

# Embryon d'oursin et séquençage du génome de l'espèce *S. purpuratus* : quels apports à l'étude du cycle cellulaire ?

par Anne-Marie Genevière\* & Antoine Aze, Yasmine Even

\* CNRS-UMR7628, Observatoire Océanologique de Banyuls, Banyuls-sur-Mer, F-66650 France ;  
Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR7628, Paris, F-75005 France.

Correspondance : Anne-Marie Genevière, Observatoire Océanologique de Banyuls, Laboratoire Arago,  
CNRS/UPMC-UMR7628, BP 44, 66650 Banyuls-sur-Mer, France.

E-mail : AMG : anne-marie.genevriere@obs-banyuls.fr – AA : antoine.aze@obs-banyuls.fr – YE : evenyasmine@yahoo.fr

Reçu le 1<sup>er</sup> mars 2007

## RÉSUMÉ

Depuis longtemps, l'oursin est un modèle privilégié pour les recherches sur le développement. De plus, la fécondation et la croissance externe des embryons, leur cycle de division rapide ainsi que leur transparence, appropriée aux techniques de visualisation moléculaire les plus actuelles, font également de l'embryogenèse précoce de l'oursin un modèle de choix pour l'analyse des mécanismes qui régulent la division cellulaire. Ces caractéristiques, ainsi que la position phylogénétique de l'oursin, proche des vertébrés et cependant dans un groupe externe, ont conduit la communauté scientifique travaillant sur ce modèle à séquencer très récemment le génome complet de l'espèce *Strongylocentrotus purpuratus*. Ce génome contient un répertoire pratiquement complet des gènes régulateurs de la division cellulaire. La comparaison avec les répertoires équivalents de vertébrés, d'insectes, de nématodes ou

de tuniciers donne un nouvel éclairage à l'évolution du contrôle du cycle cellulaire. Chaque famille de gènes comporte chez l'oursin un nombre limité de composants. Chez les vertébrés, de nombreuses familles ont subi une forte expansion (cyclines, kinases mitotiques...), néanmoins d'autres gènes semblent être absents, comme par exemple une nouvelle cycline de type B mise en évidence chez l'oursin. Par ailleurs, certains gènes, que l'on croyait jusque là spécifiques des vertébrés, existent également chez *S. purpuratus* (MCM9,...). Enfin, il est important de noter l'absence chez l'oursin des inhibiteurs du cycle cellulaire de la famille des INK, qui seraient donc vraisemblablement spécifiques des vertébrés. Cet apport considérable de nouveaux outils moléculaires pour l'oursin donnera sans aucun doute un nouvel essor aux travaux concernant les mécanismes de division dans cette espèce.

## SUMMARY Genome sequencing in the sea urchin embryo: what is new concerning the cell cycle?

Sea urchin is a classical research model system in developmental biology; moreover, the external fertilization and growth of embryos, their rapid division cycle, their transparency and the accessibility of these embryos to molecular visualization methods, made them good specimens to analyze the regulatory mechanisms of cell division. These features as well as the phylogenetic position of sea urchin, close to vertebrates but in an outgroup within the deuterostomes, led scientists working on this model to sequence the genome of the species *S. purpuratus*. The genome contains a full repertoire of cell cycle control genes. A comparison of this toolkit with those from vertebrates, nematodes, drosophila, as well as tunicates,

provides new insight into the evolution of cell cycle control. While some gene subtypes have undergone lineage-specific expansions in vertebrates (i.e. cyclins, mitotic kinases,...), others seem to be lost in vertebrates, for instance the novel cyclin B identified in *S. purpuratus*. On the other hand, some genes which were previously thought to be vertebrate innovations, are also found in sea urchins (i.e. MCM9). To note is also the absence of cell cycle inhibitors of the INK type, which are apparently confined to vertebrates. The uncovered genomic repertoire of cell-cycle regulators will thus provide molecular tools that should further enhance future research on cell cycle control and developmental regulation in this model.

## INTRODUCTION

Depuis des millénaires, les hommes ont été intrigués par les oursins comme l'atteste leur représentation sur des mosaïques romaines ou des poteries de Minos. Une

île des cyclades, Echinoussa (de nos jours Kimolos) ainsi que la ville grecque d'Ekhinoussa, leur ont dû ou leur doivent encore leur nom. Cependant ce sont principalement les caractères comestibles ou esthétiques de cet animal qui retenaient l'attention à cette époque. Aristote fut l'un

des premiers naturalistes à mentionner les curiosités morphologiques et physiologiques de cet animal :

« La bouche du hérisson de mer se tient sans discontinuité d'un bout à l'autre ; mais à la surface, elle n'est pas continue, et l'on dirait une lanterne qui n'aurait pas la peau qui doit en faire le cercle... », (Histoire des animaux, Aristote, écrit en 350 A. C., traduction de Barthélémy-Saint-Hilaire, 1883), cet organe gardera le nom de lanterne d'Aristote. Déjà, l'abondance incroyable des gamètes produits par les oursins (des millions d'œufs chaque année) ne lui avait pas échappé :

« L'hiver est (au contraire) le temps propre pour manger les hérissons du détroit de Pyrrha, c'est alors que ceux-ci sont meilleurs. Ils sont petits mais plein d'œufs » (traduction de Camus, 1753).

Il faudra toutefois attendre la moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle pour que l'œuf d'oursin, cet « objet dans lequel tant de circonstances favorables coïncident... » (Boveri, 1892 ; cité dans Ernst, 1997), devienne un véritable modèle de laboratoire. Les avancées majeures dans la biologie moléculaire du développement, obtenues à partir de l'œuf et de l'embryon d'oursin ces 40 dernières années, ont largement confirmé la pertinence de ce modèle. Parmi les traits marquants, retenons que 1) le simple mélange *in vitro* des gamètes produit des quantités d'embryons, inégales dans d'autres modèles, se développant de manière extrêmement synchrone, 2) ces œufs et ces embryons, transparents, se prêtent aux méthodes de visualisation moléculaire, hybridation *in situ*, immunocytochimie etc., 3) l'expression des gènes peut y être perturbée par l'injection de composés spécifiques de séquences nucléiques (oligonucléotides antisens substitués morpholinos) ou par de l'ADN exogène, enfin 4) l'isolement de molécules, d'organelles ou de structures allant des polysomes au fuseau mitotique est accessible.

Ces caractéristiques biologiques remarquables associées à la position phylogénétique particulière de l'oursin ont conduit très récemment les biologistes à séquencer le génome de *Strongylocentrotus purpuratus* (Sodergren *et al.*, 2006), une espèce nord-américaine d'intérêt à la fois scientifique et économique. Rappelons que les oursins (Echinodermes) sont l'une des cinq classes d'échinodermes et que la phylogénie moléculaire montre de manière concluante que les échinodermes constituent (avec les hémichordés), le groupe le plus proche des chordés. Des similitudes d'organisation embryonnaire, ont amené les zoologistes à rassembler ces trois phyla dans le superclade des deutérostomiens. Parmi les espèces dont le génome est séquencé, l'oursin constitue le seul représentant externe au groupe des chordés, au sein de ce clade. Il permet donc de définir, par comparaison, les gènes spécifiques des deutérostomiens, ceux propres aux chordés ou encore ceux conservés dans l'ensemble des bilatériens (Fig. 1). Dans l'analyse d'une fonction biologique ou de son évolution, cette comparaison est riche d'enseignements.

Dans cette revue nous nous intéresserons plus particulièrement aux apports du modèle oursin à la connaissance des mécanismes qui actionnent et contrôlent les cycles de division cellulaire embryonnaire. Pour l'analyse détaillée de l'ensemble des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et annotés dans le génome de l'oursin *S. purpuratus*, on se reportera à l'article de Fernandez-Guerra *et al.*, 2006. Les mécanismes d'apoptose, qui ne peuvent, faute de place être abordés dans cet article sont détaillés dans Robertson *et al.*, 2006. Pour une synthèse des données récentes concernant de manière plus générale la biologie cellulaire et la biologie du développement chez l'oursin on consultera le numéro spécial de *Developmental Biology* paru en décembre 2006 (vol. 300, n° 1) ainsi que les revues récentes (Davidson & Erwin, 2006 ; Levine & Davidson, 2005).

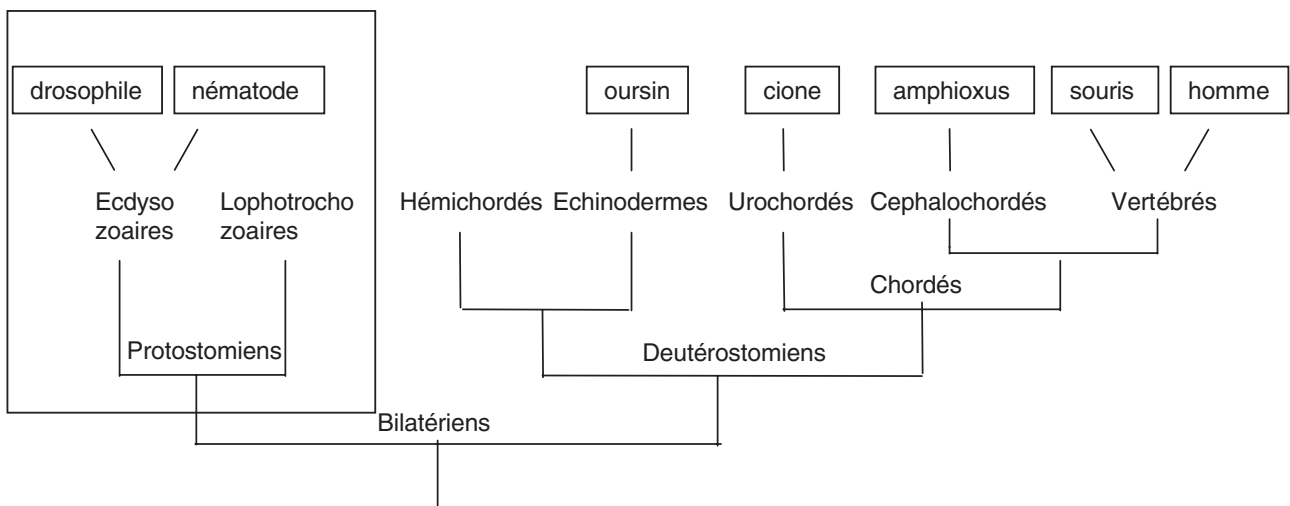


FIG. 1. – Position phylogénétique de l'oursin par rapport aux autres systèmes modèles et à l'Homme, (d'après Sodergren *et al.*, The sea urchin genome sequencing consortium, 2006).

## DE LA FÉCONDATION À LA PREMIÈRE DIVISION DE L'ŒUF, UN CHEMIN JALONNÉ DE DÉCOUVERTES FAITES CHEZ L'OURSIN

L'origine de l'embryon, comme l'hérédité, ont suscité de nombreuses spéculations parmi les philosophes et hommes de Science. Mais ce sont les expériences menées sur l'oursin durant la deuxième moitié du XIX<sup>ème</sup> siècle qui ont réellement conduit à la compréhension du processus de fécondation et à la théorie chromosomique de l'hérédité. En 1847 Alphonse Derbès, professeur de zoologie à l'Université de Marseille, observe pour la première fois le rôle essentiel du sperme dans la fécondation. Un quart de siècle plus tard, Oskar Hertwig, alors à la station Anton Dohrn de Naples profite de la remarquable clarté optique des œufs d'oursin pour démontrer que la fécondation est le résultat de la fusion de deux pronuclei, mâle et femelle (Hertwig, 1876) (Fig. 2). Indépendamment en 1877, Hermann Fol, qui créera à Villefranche-sur-Mer en 1880 un petit laboratoire marin avec Jules Barrois, est conduit à la même conclusion en obser-

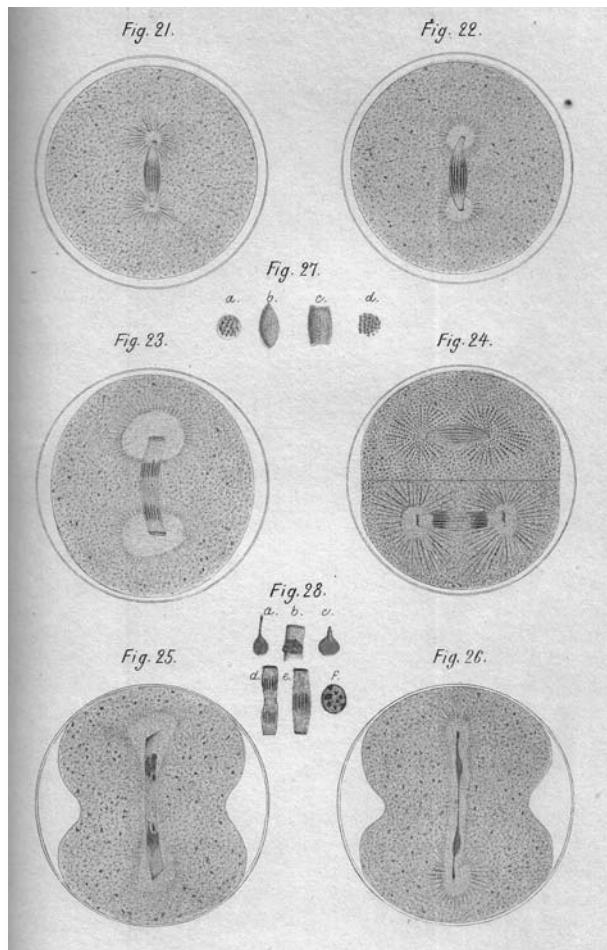


FIG. 2. – Reproduction de la planche XIII de l'article d'Oskar Hertwig en 1876. Première division mitotique observée dans les œufs de *P. lividus*.

vant à Messine les œufs d'oursin et d'étoile de mer. De plus, il montre que ces deux espèces ont des œufs dans des états différents (nous reviendrons plus loin sur cette particularité) :

« Nous sommes en présence de deux cas en apparence distincts. Dans l'un, celui de l'oursin, l'ovule au moment de la ponte, est déjà dépourvu de sa vésicule germinative et ne possède qu'un pronucleus femelle; s'il vient à être fécondé, il se développera sans expulsion de globules polaires. Dans l'autre cas, qui est celui de la grande majorité des animaux, l'ovule pondu possède encore une vésicule et souvent une tâche germinative... ».

Theodor Boveri, devenu l'assistant d'Hertwig, débute ensuite sur le modèle oursin une élégante série d'expériences qui le conduira à prouver que la présence continue d'un génome complet dans chaque cellule de l'embryon est nécessaire à un développement normal (Boveri, 1902). Il décrit également le centrosome et son rôle dans la fécondation et la division cellulaire (Boveri, 1888). Boveri avait déjà pressenti que le cytoplasme était en grande partie responsable du contrôle spatial et temporel des premiers clivages embryonnaires mais c'est dans les années 1960, que le stockage, dans le cytoplasme de l'ovocyte, de protéines et d'ARN messagers maternels nécessaires au développement de l'embryon sera mis en évidence (Brachet *et al.*, 1963; Denny & Tyler, 1964; Gross & Cousineau, 1964). C'est également de nombreuses années plus tard que l'on réalisera l'importance de deux découvertes : la totipotence des cellules embryonnaires précoces d'oursin, due à Driesch (1891) et Spemann (1936) et le concept d'équivalence des noyaux proposé par Delage (1895), professeur à la Sorbonne et Directeur de la station biologique de Roscoff, en conclusion de ses travaux sur la parthénogenèse artificielle de l'embryon d'oursin (commenté dans Beetschen & Fischer, 2004; Delage, 1895; Delage, 1903; Driesch, 1891; Spemann, 1936). Les œufs d'oursin, capables d'incorporer des précurseurs d'acides nucléiques et de protéines par simple ajout dans l'eau de mer, seront encore un modèle de choix pour analyser le rôle des synthèses protéiques aux premières étapes du développement. Ces synthèses protéiques, stimulées au moment de la fécondation, sont essentielles à la division cellulaire. Hultin note en 1961 : « le bloc mitotique produit par la puromycine est probablement dû à son effet direct sur le métabolisme protéique. Certaines protéines importantes pour la mitose pourraient être synthétisées en quantité insuffisante dans ces conditions ». Cette protéine indispensable à la première division cellulaire, mais aussi à toutes celles qui suivront, que ce soit chez l'embryon ou chez l'adulte, chez l'oursin mais aussi chez l'homme (ou encore dans les levures en division), ce sera Timothy Hunt qui la découvrira chez *Arbacia punctulata* et la nommera cycline (actuelle cycline B) pour rendre compte de son abondance variable au cours du cycle cellulaire (Evans *et al.*, 1983). Il recevra pour cela le prix Nobel en 2001 en compagnie de Paul Nurse qui identifia la sous-unité catalytique partenaire de cette

cycline, la kinase CDC2/CDK1 et démontra l'universalité de sa fonction dans la régulation du cycle cellulaire. Lee Hartwell, troisième lauréat, mit en évidence les points de contrôle, mécanismes sophistiqués chargés d'assurer la progression harmonieuse du cycle cellulaire.

### SCHÉMA GÉNÉRAL DE LA RÉGULATION DU CYCLE CELLULAIRE

Les résultats de ces trois derniers chercheurs ont jeté les bases, dans les années 1980, de la compréhension du cycle cellulaire au niveau moléculaire et montré la conservation de ses mécanismes de régulation au cours de l'évolution. A partir de l'analyse sur les différents modèles, la levure, la drosophile, l'étoile de mer, l'oursin, le xénope ou les cellules humaines, un schéma général de la progression du cycle a été dressé (Fig. 3). Depuis la découverte du premier complexe CDK1/cycline B, dont l'activation provoque la transition G2/M, il a été montré que les moteurs qui actionnent les transitions suivantes sont également des kinases de type CDK. Ces sérine/thréonine kinases phosphorylent un ensemble de substrats qui sont des facteurs clés du cycle cellulaire. L'activité des CDKs est elle-même strictement régulée au travers de multiples mécanismes : la synthèse de la sous-unité régulatrice cycline, la phosphorylation de la sous-unité catalytique mais aussi de la cycline, la fixation d'inhibiteurs (CKIs), la localisation du complexe et enfin la protéolyse, par la voie du protéasome, des cyclines et

des CKIs (Obaya & Sedivy, 2002). Les cyclines impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire ont été classées en fonction de la phase du cycle dans laquelle elles interviennent G1, S, ou M (Pines, 1999). Cyclin D/CDK4-CDK6 puis Cyclin E/CDK2 stimulent la progression de G1 vers S en provoquant la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome (pRB) et de ses analogues p107 et p130, levant ainsi l'inhibition sur les facteurs de transcription de type E2F. La phase G1, qui se caractérise par un niveau faible d'activité kinase CDK, permet la formation de complexes protéiques au niveau des origines de réplication où débutera la polymérisation du nouveau brin d'ADN en début de phase S. L'assemblage de ces pre-RC (*pre-replication complex*) requiert l'association successive à l'ADN des protéines ORC (*Origin Recognition Complex*), Cdc6, Cdt1 et enfin du complexe hélicase MCM2-7 (*Mini-Chromosome Maintenance*, pour revue voir Bell & Dutta, 2002 ; Spradling, 1999). L'activation de CDK2 et de la kinase dimérique Cdc7/Dbf4 à la transition G1/S marque le début de la réplication et empêche la formation de nouveaux preRC, permettant une réplication et une seule de l'ADN par cycle de division (pour revue voir Blow & Dutta, 2005 ; Woo & Poon, 2003). A son tour la fin de la réplication déclenche l'activation complète de cycline B/CDK1 qui conduira à la ségrégation des chromosomes. La sortie de mitose est ensuite marquée par la destruction de la cycline B polyubiquitinylée et la chute de l'activité CDK1. Par ailleurs la fonction cellulaire des complexes cycline/CDK dépasse la seule régulation du cycle cellulaire puisque ils

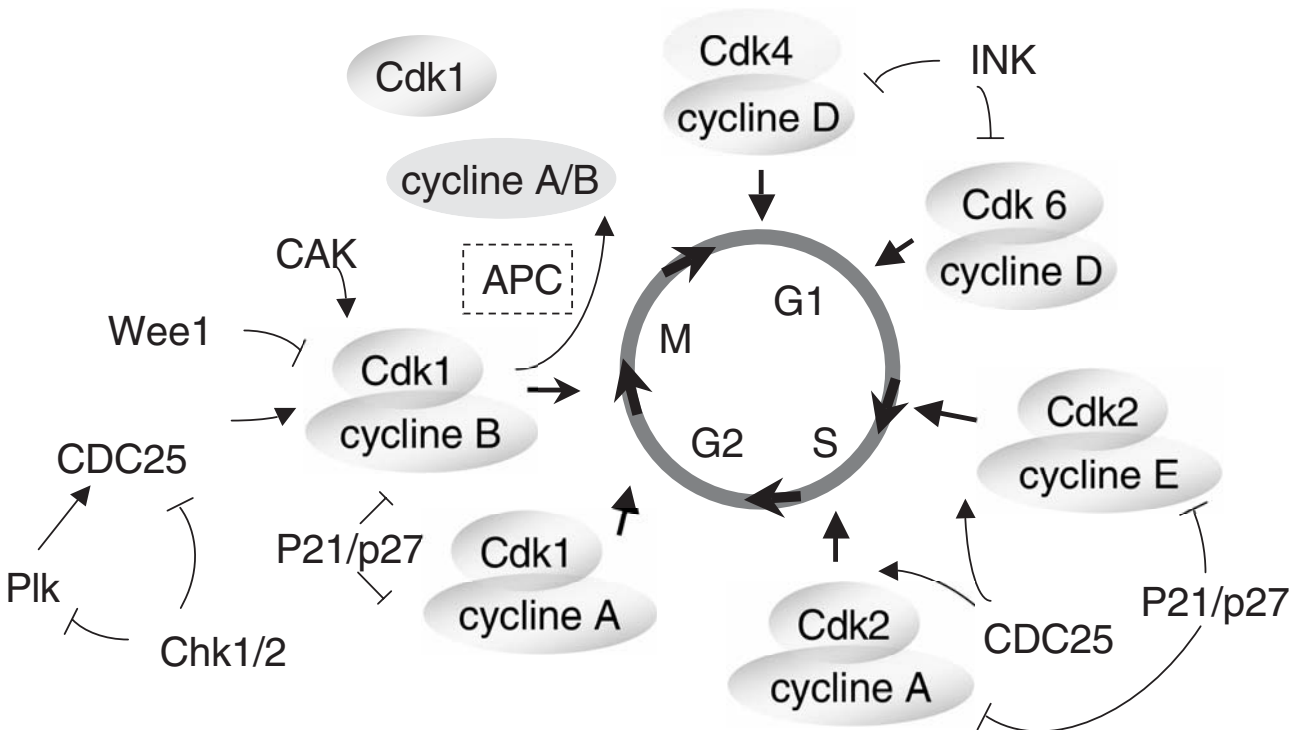


FIG. 3. – Modèle moléculaire du contrôle du cycle cellulaire.

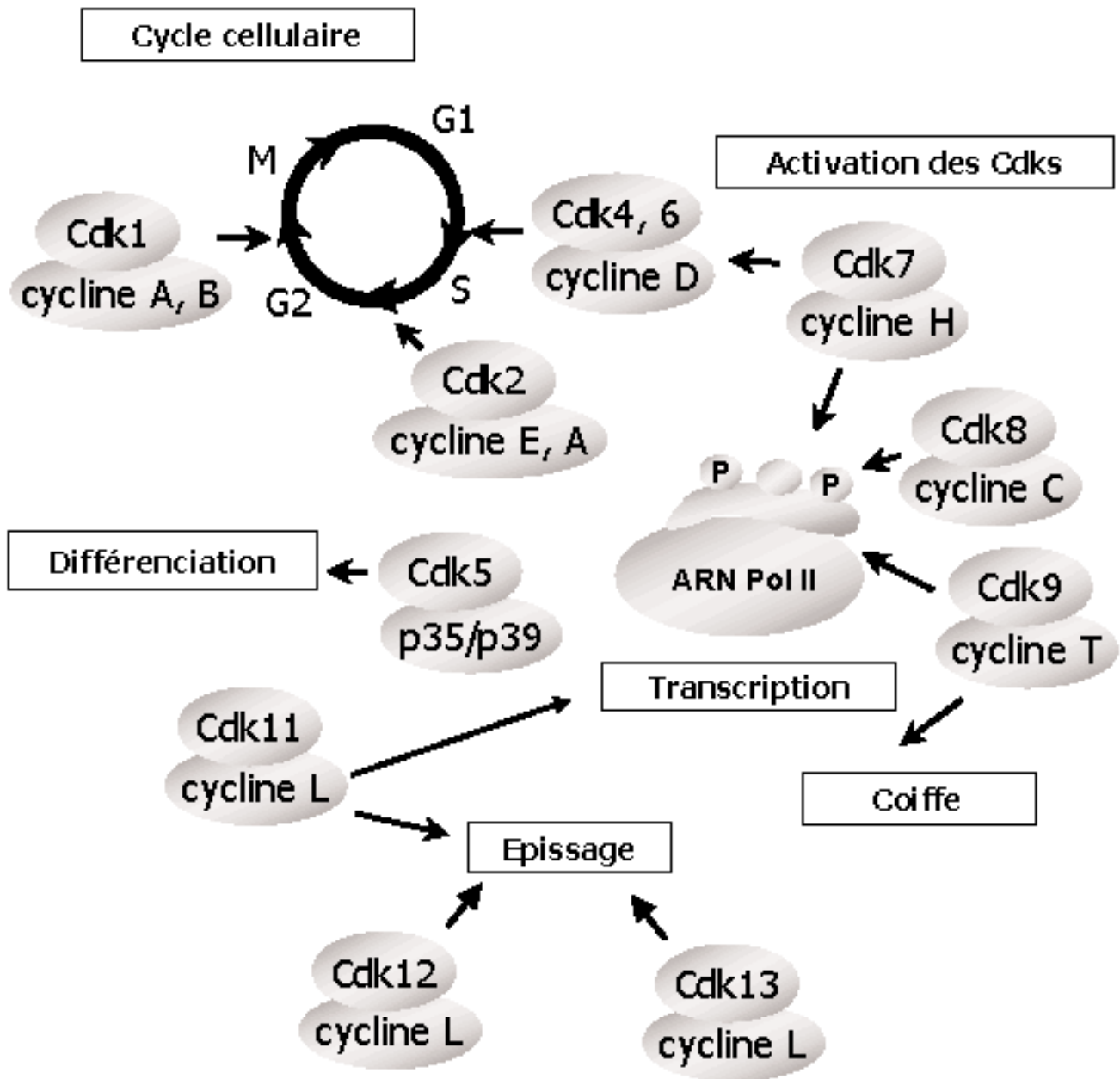


FIG. 4. – Implication des différents complexes cycline/CDK dans la régulation du cycle cellulaire et de l'expression des gènes.

contrôlent également l'expression des ARN messagers (Fig. 4) en agissant au niveau de leur transcription ou de leur maturation (pour revue voir Loyer *et al.*, 2005).

#### CARACTÉRISTIQUES DU PREMIER CYCLE EMBRYONNAIRE D'OURSIN

De ce canevas général, quels sont les mécanismes conservés ou au contraire les régulations spécifiques des cycles embryonnaires d'oursin ? L'œuf d'oursin présente

la particularité d'être stocké à l'état haploïde, c'est-à-dire après avoir terminé les deux cycles de méiose déclenchés par l'hormone de maturation. La fécondation provoque donc l'entrée directe en mitose au lieu de la complétion de la méiose comme dans la plupart des animaux, une spécificité que Fol et Hertwig avaient pressentie dans les années 1870 sans en connaître les fondements biologiques (*cf.* plus haut). Ces œufs peuvent être arrêtés pendant de très longues périodes dans cet état semblable à une phase G1 et le premier cycle embryonnaire déclenché par la fécondation commencera alors par la répliqua-

tion de l'ADN. Un intervalle, potentiellement équivalent à la phase G2 des cycles somatiques, sépare également la phase S de la phase M dans ce premier cycle mitotique, alors que les suivants seront une succession rapide de phases S et M. Les mécanismes qui maintiennent cet arrêt de l'œuf en G1 sont encore mal connus, mais cette caractéristique fait de l'oursin un organisme particulièrement intéressant pour analyser l'initiation de la phase S et découpler l'entrée dans les cycles mitotiques de l'achèvement de la méiose. Par ailleurs la fécondation, ainsi que les premiers cycles de division, ne requièrent aucune transcription, ce qui facilite l'analyse du contrôle post-transcriptionnel du cycle cellulaire.

### MÉCANISMES MOLÉCULAIRES LIÉS À LA FÉCONDATION CHEZ L'OURSIN

La pénétration de la tête spermatique dans l'œuf provoque des modifications intracellulaires substantielles, en particulier un accroissement de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) libre (Ridgway *et al.*, 1977; Steinhardt *et al.*, 1977), un changement de potentiel redox (Schomer Miller & Epel, 1999) et une augmentation du pH intracellulaire (Johnson & Epel, 1976; Shen *et al.*, 1999). Ce changement de pH a été impliqué dans la migration des pronuclei (Shatten *et al.*, 1985), l'initiation de la traduction (Epel *et al.*, 1974) et la synthèse d'ADN (Mazia & Ruby, 1974; Schomer Miller & Epel, 1999). L'élévation de la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  interne entraîne de son côté l'exocytose des granules corticaux qui modifie la surface de l'œuf et empêche la polyspermie en élevant l'enveloppe de fécondation. Mais ce signal est également un élément important dans la ré-initiation du cycle cellulaire. Il est généralement admis qu'une activité MAP kinase est nécessaire pour maintenir le blocage du cycle cellulaire imposé dans l'œuf et empêcher un développement parthénogénétique (Kishimoto, 1998; Murray, 1998; Sagata, 1996), ceci indépendamment de l'espèce. Cependant l'analyse du rôle spécifique de cette activité sur l'inhibition de la synthèse d'ADN ou de l'entrée en phase M est compliquée, dans la plupart des modèles embryonnaires, par l'association entre la fin de la méiose et l'entrée en mitose. Chez l'oursin, où ces événements sont indépendants, une MAP kinase (MAPK), de type ERK1 (pour *extracellular regulated kinase 1*), est active dans les œufs non-fécondés (*S. purpuratus*, *L. pictus*, *P. lividus*) et inactivée après fécondation (Carroll *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2006). La MAPK est maintenue active dans l'ovocyte mature par une activité MAPK-kinase (MEK) élevée (Carroll *et al.*, 2000; Kumano *et al.*, 2001). Lors de la fécondation, la stimulation d'une kinase de la famille SRC (SKF) provoque la phosphorylation sur tyrosine de la phospholipase C $\alpha$ , entraînant la production d'inositol 1,4,5-triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) et la libération consécutive de  $\text{Ca}^{2+}$  stocké dans le réticulum endoplasmique (pour revue voir Bradham *et al.*, 2006; Whitaker, 2006). La variation du taux de  $\text{Ca}^{2+}$  conduit à l'inhibition de MEK et l'activation d'une MAPK-phosphatase (Kumano *et al.*, 2001) qui simulta-

nément contribuent à l'inactivation de la MAPK. Bien que cette inactivation soit requise pour la rupture de l'enveloppe nucléaire, sa fonction dans le blocage de la synthèse d'ADN reste controversée. D'autre part les cibles affectées par l'activité MAPK élevée dans l'œuf non-fécondé et par la diminution de cette activité lors de la fécondation restent largement inconnues. Singulièrement, d'autres auteurs ont montré que les œufs non-fécondés (*P. lividus*, *L. pictus*) ne contiendraient pas d'activité MAP kinase et que celle-ci s'activerait après fécondation et serait nécessaire à l'entrée en mitose (Philipova & Whitaker, 1998). Le séquençage du génome d'oursin montre qu'il existe plusieurs MAPKs qui seraient toutes exprimées dans l'embryon précoce d'oursin (Bradham *et al.*, 2006). La caractérisation de ces kinases devrait permettre la levée de cette controverse et de manière plus générale une meilleure compréhension du rôle de la cascade des MAPK dans la réinitiation du cycle cellulaire après fécondation.

Après la fusion des gamètes, les noyaux du sperme et de l'œuf sont transformés en pronuclei mâle et femelle qui en fusionnant rétablissent la diploïdie. Cette fusion est accompagnée d'une décondensation du noyau spermatique et d'un remodelage important de la chromatine mâle. Les principaux événements qui accompagnent les modifications de la chromatine mâle ont fait l'objet d'une revue récente chez les vertébrés (Sutovsky & Schatten, 2000). Chez l'oursin ces événements diffèrent sensiblement (Imschenetzky *et al.*, 2003), en effet la chromatine mâle est compactée par des histones spermatiques (SpH) et non par des protéines basiques de type protamines; les SpH sont remplacées après fécondation par des histones maternelles spécifiques des étapes de clivage, une autre particularité de l'oursin (Poccia *et al.*, 1981). Il a été montré que deux kinases, la protéine kinase C et une CDK agiraient en synergie pour décondenser le noyau spermatique (Stephens *et al.*, 2002). Alors que la nucléoplasmine, ou des protéines semblables, ont été impliquées dans le déplacement des protéines basiques spermatiques dans d'autres espèces, aucun facteur équivalent n'a été identifié de chez l'oursin. Le remplacement des SpH s'accompagne de leur protéolyse par une cystéine protéase spécifique qui a été purifiée chez *Tetrapygus niger* (Imschenetzky *et al.*, 1997). Une cystéine protéase, vraisemblablement de type cathepsine, est d'autre part nécessaire à la progression du premier cycle mitotique (Concha *et al.*, 2005; Puchi *et al.*, 2006). Il est vraisemblable qu'il s'agisse de la même protéase.

Les protéolyses sont avec les phosphorylations les mécanismes post-traductionnels les plus utilisés dans la régulation du cycle cellulaire. Chez l'oursin le turnover de protéines dû aux dégradations par le protéasome s'active 15 à 20 minutes après la fécondation et son inhibition à ce stade provoque une sur-réplication (Kawahara *et al.*, 2000). Bien qu'on ignore encore le mécanisme sous-jacent, cette observation étend le rôle de la dégradation protéique comme régulateur du cycle au-delà des étapes de sortie de mitose où cette fonction est bien caractérisée.

## MÉCANISMES MOLÉCULAIRES LIÉS À LA PROGRESSION DU CYCLE CELLULAIRE CHEZ L'OURSIN

### Duplication de l'ADN et des centrosomes

Chez l'oursin, les événements moléculaires qui séparent l'initiation de la réplication de l'ADN des événements précoces que nous venons de décrire, restent en grande partie inconnus. Comme nous le mentionnions plus haut cette étape de transition G1/S est contrôlée dans les cycles somatiques par les complexes Cyc D/CDK4/6 et Cyc E/CDK2. Dans le génome de *S. purpuratus* les cyclines D et E préalablement identifiées (Moore *et al.*, 2002 ; Sumerel *et al.*, 2001) sont les seuls représentants de ces sous-familles. De même on ne retrouve qu'un seul membre de la famille CDK4/6, la kinase CDK4 précédemment décrite (Moore *et al.*, 2002). Alors que les ARNm de CDK4 sont constitutivement exprimés au cours du développement, ceux de la cycline D sont très peu abondants pendant les cycles de clivage puis fortement induits au stade blastula (Moore *et al.*, 2002). Des données récentes obtenues chez l'oursin mais aussi chez le nématode, la drosophile ou la souris suggèrent que les complexes cycline D/CDK4 ne seraient pas essentiels au développement précoce mais interviendraient plutôt dans la régulation de la croissance cellulaire et/ou dans la morphogenèse (Datar *et al.*, 2000 ; Malumbres *et al.*, 2004 ; Meyer *et al.*, 2000 ; Moore *et al.*, 2002 ; Sodergren *et al.*, 2006). Par contre cycline E et CDK2 sont déjà présents dans les œufs non-fécondés, le complexe y est actif mais son activité varie peu au cours des premiers cycles mitotiques. Les variations d'activité cycline E/CDK2 ne seraient donc pas essentielles durant ces cycles embryonnaires (Schnackenberg & Marzluff, 2002). De plus, alors que la cycline E/CDK2 est requise pour l'initiation de la réplication dans les cellules somatiques et les extraits acellulaires de xénope, son activité n'est pas nécessaire à l'initiation du premier cycle mitotique chez l'oursin (Genevière-Garrigues *et al.*, 1995). Cycline E/CDK2 participerait par contre à l'inhibition de la ré-réplication (Genevière-Garrigues *et al.*, 1995). La formation des preRC et l'initiation de la réplication sont des étapes encore peu étudiées chez l'oursin. L'analyse du génome de *S. purpuratus* montre que tous les gènes codant pour des composants des preRC chez les vertébrés comme chez la levure sont présents et seraient exprimés aux premières étapes du développement. Il en est de même des gènes des polymerases qui assurent la réplication ainsi que de ceux des principaux facteurs qui régulent la progression en G1 et la transition G1/S (Fernandez-Guerra *et al.*, 2006). Ceci suggère une conservation des mécanismes fondamentaux de l'initiation de la réplication dans cette espèce. Toutefois l'arrêt spécifique des œufs en G1, suivi d'une initiation de la réplication indépendante des synthèses protéiques après fécondation fait de ces œufs un modèle de choix pour préciser le rôle des modifications post-traductionnelles dans la formation des pre-RC et le déclenchement de

l'élongation du nouveau brin d'ADN. Par ailleurs, l'œuf d'oursin se prêtant à l'analyse *in vivo*, il devient maintenant possible de confirmer, dans un organisme proche des vertébrés, la signification biologique de mécanismes qui ont été proposés pour le contrôle de cette étape, à partir de modèles *in vitro*, cellules en culture ou extraits de xénope.

Parallèlement à la réplication de l'ADN, une autre duplication doit impérativement avoir lieu, celle du centrosome. C'est en effet autour des deux centrosomes issus de cette duplication que s'organiseront les pôles du fuseau mitotique (Mazia, 1987). Chez les zygotes, le centrosome est composé d'une paire de centrioles, initialement apportée par le sperme, associé à du matériel péricentriolaire d'origine maternelle (pour revue voir Hinchcliffe & Sluder, 2001). La possibilité de manipuler la capacité du zygote d'oursin à dupliquer le centrosome issu de la tête spermatique a beaucoup contribué à la compréhension des mécanismes qui lient les cycles de duplication et de disjonction des centrosomes à la progression du cycle cellulaire. Par exemple la formation de pôles de fuseau additionnels après la fécondation polyspermiq ue des œufs d'oursin, déjà observée par Wilson en 1896, a permis de montrer que le nombre de paires de centrioles détermine le nombre de pôles de fuseau. De même la possibilité d'augmenter artificiellement la longueur de la phase M chez l'oursin (Mazia *et al.*, 1960) a contribué à démontrer que les phases G1 et S autorisent la duplication des centrosomes alors que la phase M permet seulement leur séparation. Toutefois la nature moléculaire du lien entre le cycle de reproduction du centrosome et le cycle cellulaire reste encore inconnue. Le rôle précis de cycline E/CDK2, initialement proposé comme le facteur permettant la duplication des centrosomes (Hinchcliffe *et al.*, 1999 ; Matsumoto *et al.*, 1999), fait encore l'objet de débats (pour revue voir Arlot-Bonne-mains & Prigent, 2002 ; Tsou & Stearns, 2006). Quant à la séparation des centrosomes, elle serait sous contrôle de la protéine kinase Nek2 (pour *NIMA-related kinase 2*, Fry, 2002). Cette famille de kinase, homologue de NIMA chez *Aspergillus nidulans*, n'est que peu caractérisée, bien que plusieurs membres aient été associés au contrôle de la transition G2/M (Quarmby & Mahjoub, 2005). Le génome de *S. purpuratus* en contient neuf exemplaires dont un serait spécifique des échinodermes (Fernandez-Guerra *et al.*, 2006).

Durant les premiers cycles de division de l'œuf d'oursin, les événements nucléaires et cytoplasmiques ne sont pas aussi étroitement liés qu'ils le sont durant les cycles somatiques (Genevière-Garrigues *et al.*, 1995 ; Sluder & Lewis, 1987 ; Sluder *et al.*, 1986). Ainsi la formation de l'appareil mitotique n'est pas affectée par l'absence de noyau ou de réplication de l'ADN. Pourtant l'analyse du génome et du transcriptome de *S. purpuratus* montre que les supports moléculaires des points de contrôle (*checkpoints*) sont déjà présents dans l'œuf fécondés (Fernandez-Guerra *et al.*, 2006). Il est donc intéressant de comprendre pour quelle raison ils sont inopérants ou fonctionnent de manière distincte à cette étape.

## Entrée et sortie de mitose

Dans le premier cycle de division, la synthèse des cyclines mitotiques, cyclines A et B, est stimulée par la fécondation. Mais alors que le taux de cycline A augmente de manière régulière jusqu'à la transition G2/M, celui de cycline B forme un plateau pendant la phase S avant de croître à nouveau en fin de réplication (Genevière-Garrigues *et al.*, 1995). Dans ce modèle le rôle de la cycline A en phase S n'est pas démontré, par contre cette cycline participe, comme chez le xénope (Devault *et al.*, 1992), à l'activation du complexe cycline B/CDK1 (Genevière & Picard, résultats non publiés). Par ailleurs la cycline A est capable de compenser l'absence de cycline B dans l'embryon précoce (Robertson *et al.*, 2006), suggérant une fonction redondante de ces deux cyclines dans la transition G2/M. Curieusement, le génome de *S. purpuratus* comporte, en plus d'une cycline B et d'une cycline B3, une nouvelle cycline présentant des analogies avec les cyclines de type B mais aussi avec certaines cyclines de plantes et avec une cycline de *Ciona intestinalis* jusqu'ici classée parmi les cyclines A (Kawashima *et al.*, 2003) et qui serait exprimée pendant l'embryogenèse précoce (Fernandez-Guerra *et al.*, 2006).

Les protéolyses dépendantes de l'ubiquitine qui provoquent la sortie de phase M dans les autres modèles ont été peu étudiées chez l'oursin. Toutefois les gènes codant pour le protéasome, les sous-unités ubiquitine-ligase ou les protéines cibles sont présents dans le génome de *S. purpuratus* et exprimés pendant l'embryogenèse précoce (Fernandez-Guerra *et al.*, 2006), suggérant la mise en jeu de mécanismes similaires à ceux identifiés dans les autres espèces. Cependant pendant l'embryogenèse, chez l'oursin comme dans d'autres organismes dont les amphibiens, la réplication du deuxième cycle commence dans des vésicules chromosomiques qui se forment à la fin de l'anaphase ou au début de télophase du premier cycle (Hinegardner *et al.*, 1964; Ito *et al.*, 1981; Lemaitre *et al.*, 1998; Montag *et al.*, 1988). Une membrane nucléaire se forme autour de chaque chromosome qui fonctionne alors comme une entité indépendante appelée karyomère où la synthèse d'ADN est initiée alors que la cytotidérèse n'a pas encore débutée, accélérant ainsi les cycles de division cellulaire embryonnaires. Chez le xénope la formation des karyomères ne dépend pas de la réplication de l'ADN mais nécessite la formation du fuseau mitotique et la ségrégation normale des chromosomes (Lemaitre *et al.*, 1998). Là encore, une question se pose : comment ce chevauchement de plusieurs événements normalement disjoints est-il autorisé dans les cycles embryonnaires ?

L'initiation de la cytotidérèse est également dépendante de la présence de l'appareil mitotique. Dans l'œuf d'oursin, un des modèles les plus étudiés dans ce domaine, il a été montré que le contact des microtubules astraux avec le cortex de l'œuf détermine la formation du sillon de division et que ce contact doit avoir lieu après le début de l'anaphase (Rappaport, 1996; Shuster & Burges, 2002; Strickland *et al.*, 2005).

## CONCLUSIONS

Alors que l'œuf d'oursin a largement contribué, comme nous venons de le voir, à la connaissance des mécanismes qui assurent la progression de certaines étapes clés du cycle cellulaire, le schéma que l'on peut dresser reste encore incomplet comparativement au xénope ou à la drosophile par exemple. Cependant, le séquençage du génome de *S. purpuratus* nous montre qu'un répertoire complet des gènes du cycle cellulaire est présent chez l'oursin. La comparaison de ce répertoire avec celui des vertébrés, de *C. elegans*, de la drosophile ou encore d'un tunicier *Ciona intestinalis* donne une vision nouvelle de l'évolution de ces gènes. Alors que l'on retrouve de nombreux exemples d'expansion génique chez les vertébrés (avec plusieurs gènes des cyclines A, B, D, E, ou des kinases mitotiques aurora, polo et NEK), d'autres gènes en sont absents (par exemple la nouvelle cycline B identifiée chez *S. purpuratus* et *C. intestinalis*, absente chez le poisson zèbre, la souris ou l'homme). Par ailleurs certains gènes que l'on croyait jusque là spécifiques des vertébrés, comme MCM9 (Maiorano *et al.*, 2006), existent également chez l'oursin. A l'inverse le peu de gènes codant pour des inhibiteurs de CDK identifié chez *S. purpuratus* est étonnant compte tenu du rôle important qu'ils jouent chez les vertébrés. Un seul paralogue des inhibiteurs p21/p27 a en effet été identifié, par ailleurs la famille des INK4 est totalement absente et serait donc spécifique des vertébrés ou peut-être même des mammifères. La situation est donc similaire à celle rencontrée chez la drosophile et représenterait ainsi le répertoire initial présent chez les bilatériens, avec une expansion ou diversification apparue dans la lignée des chordés.

La plupart des gènes contrôlant le cycle cellulaire est exprimés aux stades précoces du développement (90 %), mais plus généralement on estime que 45 % de la totalité des gènes seraient déjà exprimés à ces étapes (Howard-Ashby *et al.*, 2006) où pourtant l'organisme semble peu complexe comparé à l'oursin adulte.

Le génome de l'oursin a également réservé des surprises dans des domaines qui ne sont pas directement liés à l'embryogenèse précoce ou au développement. Ainsi le répertoire des gènes du système nerveux y est très complexe pour un organisme où ce système semble peu développé; par ailleurs de nombreux gènes codant chez l'homme pour des protéines sensorielles liées à la vision ou l'audition sont présents, ce qui pourrait amener à une nouvelle conception des mécanismes de perception; enfin l'extraordinaire expansion du répertoire immunitaire pose la question de la relation entre ce système immunitaire inné et l'immunité adaptative des vertébrés (Hibino *et al.*, 2006).

L'ensemble des outils fournis par le séquençage du génome ouvre donc des perspectives jusque là insoupçonnées dans des domaines de recherche très divers et font à nouveau de ce modèle marin, à l'heure des « omes » (transcriptome, protéome et autre régulome...), « un objet dans lequel tant de circonstances favorables coïncident ».



## BIBLIOGRAPHIE

- Arlot-Bonnemains Y. & Prigent C., Cell cycle. A trigger for centrosome duplication. *Science*, 2002, 295, 455-456.
- Barthélémy-Saint-Hilaire J., «Histoire des Animaux d'Aristote». Traduction Française, Paris, 1883, ré-édité par Clermont-Ferrand : Paleo, 1999-2001.
- Beetschen J. C. & Fischer J. L., Yves Delage (1854-1920) as a forerunner of modern nuclear transfer experiments. *Int. J. Dev. Biol.*, 2004, 48, 607-612.
- Bell S. P. & Dutta A., DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.*, 2002, 71, 333-374.
- Blow J. J. & Dutta A., Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 2005, 6, 476-486.
- Boveri T., Zellenstudien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von *Ascaris megaloccephala*. 22. *Jena Zeit. Naturw.*, 1888, 22, 685-882.
- Boveri T., Befruchtung. *Erg. d. Anat. u. Entw. Gesch.*, 1892, 1, 386-485.
- Boveri T., Über mehrpolige Mitosen als Mittel zur Analyse des Zellkerns. *Verh. d. phys.-med. Ges. Würzburg N. F.*, 1902, 35, 67-90.
- Brachet J., Decroly M., Ficq A. & Quartier J., Ribonucleic acid metabolism in infertilized and fertilized sea-urchin eggs. *Biochim Biophys Acta*, 1963, 72, 660-662.
- Bradham C. A., Foltz K. R., Beane W. S., Arnone M. I., Rizzo F., Coffman J. A., Mushegian A., Goel M., Morales J., Genevière A. M., Lapraz F., Robertson A. J., Kelkar H., Loza-Coll M., Townley I. K., Raisch M., Roux M. M., Lepage T., Gache C., McClay D. R. & Manning G., The sea urchin kinome: a first look. *Dev. Biol.*, 2006, 300, 180-193.
- Camus P., «Histoire des Animaux d'Aristote, traduction Française». Chez la Veuve Desaint, Librairie rue du Foin S. Jacques, Paris, 1753, Fond de la bibliothèque de L'Observatoire Océanologique de Banyuls.
- Carroll D. J., Albay D. T., Hoang K. M., O'Neill F. J., Kumano M., & Foltz K. R., The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Dev. Biol.*, 2000, 217, 179-191.
- Concha C., Monardes A., Even Y., Morin V., Puchi M., Imschenetzky M. & Genevière A. M., Inhibition of cysteine protease activity disturbs DNA replication and prevents mitosis in the early mitotic cell cycles of sea urchin embryos. *J. Cell. Physiol.*, 2005, 204, 693-703.
- Consortium T. S. U. G. S., The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 2006, sous presse.
- Datar S. A., Jacobs H. W., de la Cruz A. F., Lehner C. F. & Edgar B. A., The Drosophila cyclin D-Cdk4 complex promotes cellular growth. *EMBO J.*, 2000, 19, 4543-4554.
- Davidson E. H. & Erwin D. H., Gene regulatory networks and the evolution of animal body plans. *Science*, 2006, 311, 796-800.
- Delage Y., «La structure du protoplasma, les théories de l'Hérédité et les grands problèmes de la Biologie Générale». Paris, 1895.
- Delage Y., «L'Hérédité et les grands problèmes de la Biologie Générale». Reinwald and Schleicher. Paris, 1903.
- Denny P. C. & Tyler A., Activation of protein biosynthesis in non-nucleate fragments of sea urchin eggs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 14, 245-249.
- Devault A., Fesquet D., Cavadore J. C., Garrigues A. M., Labbe J. C., Lorca T., Picard A., Philippe M. & Doree M., Cyclin A potentiates maturation-promoting factor activation in the early *Xenopus* embryo via inhibition of the tyrosine kinase that phosphorylates cdc2. *J. Cell. Biol.*, 1992, 118, 1109-1120.
- Driesch H., Entwicklungsmechanische studien. I. Der Werth der beiden ersten Furchungszellen in der Echinodermenentwicklung. Experimentelle Erzeugung von Tell und Doppelbildungen. *Z. Wiss. Zool.*, 1891, 53, 160-178 and 183-184.
- Epel D., Steinhart R., Humphreys T. & Mazia D., An analysis of the partial metabolic derepression of sea urchin eggs by ammonia: the existence of independent pathways. *Dev. Biol.*, 1974, 40, 245-255.
- Ernst S. G., A century of sea urchin development. *Amer. Zool.*, 1997, 37, 250-259.
- 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.
- Fernandez-Guerra A., Aze A., Morales J., Mulner-Lorillon O., Cosson B., Cormier P., Bradham C., Adams N., Robertson A., Marzluff W. F., Coffman J. & Genevière A. M., The genomic repertoire for cell cycle control and DNA metabolism in *S. purpuratus*. *Dev. Biol.*, 2006, 300, 238-251.
- Fol H., Sur le commencement de l'hénogénie chez divers animaux. *Arch. de Zool. Exp. et Gén.*, 1877, 6, 145-169.
- Fry A. M., The Nek2 protein kinase: a novel regulator of centrosome structure. *Oncogene* 2002, 21, 6184-694.
- Genevière-Garrigues A. M., Barakat A., Doree M., Moreau J. L. & Picard A., Active cyclin B-cdc2 kinase does not inhibit DNA replication and cannot drive prematurely fertilized sea urchin eggs into mitosis. *J. Cell. Sci.*, 1995, 108 (Pt 7), 2693-2703.
- Gross P. R. & Cousineau G. H., Macromolecule Synthesis and the Influence of Actinomycin on Early Development. *Exp. Cell. Res.*, 1964, 33, 368-395.
- Hertwig O., Beitrige zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. *Morphol. Jb.*, 1876, 1, 347-432.
- Hibino T., Loza-Coll M., Messier C., Majeske A. J., Cohen A. H., Terwilliger D. P., Buckley K. M., Brockton V., Nair S. V., Berney K., Fugmann S. D., Anderson M. K., Pancer Z., Cameron A., Smith L. C. & Rast J. P., The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome. *Dev. Biol.*, 2006, 300, 349-365.
- Hinchcliffe E. H., Li C., Thompson E. A., Maller J. L. & Sluder G., Requirement of Cdk2-cyclin E activity for repeated centrosome reproduction in *Xenopus* egg extracts. *Science*, 1999, 283, 851-854.
- Hinchcliffe E. H. & Sluder G., "It takes two to tango": understanding how centrosome duplication is regulated throughout the cell cycle. *Genes Dev.*, 2001, 15, 1167-1181.
- Hinegardner R. T., Rao B. & Feldman D. E., The DNA synthetic period during early development of the sea urchin egg. *Exp. Cell. Res.*, 1964, 36, 53-61.
- Howard-Ashby M., Brown C. T., Materna S. C., Chen L. & Davidson E. H., High regulatory gene use in sea urchin embryogenesis: implications for bilaterian development and evolution. *Dev. Biol.*, 2006, 300, 27-34.
- Imschenetzky M., Diaz F., Montecino M., Sierra F. & Puchi M., Identification of a cysteine protease responsible for degradation of sperm histones during male pronucleus remodeling in sea urchins. *J. Cell. Biochem.*, 1997, 67, 304-315.
- Imschenetzky M., Puchi M., Morin V., Medina R. & Montecino M., Chromatin remodeling during sea urchin early development: molecular determinants for pronuclei formation and transcriptional activation. *Gene*, 2003, 322, 33-46.
- Ito S., Dan K. & Goodenough D., Ultrastructure and 3H-thymidine incorporation by chromosome vesicles in sea urchin embryos. *Chromosoma*, 1981, 83, 441-453.
- Johnson J. D. & Epel D., Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilisation. *Nature*, 1976, 262, 661-664.
- Kawahara H., Philipova R., Yokosawa H., Patel R., Tanaka K. & Whitaker M., Inhibiting proteasome activity causes over-replication of DNA and blocks entry into mitosis in sea urchin embryos. *J. Cell. Sci.*, 2000, 113 ( Pt 15), 2659-2670.
- Kawashima T., Tokuoka M., Awazu S., Satoh N. & Satou Y., A genomewide survey of developmentally relevant genes in *Ciona intestinalis*. VIII. Genes for PI3K signaling and cell cycle. *Dev. Genes Evol.*, 2003, 213, 284-290.

- Kishimoto T., Cell cycle arrest and release in starfish oocytes and eggs. *Semin. Cell. Dev. Biol.*, 1998, 9, 549-257.
- Kumano M., Carroll D. J., Denu J. M. & Foltz K. R., Calcium-mediated inactivation of the MAP kinase pathway in sea urchin eggs at fertilization. *Dev. Biol.*, 2001, 236, 244-257.
- Lemaitre J. M., Geraud G. & Mechali M., Dynamics of the genome during early *Xenopus laevis* development: karyomeres as independent units of replication. *J. Cell. Biol.*, 1998, 142, 1159-1166.
- Levine M. & Davidson E. H., Gene regulatory networks for development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102, 4936-4942.
- Loyer P., Trembley J. H., Katona R., Kidd V. J. & Lahti J. M., Role of CDK/cyclin complexes in transcription and RNA splicing. *Cell Signal*, 2005, 17, 1033-1051.
- Maiorano D., Lutzmann M. & Mechali M., MCM proteins and DNA replication. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2006, 18, 130-136.
- Malumbres M., Sotillo R., Santamaria D., Galan J., Cerezo A., Ortega S., Dubus P. & Barbacid M., Mammalian cells cycle without the D-type cyclin-dependent kinases Cdk4 and Cdk6. *Cell*, 2004, 118, 493-504.
- Matsumoto Y., Hayashi K. & Nishida E., Cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) is required for centrosome duplication in mammalian cells. *Curr. Biol.*, 1999, 9, 429-432.
- Mazia D., The chromosome cycle and the centrosome cycle in the mitotic cycle. *Int. Rev. Cytol.*, 1987, 100, 49-92.
- Mazia D., Harris P. & Bibring T., The multiplicity of the mitotic centers and the time-course of their duplication and separation. *Biophys. Biochem. Cytol.*, 1960, 7, 1-20.
- Mazia D. & Ruby A., DNA synthesis turned on in unfertilized sea urchin eggs by treatment with NH<sub>4</sub>OH. *Exp. Cell. Res.*, 1974, 85, 167-172.
- Meyer C. A., Jacobs H. W., Datar S. A., Du W., Edgar B. A. & Lehner C. F., Drosophila Cdk4 is required for normal growth and is dispensable for cell cycle progression. *EMBO J.*, 2000, 19, 4533-4542.
- Montag M., Spring H. & Trendelenburg M. F., Structural analysis of the mitotic cycle in pre-gastrula *Xenopus* embryos. *Chromosoma*, 1988, 96, 187-196.
- Moore J. C., Sumerel J. L., Schnackenberg B. J., Nichols J. A., Wikramanayake A., Wessel G. M. & Marzluff W. F., Cyclin D and cdk4 are required for normal development beyond the blastula stage in sea urchin embryos. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, 22, 4863-4875.
- Murray A. W., MAP kinases in meiosis. *Cell*, 1998, 92, 157-159.
- Obaya A. J. & Sedivy J. M., Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2002, 59, 126-142.
- Philipova R. & Whitaker M., MAP kinase activity increases during mitosis in early sea urchin embryos. *J. Cell. Sci.*, 1998, 111 (Pt 17), 2497-2505.
- Pines J., Four-dimensional control of the cell cycle. *Nat. Cell. Biol.*, 1999, 1, E73-E79.
- Poccia D., Salik J. & Krystal G., Transitions in histone variants of the male pronucleus following fertilization and evidence for a maternal store of cleavage-stage histones in the sea urchin egg. *Dev. Biol.*, 1981, 82, 287-296.
- Puchi M., Quinones K., Concha C., Iribarren C., Bustos P., Morin V., Genevière A. M. & Imschenetzky M., Microinjection of an antibody against the cysteine-protease involved in male chromatin remodeling blocks the development of sea urchin embryos at the initial cell cycle. *J. Cell. Biochem.*, 2006, 98, 335-342.
- Quarby L. M. & Mahjoub M. R., Caught Nek-ing: cilia and centrioles. *J. Cell. Sci.*, 2005, 118, 5161-5169.
- Rappaport R., "Cytokinesis in Animal Cells". Cambridge University Press, Cambridge, 1996.
- Ridgway E. B., Gilkey J. C. & Jaffe L. F., Free calcium increases explosively in activating medaka eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1977, 74, 623-627.
- Robertson A. J., Croce J., Carbonneau S., Voronina E., Miranda E., McClay D. R. & Coffman J. A., The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. *Dev. Biol.*, 2006, 300, 321-334.
- Sagata N., Meiotic metaphase arrest in animal oocytes: its mechanisms and biological significance. *Trends Cell. Biol.*, 1996, 6, 22-28.
- Schatten G., Bestor T., Balczon R., Henson J. & Schatten H., intracellular pH shift leads to microtubule assembly and microtubule-mediated motility during sea urchin fertilization: correlations between elevated intracellular pH and microtubule activity and depressed intracellular pH and microtubule disassembly. *Eur. J. Cell Biol.*, 1985, 36, 116-127.
- Schnackenberg B. J. & Marzluff W. F., Novel localization and possible functions of cyclin E in early sea urchin development. *J. Cell. Sci.*, 2002, 115, 113-121.
- Schomer Miller B. & Epel D., The roles of changes in NADPH and pH during fertilization and artificial activation of the sea urchin egg. *Dev. Biol.*, 1999, 216, 394-405.
- Shen S. S., Kinsey W. H. & Lee S. J., Protein tyrosine kinase-dependent release of intracellular calcium in the sea urchin egg. *Dev. Growth Differ.*, 1999, 41, 345-355.
- Shuster C. B. & Burgess D. R., Transitions regulating the timing of cytokinesis in embryonic cells. *Curr. Biol.*, 2002, 12, 854-858.
- Sluder G. & Lewis K., Relationship between nuclear DNA synthesis and centrosome reproduction in sea urchin eggs. *J. Exp. Zool.*, 1987, 244, 89-100.
- Sluder G., Miller F. J. & Rieder C. L., The reproduction of centrosomes: nuclear versus cytoplasmic controls. *J. Cell. Biol.*, 1986, 103, 1873-1881.
- Sodergren E., Weinstock G. M., Davidson E. H., Cameron R. A., Gibbs R. A., Angerer R. C., Angerer L. M., Arnone M. I., Burgess D. R., Burke R. D. *et al.*, The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 2006, 314, 941-952.
- Spemann H., "Experimentelle Beiträge zu einer Theorie der Entwicklung". Berlin, 1936.
- Spradling A. C., ORC binding, gene amplification, and the nature of metazoan replication origins. *Genes Dev.*, 1999, 13, 2619-2623.
- Steinhardt R., Zucker R. & Schatten G., Intracellular calcium release at fertilization in the sea urchin egg. *Dev. Biol.*, 1977, 58, 185-196.
- Stephens S., Beyer B., Balthazar-Stablein U., Duncan R., Kostacos M., Lukoma M., Green G. R. & Poccia D., Two kinase activities are sufficient for sea urchin sperm chromatin decondensation *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.*, 2002, 62, 496-503.
- Strickland L. I., Donnelly E. J. & Burgess D. R., Induction of cytokinesis is independent of precisely regulated microtubule dynamics. *Mol. Biol. Cell*, 2005, 16, 4485-4494.
- Sumerel J. L., Moore J. C., Schnackenberg B. J., Nichols J. A., Canman J. C., Wessel G. M. & Marzluff W. F., Cyclin E and its associated cdk activity do not cycle during early embryogenesis of the sea urchin. *Dev. Biol.*, 2001, 234, 425-440.
- Sutovsky P. & Schatten G., Paternal contributions to the mammalian zygote: fertilization after sperm-egg fusion. *Int. Rev. Cytol.*, 2000, 195, 1-65.
- Tsou M. F. & Stearns T., Controlling centrosome number: licenses and blocks. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 2006, 18, 74-78.
- Whitaker M., Calcium at fertilization and in early development. *Physiol. Rev.*, 2006, 86, 25-88.
- Wilson E. B., "The cell in development and inheritance". New York, 1896.
- Woo R. A. & Poon R. Y., Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. *Cell Cycle*, 2003, 2, 316-324.
- Zhang W. L., Huitorel P., Genevière A. M., Chiri S. & Ciapa B., Inactivation of MAPK in mature oocytes triggers progression into mitosis *via* a Ca<sup>2+</sup>-dependent pathway but without completion of S phase. *J. Cell. Sci.*, 2006, 119, 3491-3501.