

# L'embryon d'oursin, le point de surveillance de l'ADN endommagé de la division cellulaire et les mécanismes à l'origine de la cancérisation

par Robert Bellé, Ronan Le Bouffant, Julia Morales, Bertrand Cosson, Patrick Cormier & Odile Mulner-Lorillon

Centre National de la Recherche Scientifique, UMR 7150 Mer & Santé; Université Pierre et Marie Curie-Paris 6, UMR 7150; Équipe Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique, Roscoff, F-29682 France.  
Correspondance : Professeur Robert Bellé Station Biologique, place George Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Tél. : +33 (0)2 98 29 23 46. Fax : +33 (0)2 98 29 23 06. E-mail: belle@sb-roscoff.fr

Reçu le 22 juin 2007

## RÉSUMÉ

La division cellulaire est essentielle pour l'hérédité, le maintien et l'évolution du monde vivant. Lors d'une lésion de l'ADN au cours de la division cellulaire, les « points de surveillance (= checkpoints) de l'ADN endommagé » exécutent les fonctions d'arrêt du cycle, de la réparation de l'ADN et de l'orientation vers la mort cellulaire par apoptose lorsqu'une réparation est impossible. À propos de l'origine des cancers, deux concepts majeurs se renforcent de jour en jour : les cancers s'initient par un dysfonctionnement des points de surveillance de l'ADN endommagé et les cancers naissent de la transformation de cellules souches « normales » en cellules souches « cancéreuses ». Ce dernier concept modifie la définition même des cancers puisqu'il est démontré qu'une cellule souche « cancéreuse » suffit pour générer la tumeur, bien avant les signes cliniques de la maladie.

Le développement précoce de l'oursin représente un excellent modèle expérimental pour appréhender l'analyse du fonctionnement des points de surveillance du cycle de division, car il présente l'ensemble des

éléments de régulation, comme le montrent l'analyse du génome complet et l'existence d'un point de surveillance de l'ADN endommagé tout à fait opérationnel. Le modèle biologique du développement précoce de l'oursin, dont l'œuf constitue une cellule souche par excellence, permet d'aborder l'étude de l'origine de la cancérisation. Dans le domaine de la toxicologie et de l'implication de nouvelles molécules en matière de santé, le modèle peut être utilisé pour prédire le risque de cancer dû à des molécules ou des combinaisons de molécules, bien avant le moindre signe clinique de la maladie. C'est ainsi que le risque cancérogène d'un herbicide d'usage intensif dans le monde, le Roundup\*, dont le glyphosate est l'élément actif, a pu être démontré. Le modèle expérimental de l'embryon d'oursin permet ainsi de progresser considérablement dans la prévention des cancers par la connaissance des produits à risques et d'envisager de nouvelles formes de diagnostic précoce de la maladie par la mise en évidence de marqueurs moléculaires. Prévention et diagnostic précoce sont deux des éléments décisifs de la lutte contre le cancer.

---

**SUMMARY** Sea urchin embryo, DNA-damaged cell cycle checkpoint and the mechanisms initiating cancer development

Cell division is an essential process for heredity, maintenance and evolution of the whole living kingdom. Sea urchin early development represents an excellent experimental model for the analysis of cell cycle checkpoint mechanisms since embryonic cells contain a functional DNA-damage checkpoint and since the whole sea urchin genome is sequenced. The DNA-damaged checkpoint is responsible for an arrest in the cell cycle when DNA is damaged or incorrectly replicated, for activation of the DNA repair mechanism, and for commitment to cell death by apoptosis

in the case of failure to repair. New insights in cancer biology lead to two fundamental concepts about the very first origin of cancerogenesis. Cancers result from dysfunction of DNA-damaged checkpoints and cancers appear as a result of normal stem cell (NCS) transformation into a cancer stem cell (CSC). The second aspect suggests a new definition of "cancer", since CSC can be detected well before any clinical evidence. Since early development starts from the zygote, which is a primary stem cell, sea urchin early development allows analysis of the early steps of the

---

\* Roundup est une marque déposée par Monsanto Company, Saint-Louis, USA.

cancerization process. Although sea urchins do not develop cancers, the model is alternative and complementary to stem cells which are not easy to isolate, do not divide in a short time and do not divide synchronously. In the field of toxicology and incidence on human health, the sea urchin experimental model allows assessment of cancer risk from single or combined molecules long before any epidemiologic evidence is available. Sea urchin embryos were used to

test the worldwide used pesticide Roundup that contains glyphosate as the active herbicide agent; it was shown to activate the DNA-damage checkpoint of the first cell cycle of development. The model therefore allows considerable increase in risk evaluation of new products in the field of cancer and offers a tool for the discovery of molecular markers for early diagnostic in cancer biology. Prevention and early diagnosis are two decisive elements of human cancer therapy.

## INTRODUCTION

Parmi les modèles marins, l'embryon d'oursin est un modèle de choix pour l'étude du cycle cellulaire, de sa régulation et de son dysfonctionnement. L'objet de cette revue est d'exposer les concepts récents en matière de points de surveillance (*checkpoints*) de la division cellulaire, et de la pathologie essentielle de leur dérégulation dans les mécanismes initiaux conduisant aux cancers. Le modèle biologique de l'embryon d'oursin permet de répondre à des questions fondamentales de la biologie et ouvre des perspectives nouvelles pour comprendre les mécanismes à l'origine des cancers. Il procure des outils moléculaires pour la prévention des risques et le diagnostic précoce. Les résultats scientifiques étant très abondants dans ces différents domaines, nous avons choisi de citer des revues scientifiques, en français si elles existent, qui relatent les travaux originaux et les connaissances approfondies sur les mécanismes des processus biologiques traités. La dernière partie montre l'intérêt du modèle expérimental en matière de toxicologie et de santé humaine, et en particulier les effets, et leurs conséquences en matière de santé, de l'herbicide à base de glyphosate, le Roundup, très largement employé dans le monde.

## LA DIVISION CELLULAIRE ESSENTIELLE POUR L'HÉRÉDITÉ, LE MAINTIEN ET L'ÉVOLUTION DU MONDE VIVANT

Une des découvertes biologiques majeures du XIX<sup>e</sup> siècle réside dans le fait que les cellules constituent les unités structurales et fonctionnelles de tous les organismes vivants et qu'elles prolifèrent par croissance et division. Il est admis que toutes les cellules du monde vivant actuel ont pour origine une cellule ancestrale, apparue il y a environ 0,9 milliard d'années, qui a conduit par un continuum de divisions cellulaires aux organismes actuels dont l'Homme (Cavalier-Smith, 2006). L'unité cellulaire du vivant, «*ex ovo omnia*» (Fig. 1) est la base des grandes découvertes de la biologie cellulaire et de l'embryologie du XX<sup>e</sup> siècle, ainsi que de la théorie de Darwin sur l'évolution. La division cellulaire est un processus biologique universel aussi ancien que l'existence des cellules et probablement le mieux conservé au cours de l'évolution. Ainsi, la division cellulaire, qui à chaque cycle de division d'une cellule mère donne naissance à deux cellules filles, se perpétue depuis la cellule ancestrale (Fig. 1). Elle per-

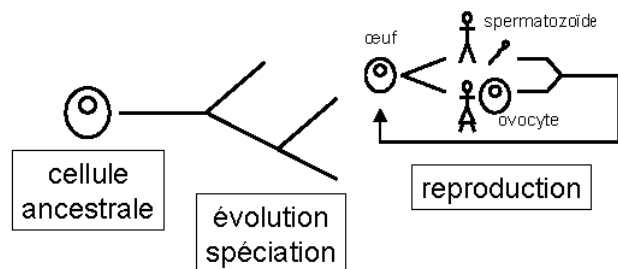


FIG. 1. – *Ex ovo omnia*, toute cellule actuelle provient d'une cellule ancestrale.

met à partir d'une cellule unique, l'œuf, de former les dix mille milliards de cellules qui constituent un être vivant tel que l'Homme (Nasmyth, 2001). Parmi les cellules des organismes parents, les cellules germinales, spermatozoïdes et ovocytes, fusionnent pour la continuité de l'espèce (Fig. 1). Dans l'organisme humain adulte, un milliard de cellules sont renouvelées quotidiennement par autant de divisions cellulaires pour maintenir l'intégrité de l'individu (Meijer, 2003). La division cellulaire permet ainsi la croissance, le développement et le maintien de tous les organismes vivants. Cependant, elle est aussi la source de pathologies graves, dont les cancers, deuxième cause de mortalité dans les populations des pays développés (Kanavos, 2006). Les grandes avancées de la génétique, de la biologie cellulaire, de la biochimie, de la biologie moléculaire et plus récemment de la génomique permettent d'appréhender les mécanismes de la division cellulaire en termes de gènes, de protéines codées par ces gènes, de fonctions cellulaires complexes et de réseaux de régulations dans lesquels les protéines kinases/protéines phosphatases jouent un rôle prépondérant (Alberts *et al.*, 2002). L'étude de ces mécanismes, qui commencent à peine à être élucidés, est essentielle à notre entendement du monde vivant et à l'analyse de l'influence de l'environnement sur celui-ci. Elle est aussi nécessaire pour la mise en œuvre de stratégies de prévention et de thérapie pour empêcher ou traiter les pathologies issues des dérèglements des processus biologiques.

## LE CYCLE CELLULAIRE ET LES POINTS DE SURVEILLANCE DU CYCLE (= CHECKPOINTS)

La division cellulaire est le processus fondamental par lequel une cellule mère donne naissance à deux cellules

filles, identiques entre elles et à la cellule mère dont elles dérivent. La réplication des chromosomes (phase S) et leur ségrégation dans chacune des cellules filles (phase M) constituent les deux événements clefs du cycle cellulaire. Ces phases, S (synthèse de l'ADN) et M (mitose), sont séparées par des phases G (gap) : G1 qui précède la phase S et G2 qui prépare la phase M. Les cellules quiescentes, en phase G0, entrent dans un cycle cellulaire sous l'action de facteurs mitogènes. La découverte des concepts fondamentaux de fonctionnement du cycle cellulaire, concrétisée par l'attribution du prix Nobel de physiologie et médecine en 2001 est exemplaire et issue de différentes approches cellulaires et génétiques de l'étude du cycle (Nasmyth, 2001). Le prix Nobel a récompensé Lee Hartwell, pionnier de l'approche génétique chez la levure, Paul Nurse, découvreur du gène *cdc2* (cell cycle control 2) de la transition G2-M du cycle chez la levure de fission et Timothy Hunt pour la découverte de la protéine régulatrice de *cdc2*, la cycline, au cours des divisions précoces embryonnaires chez la palourde et l'oursin (Nasmyth, 2001). Par l'utilisation de quelques modèles biologiques de choix, tels que les levures, les embryons d'oursins, les ovocytes d'étoile de mer et de xénope, ou les cellules de mammifères en culture, les mécanismes moléculaires de l'orchestration du cycle cellulaire par la famille des protéines kinases dépendantes des cyclines (CDKs, cyclin dependent kinases) ont été élucidés. Ces protéines kinases jouent un rôle essentiel dans le déclenchement, le contrôle et la succession harmonieuse des différentes phases du cycle. Elles sont constituées d'une sous-unité catalytique, la kinase, associée à une sous-unité régulatrice, la cycline, et s'activent séquentiellement pour assurer le bon déroulement du cycle. Les détails de leur activité et de leur activation ont fait l'objet de nombreuses revues (Nasmyth, 2001 ; Meijer, 2003 ; Nurse, 2000 ; Murray, 2004). Le complexe CDK1 (initialement dénommé *cdc2*), associé à la cycline B, s'active pour assurer la transition G2-M du cycle cellulaire, et représente l'archétype des CDKs. Dès la découverte de CDK1, le concept de point de contrôle du cycle (*checkpoint*) a émergé, comme le mécanisme permettant aux cellules de ne s'engager dans la phase suivante du cycle que lorsque la précédente est correctement exécutée. Rapidement, le concept s'est affiné en « points de surveillance » du cycle cellulaire dans lesquels s'intègrent non seulement les éléments effecteurs sur le cycle (CDKs), mais aussi les éléments de détection des anomalies, de la transduction du signal et des effecteurs comme les éléments de réparation des erreurs de division ou l'engagement des cellules vers l'apoptose, ou mort programmée des cellules (Fig. 2). Il est à noter cependant que plusieurs auteurs restreignent le point de surveillance au mécanisme de l'arrêt du cycle cellulaire. Nous privilégions le concept qui englobe l'ensemble des voies de signalisation entre le stress initial et les différents acteurs, dont les mécanismes de détection des erreurs, de leur médiation vers les voies de transduction qui activent les différents effecteurs des processus biologiques concernés (Fig. 2). Les effecteurs des CDKs assurent le bon déroulement du cycle alors que l'ensemble des constituants des

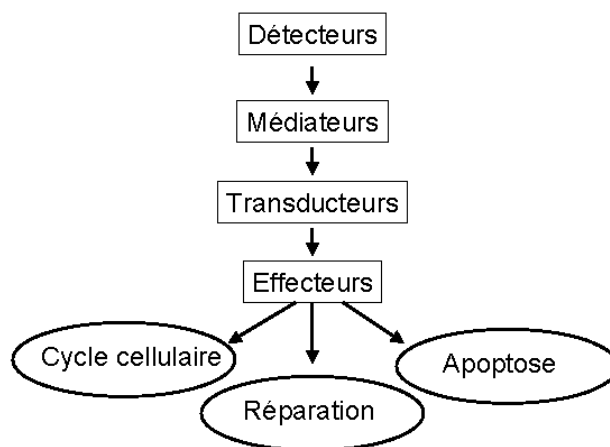


FIG. 2. – Les étapes schématisées des voies des points de surveillance du cycle cellulaire.

points de surveillance est mobilisé en cas d'erreurs, soit au cours des phases de duplication des chromosomes (ADN non répliqué ou endommagé), soit au moment de leur ségrégation (points de surveillance du fuseau de division). Les cellules étant soumises en permanence à des agents lésant l'ADN, tels que les radiations ionisantes ou des molécules issues du métabolisme cellulaire lui-même, et la réplication à chaque cycle de division des trois milliards de bases que constitue le génome humain ne s'effectuant pas sans erreurs inhérentes à tout processus biologique, les points de surveillance sont les mécanismes fondamentaux du maintien de l'intégrité du génome. À ce jour, plus de cent acteurs protéiques des points de surveillance du cycle cellulaire sont identifiés et font l'objet de nombreuses publications. Les acteurs et mécanismes des points de surveillance de l'ADN endommagé ou non répliqué sont les plus documentés (Kastan & Bartek, 2004 ; Sancar *et al.*, 2004), non seulement pour leur rôle biologique fondamental, mais aussi pour leur rôle dans la genèse de pathologies comme les cancers (Kastan & Bartek, 2004 ; Hartwell & Kastan, 1994). La figure 3 présente les acteurs moléculaires identifiés des points de surveillance de l'ADN endommagé, classés selon leur fonction et les cibles terminales dans le déroulement du cycle cellulaire. La mobilisation des points de surveillance de l'ADN endommagé provoque un ralentissement ou un arrêt du cycle cellulaire et active la machinerie très sophistiquée de réparation de l'ADN (Sancar *et al.*, 2004 ; Wang & Cho, 2004 ; Houtgraaf *et al.*, 2006 ; Lisby & Rothstein, 2004). Les mécanismes de la réparation sont multiples et dépendent du type de l'endommagement (Sancar *et al.*, 2004). Lorsque la réparation est effective, l'inhibition de la progression dans le cycle cellulaire est levée. Lorsque la réparation échoue, par excès de dommages ou défaut génétique de la machinerie de réparation, l'arrêt du cycle peut être permanent et conduire à la sénescence, l'apoptose ou la cancérisation (Kastan & Bartek, 2004 ; Schultz *et al.*, 2000 ; Massague, 2004 ; Liu *et al.*, 2003).

L'apoptose, la mort programmée des cellules, permet l'élimination de la très grande majorité des cellules dont

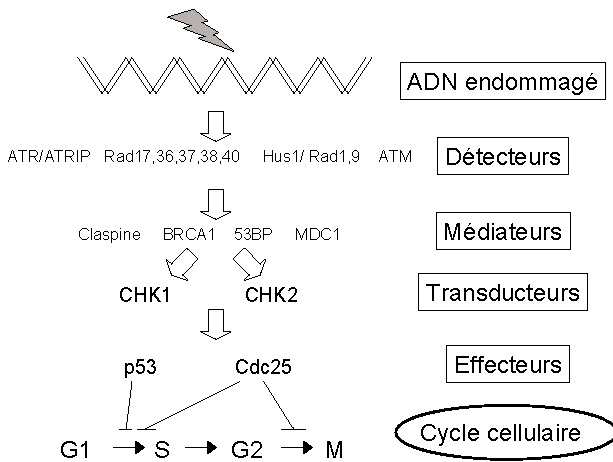


FIG. 3. – Les composants du point de surveillance de l'ADN endommagé et les phases d'inhibition du cycle cellulaire (d'après Sancar *et al.*, 2004).

l'ADN est endommagé et non réparé (Norbury & Zhivotovsky, 2004). Ainsi, lorsque le point de surveillance de l'ADN endommagé est mobilisé, les protéines kinases ATM/ATR orchestrent la réponse (voir Fig. 3). Elles inhibent la progression du cycle cellulaire par une voie de phosphorylation impliquant les protéines kinases Chk1/Chk2, engagent la réparation par les protéines RPA, BRCA1 et la phosphorylation de H2AX et activent la voie apoptotique des caspases par l'intermédiaire de la protéine p53 (Nyberg *et al.*, 2002). L'acquisition par les cellules de la résistance à l'apoptose favorise l'instabilité génétique et ses conséquences au cours du processus de la cancérisation (Kastan & Bartek, 2004 ; Sawyers, 2004).

La découverte des proto-oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs, gènes cellulaires dont la surexpression ou une altération génétique favorise ou même, comme dans le cas de c-myc, est suffisante pour conduire au cancer, a fourni une base au concept de l'origine génétique du cancer dans les dernières décennies. La relation entre les oncogènes et les mécanismes de la surveillance du cycle cellulaire, soit parce que les oncogènes sont des éléments des points de surveillance, soit parce qu'ils agissent sur ceux-ci par des voies de signalisation cellulaire, mène au nouveau concept de l'instabilité génétique des cellules permettant le processus de la cancérisation (Blanchard, 2003).

## POINTS DE SURVEILLANCE ET CELLULES SOUCHES À L'ORIGINE DES CANCERS

Deux concepts fondamentaux ont progressivement émergé au cours des deux dernières décennies. Le premier est le rôle des points de surveillance du cycle cellulaire à l'origine des cancers, et le deuxième, plus récent, est que les cancers ont pour origine des cellules souches.

Bien que l'aneuploïdie, une mauvaise répartition des chromosomes, caractérise beaucoup de cellules tumo-

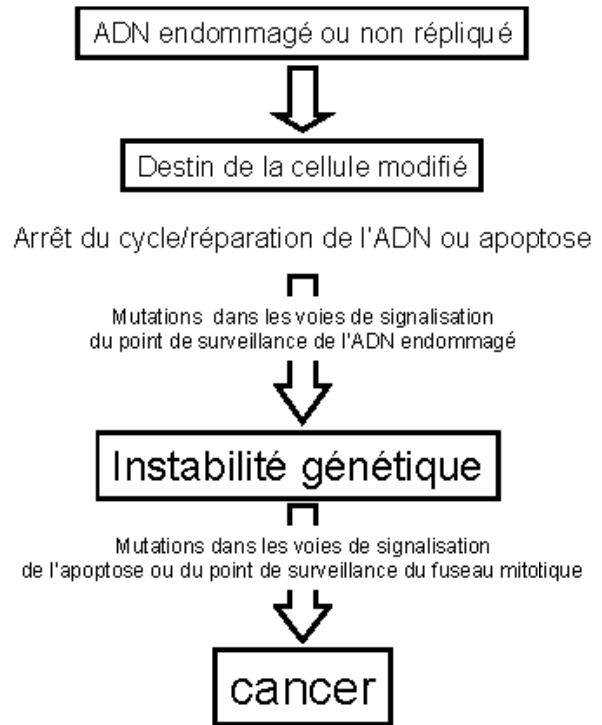


FIG. 4. – Schéma général de la réponse à l'ADN endommagé ou non répliqué sur la destinée de la cellule. Les cellules réparent leur ADN ou s'orientent vers l'apoptose. Les cellules acquièrent l'instabilité génétique par les dommages dans les voies de signalisation des points de surveillance. Celles qui échappent au contrôle de l'apoptose par de nouveaux dommages génèrent le cancer (d'après Kastan & Bartek, 2004).

rales et résulte du dysfonctionnement du point de surveillance du fuseau mitotique, il paraît de plus en plus évident que l'aneuploïdie est la conséquence de la cancérisation plutôt que son origine (Malmanche *et al.*, 2006 ; Lopes & Sunkel, 2003 ; Kops *et al.*, 2005). En revanche (Fig. 4), l'implication des points de surveillance de l'ADN endommagé ou non correctement répliqué est généralement reconnue comme la source initiale de la cancérisation (Kastan & Bartek, 2004 ; Massague, 2004). La genèse d'un cancer nécessite six à huit mutations qui confèrent aux cellules cancéreuses leur propriétés : l'instabilité génétique, l'échappement au contrôle par les facteurs externes, l'induction de l'angiogenèse et la propriété de migration pour former les métastases. Les points de surveillance de l'ADN endommagé ou incorrectement répliqué assurent le maintien de l'intégrité du génome. Ainsi, les cellules qui échappent au contrôle des points de surveillance, soit parce qu'un mécanisme de surveillance est affecté par l'erreur de division, soit parce que l'ADN n'a pas été correctement réparé, acquièrent l'instabilité génétique qui permet par un processus de sélection de conduire aux tumeurs et aux cancers (Kastan & Bartek, 2004 ; Massague, 2004). Au cours de cette sélection, elles acquièrent la possibilité d'échapper à l'apoptose (Fig. 4). Trois à quatre décennies peuvent s'écouler entre le stress initial et les signes cliniques de cancers,



à l'exception de cancers à évolution rapide pour lesquels un ou plusieurs éléments de la machinerie des points de surveillance est génétiquement affecté. Par exemple, dans le cas du rétinoblastome, la protéine Rb est génétiquement affectée et provoque une tumeur hautement maligne de la rétine chez le nourrisson et l'enfant. La protéine Rb est l'un des effecteurs du point de surveillance de la transition G1/S (Wang *et al.*, 2001). Puisque 80 % des cancers sont considérés de source non génétique, c'est-à-dire sans prédisposition génétique initiale (Kanavos, 2006), les mécanismes endogènes ou environnementaux qui lésent l'ADN génèrent les mutations nouvelles qui rendent les points de surveillance inefficaces et induisent l'instabilité génétique transmissible aux cellules filles.

L'origine du cancer au niveau des cellules souches constitue le deuxième concept émergent depuis quelques années (Fig. 5). À partir de l'œuf, l'embryon est constitué de cellules souches totipotentes, capables de se différencier en tous les tissus d'un organisme, qui deviennent progressivement multipotentes aptes à se différencier en un ou quelques types cellulaires (Fig. 6, à gauche). Les cellules souches normales sont multipotentes indifférenciées et capables de se renouveler indéfiniment, elles sont retrouvées dans la plupart des tissus humains et en assurent le maintien (Reya *et al.*, 2001 ; Sell, 2004 ; Pardal *et al.*, 2003) grâce à leur propriété d'auto-renouvellement (Fig. 6, à gauche). Elles sont alors des cellules souches adultes progénitrices des différentes cellules des tissus différenciés (Fig. 6). Dans un nombre croissant de cancers, des cellules souches dites « cancéreuses » sont découvertes et caractérisées, renforçant le concept que les cancers prennent naissance dans les cellules souches (Sell, 2004 ; Pardal *et al.*, 2003 ; Ratajczak *et al.*, 2006 ; Beachy *et al.*, 2004 ; Burkert *et al.*, 2006). Les tumeurs se développent et sont entretenues par l'auto-renouvellement des cellules souches cancéreuses qu'elles contiennent

(Fig. 6, à droite). De nombreuses données expérimentales récentes, dont des exemples sont indiqués dans la figure 5, viennent renforcer le concept des cellules souches cancéreuses à l'origine de nombreux cancers. Cependant, il n'est pas exclu qu'un cancer puisse aussi être généré à partir de la dédifférenciation de cellules tissulaires ou progénitrices (Fig. 6, à droite). Les propriétés de migration des cellules souches cancéreuses expliquent les métastases et le développement des tumeurs secondaires (Sell, 2004 ; Pardal *et al.*, 2003 ; Ratajczak *et al.*, 2006 ; Beachy *et al.*, 2004).

Ainsi, les cellules souches sont à l'origine de cancers (Fig. 5). Lors des anomalies de leurs divisions ou lorsqu'elles sont affectées au niveau de leur ADN, soit par le métabolisme naturel, soit par les agents carcinogènes, elles acquièrent l'instabilité génétique. Elles sont alors des cellules pré-cancéreuses et se transforment progressivement par un mécanisme de sélection, en cellules souches cancéreuses qui génèrent alors le(s) cancer(s). Ces concepts ont deux implications importantes. D'une part, dans la définition même du « cancer », terme jusqu'alors utilisé lorsque les signes cliniques apparaissent, et qu'il faut maintenant reconsidérer dans la mesure où, les cellules souches elles-mêmes sont « cancéreuses » dès lors qu'elles ont acquis les propriétés pour générer un cancer. D'autre part, ces concepts changent radicalement les perspectives thérapeutiques, non seulement pour la prévention, car tout agent qui agit sur l'un des mécanismes des points de surveillance est potentiellement cancérogène, mais aussi pour la détection précoce de cancers pour laquelle la détection des cellules souches cancéreuses serait un excellent critère, et enfin pour les stratégies de traitement qui doivent s'orienter vers l'élimination ciblée de ces cellules souches cancéreuses (Sell, 2004 ; Pardal *et al.*, 2003 ; Ratajczak *et al.*, 2006 ; Beachy *et al.*, 2004).

#### Relations cellules souches et cancer.

Cellules souches cancéreuses	Tumeur correspondante
Hématopoïétiques	Leucémies
Neurales	Tumeurs du cerveau
Endocriniennes bronchiales	Cancer bronchique à petites cellules (SCLC)
Epithéliales bronchiques	Cancer bronchique
Epithéliales mammaires	Cancer du sein
Hépatiques ovaies	Hépatoblastome
Epithéliales ovariennes	Cancer de l'ovaire
Epithéliales cervicales	Cancer du col utérin
Epithéliales des tubules rénaux*	Néphroblastome (tumeur de Wilms)
Epithéliales de la rétine*	Rétinoblastome
Neuroectodermiques*	Neuroblastome
Musculaires satellites squelettiques*	Rhabdomyosarcome
Très petites cellules de type embryonnaire (VSEL)*	Tératocarcinome

\*tumeurs pouvant avoir pour origine les très petites cellules de type embryonnaire.

FIG. 5. – Relations entre les cellules souches identifiées et des cancers avérés (d'après Ratajczak *et al.*, 2006).

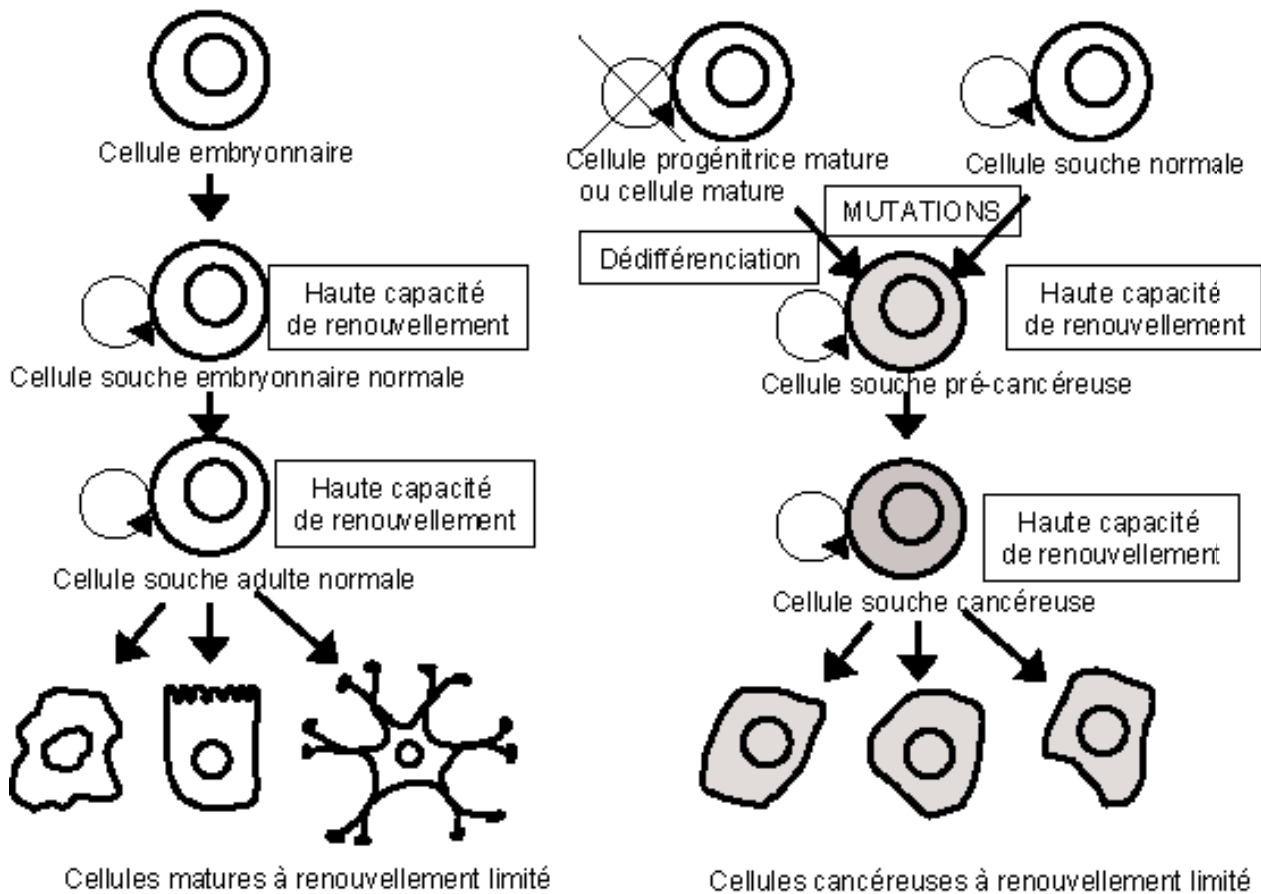


FIG. 6. – Les cellules souches à l'origine des cancers.

Gauche : les cellules souches embryonnaires donnent naissance aux cellules souches progénitrices qui assurent le renouvellement tissulaire en se différenciant en cellules matures.

Droite : par mutations, en particulier par endommagement de l'ADN, les cellules souches normales donnent naissance aux cellules souches précancéreuses puis par évolution clonale aux cellules souches cancéreuses. Les dernières forment les tumeurs et assurent leur renouvellement (d'après Pardal *et al.*, 2003). Il n'est pas exclu que des cellules matures à faible taux de renouvellement puissent se dédifférencier pour donner des cellules souches précancéreuses.

### L'OURSIN, UN MODÈLE BIOLOGIQUE DE CHOIX POUR ÉTUDIER LES RELATIONS ENTRE LES ÉLÉMENTS DES POINTS DE SURVEILLANCE DE L'ADN ENDOMMAGÉ

La complémentarité des approches, génétiques chez les levures, biochimiques et cellulaires dans des extraits ovocytaires ou embryonnaires précoces (xénope, oursin, étoile de mer, palourde), a permis l'explosion rapide des connaissances dans le domaine des acteurs du cycle cellulaire et de leur régulation (*cf.* partie 2). Parmi les modèles biologiques de choix, les ovocytes des invertébrés marins se sont révélés pertinents pour aboutir aux concepts actuels sur la régulation du cycle cellulaire (Nurse, 2000 ; Dorée, 2003). L'abondance du matériel biologique et la disponibilité d'ovocytes et de gamètes arrêtés physiologiquement à des stades précis, et pouvant poursuivre le cycle cellulaire de façon synchrone par stimulation naturelle, constituent les raisons majeures de la

pertinence des modèles ovocytaires. La fécondation provoque de manière naturelle l'entrée des gamètes dans le cycle cellulaire et des divisions synchrones des cellules sans qu'il soit nécessaire d'y adjoindre des drogues ou des facteurs de croissance. Le fait que les gamètes d'oursin aient achevé leur méiose avant la fécondation et soient arrêtés en phase G1 du cycle cellulaire (Fig. 7) confère au modèle un avantage particulier par rapport aux autres métazoaires dont les gamètes sont arrêtés en métaphase de la seconde division méiotique. La fécondation de l'oursin (Fig. 7) permet d'analyser les voies biochimiques de régulation du cycle cellulaire sans que les mécanismes d'achèvement de la méiose n'interfèrent, comme c'est le cas dans les modèles alternatifs, par exemple l'embryon de xénope ou de souris (Gilbert, 2003).

Le séquençage récent du génome complet de *Strongylocentrotus purpuratus* (Sodergren *et al.*, 2006) montre que l'oursin possède les gènes orthologues impliqués

dans la régulation du cycle cellulaire, dans les points de surveillance, la réparation de l'ADN endommagé et l'apoptose (Fernandez-Guerra *et al.*, 2006; Robertson *et al.*, 2006). La disponibilité du génome complet donne accès aux approches de génomique fonctionnelle facilitant les études des mécanismes moléculaires du cycle cellulaire et des voies reliant la détection, la transduction et les effecteurs des points de surveillance, en particulier des points de surveillance de l'ADN endommagé.

L'œuf étant la cellule souche par excellence à l'origine d'un organisme complet (Sell, 2004), le développement précoce de l'oursin (Fig. 7) offre un modèle de choix pour comprendre les premières étapes de la transformation de la cellule souche en cellule souche « cancéreuse ». Les divisions précoces offrent l'avantage d'être rapides. La première division est complète en 2 heures avec les transitions G1-S et G2-M. Les 4 ou 5 divisions suivantes sont rapides avec une succession des phases S et M puis plus lentes avec l'apparition des phases G1 et G2. Les premières divisions jusqu'au stade morula obtenu en 6 heures sont régulées par des modifications traductionnelles et post-traductionnelles sans nécessité de nouvelles transcriptions. Le stade d'une blastula nageante est observé à 20 heures et poursuit le développement jusqu'au stade adulte (Gilbert, 2003). Les embryons sont observés au microscope et la coloration de l'ADN permet de suivre par fluorescence l'évolution nucléaire, d'abord de la tête du spermatozoïde et du noyau de l'ovule puis des cycles de division nucléaire (Marc *et al.*, 2002; Fig. 7). Bien évidemment, et puisque les oursins ne développent pas de cancers, le modèle complète celui, plus approprié, constitué par les cellules souches humaines. L'isolement de celles-ci est toutefois difficile du fait

de leur petit nombre; de plus les divisions en sont longues et naturellement asynchrones (Sell, 2004), même si il est possible de les obtenir à partir de cellules différenciées (Egli *et al.*, 2007). Dans le modèle de l'oursin, la régulation du cycle cellulaire est bien documentée, en revanche, les acteurs des points de surveillance n'en sont qu'à leur premières caractérisations fonctionnelles. L'existence même de points de surveillance était controversée. Les premières données indiquant leur existence dans les cellules embryonnaires précoces proviennent des expériences montrant l'inhibition du premier cycle cellulaire par l'inactivation du complexe CDK1/cycline B qui bloque la transition G2-M du cycle (Marc *et al.*, 2002). Cet effet a été obtenu sous l'action d'un pesticide d'usage courant (voir chapitre suivant). La voie de transduction par la protéine phosphatase CDC25 qui empêche l'activation de CDK1 cycline B s'est révélée fonctionnelle (Marc *et al.*, 2004a). Grâce à des agents lésant l'ADN, la fonctionnalité du point de surveillance G2-M en réponse à l'endommagement de l'ADN a été établie (Le Bouffant *et al.*, 2006, 2007, Fig. 8). Et récemment, par l'utilisation de génotoxiques, la fonctionnalité de la voie apoptotique a été démontrée ainsi que celle de la réparation de l'ADN (Le Bouffant *et al.*, 2007, Fig. 8). Ainsi le modèle oursin permet l'étude fonctionnelle de l'ensemble des voies de signalisation du point de surveillance de l'ADN endommagé. Cette étude est d'autant plus prometteuse que des extraits, reproduisant *in vitro* des événements observés *in vivo* à différentes phases du cycle et/ou de l'activation des points de surveillance, ont été expérimentalement efficaces dans des études antérieures du cycle cellulaire. Des extraits interphasiques ont permis l'analyse de la re-formation du noyau (Collas,

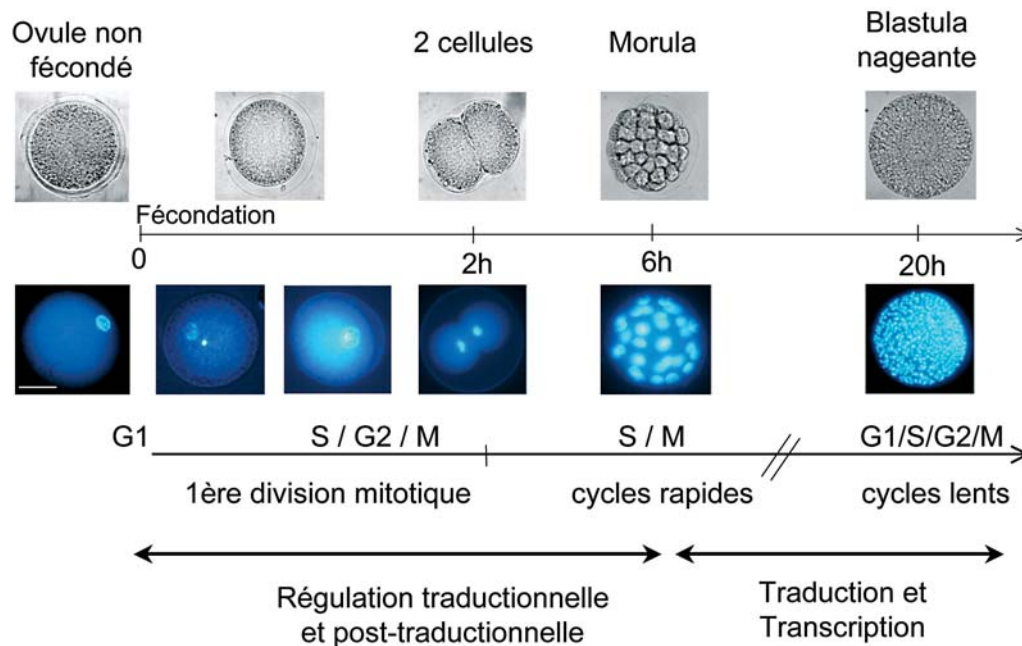


FIG. 7. – Le développement précoce de l'oursin. Les embryons sont observés au microscope et la coloration de l'ADN permet de suivre par fluorescence l'évolution nucléaire (Marc *et al.*, 2002).

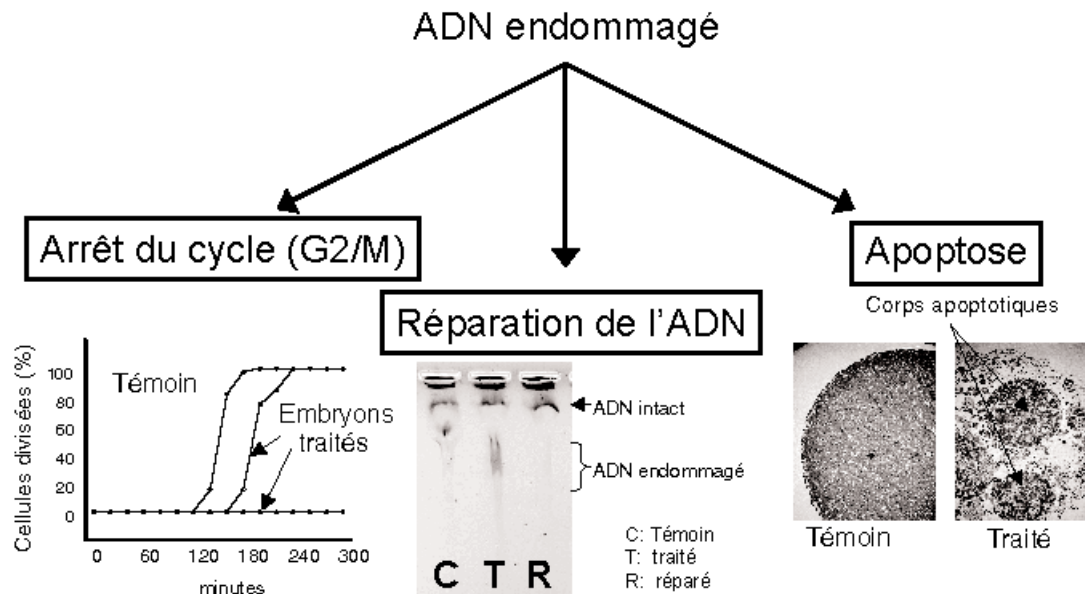


FIG. 8. – Le point de surveillance de l'ADN endommagé fonctionnel dans les embryons d'oursin (d'après Le Bouffant *et al.*, *CMLS*, 2007).

2000), de la synthèse d'ADN en phases G1 et S (Zhang & Ruderman, 1993), des événements de la phase M (Colas, 1998). Les études fonctionnelles dans de tels extraits sont réalisables par des expériences de déplétion/complémentation de protéines, facilitées par la connaissance du génome complet, et par addition d'effecteurs spécifiques des voies de signalisation.

Le modèle de l'embryon précoce d'oursin devrait permettre l'étude fonctionnelle des voies de signalisation du point de surveillance de l'ADN endommagé et de son dérèglement, et pourrait permettre d'élucider les propriétés des cellules souches « cancéreuses ». Ces recherches sont complémentaires des approches génétiques, et nous postulons que cette convergence d'approches sera aussi fructueuse que celle qui a permis l'identification et la caractérisation fonctionnelle des acteurs du cycle cellulaire (Nasmyth, 2001).

## LE MODÈLE DE L'EMBRYON D'OURSIN ET LA TOXICITÉ DU ROUNDUP

Un des défis majeurs de la toxicologie est la détermination des risques, en matière de santé, d'une exposition à un ou plusieurs produits, apparemment sans conséquence immédiate (de Rosa *et al.*, 2004). En particulier, la question se pose pour l'emploi de pesticides (Barr *et al.*, 1999) dont certains, comme le Roundup, sont utilisés à très grande échelle dans le monde dans des applications domestiques, de services ou agricoles. L'emploi du Roundup s'intensifie du fait du développement mondial des organismes génétiquement modifiés (OGM) rendus tolérants au Roundup (Blackburn & Boutin, 2003). Depuis les premières mises sur le marché du

Roundup en 1975, les risques sur l'environnement et la santé publique étaient considérés comme négligeables (Williams *et al.*, 2000).

Le Roundup contient le glyphosate, molécule active comme dés herbant, associé à des produits de formulation jouant le rôle de surfactants et de perméabilisants (Williams *et al.*, 2000). Lors de l'exposition d'embryons d'oursin à différents cocktails de pesticides, le Roundup, d'usage courant et disponible aisément dans les commerces, a été choisi initialement comme contrôle non toxique pour sa réputation de sécurité, largement entretenue par les campagnes de publicité. De façon inattendue, le Roundup s'est révélé agir sur le déroulement de la division cellulaire, à des doses bien inférieures (500 à 2 500 fois) à celles recommandées par le fabricant en usage herbicide (Marc *et al.*, 2002, 2003, 2004a, 2004b). L'analyse de l'action du produit sur la première division de l'embryon d'oursin montre que le Roundup inhibe l'activation du complexe CDK1/cycline B, complexe protéique terminal du point de surveillance de l'ADN endommagé (*cf.* chapitre « Points de surveillance et cellules souches à l'origine des cancers »). L'effet du Roundup, qui s'explique par son contenu en glyphosate, nécessite la présence des produits de formulation qui permettent son entrée dans les cellules (Marc *et al.*, 2002). L'universalité des mécanismes des points de surveillance du cycle cellulaire étant connue, un risque en santé humaine était suggéré (Marc *et al.*, 2002), ce qui a justifié l'alerte des autorités de tutelles en 2002. L'effet est analogue pour différentes formulations contenant le glyphosate (Marc *et al.*, 2004b). Le pesticide affecte la synthèse de l'ADN et aboutit à l'inhibition de l'activation de CDK1/cycline B par la voie de transduction impliquant la protéine phosphatase CDC25 (Marc *et al.*, 2004a).



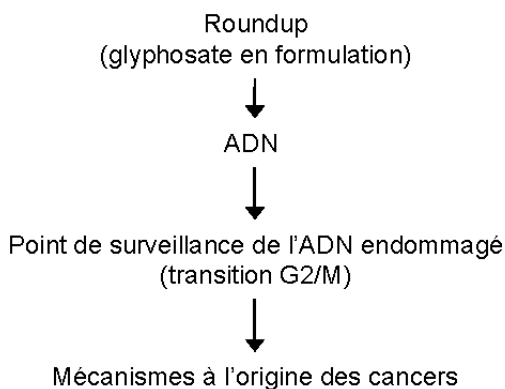


FIG. 9. – Représentation schématique des effets du Roundup, herbicide à base de glyphosate, sur l'ADN, le point de surveillance de l'ADN endommagé et par voie de conséquence sur les mécanismes à l'origine des cancers (cf. texte).

La toxicité du Roundup a aussi été démontrée au niveau de la transcription dans le modèle de l'oursin (Marc *et al.*, 2005), au niveau d'enzymes du métabolisme des hormones stéroïdes dans des modèles cellulaires humains (Richard *et al.*, 2005), en particulier des cellules embryonnaires en culture (Benachour *et al.*, 2007), et dans des écosystèmes reconstitués (Relyea, 2005). Des effets sur le cycle cellulaire et le point de surveillance de l'ADN endommagé ont été démontrés *in vivo* dans un modèle poisson (Cavas & Konen, 2007). Le Roundup est toxique sur des cultures de cellules de kératinocytes humaines (Gehin *et al.*, 2006) probablement en relation avec le point de surveillance de l'ADN endommagé. Le Roundup est déversé massivement par voie aérienne sur des cultures en Amérique du Sud (Solomon *et al.*, 2007), affectant de toute évidence l'ADN et le point de surveillance de l'ADN endommagé chez l'Homme (Fig. 9) (Paz-y-Mino *et al.*, 2004).

Avec l'accumulation des preuves expérimentales liant l'origine des cancers à l'acquisition de l'instabilité génétique de cellules qui échappent au point de surveillance du cycle cellulaire, par exemple de cellules souches, les résultats obtenus sur le modèle pertinent du développement précoce de l'oursin (cf. chapitre précédent) révèlent des conséquences probables en matière de santé humaine. Si l'on prend en compte la définition émergente du cancer, le Roundup est incontestablement un agent cancérigène. Lorsqu'elles seront possibles, les études épidémiologiques permettront d'estimer l'incidence du produit sur les différents types de cancers, en particulier les cancers des voies respiratoires puisque le produit pulvérisé contient la formulation à des concentrations très supérieures à celles qui activent le point de surveillance de l'ADN endommagé.

Le modèle biologique de l'embryon d'oursin permet d'évaluer les risques de toxicologie à long terme en matière de cancer. Il peut donc être à la base d'une méthode cellulaire et moléculaire fiable de la mesure du potentiel cancérigène de substances ou de combinaisons de substances, un problème majeur de la toxicologie

actuelle, fournissant une évaluation beaucoup plus précoce que les études épidémiologiques qui ne peuvent s'effectuer qu'*a posteriori* (Marc *et al.*, 2003). Dans une perspective d'application à grande échelle, la mise au point d'extraits acellulaires mimant *in vitro* le point de surveillance de l'ADN endommagé, parfaitement réalisables à partir des embryons, sera d'un intérêt majeur (Marc *et al.*, 2003).

## CONCLUSIONS

Après un apport important aux connaissances et concepts du cycle cellulaire et de sa régulation, le modèle du développement précoce de l'oursin apparaît prometteur pour l'étude des voies biochimiques des points de surveillance (*checkpoint*), dont celui de l'ADN endommagé. Il permet d'étudier les mécanismes de détection de l'ADN lésé, la transduction des lésions jusqu'aux effecteurs du cycle cellulaire, de la réparation et de l'apoptose. Les perspectives importantes se situent dans la compréhension des mécanismes initiaux de la cancérisation, de la prévention et du diagnostic précoce de la maladie. Le modèle offre également la perspective de criblage à haut débit et surtout en temps très court de produits à potentiel cancérigène, bien avant les signes cliniques de la maladie, et ceci, avant même le développement et l'utilisation industrielle de ces produits.

**Remerciements.** – Les références sont constituées par une sélection d'articles scientifiques de revue publiés dans les journaux à comité de lecture. Nous nous excusons de ne pouvoir citer l'ensemble considérable des travaux sur les différents aspects traités, qui peuvent cependant être trouvés dans les références citées.

Les travaux de l'équipe ont été soutenus par les financements des organismes de tutelle (CNRS et Université Pierre et Marie Curie), de l'Association de Recherche sur le Cancer (ARC), de La Ligue contre le Cancer, du Conseil Général du Finistère et de la Région Bretagne.

Nous remercions l'ensemble des membres de l'équipe et de la Station Biologique de Roscoff, ainsi que France Le Rue pour ses commentaires et suggestions. L'article est dédié à Stéphanie.

## BIBLIOGRAPHIE

- Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Walter P., Molecular biology of the cell. Garland Science, 2002. New York and London.
- Barr D. B., Barr J. R., Driskell W. J., Hill R. H. Jr., Ashley D. L., Needham L. L., Head S. L. & Sampson E. J., Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary-use pesticides. *Toxicol. Ind. Health.*, 1999, 15, 168-179.
- Beachy P. A., Karhadkar S. S. & Berman D. M., Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature*, 2004, 432, 324-331.
- Benachour N., Sipahutar H., Moslemi S., Gasnier C., Travert C. & Seralini G. E., Time- and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2007, 53, 126-133.
- Bharadwaj R. & Yu H., The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*, 2004, 23, 2016-2027.
- Blackburn L. G. & Boutin C., Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Roundup). *Ecotoxicology*, 2003, 12, 271-285.

- Blanchard J. M., Oncogenes and mitotic regulators: a change in perspective of our view of neoplastic processes. *Med. Sci. (Paris)*, 2003, 19, 187-199.
- Burkert J., Wright N. A. & Alison M. R., Stem cells and cancer: an intimate relationship. *The Journal of Pathology*, 2006, 209, 287-297.
- Cavalier-Smith T., Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 2006, 361, 969-1006.
- Cavas T. & Konen S., Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis*, 2007, 22, 263-268.
- Collas P., Nuclear envelope disassembly in mitotic extract requires functional nuclear pores and a nuclear lamina. *J. Cell Sci.*, 1998, 111 ( Pt 9), 1293-1303.
- Collas P., Formation of the sea urchin male pronucleus in cell-free extracts. *Mol. Reprod. Dev.*, 2000, 56, 265-270.
- de Rosa C. T., El-Masri H. A., Pohl H., Cibulas W. & Mumtaz M. M., Implications of chemical mixtures in public health practice. *J. Toxicol. Environ. Health B. Crit. Rev.*, 2004, 7, 339-350.
- De Rosa C. T., Nickle R., Faron O. & Jones D. E., The impact of toxicology on public health policy and service: an update. *Toxicol. Ind. Health*, 2003, 19, 115-124.
- Deng C. X., BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res.*, 2006, 34, 1416-1426.
- Doree M., Triggering cell mitosis in higher eukaryotes. *Med. Sci. (Paris)*, 2003, 19, 299-307.
- Egli D., Rosains J., Birkhoff G. & Eggan K., Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature*, 2007, 447, 679-685.
- Fernandez-Guerra A., Aze A., Morales J., Mulner-Lorillon O., Cosson B., Cormier P., Bradham C., Adams N., Robertson A. J., Marzluff W. F., Coffman J. A. & Genevieve A. M., The genomic repertoire for cell cycle control and DNA metabolism in *S. purpuratus*. *Dev. Biol.*, 2006, 300, 238-251.
- Gehin A., Guyon C. & Nicod L., Glyphosate-induced antioxidant imbalance in HaCaT: the protective effect of Vitamins C and E. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2006, 22, 27-34.
- Gilbert S. F., Developmental biology. Sinauer Associates. 2003, Sunderland, Mass.
- Hartwell L. H. & Kastan M. B., Cell cycle control and cancer. *Science*, 1994, 266, 1821-1828.
- Houtgraaf J. H., Versmissen J. & van der Giessen W. J., A concise review of DNA damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovasc. Revasc. Med.*, 2006, 7, 165-172.
- Kanavos P., The rising burden of cancer in the developing world. *Ann. Oncol.*, 2006, 17 (Suppl. 8), viii15-viii23.
- Kastan M. B. & Bartek J., Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 2004, 432, 316-323.
- Kops G. J., Weaver B. A. & Cleveland, D. W., On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat. Rev. Cancer*, 2005, 5, 773-785.
- Le Bouffant R., Cormier P., Cuffe A., Belle R. & Mulner-Lorillon O., Sea urchin embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.*, 2007, 13, 1723-1734.
- Le Bouffant R., Cormier P., Mulner-Lorillon O. & Belle R., Hypoxia and DNA-damaging agent bleomycin both increase the cellular level of the protein 4E-BP. *J. Cell Biochem.*, 2006, 99, 126-132.
- Lisby M. & Rothstein R., DNA repair: keeping it together. *Curr. Biol.*, 2004, 14, R994-R996.
- Liu S. T., van Deursen J. M. & Yen T. J., The role of mitotic checkpoint in maintaining genomic stability. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 2003, 58, 27-51.
- Lopes C. S. & Sunkel C. E., The spindle checkpoint: from normal cell division to tumorigenesis. *Arch. Med. Res.*, 2003, 34, 155-165.
- Malmanche N., Maia A. & Sunkel C. E., The spindle assembly checkpoint: preventing chromosome mis-segregation during mitosis and meiosis. *FEBS Lett.*, 2006, 580, 2888-2895.
- Marc J., Belle R., Morales J., Cormier P. & Mulner-Lorillon O., Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition. *Toxicol. Sci.*, 2004a, 82, 436-442.
- Marc J., Le Breton M., Cormier P., Morales J., Belle R. & Mulner-Lorillon O., A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2005, 203, 1-8.
- Marc J., Mulner-Lorillon O. & Belle R., Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biology of the Cell*, 2004b, 96, 245-249.
- Marc J., Mulner-Lorillon O., Boulben S., Hureau D., Durand G. & Belle R., Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. *Chem. Res. Toxicol.*, 2002, 15, 326-331.
- Marc J., Mulner-Lorillon O., Durand G. & Belle R., Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environnemental Chemistry letters*, 2003, 1, 8-12.
- Massague J., G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 2004, 432, 298-306.
- Meijer L., Le cycle de division cellulaire et sa régulation. *Oncologie*, 2003, 5, 311-326.
- Murray A. W., Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*, 2004, 116, 221-234.
- Nasmyth K., A prize for proliferation. *Cell*, 2001, 107, 689-701.
- Norbury, C. J., & Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* 23, 2797-808.
- Nurse P., A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell*, 2000, 100, 71-78.
- Nyberg, K. A., Michelson R. J., Putnam C. W. & Weinert T. A., Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu. Rev. Genet.*, 2002, 36, 617-656.
- Osada H. & Takahashi T., Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. *Oncogene*, 2002, 21, 7421-7434.
- Pardal R., Clarke M. F. & Morrison S. J., Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, 3, 895-902.
- Paz-y-Mino C., Arevalo M., Sanchez M. E. & Leone P. E., Chromosome and DNA damage analysis in individuals occupationally exposed to pesticides with relation to genetic polymorphism for CYP 1A1 gene in Ecuador. *Mutat. Res.*, 2004, 562, 77-89.
- Ratajczak M. Z., Kucia M., Dobrowolska H., Wanzeck J., Reza R. & Ratajczak J., Emerging concept of cancer as a stem cell disorder. *Central European Journal of Biology*, 2006, 1, 73-87.
- Relyea R. A., The lethal impacts of Roundup and predatory stress on six species of North American tadpoles. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 2005, 48, 351-357.
- Reya T., Morrison S. J., Clarke M. F. & Weissman I. L., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 2001, 414, 105-111.
- Richard S., Moslemi S., Sipahutar H., Benachour N. & Seralini G. E., Differential effects of glyphosate and roundup on human placental cells and aromatase. *Environ. Health Perspect.*, 2005, 113, 716-720.
- 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.
- Sancar A., Lindsey-Boltz L. A., Unsal-Kacmaz K. & Linn S., Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.*, 2004, 73, 39-85.
- Sawyers C., Targeted cancer therapy. *Nature*, 2004, 432, 294-297.

- Schultz L. B., Chehab N. H., Malikzay A., DiTullio R. A. Jr., Stavridi E. S. & Halazonetis T. D., The DNA damage checkpoint and human cancer. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 2000, 65, 489-498.
- Sell S., Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 2004, 51, 1-28.
- Sodergren E., Weinstock G. M., Belle R., Cormier P., Cosson B., Morales J., Mulner-Lorillon O. *et al.*, The genome of the sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Science*, 2006, 314, 941-952.
- Solomon K. R., Anadon A., Carrasquilla G., Cerdeira A. L., Marshall J. & Sanin L. H., Coca and poppy eradication in Colombia: environmental and human health assessment of aerially applied glyphosate. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2007, 190, 43-125.
- Taylor S. S., Scott M. I. & Holland A. J., The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res.*, 2004, 12, 599-616.
- Wang J. Y. & Cho S. K., Coordination of repair, checkpoint, and cell death responses to DNA damage. *Adv. Protein Chem.*, 2004, 69, 101-135.
- Wang J. Y., Naderi S. & Chen T. T., Role of retinoblastoma tumor suppressor protein in DNA damage response. *Acta Oncol.*, 2001, 40, 689-695.
- Williams G. M., Kroes R. & Munro I. C., Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 2000, 31, 117-165.
- Zhang H. & Ruderman J. V., Differential replication capacities of G1 and S-phase extracts from sea urchin eggs. *J. Cell Sci.*, 1993, 104, 565-572.
-