perform experimental points in triplicates (Fig. 4A). Cover slides ( $24 \times 60\text{ mm}$ ) are soaked in a 1% protamine sulfate solution in distilled water for 1 min (the timing is critical). Following protamine coating, cover slides are washed thoroughly with distilled water and air-dried. Using a diamond glass pen cutter, the cover slides are carefully cut into  $2 \times 24\text{ mm}$  pieces. Then three coverslip pieces are fixed to a 40 mm long capillary with melted wax. Each coverslip piece needs to be fixed at eight-tenths of one of its end, since the outgoing end of the side attached to the capillary is important for easily handling the glass rectangle with forceps. Finally, the capillary is fixed in a 60 mm Falcon plastic petri dish with melted wax. A mark is made outside the plate using a pen at 5 mm from the end of each coverslip piece to delimit the zone where the eggs will be aligned. Glassware assemblies fixed in petri dishes can be kept several months at room temperature before use.

### 5.2.2 Preparation of eggs

Eggs are dejellied by swirling in 10 mL 3.5 mM citric acid/NFSW (pH 5) for 1 min (the timing is critical) in an agarose-coated petri dish (1% agarose in NFSW). The eggs are swirled and concentrated in the center of the petri dish and are transferred successively to two other agarose-coated petri dishes containing NFSW using a plastic Pasteur pipette. The eggs are allowed to settle again and transferred as above into a third agarose-coated petri dish (90 mm diameter). Dejellied eggs can be stored at  $16^\circ\text{C}$  for up to 3 h without fertilization problem, but in our lab, they are preferentially used in the hour following treatment.

**FIG. 4**

Measurement of *in vivo* translation activity using luciferase reporter gene. (A) Glassware assembly for injection of five eggs in triplicates for one experimental condition. (B) Microinjection of egg under fluorescent microscope and imaging of the fluorescent signal. (C) Using forceps, the coverslip piece is removed from the capillary (1 and 2) and the end of the rectangle where the eggs are aligned is immersed in ONE-Glo™ reagent (3). (D) After standardization with respect to the fluorescence signal, *in vivo* translation activity is expressed in relative light unit (RLU) per egg. Translation measured in fertilized embryos (control) is sensitive to emetine treatment and is strongly inhibited by the mTOR inhibitor PP242. Values are a mean of 11 replicates, errors bars represent SEM (Mann–Whitney *U* test, \**P*-value < 0.1, \*\**P*-value < 0.05).

### 5.2.3 Alignment and microinjection of the eggs

Before rowing the eggs, petri dishes (one dish by experimental condition required, maximum five different conditions) containing glassware assemblies are filled with 10 mL NFSW maintained at 16 °C. Using a pulled Pasteur pipet, 5–10 dejellied eggs are aligned on the dedicated surface of the protamine sulfate coated coverslip piece. As soon as they are aligned, the unfertilized eggs are microinjected. We use the FemtoJet injection system and we use the free-flow method. This procedure results in the injection of approximately 5% of the volume of each egg. The mRNA solution for injection is prepared as in step 5.1. Fertilization of the eggs is performed rapidly after microinjection procedure. When needed, drugs (emetine, PP242 or other) are added 5 min following fertilization. Fluorescent marker present in the microinjection solution allows standardization of the volume microinjected into the egg (Fig. 4B). For quantification of fluorescent signals, image acquisitions are performed 1 and 3 h after microinjection at low magnification (100×) to maximally capture fluorescent pixels. Eggs that show more than 15% decrease between the two times of the image acquisition of the fluorescent signal are considered to be lethally affected. The population of lethally affected eggs does not exceed 4%.

### 5.3 Detection of the luciferase translated in vivo

Four hours after fertilization, each coverslip piece is gently manipulated using fine forceps and the opposite end of the rectangle on which are aligned the eggs is immersed in 50 µL ONE-Glo™ reagent (Promega) in a 2.2 mL dolphin tube (Fig. 4C). After 1 min centrifugation at 13,000 × *g*, the 50 µL solution is transferred in a 96-well microplate and luminescence is measured in a TriStar luminometer (Berthold). The luminescence signal obtained from five microinjected eggs is standardized with respect to the fluorescence signal. Results are expressed in relative light unit (RLU) per egg.

As shown in Fig. 4D, using this experimental set-up we were able to detect the translation from the injected mRNAs following fertilization, that is strongly inhibited by the mTOR inhibitor PP242, reflecting the translation regulation occurring for general mRNAs. The influence of untranslated regions on the translation regulation of a particular mRNA can be now studied by replacing the β-globin untranslated region by the 5' and/or 3' UTR of the mRNA of interest.

---

## 6 Conclusion

The sea urchin embryo has been central to several major discoveries for the understanding of protein synthesis regulation (review in Ernst, 2011). Classic proven methodologies to analyze global and specific rates of protein synthesis remain widely used, and when they are coupled with deep-sequencing or mass spectrometry, they grant access to the full spectrum of actors involved in translational control. The development of new techniques devoted to the *in situ* analysis of translation will

open venues to the single-cell translation approaches. In the emerging picture of gene regulation, translational control appears as paramount process rather than an additional, fine-tuning layer, and the sea urchin model has all the required qualities to still play a major part to uncover new regulatory mechanisms in translation regulation.

---

## Acknowledgments

We are grateful to Philippe Pierre for the gift of reagents and advice for the initial experiments on puromycin labeling. We thank the Marine and Diving facilities and the Aquarium Services (EMBRC-France) for collecting and maintaining the sea urchins at the Roscoff Marine Station. The work from the authors' laboratory is funded by La Ligue contre le Cancer (Comité Finistère, Morbihan, Côte d'Armor, Deux-Sèvres, Charente); by the Brittany Regional Council; by the Finistère Departmental Council; by the CNRS and by Sorbonne University. H. Chassé was a PhD fellow supported by the Brittany Regional Council.

---

## References

- Alexandraki, D., & Ruderman, J. V. (1985). Expression of  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulin genes during development of sea urchin embryos. *Developmental Biology*, *109*(2), 436–451.
- Blobel, G., & Sabatini, D. (1971). Dissociation of mammalian polyribosomes into subunits by puromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *68*(2), 390–394.
- Chassé, H., Aubert, J., Boulben, S., Le Corguillé, G., Corre, E., Cormier, P., et al. (2018). Translatome analysis at the egg-to-embryo transition in sea urchin. *Nucleic Acids Research*, *46*(9), 4607–4621.
- Chassé, H., Boulben, S., Costache, V., Cormier, P., & Morales, J. (2017). Analysis of translation using polysome profiling. *Nucleic Acids Research*, *45*(3), e15.
- Chassé, H., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Glippa, V., Morales, J., & Cormier, P. (2016). Cyclin B translation depends on mTOR activity after fertilization in sea urchin embryos. *PLoS One*, *11*(3), e0150318.
- Cormier, P., Chassé, H., Cosson, B., Mulner-Lorillon, O., & Morales, J. (2016). Translational control in echinoderms: The calm before the storm. In G. Hernández & R. Jagus (Eds.), *Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation* (pp. 413–432): Springer International Publishing.
- Costache, V., Bilotto, S., Laguerre, L., Bellé, R., Cosson, B., Cormier, P., et al. (2012). Dephosphorylation of eIF2 $\alpha$  is essential for protein synthesis increase and cell cycle progression after sea urchin fertilization. *Developmental Biology*, *365*(1), 303–309.
- Dube, F. (1988). Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin embryos. *Journal of Cellular Physiology*, *137*(3), 545–552.
- Ernst, S. G. (2011). Offerings from an urchin. *Developmental Biology*, *358*(2), 285–294.
- Evans, T., Rosenthal, E. T., Youngblom, J., Distel, D., & Hunt, T. (1983). Cyclin: A protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell*, *33*(2), 389–396.

- Gross, P. R., & Cousineau, G. H. (1963). Effects of actinomycin D on macromolecule synthesis and early development in sea urchin eggs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *10*, 321–326.
- Hershey, J. W., & Merrick, W. C. (2000). Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In N. Sonenberg, J. W. Hershey, & M. B. Mathews (Eds.), *Translational control of gene expression* (pp. 33–88). Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Horner, V. L., & Wolfner, M. F. (2008). Transitioning from egg to embryo: Triggers and mechanisms of egg activation. *Developmental Dynamics*, *237*(3), 527–544.
- Jackson, R. J., Hellen, C. U., & Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *11*(2), 113–127.
- Kang, Q., & Pomerening, J. R. (2012). Punctuated cyclin synthesis drives early embryonic cell cycle oscillations. *Molecular Biology of the Cell*, *23*(2), 284–296.
- Kelso-Winemiller, L. C., & Winkler, W. M. (1991). “Unmasking” of stored maternal mRNAs and the activation of protein synthesis at fertilization in sea urchins. *Development*, *111*, 623–633.
- King, H. A., & Gerber, A. P. (2016). Translatome profiling: Methods for genome-scale analysis of mRNA translation. *Briefings in Functional Genomics*, *15*(1), 22–31.
- Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Cosson, B., Morin, E., Belle, R., Bradham, C. A., et al. (2006). Translational control genes in the sea urchin genome. *Developmental Biology*, *300*(1), 293–307.
- Oulhen, N., Swartz, S. Z., Laird, J., Mascaro, A., & Wessel, G. M. (2017). Transient translational quiescence in primordial germ cells. *Development*, *144*(7), 1201–1210.
- Salaun, P., Pyronnet, S., Morales, J., Mulner-Lorillon, O., Bellé, R., Sonenberg, N., et al. (2003). eIF4E/4E-BP dissociation and 4E-BP degradation in the first mitotic division of the sea urchin embryo. *Developmental Biology*, *255*(2), 428–439.
- Schmidt, E. K., Clavarino, G., Ceppi, M., & Pierre, P. (2009). SUNSET, a nonradioactive method to monitor protein synthesis. *Nature Methods*, *6*(4), 275–277.
- Sodergren, E., Weinstock, G. M., Davidson, E. H., Cameron, R. A., Gibbs, R. A., Angerer, R. C., et al. (2006). The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, *314*(5801), 941–952.
- Wagenaar, E. B. (1983). The timing of synthesis of proteins required for mitosis in the cell cycle of the sea urchin embryo. *Experimental Cell Research*, *144*(2), 393–403.
- Wells, D. E., Showman, R. M., Klein, W. H., & Raff, R. A. (1981). Delayed recruitment of maternal histone H3 mRNA in sea urchin embryos. *Nature*, *292*(5822), 477–478.

## **Discussion, perspectives et données préliminaires**

Cet article présente différentes techniques utilisées pour étudier la synthèse protéique dans les œufs et embryons d'oursin. À la fécondation, la synthèse protéique augmente fortement et est nécessaire pour la progression en mitose du premier cycle cellulaire. Ainsi, comme déjà discuté en introduction, la traduction de l'ARNm de cycline B est finement contrôlée en amont de l'entrée en mitose en réponse à la fécondation. Les voies mTOR et MAPK sont impliquées dans ce processus car leur inhibition altère l'accumulation de la cycline B. Les mécanismes moléculaires responsables du contrôle restent à déterminer. Cette partie du manuscrit porte sur l'étude des acteurs cycline B, DAP5 et RNR dont les ARNm sont néo-recrutés à la fécondation chez l'oursin (Chassé et al. 2018). Plus précisément, cette partie consiste à étudier l'influence des 5'UTR des ARNm de cycline B, DAP5, RNR et du 3'UTR de cycline B sur l'efficacité traductionnelle d'un ARNm rapporteur (Figure 22A).

Les UTR ont été insérés à la place des UTR de globine de xénope en amont ou en aval de l'ORF codant la Firefly luciférase au sein de la construction Glob-Fluc présentée dans l'article ci-dessus. L'ARNm XI<sub>G</sub>Glob-Fluc est produit à partir du plasmide pT7TS-Fluc offert au laboratoire par Vincent Legagneux et Luc Paillard, University of Rennes (Costache et al. 2012). Les ARNm Sg5'CycB, P15'DAP et P15'RNR sont produits à partir de pT7TS-Fluc modifié où le 5'UTR a été échangé par des enzymes de restriction. L'ARNm P13'CycB est produit également à partir de pT7TS-Fluc modifié et a été offert au laboratoire par Stefania Castagnetti (LBDV - Laboratoire de Biologie du Développement de Villefranche-sur-mer) que nous remercions. L'ARNm Rluc est produit depuis le plasmide pGb-Eg2-410D2-hxG-A65 offert au laboratoire par V. Legagneux, HB Osborne and L. Paillard (Legagneux et al. 1995; Oulhen et al. 2009).

L'étude des efficacités traductionnelles sous contrôle des voies mTOR et MAPK a cependant mise en évidence une difficulté supplémentaire. En effet, la région 5'UTR constante de l'ARN rapporteur Renilla s'est révélée également sensible aux différentes drogues inhibitrices de ces voies. Ceci a eu pour conséquence d'atténuer les différences potentielles portées par les 5'UTR d'intérêts. Nous n'avons donc pas pu conclure définitivement de leur sensibilité aux drogues ciblant mTOR et MAPK. Une construction ARNm bicistronique, possédant l'ORF de Renilla comme second cistron et sous contrôle d'un IRES aurait été idéale pour réduire, voire éviter l'impact du traitement sur la traduction de l'ORF standard. Cependant, malgré plusieurs essais à partir des IRES d'EMCV et CrPV, la traduction de la Renilla n'a pas pu être détectée dans de telles conditions *in vivo*.

Le rôle des voies mTOR et MAPK a d'abord été testé en amont de l'activité traductionnelle portée par le 5'UTR de l'ARNm cycline B. L'ARNm 5'CycB-Fluc et l'ARNm standard Rluc ont été co-injectés dans des œufs traités ou non au PP242 et U0126, inhibiteurs respectifs des voies mTOR et MAPK. La fécondation est alors effectuée et la mesure de luminescence est réalisée 4hpf (Figure 22B). Comparées à la condition contrôle, les inhibitions des voies de signalisation induisent une baisse significative du ratio 5'CycB-Fluc/Rluc. Cette baisse semble légèrement plus importante pour l'inhibition par PP242. Cependant comme les inhibiteurs impactent aussi la traduction de l'ARNm contrôle co-injecté, il est difficile de conclure sur la comparaison des conditions inhibitrices. Ces résultats démontrent cependant que la région 5'UTR de la cycline B est sensible aux voies mTOR et MAPK. Cela confirme les observations faites précédemment dans l'équipe, où l'accumulation de la cycline B, voire le recrutement de son ARNm au sein des polysomes, sont sensibles à ces voies de signalisations (Mulner-Lorillon et al. 2017; Chassé et al. 2016; 2018a). Les voies mTOR et MAPK induisent la phosphorylation et le contrôle de différents acteurs au sein de la machinerie de traduction. L'effet de ces acteurs dans le contrôle de la traduction spécifique de la cycline B reste cependant à déterminer. De plus, un potentiel rôle de la région 3'UTR de la cycline B doit être également testé.

Par la suite, l'impact de l'inhibition de la voie mTOR par PP242 a été testé et comparé sur la traduction d'ARNm reporteurs sous le contrôle de différents 5' ou 3'UTR. Sur la Figure 22C, sont montrés, les efficacités traductionnelles du 5'UTR de Globine de xénope, du 5'UTR et le 3'UTR de cycline B, ainsi que les 5'UTR de RNR et DAP5 d'oursin. En condition physiologique (CTL), les ratios révèlent des efficacités traductionnelles différentes selon les constructions ARNm. De manière intéressante, 3 niveaux d'efficacité traductionnelle peuvent être distingués. Un premier niveau avec la construction 5'Glob-Fluc qui présente une efficacité de traduction plus importante que l'ensemble des autres constructions. Un second niveau, avec les constructions possédant le 5'UTR de DAP5 ou de cycline B et le 3'UTR de cycline B, soutiennent une activité traductionnelle intermédiaire. Enfin, le 5'UTR de RNR semble permettre l'activité traductionnelle la moins efficace. Ces données suggèrent que ces UTR permettent de contrôler de manière différente ces ARNm en influant sur les efficacités de traduction.



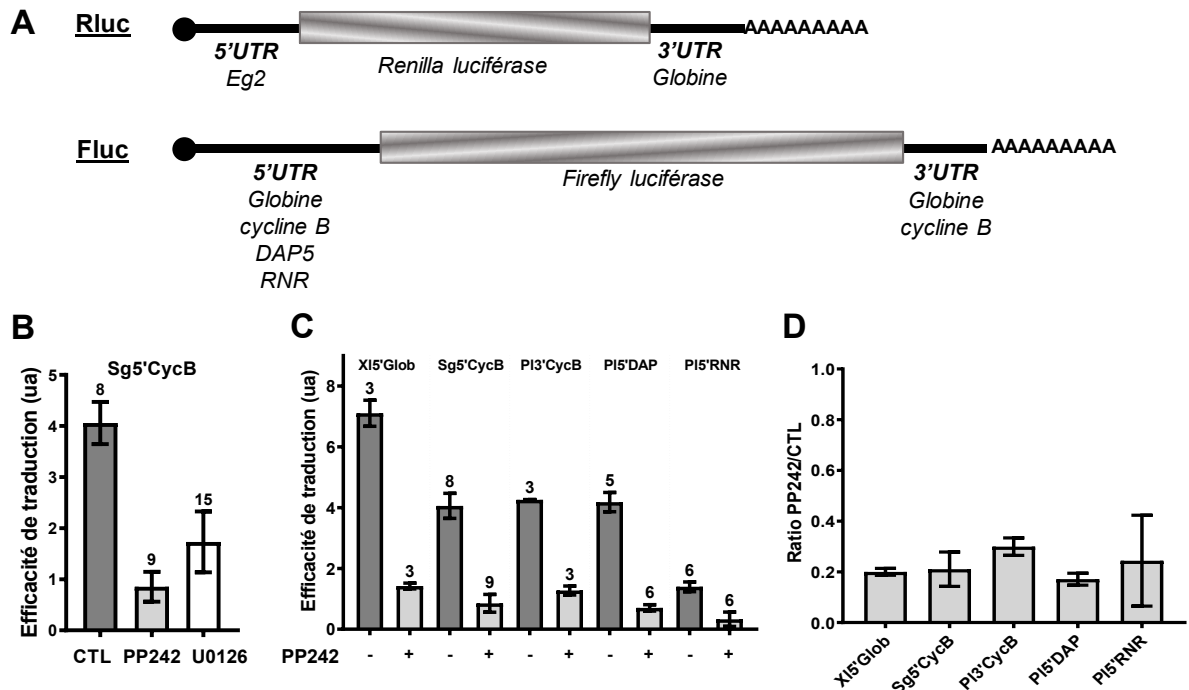


Figure 22 Mesure de l'efficacité traductionnelle in vivo de régions non codantes (UTR) d'ARNm

(A) L'efficacité traductionnelle d'UTR d'ARNm est mesurée à l'aide d'ARNm rapporteurs encodant la Firefly luciférase (Fluc) sous contrôle de ces UTR. L'activité traductionnelle in vivo est mesurée 4h après la fécondation de dix œufs injectés avec les ARNm rapporteurs (Article 3), en absence (CTL) ou présence des drogues PP242 (10 $\mu$ M final) ou U0126 (60 $\mu$ M final), respectivement inhibitrices des voies mTOR et MAPK. La luminescence des différents ARNm Fluc est rapportée à la luminescence d'un rapporteur contrôlé, co-injecté, codant la Renilla luciférase (Rluc) et est présentée en tant qu'activité traductionnelle (B, C) ou rapportée au signal de la condition PP242 (D). (B) L'activité traductionnelle du 5'UTR de cycline B (Sg5'CycB) est mesurée en présence ou non de PP242 et U0126. (C) Les activités traductionnelles des 5'UTR de Globine (XI5'Glob), cycline B (Sg5'CycB), DAP5 (PI5'DAP), ribonucléotide réductase sous-unité R2 (PI5'RNR) ou le 3'UTR de cycline B (PI3'CycB) sont mesurées en présence ou non de PP242. (D) L'inhibition de la traduction des rapporteurs Fluc en condition PP242 est calculée par le rapport entre les activités traductionnelles PP242 et CTL de (B). Les chiffres au-dessus de chaque histogramme représentent le nombre de réplicat de chaque condition.

Les différents UTR ont aussi été testés en présence de l'inhibiteur PP242. L'ensemble des constructions présente une efficacité traductionnelle diminuée en présence de PP242 (Figure 22C) et cette diminution est notamment équivalente (Figure 22D) avec 20 à 30% de traduction en PP242 par rapport à la traduction en condition CTL. Ce résultat implique alors que la traduction de l'ensemble de ces ARNm est sous contrôle de la voie mTOR. Cependant, par cette approche, aucune spécificité de réponse des différentes UTR n'est détectée. Ces régions UTR isolées de leur contexte natif semblent ne pas pouvoir expliquer à elles seules les différences de sensibilité du recrutement dans les polysomes des ARNm natifs lors du traitement au PP242 (Chassé et al. 2018). L'hypothèse de la coopérativité des 5' et 3'UTR d'un même ARNm d'origine sera notamment discuté lors de la discussion générale de ce manuscrit.

Mon objectif de mesurer l'activité traductionnelle *in vivo* et de manière exploitable en termes de statistiques étant atteint, j'ai ainsi pu m'engager dans l'étude fonctionnelle du seul acteur traductionnel de la famille des eIF4 dont l'ARNm est recruté dans les polysomes actifs en réponse à la fécondation. Dans le chapitre suivant, je décris mes derniers résultats, actuellement en cours de préparation pour publication.

## Chapitre 4 : La néo-traduction d'eIF4B contrôle la dynamique du clivage embryonnaire

La fécondation chez l'oursin engendre le recrutement d'ARNm au sein de la machinerie de traduction. Parmi ces ARNm, certains ARNm de facteurs de traduction sont recrutés (Chassé et al. 2018). Étonnamment, parmi les facteurs du complexe eIF4F, seul l'ARNm du facteur eIF4B est recruté dans les polysomes actifs en réponse à la fécondation.

Avant d'aborder nos données expérimentales sur le rôle de la traduction de l'ARNm codant pour eIF4B, j'ai choisi de vous faire, au sein de ce chapitre, une présentation détaillée de cet acteur traductionnel peu connu. En effet, le facteur d'initiation eIF4B est un des facteurs d'initiation le moins étudié. Il a été caractérisé durant les années 1970s en parallèle des autres facteurs. eIF4B a d'abord été identifié au sein d'une fraction de purification de lysat de réticulocyte de lapin nommé IF-M3 ou IE-E6 (Benne et al. 1977). Ce facteur a été caractérisé comme participant à la traduction d'ARNm exogène (Crystal and Anderson 1972) lors de l'initiation de la traduction en faisant partie du complexe pour relier l'ARNm et le ribosome chez le lapin (Benne and Hershey 1978) et la souris (Trachsel et al. 1977). eIF4B favorise ainsi la traduction d'ARNm *via* l'hélicase eIF4A du complexe eIF4F en stimulant son activité ATPase (Grifo et al. 1982; 1983; 1984) pour améliorer le dépliement de l'ARNm (Abramson et al. 1987). eIF4B, indépendamment de eIF4F cette fois, permettrait aussi le maintien de portion d'ARN déstructuré/déplié (Lawson et al. 1989). Ces fonctions permettraient alors, au niveau d'eIF4F et sur le 5'UTR, de créer une région libre d'accès pour le complexe 43S (Lindqvist et al. 2008) et empêcherait le scanne de la région 5'UTR en sens inverse (Spirin 2009). Les études portées sur eIF4B sont principalement réalisées en lysat de réticulocyte de lapin, en cellules humaines ou chez la levure. La fonction d'eIF4B de stimulation de la traduction *via* l'activité de eIF4A a été également identifiée chez la levure (Walker et al. 2013; Harms et al. 2014; Andreou and Klostermeier 2014; Andreou et al. 2017) malgré une protéine relativement différente. Lors de son clonage par deux laboratoires en parallèle, 26 et 36% d'identité ont été identifiés avec la séquence humaine (Altmann et al. 1993; Coppolecchia et al. 1993).

Chez les mammifères, trois domaines ont été identifiés lors du premier clonage d'eIF4B humain (Milburn et al. 1990). Le domaine RRM (RNA Recognition Motif), coté N terminal, participe à la fixation d'ARN et plus précisément l'ARNr 18S (Méthot et al. 1996a). C'est le seul domaine d'eIF4B actuellement cristallographié car le reste de la protéine est trop désordonné, même au sein du complexe 48S (Eliseev et al. 2018; Mishra et al. 2020). Cela pose

problème pour l'utilisation des avancées techniques récentes en intelligence artificiel d'AlphaFold qui nécessite d'apprendre de structures déjà résolues (Jumper et al. 2021). Un second domaine de fixation d'ARN, cette fois plus particulièrement pour les ARNm, est côté C terminal : l'ARM (Arginine Rich Motif) (Méthot et al. 1994). Et enfin, situé plus au centre de la protéine, le domaine DRYG, domaine riche en répétition de ces quatre acides aminés, permet une interaction au facteur eIF3 ainsi qu'une homodimérisation (Méthot et al. 1996b). En plus de ces domaines, un site de clivage par la caspase 3 est présent à l'Asp45 (selon la séquence humaine) (Bushell et al. 2001). La partie clivée N terminale contient une région de fixation au facteur PABP. À l'opposé, la région C terminale permet l'interaction avec eIF4A (Rozovsky et al. 2008). Le paralogue d'eIF4B nommé eIF4H possède également le RRM mais ne possède pas les autres domaines (Pelletier and Sonenberg 2019). Chez eIF4B de levure, le domaine RRM est conservé mais les domaines DRYG et ARM ne sont pas présents. Toute la partie C terminale est constituée d'un domaine de sept répétitions d'acides aminés (7RD). Le 7RD, malgré la différence avec la séquence mammifère, participe toujours à la stimulation de la traduction *via* une interaction avec eIF4A, et la stimulation de son activité ATPase et de dénouement d'ARNm (Andreou et al. 2017).

Comme indiqué en introduction du manuscrit, le facteur eIF4B est la cible de phosphorylations. Cela a été révélé par incorporation de P32 en lysat de réticulocyte de lapin dès 1978 (Benne et al. 1978). Plusieurs sites de phosphorylation ont été identifiés chez les eIF4B de mammifères et nommés ici selon la séquence humaine. La S6K de la voie mTOR, phosphoryle la S422 participant à la stimulation de la traduction (Raught et al. 2004; van Gorp et al. 2009; Musnier et al. 2012) par une augmentation de l'interaction avec eIF3 (Holz et al. 2005; Cen et al. 2014). La RSK de la voie MAPK phosphoryle également la S422 (Shahbazian et al. 2006; van Gorp et al. 2009). Dernièrement, cette phosphorylation a été identifiée comme favorisée par un site de fixation d'eIF4B à une sumoylation de RSK (Zhenshan Liu et al. 2021). Les kinases Pim et MELK sont également identifiées comme phosphorylant la S406 (Peng et al. 2007; Wang et al. 2016). Enfin, une dernière phosphorylation en S504, par les Casein Kinases 1 et 2, est montrée comme favorisant la plasticité synaptique dans un modèle d'épilepsie chez le rat (Bettegazzi et al. 2017). De nombreux autres sites de phosphorylation ont également été identifiés par spectrométrie de masse (<https://www.phosphosite.org/>).

Le facteur eIF4B est proposé d'interagir avec eIF4A pour stimuler la traduction d'ARNm possédant des structures stables dans les 5'UTR des ARNm (Rozen et al. 1990; Rogers et al. 1999; Rogers et al. 2001). En effet, les ARNm ayant des 5'UTR structurés,

nécessitent eIF4A et eIF4B pour permettre la liaison optimale de la petite sous-unité ribosomale à l'initiation de la traduction (Svitkin et al. 2001; Pestova and Kolupaeva 2002). Dans les cellules humaines, un traitement d'ARNi anti-eIF4B induit la baisse de traduction d'ARNm à 5'UTR structuré et notamment ceux de facteurs de prolifération ou de survie cellulaire (Shahbazian et al. 2010). La phosphorylation d'eIF4B par la S6K favorise également la traduction de ces ARNm (Csibi et al. 2014). Chez la levure, eIF4B semble avoir un contrôle spécifique et différent d'eIF4A. En effet, les mutations d'eIF4A ou d'eIF4B affectent la traduction de populations différentes d'ARNm qui possèdent néanmoins des structures stables dans leur 5'UTR (Sen et al. 2016).

De nombreux ARNm codant pour des acteurs du cycle cellulaire (c-myc, ODC etc..) présentent des structures stables dans la région 5'UTR. eIF4B est donc potentiellement un lien entre contrôle traductionnel et contrôle du cycle cellulaire en participant à la traduction de ces acteurs. Des surexpressions et suractivations (par phosphorylation) d'eIF4B sont notamment impliquées dans des pathologies, particulièrement dans plusieurs types de cancers. eIF4B est sur-exprimé dans des cas de leucémie, cancer de l'estomac, NSCLC (non-small cell lung cancer), DLBCL (diffuse large B-cell lymphoma) et cancer du sein. La suractivation par surphosphorylation est également détectée dans des cas de cancers de la bouche, de la prostate, hépatique, des poumons ou de leucémies. La double inhibition des deux phosphorylations S406 et S422 par mutation en sites non-phosphorylables permet de réduire le développement de greffes tumorales chez le rat (Chen et al. 2016). De plus, la surexpression en cellules humaines révèle aussi des effets délétères avec une inhibition générale de la traduction dans les cas de surexpression à des doses non physiologiques telles que 50 ou 25 fois la quantité d'eIF4B (respectivement (Milburn et al. 1990; Naranda et al. 1994)).

Dans l'article en préparation ci-dessous, chez l'oursin *Paracentrotus lividus*, nous montrons que la néo-traduction d'eIF4B est nécessaire à la bonne dynamique du cycle cellulaire, ce qui est en accord avec le lien entre traduction et cycle que la littérature propose. Les différents domaines et sites de phosphorylation de la protéine eIF4B sont conservés chez les échinodermes. Nous montrons également que son interaction au sein du complexe d'initiation eIF4F semble maintenue. L'introduction d'un morpholino dirigé spécifiquement contre eIF4B altère l'activité traductionnelle *in vivo* et ralentit la dynamique des clivages mitotiques induits par la fécondation. Nous avons contrôlé la spécificité de l'inhibition de la néo-traduction sur le cycle à l'aide de sauvetage phénotypique et de morpholino présentant des mésappariements. À l'inverse, nous montrons que la surexpression d'eIF4B *in vivo* permet

d'accélérer le cycle cellulaire. Enfin, la capacité d'eIF4B à stimuler la traduction est également étudiée *in vitro* et *in vivo*. Aussi, ces résultats sont confirmés chez deux oursins éloignés évolutivement d'au moins 30 millions d'années (Kroh and Smith 2010; Láruson 2017), démontrant dans la lignée évolutive des échinidés, la conservation de la fonction la plus précoce d'eIF4B en réponse à la fécondation.

Article 4 :

*The translation of eIF4B mRNA  
drives cell cleavage dynamics in sea  
urchin embryos*

Florian Pontheaux, Fernando Roch,  
Sandrine Boulben, Agnès Boutet,  
Julia Morales, Patrick Cormier

*En préparation*





## ***eIF4B* mRNA translation drives the dynamics of the first mitotic divisions triggered by fertilization in sea urchin embryos.**

Florian Pontheaux<sup>1,2</sup>, Fernando Roch<sup>1,2</sup>, Sandrine Boulben<sup>1,2</sup>, Agnès Boutet<sup>1,2</sup>, Julia Morales<sup>1,2</sup>, Patrick Cormier<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Sorbonne Université, Integrative Biology of Marine Models (LBI2M), Station Biologique de Roscoff, CS 90074, 29680 Roscoff Cedex, France

<sup>2</sup> Sorbonne Université, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Integrative Biology of Marine Models (LBI2M), Station Biologique de Roscoff, CS 90074, 29680 Roscoff Cedex, France

\*Corresponding author: e-mail : [cormier@sb-roscoff.fr](mailto:cormier@sb-roscoff.fr), telephone: +33298292366

### **INTRODUCTION**

The early cleavages of the sea urchin embryo represent a convenient experimental model to dissect the molecular machinery regulating mRNA translation and to analyze its specific contribution to cell cycle progression (Cormier et al. 2016; Pontheaux et al. 2021). The sea urchin egg, an isolated haploid cell, has completed meiosis and is physiologically blocked in a G1-like stage of the cell cycle. In these organisms, resumption of mitotic division relies on a drastic increase in protein synthesis that is triggered by fertilization. As the three subsequent mitotic divisions are independent of mRNA transcription and ribosome biogenesis (Gross and Cousineau 1963), the eggs of these echinoderms allow detailed characterization of a translation regulation network (TIRN) that is tightly intertwined with cell division (Chassé et al. 2018). These properties have seduced several investigators, and a global picture of the molecular mechanisms controlling translation during the early development of the sea urchin is slowly emerging.

Upon fertilization, robust activation of cap-dependent translation is primarily due to the release of the eukaryotic Initiation Factor 4E (eIF4E) from its specific repressor, the 4E-Binding Protein (4E-BP) (Salaün et al. 2005). eIF4E is a conserved mRNA-cap-binding protein, is then free to interact with eIF4G, a large scaffolding protein that binds as well to eIF3 and eIF4A. Whereas eIF3 is a ribosome-associated translation initiation factor, eIF4A is an RNA-dependent ATPase and RNA helicase that facilitates the scanning of mRNA 5' UnTranslated Region (UTR) by unwinding its secondary structure (Pelletier and Sonenberg 2019). Together, eIF4E, eIF4G, and eIF4A form a complex known as eIF4F, which acts as a molecular intermediary in recruiting ribosomes to capped mRNAs. In eukaryotes, two additional translation factors –eIF4B and its ancient paralog, the eIF4H

protein– stimulate eIF4A and eIF4F activity by promoting the coupling of ATP hydrolysis to RNA unwinding (Pelletier and Sonenberg 2019).

In the sea urchin, inhibiting mTOR during fertilization negatively impacts 4E-BP degradation and provokes the stabilization of a 4E-BP/eIF4E inactive complex, resulting in a low rate of protein synthesis (Salaün et al. 2003). In these conditions, the eIF4E-eIF4G interaction is abolished and the first mitotic division is adjourned (Oulhen et al. 2007). As *cyclin B* mRNA is not efficiently translated, Cyclin B protein fails to accumulate and the activity of the Cyclin B/CDK1 complex is extremely reduced (Chassé et al. 2016). However, Cyclin B is not the only relevant target of translational regulation in this biological context. By polysome profiling coupled to high-throughput sequencing, we have shown that fertilization triggers in the sea urchin *Paracentrotus lividus* the polysomal recruitment of a large set of maternal mRNAs (Chassé et al. 2018). Interestingly, this set of transcripts includes mRNA coding for eIF4B, but not for other eIF4 factors (Chassé, Boulben, Cormier, et al. 2019). eIF4B *de novo* translation may thus play a specific role during *P. lividus* early development.

There is abundant evidence indicating that eIF4B interacts physically with the translation initiation machinery. Indeed, the mammalian eIF4B homologs display four functional domains that bind to some of its core components. These motifs include a conserved RNA recognition motif (RRM) which is known to interact with the 18S rRNA. In addition, this protein harbors a second RNA binding domain called ARM (arginine rich motif), an N-terminal poly(A)-binding protein (PABP) domain and a DRYG (aspartic acid, arginine, tyrosine, and glycine) region that mediates homodimerization and interaction with eIF3. Compared to other eIF4 factors, the sequence of eIF4B is less conserved across species and it seems that this protein is not absolutely required for ribosome recruitment, suggesting that eIF4B might be part of regulatory module contributing to enhance translational efficiency in specific contexts (Metz et al. 1999; Hernández et al. 2004; Shahbazian et al. 2010; Andreou, Harms, and Klostermeier 2017). Besides, it has been proposed that eIF4B and eIF4H can exert similar overlapping functions, although eIF4H presents only an RRM motif and lacks the other eIF4B typical domains (Rozovsky, Butterworth, and Moore 2008).

To investigate the specific role of *eIF4B* mRNA polysomal recruitment at fertilization, we generated morpholino oligonucleotides (MO) to impair *eIF4B* mRNA *de novo* translation in *P. lividus* fertilized eggs. We observed that injection of a MO directed against *eIF4B* results in a down-regulation of protein synthesis and provokes a significant delay of the two first mitotic divisions. Conversely, overexpression of *eIF4B* stimulates translational activity and accelerates the onset of the two first mitotic divisions. Moreover, experimental manipulating of the eIF4B levels elicits identical

phenotypes in *Sphaerechinus granularis*, a second sea urchin species separated by at least 30 million years of evolution from *P. lividus* (Kroh and Smith 2010; Láruson 2017). Our results indicate that during early development *eIF4B* mRNA *de novo* translation participates in a conserved positive feedback loop that further reinforces translation and contributes to set the pace of cleavage dynamics.

## RESULTS

### Sea urchin eIF4B stimulates mRNA translation rates *in vitro* and *in vivo*

A search for eIF4B homologs in available genome and transcriptome databases reveals that echinoderms have a single eIF4B gene. All the sea urchin homologs present the four distinctive domains that are known to be important for eIF4B function (Fig. 1A) (Pelletier and Sonenberg 2019). Among these, the RRM 18S rRNA binding motif is particularly well conserved, and we could align the RRM sequences of different eIF4B homologs to carry out a phylogenetic analysis (Fig. 1B). These studies show that the vertebrate and echinoderm eIF4B sequences cluster together in a single clade, which presumably separated early in evolution from other RRM containing proteins, such as eIF4H (Fig. 1B). In addition, close comparison of *P. lividus*, *S. granularis* and human sequences reveals that the vertebrate and echinoderm eIF4B homologs share many distinct features (Fig. 1A). Although the DRYG region of the sea urchin eIF4B proteins is larger, the main phosphorylation sites of human eIF4B (Ser<sup>406</sup>, Ser<sup>422</sup>, and Ser<sup>442</sup>) appear well conserved in the echinoderm homologs (Fig. 1A and S1). Thus, sea urchins could be an informative system to study in detail the biological function of eIF4B. Our attempts to produce a polyclonal antibody against the sea urchin eIF4B proteins were unsuccessful, and no commercial antibodies against mammalian eIF4B cross-reacted in our hands with their echinoderm homologs. Still, we have managed to show that sea urchin eIF4B is capable of associating *in vitro* with an eIF4F complex. For this, a *P. lividus* eIF4B protein with the expected size (77,4 kDa) was produced in rabbit reticulocyte lysates. The corresponding lysate was then loaded into a column of m<sup>7</sup>GTP-sepharose beads, which retains eIF4E and its associated proteins (Fig. 1C). Whereas eIF4E was effectively purified in all the conditions tested, the beads retained a 77 kDa protein only when the eIF4B lysate was loaded into the column, and not in control experiments (Fig. 1C). Thus, sea urchin eIF4B can associate *in vitro* with a molecular complex containing heterologous eIF4E.

Next, we wondered whether sea urchin eIF4B could stimulate mRNA translation rates in an *in vitro* heterologous system (Fig. 2A). Translation activity kinetics was monitored in reticulocyte lysates using as a reporter the *Firefly luciferase* mRNA. In these assays, addition of an mRNA coding for sea urchin eIF4B (12.5 ng/μl final concentration) results in a two-fold increase in luciferase

translation rates with respect to controls. Moreover, we also observed this increase *in vivo* after co-injecting *eIF4B* and *Firefly luciferase* mRNAs into *P. lividus* unfertilized eggs. Indeed, the addition of *eIF4B* mRNA greatly enhanced reporter activity, as judged by the luminescent signals obtained at 60 and 120-min post-fertilization (Fig. 2B). Taken together, these results indicate that eIF4B could contribute to protein synthesis stimulation upon sea urchin egg fertilization.

### **eIF4B *de novo* translation drives the dynamics of the first two mitotic cell divisions in sea urchin embryos**

We sought to establish whether *eIF4B* mRNA *de novo* translation plays a functional role during sea urchin early embryonic development. We thus designed an antisense morpholino (MO) overlapping with the translation start codon of the *P. lividus* endogenous transcript, to block specifically the translation of *eIF4B* (Mo-PleIF4B). Then, we injected this MO into unfertilized eggs and monitored the dose-dependent effect of eIF4B knockdown on cell cleavage dynamics (Fig. S2). At an intracellular concentration as low as 3.3 nM, Mo-PleIF4B induced a clear delay in the onset of the first two embryonic cleavages, which was estimated at 8 minutes and 12 minutes, respectively. In addition, we confirmed that in these conditions Mo-PleIF4B provokes a significant decrease in the translation rate, as indicated by the observed activity of a co-injected *Firefly luciferase* mRNA reporter (Fig. S3). We decided thus to use the same MO concentration for subsequent experiments. As expected, a morpholino containing five mismatches with *PleIF4B* mRNA (MisMo-eIF4B) did not induce any discernable effect on the dynamics of the first two cleavages, confirming the specificity of the Mo-PleIF4B-phenotypes (Fig. 3). Moreover, the Mo-induced cleavage delay phenotype was efficiently rescued by co-injection of an mRNA insensitive to Mo-PleIF4B and coding for eIF4B (RNA-eIF4B). Taken together, these data show that eIF4B knockdown affects translational rates *in vivo* and delays the two first cleavages of *P. lividus* embryos.

In parallel, we examined whether *eIF4B* mRNA (RNA-eIF4B) overexpression could elicit the opposite effect. For this, we injected *eIF4B* mRNA into unfertilized eggs and monitored the dose-dependent effect of this manipulation on their two first cleavages following fertilization (Fig. 4). Our results show that, at an intracellular concentration of 0.6 or 1.25 ng/ $\mu$ l, injection of PI-eIF4B mRNA significantly accelerates the rhythm of the two first mitotic cleavages with respect to controls (Fig. 4). In contrast, injection of higher amounts of *eIF4B* mRNA results in division rates comparable to those observed in control embryos, suggesting that only optimal levels of eIF4B are capable of accelerating development (Fig. 4).

Finally, we decided to determine if eIF4B *de novo* translation exerts an equivalent function in other sea urchins. For this, we carried out a similar set of experiments in *S. granularis*, a species belonging to a lineage that diverged from *P. lividus* more than 30 million years ago (Kroh and Smith 2010; Láruson 2017). As in *P. lividus* eggs, Sg-eIF4B mRNA is also recruited into active polysomes following fertilization (Fig. S4). Injecting a specific morpholino, we observed that at a 3.3 nM intracellular concentration Mo-SgeIF4B consistently delays the two first embryonic mitotic divisions. Conversely, injection of 1.0 ng/ $\mu$ l of *eIF4B* mRNA significantly accelerates cleavage onset in *S. granularis* (Fig. 5). Therefore, our results suggest that *eIF4B* mRNA *de novo* translation could be part of a conserved mechanism that enhances translational efficiency and contributes to accelerate mitotic division dynamics of the embryos following fertilization.

## DISCUSSION

During the early development of many different species, cell cycle has been drastically compressed in order to accelerate cell divisions, permitting the rapid eclosion of a fully formed embryo. As a consequence, the egg's molecular machinery of some animals has acquired during evolution a series of adaptive features that have contributed decisively to abridge this phase of development. In the sea urchin embryos, where early development relies on the implementation of a translational regulatory network (TIRN), it seems that one of these features is the *de novo* translation eIF4B mRNA. Our results show indeed that this initiation factor could play a significant role in adjusting global translation rates and that its timely synthesis contributes to accelerate cell division.

By analyzing the *P. lividus* transcriptome, we had previously shown that *eIF4B* mRNA is actively recruited into polysomes during the first hour following fertilization (Chassé et al. 2018). Moreover, *eIF4B* mRNA expression levels do not vary during this period of time (Chassé et al. 2018). Although it is possible that a significant amount of maternally inherited eIF4B protein might be already present in the egg, our results show that eIF4B availability is a limiting factor for entry in mitosis. Therefore, the translational activation of *eIF4B* mRNA contributes to boost its general levels, setting in motion a positive regulatory loop that further enhances the translation of other molecular players.

At a mechanistic level, it is known that eIF4B mRNA *de novo* translation is impaired in presence of mTOR inhibitors, suggesting that mTOR activity is required for *eIF4B* mRNA recruitment into the translational machinery following fertilization (Chassé et al. 2018; Chassé, Boulben, Cormier, et al. 2019). Interestingly, eIF4B belongs to a subset of mRNAs that are specifically regulated by the mTOR complex 1 (mTORC1) in mouse embryonic fibroblast, where Torin1 suppresses the translation

of eIF4B but not of other components of the eIF4F complex (Thoreen et al. 2012). In mammals, LARP1 (La-related protein 1), an RNA binding protein and mTORC1 effector, was shown to regulate *eIF4B* mRNA *de novo* translation (Philippe et al. 2020). It would thus be interesting to examine whether a LARP1 homolog contributes to eIF4B mRNA translation in the sea urchin and if the activity of this protein has an impact on mitotic division dynamics.

In this report we also show that *eIF4B* is recruited into polysomes in *S. granularis* fertilized eggs, indicating that translation of *eIF4B* mRNA could be a recurrent feature of sea urchin embryos. Impairing the translation of *eIF4B* mRNA with specific morpholinos in two different species, we have shown that the two first mitotic divisions are systematically delayed, suggesting that *eIF4B* mRNA translation plays a conserved role in controlling cell division rates. This is coherent with previous work showing that *eIF4B* silencing negatively impacts proliferation in yeast, insect and mammalian cells (Coppolecchia et al. 1993; Altmann et al. 1993; Hernández et al. 2004; Shahbazian et al. 2010). Unfortunately, we do not know which specific phase of the cell cycle is delayed in the sea urchin embryo, but in these animals, fertilization-induced DNA duplication is independent of *de novo* translation (Wagenaar 1983). It is thus possible that *eIF4B de novo* translation could impact preferentially mitosis entry.

Overexpression of *eIF4B* mRNA positively correlates with a significant acceleration of the sea urchin embryonic divisions, but only if the levels of eIF4B do not exceed a certain threshold. In fact, we have observed that this acceleration is not evident when the levels of eIF4B are very high. This could be due to a concomitant destabilizing activity that eIF4B may exert upon the molecular complexes that coordinate translation, which play an essential role during cell cycle progression (Shahbazian et al. 2010). Indeed, overexpression of eIF4B can provoke disparate effects in mammalian cells, with some studies observing increased translation rates (Holz et al. 2005; van Gorp et al. 2009) and others reporting an inhibitory effect (Milburn et al. 1990; Naranda et al. 1994). Still, the results of our loss-of-function study clearly indicate that *eIF4B* mRNA *de novo* translation plays a positive role during mitosis. Besides, this is coherent with previous results showing that eIF4B is required in mammals for efficient translation of several mRNAs involved in cell proliferation, such as those coding for Cdc25C, c-Myc, and the ornithine decarboxylase (Shahbazian et al. 2010). In the sea urchin, a large number of cell cycle regulators are also translationally activated upon egg fertilization, including Cyclin B and CDK1 (Evans et al. 1983; Chassé et al. 2016; 2018). It would be thus interesting to monitor if the translation efficiency of these transcripts is impacted by changes in the cellular levels of eIF4B. The identification of eIF4B downstream targets is also an essential

prerequisite to determine whether this factor behaves as a global translational activator or operates in a more selective way in this specific developmental context.

Our observations are entirely consistent with the ability of this protein to enhance mRNA ribosome recruitment in eukaryotic cells (Benne and Hershey 1978). In mammalian systems, eIF4B stimulates RNA-dependent eIF4A ATPase activity, ATP-dependent eIF4A RNA binding, and the helicase activity of eIF4A (Richter-Cook et al. 1998; Rogers et al. 2001; Parsyan et al. 2011). However, there is an additional regulation level that might also be relevant to interpret the activity of eIF4B in the context of early development. In fact, it is known that phosphorylation of mammalian eIF4B on its S422 enhances its affinity for eIF3, and the expression of eIF4B phosphomimetic mutants results in increased translation rates (Shahbazian et al. 2006; van Gorp et al. 2009). We have shown that the sea urchin eIF4B homologs display several conserved putative phosphorylation sites, and the global activity of eIF4B may also respond to post-translational modifications altering its phosphorylation status.

In any case, our work provides new insights into the structure of the translational regulatory networks that orchestrate early embryonic development. Since eIF4B itself controls the translational activity of other mRNAs, this factor constitutes a noticeable example of a translational positive-feedback loop participating in the implementation of a tightly scheduled early developmental program.

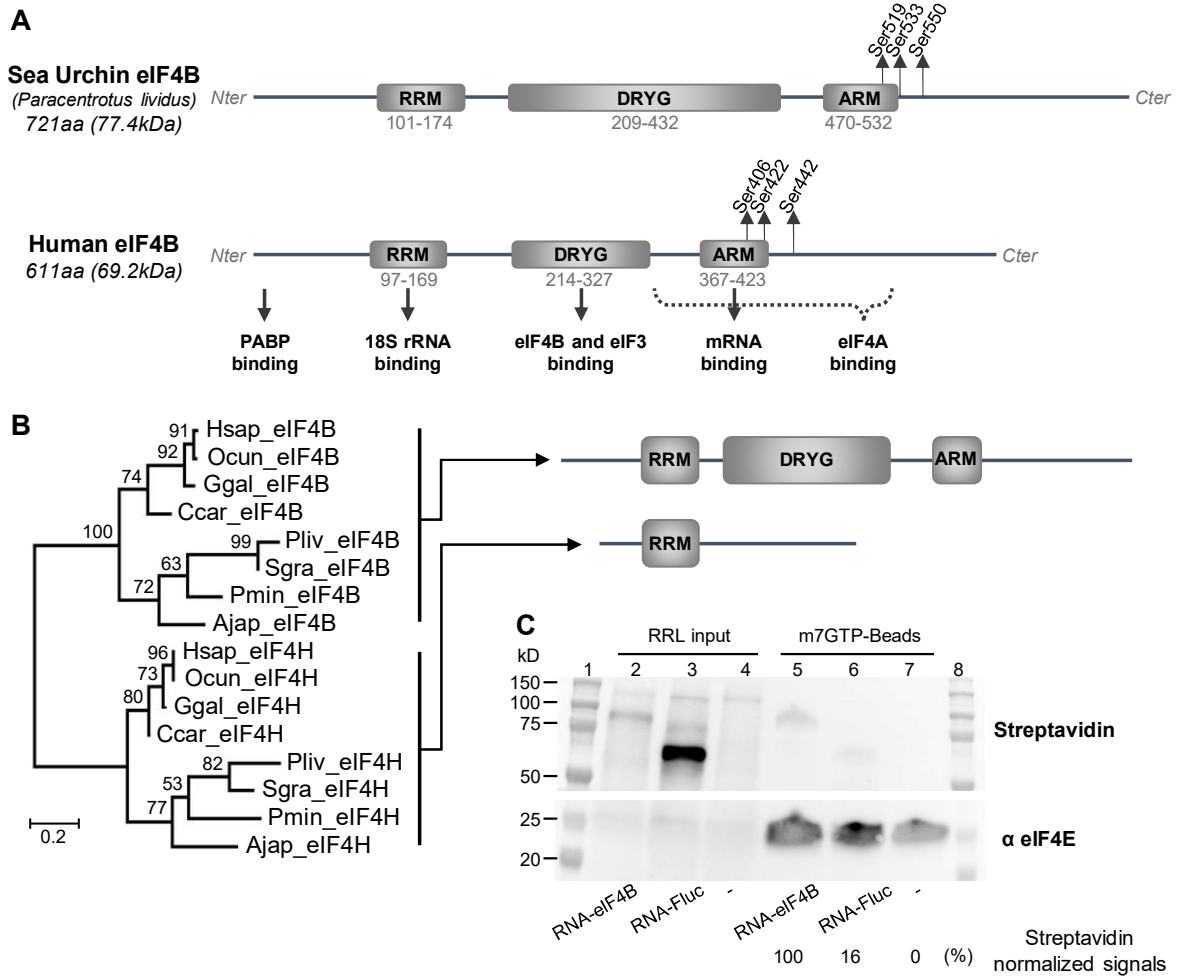


## FIGURES

### Fig 1 Conserved features of sea urchin eIF4B.

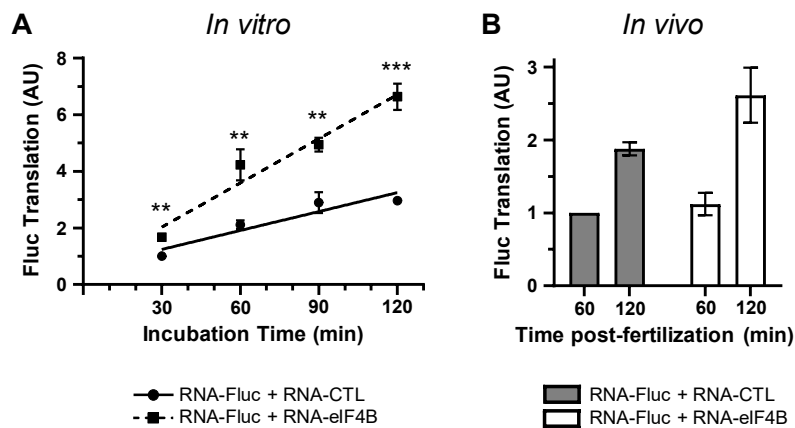
(A) eIF4B domains and phosphorylation sites are conserved between *Homo sapiens* and *Paracentrotus lividus* orthologues. Amino acids positions of domains and phosphorylation sites are indicated. Domain interactions known for human factors are indicated. (RRM = RNA recognition motif; DRYG = Aspartic acid, arginine, tyrosine and glycine rich domain; ARM = Arginine-rich motif). (B) Evolutionary analysis by Maximum Likelihood method of RRM domains from eIF4B and its paralog eIF4H in Vertebrates and Echinoderms. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analyse is detailed in the material and methods section. (C) Purification of *in vitro* expressed sea urchin eIF4B on m<sup>7</sup>GTP-sepharose beads. Sea urchin eIF4B mRNA (RNA-eIF4B), control mRNA (RNA-Fluc) or no mRNA (-) are translated in rabbit reticulocyte lysate with biotinylated-lysine-tRNA (RRL input, lanes 2-4). Then, eIF4E and associated proteins are purified on m<sup>7</sup>GTP-sepharose beads (m<sup>7</sup>GTP beads, lanes 5-7). Neo-translated proteins are detected by streptavidin-HRP detection. eIF4E purification is revealed by a specific antibody. Quantification of the signals is done by ImageJ/Fiji software. Streptavidin signal in beads is normalized by eIF4E purified signal and is shown under corresponding lanes.

**Fig 1**



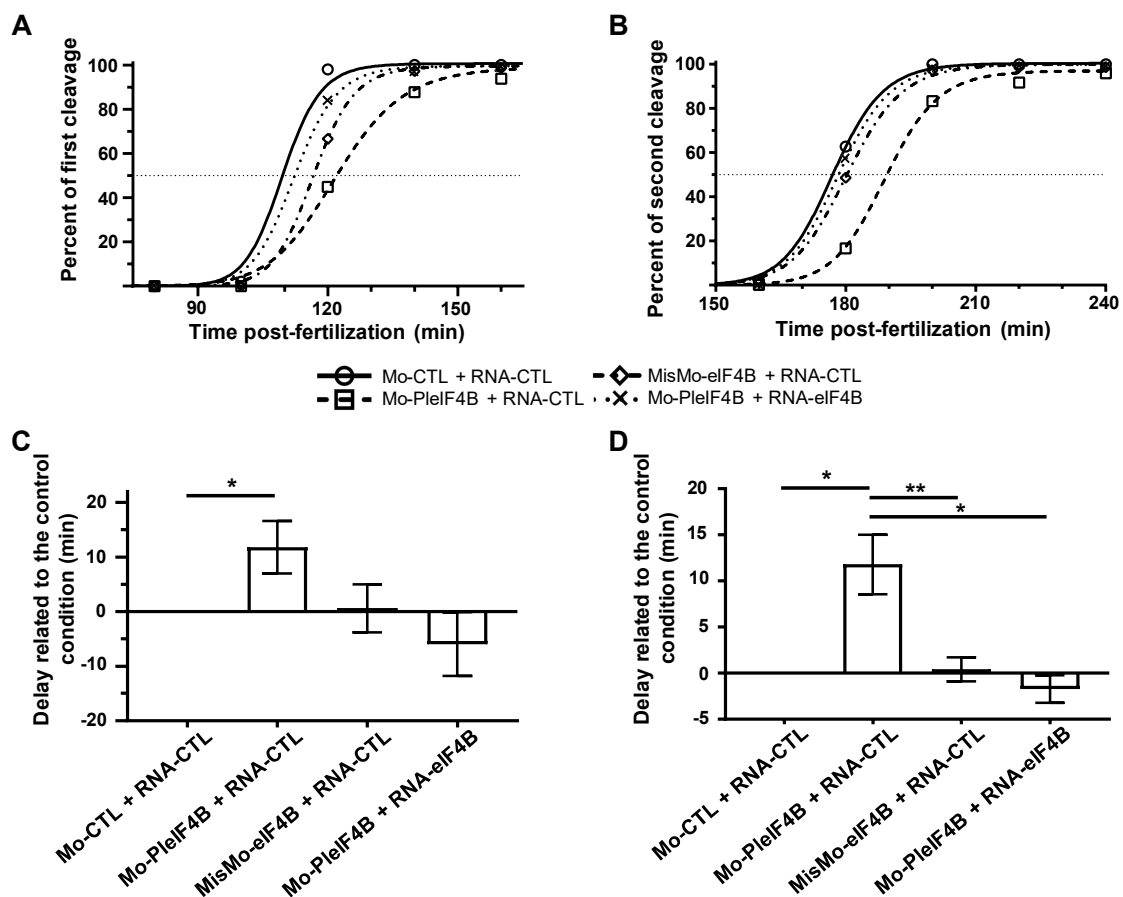
**Fig. 2 eIF4B affects *in vitro* and *in vivo* translation efficiency of a reporter mRNA.**

(A) The translation of a reporter mRNA encoding the Firefly luciferase is measured in rabbit reticulocyte lysate in presence of an mRNA encoding eIF4B (RNA-eIF4B) or a control ORF (RNA-CTL) (12.5 ng/ $\mu$ L of each mRNA). (B) The translation of a reporter luciferase is measured *in vivo* after overexpression of eIF4B in *P. lividus* eggs. Firefly luciferase luminescence are normalized to the control mRNA condition at 30mpf (A) and 60mpf (B). Four replicates of the *in vitro* experiment (A) are done with duplicate reactions. Two replicates of the *in vivo* experiment (B) are done with triplicates of thirty microinjected eggs for each condition. Microinjected solution is prepared with 1.0 ng/ $\mu$ L intracellular concentration of each mRNA. Error bars represent SEM. (Multiple-t-test: \*\*p-value<0.01; \*\*\*p-value<0.001).



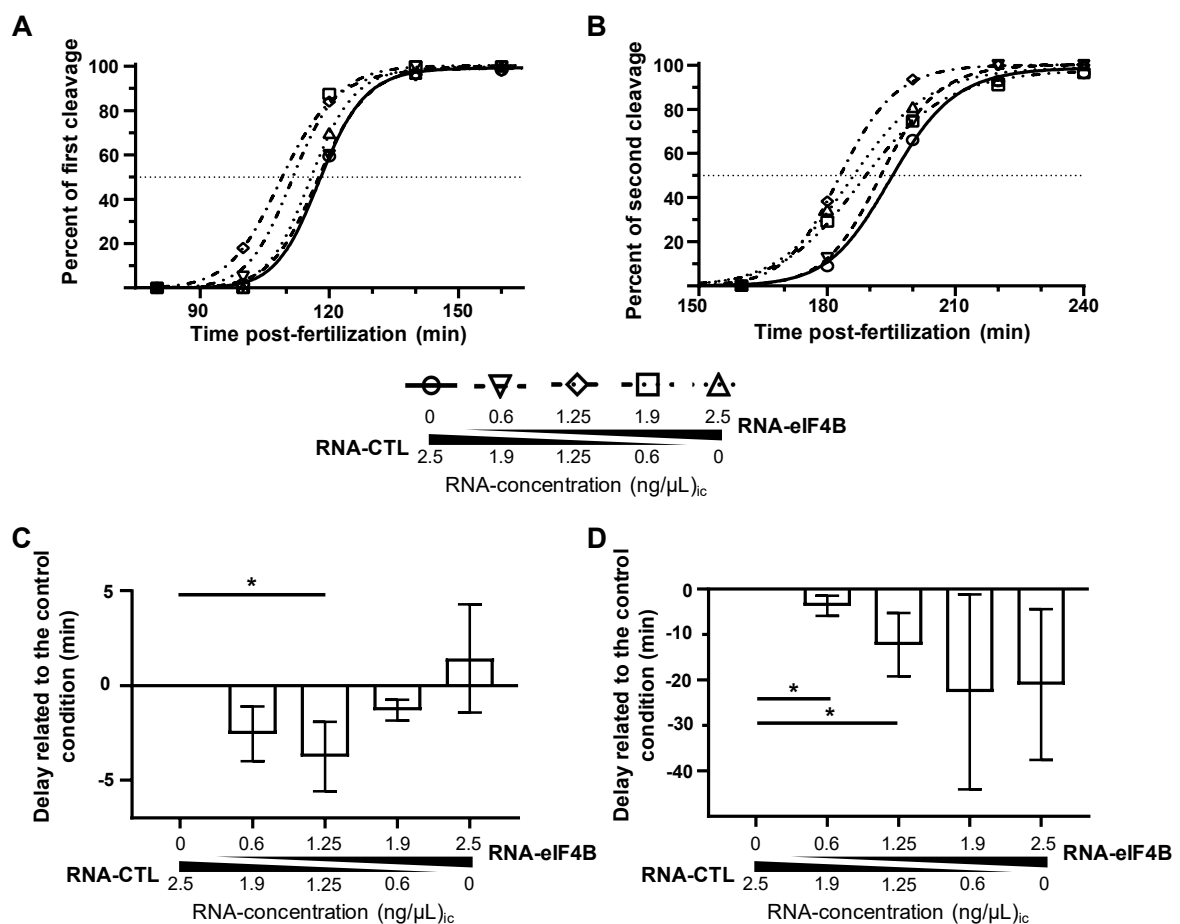
**Fig. 3 Neo-translation of eIF4B following fertilization is necessary for correct dynamic of cell divisions in *P. lividus*.**

First (A) and second (B) cell division are delayed by microinjection of a morpholino directed against sea urchin eIF4B mRNA (Mo-PleIF4B). The specificity of the Mo effect is controlled by injection of an unrelated morpholino (Mo-CTL) and by a mismatched morpholino (MisMo-eIF4B). The delay induced by the Mo knockdown is rescued by the co-injection of an mRNA encoding eIF4B (RNA-eIF4B). Representative cell division kinetic of injected embryos with indicated morpholinos and rescue mRNAs are shown (A, B). Time for 50% first cleavage (C) or for second cleavage (D) was assessed under light microscope and the results are expressed as delay time (expressed in min) compared to (Mo-CTL + RNA-CTL) cell cleavage score. Morpholino and mRNAs are injected at intracellular concentration of 3.3nM and 1ng/μL, respectively. One hundred eggs are microinjected, fertilized and followed for division in each condition. Error bars represent SEM of four independent experiments. (t-test: \*p-value<0.05; \*\*p-value<0.01).



**Fig. 4 Overexpression of eIF4B following fertilization accelerates the dynamic of first and second cell divisions in *P. lividus*.**

First (A) and second (B) cell division are advanced by microinjection of exogenous mRNA encoding sea urchin eIF4B (RNA-eIF4B) at relative low concentration. Representative cell divisions kinetic of injected embryos with indicated mRNA concentrations are shown (A, B). Time for 50% first cleavage (C) or for second cleavage (D) was assessed under light microscope and the results are expressed as delay time (expressed in min) compared to (RNA-CTL, 2.5ng/μL intracellular) cell cleavage score. Microinjected solution is prepared with both mRNAs at a total intracellular concentration of 2.5ng/μL. One hundred eggs are microinjected and followed for division for each condition. Error bars represent SEM of four independent experiments. (Mann-Whitney-test: \*p-value<0.05).



**Fig. 5 Conserved effect of eIF4B on cell cycle dynamics and translation efficiency in sea urchin *S. granularis*.**

First (A) and second (B) cell division are delayed by microinjection of a morpholino directed against sea urchin eIF4B mRNA (Mo-SgeIF4B). The specificity of the Mo effect is controlled by injection of an unrelated morpholino (Mo-CTL) and by a mismatched morpholino (MisMo-eIF4B). Time for 50% first cleavage (A) or for second cleavage (B) was assessed under light microscope and the results are expressed as delay time (expressed in min) compared to (Mo-CTL, 6.7nM intracellular) cell cleavage score. Microinjected solution is prepared with morpholinos at a total intracellular concentration of 6.7nM. First (C) and second (D) cell division are advanced by microinjection of exogenous mRNA encoding sea urchin eIF4B (RNA-eIF4B) at relative low concentration. Time for 50% first cleavage (C) or for second cleavage (D) was assessed under light microscope and the results are expressed as delay time (expressed in min) compared to (RNA-CTL, 2.0ng/ $\mu$ L intracellular) cell cleavage score. Microinjected solution is prepared with both mRNAs at a total intracellular concentration of 2.0ng/ $\mu$ L. One hundred eggs are microinjected and followed for division for each condition. Error bars represent SEM of three independent experiments (A, B and C, D). (E) The translation of a reporter luciferase is measured *in vivo* after overexpression of eIF4B in *S. granularis* eggs. Microinjected solution is prepared with 1.0 ng/ $\mu$ L intracellular concentration of each mRNA. Firefly luciferase luminescence are normalized to the condition with control mRNA at 60mpf. Three replicates of *in vivo* translation experiments (E) are done with triplicates of thirty microinjected eggs for each condition. Error bars represent SEM. (t-test: \*\*p-value<0.01 ; \*\*p-value<0.001 ; Multiple-t-test : #p-value<0.05).

Fig. 5

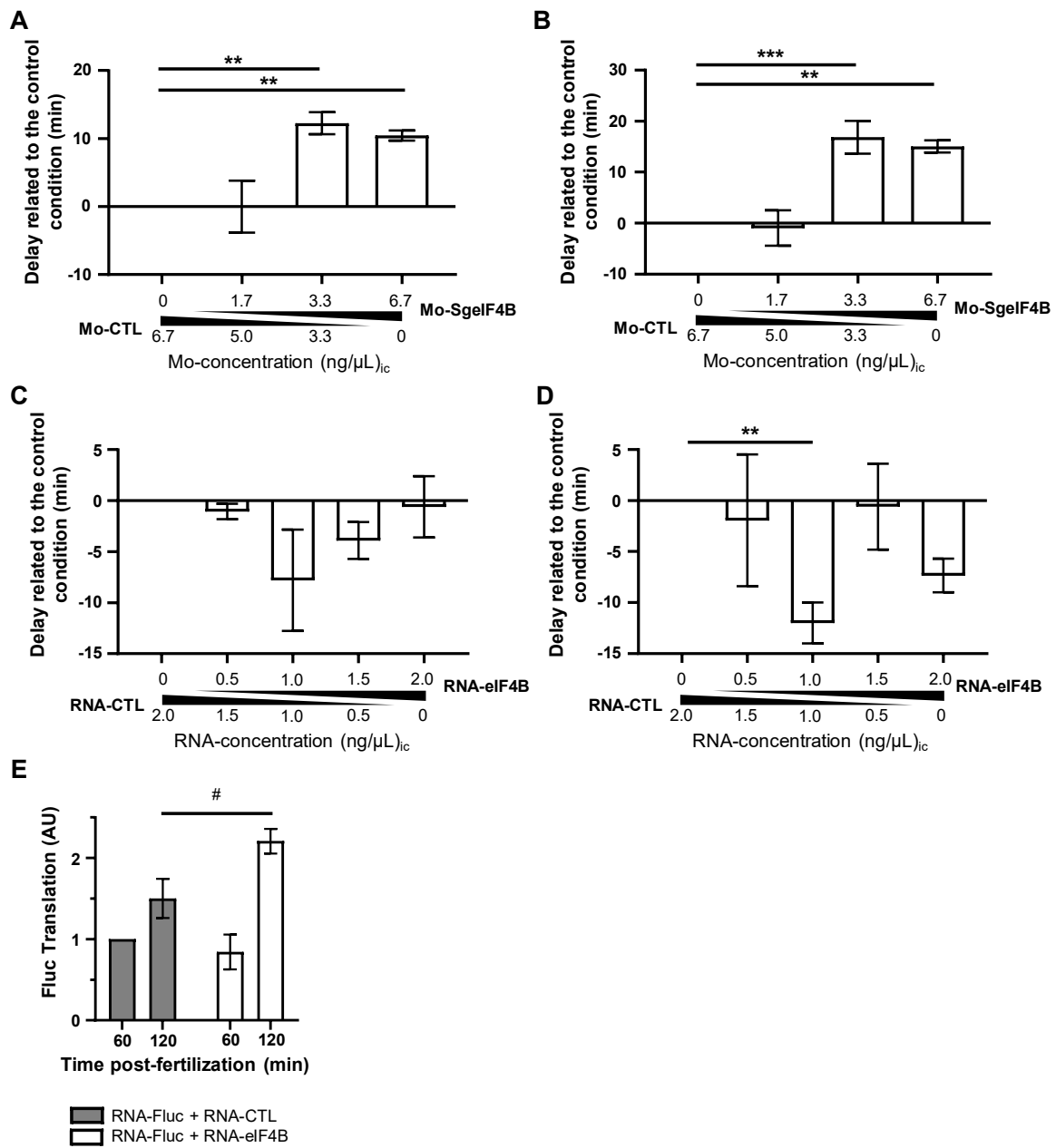


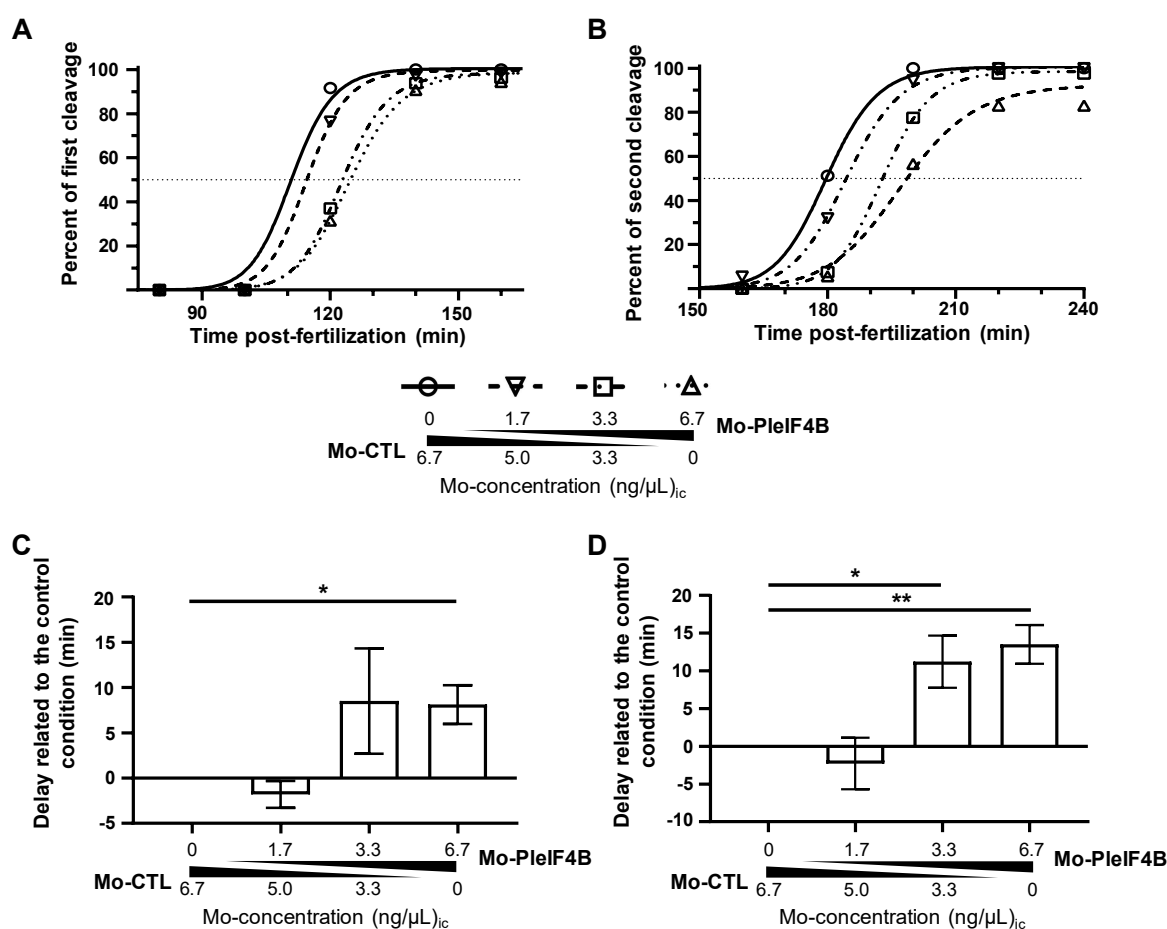
Fig. S1 eIF4B phosphorylation consensus sites alignment.

Alignment of eIF4B homologous phosphorylation consensus sites from species used in Fig. 1B.

Species	S406	S422	S442
Hsap	RPRERHPSWRSEETQ	RERSRTGSESSQTGT	RNARRRESSEKSLENE
Ocun	RPRERHPSWRSEETQ	RERSRTGSESSQTGT	RNARRRESSEKSLDNE
Ggal	RPRERYPSRSSEDNP	PERSRRTGSESSQSGA	RTTRRRRESSEKSVEGD
Ccar	QPRERHPSWRSEEDQL	LERPRTASDSSQPTD	RATVRRRESSEKSLDND
Pliv	SARVRRDSERSEGRE	ESRTRHSSSSGSGRGG	PVIMRRRESSESNDEE
Sgra	TARVRRDSERSEGRE	EGRTRHSSSSGSGRGG	PVIMRRRESSESNDEE
Pmin	PERPRRESSEGEGRTR	EGRTRHSSSSSGKGG	PIIARRRESSESNEDD
Ajap	PERPRRDSERSNDEG	EGRTRHSSSSSTGKG	PVMLRRRESSESRDDES
	RxRxxS	RxRxxS	RxxS

**Fig. S2 Neo-translation of eIF4B following fertilization is necessary for correct dynamic of cell divisions in *P. lividus*.**

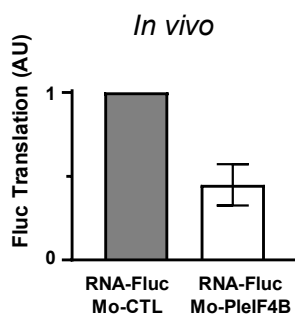
First (A) and second (B) cell division are delayed by microinjection of morpholino (Mo-PleIF4B). Representative cell divisions kinetic of injected embryos with indicated morpholino concentrations are shown (A, B). Time for 50% first cleavage (C) or for second cleavage (D) was assessed under light microscope and the results are expressed as delay time (expressed in min) compared to (Mo-CTL, 6.7nM intracellular) cell cleavage score. Microinjected solution is prepared with both morpholinos at a total of 6.7nM. One hundred eggs are microinjected and followed for division for each condition. Error bars represent SEM of three independent experiments. (t-test: \*p-value<0.05; \*\*p-value<0.01).





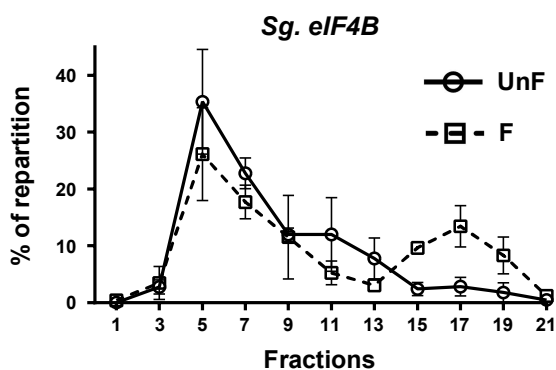
**Fig. S3 Inhibition of neo-translation of eIF4B following fertilization affect *in vivo* exogenous mRNA translation efficiency of a reporter mRNA.**

The translation of a reporter luciferase is measured *in vivo* after knockdown of eIF4B by microinjection of morpholino against eIF4B in *P. lividus* eggs (Mo-PleIF4B). Firefly luciferase luminescence are normalized to the condition with control morpholino (Mo-CTL) at 4-h post-fertilization. Microinjected solution is prepared with 3.33 ng/ $\mu$ L morpholino and 1.0 ng/ $\mu$ L RNA-Fluc intracellular concentration. Error bars represent SEM of two experimental replicates with triplicates of thirty microinjected eggs for each condition.



**Fig. S4 eIF4B mRNA neo-recruitment in polysomes following fertilization in *S. granularis*.**

eIF4B mRNA distribution on polysome gradients of two *S. granularis* females. mRNAs were detected by RTqPCR amplification in each fraction from unfertilized eggs (UnF) and 90 min post-fertilization (F) as described in methodology. Distribution is shown along gradient as a percentage of total mRNA. Fraction #1 corresponds to the top of the gradient (free mRNAs) and #21 corresponds to the bottom of the gradient (polysomal fractions). Error bars represent SEM.



## MATERIALS AND METHODS

### Protein sequences retrieving

*Paracentrotus lividus* eIF4B and eIF4H sequences (Pliv\_eIF4B and Pliv\_eIF4H) are retrieved from (Chassé et al. 2018) (respectively TSA GEDS01037963.1 and GEDS01027092.1). Blasting Pliv\_eIF4B sequence retrieves two *Sphaerechinus granularis* TSAs (GAVR01006947.1 and GAVR01069715.1) encoding the beginning and the overlapping middle of the protein forming the Sgra\_eIF4B sequence used. Blasting Pliv\_eIF4H sequence retrieves the *Sphaerechinus granularis* Sgra\_eIF4H sequence (TSA GAVR01080638.1). Other sequences used in this study are retrieved by blasting eIF4B and eIF4H sequences from *Homo sapiens* (Hsap\_eIF4B NP\_001408.2 and Hsap\_eIF4H NP\_071496.1) on refseq\_protein database. The following sequences are then obtained and used: *Oryctolagus cuniculus* (Ocun\_eIF4B XP\_002711054.1 and Ocun\_eIF4H XP\_008247306.2); *Gallus gallus* (Ggal\_eIF4B XP\_025001367.1 and Ggal\_eIF4H NP\_001376228.1); *Carcharodon carcharias* (Ccar\_eIF4B XP\_041036169.1 and Ccar\_eIF4H XP\_041052609.1); *Anneissia Japonica* (Ajap\_eIF4B XP\_033127317.1 and Ajap\_eIF4H XP\_033115958.1) and *Patiria miniata* (Pmin\_eIF4B XP\_038044277.1 and Pmin\_eIF4H XP\_038056321.1).

### Sequence analyses

Alignments are done on Clustal Omega software (v1.2.4) (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). ARM domain is computationally detected by the software mobidb used on Interpro website (<https://www.ebi.ac.uk/interpro/>). RRM domains are found by the software SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>; normal mode) (Letunic, Khedkar, and Bork 2021). Consensus phosphorylation sites (Kemp and Pearson 1990). The evolutionary history of RRM domains (Fig. 1B) was inferred by using the Maximum Likelihood method and JTT matrix-based model (Jones, Taylor, and Thornton 1992). The tree with the highest log likelihood (-1186.26) is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches (Felsenstein 1985). Initial tree(s) for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the JTT model, and then selecting the topology with superior log likelihood value. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. This analysis involved 16 amino acid sequences. There was a total of 75 positions in the final dataset.

### *In vitro* mRNA production

This study uses three different plasmids based on the pT7TS (a gift from Paul Krieg, Addgene plasmid # 17091 ; <http://n2t.net/addgene:17091> ; RRID:Addgene\_17091). The pT7TS-Fluc plasmid (Glob-Fluc) encodes the Firefly luciferase coding region flanked by the 5' and 3' untranslated region (UTR)

of the *Xenopus β-Globin* mRNA, under a T7 promoter (kindly gifted to the lab by Vincent Legagneux and Luc Paillard, University of Rennes (Costache et al. 2012), and will serve as template to produce the reporter mRNA encoding firefly luciferase. Two others plasmids were produced by replacing the open reading frame (ORF) of the pT7TS-Fluc by the Renilla luciferase or by the *Paracentrotus lividus* eIF4B open reading frame, respectively. In details, the exchange of ORF is done using In-Fusion cloning technique by Takara Bio. First, all primers are designed by the online tool (In-Fusion Cloning Primer Design Tool v1.0) while setting up the linearization by PCR and inserting ORF in between AUG and Stop codons. The eIF4B ORF sequence (TSA GEDS01037963.1) was synthesized at GeneArt® Life Technologies SAS and the Renilla luciferase sequence was PCR-amplified from plasmid pGb-Eg2-410D2-hxG-A65 (Kindly gifted by V. Legagneux, HB Osborne and L. Paillard (Legagneux, Omilli, and Osborne 1995; Oulhen et al. 2009). Primers are synthesized by Eurogentec. Vector and inserts PCR amplifications are done with the following parameters: reactions in 25 µL total with 1 ng/µL of plasmids, 1 µM of primers, 1X of CloneAmp Hifi PCR Premix (Takara Bio – Ref 638500) and cycles parameters (98°C 2 min; 35 cycles of 98°C 10 sec, 55°C 15 sec, 72°C 20 sec; 72°C 5 min; storage at 4°C). Quality and purity are assessed by migrating PCR products on agarose gel (1.5 %, 40 min, 100 V; not shown) allowing the use of the ‘Quick In-Fusion Protocol’ of In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio – Ref 639648). Resulting plasmids are transformed in DH5α Stellar™ Competent Cells (Takara Bio – Ref 636763). Growing transformed colonies are first controlled by routine PCR screening, then a mini-prep is performed using the NucleoSpin™ Plasmid kit (Macherey Nagel™ – Ref 740588). Plasmids are sequenced by Eurofins/GATC services (Supreme Run Tube protocol). Final selected colonies undergo midi-prep using NucleoBond™ Xtra Plasmid (Macherey Nagel™ - Ref 740410). Capped mRNA preparation is done as described in (Chassé, Boulben, Glippa, et al. 2019).

#### ***In vitro* translation and purification on m<sup>7</sup>GTP column**

Visualisation of the protein encoded (Fig. 1C) is done by *in vitro* translation in RRL - rabbit reticulocyte lysate (Retic Lysate IVT™ Kit - Invitrogen™ - Ref AM1200) in association with the Transcend™ Non-Radioactive Translation Detection Systems (Promega – Ref L5080). The following protocol is used. Final RRL reactions are done in 300µL with 12.5ng/µL of mRNA, 80mM of amino acids mix (20X Translation Mix minus-Met and 20X Translation Mix minus-Leu), 204µL of Retic Lysate, 3µg of Transcend™ tRNA and Nuclease-free water. Incubations are done in nuclease-free 1.5mL Eppendorf at 30°C during 2h in Eppendorf ThermoMixer at 300rpm. The input sample is taken at this stage. Rest of final solutions are resuspended in NuPAGE 2X and DTT 200mM (NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X) - Invitrogen™ - Ref NP0008; DL-Dithiothreitol – Sigma – Ref D9779) and loaded on pre-incubated m7GTP-sepharose beads (JenaScience – Ref 151S), incubated 2h at 4°C and rinsed. Input samples and beads are resuspended again in sample loading buffer NUPAGE. After 10min at

95°C, 10µg of samples are loaded on 12% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Bio-Rad - Ref 4561046) and migrates 1h30 at 90V in TG-SDS-1X buffer. Transfer is done on Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad). For Transcend detection, blots are blocked in TBS 1X, 0.1% Tween, BSA 1%, 1h at RT, then incubated with streptavidin from the Transcend™ kit (TBS 1X, 0.5% Tween, 1:10000 Streptavidin-HRP 0.25mg/ml, 1h at RT). Then, three 5min rinses with TBST and three 5min rinses with milliQ water. For eIF4E detection, blots are blocked in TBS 1X, 0.1% Tween, Milk 5%, 1h at RT. Primary antibody (BD-Science - AB\_397664 ; TBS 1X, 0.1% Tween, 1:5000, O/N at RT). Mouse secondary antibody (DAKO - P0447 - Mouse-HRP ; TBS 1X, 0.1% Tween, 1:5000, 1h at RT). The Transcend™ Chemiluminescent substrate, or the Pierce™ ECL Plus substrate (Thermofisher – Ref 32134) are used under a Fusion FX camera (Vilber-Lourmat) with 1'30 or 45'' illumination respectively.

### Chemicals

Morpholinos are provided by Gene Tools LLC (<https://www.gene-tools.com/>). Morpholinos directed against sea urchin eIF4B are designed to target the region around the AUG codon specific to the species studied. The morpholino with mismatches results in 5 mismatches with the *P. lividus* sequence and 6 mismatches with the *S. granularis* sequence. Following morpholino sequences are given in 5'–3' direction with the targeted AUG in brackets. Mo-CTL (CTCTCCGACAGGTGTTTTGTGACCT); Mo-PleIF4B (CTTACCAGAGGCCGC[CAT]GTTGATA); Mo-SgeIF4B (CTTCCAGAGGCCGC[CAT]GTTGATA); MisMo-eIF4B (CTTACGACACGCCCC[CAT]CTTGATA).

### Handling and preparation of sea urchin eggs

The present study is performed with the European species *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) and *Sphaerechinus granularis* (Lamarck, 1816). Sea urchins are collected in the Brest area by the diving facility and maintained by the Roscoff Aquarium Services (RAS) in the Centre de Ressources Biologiques Marines (CRBM) of the Biological Station of Roscoff. Handling and preparation of sea urchins' eggs are described in (Chassé, Boulben, Glippa, et al. 2019) and now recorded for the European Union Erasmus+ project Digital Marine (<https://digital-marine.sorbonne-universite.fr/index.php/echinoderms>). Rapidly, gametes spawning is induced by intraceolomic injection of 0.1 M acetylcholine solution. Sperm is collected and stored at 4°C. Eggs are collected, filtered and rinsed in natural 0.22 µm Millipore-filtered sea water (NFSW). Collecting, storage and experiments are done at 16°C. All experiments are done only on gametes showing more than 90% of fertility in *in vitro* fertilization test.

### Microinjection mix and set-up

Just prior to microinjection, the microinjected solution is prepared with milliQ water, 1mM CF™ 488A Hydrazide (Sigma – Ref SCJ4600015) and the proper mRNA and/or morpholino concentration,

1min bench centrifuged and kept in dark at 16°C. Dose responses are always made to have the same total concentration with the balance between the control avec the tested morpholino or mRNA. For microinjection, eggs are dejellied by gentle swirling in 10 mL of 3.5 mM citric acid dilution in NFSW on 1% agarose filled petri dish for 1 min and then rinsed three times in NFSW. Eggs are then aligned on 1 % protamine sulfate-coated support (Sigma – Ref P4020). Microinjection material is loaded into narrow microinjection pipettes (Eppendorf – Ref 2586221) using Microloader™ tips (Eppendorf – Ref 2519452) and injected in the aligned unfertilized eggs with the FemtoJet 4i injection system (Eppendorf – Ref 5252000013) with the free flow method at the lower pressure allowing solution expulsion. Approximately 1% (~5pL) of the egg volume is microinjected under an inversed microscope.

#### ***In vivo* cell division kinetic analyses**

To perform cell division analyses (Fig. 3, 4, 5, S2), dejellied eggs are aligned on plastic petri dish, previously treated with protamine, and plunged into NFSW maintained at 16°C. A hundred of eggs is aligned and microinjected for each condition of experiments. One hour after microinjection with the proper solution mix, eggs are fertilized. Cell division kinetics has been semi-automatized using an inversed Leica videomicroscope taking pictures of every egg from fertilization to 5hpf, every 20 minutes. Then cleavage counting is performed on images using the cell counter plugin from Fiji (Schindelin et al. 2012). So, for experiments with 5 conditions, 15 time points; 100 eggs per conditions: a total of 7500 eggs are counted and associate to the state of division (1, 2, 4 or 8 cells). Analyses and statistics were performed using GraphPad Prism v8.0.2 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Since each conditions show no difference in terms of undivided eggs, data points are normalized, setting no division at 0% and the maximum of division at 100%, to facilitate the regression. The non-linear regression ‘allosteric sigmoidal’ from the Prism v5.01 [equation  $Y=V_{max} \cdot X^h / (K_{prime} + X^h)$ ; showing the better regression] is then used in Prism v8.0.2 to calculate the cell division kinetic and to export the time by which half of embryos are divided for the analysed cell division. The delay between the control and the tested condition is then presented in figures.

#### ***In vitro* and *in vivo* translation analyses**

*In vitro* translation assays (Fig. 2A) are done in RRL - rabbit reticulocyte lysate (Retic Lysate IVT™ Kit - Invitrogen™ - Ref AM1200). The following protocol (slightly different from RRL with Transcend test) is used. Final RRL reactions are done in 12.5μL with 160mM of amino acids mix (20X Translation Mix minus-Met and 20X Translation Mix minus-Leu), 8.5μL of Retic Lysate, Nuclease-free water and a total mRNA concentration of 25 ng/μL (12.5 ng/μL each for RNA-Fluc and the additional mRNA). Kinetics incubation are done in nuclease-free 0.2mL PCR tubes at 30°C in Eppendorf ThermoMixer at

300rpm. Each time point is an independent reaction done in duplicate. *In vivo* translation assays with microinjected eggs (Fig. 2B, 5E, S3) are done following the detailed protocol of (Chassé, Boulben, Glippa, et al. 2019) and can be visualized on the Digital Marine Echinoderms part. A particular glassware setup is handmade allowing easy manipulation of small number of eggs after microinjection. Dejellied eggs are aligned on the glassware setup, previously treated with the protamine solution, and plunged into NFSW maintained at 16°C. Around one hour after microinjection of the proper solution mix in triplicate of 30 eggs aligned with the reporter mRNA, eggs are fertilized. Then, the luminescence is acquired as soon as 1hour post-fertilization (Fig. 2B, 5E) and 4hours post-fertilization (Fig. S3) as depicted in (Chassé, Boulben, Glippa, et al. 2019). *In vitro* and *in vivo* translation assays have the same luminescence acquiring principle. Coverslip pieces with microinjected eggs are transferred with forceps directly in 50µL of ONE-Glo™ reagent (Promega – Ref E6110) and centrifuged 1min at 10,000 x g. For RRL, 10 µL of reactions is transferred in 50µL of ONE-Glo™ reagent. Then, the mix is transferred on 96-well microplate (Berthold – Ref 23000) and luminescence is acquired in a Tristar luminometer (Berthold – Ref LB 941) for 10 sec.

### Statistics

Analyses and statistics were performed using GraphPad Prism version 8.0.2 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)).

### mRNA recruitment in polysomes

Described as much as the MIQE preconized (Bustin et al. 2009). mRNA polysomal gradient distribution are obtained following the same general protocol as described in (Chassé et al. 2017; 2018). Samples are collected from two *S. granularis* females with unfertilized and 90 min post-fertilized eggs. *S. granularis* eggs cultures and sampling are done as described with *P. lividus* eggs in (Chassé et al. 2017). Sucrose gradient preparation, loading, ultracentrifugation, fractionation and RNA purification are done as (Chassé et al. 2017). RNA reverse transcriptions are done as described (Chassé et al. 2018). Quantitative qPCR reaction was assembled in 5µL reaction with the SybrGreen qPCR Roche kit (LightCycler 480 SYBR Green I Master - Ref 4707516001) on a JANUS MINI dispensing automate (Perkin Elmer Ref AJS8001; KISSF platform, SBR). QPCR reactions were performed on the Light Cycler 480 (Roche) in triplicates and in two independent biological replicates with diluted (1/150e) RT reaction and the following eIF4B primers (Forward [CCC-GTA-GAC-ACT-GCT-GCT-AA] and Reverse [GTC-TCT-CCT-TAC-ACG-GGC-AG]) leading to a unique 150 nt amplicon. Primers for qPCR are designed in the open reading frame by Primer3 website (<http://bioinfo.ut.ee/primer3/>) and produced by Eurogentec. These primers have been efficiently approved with favourable parameters of amplification with extracted RNA diluted at six Log between 1/37.5e and 1/1200e. eIF4B primer pair show 100 % of efficiency; slope of -3.319; R<sup>2</sup> of 0.9986. Using the cycle threshold (CT) values,

the value in each fraction of the gradient is normalized to the value in the first fraction by the  $2\Delta CT$  method, and distribution of the mRNA on the polysome gradient is expressed as the percent of total mRNA (as described in (Panda, Martindale, and Gorospe 2017)) using Prism v8.0.2.

**Acknowledgments:**

We are indebted to the Marine and Diving Facility and the Aquarium Service of the Roscoff Marine Station for sea urchin collection and rearing. We would also like to thank Vincent Legagneux and Luc Paillard for kindly sharing plasmids. We thank the KISSf platform (Biogenouest, IBISA) for sharing the JANUS equipment and to all the members of the TCCD team for many stimulating scientific discussions.

**Funding:**

This work was supported by La Ligue contre le Cancer (Coordination du Grand Ouest, Comités Finistère, Côtes d'Armor, Deux-Sèvres, Charente, Morbihan, Ille-et-Vilaine, Sarthe), the Brittany Regional Council (Région Bretagne) and the Finistère Department Council (CG29). F.P was funded by a PhD fellowship from the French Education Ministry [SU; Doctoral School ED515].

**Conflicts of Interest:**

The authors declare no conflict of interest.

**Bibliography:**

- Altmann, M., P.P. Müller, B. Wittmer, F. Ruchti, S. Lanker, and H. Trachsel. 1993. "A *Saccharomyces Cerevisiae* Homologue of Mammalian Translation Initiation Factor 4B Contributes to RNA Helicase Activity." *The EMBO Journal* 12 (10): 3997–4003. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06077.x>.
- Andreou, Alexandra Zoi, Ulf Harms, and Dagmar Klostermeier. 2017. "EIF4B Stimulates EIF4A ATPase and Unwinding Activities by Direct Interaction through Its 7-Repeats Region." *RNA Biology* 14 (1): 113–23. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259782>.
- Benne, R., and J. W. Hershey. 1978. "The Mechanism of Action of Protein Synthesis Initiation Factors from Rabbit Reticulocytes." *The Journal of Biological Chemistry* 253 (9): 3078–87.
- Bustin, Stephen A., Vladimir Benes, Jeremy A. Garson, Jan Hellemans, Jim Huggett, Mikael Kubista, Reinhold Mueller, et al. 2009. "The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments." *Clinical Chemistry* 55 (4): 611–22. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>.
- Chassé, Héloïse, Julie Aubert, Sandrine Boulben, Gildas Le Corguillé, Erwan Corre, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2018. "Translatome Analysis at the Egg-to-Embryo Transition in Sea Urchin." *Nucleic Acids Research* 46 (9): 4607–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gky258>.
- Chassé, Héloïse, Sandrine Boulben, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2019. "Translational Control of Canonical and Non-Canonical Translation Initiation Factors at the Sea Urchin Egg to Embryo Transition." *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3): 626. <https://doi.org/10.3390/ijms20030626>.

- Chassé, Héloïse, Sandrine Boulben, Vlad Costache, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2017. "Analysis of Translation Using Polysome Profiling." *Nucleic Acids Research* 45 (3): e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw907>.
- Chassé, Héloïse, Sandrine Boulben, Virginie Glippa, Florian Pontheaux, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2019. "In Vivo Analysis of Protein Translation Activity in Sea Urchin Eggs and Embryos." In *Methods in Cell Biology*, 151:335–52. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.10.008>.
- Chassé, Héloïse, O. Mulner-Lorillon, Sandrine Boulben, Julia Morales, and Patrick Cormier. 2016. "Cyclin B Translation Depends on MTOR Activity after Fertilization in Sea Urchin Embryos." *PLOS ONE* 11. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150318>.
- Coppolecchia, R., P. Buser, A. Stotz, and P. Linder. 1993. "A New Yeast Translation Initiation Factor Suppresses a Mutation in the EIF-4A RNA Helicase." *The EMBO Journal* 12 (10): 4005–11.
- Cormier, Patrick, Héloïse Chassé, Bertrand Cosson, O. Mulner-Lorillon, and Julia Morales. 2016. "Translational Control in Echinoderms: The Calm Before the Storm." In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, 413–34. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8_16).
- Costache, Vlad, Stefania Bilotto, Laurent Laguerre, Robert Bellé, Bertrand Cosson, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2012. "Dephosphorylation of EIF2 $\alpha$  Is Essential for Protein Synthesis Increase and Cell Cycle Progression after Sea Urchin Fertilization." *Developmental Biology* 365 (1): 303–9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.03.002>.
- Evans, Tom, Eric T. Rosenthal, Jim Youngblom, Dan Distel, and Tim Hunt. 1983. "Cyclin: A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division." *Cell* 33 (2): 389–96. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90420-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90420-8).
- Felsenstein, Joseph. 1985. "Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap." *Evolution* 39 (4): 783–91. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1985.tb00420.x>.
- Gorp, A. G. M. van, K. E. van der Vos, A. B. Brenkman, A. Bremer, N. van den Broek, F. Zwartkruis, J. W. Hershey, B. M. T. Burgering, C. F. Calkhoven, and P. J. Coffey. 2009. "AGC Kinases Regulate Phosphorylation and Activation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B." *Oncogene* 28 (1): 95–106. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.367>.
- Gross, Paul R., and Gilles H. Cousineau. 1963. "Effects of Actinomycin D on Macromolecule Synthesis and Early Development in Sea Urchin Eggs." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 10 (4): 321–26. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(63\)90532-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(63)90532-1).
- Hernández, Greco, Paula Vázquez-Pianzola, Andreas Zurbriggen, Michael Altmann, José M. Sierra, and Rolando Rivera-Pomar. 2004. "Two Functionally Redundant Isoforms of Drosophila Melanogaster Eukaryotic Initiation Factor 4B Are Involved in Cap-Dependent Translation, Cell Survival, and Proliferation." *European Journal of Biochemistry* 271 (14): 2923–36. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04217.x>.
- Holz, Marina K., Bryan A. Ballif, Steven P. Gygi, and John Blenis. 2005. "MTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events." *Cell* 123 (4): 569–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024>.
- Jones, David T., William R. Taylor, and Janet M. Thornton. 1992. "The Rapid Generation of Mutation Data Matrices from Protein Sequences." *Bioinformatics* 8 (3): 275–82. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>.
- Kemp, Bruce E., and Richard B. Pearson. 1990. "Protein Kinase Recognition Sequence Motifs." *Trends in Biochemical Sciences* 15 (9): 342–46. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90073-K](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90073-K).
- Kroh, Andreas, and Andrew B. Smith. 2010. "The Phylogeny and Classification of Post-Palaeozoic Echinoids." *Journal of Systematic Palaeontology* 8 (2): 147–212.
- Láruson, Áki Jarl. 2017. "Rates and Relations of Mitochondrial Genome Evolution across the Echinoidea, with Special Focus on the Superfamily Odontophora." *Ecology and Evolution* 7 (13): 4543–51. <https://doi.org/10.1002/ece3.3042>.



- Legagneux, V, F Omilli, and H B Osborne. 1995. "Substrate-Specific Regulation of RNA Deadenylation in *Xenopus* Embryo and Activated Egg Extracts." *RNA* 1 (10): 1001–8.
- Letunic, Ivica, Supriya Khedkar, and Peer Bork. 2021. "SMART: Recent Updates, New Developments and Status in 2020." *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D458–60.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa937>.
- Metz, A. M., K. C. Wong, S. A. Malmström, and K. S. Browning. 1999. "Eukaryotic Initiation Factor 4B from Wheat and *Arabidopsis Thaliana* Is a Member of a Multigene Family." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266 (2): 314–21.  
<https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1814>.
- Milburn, S. C., J. W. Hershey, M. V. Davies, K. Kelleher, and R. J. Kaufman. 1990. "Cloning and Expression of Eukaryotic Initiation Factor 4B CDNA: Sequence Determination Identifies a Common RNA Recognition Motif." *The EMBO Journal* 9 (9): 2783–90.  
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07466.x>.
- Naranda, T., W. B. Strong, J. Menaya, B. J. Fabbri, and J. W. Hershey. 1994. "Two Structural Domains of Initiation Factor EIF-4B Are Involved in Binding to RNA." *Journal of Biological Chemistry* 269 (20): 14465–72. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36646-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36646-2).
- Oulhen, Nathalie, Sandrine Boulben, Michael Bidinosti, Julia Morales, Patrick Cormier, and Bertrand Cosson. 2009. "A Variant Mimicking Hyperphosphorylated 4E-BP Inhibits Protein Synthesis in a Sea Urchin Cell-Free, Cap-Dependent Translation System." *PLOS ONE* 4 (3).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005070>.
- Oulhen, Nathalie, Patrick Salaün, Bertrand Cosson, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2007. "After Fertilization of Sea Urchin Eggs, EIF4G Is Post-Translationally Modified and Associated with the Cap-Binding Protein EIF4E." *Journal of Cell Science* 120 (3): 425–34.  
<https://doi.org/10.1242/jcs.03339>.
- Panda, Amaresh C., Jennifer L. Martindale, and Myriam Gorospe. 2017. "Polysome Fractionation to Analyze mRNA Distribution Profiles." *Bio-Protocol* 7 (3): e2126.  
<https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2126>.
- Parsyan, Armen, Yuri Svitkin, David Shahbazian, Christos Gkogkas, Paul Lasko, William C. Merrick, and Nahum Sonenberg. 2011. "MRNA Helicases: The Tacticians of Translational Control." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12 (4): 235–45. <https://doi.org/10.1038/nrm3083>.
- Pelletier, Jerry, and Nahum Sonenberg. 2019. "The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment." *Annual Review of Biochemistry* 88 (1): 307–35.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111042>.
- Philippe, Lucas, Antonia M. G. van den Elzen, Maegan J. Watson, and Carson C. Thoren. 2020. "Global Analysis of LARP1 Translation Targets Reveals Tunable and Dynamic Features of 5' TOP Motifs." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 117 (10): 5319–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.1912864117>.
- Pontheaux, Florian, Fernando Roch, Julia Morales, and Patrick Cormier. 2021. "Echinoderms : Focus on the Sea Urchin Model in Cellular and Developmental Biology." In *Handbook of Established and Emerging Marine Model Organisms in Experimental Biology*, edited by Boutet, A. & B. Schierwater, and eds. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003217503-17>.
- Richter-Cook, N. J., T. E. Dever, J. O. Hensold, and W. C. Merrick. 1998. "Purification and Characterization of a New Eukaryotic Protein Translation Factor. Eukaryotic Initiation Factor 4H." *The Journal of Biological Chemistry* 273 (13): 7579–87.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.273.13.7579>.
- Rogers, G.W, Richter Nj, Lima Wf, and Merrick Wc. 2001. "Modulation of the Helicase Activity of EIF4A by EIF4B, EIF4H, and EIF4F." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (33).  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M100157200>.
- Rozovsky, Nadja, Aimee C. Butterworth, and Melissa J. Moore. 2008. "Interactions between EIF4AI and Its Accessory Factors EIF4B and EIF4H." *RNA* 14 (10): 2136–48.  
<https://doi.org/10.1261/rna.1049608>.

- Salaün, Patrick, Sandrine Boulben, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé, Nahum Sonenberg, Julia Morales, and Patrick Cormier. 2005. "Embryonic-Stage-Dependent Changes in the Level of EIF4E-Binding Proteins during Early Development of Sea Urchin Embryos | Journal of Cell Science." *Journal of Cell Science*, 2005.  
<http://jcs.biologists.org.insb.bib.cnrs.fr/content/118/7/1385>.
- Salaün, Patrick, Stéphane Pyronnet, Julia Morales, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé, Nahum Sonenberg, and Patrick Cormier. 2003. "EIF4E/4E-BP Dissociation and 4E-BP Degradation in the First Mitotic Division of the Sea Urchin Embryo." *Developmental Biology* 255 (2): 428–39.  
[https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00099-4).
- Schindelin, Johannes, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, et al. 2012. "Fiji: An Open-Source Platform for Biological-Image Analysis." *Nature Methods* 9 (7): 676–82. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Shahbazian, David, Armen Parsyan, Emmanuel Petroulakis, Ivan Topisirovic, Yvan Martineau, Bernard F. Gibbs, Yuri Svitkin, and Nahum Sonenberg. 2010. "Control of Cell Survival and Proliferation by Mammalian Eukaryotic Initiation Factor 4B." *Molecular and Cellular Biology* 30 (6): 1478–85. <https://doi.org/10.1128/MCB.01218-09>.
- Shahbazian, David, Philippe P Roux, Virginie Mieulet, Michael S Cohen, Brian Raught, Jack Taunton, John W B Hershey, John Blenis, Mario Pende, and Nahum Sonenberg. 2006. "The MTOR/PI3K and MAPK Pathways Converge on EIF4B to Control Its Phosphorylation and Activity." *The EMBO Journal* 25 (12): 2781–91. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601166>.
- Thoreen, Carson C., Lynne Chantranupong, Heather R. Keys, Tim Wang, Nathanael S. Gray, and David M. Sabatini. 2012. "A Unifying Model for MTORC1-Mediated Regulation of MRNA Translation." *Nature* 485 (7396): 109–13. <https://doi.org/10.1038/nature11083>.
- Wagenaar, E. B. 1983. "The Timing of Synthesis of Proteins Required for Mitosis in the Cell Cycle of the Sea Urchin Embryo." *Experimental Cell Research* 144 (2): 393–403.  
[https://doi.org/10.1016/0014-4827\(83\)90419-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(83)90419-6).



## Discussion et perspectives

Cet article présente l'implication du facteur eIF4B, et plus précisément la fraction néo-traduite d'eIF4B, dans la dynamique du cycle en réponse à la fécondation chez deux oursins évolutivement éloignés. Chez les eucaryotes, eIF4B est le potentialisateur de l'ARN hélicase eIF4A au sein du complexe d'initiation de la traduction. Le niveau d'identité de la séquence d'eIF4B chez l'oursin avec celui des mammifères permet de prédire une fonction et une régulation similaire. C'est notamment le cas pour la stimulation de la traduction après surexpression *in vitro* et *in vivo* et sa capacité à participer à un complexe d'initiation hétérologue. Au sein de l'œuf d'oursin, la néo-traduction d'eIF4B est montrée comme nécessaire à la bonne dynamique des premiers cycles post-fécondation. L'inhibition de la traduction ou la surexpression du facteur eIF4B sont respectivement capables de retarder ou d'avancer les premières divisions.

L'étude des acteurs néo-traduits au cours des deux premiers clivages permet d'accéder de manière remarquable au rôle précoce de la protéine zygotique qui sera impliquée dans la vie de l'embryon. Si cette protéine est elle-même impliquée dans le contrôle de l'activité traductionnelle, elle peut potentiellement jouer un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes induit en réponse à la fécondation. Il semble intéressant de rappeler que chez l'oursin, un réseau de régulation de l'expression génique lié au développement (dGRN : developmental Gene Regulatory Network) n'est activé qu'à partir de la quatrième division de l'embryon (stade 16 blastomères). Ce dGNR est majoritairement constitué de facteurs de transcription qui vont répondre aux différents messages de mise en place des polarités et des territoires de l'embryon. Notre hypothèse est qu'à l'instar du dGNR, les quatre premières divisions mitotiques vont être régulées par un réseau de régulation de la traduction des ARNm maternels.

La capacité de la protéine eIF4B néo-traduite à stimuler la traduction, associée à sa capacité à réguler la dynamique des premiers cycles, nous permet de proposer une boucle de rétrocontrôle positive au sein de ce réseau de régulation de la traduction. Dans la littérature, eIF4B est montré comme facilitant et nécessaire à la traduction d'ARNm ayant des 5'UTR structurées et plus particulièrement des ARNm d'acteurs du cycle cellulaire impliqués dans la prolifération et la survie. L'hypothèse que l'eIF4B d'oursin puisse également cibler des ARNm spécifiques d'acteurs du cycle peut être posée et expliquerait l'impact de la néo-traduction d'eIF4B sur la dynamique du cycle. Pour tester cela, deux prolongements de l'étude peuvent être proposés.

L'étude des ARNm cibles peut être réalisée à l'aide du système rapporteur Luciférase du chapitre 3 de ce manuscrit.

Dans l'article en préparation, le morpholino dirigé contre eIF4B impacte la traduction *in vivo* de la construction Glob-Fluc. S'il existe des ARNm cibles particuliers d'eIF4B, les constructions avec les 5'UTR de ses potentielles cibles devraient révéler cet effet spécifique. Nous pourrions alors voir la traduction des 5'CycB-Fluc ou 5'CDK1-Fluc diminuer plus fortement que la Glob-Fluc en présence du morpholino eIF4B *in vivo*. L'étude des 5'UTR des ARNm d'oursin pourra également se faire au niveau de leur structure. L'analyse peut se faire premièrement *in silico* sur leur taille, leur composition en pourcentage de GC ou *via* des logiciels de prédiction de structure. Également, la structure *in vitro* et/ou *in vivo* peut être déterminée. La technique de SHAPE (Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension) peut notamment être utilisée pour établir la structure secondaire d'un ARN, afin d'améliorer la précision des algorithmes de prédiction de structure (Wilkinson et al. 2006).

La capacité d'eIF4B d'oursin à stimuler la traduction *in vitro* peut aussi être discutée d'un point de vue dynamique. Alekhina et ses collaborateurs ont utilisé un ARNm rapporteur similaire au Glob-Fluc dans un lysat de cellule de carcinome de souris. Ils ont montré que la dépendance à l'ARN hélicase eIF4A pour traduire cet ARNm se fait principalement lors des premiers cycles de traduction de l'ARNm (Alekhina et al. 2020). Dans l'article 4 en préparation, la traduction de l'ARNm rapporteur semble cependant linéaire mais stimulée de deux fois en présence de l'ARNm d'eIF4B. Cela implique alors que la dépendance à eIF4B permettant la stimulation de la traduction du rapporteur est constante au cours de l'expérimentation. L'étude plus précise de la dynamique de traduction sous dépendance d'eIF4B chez l'oursin pourrait par la suite être menée au sein de lysat d'œufs d'oursins (Oulhen et al. 2009), de la même manière qu'Alekhina et ses collaborateurs.

### **III. Discussion**

En utilisant les premières divisions mitotiques de l'embryon d'oursin comme modèle d'étude, mes travaux de thèse ont eu pour but d'étudier les relations entre l'activité traductionnelle et la dynamique du cycle cellulaire. Plus précisément, après avoir identifié des marqueurs de la mitose susceptibles d'être suivis au sein d'une cellule, j'ai étudié comment l'efficacité traductionnelle des ARNm néo-recrutés à la fécondation est susceptible d'influencer la dynamique des premiers cycles mitotiques. À l'inverse, j'ai aussi étudié comment la traduction de ces acteurs spécifiques peut être contrôlée à la fécondation. Dans cette partie du manuscrit, nous allons discuter des régulations mises en évidence au cours de mes travaux de thèse impliquant des contrôles du cycle sur la traduction et inversement. Nous verrons également des perspectives d'études issues de ces résultats. Bien que les éléments impliqués dans le contrôle traductionnel aient été décrits indépendamment dans plusieurs systèmes, ils n'ont jamais été décrits de manière intégrée dans le cadre d'un réseau. Nous proposons ici, pour la première fois, l'existence d'un réseau de régulation traductionnel dans le contexte des premières divisions mitotiques chez l'oursin. Enfin, nous verrons que la relation traduction et cycle cellulaire se met également en lien avec l'environnement.

#### **A. Activité traductionnelle et dynamique du cycle**

##### **1. La kinase mitotique CDK1 et contrôle de la traduction**

La kinase mitotique CDK1 est impliquée dans le contrôle des acteurs du cycle afin de permettre la réalisation correcte de la mitose. Nous avons également vu en introduction que CDK1 réalise des régulations par phosphorylation d'acteurs de la traduction tels qu'eIF4G, eEF2K, eEF1B ou encore 4E-BP. Chez l'oursin, le transcriptome à la transition ovule-embryon a révélé une sélection de 18% d'ARNm maternels néo-recrutés (Chassé et al. 2018). Cependant, l'analyse détaillée de la distribution de certains ARNm sur gradient de polysome durant la transition ovule-embryon et en présence de PP242, un inhibiteur de la voie mTOR, a révélé des recrutements insensibles à la drogue. Au sein de l'équipe, un transcriptome complet comparant le recrutement post-fécondation en condition contrôle et en présence de PP242 est en cours d'analyse. Sachant que CDK1 peut activer la traduction coiffe-dépendante en inhibant 4E-BP en mitose, il se pourrait que CDK1 participe à la traduction des ARNm dont le recrutement est résistant à PP242. De plus, chez l'oursin, la traduction d'ARNm comme la cycline A (néo-recrutée à la fécondation) est impactée lors d'un traitement à l'aminopurvalanol, inhibiteur de CDK1 (Le Breton et al. 2005). L'impact de CDK1 dans le contrôle traductionnel à la

fécondation chez l'oursin est alors à explorer (Figure 23). L'utilisation du composé RO-3306, inhibiteur spécifique de CDK1, permettrait d'explorer cette hypothèse dans les cadres d'un traductome ou de l'étude de l'activité traductionnelle à l'aide du système rapporteur luciférase.

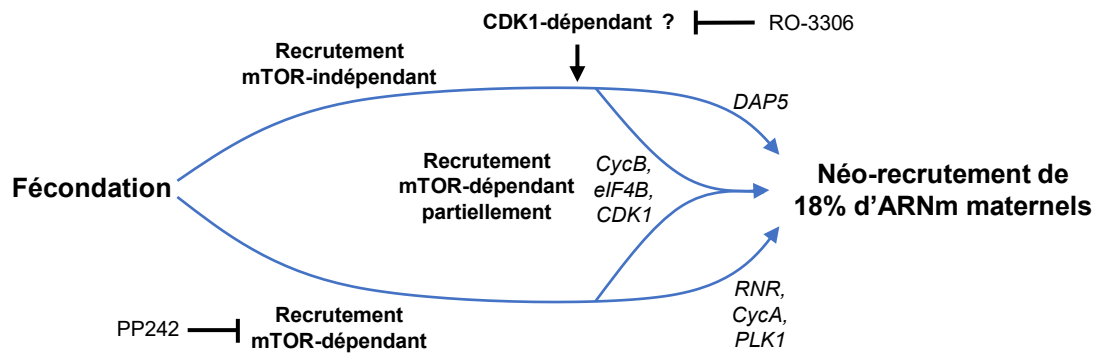


Figure 23 La kinase mitotique régulatrice de la traduction ?

En réponse à la fécondation chez l'oursin, une sélection de 18% d'ARNm maternels est néo-recrutée dans la machinerie de traduction. En présence de PP242, inhibiteur de la voie mTOR, le recrutement des ARNm de RNR, cycline A et PLK1 montrent une sensibilité à PP242, tandis que l'ARNm de DAP5 semble insensible, et les ARNm de cycline B, eIF4B et CDK1 présentent un recrutement résiduel. L'implication de la kinase mitotique CDK1, dans ces recrutements indépendants ou partiellement dépendants de mTOR, peut être testée dans le cadre d'un traductome ou de l'utilisation du système rapporteur Fluc en présence de RO-3306, inhibiteur de CDK1

Nous avons vu en introduction différentes actions de CDK1 sur les acteurs de la traduction au fuseau mitotique. De plus, des facteurs de traduction sont détectés au fuseau chez l'oursin. Le facteur eEF1B, régulé par CDK1 chez l'embryon de xénope (Le Sourd et al. 2006) est relocalisé au fuseau de division chez l'embryon d'oursin (Boulben et al. 2003). De plus, nous avons localisé l'activité de CDK1, par détection de la pT318PP1C, au fuseau mitotique des premières divisions (article 1). Il est donc possible que CDK1 participe à un contrôle traductionnel localisé dans l'œuf d'oursin, et plus particulièrement au fuseau. Une localisation de la traduction d'ARNm sensible au RO-3306 mais pas PP242 au sein de l'œuf d'oursin serait une chose à étudier. Pour le moment, la récente technique de FLARIM (fluorescence assay to detect ribosome interactions with mRNA) (Burke et al. 2017) ne permet pas chez l'oursin de détecter localement la traduction d'ARNm. Cependant, d'autres techniques existent et sont encore à tester (Biswas et al. 2019). Nous avons également vu que le marqueur d'activité localisé pT3H3 de l'haspine, kinase contrôlée par CDK1 chez les mammifères, est retardé en présence de l'inhibiteur Roscovitine. Il serait donc intéressant de voir si d'autres cibles de CDK1 voient leur activité ou leur localisation dérégulée en présence de Roscovitine (ou RO-3306). Ces inhibiteurs ont en effet déjà montré l'activation de PP1 au fuseau de cellules humaines (Song et al. 2021),

l'induction de la formation de granules de stress (Haneke et al. 2020), ou encore la délocalisation de l'ARN hélicase Vasa présente au fuseau d'embryon précoce d'échinodermes pour la traduction localisée de la cycline B (Yajima and Wessel 2011; 2015).

## **2. Contrôle de la dynamique du cycle par la néo-traduction d'ARNm**

L'augmentation de la synthèse protéique en réponse à la fécondation est nécessaire à la progression du premier cycle mitotique. Cette augmentation passe par la libération de la machinerie de traduction avec l'inhibition, par des mécanismes post-traductionnels, de 4E-BP, eEF2K et eIF2 $\alpha$  en réponse à la fécondation. La perturbation de ces régulations mène à un arrêt du cycle ou au moins un retard de la première division avec notamment un défaut d'accumulation de la cycline B (Chassé et al. 2016; Mulner-Lorillon et al. 2017). Dans les travaux présentés au cours des chapitres, c'est l'inhibition de la traduction d'ARNm codant pour des acteurs spécifiques qui perturbe la dynamique du cycle. L'influence des protéines néo-traduites est donc à préciser.

Chez l'oursin, l'ARNm de CDK1 est néo-recruté dans la machinerie de traduction en réponse à la fécondation (Chassé et al. 2018) et la quantité de protéine CDK1 est maintenue durant les premiers cycles (article 2 (Feizbakhsh et al. 2020)). L'inhibition de la néo-traduction de CDK1 par injection de morpholino a révélé un léger impact sur la dynamique du cycle dans nos conditions. Ce résultat implique tout de même une influence sur le cycle des protéines CDK1 néo-traduites, alors qu'il est admis que l'activité CDK1 ne dépend pas de sa propre production, plutôt que des régulations post-traductionnelles et de l'association à ses partenaires cyclines. L'étude plus précise des contrôles menés par les CDK1 néo-traduites est nécessaire. Dans nos travaux, la part néo-traduite de CDK1 pourrait agir sur les acteurs de la traduction, la localisation de traduction d'ARNm ou dans la spécificité de traduction d'ARNm comme celui de la cycline A. L'aminopurvalanol, utilisée pour étudier la traduction spécifique des ARNm ciblés par CDK1 (Le Breton et al. 2005), est, comme toute drogue, sujette à des effets aspécifiques. Le morpholino et les contrôles associés permettraient d'être plus spécifique dans les effets observés. Aussi, l'étude locale des cibles pourraient se faire dans le cadre d'une surexpression de CDK1. En revanche, un impact pourrait avoir lieu à la phase S d'un des deux premiers cycles. En effet, une sur-activation de CDK1 par mutation des sites de phosphorylations inhibitrices est létale pour l'embryon de souris en réponse notamment à des dommages à l'ADN (Szmyd et al. 2019).



Nous avons aussi montré que la néo-traduction des cyclines A et B, et dans une moindre mesure de PLK1, est nécessaire à la bonne dynamique du cycle cellulaire. La co-injection des morpholinos des cyclines A et B induit un effet synergique. Cependant, en déterminant le temps de clivage, le suivi de la dynamique porte sur un cycle entier. Comme initialement prévu au début de ma thèse, il est maintenant nécessaire de tester l'impact de ces inhibitions de néo-traduction sur des marqueurs de mitose au sein de la cellule en suivant les états de phosphorylation de PP1C (article 1 (Pontheaux et al. 2021)) et T3H3 (article 2 (Feizbakhsh et al. 2020)) (Figure 24).

D'autres marqueurs pourraient compléter l'étude avec notamment des marqueurs de la phase S comme l'accumulation de PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) au noyau en phase S des premiers cycles de l'embryon de drosophile (Kisielewska et al. 2005). Au moyen de ces marqueurs, la dynamique de leur apparition et disparition permettrait de mesurer les durées des différentes phases. En effet, les durées des phases S et M seraient intéressantes à étudier.

Comme discuté par (Kubiak et al. 2008; Polański et al. 2012), chez le xénope, la durée de phase mitotique peut être déterminée en extrait acellulaire par le suivi de l'activité H1Kinase, reflet de l'activité du complexe CycB/CDK1. Grâce à ce système, la surexpression de cycline B a montré un allongement de la durée de la phase mitotique. De même, une cycline B, dont la dissociation de CDK1 est empêchée, allonge aussi la mitose. À l'inverse, bloquer la traduction par un traitement à la cycloheximide avant l'entrée en mitose montre une accélération de la mitose (Chesnel et al. 2005) sans doute en accélérant le rétrocontrôle négatif sur la traduction de cycline B mis en évidence par (Kang and Pomerening 2011). Dans nos expériences, la dynamique globale du cycle est affectée, mais qu'en est-il de la dynamique des phases en particulier. Mitose retardée ou avancée, rallongée ou accélérée, il serait intéressant de suivre la pPP1 comme marqueur d'activité de CycB/CDK1 lors de l'inhibition ou la surexpression des traductions de cycline A et B.

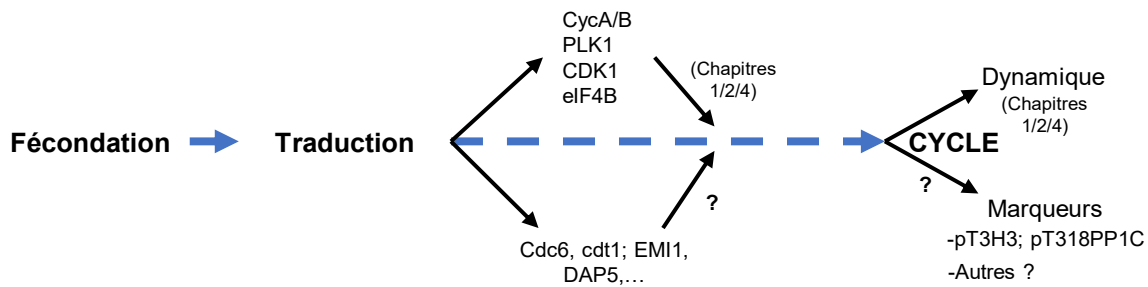
En plus de la compensation de cycline B par la cycline A proposée par Voronina et al, le complexe CycA/CDK1 est également impliqué dans l'activation de CycB/CDK1. En cellules humaines, CycA/CDK1 contrôle Greatwall et les kinases inhibitrices de CDK1 (Hégarat et al. 2020), mais participe aussi à la bonne dynamique de l'activité H1kinase en extrait méiotique chez le xénope (El Dika et al. 2021). L'effet synergique de Mo-CycA+B chez l'oursin pourrait s'expliquer par ce contrôle complémentaire des kinases. La surexpression de la cycline A et le

suivi de la pPP1 apporterait des éléments de réflexion sur ce contrôle dans un contexte de mitoses embryonnaires.

Les résultats des morpholinos et l'étude plus complète de l'effet des cyclines néo-traduites chez l'oursin permettraient de discuter l'idée acceptée que seule la dégradation des cyclines permet le contrôle précis de la dynamique du cycle. Le contrôle traductionnel des cyclines pourrait jouer un rôle aussi important.

Le suivi de ces différents marqueurs des phases du cycle cellulaire est d'autant plus intéressant que d'autres acteurs du cycle cellulaire voient leur ARNm néo-recrutés à la fécondation. Parmi eux, sont présents des acteurs de la phase S comme *Emi1*, *cdc6*, *cdt1*, etc (Figure 24). Le facteur *Emi1* inhibe notamment l'APC/*C<sup>CDH1</sup>* à la transition G1/S pour permettre l'entrée en phase S (Cappell et al. 2018). L'inhibition de sa néo-traduction à la fécondation chez l'oursin pourrait bloquer l'entrée du premier ou second cycle. Dans la même idée, les acteurs *cdc6* et *cdt1* sont impliqués dans l'initiation de la réplication du génome en phase S et doivent être inhibés pour éviter toute ré-initiation (Muñoz et al. 2017). L'inhibition de leur néo-traduction impliquerait certainement des défauts de réplication engageant alors les points de contrôles du cycle cellulaire. Également, *cdc6* est impliqué dans un contrôle de la phase M. En effet, chez l'embryon de souris, *cdc6* inhibe l'activité de CDK1 induisant une activation du complexe mitotique lente et repoussant le passage du seuil d'activation nécessaire au passage en phase M (El Dika et al. 2014). Si ce contrôle de *cdc6* sur CDK1 est conservé chez l'embryon d'oursin, l'inhibition de la néo-traduction de *cdc6* pourrait retarder la sortie de phase S, avec potentiellement des défauts de réplication, mais pourrait ensuite accélérer l'entrée en phase M. Dans ce cas, l'étude spécifique de chaque phase en réponse à la fécondation chez l'oursin devient nécessaire.

Parmi les ARNm recrutés à la fécondation, l'ARNm d'eIF4B est le seul des acteurs du complexe d'initiation canonique eIF4F. Cependant d'autres facteurs de la traduction voient leur ARNm recruté à la fécondation dont le facteur DAP5 (Chassé, Boulben, Cormier, et al. 2019). L'inhibition de sa néo-traduction par morpholino devra être testée et l'impact sur la traduction et le cycle devra être investigué à l'instar de l'étude d'eIF4B. De plus, DAP5 a été montré comme régulant la traduction de l'ARNm de CDK1 en cellules humaines et participe ainsi à maintenir la viabilité des cellules (Marash et al. 2008). Cette caractéristique pourra être testée également à l'aide du système rapporteur et du 5'UTR de CDK1 en condition de déplétion ou de surexpression de DAP5.



*Figure 24 La néo-traduction régulatrice de la dynamique du cycle*

À la fécondation chez l'oursin, l'augmentation de la traduction est nécessaire dès la première division. Les néo-traductions spécifiques des ARNm de cyclines A et B, PLK1, CDK1 et eIF4B ont montré leur implication dans le contrôle de la dynamique du cycle cellulaire (chapitres 1, 2, 4). D'autres acteurs du cycle cellulaire ou de la traduction voient leur ARNm néo-recruté à la fécondation (cdc6, cdt1, EMI1, DAP5, ...) et leur impact sur la dynamique du cycle est à déterminer. Aussi, l'impact de ces néo-traductions devra être testé sur des marqueurs biologiques d'activités enzymatiques spécifiques de phases du cycle.

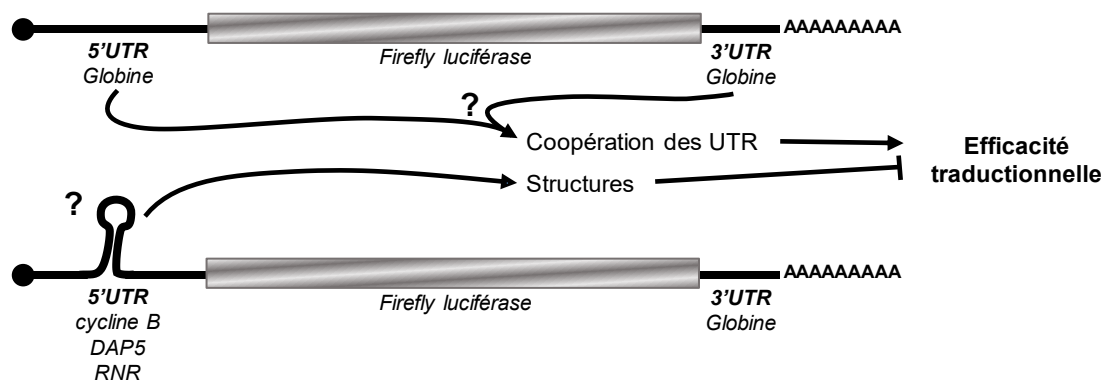
### 3. Contrôles des néo-recrutements d'ARNm

Nous avons vu au cours du chapitre 3 des résultats que nous sommes capables de mesurer et comparer l'efficacité traductionnelle *in vivo* d'UTR d'ARNm. Ce système a notamment permis l'analyse de la stimulation de traduction par le facteur eIF4B (Article 4 – en préparation). Ce système permettra de compléter cette étude par le suivi de l'impact de l'inhibition de la traduction d'eIF4B sur cette efficacité traductionnelle d'UTR spécifiques et notamment ceux d'acteurs du cycle cellulaire (voir discussion chapitre 4). Les données préliminaires autour des différentes efficacités et l'impact similaire de l'inhibition de la voie mTOR posent plusieurs questions.

En ce qui concerne l'ARNm Glob-Fluc, pourquoi est-il si efficace ? Chez le xénope, la beta Globine est particulièrement bien traduite (Meza et al. 1978). Cette construction est alors parfaite pour une utilisation de standard et contrôle positif. L'importante efficacité traductionnelle de l'ARNm Glob-Fluc pourrait être expliquée par un aspect physique des UTR. Nous avons vu que les structures d'ARNm peuvent jouer sur la capacité et la vitesse de scan du 5'UTR. Des différences structurelles des 5'UTR de Globine, cycline B, DAP5 ou RNR pourraient expliquer ces différences d'efficacité traductionnelle. Celui de l'ARNm 5'Glob-Fluc ne serait pas structuré et serait plus aisément scanné et traduit, tandis que des structures au sein des autres 5'UTR ralentiraient l'initiation de la traduction.

L'efficacité de traduction de l'ARNm Glob-Fluc pourrait également être expliquée par une coopérativité des UTR. En effet, cette construction possède les 5' et 3'UTR de la Globine, permettant potentiellement une coopération lors de la circularisation de l'ARNm à l'initiation.

La communication, entre les régions 5' et 3' UTR d'un messager représente un moyen efficace de contrôler l'activité traductionnelle (Alekhina et al. 2020). Ce mécanisme de circularisation de l'ARNm est observé dans de nombreux exemples faisant participer des facteurs de traduction ou des RBP (Mazumder et al. 2003). C'est notamment le cas de l'ARNm de cycline B lors de la maturation méiotique chez le xénope, déjà vu en introduction, nécessitant une queue poly(A) longue pour recruter la machinerie sur le 5'UTR. Il sera alors nécessaire de tester de futures constructions possédant les deux UTR d'un même ARNm d'origine ('natif') et les comparer aux efficacités traductionnelles des UTR 'isolés'. Cette hypothèse de coopération des UTR expliquerait que le 3'UTR de cycline B présente une efficacité traductionnelle équivalente au 5'UTR de cycline B. Cependant, il est important de rappeler que le 5'UTR de cycline B testé correspond à celui de l'espèce *Sphaerechinus granularis* tandis que le 3'UTR de cycline B testé est celui de l'espèce *Paracentrotus lividus* dont la construction a été fournie aimablement par Stefania Castagnetti (LBDV). La continuité de l'étude nécessite alors de réaliser les tests avec des ARNm ayant les 5', 3' provenant de la même espèce pour tester les hypothèses de coopérativité des UTR ainsi que la comparaison des efficacités faces aux inhibiteurs de voie de signalisation (Figure 25).



*Figure 25 Influence des UTR sur l'activité traductionnelle de l'ARNm*

Les ARNm rapporteurs possédant les 5'UTR de globine, cycline B, DAP5 ou RNR présentent des efficacités traductionnelles différentes (Chapitre 3). La possibilité d'une coopération des UTR issus du même ARNm pourrait expliquer l'activité traductionnelle forte de l'ARNm rapporteur. Des structures stables au sein des 5'UTR des ARNm expliqueraient quant à eux des efficacités de traduction plus faible comparées à un 5'UTR non structuré. Ces hypothèses sont à étudier.

À la fécondation chez l'oursin, les recrutements d'ARNm dans les polysomes ont montré des sensibilités différentes à l'inhibition de la voie mTOR par le PP242 (Chassé et al. 2018). Cependant, l'activité traductionnelle des constructions ARNm injectés n'a pas révélé de différence de sensibilité (chapitre 3). Le néo-recrutement de DAP5 dans les polysomes actifs est notamment insensible à la drogue PP242, tandis que l'efficacité traductionnelle de son

5'UTR 'isolé' montre une sensibilité à PP242. Son néo-recrutement insensible à PP242 à la fécondation pourrait alors impliquer les deux UTR qui devront alors être testés au sein d'une même construction d'ARNm rapporteur.

L'étude des différences d'efficacité de traduction contrôlée par les régions 5' et 3'UTR nécessite donc encore d'élargir le panel d'UTR isolés testés, de tester la coopérativité d'UTR d'un même ARNm mais également de les tester dans différentes conditions de voies de signalisation inhibées.

## **B. Un réseau de régulation de la traduction : le TIRN**

### **1. TIRN et dynamique mitotique à la fécondation chez l'oursin**

La fécondation chez l'oursin permet la reprise de divisions mitotiques rapides et synchrones pour démarrer le développement d'un nouvel organisme. L'œuf fécondé démarre alors ses premiers cycles de divisions sur les réserves maternelles accumulées. Durant cette période de vie précoce de l'embryon d'oursin, la synthèse de protéines ne se fait que sur les réserves d'ARNm maternels de l'ovule. La transcription du génome zygotique n'est que minoritaire à partir du stade 2 cellules et ne deviendra nécessaire à l'embryon qu'au quatrième cycle de divisions. La traduction des ARNm durant ces stades est donc le contrôle majeur permettant l'augmentation de la synthèse protéique. L'analyse du traductome, des régulations en amont permettant la désinhibition de la machinerie de traduction ainsi que l'influence des acteurs néo-traduits sur le cycle cellulaire en réponse à la fécondation suggère l'existence d'un réseau de régulation par la traduction d'ARNm : un 'Translation Regulatory Network'.

Initialement proposé sous le nom de TRN (Chassé et al. 2018), un problème de nomenclature risque cependant d'apparaître. En effet, le 'Translation Regulatory Network' ne doit pas être confondu avec le TRN (Transcriptional Regulatory Network) qui décrit les interactions entre facteurs de transcriptions et gènes cibles (Muley and König 2022). Nous avons pensé le nommer pTRN (pour protein Translation Regulatory Network), mais ces abréviations se confrontent au PTRN (Post-Translation Regulatory Network) qui porte sur les changements post-traductionnels que peuvent subir les protéines (Zhang et al. 2016). Nous proposons donc de le renommer TIRN (Translation Regulatory Network) pour le distinguer des autres réseaux de régulation.

Le TIRN embryonnaire de l'oursin, présenté en Figure 26, débute avec la fécondation qui libère la machinerie de traduction de ses régulations inhibitrices sur eIF4E, eIF2 $\alpha$  et eEF2, qui peuvent participer à la traduction. La libération de l'activité traductionnelle permet alors le

recrutement de 18% des ARNm maternels dans la machinerie de traduction. Le mécanisme de sélection n'est pas encore déterminé mais les éléments cis-régulateurs des ARNm ont certainement une influence dans ce mécanisme. Au cours de ma thèse, j'ai pu intégrer un nouvel acteur dans ce réseau traductionnel, avec la traduction du facteur eIF4B et son effet positif sur l'activité traductionnelle. L'étude des ARNm cibles potentiels d'eIF4B permettra potentiellement d'impliquer eIF4B dans la traduction des acteurs du cycle, ce qui expliquerait ainsi son action d'accélérateur de la dynamique mitotique en cas de surexpression (article 4). Mes travaux de thèse se sont intéressés au lien entre dynamique mitotique et synthèse protéique, cependant, ce TIRN permettrait également d'impliquer des contrôles de la dynamique du développement plus tardif. En effet, des acteurs du dGRN voient leur ARNm néo-recrutés également en réponse à la fécondation. Dans l'établissement de ce TIRN, nous pouvons penser que celui-ci va permettre l'établissement de premières régulations liées au dGRN afin de réguler l'embryogénèse.

Ce TIRN est encore à agrémenter de contrôles supplémentaires. Les autres acteurs de la traduction vont très certainement révéler leur impact sur la traduction globale ou spécifique. De même pour les acteurs du cycle cellulaire, pour le moment aucun des acteurs testés ne bloque totalement une des premières divisions. Cela implique qu'il n'y a pour l'instant pas de néo-traduction d'un acteur identifié essentiel à la reprise du cycle, mais que c'est un ensemble d'acteurs, agissant en concordance au sein de ce TIRN, qui permettent la progression des premiers cycles.

Au final ce TIRN implique de nombreuses cibles et régulations potentielles qui vont dans le sens d'une activation de la synthèse protéique pour permettre la production de facteurs de cycle ou de la traduction qui vont alors influencer sur la dynamique des premières divisions. Ainsi, ce TIRN serait un moyen d'induire les divisions rapides de l'embryon afin d'arriver rapidement à un stade de développement où l'embryon est capable de se déplacer dans la colonne d'eau et de se nourrir. En effet, l'ovule d'oursin est relativement pauvre en vitellus (oligolécithe) et la nutrition est rapidement nécessaire afin de permettre la métamorphose. Certaines espèces d'oursins présentées dans l'article 1 telles que *Heliocidaris erythrogramma*, semblent avoir évoluées différemment et présentent des œufs de diamètre 5 fois supérieur aux ovules de *Sphaerechinus granularis* ou *Paracentrotus lividus* permettant de directement se développer sans passer par les stades pré-métamorphose de la larve. Une approche comparative des TIRN potentiels impliqués au cours de l'évolution du phylum des échinodermes pourrait ainsi être informatif.

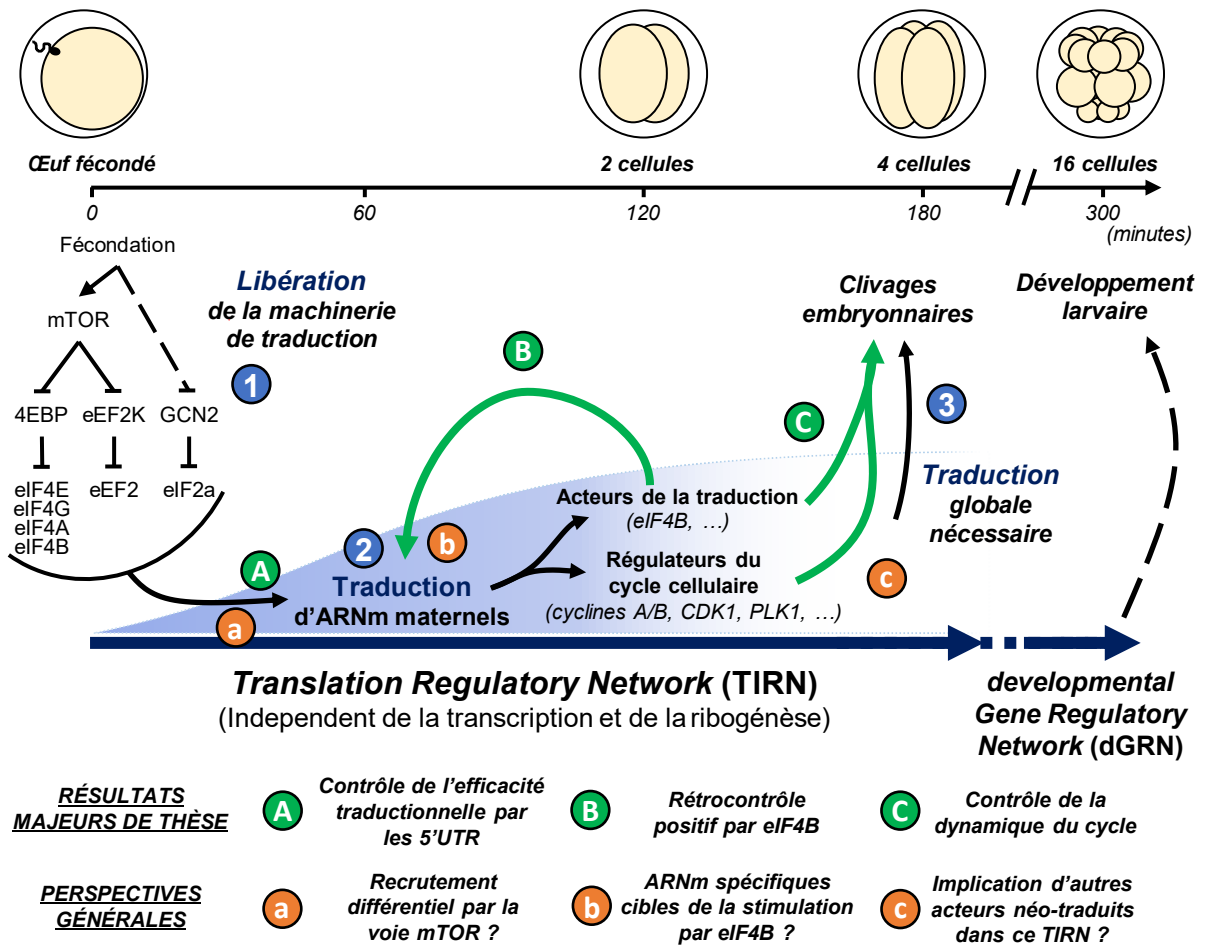


Figure 26 Translation Regulatory Network (TIRN) embryonnaire chez l'oursin

Le modèle présente les résultats majeurs de la thèse (A, B, C) et les perspectives générales de ces travaux (a, b, c) au sein du modèle « avant-thèse » présenté en Figure 18. (1, 2, 3) La fécondation induit la libération de la machinerie de traduction permettant la traduction d'une sélection d'ARNm nécessaire aux premiers cycles mitotiques. (A) Les 5'UTR des ARNm permettent une régulation de l'efficacité traductionnelle de l'ARNm. (a) La régulation différentielle des recrutements d'ARNm par la voie mTOR n'est cependant pas expliquée par les 5'UTR seul, cela reste à préciser. (B) La synthèse d'eIF4B participe à stimuler la traduction d'ARNm. (b) Cependant, il reste à déterminer si eIF4B stimule la traduction d'ARNm spécifiques. (C) Les néo-traductions des cyclines A et B, CDK1, PLK1 et eIF4B permettent de réguler la dynamique des premières divisions mitotiques. (c) L'implication de la néo-traduction d'autres acteurs à la fécondation restent à déterminer afin d'agréments ce TIRN.

## **2. Le TIRN dans d'autres contextes cellulaires**

Le TIRN (Translation Regulatory Network) est donc un réseau de régulation de la traduction dans un contexte cellulaire où la modulation de la transcription n'intervient pas dans la modulation du protéome. C'est donc notamment le cas dans les contextes cellulaires où la transcription n'a pas lieu. Chez l'oursin, il s'agit donc d'un TIRN embryonnaire post-fécondation et dans un contexte de cycles mitotiques.

Le principe d'un TIRN est nouveau dans la littérature, cependant des réseaux de régulation de la traduction ont pourtant été mis en évidence dans d'autres contextes cellulaires. Nous pouvons notamment citer le contexte de la phase de mitose où les chromosomes, une fois compactés, ne permettent plus de transcription (Zaret 2014). La synthèse protéique observée en mitose n'est donc plus la résultante d'un contrôle transcriptionnel. Également, dans un contexte de fécondation mais cette fois lié à la méiose, des arrêts méiotiques nécessitent la néo-synthèse de cycline B notamment pour permettre la reprise du cycle. Menneau et ses collaborateurs présentent justement un réseau de régulations de la traduction qui permettent la progression en méiose dans l'ovocyte de xénope (Meneau et al. 2020). Chez la souris aussi, en réponse à la fécondation, la néo-traduction d'ARNm spécifiques est régulée par des éléments cis-régulateurs des ARNm (Potireddy et al. 2010). Un TIRN peut également être décrit dans des contextes de différenciations cellulaires. C'est le cas de l'érythropoïèse où la maturation de ces cellules passe par l'énucléation. Le stock d'ARNm n'est alors plus renouvelé dans ce cas. Les changements de l'environnement sanguin (disponibilité en fer, présence d'espèces réactives de l'oxygène, etc.) vont ainsi induire des modulations rapides de la synthèse protéique pour s'y adapter (Vatikioti et al. 2019).

## **3. Oursin, TIRN et environnement**

L'oursin, comme décrit dans l'article 1, est un modèle idéal d'étude au croisement entre écologie, biologie cellulaire et développementale. L'œuf, l'embryon et son développement sont d'excellents moyens d'étude de l'impact de variations environnementales (concentration en éléments chimiques voire toxique, pH, température) sur ces processus biologiques. Il est aussi admis que la traduction des ARNm est un moyen de répondre rapidement et spécifiquement à des signaux environnementaux. Le TIRN est alors le réseau moléculaire qui va intégrer en premier ces signaux. L'ovule d'oursin pondu, dans ses conditions naturelles, est au sein d'un environnement océanique massif et extrêmement changeant à court, moyen et long terme. Les



changements de température peuvent influencer sur les vitesses de réactions chimiques dont la traduction (Peck 2016), ou encore sur les acteurs tels que les ARNt (Lorenz et al. 2017). Les éléments toxiques peuvent induire des stress à la cellule qui seront alors reçus par la voie de signalisation mTOR comme chez la daphnie pour laquelle la fécondité diminue en réponse aux nanoplastiques *via* mTOR (Zhiquan Liu et al. 2021). Chez l'oursin, ces signaux pourraient impacter *in fine*, *via* le TIRN, les divisions précoces de l'embryon. L'embryon d'oursin pourrait donc se révéler être un modèle intéressant pour étudier la relation entre le cycle cellulaire et la traduction au sein d'un environnement très variable.

## IV. Conclusion générale

Avant la réalisation de ces travaux de thèse, il était acquis que la fécondation chez l'oursin enclenchait une synthèse protéique qui était nécessaire pour la progression de la première division. Cette synthèse portait notamment sur un recrutement d'une sélection de 2514 ARNm parmi les 14002 ARNm maternels (Figure 18).

La réalisation de ces travaux de thèse a permis d'obtenir des résultats importants sur la relation qu'il y a entre la régulation de la traduction et le cycle cellulaire (Figure 26). Plus précisément, ces travaux ont permis d'appréhender les contrôles de l'efficacité traductionnelle d'ARNm et de la dynamique mitotique induits par la fécondation chez l'oursin. Ce dialogue se matérialise notamment par un réseau de régulation de la traduction (TIRN) induit par la fécondation et permettant en retour la régulation de la dynamique du cycle. Ce TIRN permet ainsi le contrôle des clivages embryonnaires précoces en amont du dGRN qui régule l'embryogénèse.

Au sein de ce TIRN, les travaux de thèse ont permis de mettre en évidence le contrôle de la dynamique du cycle par la traduction d'ARNm spécifique tels que les cyclines A et B, PLK1, CDK1 ou encore eIF4B. Ces impacts de leur néo-traduction sur le cycle devront être précisés à l'aide de marqueurs de phases du cycle cellulaire tels que ceux étudiés durant la thèse. Le facteur eIF4B est d'autant plus important au sein de ce TIRN que la protéine néo-traduite est capable de stimuler en retour la traduction en réponse à la fécondation. C'est notamment la première mise en évidence d'un rétrocontrôle positif au sein du TIRN. Son impact sur la traduction d'ARNm potentiellement spécifique pourra être détaillé grâce au système décrit dans le chapitre 3. Ce système a notamment permis de démontrer que les régions 5'UTR d'ARNm permettent de contrôler l'efficacité de la traduction de l'ARNm mais n'explique en revanche pas les contrôles différentiels de la voie mTOR sur le recrutement des ARNm à la fécondation.

L'ensemble de ces travaux sur la régulation fine de la traduction *via* le TIRN qui influe sur la dynamique du cycle embryonnaire permet de donner des arguments supplémentaires sur l'importance de comprendre le dialogue intime entre les deux mécanismes, dans un contexte cellulaire physiologique et pathologique.



## **Bibliographie**

- Abramson, R. D., T. E. Dever, T. G. Lawson, B. K. Ray, R. E. Thach, and W. C. Merrick. 1987. "The ATP-Dependent Interaction of Eukaryotic Initiation Factors with mRNA." *Journal of Biological Chemistry* 262 (8): 3826–32. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)61430-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)61430-9).
- Afonso, O., I. Matos, A. J. Pereira, P. Aguiar, M. A. Lampson, and H. Maiato. 2014. "Feedback Control of Chromosome Separation by a Midzone Aurora B Gradient." *Science* 345 (6194): 332–36. <https://doi.org/10.1126/science.1251121>.
- Afonso, Olga, Colleen M Castellani, Liam P Cheeseman, Jorge G Ferreira, Bernardo Orr, Luisa T Ferreira, James J Chambers, Eurico Morais-de-Sá, Thomas J Maresca, and Helder Maiato. 2019. "Spatiotemporal Control of Mitotic Exit during Anaphase by an Aurora B-Cdk1 Crosstalk." *ELife* 8 (August): e47646. <https://doi.org/10.7554/eLife.47646>.
- Alard, Amandine, Catherine Marboeuf, Bertrand Fabre, Christine Jean, Yvan Martineau, Frédéric Lopez, Patrice Vende, et al. 2019. "Differential Regulation of the Three Eukaryotic mRNA Translation Initiation Factor (EIF) 4Gs by the Proteasome." *Frontiers in Genetics* 10: 254. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00254>.
- Alekhina, Olga M., Ilya M. Terenin, Sergey E. Dmitriev, and Konstantin S. Vassilenko. 2020. "Functional Cyclization of Eukaryotic MRNAs." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (5): 1677. <https://doi.org/10.3390/ijms21051677>.
- Aliouat, Affaf, Isabelle Hatin, Pierre Bertin, Pauline François, Vèrène Stierlé, Olivier Namy, Samia Salhi, and Olivier Jean-Jean. 2019. "Divergent Effects of Translation Termination Factor ERF3A and Nonsense-Mediated mRNA Decay Factor UPF1 on the Expression of UORF Carrying MRNAs and Ribosome Protein Genes." *RNA Biology*, October, 1–13. <https://doi.org/10.1080/15476286.2019.1674595>.
- Altmann, M., P.P. Müller, B. Wittmer, F. Ruchti, S. Lancker, and H. Trachsel. 1993. "A *Saccharomyces Cerevisiae* Homologue of Mammalian Translation Initiation Factor 4B Contributes to RNA Helicase Activity." *The EMBO Journal* 12 (10): 3997–4003. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb06077.x>.
- Alves, Viviane S., Fabiana L. Motta, Martín Roffé, Arthur Delamano, João B. Pesquero, and Beatriz A. Castilho. 2009. "GCN2 Activation and EIF2alpha Phosphorylation in the Maturation of Mouse Oocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (1): 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.10.161>.
- Amiel, Aldine, Lucas Leclère, Lucie Robert, Sandra Chevalier, and Evelyn Houliston. 2009. "Conserved Functions for Mos in Eumetazoan Oocyte Maturation Revealed by Studies in a Cnidarian." *Current Biology* 19 (4): 305–11. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.12.054>.
- Anda, Silje, and Beáta Grallert. 2019. "Cell-Cycle-Dependent Regulation of Translation: New Interpretations of Old Observations in Light of New Approaches." *BioEssays* 41 (8): 1900022. <https://doi.org/10.1002/bies.201900022>.
- Andreev, Dmitri E., Sergey E. Dmitriev, Gary Loughran, Ilya M. Terenin, Pavel V. Baranov, and Ivan N. Shatsky. 2018. "Translation Control of MRNAs Encoding Mammalian Translation Initiation Factors." *Gene* 651 (April): 174–82. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.02.013>.
- Andreou, Alexandra Zoi, Ulf Harms, and Dagmar Klostermeier. 2017. "EIF4B Stimulates EIF4A ATPase and Unwinding Activities by Direct Interaction through Its 7-Repeats Region." *RNA Biology* 14 (1): 113–23. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1259782>.
- Andreou, Alexandra Zoi, and Dagmar Klostermeier. 2014. "EIF4B and EIF4G Jointly Stimulate EIF4A ATPase and Unwinding Activities by Modulation of the EIF4A

- Conformational Cycle.” *Journal of Molecular Biology* 426 (1): 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.027>.
- Angerer, Lynne M., and Robert C. Angerer. 2004. “Disruption of Gene Function Using Antisense Morpholinos.” In *Methods in Cell Biology*, 74:699–711. Development of Sea Urchins, Ascidians, and Other Invertebrate Deuterostomes: Experimental Approaches. Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(04\)74028-5](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(04)74028-5).
- Argüello, Rafael J., Marisa Reverendo, Andreia Mendes, Voahirana Camosseto, Adrian G. Torres, Lluís Ribas de Pouplana, Serge A. van de Pavert, Evelina Gatti, and Philippe Pierre. 2018. “SunRiSE – Measuring Translation Elongation at Single-Cell Resolution by Means of Flow Cytometry.” *Journal of Cell Science* 131 (10): jcs214346. <https://doi.org/10.1242/jcs.214346>.
- Arion, D., L. Meijer, L. Brizuela, and D. Beach. 1988. “Cdc2 Is a Component of the M Phase-Specific Histone H1 Kinase: Evidence for Identity with MPF.” *Cell* 55 (2): 371–78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90060-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90060-8).
- Aulas, Anaïs, Marta M. Fay, Shawn M. Lyons, Christopher A. Achorn, Nancy Kedersha, Paul Anderson, and Pavel Ivanov. 2017. “Stress-Specific Differences in Assembly and Composition of Stress Granules and Related Foci.” *Journal of Cell Science* 130 (5): 927–37. <https://doi.org/10.1242/jcs.199240>.
- Ayache, Jessica, Marianne Bénard, Michèle Ernoult-Lange, Nicola Minshall, Nancy Standart, Michel Kress, and Dominique Weil. 2015. “P-Body Assembly Requires DDX6 Repression Complexes Rather than Decay or Ataxin2/2L Complexes.” *Molecular Biology of the Cell* 26 (14): 2579–95. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-03-0136>.
- Ayeni, J. O., and S. D. Campbell. 2014. “‘Ready, Set, Go’: Checkpoint Regulation by Cdk1 Inhibitory Phosphorylation.” *Fly* 8 (3): 140–47. <https://doi.org/10.4161/19336934.2014.969147>.
- Bah, Alaji, Robert M. Vernon, Zeba Siddiqui, Mickaël Krzeminski, Ranjith Muhandiram, Charlie Zhao, Nahum Sonenberg, Lewis E. Kay, and Julie D. Forman-Kay. 2015. “Folding of an Intrinsically Disordered Protein by Phosphorylation as a Regulatory Switch.” *Nature* 519 (7541): 106–9. <https://doi.org/10.1038/nature13999>.
- Balakier, H. 1979. “Interspecific Heterokaryons between Oocytes and Blastomeres of the Mouse and the Bank Vole.” *The Journal of Experimental Zoology* 209 (2): 323–29. <https://doi.org/10.1002/jez.1402090213>.
- Bartek, Jiri, and Jiri Lukas. 2001. “Mammalian G1- and S-Phase Checkpoints in Response to DNA Damage.” *Current Opinion in Cell Biology* 13 (6): 738–47. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(00\)00280-5](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(00)00280-5).
- Bell, Elizabeth A., Patrick Boehnke, T. Mark Harrison, and Wendy L. Mao. 2015. “Potentially Biogenic Carbon Preserved in a 4.1 Billion-Year-Old Zircon.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (47): 14518–21. <https://doi.org/10.1073/pnas.1517557112>.
- Benne, R., J. Edman, R. R. Traut, and J. W. Hershey. 1978. “Phosphorylation of Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75 (1): 108–12.
- Benne, R., and J. W. Hershey. 1978. “The Mechanism of Action of Protein Synthesis Initiation Factors from Rabbit Reticulocytes.” *The Journal of Biological Chemistry* 253 (9): 3078–87.
- Benne, R., M. Luedi, and J. W. Hershey. 1977. “Purification and Characterization of Initiation Factors IF-E4 and IF-E6 from Rabbit Reticulocytes.” *Journal of Biological Chemistry* 252 (16): 5798–5803. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)40093-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)40093-7).

- Bertoli, Cosetta, Jan M. Skotheim, and Robertus A. M. de Bruin. 2013. “Control of Cell Cycle Transcription during G1 and S Phases.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 14 (8): 518–28. <https://doi.org/10.1038/nrm3629>.
- Besson, Arnaud, Steven F. Dowdy, and James M. Roberts. 2008. “CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond.” *Developmental Cell* 14 (2): 159–69. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2008.01.013>.
- Bettegazzi, Barbara, Serena Bellani, Paolo Roncon, Fabrizia Claudia Guarnieri, Alice Bertero, Franca Codazzi, Flavia Valtorta, Michele Simonato, Fabio Grohovaz, and Daniele Zacchetti. 2017. “EIF4B Phosphorylation at Ser504 Links Synaptic Activity with Protein Translation in Physiology and Pathology.” *Scientific Reports* 7 (September). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11096-1>.
- Bhattacharyya, Suvendra N., Regula Habermacher, Ursula Martine, Ellen I. Closs, and Witold Filipowicz. 2006. “Relief of MicroRNA-Mediated Translational Repression in Human Cells Subjected to Stress.” *Cell* 125 (6): 1111–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.031>.
- Biswas, Jeetayu, Yang Liu, Robert H. Singer, and Bin Wu. 2019. “Fluorescence Imaging Methods to Investigate Translation in Single Cells.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11 (4): a032722. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032722>.
- Blower, Michael D., Elma Feric, Karsten Weis, and Rebecca Heald. 2007. “Genome-Wide Analysis Demonstrates Conserved Localization of Messenger RNAs to Mitotic Microtubules.” *Journal of Cell Biology* 179 (7): 1365–73. <https://doi.org/10.1083/jcb.200705163>.
- Boccalletto, Pietro, and Błażej Bagiński. 2021. “MODOMICS: An Operational Guide to the Use of the RNA Modification Pathways Database.” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2284: 481–505. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1307-8\\_26](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1307-8_26).
- Boettcher, Barbara, and Yves Barral. 2013. “The Cell Biology of Open and Closed Mitosis.” *Nucleus* 4 (3): 160–65. <https://doi.org/10.4161/nucl.24676>.
- Boiani, Michele, Ellen Casser, Georg Fuellen, and Elisabeth S. Christians. 2019. “Totipotency Continuity from Zygote to Early Blastomeres: A Model under Revision.” *Reproduction* 158 (2): R49–65. <https://doi.org/10.1530/REP-18-0462>.
- Bonneau, A. M., and N. Sonenberg. 1987. “Involvement of the 24-KDa Cap-Binding Protein in Regulation of Protein Synthesis in Mitosis.” *The Journal of Biological Chemistry* 262 (23): 11134–39.
- Boulben, S., A. Monnier, M. Le Breton, J. Morales, P. Cormier, R. Bellé, and O. Mulner-Lorillon. 2003. “Sea Urchin Elongation Factor 1delta (EF1delta) and Evidence for Cell Cycle-Directed Localization Changes of a Sub-Fraction of the Protein at M Phase.” *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 60 (10): 2178–88. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3201-x>.
- Burgess, Andrew, Jenny Vuong, Kamila A. Marzec, Ulrik Nicolai de Lichtenberg, Seán I. O’Donoghue, and Lars Juhl Jensen. 2019. “SnapShot: S-Phase Entry and Exit.” *Cell* 179 (3): 802–802.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.031>.
- Burgess, Andrew, Jenny Vuong, Samuel Rogers, Marcos Malumbres, and Seán I. O’Donoghue. 2017. “SnapShot: Phosphoregulation of Mitosis.” *Cell* 169 (7): 1358–1358.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.003>.
- Burke, Kelly S., Katie A. Antilla, and David A. Tirrell. 2017. “A Fluorescence in Situ Hybridization Method To Quantify mRNA Translation by Visualizing Ribosome–mRNA Interactions in Single Cells.” *ACS Central Science* 3 (5): 425–33. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.7b00048>.
- Bushell, M., W. Wood, G. Carpenter, V. M. Pain, S. J. Morley, and M. J. Clemens. 2001. “Disruption of the Interaction of Mammalian Protein Synthesis Eukaryotic Initiation

- Factor 4B with the Poly(A)-Binding Protein by Caspase- and Viral Protease-Mediated Cleavages.” *The Journal of Biological Chemistry* 276 (26): 23922–28. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100384200>.
- Cappell, Steven D., Kevin G. Mark, Damien Garbett, Lindsey R. Pack, Michael Rape, and Tobias Meyer. 2018. “EMI1 Switches from Being a Substrate to an Inhibitor of APC/C CDH1 to Start the Cell Cycle.” *Nature* 558 (7709): 313–17. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0199-7>.
- Carmody, Sean R., and Susan R. Wentz. 2009. “MRNA Nuclear Export at a Glance.” *Journal of Cell Science* 122 (12): 1933–37. <https://doi.org/10.1242/jcs.041236>.
- Cen, Bo, Ying Xiong, Jin H. Song, Sandeep Mahajan, Rachel DuPont, Kristen McEachern, Daniel J. DeAngelo, et al. 2014. “The Pim-1 Protein Kinase Is an Important Regulator of MET Receptor Tyrosine Kinase Levels and Signaling.” *Molecular and Cellular Biology* 34 (13): 2517–32. <https://doi.org/10.1128/MCB.00147-14>.
- Chassé, Héloïse, Julie Aubert, Sandrine Boulben, Gildas Le Corguillé, Erwan Corre, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2018. “Translatome Analysis at the Egg-to-Embryo Transition in Sea Urchin.” *Nucleic Acids Research* 46 (9): 4607–21. <https://doi.org/10.1093/nar/gky258>.
- Chassé, Héloïse, Sandrine Boulben, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2019. “Translational Control of Canonical and Non-Canonical Translation Initiation Factors at the Sea Urchin Egg to Embryo Transition.” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (3): 626. <https://doi.org/10.3390/ijms20030626>.
- Chassé, Héloïse, Sandrine Boulben, Virginie Glippa, Florian Pontheaux, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2019. “In Vivo Analysis of Protein Translation Activity in Sea Urchin Eggs and Embryos.” In *Methods in Cell Biology*, 151:335–52. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.mcb.2018.10.008>.
- Chassé, Héloïse, Odile Mulner-Lorillon, Sandrine Boulben, Julia Morales, and Patrick Cormier. 2016. “Cyclin B Translation Depends on MTOR Activity after Fertilization in Sea Urchin Embryos.” *PLOS ONE* 11. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0150318>.
- Chen, C., Z. Zhang, P. Cui, Y. Liao, Y. Zhang, L. Yao, R. Rui, and S. Ju. 2017. “Phosphorylation of Histone H3 on Ser-10 by Aurora B Is Essential for Chromosome Condensation in Porcine Embryos during the First Mitotic Division.” *Histochem Cell Biol* 148 (1): 73–83. <https://doi.org/10.1007/s00418-017-1546-8>.
- Chen, Ke, Jianling Yang, Jianning Li, Xuefei Wang, Yuhai Chen, Shile Huang, and Ji-Long Chen. 2016. “EIF4B Is a Convergent Target and Critical Effector of Oncogenic Pim and PI3K/Akt/MTOR Signaling Pathways in Abl Transformants.” *Oncotarget* 7 (9): 10073–89. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7164>.
- Chen, Lian, and John J. Wiens. 2021. “Multicellularity and Sex Helped Shape the Tree of Life.” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 288 (1955): 20211265. <https://doi.org/10.1098/rspb.2021.1265>.
- Chenevert, Janet, Marianne Roca, Lydia Besnardeau, Antonella Ruggiero, Dalileh Nabi, Alex McDougall, Richard R. Copley, Elisabeth Christians, and Stefania Castagnetti. 2020. “The Spindle Assembly Checkpoint Functions during Early Development in Non-Chordate Embryos.” *Cells* 9 (5): 1087. <https://doi.org/10.3390/cells9051087>.
- Chesnel, Franck, Françoise Vignaux, Laurent Richard-Parpaillon, Antoine Huguet, and Jacek Z. Kubiak. 2005. “Differences in Regulation of the First Two M-Phases in *Xenopus Laevis* Embryo Cell-Free Extracts.” *Developmental Biology* 285 (2): 358–75. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.06.028>.
- Choi, Seung H., Thomas F. Martinez, Seongjae Kim, Cynthia Donaldson, Maxim N. Shokhirev, Alan Saghatelian, and Katherine A. Jones. 2019. “CDK12 Phosphorylates 4E-BP1 to

- Enable MTORC1-Dependent Translation and Mitotic Genome Stability.” *Genes & Development* 33 (7–8): 418–35. <https://doi.org/10.1101/gad.322339.118>.
- Chu, Jennifer, Marie Cargnello, Ivan Topisirovic, and Jerry Pelletier. 2016. “Translation Initiation Factors: Reprogramming Protein Synthesis in Cancer.” *Trends in Cell Biology* 26 (12): 918–33. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2016.06.005>.
- Cimini, Daniela, Xiaohu Wan, Christophe B. Hirel, and E. D. Salmon. 2006. “Aurora Kinase Promotes Turnover of Kinetochore Microtubules to Reduce Chromosome Segregation Errors.” *Current Biology* 16 (17): 1711–18. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.07.022>.
- Cockman, Eric, Paul Anderson, and Pavel Ivanov. 2020. “TOP MRNPs: Molecular Mechanisms and Principles of Regulation.” *Biomolecules* 10 (7): E969. <https://doi.org/10.3390/biom10070969>.
- Colas, Pierre, and François Dubé. 1998. “Meiotic Maturation in Mollusc Oocytes.” *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9 (5): 539–48. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0248>.
- Coldwell Mj, Sack U, Cowan JI, Barrett Rm, Vlasak M, Sivakumaran K, and Morley Sj. 2012. “Multiple Isoforms of the Translation Initiation Factor EIF4GII Are Generated via Use of Alternative Promoters, Splice Sites and a Non-Canonical Initiation Codon.” *The Biochemical Journal* 448 (1). <https://doi.org/10.1042/BJ20111765>.
- Colgan, D. F., K. G. Murthy, W. Zhao, C. Prives, and J. L. Manley. 1998. “Inhibition of Poly(A) Polymerase Requires P34cdc2/Cyclin B Phosphorylation of Multiple Consensus and Non-Consensus Sites.” *The EMBO Journal* 17 (4): 1053–62. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1053>.
- Coots, Ryan A., Xiao-Min Liu, Yuanhui Mao, Leiming Dong, Jun Zhou, Ji Wan, Xingqian Zhang, and Shu-Bing Qian. 2017. “M6A Facilitates EIF4F-Independent MRNA Translation.” *Molecular Cell* 68 (3): 504–514.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.002>.
- Coppolecchia, R., P. Buser, A. Stotz, and P. Linder. 1993. “A New Yeast Translation Initiation Factor Suppresses a Mutation in the EIF-4A RNA Helicase.” *The EMBO Journal* 12 (10): 4005–11.
- Cormier, Patrick, Héloïse Chassé, Bertrand Cosson, Odile Mulner-Lorillon, and Julia Morales. 2016. “Translational Control in Echinoderms: The Calm Before the Storm.” In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, 413–34. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8\\_16](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8_16).
- Cormier, Patrick, Stéphane Pyronnet, Julia Morales, Odile Mulner-Lorillon, Nahum Sonenberg, and Robert Bellé. 2001. “EIF4E Association with 4E-BP Decreases Rapidly Following Fertilization in Sea Urchin.” *Developmental Biology* 232 (2): 275–83. <https://doi.org/10.1006/dbio.2001.0206>.
- Cormier, Patrick, Stéphane Pyronnet, Patrick Salaün, Odile Mulner-Lorillon, and Nahum Sonenberg. 2003. “Cap-Dependent Translation and Control of the Cell Cycle.” *Progress in Cell Cycle Research*.
- Costache, Vlad, Stefania Bilotto, Laurent Laguerre, Robert Bellé, Bertrand Cosson, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2012. “Dephosphorylation of EIF2 $\alpha$  Is Essential for Protein Synthesis Increase and Cell Cycle Progression after Sea Urchin Fertilization.” *Developmental Biology* 365 (1): 303–9. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.03.002>.
- Costache, Vlad, Alex McDougall, and Rémi Dumollard. 2014. “Cell Cycle Arrest and Activation of Development in Marine Invertebrate Deuterostomes.” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Fertilization and Early Development, 450 (3): 1175–81. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.03.155>.
- Crystal, R. G., and W. F. Anderson. 1972. “Initiation of Hemoglobin Synthesis: Comparison of Model Reactions That Use Artificial Templates with Those Using Natural Messenger



- RNA.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69 (3): 706–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.69.3.706>.
- Csibi, Alfredo, Gina Lee, Sang-Oh Yoon, Haoxuan Tong, Didem Ilter, Ilaria Elia, Sarah-Maria Fendt, Thomas M. Roberts, and John Blenis. 2014. “The MTORC1/S6K1 Pathway Regulates Glutamine Metabolism through the EIF4B-Dependent Control of c-Myc Translation.” *Current Biology* 24 (19): 2274–80. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.08.007>.
- Cuesta, Rafael, and Marina K. Holz. 2016. “RSK-Mediated down-Regulation of PDCD4 Is Required for Proliferation, Survival, and Migration in a Model of Triple-Negative Breast Cancer.” *Oncotarget* 7 (19): 27567–83. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8375>.
- Dai, J., B. A. Sullivan, and J. M. Higgins. 2006. “Regulation of Mitotic Chromosome Cohesion by Haspin and Aurora B.” *Dev Cell* 11 (5): 741–50. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.09.018>.
- Danaie, P., M. Altmann, M. N. Hall, H. Trachsel, and S. B. Helliwell. 1999. “CLN3 Expression Is Sufficient to Restore G1-to-S-Phase Progression in *Saccharomyces Cerevisiae* Mutants Defective in Translation Initiation Factor EIF4E.” *The Biochemical Journal* 340 ( Pt 1) (May): 135–41.
- Davis, P. K., A. Ho, and S. F. Dowdy. 2001. “Biological Methods for Cell-Cycle Synchronization of Mammalian Cells.” *BioTechniques* 30 (6): 1322–26, 1328, 1330–31. <https://doi.org/10.2144/01306rv01>.
- De Magistris, Paola. 2021. “The Great Escape: mRNA Export through the Nuclear Pore Complex.” *International Journal of Molecular Sciences* 22 (21): 11767. <https://doi.org/10.3390/ijms222111767>.
- Decker, Carolyn J., and Roy Parker. 2012. “P-Bodies and Stress Granules: Possible Roles in the Control of Translation and mRNA Degradation.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (9): a012286. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012286>.
- Dever, Thomas E., Jonathan D. Dinman, and Rachel Green. 2018. “Translation Elongation and Recoding in Eukaryotes.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (8): a032649. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032649>.
- Dobrikov, Mikhail, Elena Dobrikova, Mayya Shveygert, and Matthias Gromeier. 2011. “Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G1 (EIF4G1) by Protein Kinase C $\alpha$  Regulates EIF4G1 Binding to Mnk1.” *Molecular and Cellular Biology*, June. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/MCB.05589-11>.
- Dobrikov, Mikhail I., Mayya Shveygert, Michael C. Brown, and Matthias Gromeier. 2014. “Mitotic Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4G1 (EIF4G1) at Ser1232 by Cdk1: Cyclin B Inhibits EIF4A Helicase Complex Binding with RNA.” *Molecular and Cellular Biology*, January. <https://doi.org/10.1128/MCB.01046-13>.
- Dorée, M. 1990. “Control of M-Phase by Maturation-Promoting Factor.” *Current Opinion in Cell Biology* 2 (2): 269–73. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(90\)90018-A](https://doi.org/10.1016/0955-0674(90)90018-A).
- Dorée, M., J. C. Labbé, and A. Picard. 1989. “M Phase-Promoting Factor: Its Identification as the M Phase-Specific H1 Histone Kinase and Its Activation by Dephosphorylation.” *Journal of Cell Science. Supplement* 12: 39–51. [https://doi.org/10.1242/jcs.1989.supplement\\_12.5](https://doi.org/10.1242/jcs.1989.supplement_12.5).
- Dorée, Marcel, and Tim Hunt. 2002. “From Cdc2 to Cdk1: When Did the Cell Cycle Kinase Join Its Cyclin Partner?” *Journal of Cell Science* 115 (Pt 12): 2461–64.
- Dorrello, N. Valerio, Angelo Peschiaroli, Daniele Guardavaccaro, Nancy H. Colburn, Nicholas E. Sherman, and Michele Pagano. 2006. “S6K1- and BetaTRCP-Mediated Degradation of PDCD4 Promotes Protein Translation and Cell Growth.” *Science (New York, N.Y.)* 314 (5798): 467–71. <https://doi.org/10.1126/science.1130276>.

- Dostie, Nahum Sonenberg, Ferraiuolo, A. Pause, and A. Adam. 2000. "A Novel Shuttling Protein, 4E-T, Mediates the Nuclear Import of the mRNA 5' Cap-Binding Protein, EIF4E." *EMBO Journal*, 2000. <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/pmc/articles/PMC203362/>.
- Dubé, F. 1988. "Effect of Reduced Protein Synthesis on the Cell Cycle in Sea Urchin Embryos." *Journal of Cellular Physiology* 137 (3): 545–52. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041370321>.
- Dumollard, Rémi, Mark Levasseur, Céline Hebras, Philippe Huitorel, Michael Carroll, Jean-Philippe Chambon, and Alex McDougall. 2011. "Mos Limits the Number of Meiotic Divisions in Urochordate Eggs." *Development* 138 (5): 885–95. <https://doi.org/10.1242/dev.057133>.
- El Dika, Mohammed, Katarzyna Laskowska-Kaszub, Magdalena Koryto, Damian Dudka, Claude Prigent, Jean-Pierre Tassan, Malgorzata Kloc, Zbigniew Polanski, Ewa Borsuk, and Jacek Z. Kubiak. 2014. "CDC6 Controls Dynamics of the First Embryonic M-Phase Entry and Progression via CDK1 Inhibition." *Developmental Biology* 396 (1): 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.09.023>.
- El Dika, Mohammed, Lisa Wechselberger, Bilal Djeghout, Djamel Eddine Benouareth, Krystyna Jęderka, Sławomir Lewicki, Robert Zdanowski, Claude Prigent, Malgorzata Kloc, and Jacek Z. Kubiak. 2021. "Mitotic Timing Is Differentially Controlled by A- and B-Type Cyclins and by CDC6 Associated with a Bona Fide CDK Inhibitor Xic1 in *Xenopus Laevis* Cell-Free Extract." *The International Journal of Developmental Biology* 65 (7–8–9): 487–96. <https://doi.org/10.1387/ijdb.200313jk>.
- Eliseev, Boris, Lahari Yeramala, Alexander Leitner, Manikandan Karuppasamy, Etienne Raimondeau, Karine Huard, Elena Alkalaeva, Ruedi Aebersold, and Christiane Schaffitzel. 2018. "Structure of a Human Cap-Dependent 48S Translation Pre-Initiation Complex." *Nucleic Acids Research* 46 (5): 2678–89. <https://doi.org/10.1093/nar/gky054>.
- El-Naggar, Amal M, and Poul H Sorensen. 2018. "Translational Control of Aberrant Stress Responses as a Hallmark of Cancer." *The Journal of Pathology* 244 (5): 650–66. <https://doi.org/10.1002/path.5030>.
- Eswaran, Jeyanthi, Debasis Patnaik, Panagis Filippakopoulos, Fangwei Wang, Ross L. Stein, James W. Murray, Jonathan M. G. Higgins, and Stefan Knapp. 2009. "Structure and Functional Characterization of the Atypical Human Kinase Haspin." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (48): 20198–203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901989106>.
- Evans, Tom, Eric T. Rosenthal, Jim Youngblom, Dan Distel, and Tim Hunt. 1983. "Cyclin: A Protein Specified by Maternal mRNA in Sea Urchin Eggs That Is Destroyed at Each Cleavage Division." *Cell* 33 (2): 389–96. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(83\)90420-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90420-8).
- Fan, Hung, and Sheldon Penman. 1970. "Regulation of Protein Synthesis in Mammalian Cells: II. Inhibition of Protein Synthesis at the Level of Initiation during Mitosis." *Journal of Molecular Biology* 50 (3): 655–70. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90091-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90091-4).
- Fattaey, Ali, and Robert N. Booher. 1997. "Myt1: A Wee1-Type Kinase That Phosphorylates Cdc2 on Residue Thr14." In *Progress in Cell Cycle Research*, edited by Laurent Meijer, Silvana Guidet, and Michel Philippe, 233–40. Progress in Cell Cycle Research. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5371-7\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5371-7_18).
- Feizbakhsh, Omid, Matthieu Place, Xavier Fant, Frédéric Buron, Sylvain Routier, and Sandrine Ruchaud. 2017. "The Mitotic Protein Kinase Haspin and Its Inhibitors." *Protein Phosphorylation*, November. <https://doi.org/10.5772/intechopen.70732>.

- Feizbakhsh, Omid, Florian Pontheaux, Virginie Glippa, Julia Morales, Sandrine Ruchaud, Patrick Cormier, and Fernando Roch. 2020. "A Peak of H3T3 Phosphorylation Occurs in Synchrony with Mitosis in Sea Urchin Early Embryos." *Cells* 9 (4): 898. <https://doi.org/10.3390/cells9040898>.
- Feng, Chun-Wei, Josephine Bowles, and Peter Koopman. 2014. "Control of Mammalian Germ Cell Entry into Meiosis." *Molecular and Cellular Endocrinology* 382 (1): 488–97. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.026>.
- Fernandez-Guerra, Antonio, Antoine Aze, Julia Morales, Odile Mulner-Lorillon, Bertrand Cosson, Patrick Cormier, Cynthia Bradham, et al. 2006. "The Genomic Repertoire for Cell Cycle Control and DNA Metabolism in *S. Purpuratus*." *Developmental Biology, Sea Urchin Genome: Implications and Insights*, 300 (1): 238–51. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.09.012>.
- Fernandopulle, Michael S., Jennifer Lippincott-Schwartz, and Michael E. Ward. 2021. "RNA Transport and Local Translation in Neurodevelopmental and Neurodegenerative Disease." *Nature Neuroscience* 24 (5): 622–32. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00785-2>.
- Fisher, Daniel, Ariane Abrieu, Marie-Noëlle Simon, Stephen Keyse, Valérie Vergé, Marcel Dorée, and André Picard. 1998. "MAP Kinase Inactivation Is Required Only for G2–M Phase Transition in Early Embryogenesis Cell Cycles of the Starfishes *Marthasterias Glacialis* and *Astropecten Aranciacus*." *Developmental Biology* 202 (1): 1–13. <https://doi.org/10.1006/dbio.1998.8981>.
- Fragouli, Elpida, and Nicolas Garrido. 2020. "Human Female Meiosis Checkpoints: How Much DNA Damage Is Allowed?" *Fertility and Sterility* 113 (5): 943–44. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.01.023>.
- Fu, Jingyan, Iain M. Hagan, and David M. Glover. 2015. "The Centrosome and Its Duplication Cycle." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (2): a015800. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015800>.
- Fulka, J., J. Motlík, J. Fulka, and N. Crozet. 1985. "Inhibition of Nuclear Maturation in Fully Grown Porcine and Mouse Oocytes after Their Fusion with Growing Porcine Oocytes." *The Journal of Experimental Zoology* 235 (2): 255–59. <https://doi.org/10.1002/jez.1402350212>.
- Fuller, Brian G., Michael A. Lampson, Emily A. Foley, Sara Rosasco-Nitcher, Kim V. Le, Page Tobelmann, David L. Brautigam, P. Todd Stukenberg, and Tarun M. Kapoor. 2008. "Midzone Activation of Aurora B in Anaphase Produces an Intracellular Phosphorylation Gradient." *Nature* 453 (7198): 1132–36. <https://doi.org/10.1038/nature06923>.
- Ghenoiu, C., M. S. Wheelock, and H. Funabiki. 2013. "Autoinhibition and Polo-Dependent Multisite Phosphorylation Restrict Activity of the Histone H3 Kinase Haspin to Mitosis." *Molecular Cell* 52 (5): 734–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.10.002>.
- Gillespie, Kathleen M., Tsvetan R. Bachvaroff, and Rosemary Jagus. 2016. "Expansion of EIF4E and 4E-BP Family Members in Deuterostomes." In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, 165–85. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8_8).
- Gingras, A. C., S. P. Gygi, B. Raught, R. D. Polakiewicz, R. T. Abraham, M. F. Hoekstra, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 1999. "Regulation of 4E-BP1 Phosphorylation: A Novel Two-Step Mechanism." *Genes & Development* 13 (11): 1422–37. <https://doi.org/10.1101/gad.13.11.1422>.
- Gingras, A. C., S. G. Kennedy, M. A. O’Leary, N. Sonenberg, and N. Hay. 1998. "4E-BP1, a Repressor of mRNA Translation, Is Phosphorylated and Inactivated by the Akt(PKB)

- Signaling Pathway.” *Genes & Development* 12 (4): 502–13. <https://doi.org/10.1101/gad.12.4.502>.
- Glansdorff, Nicolas, Ying Xu, and Bernard Labedan. 2008. “The Last Universal Common Ancestor: Emergence, Constitution and Genetic Legacy of an Elusive Forerunner.” *Biology Direct* 3 (1): 29. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-29>.
- Godet, Anne-Claire, Florian David, Fransky Hantelys, Florence Tatin, Eric Lacazette, Barbara Garmy-Susini, and Anne-Catherine Prats. 2019. “IRES Trans-Acting Factors, Key Actors of the Stress Response.” *International Journal of Molecular Sciences* 20 (4): E924. <https://doi.org/10.3390/ijms20040924>.
- Gomes-Duarte, Andreia, Rafaela Lacerda, Juliane Menezes, and Luísa Romão. 2018. “EIF3: A Factor for Human Health and Disease.” *RNA Biology* 15 (1): 26–34. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1391437>.
- Goodman, Steven R., ed. 2021. “Chapter 10 - Cell Cycle and Cancer.” In *Goodman’s Medical Cell Biology (Fourth Edition)*, 295–313. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817927-7.00010-7>.
- Gorp, A. G. M. van, K. E. van der Vos, A. B. Brenkman, A. Bremer, N. van den Broek, F. Zwartkuis, J. W. Hershey, B. M. T. Burgering, C. F. Calkhoven, and P. J. Coffe. 2009. “AGC Kinases Regulate Phosphorylation and Activation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B.” *Oncogene* 28 (1): 95–106. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.367>.
- Green, G. R., P. Collas, A. Burrell, and D. L. Poccia. 1995. “Histone Phosphorylation during Sea Urchin Development.” *Semin Cell Biol* 6 (4): 219–27. <https://doi.org/10.1006/scel.1995.0030>.
- Grifo, J. A., R. D. Abramson, C. A. Satler, and W. C. Merrick. 1984. “RNA-Stimulated ATPase Activity of Eukaryotic Initiation Factors.” *The Journal of Biological Chemistry* 259 (13): 8648–54.
- Grifo, J. A., S. M. Tahara, J. P. Leis, M. A. Morgan, A. J. Shatkin, and W. C. Merrick. 1982. “Characterization of Eukaryotic Initiation Factor 4A, a Protein Involved in ATP-Dependent Binding of Globin mRNA.” *Journal of Biological Chemistry* 257 (9): 5246–52. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)34662-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)34662-3).
- Grifo, J. A., S. M. Tahara, M. A. Morgan, A. J. Shatkin, and W. C. Merrick. 1983. “New Initiation Factor Activity Required for Globin mRNA Translation.” *The Journal of Biological Chemistry* 258 (9): 5804–10.
- Groisman, I., Y. S. Huang, R. Mendez, Q. Cao, W. Theurkauf, and J. D. Richter. 2000. “CPEB, Maskin, and Cyclin B1 mRNA at the Mitotic Apparatus: Implications for Local Translational Control of Cell Division.” *Cell* 103 (3): 435–47. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00135-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00135-5).
- Groisman, I., Mi-Young Jung, Sarkissian, Quiping Cao, and Joel D. Richter. 2002. “Translational Control of the Embryonic Cell Cycle.” *Cell*, 2002. [https://www.sciencedirect.com/insb.bib.cnrs.fr/science/article/pii/S009286740200733X?\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_origin=gateway&\\_docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb&ccp=y](https://www.sciencedirect.com/insb.bib.cnrs.fr/science/article/pii/S009286740200733X?_rdoc=1&_fmt=high&_origin=gateway&_docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb&ccp=y).
- Gross, Paul R., and Gilles H. Cousineau. 1963a. “Effects of Actinomycin D on Macromolecule Synthesis and Early Development in Sea Urchin Eggs.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 10 (4): 321–26. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(63\)90532-1](https://doi.org/10.1016/0006-291X(63)90532-1).
- . 1963b. “SYNTHESIS OF SPINDLE-ASSOCIATED PROTEINS IN EARLY CLEAVAGE.” *Journal of Cell Biology* 19 (1): 260–65. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.1.260>.

- Hamdoun, Amro, and Kathy R. Foltz. 2019. "Methods in Cell Biology - Echinoderms." In *Methods in Cell Biology*. Vol. 150–151. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(19\)30046-9](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(19)30046-9).
- Hamill, D., J. Davis, J. Drawbridge, and K. A. Suprenant. 1994. "Polyribosome Targeting to Microtubules: Enrichment of Specific MRNAs in a Reconstituted Microtubule Preparation from Sea Urchin Embryos." *The Journal of Cell Biology* 127 (4): 973–84. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.4.973>.
- Hammond, Scott M. 2005. "Dicing and Slicing." *FEBS Letters* 579 (26): 5822–29. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.08.079>.
- Han, Areum, Kyung Hyun Lee, Soonsil Hyun, Nam Joo Lee, Su Jin Lee, Heeyong Hwang, and Jaehoon Yu. 2011. "Methylation-Mediated Control of Aurora Kinase B and Haspin with Epigenetically Modified Histone H3 N-Terminal Peptides." *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 19 (7): 2373–77. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.02.011>.
- Haneke, Katharina, Johanna Schott, Doris Lindner, Anne Kruse Hollensen, Christian Kroun Damgaard, Cyril Mongis, Michael Knop, Wilhelm Palm, Alessia Ruggieri, and Georg Stoecklin. 2020. "CDK1 Couples Proliferation with Protein Synthesis." *The Journal of Cell Biology* 219 (3): e201906147. <https://doi.org/10.1083/jcb.201906147>.
- Hardwick, Kevin G, Rong Li, Cathy Mistrot, Rey-Huei Chen, Phoebe Dann, Adam Rudner, and Andrew W Murray. 1999. "Lesions in Many Different Spindle Components Activate the Spindle Checkpoint in the Budding Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*." *Genetics* 152 (2): 509–18. <https://doi.org/10.1093/genetics/152.2.509>.
- Harms, Ulf, Alexandra Zoi Andreou, Airat Gubaev, and Dagmar Klostermeier. 2014. "EIF4B, EIF4G and RNA Regulate EIF4A Activity in Translation Initiation by Modulating the EIF4A Conformational Cycle." *Nucleic Acids Research* 42 (12): 7911–22. <https://doi.org/10.1093/nar/gku440>.
- Hartwell, Leland H., Joseph Culotti, and Brian Reid. 1970. "Genetic Control of the Cell-Division Cycle in Yeast, I. Detection of Mutants." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 66 (2): 352–59.
- Hassine, Sami, Florence Bonnet-Magnaval, Louis Philip Benoit Bouvrette, Bellastrid Doran, Mehdi Ghram, Mathieu Bouthillette, Eric Lecuyer, and Luc DesGroseillers. 2020. "Staufen1 Localizes to the Mitotic Spindle and Controls the Localization of RNA Populations to the Spindle." *Journal of Cell Science* 133 (14): jcs247155. <https://doi.org/10.1242/jcs.247155>.
- Hayward, Daniel, Tatiana Alfonso-Pérez, and Ulrike Gruneberg. 2019. "Orchestration of the Spindle Assembly Checkpoint by CDK1-Cyclin B1." *FEBS Letters* 593 (20): 2889–2907. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13591>.
- Heesom, K. J., A. Gampel, H. Mellor, and R. M. Denton. 2001. "Cell Cycle-Dependent Phosphorylation of the Translational Repressor EIF-4E Binding Protein-1 (4E-BP1)." *Current Biology: CB* 11 (17): 1374–79. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(01\)00422-5](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(01)00422-5).
- Hégarat, Nadia, Adrijana Crncec, Maria F Suarez Peredo Rodriguez, Fabio Echegaray Iturra, Yan Gu, Oliver Busby, Paul F Lang, et al. 2020. "Cyclin A Triggers Mitosis Either via the Greatwall Kinase Pathway or Cyclin B." *The EMBO Journal* n/a (n/a): e104419. <https://doi.org/10.15252/emboj.2020104419>.
- Hellen, Christopher U. T. 2018. "Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10 (10): a032656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032656>.
- Henis-Korenblit, Sivan, Naomi Levy Strumpf, Dan Goldstaub, and Adi Kimchi. 2000. "A Novel Form of DAP5 Protein Accumulates in Apoptotic Cells as a Result of Caspase

- Cleavage and Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation.” *Molecular and Cellular Biology* 20 (2): 496–506.
- Hernández, Greco, Michael Altmann, and Paul Lasko. 2010. “Origins and Evolution of the Mechanisms Regulating Translation Initiation in Eukaryotes.” *Trends in Biochemical Sciences* 35 (2): 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.10.009>.
- Hernández, Greco, Kathleen M. Gillespie, Tsvetan R. Bachvaroff, Rosemary Jagus, Cátia Igreja, Daniel Peter, Manuel Bulfoni, and Bertrand Cosson. 2016. “Evolution of EIF4E-Interacting Proteins.” In *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation*, 207–34. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-39468-8_10).
- Hernández, Greco, Vincent G. Osnaya, and Xochitl Pérez-Martínez. 2019. “Conservation and Variability of the AUG Initiation Codon Context in Eukaryotes.” *Trends in Biochemical Sciences* 44 (12): 1009–21. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2019.07.001>.
- Hernansaiz-Ballesteros, Rosa D., Csenge Földi, Luca Cardelli, László G. Nagy, and Attila Csikász-Nagy. 2021. “Evolution of Opposing Regulatory Interactions Underlies the Emergence of Eukaryotic Cell Cycle Checkpoints.” *Scientific Reports* 11 (May): 11122. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-90384-3>.
- Holland, L. Z., and N. D. Holland. 1992. “Early Development in the Lancelet (= Amphioxus) Branchiostoma Floridae from Sperm Entry through Pronuclear Fusion: Presence of Vegetal Pole Plasm and Lack of Conspicuous Ooplasmic Segregation.” *The Biological Bulletin* 182 (1): 77–96. <https://doi.org/10.2307/1542182>.
- Holz, Marina K., Bryan A. Ballif, Steven P. Gygi, and John Blenis. 2005. “mTOR and S6K1 Mediate Assembly of the Translation Preinitiation Complex through Dynamic Protein Interchange and Ordered Phosphorylation Events.” *Cell* 123 (4): 569–80. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.10.024>.
- Hoyle, Nathaniel P., Lydia M. Castelli, Susan G. Campbell, Leah E.A. Holmes, and Mark P. Ashe. 2007. “Stress-Dependent Relocalization of Translationally Primed MRNPs to Cytoplasmic Granules That Are Kinetically and Spatially Distinct from P-Bodies.” *Journal of Cell Biology* 179 (1): 65–74. <https://doi.org/10.1083/jcb.200707010>.
- Hubstenberger, Arnaud, Maïté Courel, Marianne Bénard, Sylvie Souquere, Michèle Ernoult-Lange, Racha Chouaib, Zhou Yi, et al. 2017. “P-Body Purification Reveals the Condensation of Repressed mRNA Regulons.” *Molecular Cell* 68 (1): 144–157.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.003>.
- Huertas, D., M. Soler, J. Moreto, A. Villanueva, A. Martinez, A. Vidal, M. Charlton, et al. 2012. “Antitumor Activity of a Small-Molecule Inhibitor of the Histone Kinase Haspin.” *Oncogene* 31 (11): 1408–18. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.335>.
- Hultin, T. 1961. “The Effect of Puromycin on Protein Metabolism and Cell Division in Fertilized Sea Urchin Eggs.” *Experientia* 17 (9): 410–11. <https://doi.org/10.1007/BF02157974>.
- Hume, Samuel, Grigory L Dianov, and Kristijan Ramadan. 2020. “A Unified Model for the G1/S Cell Cycle Transition.” *Nucleic Acids Research* 48 (22): 12483–501. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1002>.
- Ingolia, Nicholas T., Gloria A. Brar, Noam Stern-Ginossar, Michael S. Harris, Gaëlle J. S. Talhouarne, Sarah E. Jackson, Mark R. Wills, and Jonathan S. Weissman. 2014. “Ribosome Profiling Reveals Pervasive Translation Outside of Annotated Protein-Coding Genes.” *Cell Reports* 8 (5): 1365–79. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.07.045>.
- Iwakawa, Hiro-oki, and Yukihide Tomari. 2015. “The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression.” *Trends in Cell Biology* 25 (11): 651–65. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.011>.

- Jackson, Richard J., Christopher U. T. Hellen, and Tatyana V. Pestova. 2010. “The Mechanism of Eucaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <https://www-ncbi-nlm-nih-gov.insb.bib.cnrs.fr/pmc/articles/PMC4461372/>.
- Jamar, Nur H., Paraskevi Kritsiligkou, and Chris M. Grant. 2017. “The Non-Stop Decay MRNA Surveillance Pathway Is Required for Oxidative Stress Tolerance.” *Nucleic Acids Research* 45 (11): 6881–93. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx306>.
- Jansova, Denisa, Daria Aleshkina, Anna Jindrova, Rajan Iyyappan, Qin An, Guoping Fan, and Andrej Susor. 2021. “Single Molecule RNA Localization and Translation in the Mammalian Oocyte and Embryo.” *Journal of Molecular Biology* 433 (19): 167166. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167166>.
- Jansova, Denisa, Marketa Koncicka, Anna Tetkova, Renata Cerna, Radek Malik, Edgar Del Llano, Michal Kubelka, and Andrej Susor. 2017. “Regulation of 4E-BP1 Activity in the Mammalian Oocyte.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 16 (10): 927–39. <https://doi.org/10.1080/15384101.2017.1295178>.
- Jansova, Denisa, Anna Tetkova, Marketa Koncicka, Michal Kubelka, and Andrej Susor. 2018. “Localization of RNA and Translation in the Mammalian Oocyte and Embryo.” *PLoS One* 13 (3): e0192544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192544>.
- Jansson, Martin D., Sophia J. Häfner, Kübra Altinel, Disa Tehler, Nicolai Krogh, Emil Jakobsen, Jens V. Andersen, et al. 2021. “Regulation of Translation by Site-Specific Ribosomal RNA Methylation.” *Nature Structural & Molecular Biology* 28 (11): 889–99. <https://doi.org/10.1038/s41594-021-00669-4>.
- Jessus, Catherine, Catriona Munro, and Evelyn Houlston. 2020. “Managing the Oocyte Meiotic Arrest—Lessons from Frogs and Jellyfish.” *Cells* 9 (5): 1150. <https://doi.org/10.3390/cells9051150>.
- Jost, E., A. d’Arcy, and S. Ely. 1979. “Transfer of Mouse Nuclear Envelope Specific Proteins to Nuclei of Chick Erythrocytes during Reactivation in Heterokaryons with Mouse A9 Cells.” *Journal of Cell Science* 37 (June): 97–107.
- Jukam, David, S. Ali M. Shariati, and Jan M. Skotheim. 2017. “Zygotic Genome Activation in Vertebrates.” *Developmental Cell* 42 (4): 316–32. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.07.026>.
- Jumper, John, Richard Evans, Alexander Pritzel, Tim Green, Michael Figurnov, Olaf Ronneberger, Kathryn Tunyasuvunakool, et al. 2021. “Highly Accurate Protein Structure Prediction with AlphaFold.” *Nature*, July, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.
- Kalous, Jaroslav, Denisa Jansová, and Andrej Šušor. 2020. “Role of Cyclin-Dependent Kinase 1 in Translational Regulation in the M-Phase.” *Cells* 9 (7): E1568. <https://doi.org/10.3390/cells9071568>.
- Kalous, Jaroslav, Anna Tetkova, Michal Kubelka, and Andrej Susor. 2018. “Importance of ERK1/2 in Regulation of Protein Translation during Oocyte Meiosis.” *International Journal of Molecular Sciences* 19 (3). <https://doi.org/10.3390/ijms19030698>.
- Kang, Qing, and R. Pomerening. 2011. “Punctuated Cyclin Synthesis Drives Early Embryonic Cell Cycle Oscillations.” *Molecular Biology of the Cell*, 2011. <https://www-molbiolcell-org.insb.bib.cnrs.fr/doi/full/10.1091/mbc.E11-09-0768>.
- Kanki, J. P., and J. W. Newport. 1991. “The Cell Cycle Dependence of Protein Synthesis during *Xenopus Laevis* Development.” *Developmental Biology* 146 (1): 198–213. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(91\)90460-k](https://doi.org/10.1016/0012-1606(91)90460-k).
- Karousis, Evangelos D., and Oliver Mühlemann. 2019. “Nonsense-Mediated MRNA Decay Begins Where Translation Ends.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 11 (2): a032862. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032862>.

- Kaulich, Manuel, Verena M. Link, John D. Lapek, Yeon J. Lee, Christopher K. Glass, David J. Gonzalez, and Steven F. Dowdy. 2021. "A Cdk4/6-Dependent Phosphorylation Gradient Regulates the Early to Late G1 Phase Transition." *Scientific Reports* 11 (July): 14736. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-94200-w>.
- Kearse, Michael G., and Jeremy E. Wilusz. 2017. "Non-AUG Translation: A New Start for Protein Synthesis in Eukaryotes." *Genes & Development* 31 (17): 1717–31. <https://doi.org/10.1101/gad.305250.117>.
- Kelly, A. E., C. Ghenoïu, J. Z. Xue, C. Zierhut, H. Kimura, and H. Funabiki. 2010. "Survivin Reads Phosphorylated Histone H3 Threonine 3 to Activate the Mitotic Kinase Aurora B." *Science* 330 (6001): 235–39. <https://doi.org/10.1126/science.1189505>.
- Khlebodarova, T M, V V Kogai, E A Trifonova, and V A Likhoshvai. 2018. "Dynamic Landscape of the Local Translation at Activated Synapses." *Molecular Psychiatry* 23 (1): 107–14. <https://doi.org/10.1038/mp.2017.245>.
- Khong, Anthony, Tyler Matheny, Saumya Jain, Sarah F. Mitchell, Joshua R. Wheeler, and Roy Parker. 2017. "The Stress Granule Transcriptome Reveals Principles of mRNA Accumulation in Stress Granules." *Molecular Cell* 68 (4): 808-820.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.015>.
- Kipryushina, Yulia O., and Konstantin V. Yakovlev. 2020. "Maternal Control of Early Patterning in Sea Urchin Embryos." *Differentiation* 113 (May): 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2020.04.001>.
- Kishimoto, Takeo. 1998. "Cell Cycle Arrest and Release in Starfish Oocytes and Eggs." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 9 (5): 549–57. <https://doi.org/10.1006/scdb.1998.0249>.
- Kishimoto, Takeo, and Haruo Kanatani. 1976. "Cytoplasmic Factor Responsible for Germinal Vesicle Breakdown and Meiotic Maturation in Starfish Oocyte." *Nature* 260 (5549): 321–22. <https://doi.org/10.1038/260321a0>.
- Kisielewska, Jolanta, Pin Lu, and Michael Whitaker. 2005. "GFP-PCNA as an S-Phase Marker in Embryos during the First and Subsequent Cell Cycles." *Biology of the Cell* 97 (3): 221–29. <https://doi.org/10.1042/BC20040093>.
- Kislauskis, E H, X Zhu, and R H Singer. 1994. "Sequences Responsible for Intracellular Localization of Beta-Actin Messenger RNA Also Affect Cell Phenotype." *Journal of Cell Biology* 127 (2): 441–51. <https://doi.org/10.1083/jcb.127.2.441>.
- Kong, S, Liu J, Zhang B, Lv F, Yu Y, and Qin T. 2021. "MicroRNA-337-3p Impedes Breast Cancer Progression by Targeting Cyclin-Dependent Kinase 1." *Oncology Letters* 23 (1). <https://doi.org/10.3892/ol.2021.13133>.
- Kozak, M. 2001. "Constraints on Reinitiation of Translation in Mammals." *Nucleic Acids Research* 29 (24): 5226–32. <https://doi.org/10.1093/nar/29.24.5226>.
- Krauchunas, Amber R., V. Horner, and M. Wolfner. 2012. "Protein Phosphorylation Changes Reveal New Candidates in the Regulation of Egg Activation and Early Embryogenesis in *D. Melanogaster*." *Developmental Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.07.024>.
- Kroh, Andreas, and Andrew B. Smith. 2010. "The Phylogeny and Classification of Post-Palaeozoic Echinoids." *Journal of Systematic Palaeontology* 8 (2): 147–212.
- Kronja, Iva, and Terry L. Orr-Weaver. 2011. "Translational Regulation of the Cell Cycle: When, Where, How and Why?" *Philosophical Transactions of the Royal Society*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/insb.bib.cnrs.fr/pmc/articles/PMC3203463/>.
- Krystosek, A., M. L. Cawthon, and D. Kabat. 1975. "Improved Methods for Purification and Assay of Eukaryotic Messenger Ribonucleic Acids and Ribosomes. Quantitative Analysis of Their Interaction in a Fractionated Reticulocyte Cell-Free System." *The Journal of Biological Chemistry* 250 (15): 6077–84.



- Kubiak, Jacek Z., Franck Chesnel, Laurent Richard-Parpaillon, Franck Bazile, Aude Pascal, Zbigniew Polanski, Marta Sikora-Polaczek, Zuzanna Maciejewska, and Maria A. Ciemerych. 2008. "Temporal Regulation of the First Mitosis in *Xenopus* and Mouse Embryos." *Molecular and Cellular Endocrinology, Mammalian Gametogenesis and Embryogenesis*, 282 (1): 63–69. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2007.11.023>.
- Kuriyama, R., P. Savereide, P. Lefebvre, and S. Dasgupta. 1990. "The Predicted Amino Acid Sequence of a Centrosphere Protein in Dividing Sea Urchin Eggs Is Similar to Elongation Factor (EF-1 Alpha)." *Journal of Cell Science* 95 (2): 231–36. <https://doi.org/10.1242/jcs.95.2.231>.
- Kuriyama, Ryoko, and Gary G. Borisy. 1985. "Identification of Molecular Components of the Centrosphere in the Mitotic Spindle of Sea Urchin Eggs." *Journal of Cell Biology* 101 (2): 524–30. <https://doi.org/10.1083/jcb.101.2.524>.
- Kwon, Y. G., S. Y. Lee, Y. Choi, P. Greengard, and A. C. Nairn. 1997. "Cell Cycle-Dependent Phosphorylation of Mammalian Protein Phosphatase 1 by Cdc2 Kinase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (6): 2168–73. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.6.2168>.
- Labbé, J. C., M. G. Lee, P. Nurse, A. Picard, and M. Doree. 1988. "Activation at M-Phase of a Protein Kinase Encoded by a Starfish Homologue of the Cell Cycle Control Gene Cdc2+." *Nature* 335 (6187): 251–54. <https://doi.org/10.1038/335251a0>.
- Labbé, J. C., A. Picard, G. Peaucellier, J. C. Cavadore, P. Nurse, and M. Doree. 1989. "Purification of MPF from Starfish: Identification as the H1 Histone Kinase P34cdc2 and a Possible Mechanism for Its Periodic Activation." *Cell* 57 (2): 253–63. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90963-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90963-x).
- Laguesse, Sophie, and Dorit Ron. 2020. "Protein Translation and Psychiatric Disorders." *The Neuroscientist* 26 (1): 21–42. <https://doi.org/10.1177/1073858419853236>.
- Laplante, Mathieu, and David M. Sabatini. 2012. "mTOR Signaling in Growth Control and Disease." *Cell* 149 (2): 274–93. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.017>.
- LaRonde-LeBlanc, Nicole, Arti N. Santhanam, Alyson R. Baker, Alexander Wlodawer, and Nancy H. Colburn. 2007. "Structural Basis for Inhibition of Translation by the Tumor Suppressor Pdc4." *Molecular and Cellular Biology*, January. <https://doi.org/10.1128/MCB.00867-06>.
- Láruson, Aki Jarl. 2017. "Rates and Relations of Mitochondrial Genome Evolution across the Echinoidea, with Special Focus on the Superfamily Odontophora." *Ecology and Evolution* 7 (13): 4543–51. <https://doi.org/10.1002/ece3.3042>.
- Lasfargues, Charline, Yvan Martineau, Corinne Bousquet, and Stéphane Pyronnet. 2013. "Changes in Translational Control after Pro-Apoptotic Stress." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (1): 177–90. <https://doi.org/10.3390/ijms14010177>.
- Laurent, Sébastien, Adrien Richard, Odile Mulner-Lorillon, Julia Morales, Didier Flament, Virginie Glippa, Jérémie Bourdon, et al. 2014. "Modelization of the Regulation of Protein Synthesis Following Fertilization in Sea Urchin Shows Requirement of Two Processes: A Destabilization of EIF4E:4E-BP Complex and a Great Stimulation of the 4E-BP-Degradation Mechanism, Both Rapamycin-Sensitive." *Frontiers in Genetics* 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00117>.
- Lawson, T. G., K. A. Lee, M. M. Maimone, R. D. Abramson, T. E. Dever, W. C. Merrick, and R. E. Thach. 1989. "Dissociation of Double-Stranded Polynucleotide Helical Structures by Eukaryotic Initiation Factors, as Revealed by a Novel Assay." *Biochemistry* 28 (11): 4729–34. <https://doi.org/10.1021/bi00437a033>.
- Layana, Carla, Paola Ferrero, and Rolando Rivera-Pomar. 2012. "Cytoplasmic Ribonucleoprotein Foci in Eukaryotes: Hotspots of Bio(Chemical)Diversity."

- Comparative and Functional Genomics* 2012: 504292.  
<https://doi.org/10.1155/2012/504292>.
- Le Breton, Magali, Robert Bellé, Patrick Cormier, Odile Mulner-Lorillon, and Julia Morales. 2003. “M-Phase Regulation of the Recruitment of MRNAs onto Polysomes Using the CDK1/Cyclin B Inhibitor Aminopurvalanol.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 306 (4): 880–86. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01083-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01083-0).
- Le Breton, Magali, Patrick Cormier, Robert Bellé, Odile Mulner-Lorillon, and Julia Morales. 2005. “Translational Control during Mitosis.” *Biochimie* 87 (9–10): 805–11. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.04.014>.
- Le Sourd, Frédéric, Sandrine Boulben, Ronan Le Bouffant, Patrick Cormier, Julia Morales, Robert Belle, and Odile Mulner-Lorillon. 2006. “EEF1B: At the Dawn of the 21st Century.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1759 (1): 13–31. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2006.02.003>.
- Lee, Melanie G., and Paul Nurse. 1987. “Complementation Used to Clone a Human Homologue of the Fission Yeast Cell Cycle Control Gene Cdc2.” *Nature* 327 (6117): 31–35. <https://doi.org/10.1038/327031a0>.
- Lee, Sooncheol, Samuel S Truesdell, Syed I A Bukhari, Ju Huck Lee, Olivier LeTonqueze, and Shobha Vasudevan. 2014. “Upregulation of EIF5B Controls Cell-Cycle Arrest and Specific Developmental Stages.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (41): E4315-22. <https://doi.org/10.1073/pnas.1320477111>.
- Leen, Eoin N., Frédéric Sorgeloos, Samantha Correia, Yasmin Chaudhry, Fabien Cannac, Chiara Pastore, Yingqi Xu, et al. 2016. “A Conserved Interaction between a C-Terminal Motif in Norovirus VPg and the HEAT-1 Domain of EIF4G Is Essential for Translation Initiation.” *PLoS Pathogens* 12 (1): e1005379. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005379>.
- Legagneux, V, F Omilli, and H B Osborne. 1995. “Substrate-Specific Regulation of RNA Deadenylation in Xenopus Embryo and Activated Egg Extracts.” *RNA* 1 (10): 1001–8.
- Leppek, Kathrin, Rhiju Das, and Maria Barna. 2018. “Functional 5' UTR mRNA Structures in Eukaryotic Translation Regulation and How to Find Them | Nature Reviews Molecular Cell Biology.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. <http://www.nature.com/insb.bib.cnrs.fr/articles/nrm.2017.103>.
- Leppek, Kathrin, Kotaro Fujii, Nick Quade, Teodorus Theo Susanto, Daniel Boehringer, Tea Lenarčič, Shifeng Xue, Naomi R. Genuth, Nenad Ban, and Maria Barna. 2020. “Gene- and Species-Specific Hox mRNA Translation by Ribosome Expansion Segments.” *Molecular Cell* 80 (6): 980-995.e13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.023>.
- Leung, Anthony K. L., J. Mauro Calabrese, and Phillip A. Sharp. 2006. “Quantitative Analysis of Argonaute Protein Reveals MicroRNA-Dependent Localization to Stress Granules.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (48): 18125–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608845103>.
- Levine, Elliot M., Yechiel Becker, Charles W. Boone, and Harry Eagle. 1965. “Contact Inhibition, Macromolecular Synthesis, and Polyribosomes in Cultured Human Diploid Fibroblasts.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 53 (2): 350–56. <https://doi.org/10.1073/pnas.53.2.350>.
- Lieberman, Marash, and Kimchi. 2009. “The Translation Initiation Factor DAP5 Is a Regulator of Cell Survival during Mitosis.” *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (2). <https://doi.org/10.4161/cc.8.2.7384>.
- Lieberman, Noa, Valentina Gandin, Yuri V. Svitkin, Maya David, Geneviève Virgili, Maritza Jaramillo, Martin Holcik, Bhushan Nagar, Adi Kimchi, and Nahum Sonenberg. 2015. “DAP5 Associates with EIF2 $\beta$  and EIF4AI to Promote Internal Ribosome Entry Site

- Driven Translation.” *Nucleic Acids Research* 43 (7): 3764–75. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv205>.
- Lim, Shuhui, and Philipp Kaldis. 2013. “Cdks, Cyclins and CKIs: Roles beyond Cell Cycle Regulation.” *Development (Cambridge, England)* 140 (15): 3079–93. <https://doi.org/10.1242/dev.091744>.
- Lin, T. A., X. Kong, T. A. Haystead, A. Pause, G. Belsham, N. Sonenberg, and J. C. Lawrence. 1994. “PHAS-I as a Link between Mitogen-Activated Protein Kinase and Translation Initiation.” *Science (New York, N.Y.)* 266 (5185): 653–56. <https://doi.org/10.1126/science.7939721>.
- Lindqvist, Lisa, Hiroaki Imataka, and Jerry Pelletier. 2008. “Cap-Dependent Eukaryotic Initiation Factor-MRNA Interactions Probed by Cross-Linking.” *RNA (New York, N.Y.)* 14 (5): 960–69. <https://doi.org/10.1261/rna.971208>.
- Liska, Adam J., Andrei V. Popov, Shamil Sunyaev, Peg Coughlin, Bianca Habermann, Anna Shevchenko, Peer Bork, Eric Karsenti, and Andrej Shevchenko. 2004. “Homology-Based Functional Proteomics by Mass Spectrometry: Application to the Xenopus Microtubule-Associated Proteome.” *Proteomics* 4 (9): 2707–21. <https://doi.org/10.1002/pmic.200300813>.
- Liu, Zhenshan, Chengrong Liu, Xin Wang, Wenwei Li, Jingfan Zhou, Peixian Dong, Maggie Z. X. Xiao, et al. 2021. “RSK1 SUMOylation Is Required for KSHV Lytic Replication.” *PLoS Pathogens* 17 (12): e1010123. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010123>.
- Liu, Zhiquan, Yiming Li, Maria S. Sepúlveda, Qichen Jiang, Yang Jiao, Qiang Chen, Yinying Huang, Jiangtao Tian, and Yunlong Zhao. 2021. “Development of an Adverse Outcome Pathway for Nanoplastic Toxicity in *Daphnia Pulex* Using Proteomics.” *Science of The Total Environment* 766 (April): 144249. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144249>.
- Lockhead, Sarah, Alisa Moskaleva, Julia Kamenz, Yuxin Chen, Minjung Kang, Anay R. Reddy, Silvia D. M. Santos, and James E. Ferrell. 2020. “The Apparent Requirement for Protein Synthesis during G2 Phase Is Due to Checkpoint Activation.” *Cell Reports* 32 (2): 107901. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107901>.
- Loon, A. E. van, P. Colas, H. J. Goedemans, I. Néant, P. Dalbon, and P. Guerrier. 1991. “The Role of Cyclins in the Maturation of *Patella Vulgata* Oocytes.” *The EMBO Journal* 10 (11): 3343–49.
- Lorenz, Christian, Christina E. Lünse, and Mario Mörl. 2017. “tRNA Modifications: Impact on Structure and Thermal Adaptation.” *Biomolecules* 7 (2): E35. <https://doi.org/10.3390/biom7020035>.
- Lu, Wei-Ting, Anna Wilczynska, Ewan Smith, and Martin Bushell. 2014. “The Diverse Roles of the EIF4A Family: You Are the Company You Keep.” *Biochemical Society Transactions* 42 (1): 166–72. <https://doi.org/10.1042/BST20130161>.
- Lund-Ricard, Yasmine, Patrick Cormier, Julia Morales, and Agnès Boutet. 2020. “mTOR Signaling at the Crossroad between Metazoan Regeneration and Human Diseases.” *International Journal of Molecular Sciences* 21 (8): 2718. <https://doi.org/10.3390/ijms21082718>.
- Luo, Q., C. Michaelis, and G. Weeks. 1994. “Overexpression of a Truncated Cyclin B Gene Arrests Dictyostelium Cell Division during Mitosis.” *Journal of Cell Science* 107 (11): 3105–14. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.11.3105>.
- Ma, Xiaojun, and John Blenis. 2009. “Molecular Mechanisms of mTOR-Mediated Translational Control.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (5): 307–18. <https://doi.org/10.1038/nrm2672>.
- Mailliot, Justine, and Franck Martin. 2018. “Viral Internal Ribosomal Entry Sites: Four Classes for One Goal.” *WIREs RNA* 9 (2): e1458. <https://doi.org/10.1002/wrna.1458>.

- Malumbres, M. 2014. “Cyclin-Dependent Kinases.” *Genome Biol* 15 (6): 122. <https://doi.org/10.1186/gb4184>.
- Marash, Lea, Noa Liberman, Sivan Henis-Korenblit, Gilad Sivan, Eran Reem, Orna Elroy-Stein, and Adi Kimchi. 2008. “DAP5 Promotes Cap-Independent Translation of Bcl-2 and CDK1 to Facilitate Cell Survival during Mitosis.” *Molecular Cell* 30 (4): 447–59. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.03.018>.
- Markmiller, Sebastian, Sahar Soltanieh, Kari L. Server, Raymond Mak, Wenhao Jin, Mark Y. Fang, En-Ching Luo, et al. 2018. “Context-Dependent and Disease-Specific Diversity in Protein Interactions within Stress Granules.” *Cell* 172 (3): 590-604.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.032>.
- Mars, Jean-Clement, Mehdi Ghram, Biljana Culjkovic-Kraljacic, and Katherine L. B. Borden. 2021. “The Cap-Binding Complex CBC and the Eukaryotic Translation Factor EIF4E: Co-Conspirators in Cap-Dependent RNA Maturation and Translation.” *Cancers* 13 (24): 6185. <https://doi.org/10.3390/cancers13246185>.
- Masui, Yoshio. 2000. “The Elusive Cytostatic Factor in the Animal Egg.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (3): 228–31. <https://doi.org/10.1038/35043096>.
- Masui, Yoshio, and Clement L. Markert. 1971. “Cytoplasmic Control of Nuclear Behavior during Meiotic Maturation of Frog Oocytes.” *Journal of Experimental Zoology* 177 (2): 129–45. <https://doi.org/10.1002/jez.1401770202>.
- Mazumder, Barsanjit, Vasudevan Seshadri, and Paul L Fox. 2003. “Translational Control by the 3'-UTR: The Ends Specify the Means.” *Trends in Biochemical Sciences* 28 (2): 91–98. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(03\)00002-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(03)00002-1).
- McIntosh, J. Richard. 2016. “Mitosis.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (9): a023218. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023218>.
- Meijer, L., D. Arion, R. Golsteyn, J. Pines, L. Brizuela, T. Hunt, and D. Beach. 1989. “Cyclin Is a Component of the Sea Urchin Egg M-Phase Specific Histone H1 Kinase.” *The EMBO Journal* 8 (8): 2275–82.
- Mendoza, Michelle C., E. Emrah Er, and John Blenis. 2011. “The Ras-ERK and PI3K-MTOR Pathways: Cross-Talk and Compensation.” *Trends in Biochemical Sciences* 36 (6): 320–28. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.03.006>.
- Meneau, Ferdinand, Aude Dupré, Catherine Jessus, and Enrico Maria Daldello. 2020. “Translational Control of Xenopus Oocyte Meiosis: Toward the Genomic Era.” *Cells* 9 (6): 1502. <https://doi.org/10.3390/cells9061502>.
- Meservey, Lindsey Madsen, Ved V. Topkar, and Meng-meng Fu. 2021. “mRNA Transport and Local Translation in Glia.” *Trends in Cell Biology* 31 (6): 419–23. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2021.03.006>.
- Méthot, N., A. Pause, J. W. Hershey, and N. Sonenberg. 1994. “The Translation Initiation Factor EIF-4B Contains an RNA-Binding Region That Is Distinct and Independent from Its Ribonucleoprotein Consensus Sequence.” *Molecular and Cellular Biology* 14 (4): 2307–16. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.4.2307>.
- Méthot, N., G. pickett, JD. Keene, and N. Sonenberg. 1996. “In Vitro RNA Selection Identifies RNA Ligands That Specifically Bind to Eukaryotic Translation Initiation Factor 4B: The Role of the RNA Recognition Motif.” *RNA* 2: 38–50.
- Méthot, N., M. S. Song, and N. Sonenberg. 1996. “A Region Rich in Aspartic Acid, Arginine, Tyrosine, and Glycine (DRYG) Mediates Eukaryotic Initiation Factor 4B (EIF4B) Self-Association and Interaction with EIF3.” *Molecular and Cellular Biology* 16 (10): 5328–34. <https://doi.org/10.1128/mcb.16.10.5328>.
- Meyer, Kate D., Deepak P. Patil, Jun Zhou, Alexandra Zinoviev, Maxim A. Skabkin, Olivier Elemento, Tatyana V. Pestova, Shu-Bing Qian, and Samie R. Jaffrey. 2015. “5' UTR

- m(6)A Promotes Cap-Independent Translation.” *Cell* 163 (4): 999–1010. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>.
- Meyuhas, Oded, and Tamar Kahan. 2015. “The Race to Decipher the Top Secrets of TOP MRNAs.” *Biochimica Et Biophysica Acta* 1849 (7): 801–11. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.08.015>.
- Meza, I., G. Benitez, and M. Crippa. 1978. “Characterization of Globin mRNA from *Xenopus Laevis*.” *Cell Biology International Reports* 2 (3): 251–57. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(78\)90005-x](https://doi.org/10.1016/0309-1651(78)90005-x).
- Miettinen, Teemu P, Joon Ho Kang, Lucy F Yang, and Scott R Manalis. 2019. “Mammalian Cell Growth Dynamics in Mitosis.” *ELife* 8 (May): e44700. <https://doi.org/10.7554/eLife.44700>.
- Milburn, S. C., J. W. Hershey, M. V. Davies, K. Kelleher, and R. J. Kaufman. 1990. “Cloning and Expression of Eukaryotic Initiation Factor 4B CDNA: Sequence Determination Identifies a Common RNA Recognition Motif.” *The EMBO Journal* 9 (9): 2783–90. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb07466.x>.
- Minshall, Nicola, Marie Helene Reiter, Dominique Weil, and Nancy Standart. 2007. “CPEB Interacts with an Ovary-Specific EIF4E and 4E-T in Early *Xenopus* Oocytes.” *The Journal of Biological Chemistry* 282 (52): 37389–401. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704629200>.
- Mishra, Rishi Kumar, Ayushi Datey, and Tanweer Hussain. 2020. “mRNA Recruiting EIF4 Factors Involved in Protein Synthesis and Its Regulation.” *Biochemistry* 59 (1): 34–46. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00788>.
- Mofatteh, Mohammad, and Simon L. Bullock. 2017. “SnapShot: Subcellular mRNA Localization.” *Cell* 169 (1): 178–178.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.03.004>.
- Mogessie, Binyam, Kathleen Scheffler, and Melina Schuh. 2018. “Assembly and Positioning of the Oocyte Meiotic Spindle.” *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34 (October): 381–403. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-100616-060553>.
- Mollet, Stephanie, Nicolas Cougot, Ania Wilczynska, François Dautry, Michel Kress, Edouard Bertrand, and Dominique Weil. 2008. “Translationally Repressed mRNA Transiently Cycles through Stress Granules during Stress.” *Molecular Biology of the Cell* 19 (10): 4469–79. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-05-0499>.
- Monnier, A., R. Bellé, J. Morales, P. Cormier, S. Boulben, and O. Mulner-Lorillon. 2001. “Evidence for Regulation of Protein Synthesis at the Elongation Step by CDK1/Cyclin B Phosphorylation.” *Nucleic Acids Research* 29 (7): 1453–57. <https://doi.org/10.1093/nar/29.7.1453>.
- Morales, Julia, Odile Mulner-Lorillon, Bertrand Cosson, Emmanuelle Morin, Robert Bellé, Cynthia Bradham, Wendy Beane, and Patrick Cormier. 2006. “Translational Control Genes in the Sea Urchin Genome.” *Developmental Biology*. [https://www-sciencedirect-com.insb.bib.cnrs.fr/science/article/pii/S0012160606010669?\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_origin=gateway&\\_docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb](https://www-sciencedirect-com.insb.bib.cnrs.fr/science/article/pii/S0012160606010669?_rdoc=1&_fmt=high&_origin=gateway&_docanchor=&md5=b8429449ccfc9c30159a5f9aeaa92ffb).
- Moundoyi, Harold, Josselin Demouy, Sophie Le Panse, Julia Morales, Benoît Sarels, and Patrick Cormier. 2018. “Toward Multiscale Modeling of Molecular and Biochemical Events Occurring at Fertilization Time in Sea Urchins.” *Results and Problems in Cell Differentiation* 65: 69–89. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92486-1_5).
- Muley, Vijaykumar Yogesh, and Rainer König. 2022. “Human Transcriptional Gene Regulatory Network Compiled from 14 Data Resources.” *Biochimie* 193 (February): 115–25. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2021.10.016>.
- Mulner-Lorillon, O., O. Minella, P. Cormier, J. P. Capony, J. C. Cavadore, J. Morales, R. Poulhe, and R. Bellé. 1994. “Elongation Factor EF-1 Delta, a New Target for

- Maturation-Promoting Factor in *Xenopus* Oocytes.” *Journal of Biological Chemistry* 269 (31): 20201–7. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32146-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32146-4).
- Mulner-Lorillon, Odile, Héloïse Chassé, Julia Morales, Robert Bellé, and Patrick Cormier. 2017. “MAPK/ERK Activity Is Required for the Successful Progression of Mitosis in Sea Urchin Embryos.” *Developmental Biology* 421 (2): 194–203. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.11.018>.
- Muñoz, Sergio, Sabela Búa, Sara Rodríguez-Acebes, Diego Megías, Sagrario Ortega, Alba de Martino, and Juan Méndez. 2017. “In Vivo DNA Re-Replication Elicits Lethal Tissue Dysplasias.” *Cell Reports* 19 (5): 928–38. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.032>.
- Murata, Takayuki, and Kunitada Shimotohno. 2006. “Ubiquitination and Proteasome-Dependent Degradation of Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E.” *The Journal of Biological Chemistry* 281 (30): 20788–800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600563200>.
- Musnier, Astrid, Kelly León, Julia Morales, Eric Reiter, Thomas Boulo, Vlad Costache, Patrick Vourc’h, et al. 2012. “mRNA-Selective Translation Induced by FSH in Primary Sertoli Cells.” *Molecular Endocrinology* 26 (4): 669–80. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1267>.
- Nandagopal, Neethi, and Philippe P Roux. 2015. “Regulation of Global and Specific mRNA Translation by the MTOR Signaling Pathway.” *Translation* 3 (1). <https://doi.org/10.4161/21690731.2014.983402>.
- Naranda, T., W. B. Strong, J. Menaya, B. J. Fabbri, and J. W. Hershey. 1994. “Two Structural Domains of Initiation Factor EIF-4B Are Involved in Binding to RNA.” *Journal of Biological Chemistry* 269 (20): 14465–72. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)36646-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)36646-2).
- Narasimha, Anil M, Manuel Kaulich, Gary S Shapiro, Yoon J Choi, Piotr Sicinski, and Steven F Dowdy. 2014. “Cyclin D Activates the Rb Tumor Suppressor by Mono-Phosphorylation.” *ELife* 3 (June): e02872. <https://doi.org/10.7554/eLife.02872>.
- Nasa, Isha, Lauren E. Cressey, Thomas Kruse, Emil P. T. Hertz, Jiang Gui, Lee M. Graves, Jakob Nilsson, and Arminja N. Kettenbach. 2020. “Quantitative Kinase and Phosphatase Profiling Reveal That CDK1 Phosphorylates PP2Ac to Promote Mitotic Entry.” *Science Signaling* 13 (648): eaba7823. <https://doi.org/10.1126/scisignal.aba7823>.
- Niklas, Karl J., Edward D. Cobb, and Ulrich Kutschera. 2014. “Did Meiosis Evolve before Sex and the Evolution of Eukaryotic Life Cycles?” *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 36 (11): 1091–1101. <https://doi.org/10.1002/bies.201400045>.
- Niklas, Karl J., and Stuart A. Newman. 2013. “The Origins of Multicellular Organisms.” *Evolution & Development* 15 (1): 41–52. <https://doi.org/10.1111/ede.12013>.
- Niklas, Karl J, and Stuart A Newman. 2020. “The Many Roads to and from Multicellularity.” *Journal of Experimental Botany* 71 (11): 3247–53. <https://doi.org/10.1093/jxb/erz547>.
- Novoa, Isabel, Javier Gallego, Pedro G. Ferreira, and Raul Mendez. 2010. “Mitotic Cell-Cycle Progression Is Regulated by CPEB1 and CPEB4-Dependent Translational Control.” *Nature Cell Biology* 12 (5): 447–56. <https://doi.org/10.1038/ncb2046>.
- Nurse, P. 2000. “A Long Twentieth Century of the Cell Cycle and Beyond.” *Cell* 100 (1): 71–78. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81684-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81684-0).
- Nurse, Paul, Pierre Thuriaux, and Kim Nasmyth. 1976. “Genetic Control of the Cell Division Cycle in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*.” *Molecular and General Genetics MGG* 146 (2): 167–78. <https://doi.org/10.1007/BF00268085>.
- Nüske, Elisabeth, Guendalina Marini, Doris Richter, Weihua Leng, Aliona Bogdanova, Titus M. Franzmann, Gaia Pigino, and Simon Alberti. 2020. “Filament Formation by the

- Translation Factor EIF2B Regulates Protein Synthesis in Starved Cells.” *Biology Open*, January. <https://doi.org/10.1242/bio.046391>.
- Odle, Richard I., Oliver Florey, Nicholas T. Ktistakis, and Simon J. Cook. 2021. “CDK1, the Other ‘Master Regulator’ of Autophagy.” *Trends in Cell Biology* 31 (2): 95–107. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.11.001>.
- O’Farrell, P. H. 2001. “Triggering the All-or-Nothing Switch into Mitosis.” *Trends Cell Biol* 11 (12): 512–19. [https://doi.org/10.1016/s0962-8924\(01\)02142-0](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(01)02142-0).
- Ohkura, Hiroyuki. 2015. “Meiosis: An Overview of Key Differences from Mitosis.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (5): a015859. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a015859>.
- Örd, Mihkel, Rainis Venta, Kaidi Möll, Ervin Valk, and Mart Loog. 2019. “Cyclin-Specific Docking Mechanisms Reveal the Complexity of M-CDK Function in the Cell Cycle.” *Molecular Cell* 75 (1): 76–89.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.04.026>.
- Orr, Bernardo, Filipe De Sousa, Ana Margarida Gomes, Olga Afonso, Luísa T. Ferreira, Ana C. Figueiredo, and Helder Maiato. 2021. “An Anaphase Surveillance Mechanism Prevents Micronuclei Formation from Frequent Chromosome Segregation Errors.” *Cell Reports* 37 (6): 109783. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109783>.
- Oulhen, Nathalie, Sandrine Boulben, Michael Bidinosti, Julia Morales, Patrick Cormier, and Bertrand Cosson. 2009. “A Variant Mimicking Hyperphosphorylated 4E-BP Inhibits Protein Synthesis in a Sea Urchin Cell-Free, Cap-Dependent Translation System.” *PLOS ONE* 4 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005070>.
- Oulhen, Nathalie, Patrick Salaün, Bertrand Cosson, Patrick Cormier, and Julia Morales. 2007. “After Fertilization of Sea Urchin Eggs, EIF4G Is Post-Translationally Modified and Associated with the Cap-Binding Protein EIF4E.” *Journal of Cell Science* 120 (3): 425–34. <https://doi.org/10.1242/jcs.03339>.
- Pan, Bo, and Julang Li. 2019. “The Art of Oocyte Meiotic Arrest Regulation.” *Reproductive Biology and Endocrinology* 17 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0445-8>.
- Papini, Diana, Mark D. Levasseur, and Jonathan M. G. Higgins. 2021. “The Aurora B Gradient Sustains Kinetochore Stability in Anaphase.” *Cell Reports* 37 (6): 109818. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109818>.
- Papst, P. J., H. Sugiyama, M. Nagasawa, J. J. Lucas, J. L. Maller, and N. Terada. 1998. “Cdc2-Cyclin B Phosphorylates P70 S6 Kinase on Ser411 at Mitosis.” *The Journal of Biological Chemistry* 273 (24): 15077–84. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.24.15077>.
- Park, Jong-Eun, Hyerim Yi, Yoosik Kim, Hyesik Chang, and V. Narry Kim. 2016. “Regulation of Poly(A) Tail and Translation during the Somatic Cell Cycle.” *Molecular Cell* 62 (3): 462–71. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.007>.
- Parra, Columba de la, Amanda Ernlund, Amandine Alard, Kelly Ruggles, Beatrix Ueberheide, and Robert J. Schneider. 2018. “A Widespread Alternate Form of Cap-Dependent mRNA Translation Initiation.” *Nature Communications* 9 (1): 3068. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05539-0>.
- Pause, A., Nahum Sonenberg, Beisham, Gingras, Donzé, Tal-An Lin, and John C. Lawrence. 1994. “Insulin-Dependent Stimulation of Protein Synthesis by Phosphorylation of a Regulator of 5’-Cap Function.” *Nature*, 1994. <http://www.nature.com.insb.bib.cnrs.fr/articles/371762a0>.
- Paweletz, Neidhard. 2001. “Walther Flemming: Pioneer of Mitosis Research.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (1): 72–75. <https://doi.org/10.1038/35048077>.
- Peck, Lloyd S. 2016. “A Cold Limit to Adaptation in the Sea.” *Trends in Ecology & Evolution* 31 (1): 13–26. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2015.09.014>.

- Pelletier, Jerry, and Nahum Sonenberg. 2019. "The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment." *Annual Review of Biochemistry* 88 (1): 307–35. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-013118-111042>.
- Peng, Charline, Axel Knebel, Nick A. Morrice, Xiang Li, Kevin Barringer, Jun Li, Scott Jakes, Brian Werneburg, and Lian Wang. 2007. "Pim Kinase Substrate Identification and Specificity." *The Journal of Biochemistry* 141 (3): 353–62. <https://doi.org/10.1093/jb/mvm040>.
- Pestova, Tatyana V., and Victoria G. Kolupaeva. 2002. "The Roles of Individual Eukaryotic Translation Initiation Factors in Ribosomal Scanning and Initiation Codon Selection." *Genes & Development* 16 (22): 2906–22. <https://doi.org/10.1101/gad.1020902>.
- Peter, Daniel, Cátia Igreja, Ramona Weber, Lara Wohlbold, Catrin Weiler, Linda Ebertsch, Oliver Weichenrieder, and Elisa Izaurralde. 2015. "Molecular Architecture of 4E-BP Translational Inhibitors Bound to EIF4E." *Molecular Cell* 57 (6): 1074–87. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.01.017>.
- Picard, Vincent, O. Mulner-Lorillon, Jérémie Bourdon, Julia Morales, Patrick Cormier, Anne Siegel, and Robert Bellé. 2016. "Model of the Delayed Translation of Cyclin B Maternal mRNA after Sea Urchin Fertilization." *Molecular Reproduction and Development* 83 (12): 1070–82. <https://doi.org/10.1002/mrd.22746>.
- Polański, Zbigniew, Hayden Homer, and Jacek Z. Kubiak. 2012. "Cyclin B in Mouse Oocytes and Embryos: Importance for Human Reproduction and Aneuploidy." In *Mouse Development: From Oocyte to Stem Cells*, edited by Jacek Z. Kubiak, 69–91. Results and Problems in Cell Differentiation. Berlin, Heidelberg: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30406-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30406-4_4).
- Pontheaux, Florian, Fernando Roch, Julia Morales, and Patrick Cormier. 2021. "Echinoderms : Focus on the Sea Urchin Model in Cellular and Developmental Biology." In *Handbook of Established and Emerging Marine Model Organisms in Experimental Biology*, edited by Boutet, A. & B. Schierwater, and eds. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003217503-17>.
- Portillo-López, Amelia, Meredith C. Gould, and José Luis Stephano. 2003. "MAPK Is Involved in Metaphase I Arrest in Oyster and Mussel Oocytes." *Biology of the Cell* 95 (5): 275–82. [https://doi.org/10.1016/S0248-4900\(03\)00054-6](https://doi.org/10.1016/S0248-4900(03)00054-6).
- Potashnikova, Daria M., Sergey A. Golyshev, Alexey A. Penin, Maria D. Logacheva, Anna V. Klepikova, Anastasia A. Zharikova, Andrey A. Mironov, Eugene V. Sheval, and Ivan A. Vorobjev. 2018. "FACS Isolation of Viable Cells in Different Cell Cycle Stages from Asynchronous Culture for RNA Sequencing." *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1745: 315–35. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7680-5\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7680-5_18).
- Potireddy, Santhi, Uros Midic, Cheng-Guang Liang, Zoran Obradovic, and Keith E. Latham. 2010. "Positive and Negative Cis-Regulatory Elements Directing Postfertilization Maternal mRNA Translational Control in Mouse Embryos." *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 299 (4): C818-827. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00166.2010>.
- Powers, Kyle T, Jenn-Yeu Alvin Szeto, and Christiane Schaffitzel. 2020. "New Insights into No-Go, Non-Stop and Nonsense-Mediated mRNA Decay Complexes." *Current Opinion in Structural Biology, Catalysis and Regulation • Protein Nucleic Acid Interaction*, 65 (December): 110–18. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.06.011>.
- Pöyry, Tuija A. A., Ann Kaminski, and Richard J. Jackson. 2004. "What Determines Whether Mammalian Ribosomes Resume Scanning after Translation of a Short Upstream Open Reading Frame?" *Genes & Development* 18 (1): 62–75. <https://doi.org/10.1101/gad.276504>.



- Prats, Anne-Catherine, Florian David, Leila H. Diallo, Emilie Roussel, Florence Tatin, Barbara Garmy-Susini, and Eric Lacazette. 2020. "Circular RNA, the Key for Translation." *International Journal of Molecular Sciences* 21 (22): 8591. <https://doi.org/10.3390/ijms21228591>.
- Prigent, C., and S. Dimitrov. 2003. "Phosphorylation of Serine 10 in Histone H3, What For?" *J Cell Sci* 116 (Pt 18): 3677–85. <https://doi.org/10.1242/jcs.00735>.
- Prochazka, Radek, and Milan Blaha. 2015. "Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinase 3/1 Activity during Meiosis Resumption in Mammals." *The Journal of Reproduction and Development* 61 (6): 495–502. <https://doi.org/10.1262/jrd.2015-069>.
- Proud, Christopher G. 2015. "Mnks, EIF4E Phosphorylation and Cancer." *Biochimica Et Biophysica Acta* 1849 (7): 766–73. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.10.003>.
- Pushparaj, P. N., J. J. Aarthi, J. Manikandan, and S. D. Kumar. 2008. "SiRNA, MiRNA, and ShRNA: In Vivo Applications." *Journal of Dental Research* 87 (11): 992–1003. <https://doi.org/10.1177/154405910808701109>.
- Pyronnet, S., J. Dostie, and N. Sonenberg. 2001. "Suppression of Cap-Dependent Translation in Mitosis." *Genes & Development* 15 (16): 2083–93. <https://doi.org/10.1101/gad.889201>.
- Pyronnet, S., H. Imataka, A. C. Gingras, R. Fukunaga, T. Hunter, and N. Sonenberg. 1999. "Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G (EIF4G) Recruits Mnk1 to Phosphorylate EIF4E." *The EMBO Journal* 18 (1): 270–79. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.1.270>.
- Pyronnet, Stéphane, and Nahum Sonenberg. 2001. "Cell-Cycle-Dependent Translational Control." *Current Opinion in Genetics & Development* 11 (1): 13–18. [https://doi.org/10.1016/S0959-437X\(00\)00150-7](https://doi.org/10.1016/S0959-437X(00)00150-7).
- Ramos, Hade, Anne Monette, Meijuan Niu, Aldo Barrera, Brenda López-Ulloa, Yazmín Fuentes, Paola Guizar, et al. 2022. "The Double-Stranded RNA-Binding Protein, Staufen1, Is an IRES-Transacting Factor Regulating HIV-1 Cap-Independent Translation Initiation." *Nucleic Acids Research* 50 (1): 411–29. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1188>.
- Raught, B., A. C. Gingras, S. P. Gygi, H. Imataka, S. Morino, A. Gradi, R. Aebersold, and N. Sonenberg. 2000. "Serum-Stimulated, Rapamycin-Sensitive Phosphorylation Sites in the Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G1." *The EMBO Journal* 19 (3): 434–44. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.3.434>.
- Raught, Brian, Franck Peiretti, Anne-Claude Gingras, Mark Livingstone, David Shahbazian, Greg L. Mayeur, Roberto D. Polakiewicz, Nahum Sonenberg, and John W. B. Hershey. 2004. "Phosphorylation of Eucaryotic Translation Initiation Factor 4B Ser422 Is Modulated by S6 Kinases." *The EMBO Journal* 23 (8): 1761–69. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600193>.
- Renz, Peter F., Fabiola Valdivia-Francia, and Ataman Sandoel. 2020. "Some like It Translated: Small ORFs in the 5'UTR." *Experimental Cell Research* 396 (1): 112229. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112229>.
- Rogers, G. W., N. J. Richter, and W. C. Merrick. 1999. "Biochemical and Kinetic Characterization of the RNA Helicase Activity of Eukaryotic Initiation Factor 4A." *The Journal of Biological Chemistry* 274 (18): 12236–44. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12236>.
- Rogers, G.W, Richter Nj, Lima Wf, and Merrick Wc. 2001. "Modulation of the Helicase Activity of EIF4A by EIF4B, EIF4H, and EIF4F." *The Journal of Biological Chemistry* 276 (33). <https://doi.org/10.1074/jbc.M100157200>.
- Rong, Liwei, Mark Livingstone, Rami Sukarieh, Emmanuel Petroulakis, Anne-Claude Gingras, Katherine Crosby, Bradley Smith, et al. 2008. "Control of EIF4E Cellular Localization

- by EIF4E-Binding Proteins, 4E-BPs.” *RNA (New York, N.Y.)* 14 (7): 1318–27. <https://doi.org/10.1261/rna.950608>.
- Ross, A. F., Y. Oleynikov, E. H. Kislauskis, K. L. Taneja, and R. H. Singer. 1997. “Characterization of a Beta-Actin mRNA Zipcode-Binding Protein.” *Molecular and Cellular Biology*, April. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.4.2158>.
- Roux, Philippe P., and Ivan Topisirovic. 2018. “Signaling Pathways Involved in the Regulation of mRNA Translation.” *Molecular and Cellular Biology* 38 (12): e00070-18. <https://doi.org/10.1128/MCB.00070-18>.
- Rozen, F, I Edery, K Meerovitch, T E Dever, W C Merrick, and N Sonenberg. 1990. “Bidirectional RNA Helicase Activity of Eucaryotic Translation Initiation Factors 4A and 4F.” *Molecular and Cellular Biology* 10 (3): 1134–44.
- Rozovsky, Nadja, Aimee C. Butterworth, and Melissa J. Moore. 2008. “Interactions between EIF4AI and Its Accessory Factors EIF4B and EIF4H.” *RNA* 14 (10): 2136–48. <https://doi.org/10.1261/rna.1049608>.
- Rubio Gomez, Miguel Angel, and Michael Ibba. 2020. “Aminoacyl-TRNA Synthetases.” *RNA (New York, N.Y.)* 26 (8): 910–36. <https://doi.org/10.1261/rna.071720.119>.
- Rudland, P. S. 1974. “Control of Translation in Cultured Cells: Continued Synthesis and Accumulation of Messenger RNA in Nondividing Cultures.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (3): 750–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.3.750>.
- Ruiz-Losada, Mireya, Raul González, Ana Peropadre, Alejandro Gil-Gálvez, Juan J. Tena, Antonio Baonza, and Carlos Estella. 2021. “Coordination between Cell Proliferation and Apoptosis after DNA Damage in Drosophila.” *Cell Death and Differentiation*, November. <https://doi.org/10.1038/s41418-021-00898-6>.
- Saba, James A., Kifayathullah Liakath-Ali, Rachel Green, and Fiona M. Watt. 2021. “Translational Control of Stem Cell Function.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 22 (10): 671–90. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00386-2>.
- Salaün, Patrick, Stéphane Pyronnet, Julia Morales, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé, Nahum Sonenberg, and Patrick Cormier. 2003. “EIF4E/4E-BP Dissociation and 4E-BP Degradation in the First Mitotic Division of the Sea Urchin Embryo.” *Developmental Biology* 255 (2): 428–39. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00099-4](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00099-4).
- Sauer, Guido, Roman Körner, Anja Hanisch, Albert Ries, Erich A. Nigg, and Herman H. W. Silljé. 2005. “Proteome Analysis of the Human Mitotic Spindle.” *Molecular & Cellular Proteomics: MCP* 4 (1): 35–43. <https://doi.org/10.1074/mcp.M400158-MCP200>.
- Saurin, A. T. 2018. “Kinase and Phosphatase Cross-Talk at the Kinetochore.” *Front Cell Dev Biol* 6: 62. <https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00062>.
- Schopf, J. William, Kouki Kitajima, Michael J. Spicuzza, Anatoliy B. Kudryavtsev, and John W. Valley. 2018. “SIMS Analyses of the Oldest Known Assemblage of Microfossils Document Their Taxon-Related Carbon Isotope Compositions.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (1): 53–58. <https://doi.org/10.1073/pnas.1718063115>.
- Schorl, Christoph, and John M. Sedivy. 2007. “Analysis of Cell Cycle Phases and Progression in Cultured Mammalian Cells.” *Methods (San Diego, Calif.)* 41 (2): 143–50. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.07.022>.
- Schulz, Katharine N., and Melissa M. Harrison. 2019. “Mechanisms Regulating Zygotic Genome Activation.” *Nature Reviews Genetics* 20 (4): 221–34. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0087-x>.
- Schwanhäusser, Björn, Dorothea Busse, Na Li, Gunnar Dittmar, Johannes Schuchhardt, Jana Wolf, Wei Chen, and Matthias Selbach. 2011. “Global Quantification of Mammalian

- Gene Expression Control.” *Nature* 473 (7347): 337–42. <https://doi.org/10.1038/nature10098>.
- Sea Urchin Genome Sequencing Consortium, E. Sodergren, G. M. Weinstock, E. H Davidson, R. A. Cameron, R. A. Gibbs, R. C. Angerer, et al. 2006. “The Genome of the Sea Urchin *Strongylocentrotus Purpuratus*.” *Science* 314 (5801): 941–52. <https://doi.org/10.1126/science.1133609>.
- Seki, Akiko, Judith A. Coppinger, Chang-Young Jang, John R. Yates, and Guowei Fang. 2008. “Bora and the Kinase Aurora A Cooperatively Activate the Kinase Plk1 and Control Mitotic Entry.” *Science*, June. <https://doi.org/10.1126/science.1157425>.
- Sen, Neelam Dabas, Fujun Zhou, Michael S. Harris, Nicholas T. Ingolia, and Alan G. Hinnebusch. 2016. “EIF4B Stimulates Translation of Long MRNAs with Structured 5’ UTRs and Low Closed-Loop Potential but Weak Dependence on EIF4G.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (38): 10464–72. <https://doi.org/10.1073/pnas.1612398113>.
- Sen, Onur, Jonathan U. Harrison, Nigel J. Burroughs, and Andrew D. McAinsh. 2021. “Kinetochores Reveal an Aurora-B-Dependent Error Correction Mechanism in Anaphase.” *Developmental Cell*, November. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.007>.
- Sesma, Ane, Carmen Castresana, and M. Mar Castellano. 2017. “Regulation of Translation by TOR, EIF4E and EIF2 $\alpha$  in Plants: Current Knowledge, Challenges and Future Perspectives.” *Frontiers in Plant Science* 8 (April). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00644>.
- Shah, O. Jameel, Sourav Ghosh, and Tony Hunter. 2003. “Mitotic Regulation of Ribosomal S6 Kinase 1 Involves Ser/Thr, Pro Phosphorylation of Consensus and Non-Consensus Sites by Cdc2.” *The Journal of Biological Chemistry* 278 (18): 16433–42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300435200>.
- Shahbazian, David, Armen Parsyan, Emmanuel Petroulakis, Ivan Topisirovic, Yvan Martineau, Bernard F. Gibbs, Yuri Svitkin, and Nahum Sonenberg. 2010. “Control of Cell Survival and Proliferation by Mammalian Eukaryotic Initiation Factor 4B.” *Molecular and Cellular Biology* 30 (6): 1478–85. <https://doi.org/10.1128/MCB.01218-09>.
- Shahbazian, David, Philippe P Roux, Virginie Mieulet, Michael S Cohen, Brian Raught, Jack Taunton, John W B Hershey, John Blenis, Mario Pende, and Nahum Sonenberg. 2006. “The MTOR/PI3K and MAPK Pathways Converge on EIF4B to Control Its Phosphorylation and Activity.” *The EMBO Journal* 25 (12): 2781–91. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601166>.
- Sheets, Michael D., Catherine A. Fox, Megan E. Dowdle, Susanne Imboden Blaser, Andy Chung, and Sookhee Park. 2017. “Controlling the Messenger: Regulated Translation of Maternal MRNAs in *Xenopus Laevis* Development.” In *Vertebrate Development: Maternal to Zygotic Control*, edited by Francisco Pelegri, Michael Danilchik, and Ann Sutherland, 49–82. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-46095-6\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-46095-6_2).
- Shengdong, Endalkachew A., Claudia, Emily Conn, John J. Fak, Aldo Mele, Bhagwattie Haripal, et al. 2015. “A Majority of m6A Residues Are in the Last Exons, Allowing the Potential for 3’ UTR Regulation.” *Genes & Development* 29 (19): 2037–53. <https://doi.org/10.1101/gad.269415.115>.
- Sheth, Ujwal, and Roy Parker. 2003. “Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies.” *Science* 300 (5620): 805–8. <https://doi.org/10.1126/science.1082320>.

- Shyu, Ann-Bin, Miles F Wilkinson, and Ambro van Hoof. 2008. "Messenger RNA Regulation: To Translate or to Degrade." *The EMBO Journal* 27 (3): 471–81. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601977>.
- Siefert, Joseph C., Emily A. Clowdus, and Christopher L. Sansam. 2015. "Cell Cycle Control in the Early Embryonic Development of Aquatic Animal Species." *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* 178 (December): 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2015.10.003>.
- Sivan, Gilad, Ranen Aviner, and Orna Elroy-Stein. 2011. "Mitotic Modulation of Translation Elongation Factor 1 Leads to Hindered TRNA Delivery to Ribosomes\*." *Journal of Biological Chemistry* 286 (32): 27927–35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.255810>.
- Skotheim, Jan M., Stefano Di Talia, Eric D. Siggia, and Frederick R. Cross. 2008. "Positive Feedback of G1 Cyclins Ensures Coherent Cell Cycle Entry." *Nature* 454 (7202): 291–96. <https://doi.org/10.1038/nature07118>.
- Smirnova, Victoria V., Ekaterina D. Shestakova, Dmitry V. Bikmetov, Anastasia A. Chugunova, Ilya A. Osterman, Marina V. Serebryakova, Olga V. Sergeeva, Timofey S. Zatselin, Ivan N. Shatsky, and Ilya M. Terenin. 2019. "EIF4G2 Balances Its Own mRNA Translation via a PCBP2-Based Feedback Loop." *RNA (New York, N.Y.)* 25 (7): 757–67. <https://doi.org/10.1261/rna.065623.118>.
- Smith, Ewan M., and Christopher G. Proud. 2008. "Cdc2-Cyclin B Regulates EEF2 Kinase Activity in a Cell Cycle- and Amino Acid-Dependent Manner." *The EMBO Journal* 27 (7): 1005–16. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.39>.
- Smith, L. Dennis, and R. E. Ecker. 1971. "The Interaction of Steroids with Rana Pipiens Oocytes in the Induction of Maturation." *Developmental Biology* 25 (2): 232–47. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(71\)90029-7](https://doi.org/10.1016/0012-1606(71)90029-7).
- Song, Jia L., Marlon Stoeckius, Jonas Maaskola, Marc Friedländer, Nadezda Stepicheva, Celina Juliano, Svetlana Lebedeva, William Thompson, Nikolaus Rajewsky, and Gary M. Wessel. 2012. "Select MicroRNAs Are Essential for Early Development in the Sea Urchin." *Developmental Biology* 362 (1): 104–13. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2011.11.015>.
- Song, Xinhong, Duccio Conti, Roshan L. Shrestha, Dominique Braun, and Viji M. Draviam. 2021. "Counteraction between Astrin-PP1 and Cyclin-B-CDK1 Pathways Protects Chromosome-Microtubule Attachments Independent of Biorientation." *Nature Communications* 12 (1): 7010. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27131-9>.
- Sonneveld, Stijn, Bram M. P. Verhagen, and Marvin E. Tanenbaum. 2020. "Heterogeneity in mRNA Translation." *Trends in Cell Biology* 30 (8): 606–18. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2020.04.008>.
- Speijer, Dave, Julius Lukeš, and Marek Eliáš. 2015. "Sex Is a Ubiquitous, Ancient, and Inherent Attribute of Eukaryotic Life." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (29): 8827–34. <https://doi.org/10.1073/pnas.1501725112>.
- Spirin, Alexander S. 2009. "How Does a Scanning Ribosomal Particle Move along the 5'-Untranslated Region of Eukaryotic mRNA? Brownian Ratchet Model." *Biochemistry* 48 (45): 10688–92. <https://doi.org/10.1021/bi901379a>.
- Spriggs, Keith A., Laura C. Cobbold, Catherine L. Jopling, Rebecca E. Cooper, Lindsay A. Wilson, Mark Stoneley, Mark J. Coldwell, et al. 2009. "Canonical Initiation Factor Requirements of the Myc Family of Internal Ribosome Entry Segments." *Molecular and Cellular Biology* 29 (6): 1565–74. <https://doi.org/10.1128/MCB.01283-08>.
- Standart, Nancy, and Dominique Weil. 2018. "P-Bodies: Cytosolic Droplets for Coordinated mRNA Storage." *Trends in Genetics* 34 (8): 612–26. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.005>.

- Stonyte, Vilte, Erik Boye, and Beáta Grallert. 2018. "Regulation of Global Translation during the Cell Cycle." *Journal of Cell Science* 131 (17). <https://doi.org/10.1242/jcs.220327>.
- Subtelny, Alexander O., Stephen W. Eichhorn, Grace R. Chen, Hazel Sive, and David P. Bartel. 2014. "Poly(A)-Tail Profiling Reveals an Embryonic Switch in Translational Control." *Nature* 508 (7494): 66–71. <https://doi.org/10.1038/nature13007>.
- Sui, Xinbing, Na Kong, Li Ye, Weidong Han, Jichun Zhou, Qin Zhang, Chao He, and Hongming Pan. 2014. "P38 and JNK MAPK Pathways Control the Balance of Apoptosis and Autophagy in Response to Chemotherapeutic Agents." *Cancer Letters* 344 (2): 174–79. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.11.019>.
- Suski, Jan M., Marcin Braun, Vladislav Strmiska, and Piotr Sicinski. 2021. "Targeting Cell-Cycle Machinery in Cancer." *Cancer Cell* 39 (6): 759–78. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.03.010>.
- Susor, Andrej, Denisa Jansova, Martin Anger, and Michal Kubelka. 2016. "Translation in the Mammalian Oocyte in Space and Time." *Cell and Tissue Research* 363 (1): 69–84. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2269-6>.
- Susor, Andrej, Denisa Jansova, Renata Cerna, Anna Danylevska, Martin Anger, Tereza Toralova, Radek Malik, et al. 2015. "Temporal and Spatial Regulation of Translation in the Mammalian Oocyte via the MTOR-EIF4F Pathway." *Nature Communications* 6 (January): 6078. <https://doi.org/10.1038/ncomms7078>.
- Susor, Andrej, and Michal Kubelka. 2017. "Translational Regulation in the Mammalian Oocyte." *Results and Problems in Cell Differentiation* 63: 257–95. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-60855-6_12).
- Svitkin, Y. V., A. Pause, A. Haghighat, S. Pyronnet, G. Witherell, G. J. Belsham, and N. Sonenberg. 2001. "The Requirement for Eukaryotic Initiation Factor 4A (EIF4A) in Translation Is in Direct Proportion to the Degree of mRNA 5' Secondary Structure." *RNA (New York, N.Y.)* 7 (3): 382–94. <https://doi.org/10.1017/s135583820100108x>.
- Swartz, S. Zachary, Hieu T. Nguyen, Brennan C. McEwan, Mark E. Adamo, Iain M. Cheeseman, and Arminja N. Kettenbach. 2021. "Selective Dephosphorylation by PP2A-B55 Directs the Meiosis I-Meiosis II Transition in Oocytes." *ELife* 10 (August): e70588. <https://doi.org/10.7554/eLife.70588>.
- Szmyd, Radoslaw, Joanna Niska-Blakie, M. Kasim Diril, Patrícia Renck Nunes, Konstantinos Tzelepis, Aurélie Lacroix, Noémi van Hul, et al. 2019. "Premature Activation of Cdk1 Leads to Mitotic Events in S Phase and Embryonic Lethality." *Oncogene* 38 (7): 998–1018. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0464-0>.
- Tachibana, Kazunori, Daisuke Tanaka, Tomohiro Isobe, and Takeo Kishimoto. 2000. "C-Mos Forces the Mitotic Cell Cycle to Undergo Meiosis II to Produce Haploid Gametes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (26): 14301–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.26.14301>.
- Tadros, Wael, and Howard D. Lipshitz. 2009. "The Maternal-to-Zygotic Transition: A Play in Two Acts." *Development (Cambridge, England)* 136 (18): 3033–42. <https://doi.org/10.1242/dev.033183>.
- Takeda, Noriyo, Yota Kon, Gonzalo Quiroga Artigas, Pascal Lapébie, Carine Barreau, Osamu Koizumi, Takeo Kishimoto, Kazunori Tachibana, Evelyn Houliston, and Ryusaku Deguchi. 2018. "Identification of Jellyfish Neuropeptides That Act Directly as Oocyte Maturation-Inducing Hormones." *Development* 145 (2): dev156786. <https://doi.org/10.1242/dev.156786>.
- Tanaka, Hiromitsu, Yasuhide Yoshimura, Yukio Nishina, Masami Nozaki, Hiroshi Nojima, and Yoshitake Nishimune. 1994. "Isolation and Characterization of cDNA Clones Specifically Expressed in Testicular Germ Cells." *FEBS Letters* 355 (1): 4–10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(94\)01155-9](https://doi.org/10.1016/0014-5793(94)01155-9).

- Tanaka, Hiromitsu, Yasuhide Yoshimura, Masami Nozaki, Kentaro Yomogida, Junji Tsuchida, Yasuhiro Tosaka, Toshiyuki Habu, et al. 1999. "Identification and Characterization of a Haploid Germ Cell-Specific Nuclear Protein Kinase (Haspin) in Spermatid Nuclei and Its Effects on Somatic Cells \*." *Journal of Biological Chemistry* 274 (24): 17049–57. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.24.17049>.
- Tanenbaum, Marvin E, Noam Stern-Ginossar, Jonathan S Weissman, and Ronald D Vale. 2015. "Regulation of mRNA Translation during Mitosis." *ELife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.07957>.
- Tarnowka, M. A., and C. Baglioni. 1979. "Regulation of Protein Synthesis in Mitotic HeLa Cells." *Journal of Cellular Physiology* 99 (3): 359–67. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040990311>.
- Taylor, Edwin W. 1963. "RELATION OF PROTEIN SYNTHESIS TO THE DIVISION CYCLE IN MAMMALIAN CELL CULTURES." *The Journal of Cell Biology* 19 (1): 1–18.
- Terasaki, Mark, and Linda Runft. 2010. "Two-Stage Dependence for 1-Methyladenine Induced Reinitiation of Meiotic Maturation in Starfish Oocytes." *Experimental Cell Research* 316 (16): 2654–63. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.05.031>.
- Thoreen, Carson C., Lynne Chantranupong, Heather R. Keys, Tim Wang, Nathanael S. Gray, and David M. Sabatini. 2012. "A Unifying Model for MTORC1-Mediated Regulation of mRNA Translation." *Nature* 485 (7396): 109–13. <https://doi.org/10.1038/nature11083>.
- Trachsel, Hans, Bernhard Erni, Max H. Schreier, and Theophil Staehelin. 1977. "Initiation of Mammalian Protein Synthesis: II. The Assembly of the Initiation Complex with Purified Initiation Factors." *Journal of Molecular Biology* 116 (4): 755–67. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(77\)90269-8](https://doi.org/10.1016/0022-2836(77)90269-8).
- Tréfier, Aurélie, Lucie P. Pellissier, Astrid Musnier, Eric Reiter, Florian Guillou, and Pascale Crépieux. 2018. "G Protein-Coupled Receptors As Regulators of Localized Translation: The Forgotten Pathway?" *Frontiers in Endocrinology* 9: 17. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00017>.
- Vadivel Gnanasundram, Sivakumar, and Robin Fåhræus. 2018. "Translation Stress Regulates Ribosome Synthesis and Cell Proliferation." *International Journal of Molecular Sciences* 19 (12): 3757. <https://doi.org/10.3390/ijms19123757>.
- Vasudevan, Shobha, Yingchun Tong, and Joan A. Steitz. 2007. "Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can up-Regulate Translation." *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858): 1931–34. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>.
- Vatikioti, Alexandra, Elena Karkoulia, Marina Ioannou, and John Strouboulis. 2019. "Translational Regulation and Deregulation in Erythropoiesis." *Experimental Hematology* 75 (July): 11–20. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2019.05.004>.
- Velásquez, Celestino, Erdong Cheng, Masahiro Shuda, Paula J. Lee-Oesterreich, Lisa Pogge von Strandmann, Marina A. Gritsenko, Jon M. Jacobs, Patrick S. Moore, and Yuan Chang. 2016. "Mitotic Protein Kinase CDK1 Phosphorylation of mRNA Translation Regulator 4E-BP1 Ser83 May Contribute to Cell Transformation." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (30): 8466–71. <https://doi.org/10.1073/pnas.1607768113>.
- Voronina, Ekaterina, William F Marzluff, and Gary M Wessel. 2003. "Cyclin B Synthesis Is Required for Sea Urchin Oocyte Maturation." *Developmental Biology* 256 (2): 258–75. [https://doi.org/10.1016/S0012-1606\(02\)00134-3](https://doi.org/10.1016/S0012-1606(02)00134-3).
- Wagenaar, E. B. 1983. "The Timing of Synthesis of Proteins Required for Mitosis in the Cell Cycle of the Sea Urchin Embryo." *Experimental Cell Research* 144 (2): 393–403. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(83\)90419-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(83)90419-6).

- Waldron, Ashley, and Mamiko Yajima. 2020. "Localized Translation on the Mitotic Apparatus: A History and Perspective." *Developmental Biology* 468 (1): 55–58. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2020.09.010>.
- Walker, Sarah E., Fujun Zhou, Sarah F. Mitchell, Victoria S. Larson, Leos Valasek, Alan G. Hinnebusch, and Jon R. Lorsch. 2013. "Yeast EIF4B Binds to the Head of the 40S Ribosomal Subunit and Promotes mRNA Recruitment through Its N-Terminal and Internal Repeat Domains." *RNA* 19 (2): 191–207. <https://doi.org/10.1261/rna.035881.112>.
- Wang, Yubao, Michael Begley, Qing Li, Hai-Tsang Huang, Ana Lako, Michael J. Eck, Nathanael S. Gray, Timothy J. Mitchison, Lewis C. Cantley, and Jean J. Zhao. 2016. "Mitotic MELK-EIF4B Signaling Controls Protein Synthesis and Tumor Cell Survival." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (35): 9810–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606862113>.
- Wiener, David, and Schraga Schwartz. 2021. "The Epitranscriptome beyond M6A." *Nature Reviews Genetics* 22 (2): 119–31. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-00295-8>.
- Wilkinson, Kevin A, Edward J Merino, and Kevin M Weeks. 2006. "Selective 2'-Hydroxyl Acylation Analyzed by Primer Extension (SHAPE): Quantitative RNA Structure Analysis at Single Nucleotide Resolution." *Nature Protocols* 1 (3): 1610–16. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.249>.
- Wohlgemuth, Ingo, Corinna Pohl, Joerg Mittelstaet, Andrey L. Konevega, and Marina V. Rodnina. 2011. "Evolutionary Optimization of Speed and Accuracy of Decoding on the Ribosome." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366 (1580): 2979–86. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0138>.
- Wu, Qiushuang, Matthew Wright, Madelaine M Gogol, William D Bradford, Ning Zhang, and Ariel A Bazzini. 2020. "Translation of Small Downstream ORFs Enhances Translation of Canonical Main Open Reading Frames." *The EMBO Journal* 39 (17): e104763. <https://doi.org/10.15252/embj.2020104763>.
- Yajima, Mamiko, and Gary M. Wessel. 2011. "The DEAD-Box RNA Helicase Vasa Functions in Embryonic Mitotic Progression in the Sea Urchin." *Development (Cambridge, England)* 138 (11): 2217–22. <https://doi.org/10.1242/dev.065052>.
- . 2015. "Essential Elements for Translation: The Germline Factor Vasa Functions Broadly in Somatic Cells." *Development (Cambridge, England)* 142 (11): 1960–70. <https://doi.org/10.1242/dev.118448>.
- Yamasaki, Satoshi, and Paul Anderson. 2008. "Reprogramming mRNA Translation during Stress." *Current Opinion in Cell Biology* 20 (2): 222–26. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.01.013>.
- Yang, Yun, and Zefeng Wang. 2019. "IRES-Mediated Cap-Independent Translation, a Path Leading to Hidden Proteome." *Journal of Molecular Cell Biology* 11 (10): 911–19. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjz091>.
- Youn, Ji-Young, Wade H. Dunham, Seo Jung Hong, James D. R. Knight, Mikhail Bashkurov, Ginny I. Chen, Halil Bagci, et al. 2018. "High-Density Proximity Mapping Reveals the Subcellular Organization of mRNA-Associated Granules and Bodies." *Molecular Cell* 69 (3): 517–532.e11. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.12.020>.
- Youn, Ji-Young, Boris J. A. Dyakov, Jianping Zhang, James D. R. Knight, Robert M. Vernon, Julie D. Forman-Kay, and Anne-Claude Gingras. 2019. "Properties of Stress Granule and P-Body Proteomes." *Molecular Cell* 76 (2): 286–94. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.014>.
- Zaret, Kenneth S. 2014. "Genome Reactivation after the Silence in Mitosis: Recapitulating Mechanisms of Development?" *Developmental Cell* 29 (2): 132–34. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.019>.

- Zetterberg, A., and O. Larsson. 1985. "Kinetic Analysis of Regulatory Events in G1 Leading to Proliferation or Quiescence of Swiss 3T3 Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (16): 5365–69. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.16.5365>.
- Zetterberg, A., O. Larsson, and K. G. Wiman. 1995. "What Is the Restriction Point?" *Current Opinion in Cell Biology* 7 (6): 835–42. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80067-0](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80067-0).
- Zhang, Xiao-Dong, Jiangning Song, Peer Bork, and Xing-Ming Zhao. 2016. "The Exploration of Network Motifs as Potential Drug Targets from Post-Translational Regulatory Networks." *Scientific Reports* 6 (February): 20558. <https://doi.org/10.1038/srep20558>.
- Zhao, Boxuan Simen, Ian A. Roundtree, and Chuan He. 2017. "Post-Transcriptional Gene Regulation by mRNA Modifications." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 18 (1): 31–42. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.132>.
- Zhou, L., X. Tian, C. Zhu, F. Wang, and J. M. Higgins. 2014. "Polo-like Kinase-1 Triggers Histone Phosphorylation by Haspin in Mitosis." *EMBO Rep* 15 (3): 273–81. <https://doi.org/10.1002/embr.201338080>.
- Zickler, Denise, and Nancy Kleckner. 2015. "Recombination, Pairing, and Synapsis of Homologs during Meiosis." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 7 (6): a016626. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016626>.
- Zoncu, Roberto, Liron Bar-Peled, Alejo Efeyan, Shuyu Wang, Yasemin Sancak, and David M. Sabatini. 2011. "MTORC1 Senses Lysosomal Amino Acids Through an Inside-Out Mechanism That Requires the Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase." *Science* 334 (6056): 678–83. <https://doi.org/10.1126/science.1207056>.





## **Table des illustrations**

FIGURE 1 LE CYCLE CELLULAIRE MITOTIQUE.....	11
FIGURE 2 LE CYCLE CELLULAIRE MEIOTIQUE.....	16
FIGURE 3 REGULATION DE L'ACTIVITE DU COMPLEXE CYCLINE B/CDK1 .....	18
FIGURE 4 REGULATION DU CYCLE CELLULAIRE PAR LES COMPLEXES CYCLINE/CDK .....	20
FIGURE 5 POINT DE CONTROLE G1/S DU CONTROLE DE L'ENTREE DANS UN CYCLE CELLULAIRE .....	22
FIGURE 6 POINT DE CONTROLE G2/M DE L'ENTREE EN MITOSE.....	24
FIGURE 7 LE SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT (SAC).....	25
FIGURE 8 ARRETS MEIOTIQUES ET FECONDATION .....	30
FIGURE 9 L'EXPRESSION DU GENOME EST UN PROCESSUS EXTREMEMENT REGULE .....	33
FIGURE 10 REGULATION GENERALE D'UN ARNM.....	34
FIGURE 11 INITIATION DE LA TRADUCTION .....	41
FIGURE 12 ELONGATION DE LA TRADUCTION.....	44
FIGURE 13 TERMINAISON DE LA TRADUCTION .....	45
FIGURE 14 ELEMENTS DE REGULATIONS INTRINSEQUES A L'ARNM PRESENTES DANS L'INTRODUCTION .....	46
FIGURE 15 LES VOIES DE SIGNALISATION MTOR ET MAPK.....	53
FIGURE 16 REGULATIONS DE LA TRADUCTION PAR LES VOIES MTOR ET MAPK .....	54
FIGURE 17 REGULATION DE LA TRADUCTION EN PHASE M : LOCALE ET SPECIFIQUE .....	64
FIGURE 18 CONTROLE DES PREMIERES DIVISIONS PAR AUGMENTATION DE LA SYNTHESE PROTEIQUE EN REPONSE A LA FECONDATION .....	72
FIGURE 19 LA NEO-TRADUCTION DE CYCLINE A ET B EN REPONSE A LA FECONDATION EST NECESSAIRE POUR LA BONNE DYNAMIQUE DE LA PREMIERE DIVISION CHEZ S. GRANULARIS .....	110

FIGURE 20 LA NEO-TRADUCTION DE CDK1 EN REPONSE A LA FECONDATION SEMBLE NECESSAIRE POUR LA BONNE DYNAMIQUE DE LA PREMIERE DIVISION CHEZ P. LIVIDUS .....	111
FIGURE 21 LA NEO-TRADUCTION DE PLK1 EN REPONSE A LA FECONDATION SEMBLE NECESSAIRE POUR LA BONNE DYNAMIQUE DE LA PREMIERE DIVISION CHEZ P. LIVIDUS .....	132
FIGURE 22 MESURE DE L'EFFICACITE TRADUCTIONNELLE IN VIVO DE REGIONS NON CODANTES (UTR) D'ARNM.....	157
FIGURE 23 LA KINASE MITOTIQUE REGULATRICE DE LA TRADUCTION ?.....	194
FIGURE 24 LA NEO-TRADUCTION REGULATRICE DE LA DYNAMIQUE DU CYCLE .....	198
FIGURE 25 INFLUENCE DES UTR SUR L'ACTIVITE TRADUCTIONNELLE DE L'ARNM.....	199
FIGURE 26 TRANSLATION REGULATORY NETWORK (TLRN) EMBRYONNAIRE CHEZ L'OURSIN.....	202

## **Table des tableaux**

TABLEAU 1 : TRANSITION MATERNELLE A ZYGOTIQUE (MZT) SELON LES ESPECES .....	32
TABLEAU 2 : FACTEURS DE LA TRADUCTION EUCARYOTES.....	38
TABLEAU 3 : CLASSES D'IRES VIR AUX .....	42
TABLEAU 4 : REGULATIONS DES ACTEURS DE LA TRADUCTION.....	60

## **Résumé**

### **Activité traductionnelle et dynamique mitotique induites par la fécondation chez l'oursin.**

La régulation fine de la traduction pour la dynamique du cycle cellulaire est un sujet important dans la recherche cellulaire. Au cours de ma thèse, j'ai analysé les relations entre l'activité traductionnelle des ARNm et les divisions embryonnaires mitotiques d'oursins. La fécondation de l'œuf déclenche l'activation de la machinerie traductionnelle nécessaire à la reprise des divisions mitotiques. Un réseau de régulation traductionnelle (TIRN), indépendant de la transcription, reste à identifier et à caractériser en amont des acteurs du cycle cellulaire.

A la recherche d'activités mitotiques pour visualiser la dynamique spatiale à l'intérieur d'œufs, j'ai obtenu des données originales montrant l'activité dynamique et spatiale du complexe mitotique CyclinB/CDK1 et la phosphorylation de l'histone H3 sur la thréonine 3 (pH3T3) pendant la mitose embryonnaire. Ensuite, j'ai analysé le rôle *in vivo* de 5'UTR spécifiques pour contrôler le recrutement d'ARNm dans les polysomes actifs après la fécondation. Enfin, j'ai montré que la traduction de l'ARNm codant pour eIF4B (facteur d'initiation eucaryote 4B) contrôle l'activité traductionnelle et la dynamique des deux premières divisions mitotiques induites par la fécondation. Je propose qu'eIF4B agisse comme un régulateur positif au sein du TIRN. Ces données permettront d'étudier l'effet potentiel d'eIF4B sur les activités CDK1 et pH3T3.

Mots clés :

oursin ; réseau de régulation traductionnelle ; cycle cellulaire ; CyclineB/CDK1 ; phosphorylation de l'histone H3 sur la thréonine 3 ; eIF4B

## **Abstract**

### **Translational activity and mitotic dynamics induced by fertilization in sea urchin.**

Fine tuning of translation for cell cycle dynamics remains an important topic in cell research. During my thesis, I analyzed the relationships between mRNA translational activity and mitotic cell division using sea urchin embryos. Egg fertilization triggers the activation of the translational machinery, which is required for resuming the first mitotic division, independently of any transcription. A Translational Regulatory Network (TIRN) remains to be identified and characterized upstream of the cell cycle actors.

Seeking mitotic activities that can help visualize spatial dynamics inside isolated eggs, I obtained original data showing the spatial and dynamic activity of the mitotic complex CyclinB/CDK1 and the phosphorylation of histone H3 at threonine 3 (pH3T3) during embryonic mitosis. Then, I analyzed the *in vivo* role of specific 5'UTR for controlling the mRNA recruitment onto active polysome following fertilization. Finally, I showed that the translation of the mRNA encoding for eIF4B (eukaryotic Initiation Factor 4B) controls the translational activity and dynamics of the first two mitotic divisions induced by fertilization. I propose that eIF4B acts as a positive regulator within the TIRN. These data will allow to study the potential effect of eIF4B acting upstream the spatial dynamics of CDK1 and pH3T3 activities.

Keywords:

sea urchin ; translation regulatory network ; cell cycle ; CyclinB/CDK1 ; phosphorylation of histone H3 at threonine 3 ; eIF4B