

Effets toxiques d'herbicides à base de glyphosate sur la régulation du cycle cellulaire et le développement précoce en utilisant l'embryon d'oursin

Julie Marc

▶ **To cite this version:**

Julie Marc. Effets toxiques d'herbicides à base de glyphosate sur la régulation du cycle cellulaire et le développement précoce en utilisant l'embryon d'oursin. Toxicologie. Rennes 1, 2004. Français. NNT : . tel-01117570

HAL Id: tel-01117570

https://hal.sorbonne-universite.fr/tel-01117570

Submitted on 17 Feb 2015

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

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

Avertissement

Au vu de la législation sur les droits d'auteur, ce travail de thèse demeure la propriété de son auteur, et toute reproduction de cette oeuvre doit faire l'objet d'une autorisation de l'auteur. (cf Loi n°92-597; 1/07/1992. Journal Officiel, 2/07/1992)

N° Ordre : 3034
de la thèse

THÈSE

présentée

DEVANT L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

pour obtenir

le grade de : ***DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1***

Mention : Biologie

PAR

Julie MARC

Équipe d'accueil : Cycle Cellulaire et Développement, Station Biologique de Roscoff

École Doctorale : Vie-Agronomie-Santé

Composante universitaire : Unité Mer & Santé, Station Biologique de Roscoff
CNRS/UPMC

TITRE DE LA THÈSE :

Effets toxiques d'herbicides à base de glyphosate sur la régulation du cycle cellulaire et le développement précoce en utilisant l'embryon d'oursin

SOUTENUE LE 10 SEPTEMBRE 2004 devant la commission d'Examen

COMPOSITION DU JURY :

Pr Yannick ANDÉOL, rapporteur

Dr André PICARD, rapporteur

Pr Michel PHILIPPE, examinateur

Pr Laurent VERNHET, examinateur

Dr Odile MULNER-LORILLON, directeur de thèse

Remerciements

Je remercie le Conseil Régional de Bretagne et l'Association pour la Recherche sur le Cancer de m'avoir permis d'effectué ce travail. Je remercie les Professeurs André Toulmond et Bernard Kloareg de m'avoir accueillie au sein de la Station Biologique de Roscoff.

Je remercie le Professeur Yannick Andéol et le Docteur André Picard d'avoir accepté de juger mon travail, ainsi que les Professeurs Michel Philippe et Laurent Vernhet d'avoir accepté de faire partie de mon jury de soutenance.

Je remercie ma Directrice de thèse, le Docteur Odile Mulner-Lorillon. Merci pour ton accueil et ton aide pendant ces presque cinq années. Merci pour ta confiance, ton soutien et ta patience quand cela a été nécessaire.

Je remercie également le Professeur Robert Bellé, mon deuxième chef! Merci pour ton aide et ton optimisme concernant ce projet. Merci pour ta confiance, ton soutien et pour tes nombreux compliments.

Je remercie Solenn Garin, Cécile Maguer et Frédéric Le Jan, qui m'ont successivement accompagnée dans ce travail et y ont contribué. Un grand merci pour votre aide.

Merci à Nicole Guyard pour les publications libano-hongroises qu'elle a toujours dénichées. Merci à tout le personnel de la Station pour leur gentillesse et l'ambiance si particulière à laquelle chacun contribue. Et surtout merci à tout le personnel du restaurant et de l'hôtel de France pour leur accueil si souriant et puis pour les frites, la paëlla et le couscous...

Merci aux Docteurs Patrick Cormier et Julia Morales. Merci à vous deux pour votre soutien tout au long de ce travail, merci pour votre aide et vos encouragements quotidiens.

Merci à Sandrine Boulben, ma colocataire de bureau! Merci pour ton aide à chaque fois que j'en ai eu besoin, tes conseils et ton soutien, en espérant que cette rédaction n'aura pas été trop pesante pour toi.

Merci à mes deux compères de thèse, Magali Le Breton et Patrick Salaün. Merci Mag pour ta bonne humeur et ta gentillesse. Merci à Pat, mon compère de café et autres soirées festives de la station, merci pour les plaintes mutuelles, merci pour ton écoute, merci pour les blagues de brestoa même si des fois, je me suis sentie outrée par tes propos. Si tu veux, tu pourras toujours me mettre sur tes prochains papiers par soutien finistérien mais bon, c'est toi qui vois, quoa...

Merci à toutes les personnes de l'équipe CCD, passées et présentes, Anna pour ta bonne humeur et ton soutien, Fred pour ton enthousiasme, tes chansons et parce qu'on a bien rigolé avec toi, Cécile parce que tu fais super bien Céline, et puis aussi Aurélie, Jérôme et Yann.

Merci à Stéphane, Gaëtan, Franck, Marie, Fabrice, Marie et Vincent parce que je me suis bien marrée quand même au cours de nos quelques mémorables pauses et autres soirées.

Merci à toute ma famille pour leurs encouragements. Merci à Anne-Marie, Jean, Nolwenn, Erwan et ma grand-mère pour leur soutien.

Merci à mes deux plus grands supporters, mes deux grands frères, Jean-Christophe et Stéphane, ainsi qu'à Béa et Mélanie. Merci pour votre soutien depuis ... la maternelle. Après 25 ans passés à l'école, votre petite sœur va enfin devenir grande et peut-être même que je travaillerai avant que vous ne soyez à la retraite!

Merci à Georges pour ses encouragements quotidiens tout au long de cette thèse, pour son soutien à chaque instant.

Merci à mes amies de quinze ans, à la Fafa, la Véro, la Momo, la Gué, la Caro....merci pour votre soutien et votre amitié pendant toutes ces looooongues années d'étude, qu'elle est loin la 6ème...alors merci de m'avoir patiemment écoutée quand je disais que j'allais tout rater ou que j'avais tout rater et que c'était la fin du monde!!! Et puis merci pour la décompression des week-end passés et à venir, essentielle pour y arriver.

Enfin, un merci tout particulier à Chantal, Jacky et mes trois super-cousines, de la plus petite à la plus grande, Christelle, Pauline et Emilie (si on peut plus rigoler!) pour votre soutien sans faille. Merci pour les "Allez Julie!", les confitures à la mûre, les peintures sur les commodes, les dents de sagesse...et tout le reste. J'espère que vous trouverez dans ces quelques pages toute ma reconnaissance (je vous autorise à ne regarder que les images...).

Sommaire général

Sommaire général 1
Sommaire des tableaux et figures 5
Liste des abréviations 7
Liste des publications 8
Avant-propos 9

INTRODUCTION 10

I - L'utilisation et la toxicologie du glyphosate 10
A- Introduction 10
B- L'origine et la variété des pesticides 13
1- La définition des pesticides 13
2- L'historique de l'utilisation des pesticides 13
3- L'origine et la distribution des pesticides présents dans l'environnement 17
4- La réglementation de l'usage des pesticides 19
B- Le glyphosate et ses formulations : ses propriétés et son utilisation 29
1- La découverte du glyphosate et de son mode d'action dans la plante 29
2- L'utilisation du glyphosate 31
3- Les spécialités commerciales à base de glyphosate 32
4- Les adjuvants présents dans le Roundup 33
5- Les contaminations par le glyphosate 34
C- Le glyphosate et ses formulations : leur toxicité 35
1- Les effets toxicologiques 35
2- Le comportement dans l'environnement et les effets écotoxicologiques 43
3- Le classement toxicologique du glyphosate 44

II- Le cycle cellulaire : sa régulation et sa dérégulation 46
A- Le cycle cellulaire et les kinases dépendantes des cyclines 46
1- Le cycle cellulaire 46
2- Les kinases dépendantes des cyclines 48
3- Les différentes CDKs au cours du cycle cellulaire 51

B- La régulation des CDKs au cours du cycle cellulaire 54
1- La régulation par l'association avec la cycline 54
2- La régulation par la phosphorylation activatrice 56
3- La régulation par les phosphorylations inhibitrices 57
4- La régulation par l'association avec des protéines inhibitrices 65
C- Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire 67
1- La présentation des mécanismes de surveillance appelés checkpoints 67
2- Les checkpoints de l'ADN 69
3- Le checkpoint du fuseau mitotique 75
4- Les activateurs de checkpoints 77
5- Le cycle cellulaire dérégulé 78

III- Le modèle d'étude : le développement précoce de l'oursin 82
A- Un modèle reconnu pour l'étude du cycle cellulaire et du développement 82
B- De la fécondation à la fusion des pronuclei 83
1- Les atouts du modèle biologique 83
2- La biochimie de la fécondation 85
C- La phase S de la première division mitotique 86
D- La phase M de la première division mitotique 87
E- Les divisions rapides : du stade 2 cellules à la Morula 90
F- Le retour à des divisions plus lentes 91
G- Les points de contrôle 92

RÉSULTATS **95**

I- La mise en évidence de dysfonctionnements du cycle cellulaire et du développement précoce induits par des polluants en utilisant l'embryon d'oursin 96
A- Le dysfonctionnement du cycle cellulaire induit par le Roundup 96
B- Les dysfonctionnements induits par les métaux lourds 97
C- Le dysfonctionnement de la transcription induit par le Roundup 99

D- Les publications 1, 2 et 3 101

. Article 1 : 102

Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. & Bellé, R. (2002a). Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. *Chem Res Toxicol* **15,** 326-331.

. Article 2 : 103

Marc, J., Maguer, C., Bellé, R. & Mulner-Lorillon, O. (2002b). Sharp dose- and time-dependent toxicity of mercuric chloride at the cellular level in sea urchin embryos. *Arch Toxicol* **76,** 388-391.

. Article 3 : 104

Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Bellé, R. & Mulner-Lorillon, O. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription (sous presse, *Toxicol Appl Pharmacol*).

II- L'analyse moléculaire des effets du Roundup sur le cycle cellulaire 105

A-L'agent responsable des dysfonctionnements du cycle cellulaire induits par le Roundup 105

B- La cible terminale du Roundup : l'activation du complexe CDK1/cycline B 106

C- L'activation du "checkpoint" G2/M par le Roundup 110

D- Les publications 4, 5 et 6 113

. Article 4 : 114

Marc, J., Mulner-Lorillon, O. & Bellé, R (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol. Cell* **96,** 245-249.

. Article 5 : 115

Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Durand, G. & Bellé, R. (2003). Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environ. Chem. Lett.* **1,** 8-12.

. Article 6 : 116

Marc, J., Bellé, 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 (sous presse, *Toxicol Sci*).

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES **117**

I- L'embryon d'oursin permet l'étude des effets des polluants sur le cycle cellulaire et le développement précoce 117
II- La cible moléculaire du Roundup : l'ADN 118
III- La dangerosité du Roundup pour la santé humaine 121
A- La dangerosité des effets du Roundup 121
B- Les doses responsables de la toxicité 122
IV- Des études qui permettent la connaissance du risque 123
V- Le Roundup déclenche le mécanisme de surveillance 125

BIBLIOGRAPHIE **127**

Sommaire des tableaux et figures

Tableaux

1 : Les principales familles de pesticides. 15
2 : L'étude toxicologique du glyphosate. 43

Figures

1: La structure chimique de la forme acide du glyphosate. 29
2 : La structure chimique du sel d'isopropylamine de glyphosate. 32
3 : Les différentes phases du cycle cellulaire. 47
4 : La morphologie des chromosomes au cours du cycle cellulaire. 48
5 : La réaction catalysée par les CDKs. 49
6 : La structure schématique des CDKs. 49
7 : Les CDKs et leurs partenaires cyclines au cours du cycle cellulaire. 51
8 : Le cycle de synthèse et de dégradation de la cycline au cours du cycle cellulaire. 55
9 : Les premières étapes de l'activation des CDKs (l'association à la cycline et la phosphorylation activatrice). 56
10 : L'activation des CDKs (la liaison à la cycline, la phosphorylation activatrice et les déphosphorylations activatrices). 58
11 : La régulation des kinases Myt1 et Wee1. 60
12 : La régulation des phosphatases cdc25. 63
13 : La boucle d'auto-amplification du complexe CDK1/cycline B en phase M. 65
14 : La régulation des complexes CDK/cycline par l'association aux protéines inhibitrices. 66
15 : Les checkpoints de l'ADN. 70
16 : Les effecteurs du checkpoint G1/S. 71
17 : Les effecteurs du checkpoint G2/M. 74
18 : Le checkpoint du fuseau mitotique. 76
19 : L'oursin *Sphaerechinus granularis*. 83
20 : La fécondation chez l'oursin. 85
21 : Les étapes du développement embryonnaire précoce de l'oursin. 89
22 : L'effet du Roundup sur la morphologie de la chromatine pendant 97

le développement précoce.
23 : L'effet du chlorure de mercure sur la cinétique de développement précoce. 98
24 : Les effets du Roundup sur les cinétiques d'éclosion et de transcription. 100
25 : L'effet dose-dépendant des formulations à base de glyphosate, Amega, Cargly, Cosmic, Roundup 3plus et Roundup Biovert, sur le premier cycle cellulaire du développement précoce d'oursin. 106
26 : L'effet du Roundup et du glyphosate sur l'activité kinasique du complexe CDK1/cycline B. 107
27 : L'effet du Roundup sur la cinétique d'activation du complexe CDK1/cycline B pendant le développement précoce. 108
28 : L'effet du Roundup sur la cinétique d'accumulation de la cycline B au cours du développement précoce. 109
29 : L'effet du Roundup sur l'association entre CDK1 et son partenaire cycline B. 109
30 : Les effets du Roundup sur le profil d'accumulation de la cycline B et l'état de phosphorylation de CDK1 au cours des premiers cycles cellulaires du développement précoce de l'oursin. 110
31 : L'effet du Roundup sur la phosphorylation activatrice sur Thr-161 de CDK1 au cours du développement précoce de l'oursin. 111
32 : L'effet du Roundup sur la cinétique de synthèse d'ADN *in vivo*. 113
33: Le déclenchement du checkpoint par le Roundup. 119

Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique

AMPA : aminomethyl phosphonic acid

APC : anaphase-promoting complex

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messagers

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATP : adenosine triphosphate

ATR : ATM and Rad3-related

CAK : CDK activating kinase

cdc : Cell Division Control

CDK : cyclin-dependent kinase

Chk : Checkpoint

CKI : Cyclin-dependent kinases Inhibitor

CL50 : Concentration létale pour 50 % des individus

DJA: Dose journalière acceptable

DL50 : Dose létale pour 50 % des individus

DRfA : Dose de référence aiguë

DSE : Dose maximale sans effet observé

DTT : dichlorodiphenyltrichloroethane

EPSPS : 5-énolpyruvylshikimate-3-3phosphonate synthase

INK4 : Inhibiteurs de CDK4

MPF : M-phase Promoting Factor

NEAO : Niveau d'exposition acceptable pour l'opérateur

NEBD : Nuclear Envelope Breakdown

PP1 : protéine phosphatase 1

PP2A: protéine phosphatase 2A

PP2C : protéine phosphatase 2C

POEA : Polyethoxylated tallow amine

VEB : Very Early Blastula

Liste des publications

. Article 1 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. & Bellé, R. (2002a). Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. *Chem Res Toxicol* **15,** 326-331.

. Article 2 : Marc, J., Maguer, C., Bellé, R. & Mulner-Lorillon, O. (2002b). Sharp dose- and time-dependent toxicity of mercuric chloride at the cellular level in sea urchin embryos. *Arch Toxicol* **76,** 388-391.

. Article 3 : Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Bellé, R. & Mulner-Lorillon, O. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription (sous presse, *Toxicol Appl Pharmacol*).

. Article 4 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O. & Bellé, R (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol Cell* **96,** 245-249.

. Article 5 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Durand, G. & Bellé, R. (2003). Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environ Chem Lett* **1**, 8-12.

. Article 6 : Marc, J., Bellé, 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 (sous presse, *Toxicol Sci*).

Avant-propos

Mon travail de thèse porte sur les dysfonctionnements du développement précoce (principalement de la division cellulaire), liés à l'exposition au glyphosate, herbicide commercialisé notamment sous l'appellation Roundup. Nous avons mis en évidence que ce pesticide d'usage courant et homologué par les instances réglementaires provoque des dysfonctionnements du cycle cellulaire et du développement précoce. Puis, nous avons recherché les cibles moléculaires atteintes lors de ces dysfonctionnements.

L'introduction présente, dans une première partie, les connaissances sur le glyphosate, à la fois sur son utilisation et sur l'implication de cette utilisation en matière d'environnement et de santé humaine. Dans une seconde partie, nous nous intéressons aux mécanismes qui assurent une régulation fine des étapes du cycle cellulaire afin de présenter les cibles moléculaires susceptibles d'être atteintes par le pesticide. Nous présentons comment les dérégulations des mécanismes contrôlant le cycle cellulaire peuvent aboutir à un cancer. La dernière partie de l'introduction concerne le modèle que nous avons choisi d'utiliser pour étudier les dysfonctionnements de la division cellulaire et du développement, le développement précoce de l'oursin.

Les résultats que nous avons obtenus sont présentés sous forme d'articles. Dans une première partie, nous montrons que le modèle permet de mettre en évidence des dysfonctionnements sur le premier cycle cellulaire et le développement précoce, en relation avec l'exposition à deux types de polluants. La seconde partie des résultats est consacrée à l'identification des cibles moléculaires du Roundup, l'herbicide qui est au centre de mon travail de thèse.

Dans la dernière partie de ce manuscrit, nous émettrons les conclusions du travail effectué et exposerons les perspectives que nous envisageons.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

I - L'utilisation et la toxicologie du glyphosate

A- Introduction

La pollution est l'introduction, directe ou indirecte, de substances, chaleur ou bruit, dans l'environnement, susceptibles de contribuer ou de causer un danger pour la santé de l'Homme ou des détériorations des ressources biologiques et des écosystèmes naturels (revue par Meyer, 2003). Un polluant est défini comme une substance chimique responsable d'une pollution; il est qualifié de primaire lorsqu'il est directement rejeté dans le milieu naturel et de secondaire lorsqu'il provient de réactions avec ou entre des polluants primaires. Par exemple, les oxydes d'azote issus de la combustion des moteurs sont des polluants primaires alors que l'ozone est un polluant secondaire puisqu'elle résulte d'une réaction chimique entre plusieurs polluants primaires.

Des familles de polluants se distinguent en fonction de l'élément contaminé. Les principaux polluants de l'air sont le dioxyde de soufre, les oxydes d'azote, l'acide chlorhydrique, les composés organiques volatils, les poussières, le monoxyde de carbone, l'ozone, les métaux lourds, les dioxines et furanes. Concernant la pollution de l'eau, plusieurs types de polluants peuvent être distingués : les matières organiques fermentescibles responsables d'un appauvrissement en oxygène (par exemple les graisses), les éléments minéraux nutritifs provenant essentiellement de l'agriculture (nitrates et phosphates), les hydrocarbures, les métaux lourds (mercure, cuivre, cadmium...), les composés organiques de synthèse ou produits phytosanitaires. Parmi ces polluants, nous nous sommes intéressés aux deux dernières familles citées et principalement aux produits phytosanitaires.

Les pollutions peuvent être de natures diverses, accidentelles lorsqu'elles proviennent d'un déversement ponctuel, ou chroniques lorsqu'elles proviennent d'un déversement diffus. Les contaminations peuvent engendrer une toxicité aiguë, subaiguë ou chronique. La toxicité aiguë cause la mort ou des désordres physiologiques importants immédiatement ou peu de temps après une forte exposition au pesticide alors que la toxicité subaiguë concerne les effets dus à des doses plus faibles, se produisant à court terme, sur des organes cibles, parfois réversibles. La toxicité chronique se développe, quant à elle, sur une longue période de temps, persistant plusieurs années après l'exposition initiale. L'effet peut être relié à une exposition à long terme ou répétée d'un pesticide à faible dose, ou à une exposition à dose élevée pendant un court laps de temps (revue par Alavanja *et al.,* 2004).

L'évaluation fiable des risques induits par les polluants tant sur la santé humaine que sur l'environnement est un challenge important (revues par Maroni *et al.*, 2000; Eason & O'Halloran, 2002). Les effets néfastes sur les écosystèmes qui nous entourent auront inévitablement, à long terme, des répercussions en santé humaine. Aucun pesticide introduit dans l'environnement ne peut être, *a priori,* considéré comme inoffensif et aucun individu ne peut se soustraire à une exposition aux pesticides; leur utilisation intensive ne fait qu'accroître le risque de dangerosité (revue par Barr & Needham, 2002). De la même manière, l'utilisation anthropique des métaux lourds a largement augmenté ces dernières années, ce qui engendre leur accumulation dans l'environnement. De plus, leur stabilité chimique induit leur persistance dans l'environnement et donc inévitablement l'exposition de l'Homme, ce qui représente un risque croissant pour la santé (revue par Waalkes *et al.,* 2000).

Les répercussions connues de l'utilisation des pesticides sont nombreuses (revue par Weiss *et al.,* 2004); elles concernent le cancer (revue par Alavanja *et al.,* 2004), la perturbation du développement du fœtus et de l'enfant (revue par Sever *et al.,* 1997), le

dérèglement des systèmes reproducteur, endocrinien, immunitaire et nerveux (revues par Colosio *et al.,* 2003; Alavanja *et al.,* 2004).

Les métaux lourds, et notamment le plomb, le mercure et le cadmium, peuvent eux aussi générer une grande variété d'effets néfastes au niveau de la cellule, du tissu ou de l'organe : carcinogénicité (revues par Costa, 1998; Rojas *et al.,* 1999), tératogénicité (Bellés *et al.,* 2002) ou encore neurotoxicité (revue par Waalkes *et al.*, 2000).

Le risque de l'exposition aux polluants est très probablement aggravé, d'une part, par la multiplicité des substances présentes dans l'environnement, et d'autre part, par le caractère chronique de cette exposition (revue par Jaga & Dharmani, 2003). Il est beaucoup plus difficile d'estimer les risques d'expositions chroniques à de faibles doses de polluants (Barr *et al.,* 1999; revue par Rojas *et al.*, 1999) que les risques aigus à court terme de fortes expositions à des polluants (Larrain *et al.,* 1999). D'autre part, les pesticides, une fois dans l'environnement, peuvent être métabolisés en composés parfois plus toxiques que le pesticide lui-même. C'est un aspect dont il faut absolument tenir compte dans l'évaluation des risques liés à l'exposition aux substances phytopharmaceutiques.

Il est donc essentiel de connaître et d'estimer le risque de l'exposition aux pesticides, à leurs métabolites, aux autres types de polluants comme les métaux lourds, et tout ceci à la fois concernant les substances isolées et en combinaison. Cette connaissance implique la caractérisation des mécanismes par lesquels les effets nocifs s'exercent. Notre travail a principalement porté sur les effets d'un pesticide et d'un métal lourd et sur la caractérisation des mécanismes impliqués dans ces effets.

B- L'origine et la variété des pesticides

1- La définition des pesticides

Les pesticides, qui signifient étymologiquement "tueurs de fléaux", sont des produits obtenus le plus souvent par synthèse chimique et dont les propriétés toxiques permettent de lutter contre les organismes nuisibles (revue par Connell, 1997). Les pesticides utilisés principalement pour la protection des végétaux, appelés produits phyto-pharmaceutiques ou plus communément produits phytosanitaires, se distinguent des autres pesticides appelés biocides. Par exemple, un insecticide sera un produit phytosanitaire s'il est utilisé sur du blé mais un biocide dès lors qu'il est utilisé sur du bois de charpentes. En revanche, sous l'angle des résidus retrouvés dans les eaux, le terme "pesticides" inclut tous les produits permettant de lutter contre les organismes nuisibles, qu'ils soient utilisés en agriculture ou non (revue par Maroni *et al.*, 2000). Les produits phytosanitaires regroupent des composés organiques et inorganiques à action plus ou moins spécifique et sont divisés en trois catégories principales (revue par Weiss *et al.,* 2004) :

- les fongicides dont le but est d'éviter le développement de champignons
- les insecticides dont le but est de lutter contre le parasitage d'insectes
- les herbicides dont le but est d'éliminer une concurrence herbacée.

2- L'historique de l'utilisation des pesticides

L'emploi des pesticides en agriculture remonte à l'Antiquité. Jusqu'à la première moitié du vingtième siècle, ils regroupent des substances d'origine naturelle : des dérivés minéraux, par exemple le cuivre qui entre dans la composition de la bouillie bordelaise, et des végétaux,

par exemple les produits dérivés du pyrèthre (revue par Connell, 1997). Dès la seconde guerre mondiale, les pesticides organiques de synthèse voient leur utilisation s'accroître. Débute alors l'ère des organochlorés avec le DTT (dichlorodiphenyltrichloroethane), un insecticide parmi les premiers utilisés (revue par Connell, 1997). La France, comme les Etats-Unis, connaît alors une expansion phénoménale du nombre de produits phytosanitaires mis sur le marché (revue par Connell, 1997) et les quantités utilisées ont par exemple été multipliées par dix aux Etats-Unis entre 1945 et 1975.

Les pesticides sont commercialisés sous la forme d'un mélange entre principe actif et produits de formulation (revue par Connell, 1997). Les matières actives de pesticides sont souvent associées au sein d'une même spécialité commerciale. Les adjuvants qui peuvent entrer dans la composition des produits phytosanitaires sont très nombreux : solvants, dispersants, émulgateurs, tensio-actifs ou surfactants, stabilisateurs, anti-mousse (revue par Connell, 1997). Ces adjuvants ont pour but d'améliorer les propriétés physico-chimiques et/ou l'efficacité biologique des matières actives (De Ruiter, 2002). Ils sont en principe dépourvus de toute activité pesticide propre (De Ruiter, 2002).

Plus de 20000 spécialités commerciales de pesticides et presque 900 matières actives sont homologuées de part le monde (revue par Weiss *et al.,* 2004). En France, à ce jour, près de 550 matières actives et environ 2700 spécialités commerciales sont homologuées et commercialisées. En France, les herbicides représentent environ 40 % des ventes totales de pesticides, les fongicides environ 30 % et les insecticides environ 20 %, le restant étant partagé par les autres familles de pesticides (algicides, rodonticides...) (Tron *et al.,* 2001). Les principales familles de pesticides sont présentées dans le tableau 1.

Famille de pesticides	Date de la première utilisation	Exemples	Utilisation
Organochlorés	1942	DDT Lindane	Insecticides Fongicides
Organophosphorés	Début années 1940	Parathion Malathion	Insecticides
Carbamates	Vers 1955	Aldicarbe Carbaryl	Fongicides Insecticides
Phénoxy	1946	2,4-D 2,4,5-T	Herbicides
Pyréthroïdes	1980	Fenpropanthrine Cyperméthrine	Insecticides

Tableau 1 : Les principales familles de pesticides (d'après Connell, 1997).
(DTT : dichlorodiphenyltrichloroethane - 2,4-D : 2,4 dichlorophenol - 2,4,5-T : 2,4,5 trichlorophenol).

Outre les principaux groupes chimiques cités dans ce tableau, de nombreuses autres familles sont disponibles sur le marché comme par exemple les aldéhydes, les amides, les pyridil, les triazines, les amino-phosphates ou les isoxazoles (revue par Connell, 1997).

Les pesticides sont *a priori* dangereux de part leur vocation même : ce sont des molécules synthétisées pour altérer des mécanismes indispensables au développement ou à la survie des organismes vivants. Bien qu'utilisés contre des organismes cibles particuliers, ils sont susceptibles d'exercer une activité toxique vis-à-vis d'autres organismes dits non-cibles (revues par Maroni *et al.,* 2000; Eason & O'Halloran, 2002). Les préoccupations concernant les effets des pesticides ne sont apparues que récemment, avec l'augmentation du nombre de molécules synthétisées et l'extension de leur action à de très nombreux organismes (revues par Maroni *et al.*, 2000; Weiss *et al.*, 2004). Faisant suite à l'utilisation massive de composés rémanents et ayant une action plus étendue que présumée initialement, la synthèse des molécules a été orientée vers des composés moins rémanents et moins bioaccumulables : les organophosphorés et les insecticides carbamates ont par exemple remplacé les organochlorés comme le DTT (revue par Connell, 1997). L'utilisation de composés plus efficaces, c'est-à-dire plus toxiques vis-à-vis d'espèces ciblées, contribue également à diminuer les quantités

utilisées. En contrepartie, les substances utilisées sont plus solubles dans l'eau, et de ce fait plus mobiles dans l'environnement. Actuellement, la réduction de l'utilisation des pesticides devient une préoccupation majeure aux Etats-Unis, au Canada et en Europe (Tron *et al.,* 2001). En Europe, une réduction de 25 % des quantités d'herbicides utilisées sur les cultures de céréales n'entraînerait pas de diminution des rendements. De la même manière, aux Etats-Unis, une réduction de 35 à 50 % des quantités de pesticides utilisées serait envisageable sans réduire la production des cultures. La France, avec près de 100 000 tonnes, est le troisième pays utilisateur de produits phytosanitaires au monde après les Etats-Unis et le Japon, et le premier en Europe. En France, les pesticides sont utilisés principalement (à 90 %) en agriculture. La part restante est utilisée dans d'autres secteurs économiques, par exemple pour le désherbage des zones urbaines (voies ferrées, routes, golfs) ou le traitement industriel de protection des bois.

Le problème relatif aux pesticides vient aussi du fait que le nombre de molécules utilisées est très important, soulevant un nouveau problème, celui des potentiels effets synergiques entre les pesticides (revue par Maroni *et al.,* 2000).

Ces dernières années, les plantes transgéniques ont fait leur apparition avec pour objectif l'obtention de nouvelles variétés plus performantes, la résistance à certaines maladies et un travail facilité pour les agriculteurs (revue par Malarkey, 2003). La prolifération de plantes transgéniques tolérantes aux herbicides entraînera une utilisation exponentielle de ces produits et risque d'aggraver la situation. L'introduction d'un nouveau gène dans le patrimoine d'une plante peut lui conférer par exemple une résistance aux herbicides. Cette pratique est surtout intéressante dans le cas d'herbicides totaux puisqu'ils affectent tout sur leur chemin comme par exemple le Roundup. L'agriculteur peut alors traiter son champ entier au Roundup sans affecter la plante cultivée. La plante classique possède des moyens pour métaboliser les pesticides. Dans le cas des plantes génétiquement modifiées, la cible de

l'herbicide est modifiée et ne peut donc pas être affectée par ce dernier. En contre-partie, la plante ne possède aucun moyen de métaboliser l'herbicide; celui-ci s'accumule dans les récoltes et se retrouve inévitablement dans la chaîne alimentaire (revue par Blackburn & Boutin, 2003).

3- L'origine et la distribution des pesticides présents dans l'environnement

Les apports de pesticides dans l'environnement sont, en dehors d'accidents ponctuels, de nature diffuse et chronique (Barr *et al.,* 1999). Issus pour l'essentiel de traitements agricoles, les apports résultent d'épandages multiples au cours de l'année (Maroni *et al.,* 1999). Environ 2,5 millions de tonnes de pesticides sont appliqués chaque année sur les cultures de la planète (revue par Weiss *et al.,* 2004). La part qui entre en contact avec les organismes cibles, ou qu'ils ingèrent, est minime. Elle est évaluée à 0,3 % ce qui veut dire que 99,7 % des substances déversées s'en vont "ailleurs", dans l'environnement, dans le sol et les eaux (Tron *et al.,* 2001).

La contamination peut s'effectuer à tous les niveaux, de l'air à l'eau en passant par les aliments (revue par Connell, 1997). Les apports de pesticides peuvent présenter des risques de toxicité pour des organismes vivants qui n'étaient pas visés par le traitement phytosanitaire (revue par Maroni *et al.,* 2000). L'homme encourt des risques, par exemple, s'il boit une eau contaminée ou encore s'il inhale des gouttelettes présentes dans l'air. Les poissons et le milieu aquatique dans son ensemble sont quant à eux en contact direct avec les pesticides (Maroni *et al.,* 1999). Les données concernant la qualité des eaux souterraines font état en France d'une contamination par les pesticides considérée suspecte dans 35 % des points de mesure et certaine dans 13 % des cas (Tron *et al.,* 2001). Concernant la qualité des eaux courantes, il apparaît globalement une contamination généralisée par les pesticides, y compris dans les

zones de dilution importante. Les eaux marines font elles-aussi état d'une contamination généralisée et pérenne par les herbicides. Par ailleurs, les non-conformités des eaux de distribution dues aux pesticides représentent 25 % des cas. L'ingestion de fruits et légumes contribue également aux apports en pesticides pour les humains (revue par Tadeo *et al.,* 2000). Les chiffres à ce sujet sont inquiétants puisque 8,3 % des échantillons d'aliments végétaux d'origine française analysés contiennent des résidus de pesticides supérieurs aux limites maximales et que 49,5 % en contiennent (Tron *et al.,* 2001).

La réglementation des eaux traitées destinées à la consommation humaine détermine les limites de qualité à respecter. Pour les pesticides et les produits apparentés, elle est fixée à 0,1µg/l pour la majorité des pesticides pris individuellement et 0,5 µg/l pour le total des substances mesurées (Babut *et al.,* 2003). Par ailleurs, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a fixé des seuils de recommandation par substance individualisée (Tron *et al.,* 2001).

Les contaminations des eaux distribuées ont une répartition géographique hétérogène au sein de l'hexagone; la Bretagne, territoire où l'agriculture occupe une place importante, fait partie des régions les plus touchées. La prise en considération des répercussions de l'utilisation des pesticides y a donc pris un intérêt considérable. À partir de 1990, la présence de pesticides est recherchée de façon régulière dans les eaux bretonnes sous l'égide de la Cellule d'Orientation pour la Protection des Eaux contre les Pesticides (CORPEP). Depuis cette date, la présence simultanée de plusieurs pesticides dans un même prélèvement des eaux destinées à l'alimentation humaine est régulièrement relevée : dans 75 % des cas, la norme réglementaire pour le cumul des substances est dépassée et plus de dix substances sont parfois décelées dans le même échantillon avec des concentrations respectives dépassant le 0,1 µg/l réglementaire (Tron *et al.,* 2001). Cette pollution a pour origine des usages agricoles mais également l'utilisation de pesticides sur les zones non cultivées.

Le nombre d'intoxications accidentelles par les pesticides est estimé à plus d'un million par an dans le monde et à 20 000 celui des cas mortels (revue par Eddleston & Phillips, 2004). En y ajoutant les cas de suicide, le chiffre de 3 millions d'empoisonnements est atteint, dont 220 000 morts.

4- La réglementation de l'usage des pesticides

a- La réglementation

Les pesticides font l'objet d'une réglementation aux niveaux français et européen (Maroni *et al.,* 1999). La commercialisation et l'utilisation des produits phytosanitaires répondent à une législation stricte qui, dans des conditions d'emploi précises, en garantit l'efficacité, l'innocuité et la conformité par rapport à l'échantillon proposé. Les tests entrepris dans le cadre des réglementations internationale et française permettent dans un premier temps d'évaluer le niveau de risque c'est-à-dire la probabilité qu'un évènement néfaste pour la santé ne survienne. Dans un second temps, ils permettent de décider si ce risque est acceptable ou non en regard aux bénéfices apportés (Maroni *et al.,* 1999). Le système français d'homologation des produits prévoit que toute nouvelle spécialité phytosanitaire doit faire l'objet d'homologation avant sa mise sur le marché. La vente n'est autorisée qu'après avis favorable du ministre de l'Agriculture. Cet avis peut revêtir deux formes :

- une autorisation provisoire de vente délivrée aux préparations nécessitant des compléments d'étude mais dont la toxicité reste dans les limites connues. Cette autorisation est accordée pour quatre ans et à l'expiration de ce délai, la spécialité est soit homologuée soit retirée de la vente

- l'homologation décernée à toute spécialité dont l'efficacité et l'innocuité ont été reconnues conformément aux règles définies par la "Commission des produits antiparasitaires à usage

agricole et des produits assimilés" ainsi que par la "Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole ou assimilés".

Cette homologation correspond pour les sociétés à une autorisation de vente du produit et est attribuée pour une durée de dix ans. Passé ce délai, la société détentrice de la marque doit effectuer une demande de renouvellement qui est examinée par le "Comité d'homologation".

Toutes les autorisations de mises sur le marché, provisoires ou non, ne sont délivrées par le ministre de l'Agriculture qu'aux produits dont l'innocuité et l'efficacité ont été reconnues aux vues d'un dossier technique complet montrant les propriétés anti-parasitaires du produit, d'un dossier sur la toxicité éventuelle sur l'Homme, les animaux et l'environnement et de l'examen des essais en laboratoire sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques de la spécialité. La "Commission d'étude de la toxicité" étudie le dossier toxicologique et rend compte de ses conclusions au ministre de l'Agriculture.

Au niveau européen, le "Comité phytosanitaire permanent" décide de l'inscription sur une liste évolutive des substances actives autorisées. La Commission classe les substances du point de vue de la toxicité, avec obligation d'étiquetage. En outre, le règlement de la "Commission Européenne" prévoit la réévaluation de toutes les substances actives existantes. Depuis 1992, un programme vise à améliorer l'efficacité de la réglementation applicable aux pesticides et biocides au niveau européen. Ce programme est dirigé par le Sous-groupe sur les pesticides (SGP) essentiellement composé de fonctionnaires des pays de l'Organisation de coopération et de développement économiques (OCDE). Le SGP compte également des représentants de la Commission européenne et d'autres organisations internationales, de l'industrie des pesticides et des milieux de défense de l'environnement et des intérêts publics. Ce programme aide les pouvoirs publics à unir leurs efforts pour évaluer plus rapidement, et de manière plus approfondie, les risques liés à différents produits, ce qui leur permet

d'approuver des produits plus sûrs et de supprimer du marché ceux qui présentent de plus grands risques. Le programme contribue à la réglementation des pesticides et des biocides en harmonisant les essais et l'évaluation des risques pour la santé et l'environnement.

b- Le dossier toxicologique

Le dossier toxicologique statue les effets sur l'homme en évaluant de nombreux critères que nous allons successivement évoquer. Les résultats permettent d'établir une classification; elle vise à identifier toutes les propriétés physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques des substances et des préparations qui peuvent constituer un risque lors de leur manipulation ou de leur utilisation normale. Le classement toxicologique et l'étiquetage sont attribués en France soit par la "Commission d'étude de la toxicité des produits antiparasitaires à usage agricole", soit par la "Commission Européenne". Quatre classifications sont utilisées :

(1) La classification sur la base de propriétés physico-chimiques (par exemple, le produit est-il inflammable)

(2) La classification suivant les propriétés toxicologiques concernant à la fois les effets à court et long terme découlant d'une exposition ou d'expositions répétées ou prolongées. L'échelle de toxicité est la suivante : corrosif, irritant, nocif, toxique et très toxique.

(3) La classification sur la base des effets spécifiques sur la santé qui indique le pouvoir cancérogène, mutagène et toxique pour la reproduction des substances. Il existe alors trois catégories suivant le niveau de risque. La première catégorie désigne les substances que l'on sait être cancérogènes, mutagènes pour l'Homme ou connues pour altérer la fertilité dans l'espèce humaine ou causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine. La deuxième catégorie désigne les substances devant être assimilées à des substances cancérogènes, mutagènes pour l'Homme ou à des substances pouvant altérer la fertilité dans

l'espèce humaine ou causant des effets toxiques sur le développement dans l'espèce humaine. La troisième catégorie concerne les substances préoccupantes pour l'Homme en raison d'effets cancérogènes, mutagènes possibles, mais pour lesquelles l'information disponible ne permet pas une évaluation satisfaisante.

(4) La classification sur la base des effets sur l'environnement ne concerne pour le moment que les substances et non les préparations commerciales. Elle vise à avertir l'utilisateur des risques que certaines substances présentent des risques pour les écosystèmes aquatiques.

Au niveau européen, la "Commission Européenne" définit également un classement hiérarchisé des substances concernant le risque cancérogène, mutagène et d'altération de la reproduction.

Nous allons voir plus précisément le contenu du dossier toxicologique recommandé par les normes sur les substances actives phytopharmaceutiques.

L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination

La nature et l'intensité des effets toxiques d'une substance active sur un organisme dépendent de sa concentration dans les organes cibles. Cette concentration est liée à la dose administrée et au sort de la substance dans l'organisme c'est-à-dire à son absorption, sa distribution, son métabolisme et son élimination (revue par Mückter, 2003). Ces critères sont évalués chez le rat. L'absorption est évaluée au niveau oral et dermal.

L'absorption orale correspond au processus par lequel une substance passe dans l'organisme après administration orale. Un taux d'absorption orale est déterminé pour chaque substance dans un intervalle de temps déterminé (revue par Connell, 1997).

L'absorption dermale est le processus par lequel une substance passe dans l'organisme à partir de la zone de pénétration (peau) vers les organes et les tissus. Elle représente la voie majeure de contamination du manipulateur agricole. L'absorption dermale d'une substance est évaluée en fonction des propriétés physico-chimiques de la substance et par des expérimentations à la fois *in vivo* sur un singe ou le rat et *in vitro* sur des cellules épidermiques humaines ou de rat. Un pourcentage d'absorption dermale est calculé, il s'agit du rapport de la dose absorbée et de la dose appliquée (revue par Connell, 1997).

Après absorption, les substances sont distribuées dans tout l'organisme par le sang y compris dans les organes d'excrétion où elles sont alors éliminées. La distribution de la substance dans les différentes zones de l'organisme peut être uniforme ou au contraire localisée dans certains tissus (revue par Connell, 1997).

Le métabolisme animal est le processus généralement enzymatique par lequel une substance étrangère se transforme en dérivés plus solubles dans l'eau, plus facilement éliminables et généralement moins toxiques. Le foie qui est l'organe le plus riche en enzymes et le plus vascularisé est le site principal de métabolisation (revue par Connell, 1997).

Les voies principales d'élimination des substances actives et de leurs métabolites sont les voies urinaires et fécales. Plus l'élimination est rapide, moins la substance et ses métabolites se concentrent et moins ils ont le temps d'exercer une action toxique. Le taux d'élimination en fonction d'un intervalle de temps donné et la part relative prise par l'excrétion urinaire ou fécale sont précisés (revue par Connell, 1997).

La toxicité aiguë ou létale

La toxicité aiguë ou létale vise la prévention des accidents lors de la mise en oeuvre des produits par ingestion (voie orale), contact (voie dermale) et inhalation. La toxicité aiguë d'une substance active est estimée par la dose (ou la concentration) en substance active qui

provoque la mort chez la moitié d'un lot d'animaux de laboratoire soumis au test après une administration unique de la substance active (revue par Eason & O'Halloran, 2002). La toxicité aiguë par inhalation est évaluée après 4 heures d'exposition dans l'air inhalé. Cette dose ou concentration calculée statistiquement est appelée DL50 ou CL50 (Dose ou concentration provoquant 50 % de létalité). La DL50 est évaluée la plupart du temps chez le rat et est exprimée en milligrammes de substance active par kilogramme de poids corporel de l'animal testé ou en milligrammes de substance active par litre d'air.

La toxicité par irritation

Trois critères sont évalués : l'irritation oculaire, l'irritation cutanée et la sensibilisation cutanée. Les effets irritants de la substance sont évalués chez le lapin et se manifestent au niveau cutané par un érythème et ou un œdème et au niveau oculaire par une inflammation de la conjonctive, opacité cornéenne, etc… Le pouvoir irritant de la substance est documenté par une appréciation choisie sur une échelle (de non irritant à très irritant). La sensibilisation cutanée est évaluée par la présence d'une réaction d'hypersensibilité retardée cutanée lors d'une exposition ultérieure à la première exposition à la substance. Elle est évaluée chez le cobaye et le résultat se traduit par une appréciation choisie sur une échelle de non sensibilisant à sensibilisant (revue par Eason & O'Halloran, 2002).

La toxicité subchronique

La toxicité subchronique vise à évaluer les effets d'ingestion répétée de produit et détermine les organes cibles à court terme et les effets correspondants. Elle est caractérisée, pour une espèce donnée, par la valeur de la dose (ou la concentration) maximale sans effet observé (DSE) c'est-à-dire la quantité maximale de substance dont l'absorption quotidienne n'entraîne aucun effet sur les animaux testés (revue par Eason & O'Halloran, 2002). La DSE

est calculée après administration de la substance par voie orale sur une période déterminée (90 jours, 1 an) et est exprimée soit en milligrammes de substance active par kilogrammes de poids corporel de l'animal testé et par jour, soit en milligrammes de substance par kilogramme de nourriture (ppm) s'il s'agit d'une concentration alimentaire.

La toxicité chronique ou sublétale et le potentiel oncogénique

La toxicité chronique, qui peut se manifester par des effets très divers, vise à évaluer les effets d'ingestion répétée de produit à plus long terme. Elle est évaluée par la mesure de la DSE sur une période plus longue que précédemment (par exemple sur une durée de 2 années) et est estimée chez la souris, le rat et le chien. Lors de ces études, les organes cibles de la toxicité sont détectés. Les fonctions précises de la toxicité, le type des lésions rencontrées et le mécanisme d'action de la substance sont alors élucidés. Le foie et le rein, qui ont des fonctions métaboliques et excrétoires importantes et qui sont très largement irrigués, sont les organes cibles les plus particulièrement exposés (revue par Mückter, 2003).

Ces études à plus long terme permettent également d'évaluer le potentiel oncogénique d'un produit. Une substance est dite cancérogène lorsqu'elle est capable soit d'induire des tumeurs, soit d'en augmenter la fréquence, soit de raccourcir significativement le temps de latence des tumeurs spontanées (revue par Meyer, 2003). L'observation de la présence de foyers tumoraux et la description du type de tumeurs induites sont réalisées chez la souris et le rat (revues par Meyer, 2003; Brent, 2004). En fonction du résultat, la substance est classée dans une catégorie.

La toxicité sur la reproduction et le développement

Les effets sur la reproduction sont étudiés chez le rat dans des études multigénérations; les DSE concernant la génération des parents, la descendance et les paramètres de la reproduction sont alors calculées (revue par Brent, 2004).

Un agent tératogène est une substance capable d'induire des malformations congénitales ou d'en accroître l'incidence (revue par Connell, 1997). Dans les études de tératogénèse, sont calculées les DSE concernant la femelle gestante et le développement (embryon, fœtus). Les animaux utilisés sont le rat et le lapin (revue par Brent, 2004).

La génotoxicité

Une mutation est une modification soudaine, permanente et transmissible, spontanée ou provoquée de l'ADN. Le pouvoir mutagène des substances actives est évalué au moyen d'une batterie de tests *in vitro* sur des cultures de cellules bactériennes et de mammifères et *in vivo* sur divers animaux. La présence de mutations géniques, de modifications de structure et du nombre de chromosomes, des phénomènes de réparation de l'ADN et de recombinaison est recherchée (revue par Bolognesi, 2003). Il est essentiel d'évaluer le potentiel d'une substance à induire des aberrations de la structure des chromosomes en raison de l'association claire qui lie réarrangements chromosomiques et cancer (revue par Tucker & Preston, 1996). Il est établi que l'accumulation de plusieurs mutations est un pré-requis au développement d'un cancer (revue par Deman & Van Larebeke, 2001). Seule une analyse globale de l'ensemble des tests permet d'évaluer si la substance est mutagène pour l'homme (revue par Elespuru, 1996).

La neurotoxicité

L'objectif des études de neurotoxicité est d'identifier les effets sur le comportement et/ou sur la toxicité retardée après exposition à une substance (revue par Alavanja *et al.,*

2004). Les animaux recommandés sont le rat et le poulet. Les essais sont requis pour les substances actives dont le mécanisme d'action est lié à une interaction avec le système nerveux comme par exemples les substances inhibant l'activité acétylcholinestérase.

Les valeurs réglementaires

L'ensemble du dossier toxicologique permet d'établir des valeurs réglementaires : la dose journalière acceptable (DJA), la dose de référence aigüe (DRfA) et le niveau d'exposition acceptable pour l'opérateur (NEAO) (revues par Eason & O'Halloran, 2002; Kleinjans, 2003).

La DJA désigne la quantité de substance qui peut être quotidiennement ingérée par le consommateur, pendant toute sa vie, sans effet pour sa santé (revue par Lu, 1995). Elle s'exprime en milligrammes de substance active par kilogramme de poids corporel et par jour.

La DRfA désigne la quantité maximale de substance active qui peut être ingérée par le consommateur pendant une courte période (c'est-à-dire au cours d'un repas ou d'un jour, dans la nourriture ou l'eau de boisson), sans effet dangereux pour sa santé. Elle s'exprime en milligrammes de substance active par kilogramme de poids corporel.

Le NEAO désigne la quantité maximale de substance active à laquelle l'opérateur peut être exposé quotidiennement, sans effet dangereux pour sa santé. Il caractérise un indicateur de danger pour l'opérateur et le travailleur agricole et s'exprime en milligrammes de substance active par kilogramme de poids corporel et par jour (revue par Eason & O'Halloran, 2002).

Aux tests de toxicité visant à évaluer le danger pour l'homme, s'ajoute une gamme de tests qui précisent le comportement de la substance dans l'environnement (persistance, mobilité, adsorption, biodégradabilité...) ainsi que son pouvoir écotoxique (sur les oiseaux, les poissons, les invertébrés aquatiques, les plantes aquatiques, les abeilles...) (revue par Connell,

1997; Schweigert *et al.,* 2002). De plus, l'existence d'études épidémiologiques contribue à l'évaluation des risques de toxicité d'une substance; leur finalité est la comparaison des risques entre les groupes exposés et non exposés aux pesticides. Ces études utilisent des méthodes d'enquête dont l'objectif est de vérifier l'hypothèse d'une relation causale entre l'exposition à un facteur de risque et la survenue du problème de santé (Tron *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces études permet d'établir le classement toxicologique de la substance testée.

c- Conclusion

Les données concernant la toxicité aiguë pour l'Homme sont connues pour presque toutes les matières actives de pesticides; en revanche, nos connaissances sur leur toxicité chronique sont insuffisantes pour beaucoup de substances. De plus, la connaissance absolue de tous les composants d'une spécialité commerciale n'est pas toujours la règle. L'existence de secrets de fabrication nuit forcément à la connaissance des effets toxiques des formulations de pesticides. Enfin, les tests de toxicité portent sur les substances isolées alors que chacun est exposé simultanément dans l'environnement à une multitude de composés. La non-considération de cette multiplicité et des potentiels effets synergiques pouvant en découler constitue une des lacunes majeures de la réglementation en vigueur. Nous nous sommes intéressés aux effets toxiques d'un herbicide, le glyphosate.

B- Le glyphosate et ses formulations : ses propriétés et son utilisation

1- La découverte du glyphosate et de son mode d'action dans la plante

Le glyphosate, ou N-phosphonométhyl glycine, est un herbicide dérivé d'un acide aminé, la glycine, appartenant à la famille des aminophosphates (revues par Malik *et al.,* 1989; Maroni *et al.*, 2000). Il fut découvert en 1970 par un groupe de scientifiques de l'entreprise Monsanto et a été commercialisé pour la première fois en 1974 sous l'appellation Roundup (revue par Williams *et al.,* 2000). La découverte de l'activité herbicide du glyphosate n'est pas le fruit du hasard; l'équipe de chercheurs avait remarqué une faible activité herbicide en présence de composés chimiquement proches du glyphosate et avait de ce fait mis en place une stratégie de synthèse en cherchant à améliorer l'activité herbicide (Alibhai & Stallings, 2001). Le glyphosate est un acide faible anionique, sa formule chimique est la suivante :

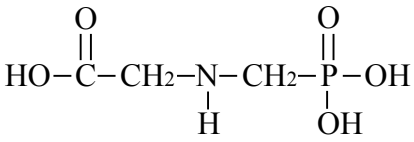


Figure 1: La structure chimique de la forme acide du glyphosate.

Le glyphosate est absorbé par la plante au niveau des feuilles puis est rapidement véhiculé par la sève jusqu'à l'extrémité des racines et rhizomes (revues par Smith & Oehme, 1992; Solomon & Thompson, 2003). Son adsorption directe par les racines est très faible en raison de sa forte rétention par le sol (revues par Smith & Oehme, 1992; Solomon & Thompson, 2003). Le caractère non sélectif de l'activité herbicide du glyphosate a particulièrement séduit les chercheurs et sa découverte a été suivie par de multiples études

biochimiques visant à élucider le mécanisme d'action de la substance. C'est ainsi qu'en 1980, la cible du glyphosate fut identifiée; il s'agit d'une enzyme, la 5-énolpyruvylshikimate-3-3phosphonate synthase (EPSPS), essentielle à la voie de synthèse des acides aminés aromatiques (Alibhai & Stallings, 2001; revue par Solomon & Thompson, 2003). Cette enzyme est majoritairement située dans les chloroplastes (revue par Blackburn & Boutin, 2003). À ce titre, il est important de noter que de faibles concentrations de glyphosate donnent de meilleurs résultats que de fortes concentrations quant à leur effet herbicide. En effet, s'il est appliqué à de fortes concentrations, le glyphosate tue les tissus avec lesquels il est en contact avant d'être transloqué jusqu'à sa cible. En revanche, de faibles concentrations maintiennent les fonctions de transport interne, au sein de la plante, intactes et permettent à l'herbicide d'atteindre les racines (revue par Blackburn & Boutin, 2003). Une fois sa cible atteinte, le glyphosate provoque une diminution de la concentration des acides aminés aromatiques ainsi qu'une diminution du taux de synthèse protéique de la chlorophylle et de certaines hormones (revue par Solomon & Thompson, 2003). La cessation de la croissance qui en découle est alors suivie de la nécrose des tissus qui aboutit à la mort de la plante. À signaler que cette voie de biosynthèse des acides aminés aromatiques n'est pas présente dans le règne animal (revues par Williams *et al.,* 2000; Solomon & Thompson, 2003). Le glyphosate peut rester intact dans la plante ou être métabolisé par les microorganismes de l'environnement en acide aminométhyl phosphonique ou AMPA (revue par Malik *et al.,* 1989). Il est fortement adsorbé au niveau du sol où la flore microbienne permet sa dégradation soit en AMPA+CO_2, soit en glycine+phosphate (revues Malik *et al.,* 1989; Smith & Oehme, 1992; Williams *et al.,* 2000; Solomon & Thompson, 2003).

Le caractère non sélectif de l'activité herbicide du glyphosate associé au faible nombre de cas de résistances répertoriées ont fait du glyphosate un herbicide de choix pour le

développement de cultures génétiquement modifiées résistantes à l'herbicide (Vollenhofer *et al.,* 1999; revue par Blackburn & Boutin, 2003).

2- L'utilisation du glyphosate

Le glyphosate fait partie des pesticides les plus utilisés en terme de volume (revue par Solomon & Thompson, 2003). Non sélectif, il possède un large spectre d'action c'est-à-dire qu'il tue toutes les cultures sur lesquelles il est appliqué (revues par Smith & Oehme, 1992; Solomon & Thompson, 2003). Les usages autorisés du glyphosate sont nombreux :

- en zones non agricoles (désherbage des allées de parcs, des jardins et des trottoirs, désherbage total)
- pour le désherbage des zones cultivées, des céréales et des jachères, des cultures légumières et florales, des vignes et vergers, des arbres et arbustes d'ornement, et des forêts
- pour la dévitalisation des souches, broussailles et arbres
- pour le désherbage de plantes semi-aquatiques.

Le fabricant recommande, lorsque le Roundup est pulvérisé, une dose allant de 5 à 40 mM de glyphosate (soit environ de 1 à 7 g/l).

L'utilisation massive de glyphosate est un phénomène relativement récent consécutif aux changements dans la réglementation. Par exemple, en Bretagne, un arrêté préfectoral a limité l'utilisation d'un herbicide non sélectif, le diuron, pour le désherbage des zones non agricoles; l'un des produits les plus utilisés en substitution du diuron est le glyphosate qui voit donc son utilisation augmenter d'année en année. Les conséquences de cette considérable augmentation, notamment durant les années 1990, ne sont pas forcément prises en compte dans les études de toxicité, en particulier dans les études épidémiologiques, et ne pourront être évaluées qu'avec le recul nécessaire.

3- Les spécialités commerciales à base de glyphosate

Il est utilisé principalement sous forme de sels (isopropylamine, trimethylsulfonium, sodium ou ammonium) de manière à le rendre plus soluble dans l'eau et est commercialisé sous forme de poudre ou concentré aqueux. Le glyphosate constitue la matière active la plus souvent utilisée dans les désherbants non rémanents. Les spécialités commerciales présentes sur le marché sont nombreuses. En voici quelques exemples : l'Amega (CFPI Nufarm), le Cargly (Cardel), le Cosmic (Calliope), le Tchao (BHS), le Nomix (Monsanto) , le Rodeo (Monsanto) ou encore le Roundup (Monsanto) qui est la gamme de désherbants à base de glyphosate la plus utilisée et celle à laquelle nous nous sommes intéressés. Les produits Roundup contiennent du glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine; la formule chimique du glyphosate sous forme de sel d'isopropylamine est présentée à la figure suivante :

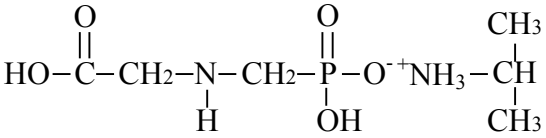


Figure 2 : La structure chimique du sel d'isopropylamine de glyphosate.

La gamme Roundup comprend elle-même plusieurs spécialités commerciales : Roundup 3plus, Roundup Biovert, Roundup Flash... Toutes ces spécialités contiennent le principe actif, le glyphosate, associé à un ensemble de produits inertes en tant qu'herbicides. Ces produits inertes sont pour la plupart des adjuvants mais la totalité de la composition est souvent maintenue secrète. Nos études ont principalement concerné le Roundup 3Plus.

4- Les adjuvants présents dans le Roundup

Les adjuvants utilisés dans les formulations de glyphosate sont des surfactants. Leur présence est toujours nécessaire afin de permettre la pénétration du glyphosate dans la plante. Sans surfactant, seul 10 % de la quantité de glyphosate pénètre dans la plante. Ces surfactants sont donc indispensables afin d'optimiser l'activité biologique des sels de glyphosate. Les surfactants présents dans les formulations de glyphosate sont principalement issus de deux familles de surfactants : les amines grasses éthoxylées, la famille la plus ancienne et les esters de phosphate (De Ruiter, 2002). Les surfactants présents dans le Roundup sont issus de la première de ces familles; ce sont des amines grasses de suif éthoxylées (Deschomets, 2001). Le principal surfactant présent dans la gamme de produits Roundup est un adjuvant cationique, le polyoxyéthylène amine (Polyethoxylated tallow amine ou POEA), appelé genamin (revues par Smith & Oehme, 1992; Williams *et al.,* 2000).

De nombreuses études montrent que le POEA est plus toxique que le glyphosate (Folmar *et al.,* 1979; Mitchell *et al.,* 1987; Servizi *et al.,* 1987; Adam *et al.*, 1997; Mann & Bidwell, 1999; Everett & Dickerson, 2003; Tsui & Chu, 2003). De manière surprenante, le POEA s'est également révélé plus toxique que le Roundup (Tsui & Chu, 2003) suggérant l'existence dans le Roundup d'un protecteur de l'effet du POEA. Suivant la spécialité commerciale, le Roundup contient 14,4 à 75 % de sels de glyphosate, l'ingrédient actif, associé à un mélange de différents additifs, coformulants et surfactants qui augmentent l'activité herbicide du sel de glyphosate (revue par Solomon & Thompson, 2003); le secret de fabrication rend difficile la connaissance de tous les constituants du Roundup.

5- Les contaminations par le glyphosate

Le glyphosate est utilisé sur une large période de l'année. Cette caractéristique est liée aux multiples usages de la molécule, en zones agricole et non agricole. Les contributions respectives de ces deux types d'usage à la contamination de l'eau sont pour le moment inconnues mais la source non agricole pourrait être majoritaire. Dans l'environnement, le glyphosate peut se retrouver en solution après lessivage du sol et des feuillages ou adsorbé par le sol lors du transport des particules dans le sol.

De nombreuses études ont cherché à évaluer la contamination des eaux côtières bretonnes par le glyphosate ces dernières années (Tron *et al.,* 2001). En milieu marin par exemple, les concentrations retrouvées en glyphosate sont de l'ordre du µg/l. En 1998, il a été retrouvé dans 85 % des échantillons prélevés dans les eaux bretonnes une valeur supérieure au seuil légal de 0,1 µg/l; une concentration de 3,4 µg/l a même été relevée sur la Seiche, un affluent de la Vilaine. En 1999, les mesures ont confirmé la tendance puisque le glyphosate a été retrouvé à une concentration supérieure à la dose seuil de 0,1 µg/l dans 90 % des échantillons prélevés. La demi-vie du glyphosate étant relativement courte (47 jours), la présence de son principal métabolite, l'AMPA, est recherchée depuis 2000 : 95 % des échantillons prélevés avaient une concentration en AMPA supérieure à 0,1 µg/l.

Enfin, une étude a recherché les quantités de glyphosate présentes dans les urines des agriculteurs et révèle que 70 % d'entre eux ont une urine contaminée le jour de l'application du glyphosate. La concentration moyenne retrouvée est d'environ 3 µg/l et le maximum atteint est de 233 µg/l (Acquavella *et al.*, 2004).

C- Le glyphosate et ses formulations : leur toxicité

1- Les effets toxicologiques

a- L'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination

L'absorption orale est retrouvée rapide mais limitée pour le glyphosate et l'AMPA : 15 à 36 % de la dose administrée oralement, en une seule fois ou fractionnée en plusieurs prises, est absorbée (Brewster *et al.,* 1991; Chan & Mahler, 1992; revue par Williams *et al.*, 2000). La pénétration dermale ne dépasse pas les 3 % pour le glyphosate qu'il soit sous forme acide ou de sel d'isopropylamine et les 2 % pour le Roundup (Wester *et al.,* 1991; revue par Williams *et al.,* 2000). Le glyphosate est donc considéré comme pratiquement non toxique par absorption dermale. S'ils pénètrent dans l'organisme, le glyphosate et l'AMPA ne s'accumulent pas dans les tissus (revues par Smith & Oehme, 1992; Williams *et al.,* 2000). Leur métabolisme dans l'organisme est très limité et leur élimination est rapide et presque totale. Le glyphosate et l'AMPA sont donc classés parmi les substances très peu toxiques par ingestion orale ou dermale.

b- La toxicité aiguë ou létale

Pour le glyphosate et le Roundup, la DL50 orale et dermale évaluée chez le rat est supérieure à 5000 mg/kg p.c. (poids corporel) (revue par Williams *et al.,* 2000). La DL50 orale de l'AMPA est quant à elle encore plus élevée, 8300 mg/kg p.c. (revues par Smith & Oehme, 1992; Williams *et al.,* 2000). En revanche la DL50 orale et dermale du principal surfactant présent dans le Roundup, le POEA, est beaucoup plus faible puisqu'elle est au minimum de 1200 mg/kg p.c. La CL50 par inhalation mesurée pour le glyphosate chez le rat est supérieure à 5 mg/l d'air. Aux vues des doses ou concentrations létales mesurées, la

toxicité aiguë du glyphosate et l'AMPA par voie orale et dermale est très faible et le glyphosate est classé comme modérément toxique par inhalation (revue par Williams *et al.,* 2000).

Le glyphosate est un des pesticides les plus utilisés dans les cas de suicide par ingestion de pesticides, fréquents en Asie. Une étude réalisée à Taïwan sur 131 cas d'intoxication par suicide décrit les symptômes observés chez les patients : irritation de la gorge, nausées, leucocytose...; environ 8 % des patients meurent notamment à la suite d'œdème ou de détresse respiratoire (Lee *et al.,* 2000).

Une étude relatant une contamination accidentelle d'un homme par pulvérisation, indique les symptômes observés : lésions de la peau au bout de quelques heures et syndrome parkinsonien au bout d'un mois (Barbosa *et al.,* 2001).

c- La toxicité par irritation

Sous sa forme acide, le glyphosate est très irritant pour les yeux (inflammation) et modérément pour la peau (présence d'œdème). En revanche, sous forme de sel d'isopropylamine, il n'est irritant ni pour la peau, ni pour les yeux (revue par Williams *et al.,* 2000). Le Roundup et le POEA peuvent être irritants pour les yeux ; cependant, ce n'est pas le cas si le pesticide est pulvérisé dans les conditions de dilution recommandées (revues par Smith & Oehme, 1992; Williams *et al.,* 2000). Le potentiel irritant du POEA est classiquement retrouvé chez les surfactants car ils interagissent avec les composants lipidiques des membranes. Le glyphosate est donc classé comme irritant sous forme acide et comme très peu irritant sous forme de sel d'isopropylamine (revue par Williams *et al.,* 2000).

d- La toxicité subchronique

Le glyphosate atteint principalement le foie et déclenche en autre des vomissements, des diarrhées et une diminution du poids corporel (Chan & Mahler, 1992) à des concentrations très élevées (supérieures à 25000 mg/kg p.c.). Autre organe cible atteint par le glyphosate, les glandes salivaires, dont l'altération est associée à des dysfonctionnements histologiques (Chan & Mahler, 1992). Pour le glyphosate, la dose maximale sans effet observé a été évaluée en utilisant plusieurs modèles : 2500 mg/kg p.c./jour chez la souris (Chan & Mahler, 1992), 1500 mg/kg p.c./jour chez le rat, 500 mg/kg p.c./jour chez le chien. En ce qui concerne l'AMPA, la dose maximale sans effet observé est de 400 mg/kg p.c./jour chez le rat et de 260 mg/kg p.c./jour chez le chien (revue par Williams *et al.,* 2000). Tout comme pour le glyphosate, les effets subchroniques de l'AMPA n'apparaissent qu'à de très fortes concentrations.

e- La toxicité chronique ou sublétale

Comme dans le cas de la toxicité subchronique, une diminution du poids corporel est observée ainsi que des effets histologiques au niveau du foie. Ces effets chroniques n'apparaissent qu'aux plus fortes concentrations testées. La dose maximale sans effet observé du glyphosate pour la toxicité chronique a été évaluée à 885 mg/kg p.c./jour chez la souris et 409 mg/kg p.c./jour chez le rat (revue par Williams *et al.,* 2000). Elle n'est que de 2,8 mg/kg p.c./jour pour l'AMPA.

f- Le potentiel oncogénique

Le potentiel oncogénique du glyphosate a été retrouvé nul chez le rat et la souris. Le glyphosate a donc été classé par l'EPA (Environmental Protection Agency) dans la catégorie E, "Evidence of Non-carcinogenicity in Humans".

Cependant, ces dernières années, plusieurs études épidémiologiques relatives à l'exposition au glyphosate ont mis en avant une relation avec certains types de cancers. Par exemple, une étude a été réalisée en Suède avec des patients diagnostiqués entre 1987 et 1990 (Hardell & Eriksson, 1999). Elle révèle que l'exposition aux fongicides et aux herbicides dont le glyphosate est significativement associée à un risque plus élevé de lymphome non-Hodgkinien. Les cas concernant le glyphosate étaient en nombre trop restreint pour pouvoir avancer des conclusions à la seule vue de cette étude. Une étude épidémiologique canadienne, réalisée sur des hommes diagnostiqués entre 1991 et 1994, a mis en évidence une relation dose-dépendante entre le risque de lymphome non Hodgkinien et l'exposition au glyphosate (McDuffie *et al.,* 2001). Une autre étude épidémiologique, réalisée aux Etats-Unis avec des malades diagnostiqués entre 1979 et 1986, a également mis en évidence une augmentation de l'incidence de lymphome non Hodgkinien associée à l'exposition à certains pesticides dont le glyphosate (De Roos *et al.,* 2003). Enfin, une étude épidémiologique a été réalisée par la même équipe suédoise que citée précédemment, sur des hommes diagnostiqués entre 1987 et 1990 (Hardell *et al.,* 2002). Les auteurs montrent, sur un nombre de cas statistiquement acceptable, que l'exposition au glyphosate est un facteur de risque pour le lymphome non Hodgkinien**.**

Le lymphome non Hodgkinien est un cancer développé à partir de cellules lymphoïdes ou lymphocytes qui se distingue des leucémies de même origine par la prépondérance de tumeurs, en particulier des ganglions lymphatiques, et par l'absence, le plus souvent, de cellules anormales dans le sang. Ces lymphomes présentent une grande variété et sont regroupés avec la maladie de Hodgkin, sous le terme de lymphomes malins, ce qui explique leur appellation négative. Plus fréquents que la maladie de Hodgkin, ils représentent près de deux tiers de tous les lymphomes malins et près de 2 % de tous les cancers, d'autant que leur fréquence ou incidence tend à augmenter.

Nos résultats démontrent que le Roundup affecte la régulation de la division cellulaire. En utilisant le développement précoce de l'oursin, nous avons mis en évidence que le Roundup retarde l'activation du complexe régulateur de l'entrée en phase M, le complexe CDK1/cycline B. Ce retard provoque un délai dans l'apparition du premier clivage mitotique. À l'origine du dysfonctionnement, le Roundup affecte l'activité de synthèse d'ADN, dérégulation qui est détectée par le mécanisme de surveillance du cycle cellulaire situé à la transition G2/M. L'activation de ce mécanisme est responsable des délais observés en présence de Roundup. Toute perturbation du cycle cellulaire est un signe potentiel de carcinogénicité pour une substance; l'effet du Roundup que nous avons mis en évidence pourrait donc être associé à l'apparition de cancers (Résultats).

g- La toxicité sur la reproduction et le développement

Des effets sur la concentration des spermatozoïdes ont été observés à de fortes concentrations (Chan & Mahler, 1992). La DSE du glyphosate pour les effets sur la reproduction a été fixée à 2132 mg/kg p.c./jour. Les effets sur la reproduction sont rares et uniquement observés à de très fortes doses. Des études *in vitro* et *in vivo* ont évalué la capacité du glyphosate, du POEA, du Roundup et de l'AMPA à interagir avec le système endocrinien et révèlent qu'aucune toxicité n'a été observée à ce niveau (revue par Williams *et al.,* 2000). Une étude a montré l'effet inhibiteur du Roundup sur la stéroïdogénèse en utilisant des cellules de souris en culture (Walsh *et al.,* 2000).

Des effets toxiques comme une augmentation de la mortalité des mères exposées et une diminution du nombre de fœtus viables ont été observés. La DSE pour la toxicité maternelle et développementale a été fixée à 1000 mg/kg p.c./jour chez le rat et 175 mg/kg p.c./jour chez le lapin (revue par Williams *et al.,* 2000). Il a été montré que, chez le rat, l'administration orale de Roundup est toxique pour les femelles et qu'elle entraîne un retard

dans le développement du squelette des fœtus de ces femelles (Dallegrave *et al.,* 2003). Dans une autre étude effectuée chez le rat, l'exposition maternelle au glyphosate pendant sa gestation induit de nombreuses anomalies fonctionnelles notamment au niveau de l'activité de certaines enzymes, comme la malate déshydrogénase ou la glucose 6-phosphatase déshydrogénase (Daruich *et al.,* 2001). Les effets du glyphosate et du Roundup ont aussi été évalués sur le développement des neurites à partir de cellules de neuroblastomes de souris (Axelrad *et al.,* 2003). Les résultats montrent là encore une toxicité, qui est de surcroît considérablement plus importante pour le Roundup que pour le glyphosate seul à des concentrations équivalentes en glyphosate. La dose provoquant 50 % d'inhibition de croissance des neurites est 1,5 mM pour le glyphosate alors qu'elle n'est que de 10 µM pour le Roundup.

La présence de plusieurs études met donc en doute le caractère non tératogène du glyphosate. Cependant, la majorité des effets étant observés à des concentrations élevées, le glyphosate, le Roundup, l'AMPA et le surfactant POEA sont considérés par la réglementation comme non toxiques envers la fertilité, la reproduction ou encore le développement dans les conditions recommandées d'utilisation.

Enfin, une étude épidémiologique a été réalisée sur des femmes enceintes issues de population agricole (Arbuckle *et al.,* 2001). Les auteurs montrent que l'exposition au glyphosate pendant les trois mois précédents la conception ou pendant le premier trimestre de grossesse est associée à un risque plus élevé d'avortements spontanés tardifs.

Nos résultats démontrent que le Roundup affecte le mécanisme de transcription, processus essentiel au bon déroulement du développement embryonnaire précoce. Ce mécanisme est en effet impliqué dans l'éclosion des embryons et dans la détermination des territoires embryonnaires (Résultats).

h- La génotoxicité

Certaines équipes ont montré, par des expériences visant à détecter les mutations géniques ou les aberrations chromosomiques, que le glyphosate n'est pas génotoxique (Moriya *et al.,* 1983; Li & Long, 1988; Wildeman & Nazar, 1982; Chan & Mahler, 1992; De Marco *et al.*, 1992).

Cependant, en ce qui concerne le Roundup, un faible effet mutagène a été observé dans les cellules bactériennes (Rank *et al.,* 1993). Le glyphosate (entre 6 et 36 mM) et le Roundup (0,6 mM) ont été associés à l'apparition d'échanges entre chromatides sœurs dans des lymphocytes humains en culture (Vigfusson & Vyse, 1980). Le glyphosate produit également de manière dose-dépendante l'apparition d'aberrations chromosomiques et d'échanges entre chromatides sœurs dans des lymphocytes humains en culture (Lioi *et al.,* 1998a). Cette même équipe a révélé une activité génotoxique du glyphosate sur des lymphocytes de bovins en culture à des doses allant de 20 à 200 µM; les aberrations et les échanges chromosomiques sont là encore retrouvés en plus grand nombre (Lioi *et al.,* 1998b). Le Roundup (à des concentrations de 1 à 3 mg/l soit 6 à 18 µM) provoque également une augmentation des aberrations chromosomiques *in vitro*, caractérisées le plus souvent par des anomalies du fuseau (Rank *et al.,* 1993). Des effets génotoxiques synergiques ont également été observés entre le glyphosate et le stress oxydatif dans des fibroblastes humains en culture (Lueken *et al.,* 2004). Des tests de génotoxicité ont été réalisés sur des larves de drosophile âgées de trois jours; les herbicides leur sont administrés par alimentation chronique. Les auteurs révèlent un potentiel génotoxique du glyphosate à des concentrations allant de 1 à 10 mM (Kaya *et al.,* 2000). D'autres auteurs ont montré que le Roundup est capable d'induire la formation d'insertion d'ADN de manière dose-dépendante dans des reins et des foies de souris (Peluso *et al.*, 1998). Ces mutations ne sont pas attribuées à la substance active du Roundup

mais à un composant inconnu de la spécialité commerciale. Selon les auteurs, les surfactants contenus dans le Roundup jouent un rôle important dans la toxicité de l'herbicide.

En définitive, les effets génotoxiques du glyphosate ne sont observés qu'à de fortes doses; il est donc considéré par les instances réglementaires comme non génotoxique dans les conditions recommandées d'utilisation.

i- La neurotoxicité

Aucune toxicité n'a été observée dans les études de neurotoxicité (revue par Williams *et al.,* 2000). Le mécanisme d'action du glyphosate dans la plante n'étant pas lié à une interaction avec le système nerveux, les études de neurotoxicité ne sont pas pertinentes dans ce cas.

L'ensemble des résultats de l'étude toxicologique est récapitulé dans le tableau 2.

j- Les valeurs réglementaires

La dose journalière acceptable du glyphosate évaluée chez le rat sur 2 ans par voie orale est 0,3 mg/kg p.c./jour (revue par Lu, 1995). Le niveau d'exposition acceptable pour l'opérateur du glyphosate, évalué chez le lapin par l'effet tératogénique par voie orale, est 0,2 mg/kg p.c./jour.

Critère évalué	Résultat	Conclusion
Absorption orale et dermale Distribution Métabolisme Elimination	Faible Homogène, pas d'accumulation Très limité Rapide et totale	Très faiblement toxique
Toxicité aiguë ou létale .par voie orale .par voie dermale .par inhalation	 Très faible Très faible Moyenne	 Très faiblement toxique Très faiblement toxique Modérément toxique
Toxicité par irritation .irritation oculaire .irritation cutanée .sensibilisation cutanée	 Très irritant Modérément irritant Pratiquement pas irritant	 Toxique Modérément toxique Très faiblement toxique
Toxicité suchronique	Organes cibles : foie, tractus digestif, glandes salivaires Toxique à fortes doses	Très faiblement toxique
Toxicité chronique ou sublétale	Organes cibles : tractus digestif Toxique à fortes doses	Très faiblement toxique
Potentiel oncogénique	Pas de foyers tumoraux	Pas de potentiel oncogénique
Toxicité sur la reproduction et le développement	Effets toxiques rares et à fortes doses	Non toxique
Génotoxicité	Effets toxiques à de fortes doses	Non toxique

Tableau 2 : L'étude toxicologique du glyphosate (références dans le texte).

2- Le comportement dans l'environnement et les effets écotoxicologiques

Concernant le comportement dans l'environnement, le glyphosate ne semble pas s'accumuler dans les tissus animaux (revue par Williams *et al.*, 2000).

Concernant l'effet sur l'environnement aquatique, les résultats sont controversés. La toxicité du Roundup sur l'environnement aquatique, testée sur plusieurs espèces de poissons, est considérée comme très faible par certains (Mitchell *et al.,* 1987) alors que d'autres mettent en évidence des effets toxiques du glyphosate et de ses différentes formulations (Smith, 2001;

Jiraungkoorskul *et al.,* 2003; Tsui & Chu, 2003). Par exemple, une étude, réalisée sur le développement embryonnaire et larvaire de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus,* a révélé que le glyphosate provoque une diminution du taux d'éclosion à de faibles doses, environ 25 % de baisse à 0,5 µg/l et 45 % à 1 µg/l (Larvor-Cario *et al.,* 2000). Une étude, réalisée sur les carpes, a mis en évidence que le Roundup provoque l'apparition de structures pathologiques au niveau des hépatocytes et notamment au niveau des mitochondries, et ceci à des concentrations 20 à 40 fois plus faibles que celles utilisées en pratique (Szarek *et al.,* 2000).

L'effet herbicide du glyphosate pourrait également être néfaste sur certaines plantes pour lesquelles sa pulvérisation induit un effet significatif sur la germination et la croissance des semences issues de ce plant (revue par Blackburn & Boutin, 2003).

3- Le classement toxicologique du glyphosate

L'ensemble de ces études permet d'établir le classement toxicologique du glyphosate. Selon les instances françaises et internationales, le glyphosate est considéré comme irritant, pouvant provoquer des lésions oculaires graves et toxiques pour les organismes aquatiques car susceptible d'entraîner des effets néfastes à long terme pour l'environnement aquatique. À noter que les sels de glyphosate ne sont pratiquement pas irritants pour les yeux. La toxicité du glyphosate n'apparaît qu'à des doses élevées, ce qui permet son homologation et donc son utilisation légale dans les conditions normales d'utilisation (revue par Malik *et al.,* 1989); il a d'ailleurs été récemment réhomologué au niveau européen. Lors de son homologation par l'EPA, le glyphosate a été placé dans la classe de toxicité la moins élevée concernant l'effet carcinogène. Par ailleurs, la valeur guide de l'OMS, c'est-à-dire la concentration maximale admissible dans l'eau à des fins alimentaires, a été établie à 9000 µg/l, valeur largement

supérieure au seuil légal en France. Selon l'OMS, l'EPA et la Commission Européenne, l'utilisation du glyphosate en accord avec les instructions du fabricant ne pose donc aucun problème en matière de santé humaine.

Cependant, plusieurs études épidémiologiques démontrent une corrélation entre l'exposition au glyphosate et la présence de cancers (revue par Morrison *et al.,* 1992), problème majeur de santé publique. L'utilisation récente d'une substance implique que certaines conséquences, en particulier en terme de cancer, peuvent rester insoupçonnées pendant plusieurs années. À l'origine d'un cancer, un ensemble de facteurs, environnementaux et génétiques, provoque des anomalies de la régulation du cycle cellulaire. Les cellules vont alors échapper à leurs contrôles et proliférer, conduisant à l'apparition et au développement d'un cancer. L'évaluation des effets des polluants sur le processus de division cellulaire apparaît donc indispensable et serait un outil fiable de quantification des risques à long terme. Les connaissances sur le processus fondamental du cycle cellulaire permet de comprendre les dérèglements de la division cellulaire qui aboutissent à des cancers.

II - Le cycle cellulaire : sa régulation et sa dérégulation

A- Le cycle cellulaire et les kinases dépendantes des cyclines

1- Le cycle cellulaire

Le cycle cellulaire est le mécanisme par lequel une cellule-mère donne, par duplication de ses composants, deux cellules-filles contenant un patrimoine génétique identique entre elles et à la cellule-mère. C'est un processus essentiel à la vie cellulaire et notamment au développement embryonnaire. Le cycle cellulaire est composé de deux phases : l'interphase, période pendant laquelle les chromosomes sont répliqués, puis la mitose au cours de laquelle les chromosomes se répartissent entre les deux cellules-filles. L'interphase est constituée de trois phases : successivement G1, S et G2. Les phases G1 et G2 (G pour gap signifiant intervalle) sont des périodes de latence pendant lesquelles la cellule se prépare à la phase suivante. Chaque phase ne peut débuter qu'à condition que la phase précédente se soit déroulée correctement. La phase G1 est une période de croissance de la cellule, de contrôle de l'état de l'ADN et de préparation à la phase S. Au cours de la phase S, la cellule duplique son ADN et contrôle cette duplication avant que ne débute la phase G2, qui est à la fois une phase de contrôle et une phase de préparation à la mitose. La phase G2 est marquée par le début de la condensation des chromosomes (Kubelka *et al.,* 2002). La division cellulaire proprement dite a lieu pendant la mitose ou phase M, période au cours de laquelle la cellule répartit son ADN entre les deux futures cellules-filles puis se divise (revue par Nurse, 1990). La phase M est classiquement découpée en cinq périodes : la prophase, la prométaphase, la métaphase, l'anaphase et la télophase. La sortie de métaphase est contrôlée et ne s'effectue qu'après une

métaphase correcte. Le cycle cellulaire est schématiquement représenté à la figure 3 (Alberts *et al.,* 1983).

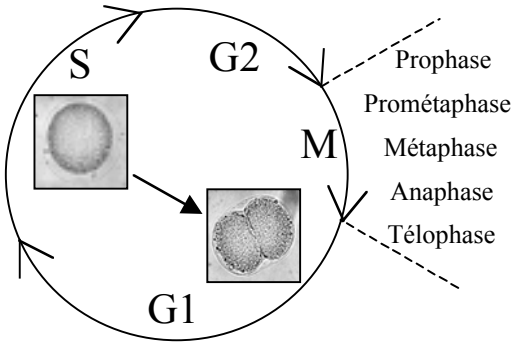


Figure 3 : Les différentes phases du cycle cellulaire.

La prophase correspond à la fin de la condensation des chromosomes et s'achève par la rupture de l'enveloppe nucléaire (Nuclear Envelope Breakdown ou NEBD). Au cours de la prométaphase, le fuseau bipolaire mitotique se forme et les chromosomes commencent à s'aligner sur celui-ci, alignement qui se poursuit pendant la métaphase. Le fuseau mitotique est nécessaire à la migration des chromosomes vers les deux cellules-filles. Pendant l'anaphase, les chromosomes se séparent. Débute alors la télophase, caractérisée par le mouvement des chromosomes vers les pôles, la disparition du fuseau, la décondensation des chromosomes et le début de la cytokinèse. Cette étape conduit à l'individualisation des deux cellules-filles et achève le processus de division de la cellule. La morphologie des chromosomes au cours des différentes étapes du cycle de division cellulaire est représentée à la figure 4.

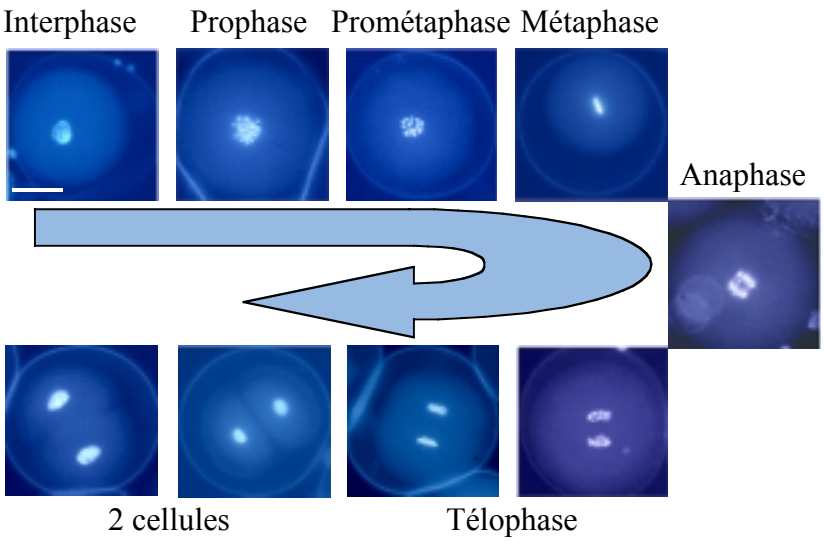


Figure 4 : La morphologie des chromosomes au cours du cycle cellulaire.
Observations en microscopie à fluorescence du matériel génétique dans des embryons d'oursin. Echelle : 50 µM (d'après Marc et al.*, non publié).*

De part sa complexité, le mécanisme de division cellulaire nécessite une régulation fine permettant la succession précise des différentes étapes du cycle cellulaire (Nurse, 2002). Cette régulation est assurée par différents mécanismes de contrôle opérant tout au long du cycle cellulaire.

2- Les kinases dépendantes des cyclines

La progression à travers les différentes phases du cycle cellulaire est contrôlée par des mécanismes moléculaires orchestrés par une famille de protéines kinases, les kinases cyclines-dépendantes (cyclin-dependent kinase ou CDK) (revue par Murray, 2004). Les CDKs doivent leur nom au fait qu'elles sont actives uniquement sous forme d'un complexe entre une sous-unité catalytique, la kinase, et une sous-unité régulatrice, la cycline (Pines & Hunter, 1991). Les CDKs appartiennent à la famille des sérine-thréonine kinases : elles

catalysent le transfert d'un groupement phosphate sur les résidus sérine et thréonine de leurs substrats (figure 5).

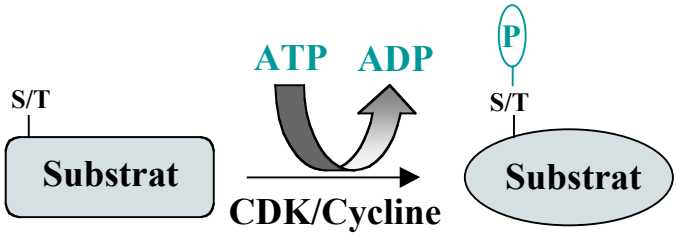


Figure 5 : La réaction catalysée par les CDKs.

Les CDKs sont structurellement composées d'un lobe N-terminal riche en feuillets β et d'un lobe C-terminal riche en hélices α. La figure 6 est une illustration schématique de leur structure.

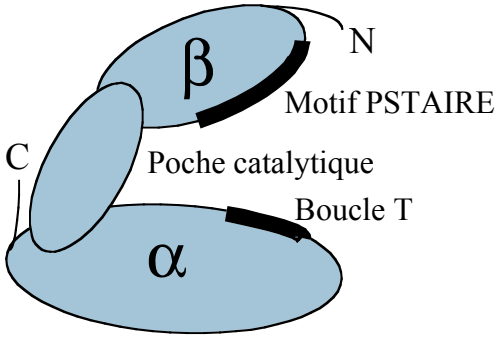


Figure 6 : La structure schématique des CDKs.

À l'intersection des deux domaines, se situe le site catalytique comprenant les sites de fixation à l'ATP et de liaison au substrat. Outre ces domaines communs à toutes les protéines kinases, les CDKs possèdent deux régions spécifiques : une boucle régulatrice dite boucle T (T-loop) et un motif PSTAIRE (en code acides aminés à une lettre) en hélice α très conservé qui est la véritable signature des CDKs. Ces deux régions sont impliquées dans la régulation de l'activité des complexes CDK/cycline (De Bondt *et al.,* 1993; Jeffrey *et al.*, 1995).

La première kinase contrôlant le cycle cellulaire a été initialement découverte chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* comme le produit du gène cdc2 (cdc pour Cell Division Control) (Nurse & Thuriaux, 1980); elle fut par la suite rebaptisée CDK1. Les homologues de cdc2 ont par la suite été caractérisés dans de nombreux organismes; à ce jour, onze CDKs (numérotées de 1 à 11) ont été découvertes. Les CDKs se sont imposées au cours des deux dernières décennies comme les régulateurs universels de la division des cellules. C'est notamment à partir de la kinase CDK1 associée à son régulateur cycline B que les connaissances sur les complexes CDK/cycline et sur leur régulation ont évolué. Le complexe CDK1/cycline B est le régulateur universel de la phase M (Arion *et al.,* 1988; Dunphy *et al.*, 1988; Gautier *et al.,* 1988; Labbé *et al.,* 1988 et 1989; Meijer *et al.,* 1989) présent dans toutes les cellules eucaryotes aussi bien ovocytaires que somatiques. Ses caractéristiques lui doivent son nom de facteur promoteur de la phase M (M-phase Promoting Factor ou MPF).

Les CDKs impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire sont au nombre de six; il s'agit de CDK1, 2, 3, 4, 6 et 7. La fonction biologique des CDKs n'est pas limitée au contrôle de la division cellulaire et, chez tous les organismes à l'exception des levures, certaines CDKs ne possèdent pas de fonction dans le cycle cellulaire (revue par Morgan, 1995); il s'agit de CDK5, 8, 9, 10 et 11. Ces kinases sont impliquées dans des processus cellulaires divers tels que la fonction neuronale pour CDK5, la transcription pour CDK8 (revue par Morgan, 1997), CDK9 (De Falco & Giordano, 1998) et CDK10 (Kasten & Giordano, 2001) ou encore l'apoptose pour CDK5 (Tanaka *et al.,* 2001) et CDK11 (Shi *et al.*, 2003). La kinase CDK7 est quant à elle impliquée à la fois dans le cycle cellulaire et la transcription (revue par Morgan, 1997).

3- Les différentes CDKs au cours du cycle cellulaire

Chacune des CDKs peut, en fonction de la phase du cycle, s'associer à diverses cyclines. Le contrôle du cycle cellulaire des eucaryotes par les différents couples CDK/cycline est illustré schématiquement à la figure 7. Deux groupes de complexes peuvent être distingués : le premier comprend les cyclines D, E et A associées aux CDKs 4/6 et 2 et le second comprend les cyclines A et B, dites mitotiques, associées à la CDK mitotique, CDK1 (revue par Murray, 2004).

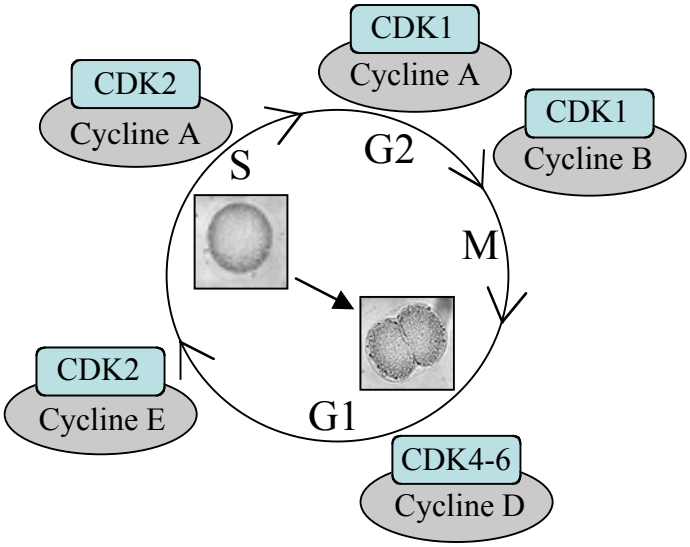


Figure 7 : Les CDKs et leurs partenaires cyclines au cours du cycle cellulaire.

Le déroulement de la phase G1 est régulé par les kinases CDK4 et CDK6 associées à des cyclines de type D (revue par Ekholm & Reed, 2000). En début de phase G1, des signaux extracellulaires permettent l'activation des kinases CDK4 et CDK6 associées aux cyclines D. Ces deux complexes phosphorylent et inactivent la protéine du Rétinoblastome (pRb), entraînant la libération des facteurs de transcription E2F et DP1, qui contrôlent l'expression des gènes requis pour la transition G1/S et la progression en phase S. L'expression de la

cycline E est ainsi stimulée, cette protéine va alors activer la kinase CDK2 et permettre l'initiation de la synthèse d'ADN (revue par Bartek & Lukas, 2001).

Le complexe CDK2/cycline E contrôle la transition G1/S (Ohtsubo & Roberts, 1993; Knoblich *et al.,* 1994). Le complexe CDK2/cycline E permet la fixation d'un facteur, cdc45, à la chromatine, fixation qui est indispensable à l'accrochage de l'ADN polymérase, l'enzyme de la réplication (revue par Bartek & Lukas, 2001). L'activité CDK est indispensable à la réplication de l'ADN mais la plupart des substrats restent encore inconnus.

Au début de la phase S, la cycline A est synthétisée et localisée aux sites de réplication de l'ADN. La kinase CDK2 s'associe alors à la cycline A et le complexe CDK2/cycline A phosphoryle différents substrats permettant à la duplication de l'ADN de s'accomplir et l'inactivation des facteurs de transcription G1 (Girard *et al.*, 1991; Pagano *et al.*, 1992). De plus, le complexe CDK2/cycline A n'autorise qu'une seule réplication par cycle cellulaire (revue par Yam *et al.*, 2002). Parmi les cibles connues du complexe CDK2/cycline A, sont présents des éléments de la machinerie de réplication de l'ADN qui s'assemblent au niveau de la chromatine avant le début de la réplication : ORC (origin recognition complex), cdc6 (revue par Yam *et al.*, 2002).

Au moment de la transition S/G2, la cycline A change de partenaire pour s'associer à la kinase CDK1; le complexe CDK1/cycline A participe à l'activation de CDK1/cycline B (Devault *et al.,* 1992; Okano-Uchida *et al.,* 1998; Mitra & Enders, 2004).

Enfin, CDK1 s'associe à la cycline B et forme ainsi l'enzyme clé qui régule la transition G2/M et l'entrée en mitose (revue par Nurse, 1990). Les substrats du complexe CDK1/cycline B sont à la fois des protéines structurales (par exemple la nucléoline, la condensine ou la kinésine) mais également des protéines régulatrices, comme des kinases ou phosphatases (par exemple cdc25C). La phosphorylation de ces substrats permet les évènements cytologiques de la mitose comme la rupture de l'enveloppe nucléaire (lamines

nucléaires), la condensation de la chromatine (histones) ou la formation du fuseau mitotique (protéines MAP ou mitogen-activated protein, s'associant aux microtubules) (revues par Nigg, 1995; Vermeulen *et al.,* 2003).

La cycline B est elle-même un substrat du complexe CDK1/cycline B (Borgne *et al.*, 1999); cette autophosphorylation a été observée dans de nombreux types cellulaires dont les œufs d'oursin (Meijer *et al.*, 1989); elle s'effectue sur des sites conservés au cours de l'évolution (Borgne *et al.,* 1999). La phosphorylation de la cycline B est un marqueur de l'activation du complexe (Meijer *et al.,* 1989 et 1991). Elle joue un rôle dans la localisation intracellulaire du complexe CDK1/cycline B (revue par Pommier & Kohn, 2003) et dans l'activation du complexe CDK1/cycline B (Peter *et al.,* 2002).

Parmi les substrats de CDK1/cycline B, est présent un complexe multi-protéique dit promoteur de l'anaphase, l'APC (anaphase-promoting complex) ou cyclosome, qui intervient dans la perte de la cohésion des chromatides sœurs. Au cours de la phase G2 et au début de la phase M, la cohésion entre les chromatides sœurs est assurée par un complexe protéique appelé cohésine. La séparation des chromatides sœurs en anaphase requiert le clivage de la cohésine par une enzyme, la séparase, qui est maintenue inactive avant l'anaphase, par sa liaison à une protéine appelée sécurine (revue par Hixon & Gualberto, 2000). La phosphorylation de l'APC par le complexe CDK1/cycline B provoque son activation; il assure la dégradation ubiquitine-dépendante de la sécurine, libère ainsi la séparase qui va cliver la cohésine (revue par Amon, 1999). Les chromatides sœurs peuvent alors migrer vers les pôles opposés du fuseau qui s'écartent l'un de l'autre (revue par Bharadwaj & Yu, 2004). L'APC requiert, pour ubiquitinyler les sécurines, la présence de la protéine cdc20 ou fizzy (revue par Amon, 1999). La phosphorylation du complexe APC par le complexe CDK1/cycline B permet également la dégradation de la cycline B par la voie de l'ubiquitine, ce qui entraîne la fin de la mitose (revue par King *et al.,* 1996).

B- La régulation des CDKs au cours du cycle cellulaire

L'activité des CDKs est transitoire au cours du cycle cellulaire; cette caractéristique leur permet d'exercer un contrôle fin et précis tout au long du cycle cellulaire. Le caractère transitoire de leur activité n'est pas dû à une variation de la quantité de protéines présente dans la cellule (revue par Morgan, 1995). Cette activité discontinue est le fruit d'une régulation à quatre niveaux principaux que nous allons évoquer successivement : l'association transitoire avec la cycline, la phosphorylation activatrice, les phosphorylations inhibitrices et enfin l'association transitoire avec des protéines inhibitrices (revue par Morgan, 1997).

1- La régulation par l'association avec la cycline

L'activité de la kinase requiert l'expression de sa cycline partenaire, résultante des niveaux de synthèse et de dégradation de la protéine. Les cyclines doivent leur nom à leur dégradation périodique au cours du cycle cellulaire; à l'exception de la cycline D et de la cycline E dans le cas des cycles embryonnaires, leur accumulation est périodique, en phase avec le cycle cellulaire (revue par Murray, 2004) (figure 8). La protéolyse d'une cycline par le protéasome s'effectue par la voie de dégradation de l'ubiquitine; elle est indispensable à l'inactivation de la CDK associée. L'ubiquitination des cyclines A et B est assurée, comme nous l'avons préalablement précisé, par le complexe multienzymatique APC. La dégradation de la cycline E est quant à elle dépendante d'un autre complexe d'ubiquitination, le SCF (Skp1-culin-F-box) (revue par Ekholm & Reed, 2000).

L'association avec la cycline provoque des changements de conformation au sein de la kinase qui permettent l'activation des CDKs (revue par Morgan, 1997) :

- l'hélice PSTAIRE subit une rotation impliquant un réarrangement au sein de la poche catalytique. Cette modification rend l'orientation de la molécule d'ATP compatible avec la réaction de transfert d'un phosphate vers le substrat

- la boucle T subit un déplacement qui libère l'accès au site catalytique et le rend ainsi plus accessible au substrat.

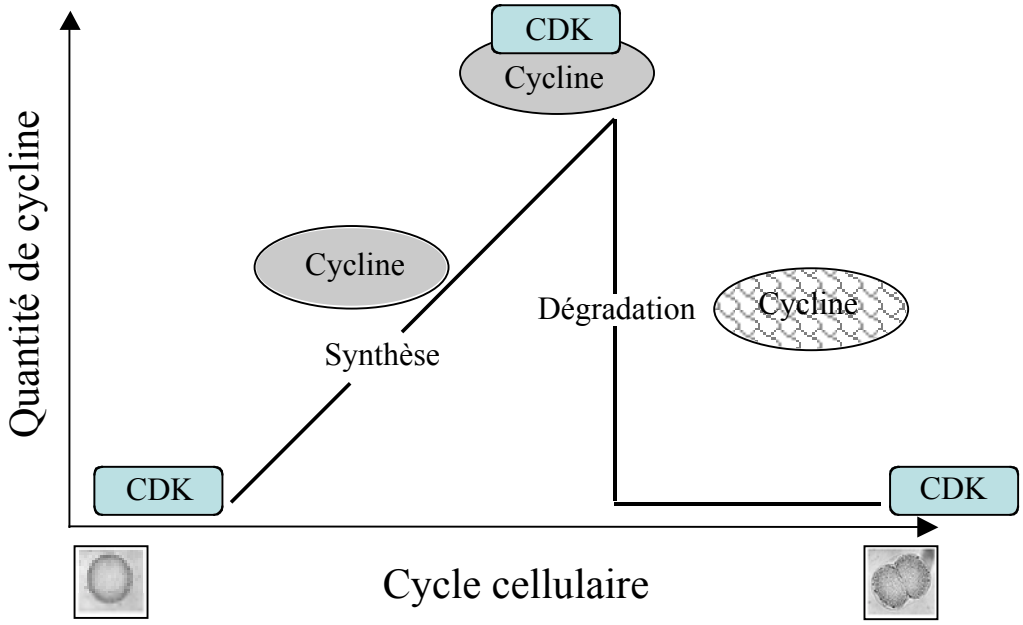


Figure 8 : Le cycle de synthèse et de dégradation de la cycline au cours du cycle cellulaire.

L'association avec le partenaire cycline est également essentielle en raison de la présence de signaux de localisation intracellulaire sur la cycline, signaux qui dirigent la localisation des complexes (revue par Molinari, 2000). Ainsi, en interphase, le maintien du complexe CDK1/cycline B inactif dans le cytoplasme, longtemps attribué à la présence d'un signal de rétention cytoplasmique au sein de la cycline B, est dû à la présence signal d'exclusion nucléaire sur la cycline B (Ookata *et al.,* 1992). L'interaction du complexe avec la protéine phosphatase cdc25 dans le cytoplasme masque ce signal et permet au MPF de

s'accumuler dans le noyau en début de prophase (revues par Molinari, 2000; Vermeulen *et al.,* 2003).

2- La régulation par la phosphorylation activatrice

L'orientation de la boucle T consécutive à l'association avec la cycline permet la phosphorylation d'un résidu thréonine/sérine conservé situé dans la boucle T : le résidu thréonine 161 pour CDK1 et le résidu thréonine 160 pour CDK2, déterminés selon la séquence humaine (Gu *et al.,* 1992). Ces deux étapes, la liaison au partenaire cycline et la phosphorylation activatrice, sont schématisées à la figure 9.

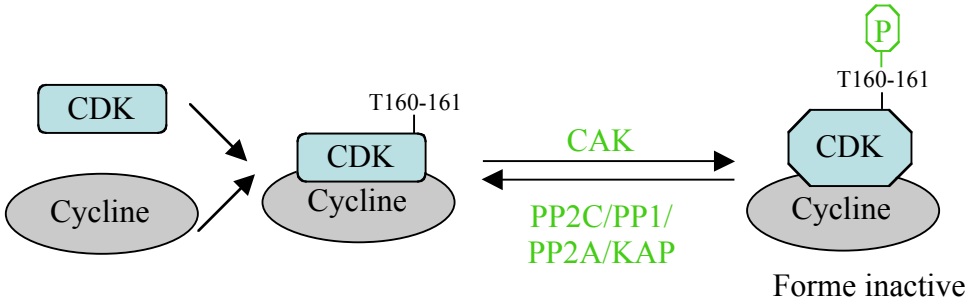


Figure 9 : Les premières étapes de l'activation des CDKs (l'association à la cycline et la phosphorylation activatrice).

La phosphorylation sur thréonine est une étape essentielle à l'activation de toutes les CDKs, à l'exception de CDK5, 7 et 8 (Gould *et al.,* 1991; Krek & Nigg, 1992; Solomon *et al.,* 1992; revue par Morgan, 1997). La modification post-traductionnelle de la thréonine entraîne elle-même des changements de conformation qui, ajoutés à ceux initiés par la fixation de la cycline, contribuent à la réorganisation du site de liaison au substrat et à la stabilisation du complexe (Gould *et al.,* 1991; Jeffrey *et al.,* 1995). La kinase responsable de la phosphorylation sur thréonine est une kinase dite activatrice des CDKs appelée CAK (CDK

activating kinase) (Solomon *et al.,* 1992). La CAK est une enzyme trimérique, constituée chez les eucaryotes de la cycline H, la protéine MAT1 (pour ménage à trois) et la CDK7 (ou protéine MO15) (Fesquet *et al.,* 1993; Solomon *et al.*, 1993; Fisher & Morgan, 1994; Mäkelä *et al.,* 1994; Poon *et al.,* 1994; Tassan *et al.,* 1995). La protéine MAT1 est un facteur d'assemblage; son association au complexe stabilise la liaison CDK/cycline et s'avère essentielle à la formation d'un complexe actif (Devault *et al.,* 1995; Tassan *et al.,* 1995).

La déphosphorylation du résidu activateur Thr160/161 est essentielle à l'inactivation de la kinase en sortie de phase M (Gould *et al.,* 1991; Lorca *et al.,* 1992). Plusieurs protéines potentielles sont impliquées directement ou indirectement dans cette déphosphorylation : une protéine phosphatase type 2A appelée INH (inhibiteur de la M-phase) (Solomon *et al.,* 1990; revue par Janssens & Goris, 2001), les protéines phosphatases 2C (De Smedt *et al.,* 2002), la protéine KAP (Kinase Associated Protein) (revue par Harper & Adams, 2001), une phosphatase de type 1 (Lorca *et al.,* 1992).

3- La régulation par les phosphorylations inhibitrices

a- L'inhibition par les phosphorylations

Toutes les CDKs sont régulées par la phosphorylation de résidus inhibiteurs, à l'exception de CDK7 (Solomon *et al.,* 1990; Meijer *et al.,* 1991; revue par Nigg, 1995). Pour les CDK1 et 2 , les résidus inhibiteurs sont au nombre de deux : un résidu thréonine (Thr-14 de la séquence humaine) et un résidu tyrosine (Tyr-15 de la séquence humaine). Pour les CDK4, 6 et 9, il n'y a qu'un résidu inhibiteur, soit thréonine, soit tyrosine (revue par Nigg, 1995). Ces phosphorylations inhibent l'activité des CDKs (Gould & Nurse, 1989; Gould *et al.,* 1990; Krek & Nigg, 1991a et b; Parker *et al.*, 1992). Ces résidus sont situés au bord de la poche de fixation de l'ATP, ce qui interfère avec la fixation de l'ATP lorsqu'ils sont phosphorylés (Jeffrey *et al.,* 1995). Les phosphorylations inhibitrices ne semblent pas jouer un

rôle majeur dans la régulation de CDK2; en revanche, elles sont cruciales pour la régulation de la kinase CDK1 (Chow *et al.*, 2003).

b- Les kinases responsables des phosphorylations inhibitrices

La phosphorylation de ces deux résidus est assurée par les kinases Myt1 et Wee1/Mik1. La kinase Myt1 possède une double spécificité et peut phosphoryler à la fois la thréonine 14 (Mueller *et al.,* 1995) et la tyrosine 15 (Lundgren *et al.,* 1991). La kinase Wee1/Mik1 peut phosphoryler uniquement la tyrosine 15 (Honda *et al.,* 1992; Parker & Piwnica-Worms, 1992; McGowan & Russell, 1993; Lee *et al.*, 1994).

c- Les phosphatases responsables des déphosphorylations activatrices

Les protéines tyrosine phosphatases de la famille cdc25 déphosphorylent les deux résidus Thr-14 et Tyr-15 (Dunphy & Kumagai, 1991; Gautier *et al.,* 1991; Millar *et al.,* 1991; Lee *et al.,* 1992; Honda *et al.,* 1993; revues par Millar & Russell, 1992; Jessus & Ozon, 1995); elles possèdent une double spécificité et assurent ainsi la levée de l'inhibition de l'activité du complexe CDK/cycline. La figure 10 illustre cette étape de déphosphorylation activatrice.

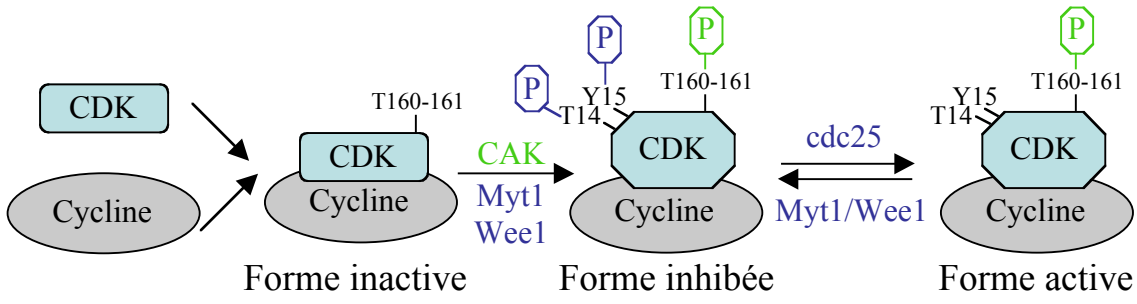


Figure 10 : L'activation des CDKs (la liaison à la cycline, la phosphorylation activatrice et les déphosphorylations activatrices).

Trois isoformes très similaires de la phosphatase existent chez les Mammifères : cdc25A, cdc25B et cdc25C (Galaktionov & Beach, 1991; revue par Pommier & Kohn, 2003). Les fonctions respectives de chacune des trois cdc25 n'ont pas encore été clairement établies mais chacune intervient à des moments distincts du cycle.

L'isoforme cdc25A présente un pic d'activité en G1 (Jinno *et al.,* 1994) mais semble être impliquée également en G1/S, S et G2/M (Kim *et al.*, 1999a; revues par Donzelli & Draetta, 2003; Wolfe & Gould, 2004). En G1, cdc25A participe à la déphosphorylation du résidu tyrosine 15 de CDK4 (Iavarone & Massagué, 1997). En G1/S, cdc25A active le complexe CDK2/cycline E qui en retour la phosphoryle et ainsi l'active (revue par Donzelli & Draetta, 2003). En mitose, cdc25A est stabilisée par phosphorylation par le complexe CDK1/cycline B. La phosphatase s'associe et active le complexe CDK1/cycline B (Mailand *et al.,* 2002); cdc25A participe ainsi à l'amplification du complexe CDK1/cycline B en phase M.

Les isoformes B et C ont des rôles plus limités dans le temps que cdc25A puisqu'elles agissent autour de la transition G2/M. Ces deux isoformes sont en effet actives en phase G2 (Ducommun *et al.,* 1990; Sadhu *et al.,* 1990); la fonction de cdc25B n'est pas totalement élucidée, il semblerait que cdc25B amorce l'activation de CDK1/cycline B, prise en charge par la suite par cdc25C (Gautier *et al.,* 1991). cdc25C est donc la principale phosphatase responsable de la déphosphorylation de CDK1/cycline B à l'entrée en phase M (Strausfeld *et al.,* 1994).

d- La régulation des kinases

Les deux kinases Wee-1 et Myt-1 sont actives sous formes déphosphorylées et inactives sous formes phosphorylées (Russell & Nurse, 1987; Tang *et al.,* 1993). Les phosphatases 1 et 2A déphosphorylent les deux kinases Wee-1 et Myt-1. Plusieurs kinases

responsables de leur phosphorylation ont été identifiées : Akt (ou PKB pour Protéine Kinase B) (Okumura *et al.,* 2002), p90 RSK (Palmer *et al.,* 1998), nim1 (Coleman *et al.,* 1993; Parker *et al.,* 1993; Wu & Russell, 1993), une kinase de la famille polo (Okano-Uchida *et al.,* 2003). L'activité de ces kinases provoque une inhibition de l'activité de Myt1/Wee1 et renverse ainsi l'équilibre entre les kinases inhibitrices Myt1 et Wee1 et la phosphatase activatrice cdc25. La régulation par phosphorylation des kinases Myt1/Wee1 est illustrée à la figure 11.

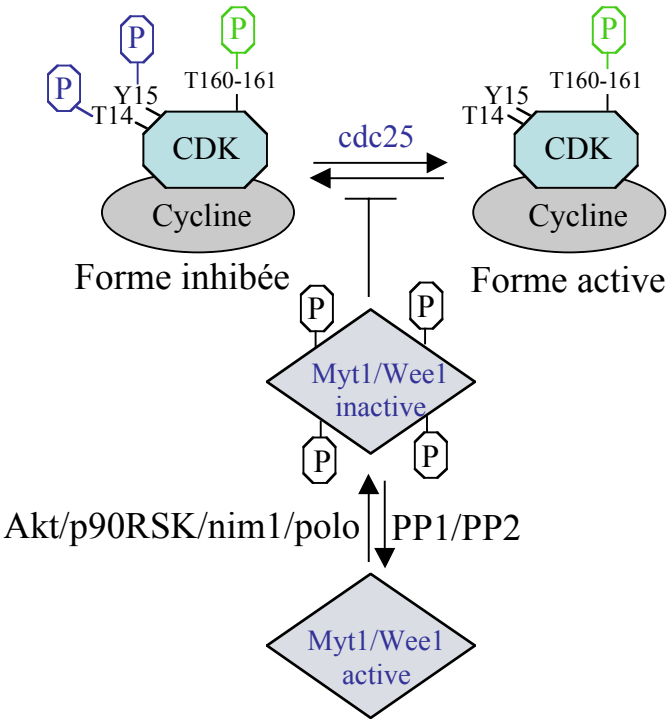


Figure 11 : La régulation des kinases Myt1 et Wee1.

e- La régulation des phosphatases

L'activité des phosphatases cdc25 est régulée à plusieurs niveaux : par des évènements de protéolyse, par la phosphorylation de résidus inhibiteurs associée à des modifications de localisation intracellulaire et par la phosphorylation de résidus activateurs (Izumi *et al.,* 1992;

Kumagai & Dunphy, 1992; revue par Jessus & Ozon, 1995). Pour déphosphoryler les résidus inhibiteurs des CDKs, les protéines phosphatases cdc25 s'associent physiquement avec les complexes CDK/cycline actifs (Galaktionov & Beach, 1991).

La régulation par protéolyse est essentielle en ce qui concerne la phosphatase cdc25A. Elle possède un "turn-over" rapide tout au long de l'interphase; elle est principalement active en G1 et continue de s'accumuler en phases S et G2. En G2/M, le complexe CDK1/cycline B stabilise cdc25A par phosphorylation et empêche ainsi la phosphatase d'être ubiquitinée (revue par Donzelli & Draetta, 2003). En sortie de mitose, l'inhibition du complexe CDK1/cycline B et l'activation de l'APC permettent la protéolyse de cdc25A par la voie de l'ubiquitination. La quantité et l'activité de cdc25B ne sont pas stables au cours du cycle cellulaire; elles augmentent en phase S et en début de phase G2 pour atteindre un pic en G2/M. En sortie de mitose, le complexe CDK1/cycline A phosphoryle cdc25B ce qui induit sa dégradation par le protéasome (revue par Donzelli & Draetta, 2003). En revanche, le niveau de protéine de cdc25C est constant au cours du cycle cellulaire (Izumi *et al.,* 1992; Jessus & Beach, 1992); l'augmentation de son activité en phase G2 n'est donc pas le fruit d'une régulation par protéolyse (revue par Molinari, 2000). L'association entre cdc25C et le complexe CDK1/cycline B est dépendante du cycle cellulaire puisqu'elle atteint son maximum en phase M (Gautier *et al.,* 1991; Jessus & Beach; 1992).

La localisation intracellulaire de cdc25 est un aspect de sa régulation qui a été largement étudié et controversé; elle dépend à la fois de la phosphorylation d'un résidu inhibiteur et de la présence de signaux spécifiques de localisation. Le résidu inhibiteur de cdc25 impliqué dans la localisation est un résidu sérine conservé (sérine 216 sur cdc25C et sérine 309 pour cdcd25B à partir des séquences humaines) (Sanchez *et al.,* 1997). La phosphorylation de ce résidu provoque la liaison à une protéine appelée 14-3-3. Les protéines de la famille 14-3-3 sont connues pour reconnaître spécifiquement des résidus phosphosérines

dans les protéines régulant le cycle cellulaire (revue par Hermeking, 2003). Plusieurs kinases sont impliquées dans la phosphorylation du résidu inhibiteur : cTAK1 (cdc twenty-five C associated protein kinase), la kinase de stress p38, les kinases Chk1 et Chk2 (Chk pour Checkpoint) ou encore la PKA (protéine kinase A) (revue par Wolfe & Gould, 2004) (figure 12). L'interaction de cdc25 avec 14-3-3 maintient l'inactivité de la phosphatase principalement pour deux raisons (Margolis & Kornbluth, 2004) :

- elle s'oppose à la translocation nucléaire des phosphatases (Dalal *et al.,* 1999; Kumagai & Dunphy, 1999)
- elle masque certains résidus requis pour l'interaction avec la cycline B, empêchant l'interaction de CDK1/cycline B avec le site catalytique de cdc25.

Les phosphatases cdc25 B et C sont donc maintenues sous formes inactives grâce à leur liaison à une protéine de la famille 14-3-3 (Sanchez *et al.,* 1997; Kumagai *et al.,* 1998). À la transition G2/M, la déphosphorylation par la phosphatase de type 1 (Margolis *et al.,* 2003) du résidu sérine inhibiteur libère 14-3-3 et permet l'activation de cdc25 (revue par Hermeking, 2003).

La phosphorylation de résidus activateurs est également impliquée dans la régulation de l'activité de la phosphatase. Pendant l'interphase, les résidus activateurs sont déphosphorylés sous l'effet des phosphatases 1 et/ou 2A; la phosphatase est ainsi maintenue inactive (Clarke *et al.,* 1993; Karaïskou *et al.,* 1998; revue par Jessus et Ozon, 1995; Margolis & Kornbluth, 2004) (figure 12). Plusieurs kinases sont responsables de l'hyperphosphorylation des résidus activateurs de cdc25C : une kinase de la famille polo et le complexe CDK1/cycline B lui-même. En sortie de mitose, les phosphatases 1 et 2A provoquent une diminution de l'activité de cdc25 (Izumi *et al.,* 1992; revue par Janssens & Goris, 2001).

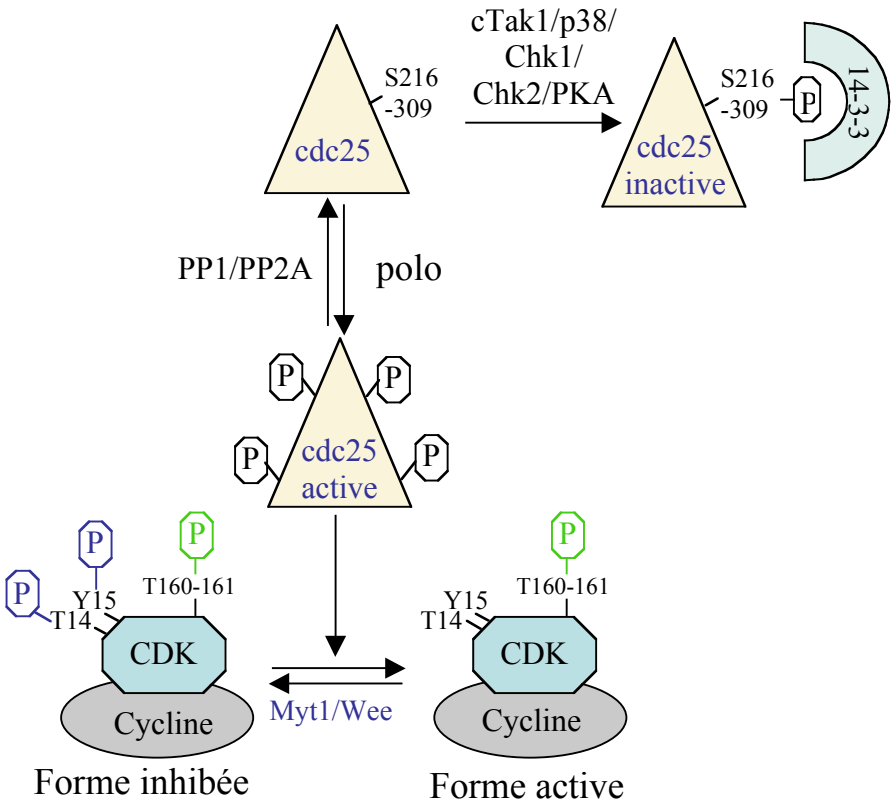


Figure 12 : La régulation des phosphatases cdc25.

f- L'auto-amplification du complexe CDK1/cycline B

Le complexe CDK1/cycline B possède, en plus des mécanismes classiques de régulation, un mode de régulation particulier qui explique son activation considérable en mitose. Cette activation s'effectue en deux temps : une activation initiale linéaire déclenchant une amplification exponentielle.

Le mécanisme précis du déclenchement de la première activation n'est pas élucidé. L'amorce de CDK1/cycline B actif pourrait être la conséquence d'une activation des cdc25 principalement A et B (revue par Donzelli & Draetta, 2003) ou d'une inhibition des kinases Wee1/Myt1.

Dans un second temps, deux processus de rétrocontrôle se mettent en place et permettent ainsi la boucle d'auto-amplification du MPF : un rétrocontrôle négatif sur les kinases Wee1/Myt1 et un rétrocontrôle positif sur les phosphatases cdc25B/C.

Dans le rétrocontrôle négatif, l'amorce de complexe CDK1/cycline B activé va d'une part inhiber les phosphatases 1 et 2A (Picard *et al.,* 1991) et d'autre part activer une kinase de la famille polo, stimulant ainsi la phosphorylation et donc l'inactivation de la kinase Wee1 (Parker *et al.,* 1993; Tang *et al.,* 1993; Bartholomew *et al.*, 2001; Nakajima *et al.*, 2003) (figure 13). Le MPF provoque une inhibition de l'activité des kinases Wee1/Myt1, inhibition qui stimule en retour l'activité du MPF.

Dans le rétrocontrôle positif, la kinase CDK1/cycline B activée hyperphosphoryle cdc25C sur les résidus activateurs et active ainsi la phosphatase (Hoffman *et al.,* 1993; Strausfeld *et al.,* 1994; Karaïskou *et al.,* 1998 et 1999). De plus, l'amorce de CDK1 actif conduit également à l'activation de la kinase de la famille polo (Abrieu *et al.,* 1998; Karaïskou *et al.,*1999; Qian *et al.,* 2001) qui coopère, avec CDK1/cycline B, à l'hyperphosphorylation activatrice de cdc25 (Kumagai & Dunphy, 1996; Peter *et al.,* 2002) (figure 13). Le MPF augmente donc l'activité de cdc25, activité qui en retour active le MPF.

L'association de ces deux processus d'auto-amplification est responsable de l'activation rapide du complexe CDK1/cycline B en phase M. Ce processus général s'applique à toutes les cellules entrant en division (Maller, 1995).

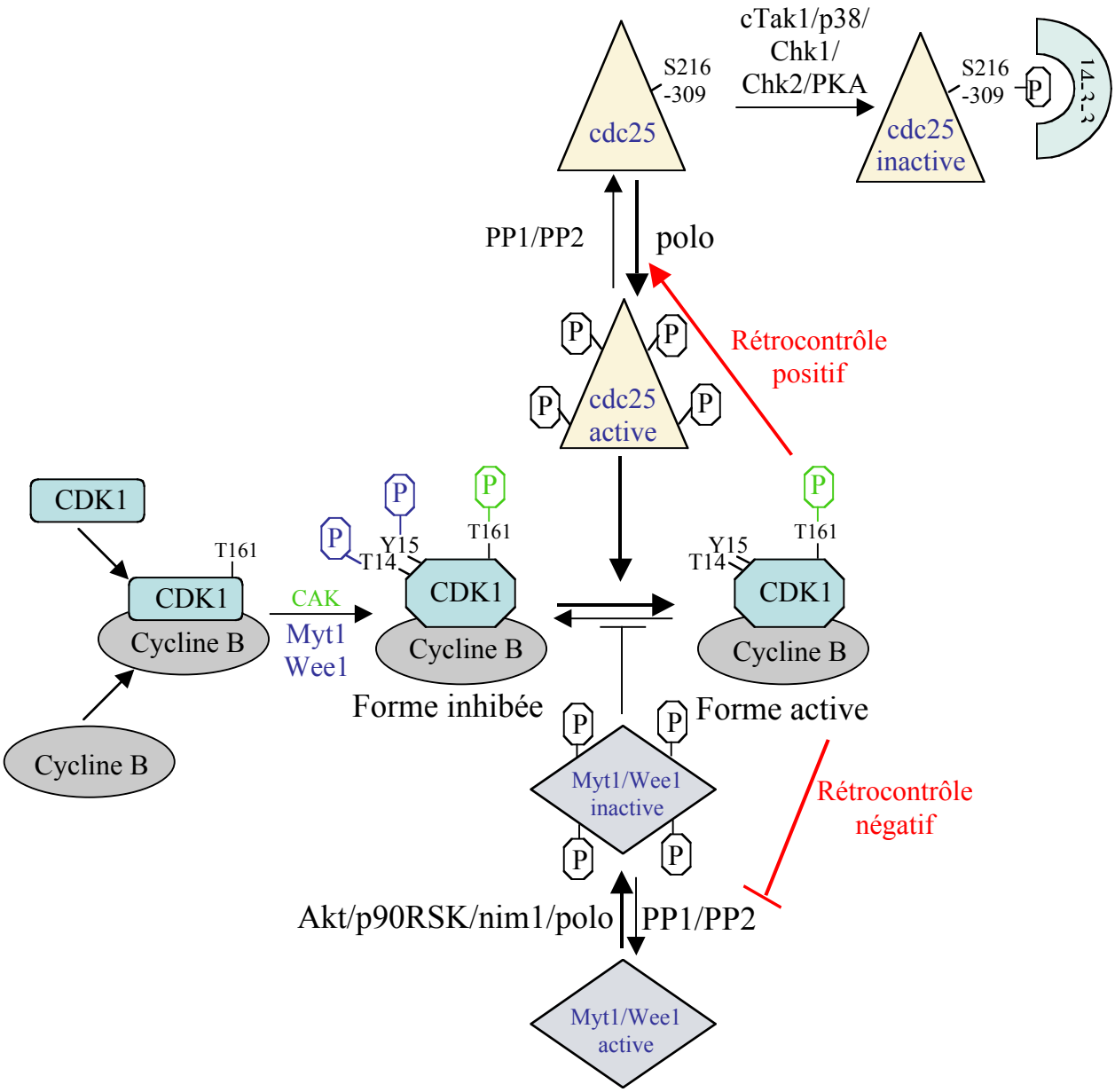


Figure 13 : La boucle d'auto-amplification du complexe CDK1/cycline B en phase M.

4- La régulation par l'association avec des protéines inhibitrices

L'association des CDKs avec certaines protéines conduit à l'inhibition de l'activité des CDKs. Deux familles d'inhibiteurs physiologiques de CDKs appelés CKIs (pour Cyclin-dependent kinases Inhibitors) ont été mises en évidence (revues par Sherr & Roberts, 1999;

Pommier & Kohn, 2003) : la famille des protéines INK4 (pour Inhibiteurs de CDK4) spécifiques de CDK4 et 6 et la famille CIP/KIP à spectre d'action plus large.

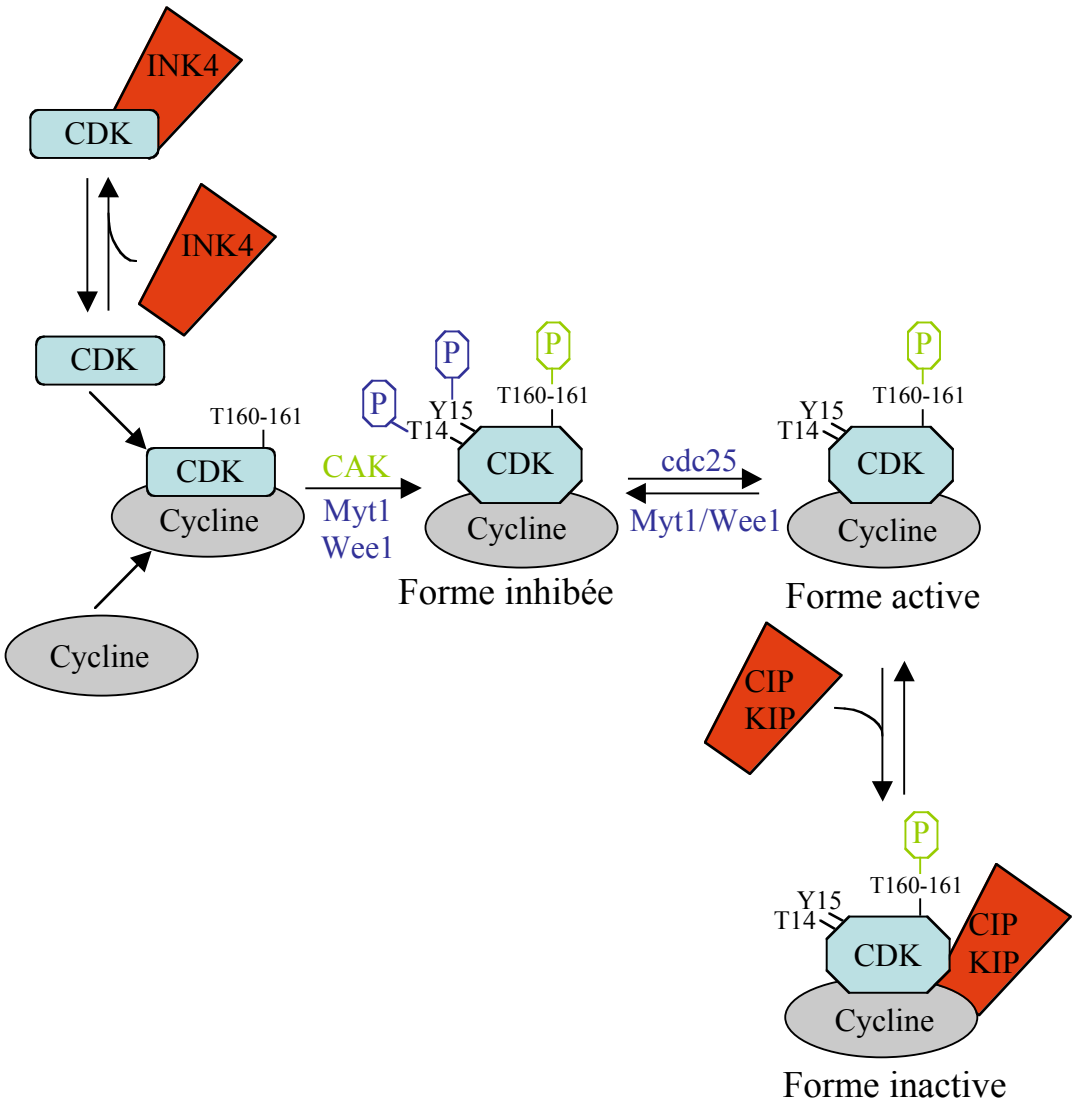


Figure 14 : La régulation des complexes CDK/cycline par l'association aux protéines inhibitrices.

Les deux familles d'inhibiteurs diffèrent également au niveau de leur mode d'action (figure 14) : les membres de la famille INK4 se lient à la CDK monomérique inhibant ainsi son association à la cycline alors que les membres de la famille CIP/KIP inactivent les complexes CDK/cycline après les avoir fixés (revue par Pavletich, 1999). La famille INK4

comprend les membres p15, p16, p18 et p19; la famille CIP/KIP comprend les protéines p21, p27 et p57. Par exemple, la protéine p27 de la famille CIP/KIP s'associe au complexe CDK2/cycline A actif, le régulateur de la phase S. p27 interagit avec les deux sous-unités du complexe et mime la molécule d'ATP qui est alors incapable de se loger dans la poche catalytique du complexe CDK2/cycline A (Russo *et al.,* 1996). La liaison à p27 inhibe donc l'activité kinasique du complexe CDK2/cycline A.

Nous avons décrit les principaux mécanismes responsables de la régulation des complexes CDK/cycline au cours du cycle cellulaire. Les interconnexions entre ces mécanismes sont nombreuses, ce qui explique la complexité des phases de transition du cycle cellulaire notamment en ce qui concerne la chronologie des évènements impliqués. Au sein de ces multiples régulations, nous allons voir quels mécanismes utilise la cellule pour assurer la fidélité de la transmission des gènes aux cellules filles.

C- Les mécanismes de surveillance du cycle cellulaire

1- La présentation des mécanismes de surveillance appelés checkpoints

Le mécanisme de division cellulaire est extrêmement complexe; sa régulation permet la succession des différentes étapes le constituant. Les phases G1, S, G2 et M s'enchaînent de façon coordonnée, chaque phase ne pouvant commencer que lorsque la précédente s'est déroulée correctement. La cellule en division possède en effet des mécanismes de surveillance du cycle appelés "checkpoints" qui se mettent en place lorsque des évènements délétères se produisent et assurent ainsi la fidélité de la transmission génétique (revues par Hartwell & Weinert, 1989; Nurse, 2000; Nigg, 2001). Le checkpoint est l'ensemble du processus qui se

déclenche à la détection de l'anomalie et se matérialise par la production d'un frein s'exerçant sur les évènements normaux constitutifs de la régulation du cycle cellulaire (revues par Walworth, 2000; Dorée, 2003; Pommier & Kohn, 2003; Stewart *et al.,* 2003). Les mécanismes activés conduisent, lorsque l'ADN est endommagé ou mal réparti, à un arrêt du cycle cellulaire permettant à la cellule soit de réparer cet ADN endommagé ou son accrochage aux microtubules, soit, si les dommages sont trop importants, d'enclencher un programme de mort cellulaire, l'apoptose (revue par Norbury & Zhivotovsky, 2004). L'activation du checkpoint, par le délai qu'elle induit dans le cycle cellulaire en cours, aide à la réparation puis maintient le cycle bloqué jusqu'à réparation complète (revue par Bartek & Lukas, 2001). Dans les cellules eucaryotes, deux points de contrôle existent.

Le premier point de contrôle concerne l'ADN et comprend à la fois le contrôle de la réplication qui vérifie la fidélité du processus et le contrôle de l'état de l'ADN pendant toute la durée du cycle cellulaire (revue par Nyberg *et al.*, 2002). C'est le "DNA damage checkpoint" ou "DNA response checkpoint" :

- en phase G1, lorsque l'ADN est endommagé, il ne peut être répliqué avant d'être préalablement réparé (revue par Nurse, 2000). Le processus qui aboutit au blocage de l'entrée en phase S par inhibition de CDK2 jusqu'à réparation de l'ADN endommagé est appelé checkpoint G1/S
- en phase S, lorsque l'ADN est endommagé ou lorsque la réplication ne se déroule pas correctement, le checkpoint de la phase S se déclenche
- en phase G2, lorsque l'ADN est endommagé, il ne peut être réparti entre les deux cellules-filles avant d'être préalablement réparé (revue par Nurse, 2000). Le processus qui se conclue par un retard de l'activité du complexe CDK1/cycline B freinant ainsi l'entrée en phase M est appelé checkpoint G2 DNA damage ou checkpoint G2/M. Le point de contrôle G2/M

concerne tous types de cellules en division, les cellules somatiques et embryonnaires ainsi que les ovocytes.

Le second point de contrôle est appelé checkpoint du fuseau (spindle checkpoint). La cellule vérifie que les chromosomes sont correctement attachés au fuseau, orientés en une plaque métaphasique et que leur ségrégation s'effectue correctement (revues par Amon, 1999; Nurse, 2000). Si tel n'est pas le cas, le mécanisme de contrôle se déclenche et la cellule reste en métaphase. Ce mécanisme de régulation de la transition métaphase/anaphase est conservé au cours de l'évolution.

2- Les checkpoints de l'ADN

Beaucoup d'incertitudes existent quant aux protéines responsables de la reconnaissance des structures aberrantes au niveau de l'ADN, appelées senseurs (revue par Zhou & Elledge, 2000). En revanche, les éléments de la voie de transduction, appelés transducteurs, sont bien connus : les kinases ATM (pour "Ataxia Telangiectasia Mutated") et ATR (pour "ATM and Rad3-related"), la kinase de stress p38, une kinase de la famille polo (revues par Nurse, 1997; Zhou & Elledge, 2000). Les transducteurs sont chargés de la coordination entre le cycle cellulaire et le métabolisme de l'ADN (revue par Pommier & Kohn, 2003).

Les kinases ATM et ATR appartiennent à la famille des phosphatidylinositol 3-kinase-like kinases (PIKKs) : elles vont agir sur des effecteurs responsables du retard du cycle cellulaire. Les effecteurs sont les kinases Chk1 et Chk2 (Chk pour checkpoint) et directement les phosphatases cdc25. Les kinases ATM et ATR phosphorylent et activent les sérine/thréonine kinases : la kinase Chk2 est principalement activée par ATM, alors que Chk1

est principalement activée par ATR (revue par Pommier & Kohn, 2003). Ces deux voies parallèles, la voie ATR-Chk1 et la voie ATM-Chk2, interagissent entre elles (figure 15).

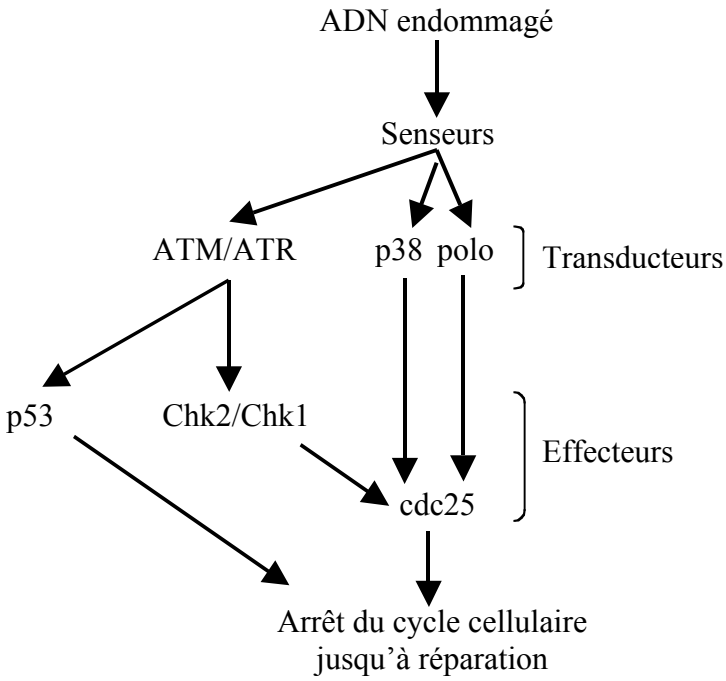


Figure 15 : Les checkpoints de l'ADN.

Les checkpoints de l'ADN partagent les senseurs et les voies de transduction. En revanche, en fonction du moment du cycle cellulaire auquel le mécanisme de surveillance est activé, les effecteurs sont différents.

a- Les effecteurs du checkpoint en phase G1

Dans le checkpoint G1/S, un des effecteurs connus est cdc25A. Les 2 kinases Chk1 et Chk2 vont phosphoryler cdc25A et accélérer ainsi sa dégradation dans le protéasome par la voie de l'ubiquitine. En conséquence, CDK2 reste inactive et le cycle cellulaire reste en G1 (revues par Bartek & Lukas, 2001; Iliakis *et al.,* 2003) (figure 16).

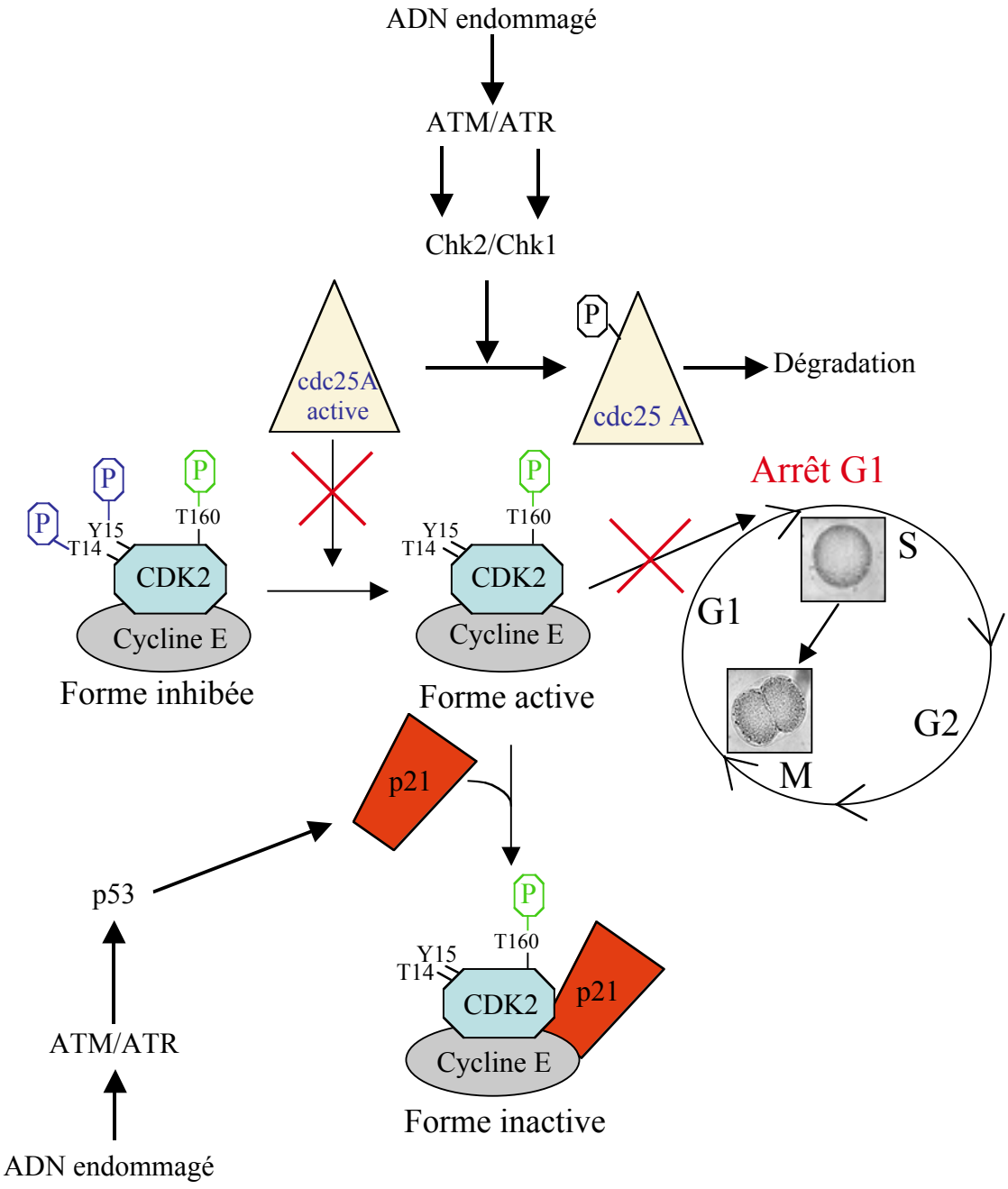


Figure 16 : Les effecteurs du checkpoint G1/S.

Une seconde voie existe dans le point de surveillance G1/S : il implique l'activation d'un autre effecteur, la protéine suppresseur de tumeurs p53. Cette activation va stimuler l'expression de plusieurs gènes dont certains codent pour des inhibiteurs de CDKs qui jouent un rôle crucial dans ce mécanisme de surveillance (revues par Pommier & Kohn, 2003;

Stewart *et al.,* 2003; Vermeulen *et al.,* 2003) (figure 16). L'induction et l'activation de p53 conduit à l'accumulation de p21 qui va inactiver le complexe CDK2/cycline E, dont l'activité est responsable de la transition G1/S du cycle cellulaire (revue par Ekholm & Redd, 2000). Cette seconde voie du checkpoint G1/S est efficace plus tardivement que la première car elle requiert une phase d'expression de gènes.

b- L'effecteur du checkpoint en phase S

L'effecteur du checkpoint de la phase S est la phosphatase cdc25A. En réponse à un dommage de l'ADN ou un problème de réplication, la voie ATM/Chk2 s'active et provoque la dégradation de la phosphatase cdc25A (Falck *et al.,* 2001). L'activité de CDK2 est alors inhibée et les éléments de la machinerie de réplication de l'ADN ne peuvent s'assembler correctement au niveau de la chromatine. Le cycle cellulaire s'arrête en phase S (revue par Nyberg *et al.,* 2002). Beaucoup d'incertitudes subsistent quant au mécanisme régulateur du checkpoint en phase S.

c- Les effecteurs du checkpoint en phase G2

Dans le checkpoint G2/M, les principaux effecteurs connus sont les phosphatases cdc25B et C (O'Connor *et al.,* 1994; Peng *et al.,* 1997). L'activité des phosphatases cdc25 peut être inhibée par plusieurs voies de transduction.

La phosphatase cdc25B peut être phosphorylée sur son résidu sérine inhibiteur par les kinases Chk1 et Chk2 ou la kinase de stress p38 et la phosphatase cdc25C peut être phosphorylée par les kinases Chk1 et Chk2 (Blasina *et al.,* 1999; Furnari *et al.,* 1999; Bulavin *et al.,* 2001; revues par Pearce & Humphrey, 2001; Dorée, 2003). Cette phosphorylation inhibitrice rend impossible la libération de 14-3-3; la phosphatase cdc 25 se retrouve donc séquestrée dans le cytosol à distance de son substrat nucléaire. L'inactivation des complexes

CDK2/cycline A et CDK1/cycline B qui en résulte déclenche un arrêt dans la progression du cycle cellulaire. L'interaction entre cdc25 et la cycline B ne peut donc avoir lieu (revue par Pommier & Kohn, 2003). L'exclusion de la cycline B du noyau participe également à l'inactivation du complexe CDK1/cycline B (revue par Molinari, 2000). En conséquence, CDK1 reste inactive et le cycle cellulaire est arrêté en G2/M (Peng *et al.,* 1997; Sanchez *et al.,* 1997; revues par Zhou & Elledge, 2000; Stewart *et al.,* 2003) (figure 17).

La phosphatase cdc25C peut également être inhibée par le biais d'une kinase de la famille polo. La détection d'une anomalie déclenche l'inhibition de la kinase polo et en conséquence l'inhibition de l'hyperphosphorylation des résidus activateurs de cdc25C nécessaire à l'activation de la phosphatase (revues par Iliakis *et al.,* 2003; Pommier & Kohn, 2003) (figure 17). L'inhibition de la kinase de la famille polo provoque également une inhibition de la phosphorylation de la cycline B, indispensable à la translocation nucléaire du complexe actif.

Des études récentes montrent que la protéine p53 jouerait également un rôle dans l'arrêt en G2 après dommage de l'ADN dans les cellules tumorales (Bunz *et al.,* 1998) : elle n'est pas nécessaire pour la décision d'arrêt en G2 mais joue un rôle dans sa persistance en bloquant l'activité du complexe CDK1/cycline B (revue par Pommier & Kohn, 2003). p53 peut alors utiliser diverses voies moléculaires et notamment induire un inhibiteur de CDKs, p21, capable d'inhiber directement et indirectement la kinase CDK1 (Smits *et al.,* 2000; revue par Pommier & Kohn, 2003).

Plusieurs hypothèses existent concernant d'autres effecteurs qui seraient impliqués dans le mécanisme de surveillance en G2 :

- l'activation des checkpoints G2/M peut provoquer l'arrêt en G2 en supprimant, par exemple, l'expression de la cycline A ou en augmentant l'activité des kinases inhibitrices Wee1/Myt1 (revue par Raleigh & O'Connell, 2000; Pommier & Kohn, 2003).

- la phosphatase cdc25A est impliquée dans la transition G2/M du cycle cellulaire. Sa participation en tant qu'effecteur dans le checkpoint G2/M est pour le moment hypothétique (revue par Donzelli & Draetta, 2003) : elle implique une protéolyse prématurée de la phosphatase qui serait responsable d'un arrêt en phase G2 (Busino *et al.*, 2004). Cette hypothèse reste à vérifier tant l'implication de cdc25A dans la phase M soulève des interrogations.

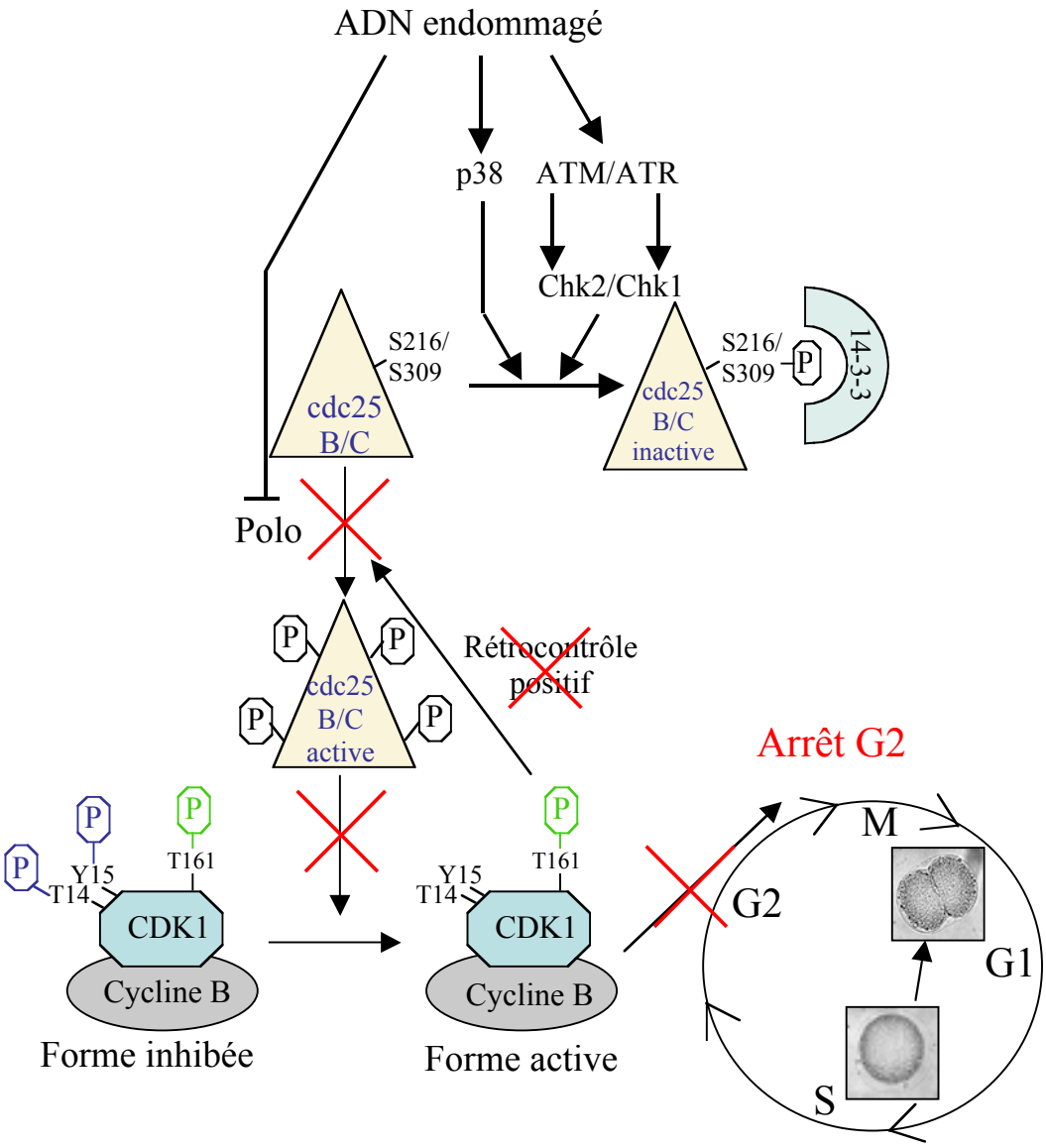


Figure 17 : Les effecteurs du checkpoint G2/M.

Il semble donc que la cellule puisse utiliser plusieurs voies de transduction pour inhiber l'activité du complexe CDK1/cycline B et assurer ainsi l'arrêt du cycle cellulaire en cas de dommage de l'ADN. Le choix de la voie de transduction utilisée est fonction du type de dommage occasionné à l'ADN.

3- Le checkpoint du fuseau mitotique

Le spindle checkpoint est le point de contrôle de l'intégrité du fuseau mitotique; il arrête la division cellulaire avant que ne se produise la séparation des chromatides. Il est essentiel pour assurer de la fidélité de la transmission des chromosomes. Les chromatides sont attachées aux microtubules du fuseau mitotique par l'intermédiaire de complexes protéine/ADN appelés kinétochores. Le checkpoint s'active soit par l'absence d'une force de tension correcte entre un kinétochore et les microtubules, soit tout simplement par la présence d'un kinétochore non attaché.

Le déclenchement du checkpoint stimule l'activation d'un transducteur, la protéine kinase, Mps1, qui va phosphoryler la protéine Mad1 (mitotic arrest deficient). Cette phosphorylation est dépendante d'autres protéines du checkpoint : la protéine kinase Bub1 (budding uninhibited by benzimidazole), Bub3 et Mad2 (revue par Amon, 1999). L'ensemble de ces protéines composantes du checkpoint est localisé sur les kinétochores des chromatides; lorsqu'un défaut est détecté, ces protéines composantes du checkpoint interagissent avec le complexe cdc20-APC, ce qui inhibe son activité d'ubiquitination (revue par Nigg, 2001). Ce complexe est alors incapable d'ubiquitiner les sécurines et la cohésion des chromatides est maintenue. L'inactivation de l'APC empêche également la dégradation de la cycline B en anaphase. Le complexe CDK1/cycline B reste alors actif et la cellule se bloque en métaphase.

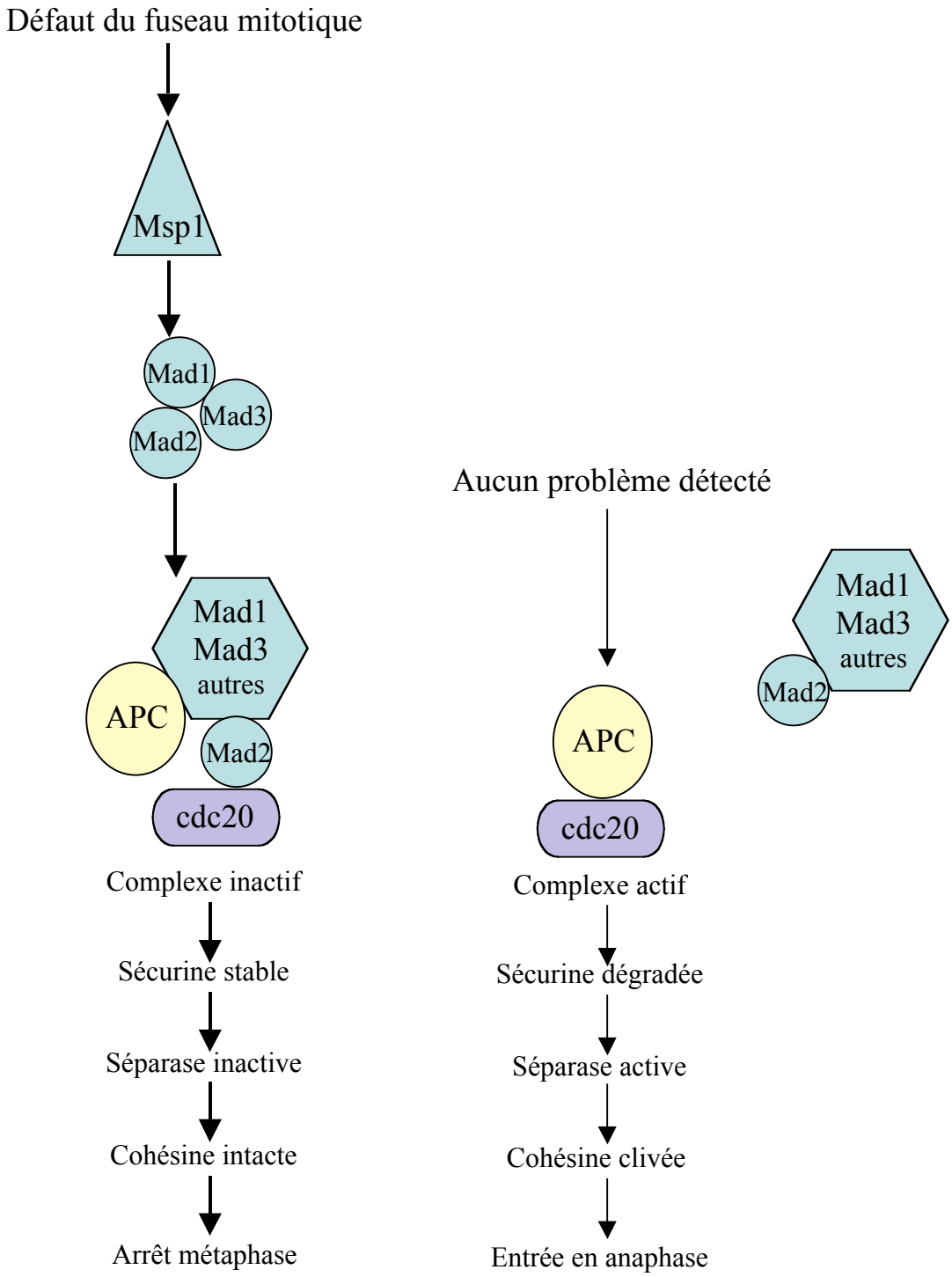


Figure 18 : Le checkpoint du fuseau mitotique

Quand les défauts du fuseau sont réparés et que tous les kinétochores sont attachés aux microtubules, Mad2 se dissocie du complexe. Le complexe cdc20-APC peut alors ubiquitiner les sécurines inhibitrices de l'anaphase et initier la séparation des chromatides sœurs permettant aux cellules d'entrer en anaphase. L'activation du checkpoint du fuseau est illustrée à la figure 18.

4- Les activateurs de checkpoints

Les perturbations de l'ADN cellulaire sont le résultat de stimuli externes par exemple par les rayons ultraviolets (UV) ou des composés génotoxiques mais peuvent également être consécutives à des perturbations intrinsèques de la réplication de l'ADN. Nous citerons quelques exemples de ces perturbations.

L'irradiation aux UV provoque la formation de dimères au sein de la molécule d'ADN. Le blocage de la réplication qui en résulte active le checkpoint en stimulant principalement la voie ATR/Chk1 (revue par Pommier & Kohn, 2003) mais d'autres voies peuvent être également impliquées (revue par Stewart *et al.*, 2003). Les cibles de ces lésions sont les phosphatases cdc25 :

- cdc25 A peut être activée par la voie ATR et déclencher ainsi un arrêt en phase G1 ou S
- cdc25B peut être activée par la kinase de stress p38 et déclencher ainsi un arrêt en G2
- cdc25C peut être activée par la voie ATR et déclencher ainsi un arrêt en G2.

Autre exemple avec celui des rayonnements ionisants qui provoquent des cassures double-brin de l'ADN. Ces lésions stimulent principalement la voie ATM/Chk2 (revues par Iliakis *et al.,* 2003; Pommier & Kohn, 2003). Mais tout comme dans le cas de l'exposition aux

UV, diverses voies peuvent être impliquées et les principales cibles sont là encore les phosphatases cdc25 (revue par Iliakis *et al.,* 2003) :

- cdc25 A peut être activée par la voie ATM/ATR et déclencher ainsi un arrêt en phase G1 ou en phase S
- cdc25B peut être activée par la kinase de stress p38 provoquant ainsi un arrêt en G2
- cdc25C peut être activée par la voie ATM provoquant ainsi un arrêt en G2.

Des drogues qui altèrent les microtubules par dépolymérisation (nocodazole, vinblastine) ou par stabilisation (taxol) déclenchent le checkpoint du fuseau et provoquent ainsi un arrêt en métaphase (revue par Amon, 1999).

Les produits dits cancérigènes favorisent l'apparition d'anomalies dans la régulation de la division d'une cellule en cycle. Cette anomalie libère alors la cellule des multiples régulations qui limitent ses capacités de division et peut alors être transmise aux cellules-filles. La cellule devenue cancéreuse va alors se développer outre mesure car libérée de tout contrôle. Cette anarchie conduit à l'apparition d'une tumeur (1mm de diamètre correspond 1 million de cellules cancéreuses, 1 cm de diamètre : 1 milliard de cellules cancéreuses, etc...). La tumeur va alors, par métastase, quitter son tissu originel et envahir tout l'organisme où elle entraînera des conséquences dramatiques.

5- Le cycle cellulaire dérégulé

La survie de l'organisme est assurée tant que les checkpoints sont activés et efficaces. En revanche, elle est altérée par la dérégulation de ces mécanismes. Une altération directe d'un des composants de la machinerie du cycle cellulaire, comme les gènes codant pour les

CDKs, les cyclines, les enzymes activatrices des CDKs ou encore les substrats des CDKs, (revue par Vermeulen *et al.,* 2003) ainsi qu'une altération rendant défectueux le mécanisme de surveillance (revues par Iliakis *et al.,* 2003; Stewart *et al.,* 2003; Motoyama & Naka, 2004) contribuent à l'instabilité génétique prédisposant au cancer.

Certaines protéines impliquées directement dans la régulation du cycle cellulaire favorisent le développement de tumeurs. Ces protéines dites oncogènes sont régulièrement surexprimées ou dérégulées dans les cancers; c'est le cas des CDKs et des cyclines (revue par Buolamwini, 2000). D'autres molécules, comme les CKI, sont au contraire des suppresseurs de tumeurs et c'est alors leur inactivation qui est retrouvée fréquente dans les cellules tumorales. De la même manière, lorsque des perturbations des éléments des checkpoints surviennent, elles entraînent une perte de précision dans les mécanismes de contrôle et amoindrissent ainsi leur efficacité. La cellule devient alors plus sensible aux perturbations que lui impose son environnement (revue par Hartwell & Weinert, 1989). Elle pourra se diviser même si son ADN est endommagé, répliqué de manière incomplète ou encore quand les chromosomes ségrègent de manière incorrecte (revue par Nurse, 2000). Les mutations et les aberrations chromosomiques vont alors s'accumuler (revue par Hartwell & Weinert, 1989). Cette distribution infidèle du matériel génétique génère une instabilité génomique, terrain de prédilection à la formation de tumeurs (revues par Bartek & Lukas, 2001; Nurse, 2000; O'Farrell, 2001).

Le contrôle aberrant des CDKs ou un défaut d'une des protéines impliquées dans le checkpoint provoque la perte fonctionnelle des phases de transition du cycle cellulaire. Les désordres génétiques qui en résultent sont directement liés à la pathologie moléculaire du cancer (revues par Stewart *et al.,* 2003; Vermeulen *et al.,* 2003). En voici quelques exemples :

- la surexpression simultanée de CDK2 et de la cycline E est observée dans les carcinomes hépatocellulaires (Kohzato *et al.,* 2001)

- la surexpression de cdc25B est détectée dans certaines tumeurs comme le cancer du sein (Galaktionov *et al.,* 1995)

- une surexpression de cdc25A est observée dans les carcinomes du sein (Bartek & Lukas, 2001)

- la surexpression de polo est fréquemment retrouvée dans les tumeurs (Knecht *et al.,* 1999)

- CDK1 et CDK2 sont surexprimées dans certains cancers du colon (Kim *et al.,* 1999b)

- la surexpression de la cycline D est fréquente dans les carcinomes mammaires (Keyomarsi & Pardee, 1993)

- la perte de la protéine p27 est souvent retrouvée chez les patients atteints de cancers gastriques, du sein, de la prostate, du poumon ou du colon (revue par Tsihlias *et al.,* 1999)

- la mutation de p53 est la lésion génétique la plus fréquemment retrouvée dans les cancers humains (revue par Stewart *et al.,* 2003); la protéine est en effet retrouvée inactive dans 50 % des cas (revue par Molinari, 2000). L'arrêt en G1 est alors atténué et les cellules entrent en phase S malgré la présence d'anomalies de l'ADN (revue par Pommier & Kohn, 2003)

- des déficiences génétiques de 14-3-3 ont été impliquées dans les anomalies du point de surveillance G2 dans les cancers pulmonaires à petites cellules (revues par Hermeking, 2003; Pommier & Kohn, 2003)

- la kinase ATM est inactivée par mutation de son gène chez les malades atteints d'ataxie-télangiectasie (revue par Pommier & Kohn, 2003). Il en résulte une hypersensibilité aux radiations ionisantes et aux agents inducteurs de lésions de l'ADN. Cette pathologie prédispose à de nombreux cancers (leucémies, lymphomes et cancers du sein) (revues par Molinari, 2000; Stewart *et al.,* 2003)

- des mutations de Chk1 et Chk2 sont également présentes, respectivement dans les cancers du colon et du poumon (revues par Stewart *et al.,* 2003)

Toutes ces perturbations ont de graves conséquences même en l'absence d'agents génotoxiques puisque des erreurs qui ne seront pas réparées surviennent lors de la réplication normale du matériel génétique (revue par Zhou & Elledge, 2000). Les altérations des éléments des checkpoints sont responsables de la résistance des cellules tumorales aux traitements chimiothérapeutiques et aux rayonnements (revue par Molinari, 2000).

Les éléments intervenant dans le cycle cellulaire normal et dérégulé sont donc très nombreux et leur régulation en est d'autant plus complexe. Certains de ces aspects n'ont été que peu développés dans cette introduction, comme par exemple la régulation des CDKs par les protéines inhibitrices. Nous nous sommes concentrés sur les éléments régulateurs nécessaires à la compréhension du cheminement scientifique qui a dicté nos expériences.

Il est donc évident que toute perturbation du cycle cellulaire est un signe de potentiel carcinogène pour une substance. L'évaluation de ce risque est donc essentielle et nous avons choisi de le tester sur un modèle reconnu pour l'étude du cycle cellulaire, le développement précoce de l'oursin.

III- Le modèle d'étude : le développement précoce de l'oursin

A- Un modèle reconnu pour l'étude du cycle cellulaire et du développement

L'identification des molécules clés et des mécanismes régulant la division des cellules est née de la convergence d'approches expérimentales différentes entreprises sur des modèles biologiques variés : les levures, les embryons d'oursin, les ovocytes d'étoiles de mer et d'amphibiens ou encore les cellules de mammifères en culture. En effet, l'extrême conservation des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (revue par Nurse, 2000) associée à la complémentarité d'une telle richesse de modèles biologiques a permis d'établir le modèle général de contrôle de la division cellulaire que nous avons décrit plus haut. Tous ces travaux ont été couronnés par l'attribution en Octobre 2001 du Prix Nobel de Physiologie et de Médecine à trois acteurs essentiels du décryptage des mécanismes régulant le cycle cellulaire, les britanniques Tim Hunt et Paul Nurse, et l'américain, Leyland Hartwell. Le développement précoce de l'oursin fait donc partie de ces modèles reconnus pour l'étude du cycle cellulaire. La cycline B a par exemple été initialement identifiée dans les stades embryonnaires précoces d'oursin (Evans *et al.,* 1983).

De plus, les Echinodermes occupent une place importante parmi les modèles utilisés dans l'étude du développement embryonnaire (revues par Giudice, 1973; Hörstadius, 1973). Les Echinodermes sont des invertébrés marins recouverts d'épines. Ce phylum inclut les oursins ou échinides, les crinoïdes, les astéries ou étoiles de mer, les ophiures et les holoturies ou concombres de mer (Platel, 1992). Parmi les Echinodermes, nous avons choisi d'utiliser les oursins. À ce jour, environ 900 espèces d'oursin sont dénombrées. Parmi les espèces les plus couramment utilisées, nous avons choisi *Sphaerechinus granularis*, présente au large de Brest. Elle se présente sous la forme d'un test sphérique de diamètre supérieur à 10 cm

recouvert de piquants courts de couleur violette ou blanche; il s'agit d'extensions du squelette de l'oursin (Figure 19).



Figure 19 : L'oursin Sphaerechinus granularis.

B- De la fécondation à la fusion des pronuclei

1- Les atouts du modèle biologique

La vie des organismes pluricellulaires commence à la fécondation par l'union des cellules germinales. La fécondation est la fusion de deux gamètes haploïdes, femelle et mâle, donnant naissance à une cellule œuf diploïde. Les oursins ont un mode de reproduction sexué et gonochorique c'est-à-dire à sexes séparés. La fécondation s'effectue dans le milieu extérieur et sans accouplement (Platel, 1992). Le modèle que nous utilisons présente de nombreux atouts parmi lesquels la disponibilité des gamètes toute l'année et la quantité importante de gamètes permettant de réaliser des études quantitatives et biochimiques. Ces caractéristiques permettent d'étudier facilement la fécondation en laboratoire.

Suivant les espèces, la fécondation peut intervenir à différents stades du processus de maturation méiotique :

- en prophase de la première division méiotique chez la palourde
- en métaphase de la première division méiotique chez la drosophile
- en métaphase de la seconde division méiotique chez le xénope
- au stade pronucleus, une fois la maturation méiotique achevée chez l'oursin.

Par conséquent, la fécondation déclenche, suivant l'espèce, soit la reprise et l'accomplissement final des clivages méiotiques, soit le début des clivages mitotiques (Collas, 2000). Pour ces raisons, la première division des clivages embryonnaires est singulière et différente des divisions suivantes. Chaque ovocyte a sa particularité et cette diversité permet d'étudier chaque processus de la manière la plus adaptée. Chez l'oursin, l'œuf mature a achevé ses deux divisions méiotiques avant la ponte naturelle; il est bloqué en phase G1 de la première division mitotique. La cycline D et la kinase CDK4 ne sont pas directement impliquées dans la régulation du cycle cellulaire (Moore *et al.*, 2002), ce qui implique que la phase G1 serait totalement achevée ou dépendante d'autres régulateurs. L'utilisation du développement précoce de l'oursin permet d'étudier la fécondation et la division cellulaire mitotique indépendamment du processus de maturation méiotique. La maturation aboutit à un œuf fécondable, d'un diamètre de 90 à 100 µm, contenant un pronucleus haploïde. Cet œuf mature est entouré d'une gangue gélatineuse protectrice; il est de type oligolécithe c'est-à-dire qu'il possède peu de vitellus (revue par Hörstadius, 1973). Sous la gangue, sont situés, de la périphérie vers le centre, l'enveloppe vitelline, la membrane plasmique et le cortex de l'ovule. Le cortex renferme environ 30000 granules corticaux qui, à la fécondation, vont libérer leur contenu par exocytose, contenu qui va fusionner avec l'enveloppe vitelline, formant ainsi la membrane de fécondation qui participe au blocage de la polyspermie (revues par Giudice, 1973; Epel, 1990).

L'observation microscopique de la levée de la membrane de fécondation au bout de quelques minutes permet une quantification rapide et facile du pourcentage de fécondation faisant du développement embryonnaire de l'oursin un outil simple et efficace pour l'évaluation de l'impact de diverses substances sur la fécondation, indépendamment du processus de maturation méiotique (figure 20).

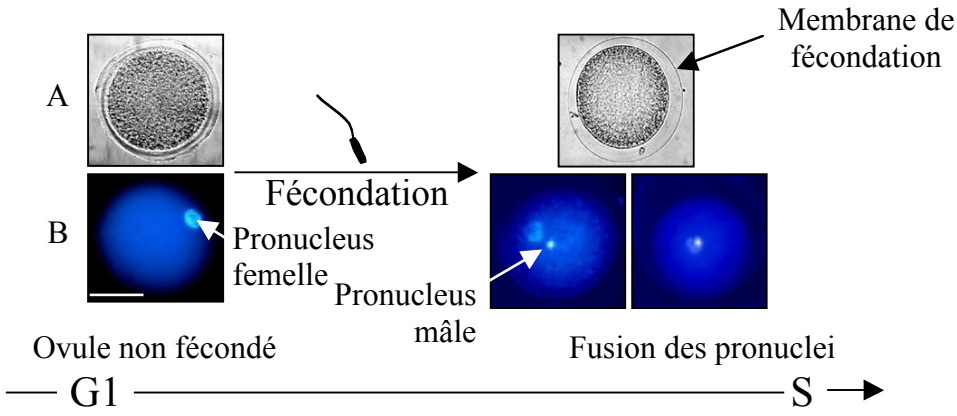


Figure 20 : La fécondation chez l'oursin.
A : Observations microscopiques en contraste de phase. B: Observations du matériel génétique en microscopie à fluorescence. Echelle : 50 µM (d'après Marc et al.*, non publié).*

2- La biochimie de la fécondation

La fécondation est déclenchée par l'interaction entre le spermatozoïde et l'ovule et est caractérisée par la libération de calcium dans la cellule. Le mécanisme qui est responsable de l'augmentation du calcium intracellulaire est complexe et n'est pas totalement élucidé. Dans les premières secondes après la fécondation, l'activation de l'œuf par le spermatozoïde déclenche une rapide et transitoire activation des protéines tyrosine-kinases (PTKs) de la famille Src (Giusti *et al.*, 2003; revue par Sato *et al.,* 2004). L'activation de ces protéines appelées SFKs (Src family PTKs), conduit à celle de la phospholipase C gamma (PLCγ), enzyme qui va activer la voie PI3K (phosphatidyl inositol 3 kinase). La PLCγ déclenche

l'hydrolyse du PIP2 (phosphoinositide biphosphate) en IP3 (inositol 1,4,5-triphosphate) et DAG (diacylglycérol). L'IP3 provoque une élévation transitoire du calcium intracellulaire (De Nadai *et al.,* 1998; Carroll *et al.,* 1999). En amont, le lien biochimique entre l'activation par le spermatozoïde et l'activation des PTKs n'est pas élucidé. L'activation de la protéine kinase C, notamment par le DAG, déclenche celle de l'échangeur Na+/H+ et ainsi une augmentation du pH intracellulaire (Winkler *et al.,* 1980; Heinecke & Shapiro, 1990). La MAPK (mitogen-activated protein kinase), qui est phosphorylée et active dans les œufs non fécondés, se déphosphoryle pour s'inactiver dans les 15 minutes après la fécondation; l'inactivation de la MAPK est dépendante du calcium (Caroll *et al.*, 2000).

L'activation de la voie PI3K et le flux calcique qui en résulte sont responsables d'une série d'évènements biochimiques conduisant à l'initiation du programme de développement c'est-à-dire à l'entrée dans le cycle cellulaire (revue par Sato *et al.,* 2004). Après la fusion des gamètes, environ trente minutes après la fécondation, les embryons débutent la première phase de synthèse d'ADN (revue par Epel, 1990). La fécondation chez l'oursin induit donc une transition G1/S.

C- La phase S de la première division mitotique

La transition G1/S est contrôlée par le complexe CDK2/cycline E et la phase S par le complexe CDK2/cycline A (introduction II A). Chez l'oursin, la phase S de la première division mitotique possède des caractéristiques particulières.

Dans les embryons d'oursin, le complexe CDK2/cycline E est constitutivement actif (Sumerel *et al.,* 2001) et l'activité de CDK2 est stable dans les premières divisions (Moreau *et al.,* 1998). De plus, la synthèse des cyclines A et E n'est pas requise pour la phase de synthèse d'ADN (Zhang & Ruderman, 1993). Les cyclines E et A sont déjà présentes dans les œufs non

fécondés (Moreau *et al.*, 1998; Sumerel *et al.,* 2001). Ces informations impliquent que l'entrée en phase S chez l'oursin ne requiert pas l'activation et/ou la synthèse du complexe CDK2/cycline E; de plus, la réplication de l'ADN n'est pas contrôlée par l'activation et/ou la synthèse du complexe CDK2/cycline A. Cependant, CDK2 est impliquée dans d'autres mécanismes régissant la réplication; elle régulerait l'inhibition de la re-réplication; ce contrôle pourrait s'exercer par une voie indépendante de son activité kinasique (Moreau *et al.*, 1998). Le mécanisme qui contrôle la réplication de l'ADN n'est pas élucidé; la capacité à synthétiser l'ADN semble être acquise très tôt après la fécondation (Zhang & Ruderman, 1993) et le mécanisme par lequel l'initiation de la synthèse d'ADN débute est inconnu. La fécondation doit probablement déclencher la levée d'une inhibition, soit au niveau d'une protéine, soit au niveau de la localisation d'un régulateur. Il est établi que l'inhibition de la synthèse protéique n'interfère pas avec la première synthèse d'ADN *in vivo* (Zhang & Ruderman, 1993; Marc *et al.*, non publié). La fécondation provoquerait donc la levée de l'inhibition de la synthèse d'ADN par un mécanisme qui ne requiert pas la synthèse d'une protéine.

D- La phase M de la première division mitotique

La stimulation du métabolisme cellulaire consécutive à la fécondation est caractérisée par une augmentation considérable du taux de synthèse protéique de 5 à 15 fois (Gross & Fry, 1966; Epel, 1967; Regier & Kafatos, 1977; Brandis & Raff, 1979; Grainger *et al.,* 1979). L'augmentation de la synthèse protéique à la fécondation est un processus complexe qui résulte d'une régulation à deux niveaux : un recrutement des ARN messagers (ARNm) maternels préalablement transcrits (Grainger & Winkler, 1987) et une régulation traductionnelle qui conduit à une augmentation de l'activité de la machinerie de traduction (Brandis & Raff, 1978; revue par Hille *et al.,* 1990).

Deux types d'ARNm sont stockés dans l'ovule non fécondé. Ce sont soit des messagers de grande taille, immatures, soit des messagers associés à des protéines ou des ribonucléoparticules sous forme de complexes appelés mRNP (messenger ribonucleoparticules) (Moon *et al.,* 1980). La fécondation provoque le démasquage des ARN maternels par le relargage des protéines associées aux messagers dans les mRNPs (Grainger & Winkler, 1987). La machinerie de la traduction est stimulée au niveau de l'initiation et de l'élongation (Monnier *et al.,* 2001; revue par Hille *et al.,* 1990). L'augmentation du pH et le flux de calcium sont impliqués dans l'activation de la synthèse protéique (Winkler *et al.,* 1980) : l'augmentation du pH active le recrutement des ARNm (Johnson & Epel, 1976; Winkler *et al.,* 1980) et le calcium est nécessaire à l'activation de l'élongation (Brandis & Raff, 1979; Winkler *et al.,* 1980).

L'élévation de la synthèse protéique est indépendante de la transcription pendant les premières divisions (revue dans Epel, 1990); elle est principalement quantitative et le profil protéique n'est globalement pas modifié (Grainger *et al.,* 1986).

En présence d'émétine, un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycle cellulaire s'arrête avant la première entrée en phase M montrant la nécessité de synthèses protéiques pour le déroulement de la division cellulaire (Hultin, 1961; Wagenaar, 1983; Meijer & Pondaven, 1988; Arion & Meijer, 1989; Yamada, 1998).

La synthèse de la cycline B est indispensable pour l'entrée en mitose (Evans *et al.,* 1983), elle débute juste après la fécondation à partir d'un stock d'ARN maternel (Meijer *et al.,* 1991). La quantité de cycline B suffisante pour permettre l'entrée en phase M est atteinte rapidement, environ 30 à 45 minutes après la fécondation (Dubé, 1988; Geneviève-Garrigues *et al.,* 1995; Yamada, 1998). De manière contradictoire, la présence de cycline B dans les œufs matures d'oursin a parfois été observée; il s'agirait d'une réserve maternelle pour les premiers clivages embryonnaires (Geneviève-Garrigues *et al.*, 1995; Voronina *et al.,* 2003).

La présence de cycline B maternelle ne permet pas d'outrepasser la nécessité d'une néosynthèse de cycline B, qui est toujours requise pour le premier clivage mitotique. Le complexe CDK1/cycline B est localisé dans le noyau avant la rupture de l'enveloppe nucléaire (Geneviève-Garrigues *et al.*, 1995; Hinchcliffe *et al.,* 1999). Chez l'oursin, tout au moins en ce qui concerne l'espèce *Strongylocentrotus purpuratus,* le messager Wee1 est très peu présent jusqu'au cinquième cycle et sa concentration augmente considérablement par la suite (Nemer & Stuebing, 1996).

La première division mitotique s'effectue en deux heures à deux heures trente. Le synchronisme de cette division ainsi que des suivantes permet d'étudier des régulations au niveau biochimique. Les étapes du développement embryonnaire précoce, présentées à la figure 21, sont observables en microscopie en raison de la transparence des œufs.

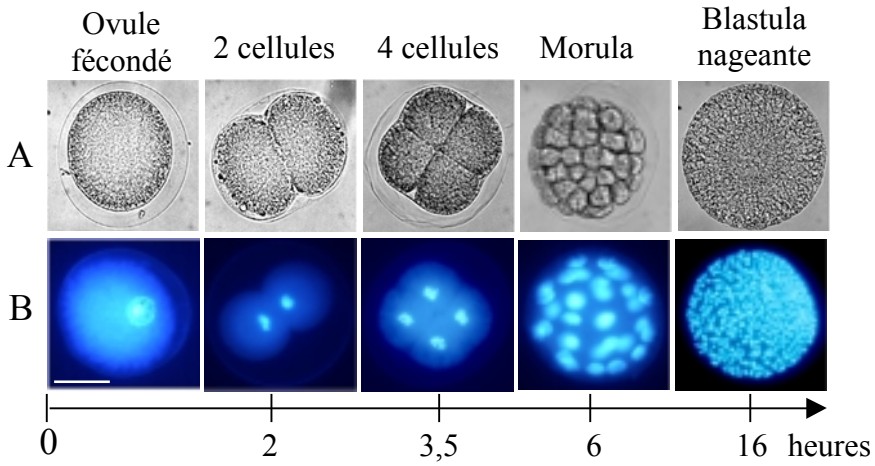


Figure 21 : Les étapes du développement embryonnaire précoce de l'oursin.
A : Observations microscopiques en contraste de phase. B: Observations du matériel génétique en microscopie à fluorescence. Echelle : 50 µM (d'après Marc et al.*, non publié).*

E- Les divisions rapides : du stade 2 cellules à la Morula

À partir de la seconde division, les cycles embryonnaires chez l'oursin comme chez les Amphibiens et les Invertébrés marins sont des successions de phase S et M sans phase de latence G1 et G2 avec un taux de division élevé (Parisi *et al.,* 1978). Chez *Sphaerechinus granularis*, la seconde division s'effectue en une heure trente et les suivantes en trente minutes environ. À la sixième division, l'embryon atteint le stade Morula (pour petite mûre) (figure 21).

La régulation de la transcription a été largement étudiée au cours du développement notamment chez l'oursin (revues par Giudice, 1973; Davidson, 1986). Nous avons au préalable mentionné que l'augmentation de la synthèse protéique à la suite de la fécondation est indépendante de la transcription pendant les premières divisions mitotiques (Gross & Cousineau, 1964; revue par Giudice, 1973). Afin de déterminer le rôle de la transcription au cours des premières divisions chez l'oursin, des études ont été réalisées en présence d'une drogue, l'actinomycine D, dont la liaison à l'ADN provoque une inhibition de la transcription (Gross & Cousineau, 1963 et 1964). En présence de cet inhibiteur, le développement des embryons est arrêté ou tout au moins ralenti à partir du stade 16 cellules; les mécanismes de la fécondation et les premiers clivages cellulaires ne sont eux pas affectés (Gross & Cousineau, 1964). Une fois la fusion des pronuclei accomplie, l'activité transcriptionnelle n'est jamais interrompue dans le zygote et son inhibition ne provoque pas de développement anormal jusqu'au stade 16 cellules (Arion & Meijer, 1989). À partir de ce stade, les ARNm maternels sont progressivement remplacés par les ARN d'origine zygotique dits précoces qui requièrent la transcription du génôme zygotique. Le point de développement auquel les messagers maternels sont remplacés par les messagers zygoytiques est variable selon les ARN (Cabrera *et al.*, 1984).

F- Le retour à des divisions plus lentes

Dès la huitième division, une petite cavité centrale se forme et correspond au blastocœle (revue par Hörstadius, 1973). Au stade Blastula précoce (environ 400 cellules), de longs cils apparaissent à la surface externe au niveau du pôle animal et le pôle végétatif s'aplatit pour donner naissance à la plaque végétative. La jeune Blastula est constituée de couches de cellules et nage à l'intérieur de la membrane de fécondation. Chez l'oursin, la cycline D et la kinase CDK4 sont requises pour le développement normal, probablement dans la mise en place des territoires embryonnaires à la blastula (Moore *et al.*, 2002).

Le retour à des divisions plus lentes a lieu à cette étape, environ douze heures après fécondation, et correspond à l'acquisition des phases G1 et G2. Vers 14-16 heures après la fécondation, la Blastula sécrète l'enzyme d'éclosion, une protéase qui digère la membrane de fécondation libérant ainsi la blastula ciliée (Lepage & Gache, 1989 et 1990); c'est le stade Blastula nageante (figure 21). Commence alors l'organogénèse, c'est-à-dire la mise en place de tous les organes à partir des feuillets embryonnaires.

Après la stimulation de la synthèse protéique qui résulte directement de la fécondation, l'augmentation se poursuit avec le développement (Regier & Kafatos, 1977; Goustin & Wilt, 1981) et permet aux embryons de croître et de se différencier. De nombreuses kinases jouent un rôle dans le bon déroulement du développement embryonnaire comme par exemples les activités tyrosine kinases (revue par Kinsey, 1997), les sérine/thréonine kinases telle la glycogène synthase kinase 3 (Emily-Fenouil *et al.,* 1998) ou la caséine kinase 2 (Delalande *et al.*, 1999).

Les messagers zygotiques transcrits au moment de la Blastula précoce sont appelés VEB (Very Early Blastula); ils sont en nombre restreint et comptent parmi eux le messager codant pour l'enzyme d'éclosion (Lepage & Gache, 1990). C'est pourquoi, en présence

d'actinomycine D, les embryons sont incapables de dépasser le stade Blastula et d'éclore (Gross & Cousineau, 1964) La transcription de l'enzyme d'éclosion est transitoire tant au niveau temporel que spatial. En effet, elle se déroule entre le stade 8 cellules et le stade jeune Blastula (Lepage & Gache, 1990) et est spatialement restreinte à une partie de l'embryon (Lepage *et al.,* 1992). Cette distribution spatio-temporelle complexe est liée à la détermination de territoires bien définis au sein de l'embryon, condition indispensable à un développement embryonnaire normal. La régulation de la transcription est donc requise pour l'embryogénèse.

G- Les points de contrôle

La première division mitotique de l'oursin *Sphaerechinus granularis* comprend les phases S, G2 et M (Geneviève-Garrigues *et al.,* 1995). Lorsqu'une étape du cycle cellulaire est affectée, la cellule, par le biais de son point de contrôle, va réparer l'anomalie ou enclencher un programme d'apoptose (introduction, II C). Les embryons d'oursin possèdent la machinerie nécessaire à l'apoptose et son activation a été observée pendant les premiers clivages embryonnaires ainsi qu'au stade blastula et dans les stades plus tardifs du développement embryonnaire (Roccheri *et al.,* 1997; Voronina & Wessel, 2001; Lesser *et al.*, 2003). Dans les clivages embryonnaires en général, les transitions S/M ne possédent pas de mécanismes de surveillance (Epel, 2003) mais par la suite, le retour à des divisions plus lentes coïncide avec la réapparition des mécanismes d'apoptose et des points de contrôle (Finkielstein *et al.,* 2001).

La présence des mécanismes d'apoptose et des points de contrôle du cycle cellulaire montrent la particularité de la première division mitotique de l'oursin.

Le spindle checkpoint qui contrôle l'attachement des chromosomes à la transition métaphase/anaphase a été caractérisé chez l'oursin (Sluder *et al.,* 1994). Ce point de contrôle

possède des caractéristiques différentes de celui des cellules somatiques dans la mesure où il ne détecte pas les défauts dans l'architecture du fuseau ou les orientations incorrectes des chromosomes (Sluder *et al.,* 1997).

La présence et l'activation du point de contrôle situé en phase G1 a été observé (Lesser *et al.*, 2003) : dans les cellules exposées à des radiations UV, l'expression des protéines p53 et p21 est stimulée, ce qui provoque une inhibition de l'activité de CDK1 et l'arrêt du cycle cellulaire.

Les éléments moléculaires intervenant dans le checkpoint G2/M et leur activation ont été observés par plusieurs équipes (Ikegami *et al.*, 1978 et 1979; Meijer *et al,* 1991; Sluder *et al.,* 1995; Patel *et al.,* 1997; Yamada, 1998; Kawahara *et al.,* 2000; Voronina & Wessel, 2001; Lesser *et al.,* 2003). En présence d'aphidicoline, des évènements mitotiques comme la rupture de l'enveloppe nucléaire sont inhibés (Nishioka *et al.,* 1984; Geneviève-Garrigues *et al.,* 1995; Sluder *et al.,* 1995; Patel *et al.,* 1997; Hinchcliffe *et al.*, 1999), indiquant la présence d'un mécanisme de contrôle. L'aphidicoline provoque une accumulation de cycline B déphosphorylée associée à une accumulation de CDK1 phosphorylé sur tyrosine (Meijer *et al.,* 1991; Patel *et al.,* 1997); l'activation du complexe est donc inhibée (Patel *et al.,* 1997). Cette accumulation de tyrosine phosphorylée maintient la kinase inactive (Patel *et al.,* 1997). L'inhibition de la synthèse d'ADN provoque donc un retard de l'entrée en phase M; le complexe inactif a besoin que la synthèse de DNA soit achevée avant de s'activer (Meijer *et al.,* 1991).

En conclusion, le développement précoce de l'oursin est un modèle de choix pour l'étude de la fécondation, des premières divisions mitotiques et du développement embryonnaire. Il permet une perception visuelle immédiate des anomalies, caractéristique qui a été exploitée dans plusieurs études de toxicologie (Larrain *et al.,* 1999; Pagano *et al.*, 2001;

Nishioka *et al.,* 2003). Certains de ces auteurs ont analysé au niveau moléculaire les effets biologiques d'exposition aux pesticides (Pesando *et al.,* 2003). La fécondation de l'embryon d'oursin représente un test biologique couramment utilisé et reconnu en matière d'étude toxicologique sur la reproduction. Nous avons choisi d'étudier les impacts potentiels des polluants sur les phases de cycle cellulaire et de développement embryonnaire.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

Nos résultats sont présentés en deux parties. Dans une première partie, nous montrons que l'utilisation du développement précoce de l'oursin a permis de mettre en évidence différents types de dysfonctionnements sur le cycle cellulaire (articles 1 et 2) ainsi que sur la phase de transcription (article 3) en relation avec l'exposition à des polluants.

. Article 1 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. & Bellé, R. (2002a). Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. *Chem Res Toxicol* **15,** 326-331.

. Article 2 : Marc, J., Maguer, C., Bellé, R. & Mulner-Lorillon, O. (2002b). Sharp dose- and time-dependent toxicity of mercuric chloride at the cellular level in sea urchin embryos. *Arch Toxicol* **76,** 388-391.

. Article 3 : Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Bellé, R. & Mulner-Lorillon, O. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription (sous presse, *Toxicol Appl Pharmacol*).

Dans une seconde partie, nous montrons l'implication d'un pesticide particulier, le Roundup, dans la dérégulation du premier cycle mitotique; nous nous attachons à l'analyse moléculaire de ses effets (articles 4, 5 et 6).

. Article 4 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O. & Bellé, R (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol Cell* **96,** 245-249.

. Article 5 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Durand, G. & Bellé, R. (2003). Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environ Chem Lett* **1,** 8-12.

. Article 6 : Marc, J., Bellé, 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 (sous presse, *Toxicol Sci*).

I- La mise en évidence de dysfonctionnements du cycle cellulaire et du développement précoce induits par des polluants en utilisant l'embryon d'oursin

A- Le dysfonctionnement du cycle cellulaire induit par le Roundup

Nous avons déterminé les effets du pesticide Roundup sur le cycle cellulaire en utilisant comme modèle le développement précoce de l'oursin. Nous étudions les effets sur le cycle cellulaire en excluant les potentiels effets des pesticides sur la fécondation. Nous démontrons que la présence de Roundup contenant 8 mM de glyphosate, le principe actif de la spécialité commerciale, retarde d'au moins 30 minutes l'apparition du premier clivage mitotique (figure 22 et article 1). Les embryons traités au pesticide sont cytologiquement comparables aux embryons contrôles, ce qui indique que le Roundup ne provoque pas de dommage létal. Nous montrons que l'effet observé est reproductible et dépendant de la dose de glyphosate présent dans le Roundup. Une concentration de 6,8 mM de glyphosate dans le Roundup produit 50 % de l'effet maximum sur le premier cycle cellulaire. Lors de ces premières expériences, le Roundup est laissé en contact des embryons pendant toute la durée du développement. Nous avons déterminé que pour induire le dysfonctionnement observé, le Roundup doit être appliqué pendant au minimum une heure et l'exposition doit débuter pendant la première heure après fécondation.

Pour comprendre comment le Roundup induit cet effet, nous avons réalisé une analyse cellulaire de l'effet du pesticide en suivant l'état de la chromatine en microscopie à fluorescence. Nous observons que l'évolution de l'état de la chromatine est comparable dans les embryons traités et contrôles (figure 22 et article 1).

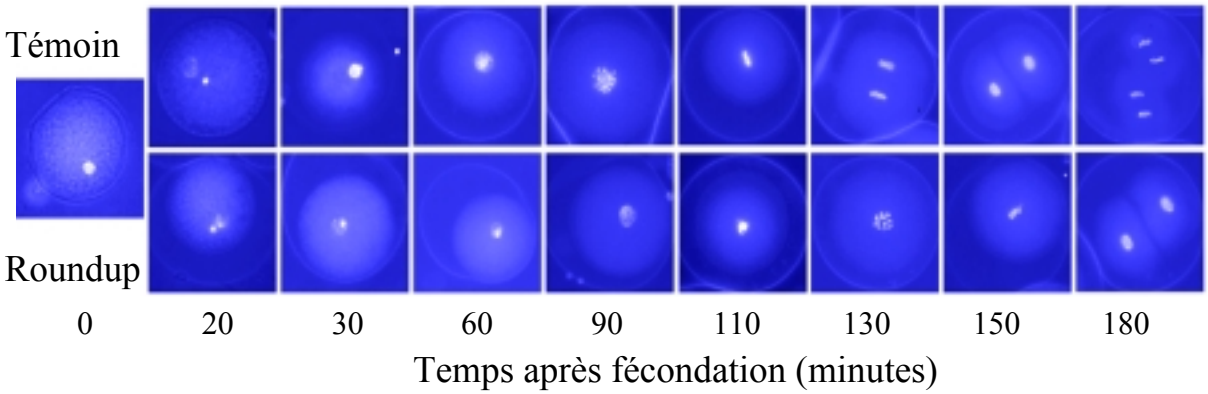


Figure 22 : L'effet du Roundup sur la morphologie de la chromatine pendant le développement précoce. L'entrée en phase M est retardée de 40 minutes avec le pesticide (d'après Marc et al*., 2002a).*

Nous remarquons que la durée des phases constituant le premier cycle cellulaire n'est pas affectée par la présence de l'herbicide. En revanche, le Roundup provoque un retard de l'entrée en phase M du premier cycle cellulaire (figure 22 et article 1).

B- Les dysfonctionnements induits par les métaux lourds

Nous avons déterminé les effets d'un métal lourd, le mercure, sur le développement précoce de l'oursin (article 2). Nous démontrons que l'exposition au chlorure de mercure, à une concentration de 10 µM, provoque un arrêt dans la progression du cycle cellulaire; les embryons ne se divisent pas même après 20 heures (figure 23 et article 2). Cet effet est radical dans le sens où à la concentration limite de 7 µM, soit 0 %, soit 100 % des embryons se divisent. En présence de 5 µM de mercure, la cinétique de division des embryons est comparable à celle des embryons contrôles (figure 23 et article 2). Le mercure agit par un mécanisme de "tout ou rien" dans l'inhibition de la division.

Le mercure est donc toxique pour le développement à une concentration de 10 µM et aucun effet sur la division n'a été observé à une concentration seulement 2 fois plus faible.

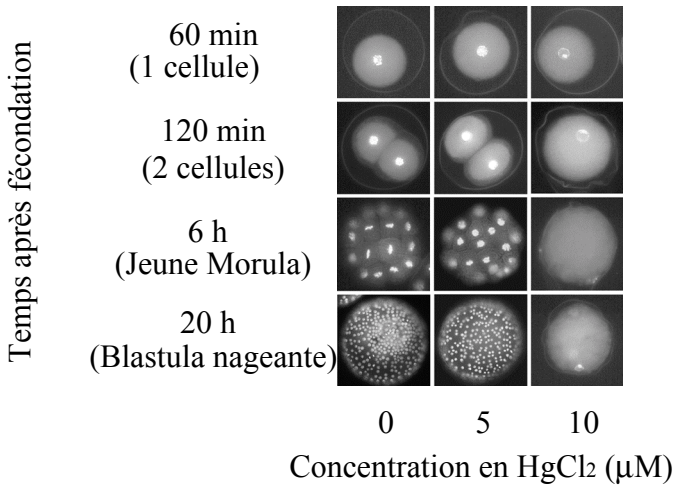


Figure 23 : L'effet du chlorure de mercure sur la cinétique de développement précoce (d'après Marc et al., *2002b).*

Nous avons comparé les effets du chlorure de mercure sur le développement précoce à ceux de plusieurs autres métaux lourds : le chlorure de plomb, le chlorure de zinc ou le chlorure de cuivre (article 2). À des concentrations identiques à celles utilisées pour le mercure, les 3 métaux lourds se révèlent non toxiques vis-à-vis du premier cycle cellulaire. Plus tardivement au cours du développement, au stade Blastula, les chlorures de zinc et de cuivre provoquent un retard du cycle cellulaire pour une faible proportion des embryons et uniquement pour la plus forte concentration testée, 30 µM. Cet effet est caractérisé par l'apparition de blastula anormales possédant un nombre de noyaux inférieur à celui des embryons contrôles. C'est également le cas concernant l'exposition au mercure qui, de surcroît, déclenche un arrêt du développement quelque soit le moment auquel il est ajouté.

Nous avons également démontré qu'une très courte durée d'exposition au chlorure de mercure (5 minutes) est suffisante pour induire le dysfonctionnement de la division (article 2). Le caractère très tranchant de la réponse au mercure est donc observé tant au niveau de la concentration qu'au niveau du temps d'exposition au polluant. L'effet du mercure que nous

avons mis en évidence en utilisant le développement précoce de l'oursin est différent de celui du Roundup.

C- Le dysfonctionnement de la transcription induit par le Roundup

Nous avons déterminé que la présence de Roundup affecte, outre le cycle cellulaire, les phases de développement précoce de l'oursin (article 3). Nous démontrons que le pesticide affecte l'éclosion des embryons au stade Blastula (figure 24A et article 3). Le retard de l'éclosion induit par le Roundup est invariablement présent et significatif (plusieurs heures). L'effet observé n'est pas létal; il est dépendant de la dose de glyphosate présent dans le Roundup; 2 mM suffisent pour déclencher le retard d'éclosion. Une exposition au pesticide uniquement pendant la transition Morula-Blastula est suffisante pour déclencher le retard. Nous avons vu que l'éclosion est assurée par une protéase qui fait partie des premiers transcrits zygotiques (introduction III F); l'éclosion est donc inhibée en l'absence de transcription. Nous avons utilisé de l'uridine radiomarquée afin de déterminer la cinétique d'activité transcriptionnelle à partir d'embryons prélevés à différents temps après fécondation. Nous démontrons que l'augmentation de l'activité transcriptionnelle observée à partir du stade Morula est retardée en présence du pesticide (figure 24 B et article 3).

Les effets du Roundup sur la transcription et l'éclosion sont dépendants de la dose de glyphosate et l'inhibition de l'éclosion apparaît plus sensible que celle de la transcription. Nos résultats démontrent que la transcription de l'enzyme d'éclosion, étudiée par RT-PCR, est retardée par le pesticide.

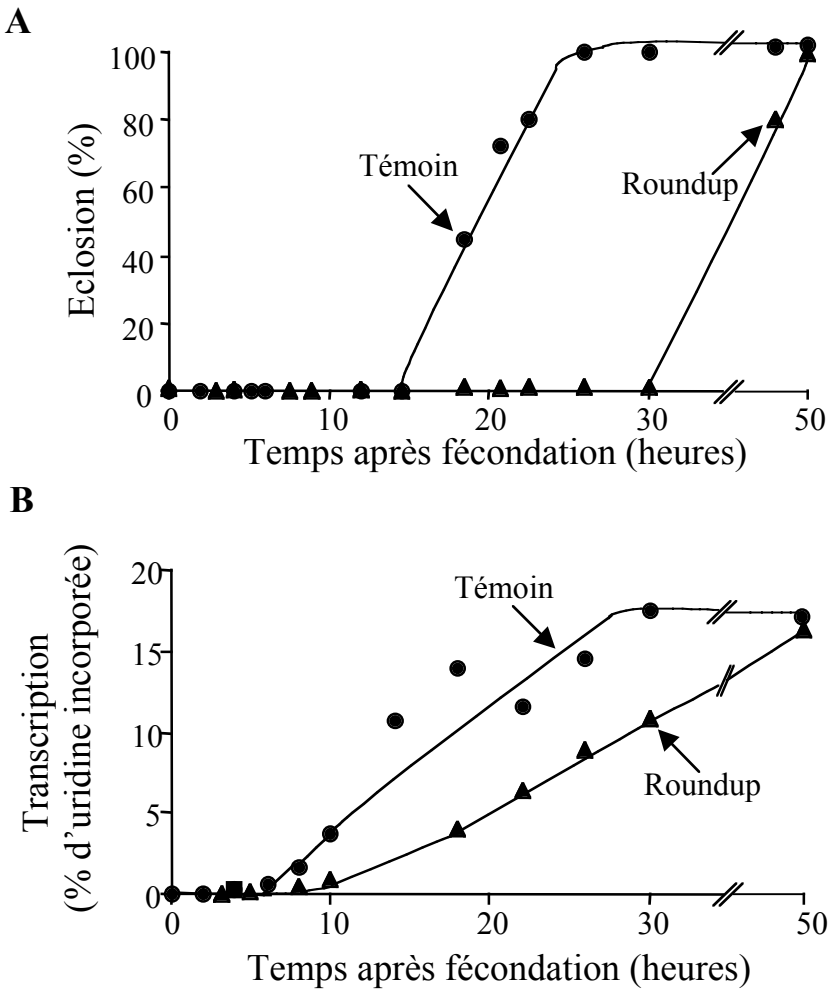


Figure 24 : Les effets du Roundup sur les cinétiques d'éclosion et de transcription (d'après Marc et al*., sous presse,* Toxicol Appl Pharmacol*).*

Nous démontrons donc que le Roundup inhibe l'augmentation de la transcription des ARN d'origine zygotique consécutive à la fécondation. Cette étape est indispensable au bon déroulement du développement des embryons à partir du stade 16 cellules (article 3). L'inhibition de la transcription est responsable de l'inhibition de l'éclosion des embryons au stade Blastula précoce; nous ne pouvons exclure que l'effet du Roundup sur le cycle cellulaire, que nous avons montré plus haut, puisse contribuer aussi au retard d'éclosion observé.

En conclusion de cette première partie, l'utilisation du développement précoce de l'oursin a permis de mettre en évidence des dysfonctionnements du cycle cellulaire et du développement précoce induits par deux types de polluants, un pesticide d'usage intensif, le Roundup, et un métal lourd, le mercure, particulièrement connu pour sa toxicité neurologique. Les dysfonctionnements observés sont différents et spécifiques : le mercure a un effet radical sur la division alors que le Roundup a un effet plus subtil et non létal sur le cycle cellulaire.

Le Roundup agit sur l'entrée en phase M, une étape du cycle cellulaire hautement régulée et dont les dérégulations sont corrélées à l'apparition de cancers. Cet effet du Roundup avait échappé aux réglementations en vigueur, montrant ainsi la sensibilité de notre système biologique. Une substance considérée inoffensive s'est révélée toxique en utilisant le développement précoce de l'oursin. Ces différents éléments ont motivé notre choix de rechercher la contribution des différents composants du Roundup dans les effets observés ainsi que les cibles moléculaires de l'effet du Roundup sur le cycle cellulaire.

D- Les publications 1, 2 et 3

. Article 1 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G. & Bellé, R. (2002a). Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. *Chem Res Toxicol* **15,** 326-331.

Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation

Julie Marc, Odile Mulner-Lorillon, Sandrine Boulben, Dorothée Hureau,[†] Gaël Durand,[†] and Robert Bellé*

Station Biologique de Roscoff, Université Pierre et Marie Curie (UFR 937), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, UMR 7127), BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France

Received July 18, 2001

To assess human health risk from environmental chemicals, we have studied the effect on cell cycle regulation of the widely used glyphosate-containing pesticide Roundup. As a model system we have used sea urchin embryonic first divisions following fertilization, which are appropriate for the study of universal cell cycle regulation without interference with transcription. We show that 0.8% Roundup (containing 8 mM glyphosate) induces a delay in the kinetic of the first cell cleavage of sea urchin embryos. The delay is dependent on the concentration of Roundup. The delay in the cell cycle could be induced using increasing glyphosate concentrations (1−10 mM) in the presence of a subthreshold concentration of Roundup 0.2%, while glyphosate alone was ineffective, thus indicating synergy between glyphosate and Roundup formulation products. The effect of Roundup was not lethal and involved a delay in entry into M-phase of the cell cycle, as judged cytologically. Since CDK1/cyclin B regulates universally the M-phase of the cell cycle, we analyzed CDK1/cyclin B activation during the first division of early development. Roundup delayed the activation of CDK1/cyclin B in vivo. Roundup inhibited also the global protein synthetic rate without preventing the accumulation of cyclin B. In summary, Roundup affects cell cycle regulation by delaying activation of the CDK1/cyclin B complex, by synergic effect of glyphosate and formulation products. Considering the universality among species of the CDK1/cyclin B regulator, our results question the safety of glyphosate and Roundup on human health.

Introduction

Widespread use of pesticides leads to chronic exposure to a combination of various products. Despite the obvious benefits of pesticides, their extensive use has posed problems for both environment and human health. Among the human health concerns, exposure to several groups of pesticides has been associated with various cancers (*1*, *2*) or reproductive and developmental disorders (*3*). Therefore, searches for mechanisms by which pesticides could interfere with cell cycle or developmental processes are of great interest.

The cell cycle is the universal process by which cells reproduce and underlies the growth and development of all living organisms. Controls operate during the cell cycle to regulate the onset of DNA replication and segregation of the replicated chromosomes. Surveillance mechanisms, called checkpoint (*4*) pathways, ensure the proper order and correct execution of cell cycle events. The molecular basis of these controls is highly conserved from single unicellular eucaryotes to complex metazoans such as humans (for review, see refs *5*−*7*). Human cancers are associated with defects in the control of cell cycle transitions (*8*). Errors in the choreography of the process of mitosis and cytokinesis can lead to genetic instability fostering cell death or disease. Failures of these checkpoints allow cells to divide when DNA is incorrectly replicated, or when chromosomes are incorrectly segregated to daughter cells, resulting in increased genetic damages that is crucial in the generation of cancer (for review, see refs *5*−*7*).

Marine invertebrates, including sea urchin gametes and embryos (*9*) have proven to be powerful models for conceptual advances in the cell cycle and its regulation (*5*). Early development offers the opportunity to analyze synchronous embryonic cell divisions, during first cleavages after fertilization in the absence of transcriptional control (*9*).

We have studied early development in sea urchin in order to provide a molecular basis for assessing the risk of pesticide usage for altering cell cycle controls.

We have investigated effects of the pesticide Roundup. Roundup contains glyphosate as the active ingredient; it has been used since 1974 and is currently spread worldwide (for review, see ref *10*). Glyphosate is a nonselective herbicide that inhibits plant growth through interference with the production of essential aromatic amino acids (*11*). The adverse effects of glyphosate and Roundup are periodically reevaluated and toxicity of the pesticide has been described for severe exposure conditions (for review, see ref *10*). It has been suggested that the toxicity of glyphosate-containing products was related to the surfactant components of the formulation products (*12*). In normal usage and at chronic exposure, several regulatory agencies and scientific institutions worldwide have concluded that there is no indication of any human health concern with glyphosate and Roundup (*10*).

We report here that Roundup causes changes in cell cycle regulation that may raise questions about the effect of this pesticide on human health.

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 33 (0) 2 98 29 23 46. Fax: 33 (0) 2 98 29 23 06. E-mail: belle@sb-roscoff.fr.

[†] Pôle Analytique des Eaux, 120 avenue A. De Rochon, BP 52, 29280 Plouzané, France.

10.1021/tx015543g CCC: $22.00 © 2002 American Chemical Society
Published on Web 02/22/2002

. Article 2 : Marc, J., Maguer, C., Bellé, R. & Mulner-Lorillon, O. (2002b). Sharp dose- and time-dependent toxicity of mercuric chloride at the cellular level in sea urchin embryos. *Arch Toxicol* **76,** 388-391.

Arch Toxicol (2002) 76: 388–391
DOI 10.1007/s00204-002-0368-0

INORGANIC COMPOUNDS

Julie Marc · Cécile Maguer · Robert Bellé
Odile Mulner-Lorillon

Sharp dose- and time-dependent toxicity of mercuric chloride at the cellular level in sea urchin embryos

Received: 22 March 2002 / Accepted: 15 May 2002 / Published online: 22 June 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract Sea urchin embryos (*Sphaerechinus granularis*) offer the opportunity to analyse toxicity towards cell division and stages of early development. Mercuric chloride ($HgCl_2$) arrested early development at the level of the first cell cycle. The toxic effect occurred in a very sharp concentration range around 7 μM $HgCl_2$. At subtoxic concentrations of $HgCl_2$, the morphology and kinetics of early development were comparable to control embryos. The time-dependence of toxicity was short; a 5-min exposure to the toxic concentration of 10 μM $HgCl_2$ was sufficient to provoke developmental dysfunction whereas continuous exposure to 5 μM $HgCl_2$ allowed development to occur normally. The effects on early development over this range of concentrations were specific to $HgCl_2$ toxicity since other heavy metal chlorides had no effect at 30 μM. Thus, the sea urchin model may provide new clues to the molecular mechanisms of $HgCl_2$ toxicity.

Keywords Mercury · Sea urchin · Developmental toxicity · Cell cycle toxicity

Introduction

Heavy metals are present in the environment and are of concern to human health (reviewed in Domingo 1994; Costa 1998; Rojas et al. 1999; Hu 2000; Waalkes et al. 2000; Fischer and Skreb 2001). Among heavy metals, several forms of mercury compounds have been demonstrated to exert toxicological effects (reviewed in Clarkson 1997; Satoh 2000; Ozuah 2001; Sweet and Zelikoff 2001). Inorganic mercury comes from both natural and anthropogenic sources (reviewed in Clarkson 1997). Mercury is methylated in the environment and enters the aquatic food chain to become the predominant dietary source of mercury in humans (reviewed in Satoh 2000). The methylated forms of mercury are responsible for selective damage to the central nervous system whereas the toxicity of the inorganic forms depends on the Hg^{2+} ion, the proximate toxic species of both mercurous and mercuric compounds (review in Clarkson 1997). Mercury-induced developmental toxicity has been reported (Bellas et al. 2001; Belles et al. 2002); however, the effects of low-dose exposure may be too subtle and specific to be detectable using global measures, and/or may remain dormant until late development.

In searching for specific effects of $HgCl_2$ at the cellular level, we took advantage of a cellular model that was proven to be efficient in determination of pollutants molecular targets implicated in cell division and early development (Marc et al. 2002). The cell cycle is the universal process by which cells reproduce, and which underlies the growth and development of all living organisms. Human cancers are associated with defects in the control of cell cycle transitions (Molinari 2000) due to failure at the checkpoints (Hartwell and Weinert 1989) that ensure the proper order and correct execution of cell cycle events. The molecular basis of cell cycle control is highly conserved from single unicellular eukaryotes to complex metazoans such as humans (reviewed in Nurse 2000; Nigg 2001; O'Farrell 2001). We have used sea urchin embryos, a powerful convenient model in cell cycle studies (Nurse 2000). Sea urchin early development offers the opportunity to analyse synchronous embryonic cell divisions during first cleavages after fertilization in the absence of transcriptional control (reviewed in Epel 1990).

We report that $HgCl_2$ provokes arrest of sea urchin development at the level of the first cell cycle. The arrest occurred in a strikingly sharp concentration- and time-dependent manner.

J. Marc · C. Maguer · R. Bellé · O. Mulner-Lorillon (✉)
Station Biologique de Roscoff, Université Pierre et Marie Curie (UFR 937), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, UMR 7127), BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France
E-mail: mulner@sb-roscoff.fr
Tel.: +33-2-98292337
Fax: +33-2-98292306

. Article 3 : Marc, J., Le Breton, M., Cormier, P., Morales, J., Bellé, R. & Mulner-Lorillon, O. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription (sous presse, *Toxicol Appl Pharmacol*).

A glyphosate-based pesticide impinges on transcription

Julie Marc*, Magali Le Breton, Patrick Cormier, Julia Morales, Robert Bellé and Odile Mulner-Lorillon.

Station Biologique de Roscoff, Cycle Cellulaire et Développement, Unité Mer & Santé, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université Pierre et Marie Curie (UPMC), BP 74 29682 Roscoff Cedex France

* Corresponding author. Station Biologique, Place Georges Teissier, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Tel: 33 (0) 2 98 29 23 46; fax: 33 (0) 2 98 29 23 06.

E-mail address: marc@sb-roscoff.fr

II- L'analyse moléculaire des effets du Roundup sur le cycle cellulaire

A-L'agent responsable des dysfonctionnements du cycle cellulaire induits par le Roundup

Le Roundup contient du glyphosate, la substance active en tant qu'herbicide, associé à divers surfactants servant à la pénétration du glyphosate dans la plante, le principal étant le polyethoxylated tallow amine (POEA). Nous avons cherché à déterminer quel est, au sein du Roundup, la substance responsable des dysfonctionnements que nous observons (article 1). Nous avons donc testé séparément les effets du glyphosate et du POEA sur le premier cycle cellulaire. Nous démontrons que le glyphosate testé seul et à pH neutre n'induit aucun effet sur le cycle cellulaire à des concentrations équivalentes voire supérieures à celles utilisées avec le Roundup. Le surfactant POEA s'est avéré plus toxique que le Roundup pour les embryons d'oursin suggérant la présence de produits atténuant la toxicité du POEA dans le Roundup.

Pour analyser les contributions respectives du glyphosate et des surfactants dans les dérèglements du cycle cellulaire, nous avons testé l'effet de concentrations croissantes de glyphosate en présence d'une dose de Roundup inefficace sur le cycle cellulaire. L'ajout de glyphosate provoque un retard dose-dépendant de la première division mitotique (article 1). Le glyphosate et les surfactants présents dans le Roundup exercent donc des effets synergiques responsables du dysfonctionnement du cycle cellulaire.

Nous avons comparé l'effet de quatre spécialités commerciales d'herbicides différentes, toutes à base de glyphosate, à l'effet décrit pour le Roundup 3plus (article 4). Nous démontrons qu'elles provoquent toutes le même type de dérégulations du cycle cellulaire et ce dans des gammes de concentrations en glyphosate du même ordre de grandeur (figure 25 et article 4).

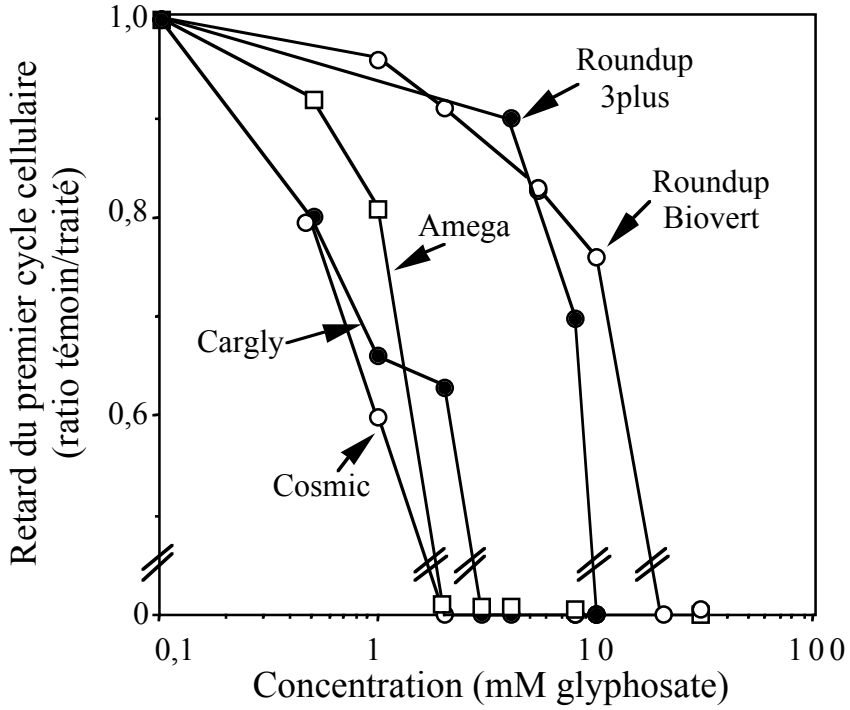


Figure 25 : L'effet dose-dépendant des formulations à base de glyphosate, Amega, Cargly, Cosmic, Roundup 3plus et Roundup Biovert, sur le premier cycle cellulaire du développement précoce de l'oursin (d'après Marc et al., *2004).*

La présence, dans le Roundup, du glyphosate et des surfactants simultanément induit le dysfonctionnement du cycle cellulaire. L'un des responsables est le principe actif, le glyphosate, et la présence de surfactants est requise pour induire les dérégulations. Le surfactant permettrait la pénétration du glyphosate dans les embryons d'oursin de la même manière que dans les plantes. Les surfactants pourraient exercer des effets propres que nous n'avons pas analysés.

B- La cible terminale du Roundup : l'activation du complexe CDK1/cycline B

Nous avons recherché le mécanisme moléculaire du retard induit par le Roundup dans l'entrée en phase M du premier clivage mitotique (article 1). L'entrée en phase M du cycle

cellulaire est contrôlée par l'activation du complexe CDK1/cycline B (introduction II A). Nous avons déterminé l'activité kinasique *in vitro* du complexe par la mesure de l'activité de phosphorylation du complexe purifié actif sur un substrat , l'histone H1. Nous montrons que le Roundup et le glyphosate n'ont aucun effet sur l'activité kinasique du complexe (figure 26).

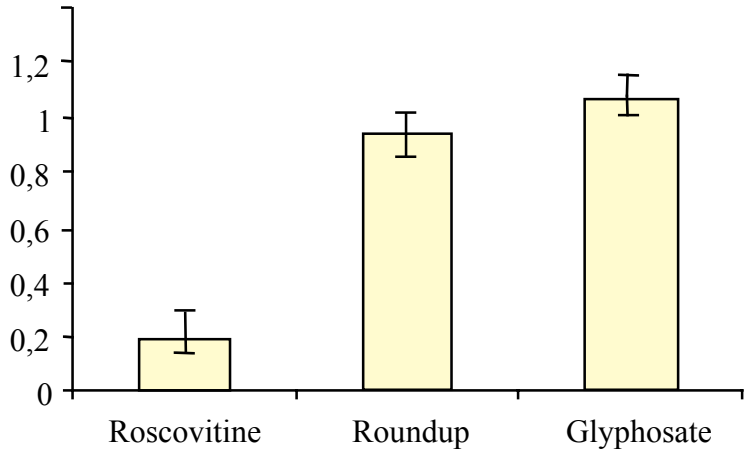


Figure 26 : L'effet du Roundup et du glyphosate sur l'activité kinasique du complexe CDK1/cycline B.
Le complexe CDK1/cycline B actif est purifié par chromatographie d'affinité à partir d'extraits métaphasiques d'oursin. L'activité du complexe correspond à la mesure in vitro du degré de phosphorylation de l'histone H1 et mesurée en présence d'un inhibiteur des CDKs, la roscovitine (10 µM), de Roundup (8 mM équivalent glyphosate) et de glyphosate (8mM). Le résultat est exprimé par la moyenne des ratios des activités contrôle/traité et la déviation standard est calculée sur 4 expériences.

Nous nous sommes donc intéressés à l'effet du Roundup sur l'activation du complexe (article 1). Au cours du développement précoce, le complexe CDK1/cycline B présente 2 pics d'activation successifs correspondant respectivement à l'entrée en phase M du premier et du second cycles cellulaires. Dans les embryons traités au Roundup, les 2 pics d'activation du complexe sont totalement abolis (figure 27 et article 1). Le Roundup agit sur le mécanisme d'activation du complexe CDK1/cycline B.

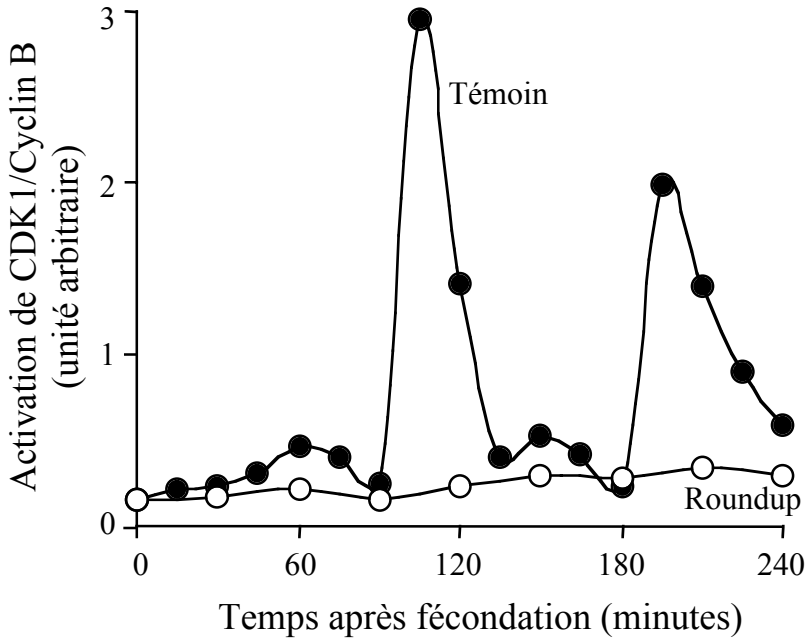


Figure 27 : L'effet du Roundup sur la cinétique d'activation du complexe CDK1/cycline B pendant le développement précoce (d'après Marc et al.*, 2002a).*

Nous avons recherché les effets du Roundup sur les différents éléments requis pour cette activation.

Nous avons étudié le profil d'accumulation de la cycline B par des expériences de western blot (article 5). Nous démontrons que le Roundup n'affecte ni la quantité, ni la cinétique d'accumulation de la cycline B pendant le premier cycle mitotique (figure 28 et article 5; voir aussi article 1). La phosphorylation de la cycline B en métaphase est un marqueur de l'activité du complexe et se traduit en western blot par l'apparition d'une bande retardée électrophorétiquement. Nous observons en présence de Roundup un retard de ce changement de migration électrophorétique de la cycline B, reflétant le retard dans l'activation du complexe CDK1/cycline B (figure 28, article 5; voir aussi article 1).

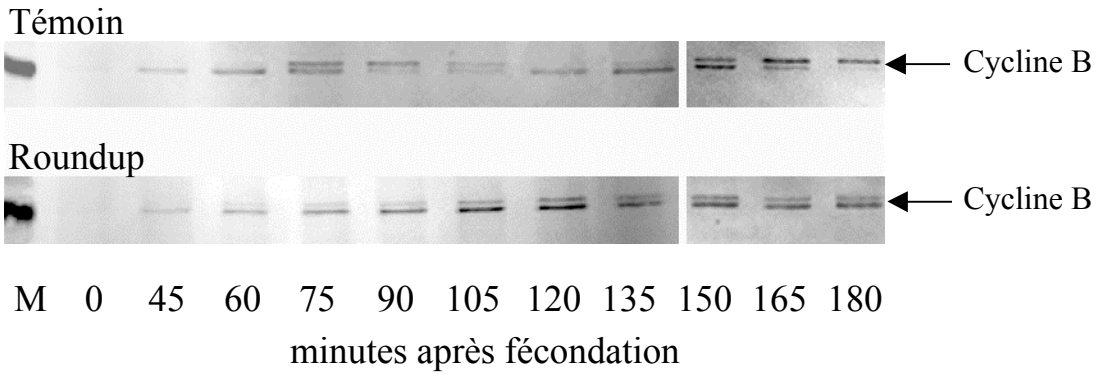


Figure 28 : L'effet du Roundup sur la cinétique d'accumulation de la cycline B au cours du développement précoce (d'après Marc et al.*, 2003).*

Nous avons montré que la synthèse de la cycline B n'est pas la cible du Roundup. L'activation du complexe requiert l'association de la cycline B à la kinase CDK1 (introduction II B). Nous avons purifié CDK1 et les protéines associées par chromatographie d'affinité à partir d'embryons et recherché la présence du complexe CDK1/cycline B par western blot (figure 29, article 5).

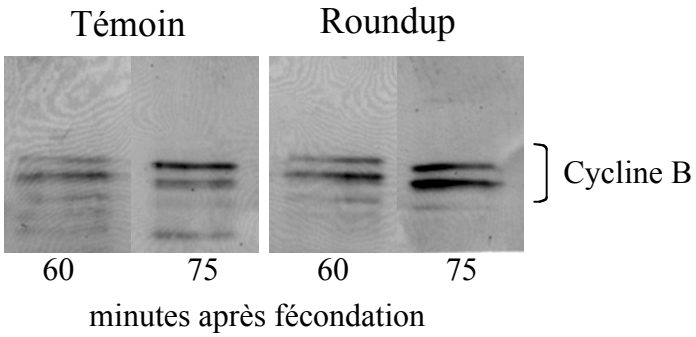


Figure 29 : L'effet du Roundup sur l'association entre CDK1 et son partenaire cycline B (d'après Marc et al.*, 2003).*

Nous démontrons que la cycline B est associée à la protéine CDK1 de manière comparable, tant au niveau quantitatif que temporel, dans les embryons contrôles et exposés au Roundup (figure 29 et article 5). En présence de Roundup, le complexe CDK1/cycline B se forme mais ne s'active pas (articles 1 et 5).

C- L'activation du "checkpoint" G2/M par le Roundup

Des modifications post-traductionnelles sont requises pour l'activation du complexe CDK1/cycline B à la transition G2/M : la kinase CDK1, une fois associée à son partenaire cycline B, doit subir deux déphosphorylations sur les résidus Thr 14 et Tyr 15 pour acquérir son activité kinasique (introduction II B). Nous avons suivi l'état de phosphorylation de la kinase par des expériences de western blot sur des complexes purifiés à différents temps après fécondation (figure 30 et article 6).

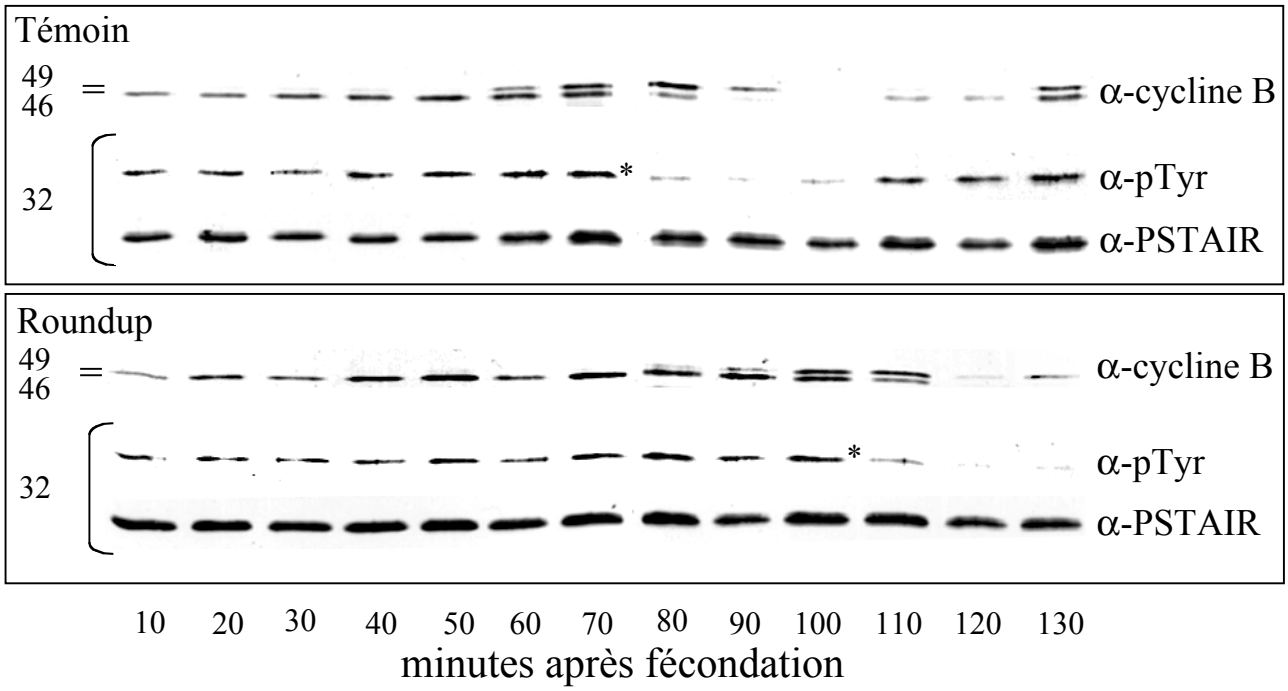


Figure 30 : Les effets du Roundup sur le profil d'accumulation de la cycline B et l'état de phosphorylation de CDK1 au cours des premiers cycles cellulaires du développement précoce de l'oursin (d'après Marc et al.*, sous presse,* Toxicol Sci*).*

Dans les embryons contrôles, nous observons des changements du niveau de phosphorylation sur tyrosine de CDK1 (figure 30) : le signal p-Tyr diminue, correspondant à la déphosphorylation activatrice du résidu en métaphase (signalée par une étoile pour chaque

lot d'embryons). Nous démontrons que le Roundup provoque un retard de la déphosphorylation sur tyrosine de CDK1 (figure 30 et article 6). Nous avons contrôlé que la quantité totale de CDK1 (α-PSTAIR) est comparable dans les embryons contrôles et traités au Roundup (figure 30 et article 6). Les profils d'accumulation de la cycline B sont comparables pour les embryons contrôles et traités au Roundup (figure 30 et articles 1 et 5). Le retard de la déphosphorylation sur tyrosine de CDK1, le retard de l'apparition du doublet de cycline B, reflétant l'activation du complexe, et le retard dans l'apparition du premier clivage mitotique sont tous trois temporellement corrélés (article 6).

Une autre modification post-traductionnelle de CDK1 est requise pour l'entrée en phase M, la phosphorylation activatrice du résidu thréonine 161 (introduction II B). Nous avons suivi l'état de phosphorylation de CDK1 sur la Thr-161 par des expériences de western blot sur des complexes purifiés à différents temps après fécondation (figure 31).

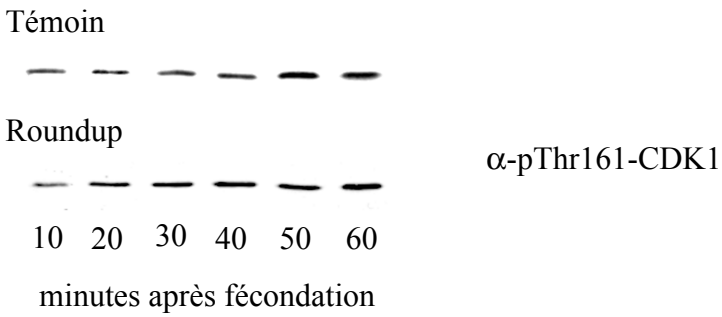


Figure 31 : L'effet du Roundup sur la phosphorylation activatrice sur Thr-161 de CDK1 au cours du développement précoce de l'oursin.
Le complexe CDK1 et les protéines associeés sont purifiées par chromatographie d'affinité à partir d'embryons contrôles et traités au Ropundup (10 mM équivalent glyphosate). La présence de complexe CDK1/cycline B phosphorylé sur Thr-161 est détectée par western blot en utilisant un anticorps polyclonal anti-phospho CDK1-threonine-161 antibody (α-pThr161-CDK1 from Cell Signaling Technology). La figure est représentative de deux expériences indépendantes.

La cinétique d'accumulation de la phosphorylation sur thréonine est comparable dans les embryons contrôles et traités au Roundup (figure 31). Cette régulation n'est donc pas impliquée dans l'effet inhibiteur du Roundup sur le premier clivage mitotique.

Nous avons démontré que le Roundup affecte la déphosphorylation activatrice sur le résidu tyrosine de la kinase CDK1 (article 6), étape catalysée par la phosphatase cdc25 (introduction II B). Nous avons caractérisé l'activité de la phosphatase à partir d'extraits embryonnaires métaphasiques. L'effet du pesticide sur l'activité de la phosphatase a été évalué et nos résultats montrent que le glyphosate, seul ou en formulation dans le Roundup, même lorsqu'il est ajouté à une concentration de 16 mM, n'affecte pas directement l'activité de la phosphatase cdc25 (article 6). Le retard de la déphosphorylation sur tyrosine observée en présence de Roundup n'est donc pas médié par un effet direct du pesticide sur l'activité de la protéine phosphatase.

Maintenir les résidus inhibiteurs de CDK1 phosphorylés à la transition G2/M fait partie des stratégies mises en œuvre par la cellule en réponse à une perturbation de l'ADN ou un problème dans sa réplication (introduction II C). Nous avons suivi la cinétique d'activité de synthèse de l'ADN *in vivo* par la mesure de l'incorporation de thymidine radiomarquée dans l'ADN (article 6). La synthèse d'ADN des embryons contrôles augmente entre 20 et 50 minutes après la fécondation; celle des embryons traités au Roundup est inhibée à près de 75% (figure 34). L'effet du Roundup est comparable à celui de l'aphidicoline, un inhibiteur de synthèse d'ADN (figure 34). L'aphidicoline provoque un retard de la cytokinèse, résultant de l'existence d'un checkpoint en réponse aux dommages de l'ADN dans le premier cycle mitotique de l'oursin (article 6). L'inhibition de la synthèse d'ADN par le Roundup est en corrélation avec celle de la cytokinèse (article 6).

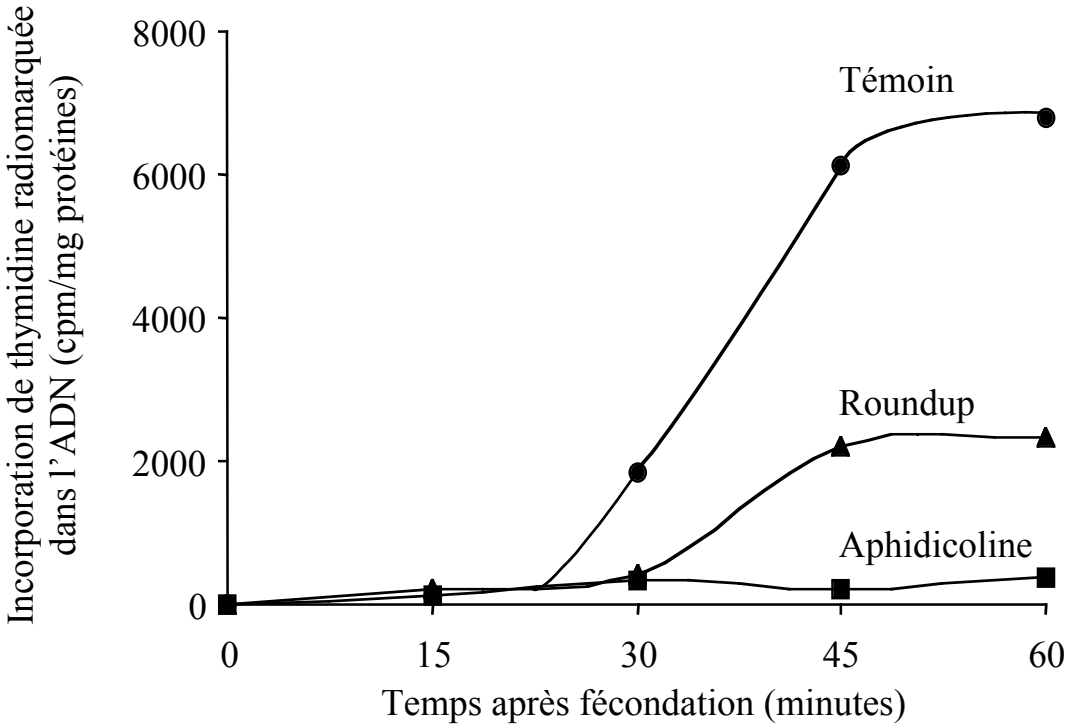


Figure 32 : L'effet du Roundup sur la cinétique de synthèse d'ADN in vivo *(d'après Marc* et al.*, sous presse,* Toxicol Sci*).*

En définitive, le Roundup affecte l'activité de synthèse d'ADN qui s'effectue pendant la phase S de la première division mitotique du développement précoce de l'oursin. La cellule détecte cette dérégulation et déclenche l'activation du mécanisme de surveillance situé à la transition G2/M du cycle cellulaire. L'activation de ce checkpoint G2/M se matérialise par le maintien des phosphorylations inhibitrices au niveau de CDK1, ce qui provoque un retard dans l'activation du complexe CDK1/cycline B, visualisé par le délai de phosphorylation du partenaire cycline B. Le retard de l'entrée en phase M se traduit par un retard dans l'apparition du premier clivage mitotique.

D- Les publications 4, 5 et 6

. Article 4 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O. & Bellé, R (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol Cell* **96,** 245-249.

Available online at www.sciencedirect.com
SCIENCE DIRECT®
Biology of the Cell 96 (2004) 245–249
Biology of the Cell
www.elsevier.com/locate/biocell

Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation

Julie Marc *, Odile Mulner-Lorillon, Robert Bellé

Station Biologique de Roscoff, Cycle Cellulaire et Développement, UMR 7127, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université Pierre et Marie Curie (UPMC), BP 74 29682 Roscoff Cedex France.

Received 15 October 2003; accepted 6 November 2003

Abstract

Cell-cycle dysregulation is a hallmark of tumor cells and human cancers. Failure in the cell-cycle checkpoints leads to genomic instability and subsequent development of cancers from the initial affected cell. A worldwide used product Roundup 3plus, based on glyphosate as the active herbicide, was suggested to be of human health concern since it induced cell cycle dysfunction as judged from analysis of the first cell division of sea urchin embryos, a recognized model for cell cycle studies.

Several glyphosate-based pesticides from different manufacturers were assayed in comparison with Roundup 3plus for their ability to interfere with the cell cycle regulation. All the tested products, Amega, Cargly, Cosmic, and Roundup Biovert induced cell cycle dysfunction. The threshold concentration for induction of cell cycle dysfunction was evaluated for each product and suggests high risk by inhalation for people in the vicinity of the pesticide handling sprayed at 500 to 4000 times higher dose than the cell-cycle adverse concentration.
© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.

Keywords: Cell cycle regulation; Glyphosate; Glyphosate formulation products; CDK1- cyclin B activation

1. Introduction

Cell cycle is the universal process by which cells reproduce and which underlies the growth and development of all living organisms. Considerable progress have been made on the molecular basis of cell cycle control during the past fifteen years concretized by the 2001 Nobel price for Medecine and Physiology to Lee Hartwell, Paul Nurse and Tim Hunt (Nasmyth, 2001; Dorée, 2001). A considerable body of evidence has proven the highly conserved molecular basis of cell cycle from single unicellular eucaryotes to complex metazoans such as humans and the crucial role played by the protein kinases known as cyclin-dependent kinases (CDKs) in the cell cycle transitions (Nurse, 2000; Nigg, 2001; O'Farrel, 2001; Dorée and Hunt, 2002). Eucaryotic cells have developed control mechanisms known as cell-cycle checkpoints (Hartwell and Weinert, 1989) that restrain cell-cycle transitions in response to stress, allowing the repair of cellular damage or eventually leading to programmed cell death. Cell-cycle dysregulation is a hallmark of tumor cells and human cancers. Failure in the cell-cycle checkpoints leads genomic instability and subsequent development of cancers from the affected cell (Molinari, 2000; Stewart et al., 2003).

Worldwide, there is increasing usage of pesticides in agriculture, industry and for domestic applications that results in a great part of the population exposed to these compounds (Maroni, 2000). The immediate risk of accurate or accidental expose to high levels of pesticides can be readily evaluated, in contrast, the evaluation of risk associated to chronic exposure is a major challenge (Barr et al., 1999; Maroni, 2000). In the field of human cancer, there are correlative or epidemiological lines of evidence that chronic exposure to various environmental products among which pesticides, are associated with increasing frequency of cancers (Barr et al., 1999; De Ross et al., 2003). Since cancers develop years or decades after the primary dysfunction of a single cell (Molinari, 2000), it is a great importance to develop prevention strategies on the basis of the knowledge of the undesirable molecular targets or signaling pathways of pollutants such as pesticides.

Glyphosate is the active herbicide component of Roundup (Malik et al., 1989). Glyphosate alone or with its formulation products was previously considered to be harmless in normal usage and at chronic exposure in previous testing approaches (Williams et al., 2000). However, toxic effect of Roundup at

* Corresponding author. Station Biologique, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France. Tel: 33 (0) 2 98 29 23 46; fax: 33 (0) 2 98 29 23 06.
E-mail address: marc@sb-roscoff.fr (J. Marc).

© 2004 Elsevier SAS. All rights reserved.
doi:10.1016/j.biolcel.2003.11.010

. Article 5 : Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Durand, G. & Bellé, R. (2003). Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environ Chem Lett* **1,** 8-12.

Environ Chem Lett (2003) 1:8–12
DOI 10.1007/s10311-002-0015-2

ORIGINAL PAPER

J. Marc · O. Mulner-Lorillon · G. Durand · R. Belle

Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level

Accepted: 5 September 2002 / Published online: 23 January 2003
© Springer-Verlag 2003

Abstract Cell cycle mechanisms are highly conserved from unicellular eukaryotes to complex metazoans including humans. Abnormalities in the regulation of the cell cycle result in death or diseases such as cancer. Early development of sea urchin has proved to be a powerful model for cell division studies and offers the opportunity to study synchronous cell divisions in the absence of transcriptional control. We have analyzed pesticide-induced dysfunctions in the first cell division following fertilization in sea urchin embryos, using Roundup, a widely used pesticide formulation containing isopropylamine glyphosate as the active substance. The pesticide induced cell cycle dysfunction by preventing the in vivo activation of the universal cell cycle regulator CDK1/cyclin B. We further show that synthesis of the regulator protein, cyclin B, as well as its association to the catalytic protein, CDK1, were not affected by the pesticide. Therefore, our results suggest that the pollutant impedes the processing of the CDK1/cyclin B complex, which is required in its physiological activation. Our studies demonstrate the relevance of sea urchin embryonic cells as a sensitive model to assess pesticide toxicity at the level of the universal cell cycle checkpoints.

Keywords Environmental pollution · Glyphosate pesticide · Cell cycle regulation · Early development · CDK1:cyclinB

R. Belle can also be reached at http://www.sb-roscoff.fr.

J. Marc · O. Mulner-Lorillon · R. Belle (✉)
Station Biologique de Roscoff,
Université Pierre et Marie Curie (UFR 937),
Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS, UMR 7127),
BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France
e-mail: belle@sb-roscoff.fr
Tel.: +33-2-98292346; Fax: +33-2-98292306

G. Durand
Pôle Analytique des Eaux,
120 avenue A. De Rochon,
BP 52, 29280 Plouzane, France

Introduction

The use of pesticides is of major concern for both environment and human health. Toxicologists apply a battery of tests to identify chemicals of potential human and environmental toxicity. Due to the wide variety and numbers of chemicals, as well as the evaluation of synergic effects of multi-exposures, there is a need to develop alternative methods based on identification of molecular markers of biological disorders (Thomas et al. 2001). Among the human health concerns, exposure to several groups of pesticides has been associated with various cancers (Blair and Zahm 1990; Barr et al. 1999) or reproductive and developmental disorders (Sever et al. 1997). These pathologies may be linked to abnormal cell cycles, the universal process by which cells reproduce and which underlies the growth and development of all living organisms. Human cancers are associated with defects in the control of cell cycle transitions (Molinari 2000) due to failure in the checkpoints (Hartwell and Weinert 1989) that ensure the proper order and correct execution of cell cycle events. The molecular basis of cell cycle control is highly conserved from single unicellular eukaryotes to complex metazoans such as humans as reviewed by Nurse (2000), Nigg (2001), and O'Farrell (2001). The cell cycle is under the control of universal regulators, the cyclin-dependent kinases (CDKs). Among them, the CDK1/cyclin B complex regulates entry into M-phase, the phase of the cell cycle during which chromosomes segregate. Activation of the CDK1/cyclin B regulator requires the synthesis of the cyclin B protein component, its association with CDK1 protein pre-existing in the cells and a further molecular switch leading to activation of the CDK1/cyclin B complex, through post-translational modifications, as reviewed by Nurse (2000), Nigg (2001), and O'Farrell (2001).

We used sea urchin embryos, a powerful convenient model in cell cycle studies (Nurse 2000), in order to provide a molecular basis for assessing the risk of pesticide usage in altering cell cycle controls. Sea urchin early de-

. Article 6 : Marc, J., Bellé, 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 (sous presse, *Toxicol Sci*).

Formulated glyphosate activates the DNA-response checkpoint of the cell cycle leading to the prevention of G2/M transition.

Julie Marc, Robert Bellé, Julia Morales, Patrick Cormier and Odile Mulner-Lorillon

Station Biologique de Roscoff, Cycle Cellulaire et Développement, Unité Mer & Santé (FRE 2775), Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and Université Pierre et Marie Curie (UPMC), BP 74, 29682 Roscoff Cedex France.

Running title: formulated glyphosate and cell cycle checkpoint

Corresponding author : Robert Bellé, Station Biologique, BP 74, 29682 Roscoff Cedex, France.

Tel: 33 (0) 2 98 29 23 46; fax: 33 (0) 2 98 29 23 06

E-mail address: belle@sb-roscoff.fr

CONCLUSIONS

&

PERSPECTIVES

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

I- L'embryon d'oursin permet l'étude des effets des polluants sur le cycle cellulaire et le développement précoce

L'utilisation du développement précoce de l'oursin nous a permis de mettre en évidence différents types de dysfonctionnements tant sur les phases de cycle cellulaire que sur des phases du développement précoce et ceci en réponse à l'exposition à des pesticides et métaux lourds. Concernant les pesticides, nous avons mis en évidence un effet de formulations commerciales. Ce sont ces spécialités commerciales et non les substances actives isolées qui sont déversées dans l'environnement. L'évaluation des risques liés à l'exposition aux formulations commerciales correspond au risque réel encouru dans l'environnement.

De plus, nous avons montré que les effets sur le cycle cellulaire n'apparaissent que si glyphosate et surfactants sont présents. Le glyphosate seul n'a pas d'effet sur le développement précoce de l'oursin; il est possible qu'il ne puisse atteindre ses cibles intracellulaires sans la présence du surfactant. De la même manière, dans la plante, le surfactant est indispensable à l'activité herbicide du glyphosate. L'étude des effets du Roundup, la spécialité commerciale, a donc permis de mettre en évidence un nouvel effet indésirable du glyphosate, la substance active.

Le caractère novateur de nos travaux vient également du fait que l'effet du Roundup sur le cycle cellulaire n'avait jusqu'à maintenant pas été mis en évidence dans les tests de génotoxicité ou de cancérogénicité. Le glyphosate, aux concentrations recommandées par les fabricants, est en effet considéré comme non génotoxique et non carcinogène (introduction I

C). L'utilisation du développement précoce de l'oursin a donc permis de mettre en évidence un effet toxique d'une substance considérée comme non toxique par les instances réglementaires. L'universalité des molécules impliquées dans les différents mécanismes essentiels à la vie et notamment dans le processus de division cellulaire crédibilise les analyses moléculaires des effets observés à partir du développement précoce de l'oursin, même si les résultats doivent être vérifiés dans des cellules de Mammifères.

II- La cible moléculaire du Roundup : l'ADN

Le Roundup agit initialement au niveau de l'ADN. Nous ne connaissons pas le mécanisme précis qui induit l'inhibition de l'activité de synthèse d'ADN en réponse au Roundup. Cette inhibition déclenche une série d'effets grâce au mécanisme de surveillance existant dans la cellule. Indirectement, c'est-à-dire par le biais du checkpoint, le Roundup va donc agir sur la régulation de la transition G2/M et retarder ainsi l'entrée en phase M (figure 33).

Il est intéressant de remarquer que dans les deux effets observés consécutifs à l'exposition au Roundup, c'est-à-dire sur le cycle cellulaire et sur la transcription, la molécule d'ADN est impliquée, soit parce qu'elle doit être répliquée, soit parce qu'elle doit être transcrite en ARN. Plusieurs hypothèses sont envisageables en ce qui concerne la cible initiale du Roundup.

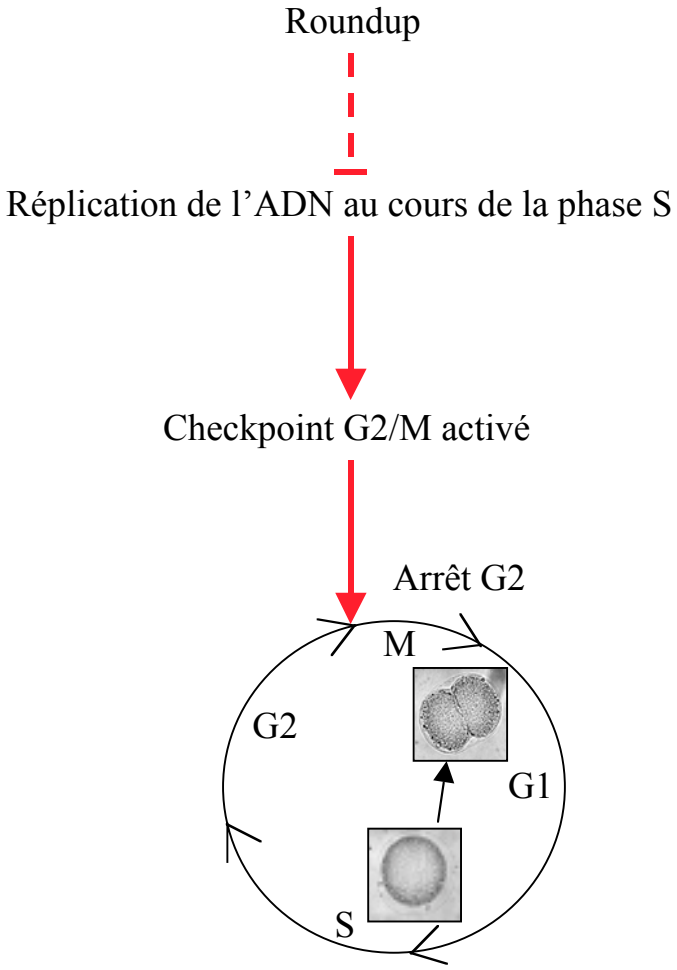


Figure 33 : Le déclenchement du checkpoint par le Roundup.

Le pesticide pourrait agir directement sur l'ADN en y provoquant une altération, inhibant ainsi la réplication et la transcription. À de fortes doses, le glyphosate est responsable d'insertions de fragments d'ADN, d'échanges entre chromatides sœurs ou encore d'aberrations chromosomiques (Vigfusson & Vyse, 1980; Rank *et al.,* 1993; Lioi *et al.,* 1998a et b), des altérations qui pourraient être à l'origine des défauts de réplication et de transcription de la molécule d'ADN. Ces altérations génétiques, qui sont associées au mécanisme de la réplication (revue par Tucker & Preston, 1996), pourraient être les déclencheurs des mécanismes de surveillance en réponse au Roundup. Concernant l'effet inhibiteur sur la transcription, il est intéressant de remarquer qu'un inhibiteur de transcription, l'actinomycine

D, agit de part son effet intercalant avec les paires de bases d'ADN; il forme ainsi un complexe avec l'ADN inhibant la synthèse d'ARN (Goldberg *et al.*, 1962).

Une seconde hypothèse est envisagée : dans les deux effets observés en présence de Roundup, la molécule d'ADN doit être lue par une polymérase, enzyme qui constitue donc une cible potentielle de l'action initiale du pesticide. Le Roundup pourrait agir en inhibant soit l'activité de la polymérase, comme le fait par exemple l'aphidicoline, soit la synthèse de la polymérase. Or, nous avons montré que l'augmentation de l'activité de synthèse protéique déclenchée à la fécondation est partiellement inhibée par la présence du pesticide; celle de la cycline B, en revanche, n'est pas affectée (article 1). Cependant, chez l'oursin, l'inhibition de la synthèse protéique n'affecte pas la première synthèse d'ADN (Zhang & Ruderman, 1993). L'inhibition partielle de la synthèse protéique par le pesticide n'est donc pas suffisante pour expliquer l'effet du pesticide.

Pour le moment, aucune donnée ne montre le lien entre la formule chimique du glyphosate et les deux effets observés avec celui-ci. Il est intéressant de remarquer que les deux types d'effets sont observés à des concentrations légèrement différentes en glyphosate. Par exemple, à 2 mM de glyphosate, le Roundup n'affecte pas le premier cycle cellulaire alors qu'il affecte déjà le mécanisme de transcription. En conséquence, le pesticide agit très probablement sur au moins deux cibles différentes, ce qui n'exclut en rien la possibilité d'interrelations entre les deux effets.

III- La dangerosité du Roundup pour la santé humaine

A- La dangerosité des effets du Roundup

Un dommage de l'ADN est lourd de conséquences s'il conduit à des changements qui vont se transmettre aux cellules filles lors de la réplication. Si le mécanisme normal permettant de maintenir une réplication fidèle est affecté, les altérations génétiques s'accumulent. Dans ce cas, un état d'instabilité génomique s'installe auquel des pathologies *in vivo* sont associées. Par exemple, la présence de réarrangements chromosomiques est corrélée à l'apparition des cancers (revue par Tucker & Preston, 1996). Nous avons pris en introduction l'exemple des rayons ultraviolets dont la présence déclenche les points de contrôle et dont l'exposition chronique est reconnue pour être responsable de l'apparition de cancers. Toute substance capable de déclencher les mécanismes de surveillance de la cellule est donc potentiellement dangereuse et l'effet du Roundup sur la régulation du cycle cellulaire pourrait donc être associé à l'apparition de cancers. À ce titre, l'exposition au glyphosate a été retrouvée associée à l'apparition de cancers dans plusieurs études épidémiologiques (introduction I C).

De plus, il est admis qu'une transcription efficace est essentielle au bon déroulement du développement embryonnaire, notamment parce que les ARN transcrits codent pour des protéines impliquées dans la détermination des territoires embryonnaires. L'effet du Roundup sur la transcription peut donc lui aussi être source de dysfonctionnements graves.

Les deux effets décrits en présence de Roundup sont donc associés à des pathologies et leur existence pose problème en terme de santé humaine. Cependant, il convient pour évaluer la dangerosité d'une substance de tenir compte des doses auxquelles les effets néfastes sont observés.

B- Les doses responsables de la toxicité

Les dysfonctionnements du cycle cellulaire et du développement précoce apparaissent à des concentrations en glyphosate de l'ordre du millimolaire :

- concernant l'effet sur le cycle cellulaire, la dose moyenne efficace responsable de 50 % de l'inhibition maximale pour tous les embryons exposés est 6,8 mM
- concernant l'effet sur la transcription, la dose moyenne efficace responsable de 50 % d'inhibition pour tous les embryons exposés est 1,6 mM.

En comparaison, les effets aigus et chroniques du glyphosate n'apparaissent qu'à des concentrations très élevées (introduction I C) correspondant à plus de 100 mM de glyphosate (100 mM correspond à 17 g/l). En revanche, certains effets génotoxiques sont observés à des concentrations beaucoup plus faibles, moins de 10 µM (introduction I C).

La différence entre les doses résiduelles de glyphosate présentes dans les eaux et la dose qui induit un dysfonctionnement ne doit pas conduire à sous-estimer le risque de l'exposition au Roundup. En effet, la différence peut être compensée au moins partiellement par la différence dans le temps d'exposition. Les traitements que nous avons appliqués peuvent mimer plusieurs jours ou mois voire plusieurs années d'exposition à de faibles concentrations aux pesticides, reflétant ainsi les niveaux d'exposition présents dans l'environnement.

Lorsque le pesticide est pulvérisé pour son usage herbicide, la concentration en glyphosate au sein de la goutte pulvérisée est très élevée, de 5 à 40 mM. Tous les organismes vivants présents dans la zone de pulvérisation, à commencer par l'agriculteur lui-même, sont donc susceptibles d'inhaler des gouttes de pesticide pouvant contenir jusqu'à 7 à 25 fois moins

que la dose suffisante pour induire les dysfonctionnements observés (en comparaison à 6,8 et 1,6 mM).

Dans nos expériences, le Roundup affecte 100 % des cellules exposées alors qu'un nombre très restreint de cellules dérégulées suffit à enclencher un processus tumoral. Un cancer peut se développer à partir d'une seule cellule plusieurs années voire plusieurs décennies après l'exposition au stress initial.

Enfin, il ne faut pas oublier que les pesticides sont souvent utilisés en combinaison et de faibles concentrations simultanées de plusieurs polluants peuvent conduire à des altérations en agissant de manière synergique.

IV- Des études qui permettent la connaissance du risque

Les études évaluant l'impact des polluants en santé humaine permettent de développer des bases et des outils d'aide à la décision des pouvoirs publics. Ainsi, les substances considérées comme à risque en matière de santé humaine sont interdites d'utilisation. Mais, il convient de rester prudent concernant les produits autorisés pour lesquels la prévention des risques reste la seule arme dont nous disposons. D'ailleurs, à côté du développement des moyens thérapeutiques, la lutte contre le cancer passe par deux modes d'action principaux, la prévention et le dépistage, que les autorités ont largement développés ces dernières années. Or, le développement des actions de prévention n'est rendue possible que par l'identification préalable des causes et concernant les pesticides, par l'identification de leurs mécanismes d'action. Notre travail fournit une base moléculaire permettant d'évaluer le risque que représente l'exposition aux spécialités commerciales à base de glyphosate. De ce fait, il informe sur les risques et la détermination du mode d'action d'agents potentiellement cancérigènes. Le risque concerne les personnes exposées directement lors de la pulvérisation

de ces produits à des fins de désherbage et les personnes ingérant de façon prolongée de faibles doses résiduelles de ces pesticides, présentes dans les eaux et l'alimentation.

Beaucoup reste à faire quant à l'évaluation des risques dus à l'exposition simultanée à plusieurs agents responsables de potentiels dommages de l'ADN; les interactions pouvant exister entre plusieurs carcinogènes restent mal comprises et fastidieuses à étudier. La mise au point de tests permettant d'évaluer à grande échelle les effets de substances anthropiques, seules et en combinaison, est donc prometteuse. Par exemple, les technologies microarray permettent d'étudier les profils d'expression des gènes en présence d'une mixture d'agents. D'autre part, les différents acteurs impliqués dans les dysfonctionnements que nous avons étudiés sont autant de marqueurs moléculaires pouvant être utilisés pour caractériser les effets des polluants. À ce titre, il serait possible de valoriser nos travaux en les adaptant au sein d'un test évaluant les effets des polluants sur la régulation du cycle cellulaire. Il faudrait pour cela mettre au point un système acellulaire contenant tous les éléments requis pour la transition G2/M *in vivo*. Aujourd'hui, des tests permettent de détecter des perturbations isolées au niveau de chaque élément d'une voie de régulation. Dans notre cas, le test pourrait détecter en une seule fois n'importe quelle perturbation d'un des éléments de la voie de régulation du cycle cellulaire. Par exemple, l'effet du Roundup n'aurait pu être détecté en utilisant un test classique de mesure de l'activité du complexe CDK1/cycline B car le pesticide atteint la régulation de ce dernier et non son activité kinasique. Ce test permettrait donc un criblage systématique d'agents anthropiques et naturels agissant à la fois sur la régulation du cycle cellulaire et sur l'activité directe des régulateurs du cycle cellulaire. Nous pourrions également évaluer de manière rapide les effets dus à une combinaison de polluants. La présence d'effets synergiques est un des critères les plus difficiles à estimer et pourtant, la multiplicité des polluants présents dans l'environnement est le reflet des conditions auxquelles nous sommes continuellement exposés.

V- Le Roundup déclenche le mécanisme de surveillance

L'utilisation du glyphosate nous a permis de mettre en évidence le déclenchement du point de contrôle situé en G2/M au cours de la première division mitotique dans les embryons d'oursin. Différents acteurs de la régulation de la transition G2/M peuvent être activés ou inhibés dans le déclenchement du checkpoint (introduction II C). Le pesticide pourra être utilisé comme nouvelle molécule pour étudier la voie utilisée par la cellule dans le déclenchement du checkpoint G2/M. Quelles sont les voies potentielles à étudier?

La localisation intracellulaire de la cycline B est déterminante pour la transition G2/M (introduction II B). Chez *Sphaerechinus granularis*, la cycline B est déjà présente dans le noyau avant la phase S et même au moment du stade pronucleus (Geneviève-Garrigues *et al.,* 1995). Il semble que le mécanisme permettant à la cycline B d'être exclue du noyau existe mais il ne serait pas actif durant le premier cycle cellulaire de l'oursin. La localisation intracellulaire du complexe CDK1/cycline B n'est donc probablement pas la voie utilisée par la cellule pour retarder le cycle cellulaire.

Une voie possible utilisée par la cellule serait l'activation des kinases inhibitrices Wee1/Myt1. Chez l'oursin *Strongylocentrotus purpuratus*, la régulation de la déphosphorylation activatrice serait principalement le fait de la phosphatase à double spécificité, cdc25 (Nemer & Stuebing, 1996). Ces données concernant une autre espèce d'oursin, nous ne pouvons exclure la possibilité que, chez *Sphaerechinus granularis*, la kinase Wee et les éléments impliqués dans sa régulation soient impliqués dans le checkpoint en réponse au pesticide.

Une autre voie potentielle est l'inhibition de la phosphatase cdc25 responsable des déphosphorylations activatrices de CDK1. Nous avons démontré que, dans le déclenchement du checkpoint en présence de Roundup, l'activité directe de la phosphatase n'est pas affectée

(article 6); il pourrait en revanche agir au niveau de la régulation de son activité. Il s'agit d'un mécanisme complexe qui implique des modifications de la quantité de la protéine au cours du cycle cellulaire, des changements de localisation intracellulaire corrélés à la phosphorylation de résidus inhibiteurs et à l'association avec la protéine 14-3-3 ou encore des modifications post-traductionnelles de résidus activateurs corrélées à l'activation de la phosphatase. Tous ces éléments ainsi que les protéines qui ont déjà été impliquées dans le déclenchement du checkpoint, la kinase p38, les kinases du checkpoint Chk1 et Chk2, la kinase polo, sont potentiellement impliqués dans le checkpoint en réponse au Roundup.

L'utilisation du glyphosate pourrait permettre de découvrir quels éléments, parmi les voies potentielles que nous venons d'évoquer, sont présents et impliqués dans le point de contrôle chez l'oursin.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbe, J. C., & Dorée, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G2/M-phase transition of the cell cycle in Xenopus eggs. *J Cell Sci* **111,** 1751-1757.

Acquavella, J. F., Alexander, B. H., Mandel, J. S., Gustin, C., Baker, B., Chapman, P., & Bleeke, M. (2004). HGlyphosate biomonitoring for farmers and their families: results from the Farm Family Exposure Study. *Environ Health Perspect* **112,** 321-326.

Adam, A., Marzuki, A., Abdul Rahman, H., & Abdul Aziz, M. (1997). The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. *Vet Hum Toxicol* **39,** 147-151.

Alavanja, M. C., Hoppin, J. A., & Kamel, F. (2004). Health effects of chronic pesticide exposure : cancer and neurotoxicity. *Annu Rev Public Health* **25,** 155-197.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1983). Molecular Biology of the Cell (First Edition), Garland Publishing, Inc., New York & London.

Alibhai, M. F., & Stallings, W. C. (2001). Closing down on glyphosate inhibition--with a new structure for drug discovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 2944-2946.

Amon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev* **9,** 69-75.

Arbuckle, T. E., Lin, Z., & Mery, L. S. (2001). An exploratory analysis of the effect of pesticide exposure on the risk of spontaneous abortion in an Ontario farm population. *Environ Health Perspect* **109,** 851-857.

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

Arion, D., Meijer, L., Brizuela, L., & Beach, D. (1988). cdc2 is a component of the M phase-specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF. *Cell* **55,** 371-378.

Axelrad, J. C., Howard, C. V., & McLean, W. G. (2003). The effects of acute pesticide exposure on neuroblastoma cells chronically exposed to diazinon. *Toxicology* **185,** 67-78.

Babut, M., Corinne, B., Marc, B., Patrick, F., Jeanne, G., & Genevieve, G. (2003). Developing environmental quality standards for various pesticides and priority pollutants for French freshwaters. *J Environ Manage* **69,** 139-147.

Barbosa, E. R., Leiros da Costa, M. D., Bacheschi, L. A., Scaff, M., & Leite, C. C. (2001).

Parkinsonism after glycine-derivate exposure. *Mov Disord* **16,** 565-658.

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. (1999). Strategies for biological monitoring of exposure for contemporary-use pesticides. *Toxicol Ind Health* **15,** 168-179.

Barr, D. B., & Needham, L. L. (2002). Analytical methods for biological monitoring of exposure to pesticides: a review. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **778,** 5-29.

Bartek, J., & Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr Opin Cell Biol* **13,** 738-747.

Bartholomew, C. R., Woo, S. H., Chung, Y. S., Jones, C., & Hardy, C. F. (2001). Cdc5 interacts with the Wee1 kinase in budding yeast. *Mol Cell Biol* **21,** 4949-4959.

Belles, M., Albina, M. L., Sanchez, D. J., Corbella, J., & Domingo, J. L. (2002). Interactions in developmental toxicology: effects of concurrent exposure to lead, organic mercury, and arsenic in pregnant mice. *Arch Environ Contam Toxicol* **42,** 93-98.

Bharadwaj, R., & Yu, H. (2004). The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene* **23,** 2016-2027.

Blackburn, L. G., & Boutin, C. (2003). Subtle effects of herbicide use in the context of genetically modified crops: a case study with glyphosate (Roundup). *Ecotoxicology* **12,** 271-285.

Blasina, A., de Weyer, I. V., Laus, M. C., Luyten, W. H., Parker, A. E., & McGowan, C. H. (1999). A human homologue of the checkpoint kinase Cds1 directly inhibits Cdc25 phosphatase. *Curr Biol* **9,** 1-10.

Bolognesi, C. (2003). Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. *Mutat Res* **543,** 251-272.

Borgne, A., Ostvold, A. C., Flament, S., & Meijer, L. (1999). Intra-M phase-promoting factor phosphorylation of cyclin B at the prophase/metaphase transition. *Journal of Biological Chemistry* **274,** 11977-11986.

Brandis, J. W., & Raff, R. A. (1978). Translation of oogenetic mRNA in sea urchin eggs and early embryos. Demonstration of a change in translational efficiency following fertilization. *Dev Biol* **67,** 99-113.

Brandis, J. W., & Raff, R. A. (1979). Elevation of protein synthesis is a complex response to fertilization. *Nature* **278,** 467-469.

Brent, R. L. (2004). Utilization of animal studies to determine the effects and human risks of environmental toxicants (drugs, chemicals, and physical agents). *Pediatrics* **113,** 984-

995.

Brewster, D. W., Warren, J., & Hopkins, W. E., 2nd. (1991). Metabolism of glyphosate in Sprague-Dawley rats: tissue distribution, identification, and quantitation of glyphosate-derived materials following a single oral dose. *Fundam Appl Toxicol* **17,** 43-51.

Bulavin, D. V., Higashimoto, Y., Popoff, I. J., Gaarde, W. A., Basrur, V., Potapova, O., Appella, E., & Fornace, A. J., Jr. (2001). Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. *Nature* **411,** 102-107.

Bunz, F., Dutriaux, A., Lengauer, C., Waldman, T., Zhou, S., Brown, J. P., Sedivy, J. M., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. *Science* **282,** 1497-1501.

Buolamwini, J. K. (2000). Cell cycle molecular targets in novel anticancer drug discovery. *Curr Pharm Des* **6,** 379-392.

Busino, L., Chiesa, M., Draetta, G. F., & Donzelli, M. (2004). Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene* **23,** 2050-2056.

Cabrera, C. V., Lee, J. J., Ellison, J. W., Britten, R. J., & Davidson, E. H. (1984). Regulation of cytoplasmic mRNA prevalence in sea urchin embryos. Rate of appearance and turnover for specific sequences. *J Mol Biol* **174,** 85-111.

Carroll, D. J., Albay, D. T., Hoang, K. M., O'Neill, F. J., Kumano, M., & Foltz, K. R. (2000). The relationship between calcium, MAP kinase, and DNA synthesis in the sea urchin egg at fertilization. *Dev Biol* **217,** 179-191.

Carroll, D. J., Albay, D. T., Terasaki, M., Jaffe, L. A., & Foltz, K. R. (1999). Identification of PLCgamma-dependent and -independent events during fertilization of sea urchin eggs. *Dev Biol* **206,** 232-247.

Chan, P., & Mahler, J. (1992). NTP technical report on the toxicity studies of Glyphosate (CAS No. 1071-83-6) Administered In Dosed Feed To F344/N Rats And B6C3F1 Mice. *Toxic Rep Ser* **16,** 1-D3.

Chow, J. P., Siu, W. Y., Ho, H. T., Ma, K. H., Ho, C. C., & Poon, R. Y. (2003). Differential contribution of inhibitory phosphorylation of CDC2 and CDK2 for unperturbed cell cycle control and DNA integrity checkpoints. *J Biol Chem* **278,** 40815-40828.

Clarke, P. R., Hoffmann, I., Draetta, G., & Karsenti, E. (1993). Dephosphorylation of cdc25-C by a type-2A protein phosphatase: specific regulation during the cell cycle in Xenopus egg extracts. *Mol Biol Cell* **4,** 397-411.

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

Collas, P. (2000). Formation of the sea urchin male pronucleus in cell-free extracts. *Mol Reprod Dev* **56,** 265-270.

Colosio, C., Tiramani, M., & Maroni, M. (2003). Neurobehavioral effects of pesticides: state of the art. *Neurotoxicology* **24,** 577-591.

Connell, D. W. (1997). Basic concepts of Envrionmental Chemistry. Lewis Publishers, New York.

Costa, M. (1998). Carcinogenic metals. *Sci Prog* **81,** 329-339.

Dalal, S. N., Schweitzer, C. M., Gan, J., & DeCaprio, J. A. (1999). Cytoplasmic localization of human cdc25C during interphase requires an intact 14-3-3 binding site. *Mol Cell Biol* **19,** 4465-4479.

Dallegrave, E., Mantese, F. D., Coelho, R. S., Pereira, J. D., Dalsenter, P. R., & Langeloh, A. (2003). The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup in Wistar rats. *Toxicol Lett* **142,** 45-52.

Daruich, J., Zirulnik, F., & Gimenez, M. S. (2001). Effect of the herbicide glyphosate on enzymatic activity in pregnant rats and their fetuses. *Environ Res* **85,** 226-331.

Davidson, E. H. (1986). The nature and function of maternal transcripts. *In* "Gene activity in early development" (E. DAVIDSON, Ed.), pp. 46-125. Academic Press, Orlando.

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

De Falco, G., & Giordano, A. (1998). CDK9 (PITALRE): a multifunctional cdc2-related kinase. *J Cell Physiol* **177,** 501-506.

De Marco, A., De Simone, C., Raglione, M., Testa, A., & Trinca, S. (1992). Importance of the type of soil for the induction of micronuclei and the growth of primary roots of Vicia faba treated with the herbicides atrazine, glyphosate and maleic hydrazide. *Mutat Res* **279,** 9-13.

De Nadai, C., Cailliau, K., Epel, D., & Ciapa, B. (1998). Detection of phospholipase Cgamma in sea urchin eggs. *Dev Growth Differ* **40,** 669-676.

De Roos, A. J., Zahm, S. H., Cantor, K. P., Weisenburger, D. D., Holmes, F. F., Burmeister, L. F., & Blair, A. (2003). Integrative assessment of multiple pesticides as risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men. *Occup Environ Med* **60,** E11.

De Ruiter, H. (2002). Developments in adjuvant use for agrochemicals. *Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet* **67,** 19-25.

De Smedt, V., Poulhe, R., Cayla, X., Dessauge, F., Karaiskou, A., Jessus, C., & Ozon, R. (2002). Thr-161 phosphorylation of monomeric Cdc2. Regulation by protein phosphatase 2C in Xenopus oocytes. *J Biol Chem* **277,** 28592-28600.

Delalande, C., Bellé, R., Cormier, P., & Mulner-Lorillon, O. (1999). Transient increase of a protein kinase activity identified to CK2 during sea urchin development. *Biochem Biophys Res Commun* **266,** 425-431.

Deman, J., & Van Larebeke, N. (2001). Carcinogenesis: mutations and mutagens. *Tumour Biol* **22,** 191-202.

Deschomets, G. (2001). Les adjuvants du glyphosate. *Phytoma* **541**, 14-16.

Devault, A., Fesquet, D., Cavadore, J. C., Garrigues, A. M., Labbe, J. C., Lorca, T., Picard, A., Philippe, M., & Doree, M. (1992). Cyclin A potentiates maturation-promoting factor activation in the early Xenopus embryo via inhibition of the tyrosine kinase that phosphorylates cdc2. *J Cell Biol* **118,** 1109-1120.

Devault, A., Martinez, A. M., Fesquet, D., Labbe, J. C., Morin, N., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Cavadore, J. C., & Doree, M. (1995). MAT1 ('menage a trois') a new RING finger protein subunit stabilizing cyclin H-cdk7 complexes in starfish and Xenopus CAK. *Embo J* **14,** 5027-5036.

Donzelli, M., & Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* **4,** 671-677.

Dorée, M. (2003). Triggering cell mitosis in higher eukaryotes. *Med Sci (Paris)* **19,** 299-307.

Dubé, F. (1988). Effect of reduced protein synthesis on the cell cycle in sea urchin embryos. *J Cell Physiol* **137,** 545-552.

Ducommun, B., Draetta, G., Young, P., & Beach, D. (1990). Fission yeast cdc25 is a cell-cycle regulated protein. *Biochem Biophys Res Commun* **167,** 301-309.

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

Dunphy, W. G., & Kumagai, A. (1991). The cdc25 protein contains an intrinsic phosphatase activity. *Cell* **67,** 189-196.

Eason, C., & O'Halloran, K. (2002). Biomarkers in toxicology versus ecological risk assessment. *Toxicology* **181-182,** 517-521.

Eddleston, M., & Phillips, M. R. (2004). Self poisoning with pesticides. *Bmj* **328,** 42-44.

Ekholm, S. V., & Reed, S. I. (2000). Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **12,** 676-684.

Elespuru, R. K. (1996). Future approaches to genetic toxicology risk assessment. *Mutat Res*

365, 191-204.

Emily-fenouil, F., Ghiglione, C., Lhomond, G., Lepage, T., & Gache, C. (1998). GSK3 beta/shaggy mediates patterning along the animal-vegetal axis of the sea urchin embryo. *Development* **125,** 2489-2498.

Epel, D. (1967). Protein synthesis in sea urchin eggs: a "late" response to fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA* **57,** 899-906.

Epel, D. (1990). The initiation of development at fertilization. *Cell Differ Dev* **29,** 1-12.

Epel, D. (2003). Protection of DNA during early development: adaptations and evolutionary consequences. *Evol Dev* **5,** 83-88.

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

Everett, K. D., & Dickerson, H. W. (2003). Ichthyophthirius multifiliis and Tetrahymena thermophila tolerate glyphosate but not a commercial herbicidal formulation. *Bull Environ Contam Toxicol* **70,** 731-738.

Falck, J., Mailand, N., Syljuasen, R. G., Bartek, J., & Lukas, J. (2001). The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature* **410,** 842-847.

Fesquet, D., Labbe, J. C., Derancourt, J., Capony, J. P., Galas, S., Girard, F., Lorca, T., Shuttleworth, J., Dorée, M., & Cavadore, J. C. (1993). The MO15 gene encodes the catalytic subunit of a protein kinase that activates cdc2 and other cyclin-dependent kinases (CDKs) through phosphorylation of Thr161 and its homologues. *Embo J* **12,** 3111-3121.

Finkielstein, C. V., Lewellyn, A. L., & Maller, J. L. (2001). The midblastula transition in Xenopus embryos activates multiple pathways to prevent apoptosis in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98,** 1006-1011.

Fisher, R. P., & Morgan, D. O. (1994). A novel cyclin associates with MO15/CDK7 to form the CDK-activating kinase. *Cell* **78,** 713-724.

Folmar, L. C., Sanders, H. O., & Julin, A. M. (1979). Toxicity of the herbicide glyphosphate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol* **8,** 269-278.

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

Galaktionov, K., & Beach, D. (1991). Specific activation of cdc25 tyrosine phosphatases by B-type cyclins: evidence for multiple roles of mitotic cyclins. *Cell* **67,** 1181-1194.

Galaktionov, K., Lee, A. K., Eckstein, J., Draetta, G., Meckler, J., Loda, M., & Beach, D. (1995). CDC25 phosphatases as potential human oncogenes. *Science* **269,** 1575-1577.

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

Gautier, J., Solomon, M. J., Booher, R. N., Bazan, J. F., & Kirschner, M. W. (1991). cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates p34cdc2. *Cell* **67,** 197-211.

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

Girard, F., Strausfeld, U., Fernandez, A., & Lamb, N. J. (1991). Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts. *Cell* **67,** 1169-1179.

Giudice, G. (1973). Developmental biology of the sea urchin embryo. Editions Academic press New York and London.

Giusti, A. F., O'Neill, F. J., Yamasu, K., Foltz, K. R., & Jaffe, L. A. (2003). Function of a sea urchin egg Src family kinase in initiating Ca2+ release at fertilization. *Dev Biol* **256,** 367-378.

Goldberg, I. H., Rabinowitz, M., & Reich, E. (1962). Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48,** 2094-2101.

Gould, K. L., Moreno, S., Owen, D. J., Sazer, S., & Nurse, P. (1991). Phosphorylation at Thr167 is required for Schizosaccharomyces pombe p34cdc2 function. *Embo J* **10,** 3297-3309.

Gould, K. L., Moreno, S., Tonks, N. K., & Nurse, P. (1990). Complementation of the mitotic activator, p80cdc25, by a human protein-tyrosine phosphatase. *Science* **250,** 1573-1576.

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

Goustin, A. S., & Wilt, F. H. (1981). Protein synthesis, polyribosomes, and peptide elongation in early development of Strongylocentrotus purpuratus. *Dev Biol* **82,** 32-40.

Grainger, J. L., Von Brunn, A., & Winkler, M. M. (1986). Transient synthesis of a specific set of proteins during the rapid cleavage phase of sea urchin development. *Dev Biol* **114,**

403-415.

Grainger, J. L., & Winkler, M. M. (1987). Fertilization triggers unmasking of maternal mRNAs in sea urchin eggs. *Mol Cell Biol* **7,** 3947-3954.

Grainger, J. L., Winkler, M. M., Shen, S. S., & Steinhardt, R. A. (1979). Intracellular pH controls protein synthesis rate in the sea urchin egg and early embryo. *Dev Biol* **68,** 396-406.

Gross, P. R., & Cousineau, G. H. (1963). Effects of actinomycin D on macromolecule synthesis and early development in sea urchin eggs. *Biochem Biophys Res Commun* **10,** 321-326.

Gross, P. R., & Cousineau, G. H. (1964). Macromolecule synthesis and the influence of actinomycin on early development. *Exp Cell Res* **33,** 368-395.

Gross, P. R., & Fry, B. J. (1966). Continuity of protein synthesis through cleavage metaphase. *Science* **153,** 749-751.

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

Hardell, L., & Eriksson, M. (1999). A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. *Cancer* **85,** 1353-1360.

Hardell, L., Eriksson, M., & Nordstrom, M. (2002). Exposure to pesticides as risk factor for non-Hodgkin's lymphoma & hairy cell leukemia: pooled analysis of two Swedish case-control studies. *Leuk Lymphoma* **43,** 1043-1049.

Harper, J. W., & Adams, P. D. (2001). Cyclin-dependent kinases. *Chem Rev* **101,** 2511-2526.

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

Heinecke, J. W., & Shapiro, B. M. (1990). Protein kinase C activates the respiratory burst of fertilization, but not cortical granule exocytosis, in ionophore-stimulated sea urchin eggs. *Dev Biol* **142,** 216-223.

Hermeking, H. (2003). The 14-3-3 cancer connection. *Nat Rev Cancer* **3,** 931-943.

Hille, M. B., Dholakia, J. N., Wahba, A., Fanning, E., Stimler, L., Xu, Z., & Yablonka-reuveni, Z. (1990). In-vivo and in-vitro evidence supporting co-regulation of translation in sea-urchin eggs by polypeptide initiation factors, pH optimization, and mRNAs. *J Reprod Fert* **42,** 235-248.

Hinchcliffe, E. H., Thompson, E. A., Miller, F. J., Yang, J., & Sluder, G. (1999). Nucleo-cytoplasmic interactions that control nuclear envelope breakdown and entry into mitosis in the sea urchin zygote. *J Cell Sci* **112,** 1139-1148.

Hixon, M. L., & Gualberto, A. (2000). The control of mitosis. *Front Biosci* **5,** D50-7.

Hoffmann, I., Clarke, P. R., Marcote, M. J., Karsenti, E., & Draetta, G. (1993). Phosphorylation and activation of human cdc25-C by cdc2--cyclin B and its involvement in the self-amplification of MPF at mitosis. *Embo J* **12,** 53-63.

Honda, R., Ohba, Y., Nagata, A., Okayama, H., & Yasuda, H. (1993). Dephosphorylation of human p34cdc2 kinase on both Thr-14 and Tyr-15 by human cdc25B phosphatase. *FEBS Lett* **318,** 331-334.

Honda, R., Ohba, Y., & Yasuda, H. (1992). The cell cycle regulator, human p50weel, is a tyrosine kinase and not a serine/tyrosine kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **186,** 1333-1338.

Hörstadius, S. (1973). Experimental embryology of Echinoderms. Editions Clarendon Press-Oxford.

Hultin, T. (1961). The effect of puromycin on protein metabolism and cell division in fertilized sea urchin eggs. *Exp Cell Res* **15,** 410-411.

Iavarone, A., & Massague, J. (1997). Repression of the CDK activator Cdc25A and cell-cycle arrest by cytokine TGF-beta in cells lacking the CDK inhibitor p15. *Nature* **387,** 417-422.

Ikegami, S., Amemiya, S., Oguro, M., Nagano, H., & Mano, Y. (1979). Inhibition by aphidicolin of cell cycle progression and DNA replication in sea urchin embryos. *J Cell Physiol* **100,** 439-444.

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

Iliakis, G., Wang, Y., Guan, J., & Wang, H. (2003). DNA damage checkpoint control in cells exposed to ionizing radiation. *Oncogene* **22,** 5834-5847.

Izumi, T., Walker, D. H., & Maller, J. L. (1992). Periodic changes in phosphorylation of the Xenopus cdc25 phosphatase regulate its activity. *Mol Biol Cell* **3,** 927-939.

Jaga, K., & Dharmani, C. (2003). Sources of exposure to and public health implications of organophosphate pesticides. *Rev Panam Salud Publica* **14,** 171-185.

Janssens, V., & Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem J* **353,** 417-439.

Jeffrey, P. D., Russo, A. A., Polyak, K., Gibbs, E., Hurwitz, J., Massague, J., & Pavletich, N. P. (1995). Mechanism of CDK activation revealed by the structure of a cyclinA-CDK2

complex. *Nature* **376,** 313-320.

Jessus, C., & Beach, D. (1992). Oscillation of MPF is accompanied by periodic association between cdc25 and cdc2-cyclin B. *Cell* **68,** 323-332.

Jessus, C., & Ozon, R. (1995). Function and regulation of cdc25 protein phosphate through mitosis and meiosis. *Prog Cell Cycle Res* **1,** 215-228.

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

Jiraungkoorskul, W., Upatham, E. S., Kruatrachue, M., Sahaphong, S., Vichasri-Grams, S., & Pokethitiyook, P. (2003). Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (Oreochromis niloticus). *Environ Toxicol* **18,** 260-267.

Johnson, J. D., & Epel, D. (1976). Intracellular pH and activation of sea urchin eggs after fertilization. *Nature* **262,** 661-664.

Karaiskou, A., Cayla, X., Haccard, O., Jessus, C., & Ozon, R. (1998). MPF amplification in Xenopus oocyte extracts depends on a two-step activation of cdc25 phosphatase. *Exp Cell Res* **244,** 491-500.

Karaiskou, A., Jessus, C., Brassac, T., & Ozon, R. (1999). Phosphatase 2A and polo kinase, two antagonistic regulators of cdc25 activation and MPF auto-amplification. *J Cell Sci* **112,** 3747-3756.

Kasten, M., & Giordano, A. (2001). Cdk10, a Cdc2-related kinase, associates with the Ets2 transcription factor and modulates its transactivation activity. *Oncogene* **20,** 1832-1838.

Kawahara, H., Philipova, R., Yokosawa, H., Patel, R., Tanaka, K., & Whitaker, M. (2000). Inhibiting proteasome activity causes overreplication of DNA and blocks entry into mitosis in sea urchin embryos. *J Cell Sci* **113,** 2659-2670.

Kaya, B., Creus, A., Yanikoglu, A., Cabre, O., & Marcos, R. (2000). Use of the Drosophila wing spot test in the genotoxicity testing of different herbicides. *Environ Mol Mutagen* **36,** 40-46.

Keyomarsi, K., & Pardee, A. B. (1993). Redundant cyclin overexpression and gene amplification in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90,** 1112-1116.

Kim, J. H., Kang, M. J., Park, C. U., Kwak, H. J., Hwang, Y., & Koh, G. Y. (1999b). Amplified CDK2 and cdc2 activities in primary colorectal carcinoma. *Cancer* **85,** 546-553.

Kim, S. H., Li, C., & Maller, J. L. (1999a). A maternal form of the phosphatase Cdc25A

regulates early embryonic cell cycles in Xenopus laevis. *Dev Biol* **212,** 381-391.

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

Kinsey, W. H. (1997). Tyrosine kinase signaling at fertilization. *Biochem Biophys Res Commun* **240,** 519-522.

Kleinjans, J. C. (2003). Principles in toxicological risk analysis. *Toxicol Lett* **140-141,** 311-315.

Knecht, R., Elez, R., Oechler, M., Solbach, C., von Ilberg, C., & Strebhardt, K. (1999). Prognostic significance of polo-like kinase (PLK) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* **59,** 2794-2797.

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

Kohzato, N., Dong, Y., Sui, L., Masaki, T., Nagahata, S., Nishioka, M., Konishi, R., & Tokuda, M. (2001). Overexpression of cyclin E and cyclin-dependent kinase 2 is correlated with development of hepatocellular carcinomas. *Hepatol Res* **21,** 27-39.

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

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

Krek, W., & Nigg, E. A. (1992). Cell cycle regulation of vertebrate p34cdc2 activity: identification of Thr161 as an essential in vivo phosphorylation site. *New Biol* **4,** 323-329.

Kubelka, M., Anger, M., Kalous, J., Schultz, R. M., & Motlik, J. (2002). Chromosome condensation in pig oocytes: lack of a requirement for either cdc2 kinase or MAP kinase activity. *Mol Reprod Dev* **63,** 110-118.

Kumagai, A., & Dunphy, W. G. (1992). Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in Xenopus extracts. *Cell* **70,** 139-151.

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

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

Kumagai, A., Yakowec, P. S., & Dunphy, W. G. (1998). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in Xenopus egg extracts. *Mol Biol Cell* **9,** 345-354.

Labbé, J. C., Capony, J. P., Caput, D., Cavadore, J. C., Derancourt, J., Kaghad, M., Lelias, J. M., Picard, A., & Doree, M. (1989). MPF from starfish oocytes at first meiotic metaphase is a heterodimer containing one molecule of cdc2 and one molecule of cyclin B. *Embo J* **8,** 3053-3058.

Labbé, J. C., Lee, M. G., Nurse, P., Picard, A., & Doree, M. (1988). Activation at M-phase of a protein kinase encoded by a starfish homologue of the cell cycle control gene cdc2+. *Nature* **335,** 251-254.

Larrain, A., Riveros, A., Silva, J., Bay-Schmith, E., Nemer, M., & Stuebing, E. W. (1999). Toxicity of metals and pesticides using the sperm cell bioassay with the sea urchin Arbacia spatuligera. *Bull Environ Contam Toxicol* **62,** 749-757.

Larvor-Cario, H., de Laborie, L.P., Hureau, D., Muzellec, M.L., Devauchelle, N., Durand, G. & Dorange, G. (2000). Influence d'herbicides détectés en rade de Brest sur le développement embryonnaire et larvaire de la coquille Saint-Jacques *Pecten Maximus*. Rapport Ifremer / Ecloserie du Tinduff / Institut de synergie des Sciences et de la Santé.

Lee, H. L., Chen, K. W., Chi, C. H., Huang, J. J., & Tsai, L. M. (2000). Clinical presentations and prognostic factors of a glyphosate-surfactant herbicide intoxication: a review of 131 cases. *Acad Emerg Med* **7,** 906-910.

Lee, M. S., Enoch, T., & Piwnica-Worms, H. (1994). mik1+ encodes a tyrosine kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *J Biol Chem* **269,** 30530-30537.

Lee, M. S., Ogg, S., Xu, M., Parker, L. L., Donoghue, D. J., Maller, J. L., & Piwnica-Worms, H. (1992). cdc25+ encodes a protein phosphatase that dephosphorylates p34cdc2. *Mol Biol Cell* **3,** 73-84.

Lepage, T., & Gache, C. (1989). Purification and characterization of the sea urchin embryo hatching enzyme. *J Biol Chem* **264,** 4787-4793.

Lepage, T., & Gache, C. (1990). Early expression of a collagenase-like hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Embo J* **9,** 3003-3012.

Lepage, T., Sardet, C., & Gache, C. (1992). Spatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo. *Dev Biol* **150,** 23-32.

Lesser, M. P., Kruse, V. A., and Barry, T. M. (2003). Exposure to ultraviolet radiation causes apoptosis in developing sea urchin embryos. *J Exp Biol* **206,** 4097-4103.

Li, A. P., & Long, T. J. (1988). An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. *Fundam Appl Toxicol* **10,** 537-546.

Lioi, M. B., Scarfi, M. R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Di Berardino, D., & Ursini, M. V. (1998b). Genotoxicity and oxidative stress induced by pesticide exposure in bovine lymphocyte cultures in vitro. *Mutat Res* **403,** 13-20.

Lioi, M. B., Scarfi, M. R., Santoro, A., Barbieri, R., Zeni, O., Salvemini, F., Di Berardino, D., & Ursini, M. V. (1998a). Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to gliphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. *Environ Mol Mutagen* **32,** 39-46.

Lorca, T., Labbe, J. C., Devault, A., Fesquet, D., Capony, J. P., Cavadore, J. C., Le Bouffant, F., & Dorée, M. (1992). Dephosphorylation of cdc2 on threonine 161 is required for cdc2 kinase inactivation and normal anaphase. *Embo J* **11,** 2381-2390.

Lu, F. C. (1995). A review of the acceptable daily intakes of pesticides assessed by WHO. *Regul Toxicol Pharmacol* **21,** 352-364.

Lueken, A., Juhl-Strauss, U., Krieger, G., & Witte, I. (2004). Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H2O2) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicol Lett* **147,** 35-43.

Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner, M., & Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* **64,** 1111-1122.

Mailand, N., Podtelejnikov, A. V., Groth, A., Mann, M., Bartek, J., & Lukas, J. (2002). Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability. *Embo J* **21,** 5911-5920.

Mäkelä, T. P., Tassan, J. P., Nigg, E. A., Frutiger, S., Hughes, G. J., & Weinberg, R. A. (1994). A cyclin associated with the CDK-activating kinase MO15. *Nature* **371,** 254-257.

Malarkey, T. (2003). Human health concerns with GM crops. *Mutat Res* **544,** 217-221.

Malik, J., Barry, G., & Kishore, G. (1989). The herbicide glyphosate. *Biofactors* **2,** 17-25.

Maller, J. L. (1995). Maturation-promoting factor in the early days. *Trends Biochem Sci* **20,** 524-528.

Mann, R. M., & Bidwell, J. R. (1999). The toxicity of glyphosate and several glyphosate formulations to four species of southwestern Australian frogs. *Arch Environ Contam Toxicol* **36,** 193-199.

Marc, J., Maguer, C., Bellé, R., & Mulner-Lorillon, O. (2002b). Sharp dose- and time-

dependent toxicity of mercuric chloride at the cellular level in sea urchin embryos. *Arch Toxicol* **76,** 388-391.

Marc, J., Mulner-Lorillon, O., & Bellé, R. (2004). Glyphosate-based pesticides affect cell cycle regulation. *Biol Cell* **96,** 245-249.

Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Boulben, S., Hureau, D., Durand, G., & Bellé, R. (2002a). Pesticide Roundup Provokes Cell Division Dysfunction at the Level of CDK1/Cyclin B Activation. *Chem Res Toxicol* **15,** 326-331.

Marc, J., Mulner-Lorillon, O., Durand, G., & Bellé, R. (2003). Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level. *Environ Chem lett* **1,** 8-12.

Margolis, S. S., & Kornbluth, S. (2004). When the Checkpoints Have Gone: Insights into Cdc25 Functional Activation. *Cell Cycle* **3,** 425-428.

Margolis, S. S., Walsh, S., Weiser, D. C., Yoshida, M., Shenolikar, S., & Kornbluth, S. (2003). PP1 control of M phase entry exerted through 14-3-3-regulated Cdc25 dephosphorylation. *Embo J* **22,** 5734-5745.

Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., & Fait, A. (2000). Biological Monitoring of Pesticide Exposure: a review. Introduction. *Toxicology* **143,** 1-118.

Maroni, M., Fait, A., & Colosio, C. (1999). Risk assessment and management of occupational exposure to pesticides. *Toxicol Lett* **107,** 145-153.

McDuffie, H. H., Pahwa, P., McLaughlin, J. R., Spinelli, J. J., Fincham, S., Dosman, J. A., Robson, D., Skinnider, L. F., & Choi, N. W. (2001). Non-Hodgkin's lymphoma and specific pesticide exposures in men: cross-Canada study of pesticides and health. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10,** 1155-1163.

McGowan, C. H., & Russell, P. (1993). Human Wee1 kinase inhibits cell division by phosphorylating p34cdc2 exclusively on Tyr15. *Embo J* **12,** 75-85.

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

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

Meijer, L., & Pondaven, P. (1988). Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. *Exp Cell Res* **174,** 116-129.

Meyer, O. (2003). Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicol Lett* **140-141,** 21-30.

Millar, J. B., McGowan, C. H., Lenaers, G., Jones, R., & Russell, P. (1991). p80cdc25 mitotic

inducer is the tyrosine phosphatase that activates p34cdc2 kinase in fission yeast. *Embo J* **10,** 4301-4309.

Millar, J. B., & Russell, P. (1992). The cdc25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. *Cell* **68,** 407-410.

Mitchell, D. G., Chapman, P. M., & Long, T. J. (1987). Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. *Bull Environ Contam Toxicol* **39,** 1028-1035.

Mitra, J., & Enders, G. H. (2004). Cyclin A/Cdk2 complexes regulate activation of Cdk1 and Cdc25 phosphatases in human cells. *Oncogene* **23,** 3361-3367.

Molinari, M. (2000). Cell cycle checkpoints & their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation* **33,** 261-274.

Monnier, A., Morales, J., Cormier, P., Boulben, S., Bellé, R., & Mulner-Lorillon, O. (2001). Protein translation during early cell divisions of sea urchin embryos regulated at the level of polypeptide chain elongation and highly sensitive to natural polyamines. *Zygote* **9,** 229-236.

Moon, R. T., Moe, K. D., & Hille, M. B. (1980). Polypeptides of nonpolyribosomal messenger ribonucleoprotein complexes of sea urchin eggs. *Biochemistry* **19,** 2723-2730.

Moore, J. C., Sumerel, J. L., Schnackenberg, B. J., Nichols, J. A., Wikramanayake, A., Wessel, G. M., & Marzluff, W. F. (2002). Cyclin D and cdk4 are required for normal development beyond the blastula stage in sea urchin embryos. *Mol Cell Biol* **22,** 4863-4875.

Moreau, J. L., Marques, F., Barakat, A., Schatt, P., Lozano, J. C., Peaucellier, G., Picard, A., & Geneviere, A. M. (1998). Cdk2 activity is dispensable for the onset of DNA replication during the first mitotic cycles of the sea urchin early embryo. *Dev Biol* **200,** 182-197.

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

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

Moriya, M., Ohta, T., Watanabe, K., Miyazawa, T., Kato, K., & Shirasu, Y. (1983). Further mutagenicity studies on pesticides in bacterial reversion assay systems. *Mutat Res* **116,** 185-216.

Morrison, H. I., Wilkins, K., Semenciw, R., Mao, Y., & Wigle, D. (1992). Herbicides and cancer. *J Natl Cancer Inst* **84,** 1866-1874.

Motoyama, N., & Naka, K. (2004). DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev* **14,** 11-16.

Muckter, H. (2003). What is toxicology and how does toxicity occur? *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **17,** 5-27.

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

Murray, A. W. (2004). Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell* **116,** 221-234.

Nakajima, H., Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E., & Nishida, E. (2003). Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. *J Biol Chem* **278,** 25277-25280.

Nemer, M., & Stuebing, E. W. (1996). WEE1-like CDK tyrosine kinase mRNA level is regulated temporally and spatially in sea urchin embryos. *Mech Dev* **58,** 75-88.

Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays* **17,** 471-480.

Nigg, E. A. (2001). Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2,** 21-32.

Nishioka, D., Killian, C. E., Chacon, C. T., & Sgagias, M. K. (1984). Increased uptake of thymidine in the activation of sea urchin eggs. III. Effects of aphidicolin. *J Cell Physiol* **118,** 27-33.

Nishioka, D., Marcell, V., Cunningham, M., Khan, M., Von Hoff, D. D., & Izbicka, E. (2003). The use of early sea urchin embryos in anticancer drug testing. *Methods Mol Med* **85,** 265-276.

Norbury, C. J., & Zhivotovsky, B. (2004). DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene* **23,** 2797-2808.

Nurse, P. (1990). Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* **344,** 503-8.

Nurse, P. (1997). Checkpoint pathways come of age. *Cell* **91,** 865-867.

Nurse, P. (2000). A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* **100,** 71-78.

Nurse, P., & Thuriaux, P. (1980). Regulatory genes controlling mitosis in the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Genetics* **96,** 627-637.

Nurse, P. M. (2002). Nobel Lecture. Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Biosci Rep* **22,** 487-499.

Nyberg, K. A., Michelson, R. J., Putnam, C. W., & Weinert, T. A. (2002). Toward

maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36,** 617-656.

O'Connor, P. M., Ferris, D. K., Hoffmann, I., Jackman, J., Draetta, G., & Kohn, K. W. (1994). Role of the cdc25C phosphatase in G2 arrest induced by nitrogen mustard. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91,** 9480-9484.

O'Farrell, P. H. (2001). Triggering the all-or-nothing switch into mitosis. *Trends Cell Biol* **11,** 512-519.

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

Okano-Uchida, T., Okumura, E., Iwashita, M., Yoshida, H., Tachibana, K., & Kishimoto, T. (2003). Distinct regulators for Plk1 activation in starfish meiotic and early embryonic cycles. *Embo J* **22,** 5633-5642.

Okano-Uchida, T., Sekiai, T., Lee, K., Okumura, E., Tachibana, K., & Kishimoto, T. (1998). In vivo regulation of cyclin A/Cdc2 and cyclin B/Cdc2 through meiotic and early cleavage cycles in starfish. *Dev Biol* **197,** 39-53.

Okumura, E., Fukuhara, T., Yoshida, H., Hanada Si, S., Kozutsumi, R., Mori, M., Tachibana, K., & Kishimoto, T. (2002). Akt inhibits Myt1 in the signalling pathway that leads to meiotic G2/M-phase transition. *Nat Cell Biol* **4,** 111-116.

Ookata, K., Hisanaga, S., Okano, T., Tachibana, K., & Kishimoto, T. (1992). Relocation and distinct subcellular localization of p34cdc2-cyclin B complex at meiosis reinitiation in starfish oocytes. *Embo J* **11,** 1763-1772.

Pagano, G., Iaccarino, M., De Biase, A., Meric, S. G., Warnau, M., Oral, R., & Trieff, N. M. (2001). Factors affecting R6 fungicide toxicity on sea urchin fertilization and early development: roles of exposure routes & mixture components. *Hum Exp Toxicol* **20,** 404-411.

Pagano, M., Pepperkok, R., Verde, F., Ansorge, W., & Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *Embo J* **11,** 961-971.

Palmer, A., Gavin, A. C., & Nebreda, A. R. (1998). A link between MAP kinase and p34(cdc2)/cyclin B during oocyte maturation: p90(rsk) phosphorylates and inactivates the p34(cdc2) inhibitory kinase Myt1. *Embo J* **17,** 5037-5047.

Parisi, E., Filosa, S., De Petrocellis, B., & Monroy, A. (1978). The pattern of cell division in the early development of the sea urchin. Paracentrotus lividus. *Dev Biol* **65,** 38-49.

Parker, L. L., Atherton-Fessler, S., & Piwnica-Worms, H. (1992). p107wee1 is a dual-specificity kinase that phosphorylates p34cdc2 on tyrosine 15. *Proc Natl Acad Sci U S*

A **89,** 2917-2921.

Parker, L. L., & Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science* **257,** 1955-1957.

Parker, L. L., Walter, S. A., Young, P. G., & Piwnica-Worms, H. (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the nim1/cdr1 kinase. *Nature* **363,** 736-738.

Patel, R., Wright, E. M., & Whitaker, M. (1997). Caffeine overrides the S-phase cell cycle block in sea urchin embryos. *Zygote* **5,** 127-138.

Pavletich, N. P. (1999). Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and Cip and INK4 inhibitors. *J Mol Biol* **287,** 821-828.

Pearce, A. K., & Humphrey, T. C. (2001). Integrating stress-response and cell-cycle checkpoint pathways. *Trends Cell Biol* **11,** 426-433.

Peluso, M., Munnia, A., Bolognesi, C., & Parodi, S. (1998). 32P-postlabeling detection of DNA adducts in mice treated with the herbicide Roundup. *Environ Mol Mutagen* **31,** 55-59.

Peng, C. Y., Graves, P. R., Thoma, R. S., Wu, Z., Shaw, A. S., & Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* **277,** 1501-1505.

Pesando, D., Huitorel, P., Dolcini, V., Angelini, C., Guidetti, P., & Falugi, C. (2003). Biological targets of neurotoxic pesticides analysed by alteration of developmental events in the Mediterranean sea urchin, Paracentrotus lividus. *Mar Environ Research* **55,** 39-57.

Peter, M., Le Peuch, C., Labbe, J. C., Meyer, A. N., Donoghue, D. J., & Doree, M. (2002). Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1. *EMBO Rep* **3,** 551-556.

Picard, A., Labbe, J. C., Barakat, H., Cavadore, J. C., & Doree, M. (1991). Okadaic acid mimics a nuclear component required for cyclin B-cdc2 kinase microinjection to drive starfish oocytes into M phase. *J Cell Biol* **115,** 337-344.

Pines, J., & Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell cycle-dependent nuclear transport. *J Cell Biol* **115,** 1-17.

Platel, R. (1992). Echinodermes. Des Protozoaires aux Echinodermes. Editions Ellipses, 199-216.

Pommier, Y., & Kohn, K. W. (2003). Cell cycle and checkpoints in oncology: new therapeutic targets. *Med Sci (Paris)* **19,** 173-186.

Poon, R. Y., Yamashita, K., Howell, M., Ershler, M. A., Belyavsky, A., & Hunt, T. (1994). Cell cycle regulation of the p34cdc2/p33cdk2-activating kinase p40MO15. *J Cell Sci* **107,** 2789-2799.

Qian, Y. W., Erikson, E., Taieb, F. E., & Maller, J. L. (2001). The polo-like kinase Plx1 is required for activation of the phosphatase Cdc25C and cyclin B-Cdc2 in Xenopus oocytes. *Mol Biol Cell* **12,** 1791-1799.

Raleigh, J. M., & O'Connell, M. J. (2000). The G(2) DNA damage checkpoint targets both Wee1 and Cdc25. *J Cell Sci* **113,** 1727-1736.

Rank, J., Jensen, A. G., Skov, B., Pedersen, L. H., & Jensen, K. (1993). Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test. *Mutat Res* **300,** 29-36.

Regier, J. C., & Kafatos, F. C. (1977). Absolute rates of protein synthesis in sea urchins with specific activity measurements of radioactive leucine and leucyl-tRNA. *Dev Biol* **57,** 270-283.

Roccheri, M. C., Barbata, G., Cardinale, F., Tipa, C., Bosco, L., Oliva, O. A., Cascino, D., & Giudice, G. (1997). Apoptosis in sea urchin embryos. *Biochem Biophys Res Commun* **240,** 359-366.

Rojas, E., Herrera, L. A., Poirier, L. A., & Ostrosky-Wegman, P. (1999). Are metals dietary carcinogens? *Mutat Res* **443,** 157-181.

Russell, P., & Nurse, P. (1987). Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell* **49,** 559-567.

Russo, A. A., Jeffrey, P. D., Patten, A. K., Massague, J., & Pavletich, N. P. (1996). Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A-Cdk2 complex. *Nature* **382,** 325-331.

Sadhu, K., Reed, S. I., Richardson, H., & Russell, P. (1990). Human homolog of fission yeast cdc25 mitotic inducer is predominantly expressed in G2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87,** 5139-5143.

Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnica-Worms, H., & Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science* **277,** 1497-1501.

Sato, K., Iwasaki, T., Hirahara, S., Nishihira, Y., & Fukami, Y. (2004). Molecular dissection of egg fertilization signaling with the aid of tyrosine kinase-specific inhibitor and activator strategies. *Biochim Biophys Acta* **1697,** 103-121.

Schweigert, N., Eggen, R. I., Escher, B. I., Burkhardt-Holm, P., & Behra, R. (2002). Ecotoxicological assessment of surface waters: a modular approach integrating in vitro methods. *Altex* **19,** 30-37.

Servizi, J. A., Gordon, R. W., & Martens, D. W. (1987). Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, Daphnia, and trout. *Bull Environ Contam Toxicol* **39,** 15-22.

Sever, L. E., Arbuckle, T. E., & Sweeney, A. (1997). Reproductive and developmental effects of occupational pesticide exposure: the epidemiologic evidence. *Occup Med* **12,** 305-325.

Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* **13,** 1501-1512.

Shi, J., Feng, Y., Goulet, A. C., Vaillancourt, R. R., Sachs, N. A., Hershey, J. W., & Nelson, M. A. (2003). The p34cdc2-related cyclin-dependent kinase 11 interacts with the p47 subunit of eukaryotic initiation factor 3 during apoptosis. *J Biol Chem* **278,** 5062-5071.

Sluder, G., Miller, F. J., Thompson, E. A., & Wolf, D. E. (1994). Feedback control of the metaphase-anaphase transition in sea urchin zygotes: role of maloriented chromosomes. *J Cell Biol* **126,** 189-198.

Sluder, G., Thompson, E. A., Miller, F. J., Hayes, J., & Rieder, C. L. (1997). The checkpoint control for anaphase onset does not monitor excess numbers of spindle poles or bipolar spindle symmetry. *J Cell Sci* **110,** 421-429.

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

Smith, E. A., & Oehme, F. W. (1992). The biological activity of glyphosate to plants and animals: a literature review. *Vet Hum Toxicol* **34,** 531-543.

Smith, G. R. (2001). Effects of acute exposure to a commercial formulation of glyphosate on the tadpoles of two species of anurans. *Bull Environ Contam Toxicol* **67,** 483-488.

Smits, V. A., Klompmaker, R., Vallenius, T., Rijksen, G., Makela, T. P., & Medema, R. H. (2000). p21 inhibits Thr161 phosphorylation of Cdc2 to enforce the G2 DNA damage checkpoint. *J Biol Chem* **275,** 30638-30643.

Solomon, K. R., & Thompson, D. G. (2003). Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* **6,** 289-324.

Solomon, M. J., Glotzer, M., Lee, T. H., Philippe, M., & Kirschner, M. W. (1990). Cyclin activation of p34cdc2. *Cell* **63,** 1013-1024.

Solomon, M. J., Harper, J. W., & Shuttleworth, J. (1993). CAK, the p34cdc2 activating kinase, contains a protein identical or closely related to p40MO15. *Embo J* **12,** 3133-3142.

Solomon, M. J., Lee, T., & Kirschner, M. W. (1992). Role of phosphorylation in p34cdc2 activation: identification of an activating kinase. *Mol Biol Cell* **3,** 13-27.

Stewart, Z. A., Westfall, M. D., & Pietenpol, J. A. (2003). Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* **24,** 139-145.

Strausfeld, U., Fernandez, A., Capony, J. P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbe, J. C., & Lamb, N. J. (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J Biol Chem* **269,** 5989-6000.

Strausfeld, U., Fernandez, A., Capony, J. P., Girard, F., Lautredou, N., Derancourt, J., Labbe, J. C., & Lamb, N. J. (1994). Activation of p34cdc2 protein kinase by microinjection of human cdc25C into mammalian cells. Requirement for prior phosphorylation of cdc25C by p34cdc2 on sites phosphorylated at mitosis. *J Biol Chem* **269,** 5989-6000.

Sumerel, J. L., Moore, J. C., Schnackenberg, B. J., Nichols, J. A., Canman, J. C., Wessel, G. M., & Marzluff, W. F. (2001). Cyclin E and its associated cdk activity do not cycle during early embryogenesis of the sea Urchin. *Dev Biol* **234,** 425-440.

Szarek, J., Siwicki, A., Andrzejewska, A., Terech-Majewska, E., & Banaszkiewicz, T. (2000). Effects of the herbicide Roundup on the ultrastructural pattern of hepatocytes in carp (Cyprinus carpio). *Mar Environ Res* **50,** 263-266.

Tadeo, J. L., Sanchez-Brunete, C., Perez, R. A., & Fernandez, M. D. (2000). Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *J Chromatogr A* **882,** 175-191.

Tanaka, T., Veeranna, Ohshima, T., Rajan, P., Amin, N. D., Cho, A., Sreenath, T., Pant, H. C., Brady, R. O., & Kulkarni, A. B. (2001). Neuronal cyclin-dependent kinase 5 activity is critical for survival. *J Neurosci* **21,** 550-558.

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

Tassan, J. P., Jaquenoud, M., Fry, A. M., Frutiger, S., Hughes, G. J., & Nigg, E. A. (1995). In vitro assembly of a functional human CDK7-cyclin H complex requires MAT1, a novel 36 kDa RING finger protein. *Embo J* **14,** 5608-5617.

Tron, I., Piquet, O., & Cohuet, S. (2001). Effets chroniques des pesticides sur la santé : état

actuel des connaissances. Rapport de l'Observatoire Régional de Santé de Bretagne.

Tsihlias, J., Kapusta, L., & Slingerland, J. (1999). The prognostic significance of altered cyclin-dependent kinase inhibitors in human cancer. *Annu Rev Med* **50,** 401-423.

Tsui, M. T., & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* **52,** 1189-1197.

Tucker, J. D., & Preston, R. J. (1996). Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat Res* **365,** 147-159.

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D. R., & Berneman, Z. N. (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36,** 131-149.

Vigfusson, N. V., & Vyse, E. R. (1980). The effect of the pesticides, Dexon, Captan and Roundup, on sister-chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro. *Mutat Res* **79,** 53-57.

Vollenhofer, S., Burg, K., Schmidt, J., & Kroath, H. (1999). Genetically modified organisms in food-screening and specific detection by polymerase chain reaction. *J Agric Food Chem* **47,** 5038-5043.

Voronina, E., Marzluff, W. F., & Wessel, G. M. (2003). Cyclin B synthesis is required for sea urchin oocyte maturation. *Dev Biol* **256,** 258-275.

Voronina, E., & Wessel, G. M. (2001). Apoptosis in sea urchin oocytes, eggs, and early embryos. *Mol Reprod Dev* **60,** 553-561.

Waalkes, M. P., Fox, D. A., States, J. C., Patierno, S. R., & McCabe, M. J., Jr. (2000). Metals and disorders of cell accumulation: modulation of apoptosis and cell proliferation. *Toxicol Sci* **56,** 255-261.

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

Walsh, L. P., McCormick, C., Martin, C., & Stocco, D. M. (2000). Roundup inhibits steroidogenesis by disrupting steroidogenic acute regulatory (StAR) protein expression. *Environ Health Perspect* **108,** 769-776.

Walworth, N. C. (2000). Cell-cycle checkpoint kinases: checking in on the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol* **12,** 697-704.

Weiss, B., Amler, S., & Amler, R. W. (2004). Pesticides. *Pediatrics* **113,** 1030-1036.

Wester, R. C., Melendres, J., Sarason, R., McMaster, J., & Maibach, H. I. (1991). Glyphosate skin binding, absorption, residual tissue distribution, and skin decontamination. *Fundam Appl Toxicol* **16,** 725-732.

Wildeman, A. G., & Nazar, R. N. (1982). Significance of plant metabolism in the mutagenicity and toxicity of pesticides. *Can J Genet Cytol* **24,** 437-449.

Williams, G. M., Kroes, R., & Munro, I. C. (2000). Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* **31,** 117-165.

Winkler, M. M., Steinhardt, R. A., Grainger, J. L., & Minning, L. (1980). Dual ionic controls for the activation of protein synthesis at fertilization. *Nature* **287,** 558-60.

Wolfe, B. A., & Gould, K. L. (2004). Inactivating Cdc25, Mitotic Style. *Cell Cycle* **3,** 601-603.

Wu, L., & Russell, P. (1993). Nim1 kinase promotes mitosis by inactivating Wee1 tyrosine kinase. *Nature* **363,** 738-741.

Yam, C. H., Fung, T. K., & Poon, R. Y. (2002). Cyclin A in cell cycle control and cancer. *Cell Mol Life Sci* **59,** 1317-1326.

Yamada, K. (1998). Dependence of timing of mitotic events on the rate of protein synthesis and DNA replication in sea urchin early cleavages. *Cell Prolif* **31,** 203-215.

Zhang, H., & Ruderman, J. V. (1993). Differential replication capacities of G1 and S-phase extracts from sea urchin eggs. *J Cell Sci* **104,** 565-572.

Zhou, B. B., & Elledge, S. J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408,** 433-439.

Résumé

Toute perturbation du cycle cellulaire est un signe potentiel de carcinogénicité pour une substance. L'évaluation des effets des polluants sur le processus de division cellulaire est donc essentielle.

L'utilisation du développement précoce de l'oursin nous a permis de mettre en évidence des dysfonctionnements spécifiques du cycle cellulaire : le Roundup retarde le premier clivage mitotique et inhibe la transcription, le mercure bloque le cycle cellulaire à tout moment du développement précoce.

Nous montrons que le Roundup retarde l'activation du complexe régulateur de l'entrée en phase M, le complexe CDK1/cycline B. Ce retard provoque un délai dans l'apparition du premier clivage mitotique. À l'origine du dysfonctionnement, le Roundup affecte l'activité de synthèse d'ADN, dérégulation qui est détectée par le mécanisme de surveillance du cycle cellulaire situé à la transition G2/M. L'activation de ce mécanisme est responsable des délais observés en présence de Roundup.

Parallèlement, nous avons mis en évidence que le Roundup provoque des dysfonctionnements du développement embryonnaire précoce en affectant le mécanisme de transcription.

Les deux effets décrits en présence de Roundup sont associés à des pathologies et leur existence pose problème en terme de santé humaine. Nous avons démontré un effet du Roundup qui avait échappé aux réglementations en vigueur, montrant ainsi la sensibilité de notre système biologique.