



HAL
open science

Inhibition de l'apoptose comme facteur de la transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster Syrien

Marie-Aline Maire

► **To cite this version:**

Marie-Aline Maire. Inhibition de l'apoptose comme facteur de la transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster Syrien. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2004. Français. NNT : 2004METZ034S . tel-01750008

HAL Id: tel-01750008

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01750008>

Submitted on 29 Mar 2018

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

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITE DE METZ

UNIVERSITE DE METZ – UFR Sci F.A.



Laboratoire d'Ecotoxicité, Santé Environnementale

THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur ès Sciences
mention "Toxicologie de l'Environnement"

UNIVERSITE Paul Verlaine METZ	
S.C.D.	
N° Inv.	20041015
Date	S/M 04/34
Loc	mag. rouge

**Inhibition de l'apoptose comme facteur
de la transformation morphologique
des cellules embryonnaires de hamster Syrien**

MAIRE Marie-Aline

6 octobre 2004

Membres du jury :

Professeur M. DAUCA, Université de Nancy - *rapporteur*

Professeur P. GAUDUCHON, Université de Caen - *rapporteur*

Docteur C. DARNE, INRS - *examineur*

Docteur J.C. HOFACK, Biologie SERVIER - *examineur*

Docteur J.R. MEUNIER, L'OREAL Recherche - *examineur*

Professeur P VASSEUR, Université de Metz - *directeur de Thèse*

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



031 536364 3

PPN 098999877

UNIVERSITE Paul Verlaine METZ S.C.D.	
N° Inv	20041015
Cote	S/M304/34
Loc	mag. rouge

Remerciements

Ma reconnaissance s'adresse en premier lieu au professeur Paule VASSEUR, pour la qualité de l'encadrement dont elle m'a fait bénéficier, en particulier pour son attention, ses conseils et sa disponibilité.

Je remercie tout particulièrement le professeur Michel DAUCA et le professeur Pascal GAUDUCHON d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie le docteur Christian DARNE, le docteur Jean-Christophe HOFACK et le docteur Jean-Roch MEUNIER, d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse et de participer à sa critique.

Je remercie le Bureau des Substances et Préparations Chimiques (BSPC) et la Direction de la Prévention des Pollutions et des Risques (DPPR) du Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable, pour leur contribution au financement de cette étude.

Je remercie le Dr METHLIN et ses collègues du service de radiothérapie et de chimiothérapie de la clinique Claude Bernard de Metz, pour leur aide dans la préparation des cellules SHE irradiées.

Merci Claudine pour tous ces bons moments passés à travailler ensemble. Ton expérience et ta disponibilité sans faille, ont grandement contribué à la réalisation de ce travail.

Tous mes remerciements à Pascal et à Christophe, pour leur aide précieuse et leur nombreux conseils techniques.

J'aimerais remercier chaleureusement toute l'équipe de l'ESE : Anne-Marie, Carole (merci pour le baptême de l'air !!!), Maryline, Rosy, Chantal...








Merci Seb d'avoir « animé » mes journées au labo... et les soirées « *besame mucho* »...

Merci à mes camarades doctorants et ex-doctorants, en particulier Anne-Marie, Sylvie, Stéphanie et Sophie, pour les pauses café et les grandes discussions, pas toujours très « constructives » !!!

Je voudrais remercier tout particulièrement mes parents, pour leur aide et leur soutien, mais aussi pour l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux ces dernières années.

Merci p'tite Séve, Merci Virginie & Andrew, pour votre aide dans les dernières heures fatidiques !!!

Merci à ma « deuxième » famille pour sa générosité et ses encouragements. Merci Jacqueline, pour les heures passées à traquer les fautes en tout genre...

La p'tite MAM de PAM n'oublie pas ses amis, alors merci à : Mam'zelle Gus , Monsieur Joe , Mam'zelle Sandriiiiiine , Monsieur Simon , Monsieur Olive , Monsieur C , Mam'zelle Emeline  ...

Merci Gilles , pour tout...

Liste des abréviations

$\Delta\psi_m$	potentiel mitochondrial transmembranaire
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AIF	apoptosis inducing factor
ANT	translocateur à adénine
Apaf-1	apoptotic protease activating factor 1
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATP	adénosine triphosphate
BaP	benzo(a)pyrène
Bcl-2	B-cell lymphoma/leukemia-2
BH	Bcl-2 Homology
BET	bromure d'éthidium
Cdk	cycline kinase dépendante
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEHP	di(2-ethylhexyl) phthalate
DEPC	diéthyl pyrocarbonate
2,4-D	acide 2,4-dichlorodiphénoxyacétique
DD	death domain
DED	death effector domain
DIG	digoxigenin
DISC	death inducing signalling complex
DMEM	milieu de Dubelcco modifié par Eagle
DMSO	diméthylsulfoxyde
DO	densité optique
EC	efficacité de clonage
EDTA	acide éthylène diamine tétracétique
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMS	E-box-myc-sequence
FADD	fas associated death domain
FITC	fluorescéine isothiocyanate
FLIP	FLICE-inhibitory protein
GATC	guanidine thiocyanate
HAP	hydrocarbure aromatique polycyclique
HL60	lignée lymphocytaire humaine
HPPs	proliférateur de peroxysomes hépatiques
IAP	inhibiteur des protéines apoptotiques
IARC	Agence Internationale pour la Recherche contre le Cancer

IgH	chaîne lourde des immunoglobulines
IP	iodure de propidium
IPCS	The international programme on chemical safety
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
kDa	kilodaltons
MALD	2-methoxy-acetaldehyde
MEHP	mono(2-ethylhexyl)phthalate
OCDE	Organisation de Coopération et de Développement Economique
ODC	ornithine décarboxylase
OMS/WHO	Organisation Mondiale de la Santé / World Health Organization
PARP	poly(ADP-ribose)polymérase
Pb	paire de bases
PBS	phosphate buffer saline
PCR	polymérase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor
PTPC	permeability transition pore complex
HPPs	proliférateurs de peroxysomes hépatiques
RNase	ribonucléase
ROS	espèces réactives de l'oxygène
RT-PCR	reverse transcription & polymérase chain reaction
SHE	cellules embryonnaires de hamster Syrien
SIDA	syndrome immunodéficience acquise
SIMP	soluble intermembrane mitochondrial proteins
SVF	sérum de veau fœtal
TAE	tris-acétate-EDTA
TBS	tris buffer saline
TBS-L	tris buffer saline – lait
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxine
Tf	taux de transformation
TNFR	tumor necrosis factor receptor
TRADD	TNFR-associated death domain
TRAIL-R	TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor
TPA	12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)éthylène diamine
TUNNEL	TdT-mediated X-dUTP Nick End Labelling
UV	ultra violet
VADC	voltage dependent anion channel
Xgal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside

INTRODUCTION.....	1
A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I. LA TRANSFORMATION CELLULAIRE	3
1 La cancérogenèse <i>in vivo</i>	3
1.1 Les mécanismes génotoxiques de la cancérogenèse.....	3
1.2 Les mécanismes non-génotoxiques de la cancérogenèse	4
2 Les essais de transformation cellulaire <i>in vitro</i>	5
2.1 Définition de la transformation cellulaire.....	5
2.2 Modèles cellulaires utilisés pour l'étude des différents stades de la cancérogenèse.....	5
2.3 Les essais de transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE).....	7
2.4 Utilité des cellules SHE dans l'étude des mécanismes de la cancérogenèse.....	9
II. L'APOPTOSE.....	10
1 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose	11
2 Mécanismes moléculaires de l'apoptose	11
2.1 Introduction.....	11
2.2 Les caspases : acteurs principaux de l'exécution du processus apoptotique.....	13
2.3 Voies activatrices des caspases.....	14
2.3.1 La voie extrinsèque des récepteurs membranaires.....	14
2.3.2 La voie intrinsèque mitochondriale.....	16
2.3.2.1 Mécanismes conduisant à la perméabilisation des membranes mitochondriales	17
2.3.2.2 La famille de protéine Bcl-2 : des régulateurs importants de la voie mitochondriale.....	19
2.4 Le rôle de P53 dans l'apoptose	24
2.5 La fonction double de <i>c-myc</i> : implication dans la croissance cellulaire et l'apoptose	26
2.5.1 Activité transcriptionnelle du gène <i>c-myc</i>	26
2.5.2 Implication de <i>c-myc</i> dans la prolifération cellulaire.....	27
2.5.3 Implication de <i>c-myc</i> dans l'apoptose	29

3	Implication du dysfonctionnement de l'apoptose dans la cancérogenèse et de diverses pathologies	32
4	Principales techniques d'observation et d'étude de l'apoptose	34
III. SUBSTANCES ETUDIEES.....		36
1	Le zinc	37
2	Le DEHP et le 2,4-D : deux proliférateurs de peroxysomes	41
2.1	Le di(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP)	41
2.2	L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)	42
2.3	Les proliférateurs de peroxysomes	45
B. MATERIELS ET METHODES		48
I. PRODUITS CHIMIQUES UTILISES		48
II. CULTURE CELLULAIRE		48
1	Milieu de culture	48
2	Les cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE)	49
III. ESSAIS DE TRANSFORMATION CELLULAIRE IN VITRO		50
1	Protocole des essais de transformation cellulaire.....	51
2	Etude quantitative de la transformation cellulaire morphologique.....	52
IV. DETECTION DE L'APOPTOSE		53
1	Etude de la morphologie des cellules en apoptose	53
2	DNA ladder	54
V. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES <i>bcl-2</i> , <i>bax</i> ET <i>c-myc</i> EN RT-PCR.....		55
1	Traitement des cellules SHE	55
2	Extraction des ARN totaux.....	55
3	Dosage et vérification de l'intégrité des ARN totaux	56
4	La transcription reverse (RT)	57
5	La réaction PCR (Polymérase Chain Reaction)	57

VI. SEQUENÇAGE DES GENES CODANT POUR LES PROTEINES Bcl-2, Bax ET c-Myc.....	60
1 Clonage.....	60
2 Extraction et purification des ADN plasmidiques.....	61
VII. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES Bcl-2 ET Bax PAR IMMUNOBLOTTING.....	62
1 Traitement des cellules	62
2 Extraction et dosage des protéines.....	62
3 Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....	63
4 Transfert des protéines sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF)	64
5 Immunoblotting	64
C. RESULTATS.....	66
I. INFLUENCE DU ZINC SUR LA TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE DES CELLULES EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN	67
II. EFFETS DU ZINC SUR L'EXPRESSION DE <i>bcl-2</i> , <i>bax</i> ET <i>c-myc</i> DANS LES CELLULES EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN	81
III. DI-ETHYLHEXYLPHTALATE (DEHP) AUGMENTE LE RATIO <i>bcl-2/bax</i> ET MODIFIE L'EXPRESSION DE <i>c-myc</i> DANS LES CELLULES EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN	109
IV. L'ACIDE 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIQUE (2,4-D) INDUIT LA TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE DES CELLULES EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN.....	125
D. DISCUSSION	146
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	155
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	158
ANNEXES	176

INTRODUCTION

INTRODUCTION

La transformation cellulaire est le processus de conversion *in vitro* de cellules normales en cellules présentant un phénotype « transformé » ou anormal, pouvant évoluer vers l'état néoplasique. Elle peut être observée *in vitro* et fait l'objet de nombreuses études en tant que modèle de cancérisation chez l'animal.

La transformation cellulaire peut être la conséquence d'effets mutagènes ou génotoxiques dont la cause peut être d'origine chimique, physique ou biologique. Ces effets sont facilement détectés par les essais *in vitro* validés à l'heure actuelle. Mais la transformation cellulaire peut aussi résulter d'effets épigénétiques touchant la différenciation, les voies de contrôle activatrices ou inhibitrices du cycle cellulaire, l'apoptose... Ces mécanismes sont moins facilement identifiés, mais la détection des substances toxiques à long terme agissant par des mécanismes épigénétiques n'en reste pas moins fondamentale.

Les essais de transformation cellulaire utilisant des cellules normales de mammifères de type cellules embryonnaires de hamsters Syriens (SHE) s'inscrivent dans la recherche des mécanismes de toxicité à long terme des substances chimiques sur les organismes biologiques.

L'activation de la prolifération cellulaire a longtemps été considérée comme le seul facteur de la transformation cellulaire cancéreuse. Cependant, les connaissances actuelles ont permis de démontrer que la défaillance des voies inhibitrices de la croissance et de la division cellulaire est un facteur tout aussi important que l'activation des voies prolifératrices.

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée intervenant dans l'homéostasie cellulaire et permettant l'élimination des cellules altérées et non-fonctionnelles pour l'organisme. La défaillance des voies apoptotiques a été avancée comme pouvant être l'une des causes de l'apparition des cancers et de nombreuses pathologies comme les maladies auto-immunes (SIDA), maladies neuro-dégénératives (maladie de Parkinson, chorée de Huntington), infections virales,

Le but de ce travail est de vérifier l'hypothèse selon laquelle une inhibition des processus apoptotiques contribuerait à la transformation cellulaire, et d'étudier les mécanismes d'inhibition de l'apoptose de deux substances modèles :

- ♦ **le zinc**, choisi pour ses propriétés inhibitrices de l'apoptose.
- ♦ **le DEHP (di-2-ethylhexyl phtalate)**, un cancérigène non-génotoxique, chez les rongeurs, proliférateur de peroxyosomes hépatiques, et connu pour ses effets transformants *in vitro*.

La relation entre l'apoptose et la transformation cellulaire a ensuite été étudiée dans le cas du **2,4-D**, une substance chimique apparentée au DEHP au plan mécanistique, en tant que proliférateur de peroxyosomes hépatiques.

Cette étude a été menée sur les cellules embryonnaires de hamsters Syriens (SHE). A l'opposé des lignées cellulaires établies, les cellules SHE sont des cellules normales, diploïdes et capables de métaboliser un grand nombre de substances chimiques. Le système cellulaire SHE constitue non seulement la base des essais de transformation cellulaire *in vitro* mais fournit également un modèle pertinent pour l'étude mécanistique de la cancérogenèse *in vitro*.

L'étude des effets sur l'apoptose des substances étudiées a été réalisée à l'aide de techniques permettant :

- ♦ une approche descriptive basée sur l'étude de la morphologie et sur la fragmentation de l'ADN caractéristique des cellules apoptotiques.
- ♦ une approche mécanistique basée sur l'étude de la modification de l'expression de gènes impliqués dans le contrôle du processus apoptotique et/ou de la prolifération cellulaire (*bcl-2*, *bax*, *c-myc*...).

Ce travail s'inscrit dans la continuité des travaux amorcés dans notre laboratoire par Alexandre *et al.*, qui avaient déterminé les facteurs de l'apoptose dans les cellules SHE et défini ses indicateurs.

**SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE**

A. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. LA TRANSFORMATION CELLULAIRE

1 La cancérogenèse in vivo

L'apparition d'un cancer cliniquement décelable est un processus souvent long qui fait intervenir plusieurs étapes importantes de transformation conférant aux cellules un phénotype néoplasique (Harris, 1991). La transformation cellulaire est un processus multiétape qui résulte de l'accumulation dans une cellule de plusieurs anomalies génétiques et épigénétiques. Les cellules altérées par ces événements génétiques et/ou épigénétiques acquièrent par rapport aux cellules normales des avantages sélectifs en terme de prolifération et de survie.

Les cellules cancéreuses croissent de façon anarchique (perte de l'inhibition de contact, perte de la nécessité d'ancrage...). Elles perdent leur spécialisation, on dit aussi qu'elles se dédifférencient. Enfin, elles peuvent envahir d'autres tissus et former des métastases.

1.1 Les mécanismes génotoxiques de la cancérogenèse

Les agents génotoxiques altèrent la structure de la molécule d'ADN soit par eux-mêmes (génotoxiques directs) soit par leurs métabolites (génotoxiques indirects). L'altération de l'ADN peut être due à des changements dans la structure de la séquence des gènes, par des mutations (insertions, inversions, délétions...), des réarrangements chromosomiques, des adduits, des cassures, des réactions d'oxydations....

Lorsque la réparation de l'ADN est défailante ou insuffisante, l'altération des séquences codantes de l'ADN peut avoir des conséquences graves pour la cellule et ses descendantes, notamment sur le cycle cellulaire, la différenciation, la division cellulaire, les systèmes de sauvegardes apoptotiques....

1.2 Les mécanismes non-génotoxiques ou épigénétiques de la cancérogenèse

Les cancérogènes dits « non-génotoxiques » ou « épigénétiques » n'agissent pas directement au niveau de l'ADN, mais interfèrent avec sa structure et ses fonctions, perturbant les mécanismes de régulation du cycle cellulaire, de prolifération, de différenciation, de l'apoptose... comme les cancérogènes génotoxiques (Bertram, 2000).

Les mécanismes de la cancérogenèse épigénétique incluent :

- ♦ la perturbation des signaux de transduction qui contrôlent la croissance cellulaire et la différenciation, incluant l'activation des protéines kinases et l'inhibition des phosphatases.
- ♦ la modification du profil de méthylation de l'ADN.
- ♦ la perturbation des mécanismes de réplication, de transcription et de réparation de l'ADN.
- ♦ l'inhibition des télomérases.
- ♦ l'inhibition des mécanismes apoptotiques.
- ♦ l'altération des membranes cytoplasmiques et l'inhibition des communications intercellulaires.
- ♦ l'induction du stress oxydant et la production de radicaux libres.
- ♦ l'activation du métabolisme des polyamines, par exemple par l'activation de l'ornithine décarboxylase (ODC).
- ♦ l'activation de proto-oncogènes et/ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs.
- ♦ ...

Ces cancérogènes posent des problèmes de détection car ils échappent au screening *in vitro* réalisé pour les substances chimiques, et orienté sur la recherche des altérations structurales de l'ADN. Seules les expérimentations animales à long terme et les études épidémiologiques permettent de détecter la toxicité de ces substances.

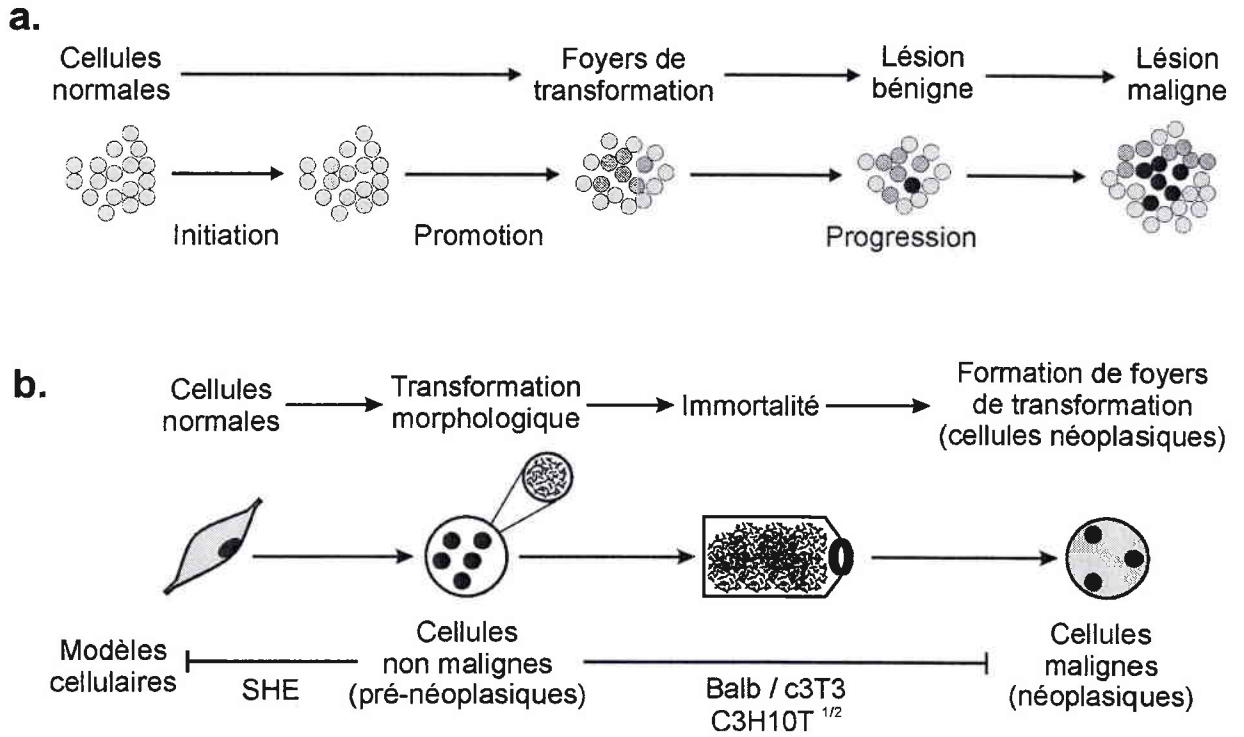


Figure 1 : Schéma représentant le processus multiétapes de la cancérogenèse *in vivo* et de la transformation cellulaire *in vitro* (d'après Combes *et al.*, 1999).

Les essais de transformation cellulaire *in vitro* ont été développés notamment pour détecter les cancérogènes non-génotoxiques qui répondent négativement à certains tests de génotoxicité standardisés (test d'Ames sur *Salmonella typhimurium*, test de mutation du locus HGPRT sur cellules de mammifères CHO (cellules ovariennes de hamster Chinois), test L5178Y Mouse Lymphoma, test d'aberrations chromosomiques, test micronoyaux *in vivo* et *in vitro*...) (Berwald et Sachs, 1963 ; Berwald et Sachs, 1965 ; Barrett *et al.*, 1984). Les essais de transformation cellulaire ne font cependant pas partie actuellement des essais de screening réglementaires pour l'évaluation des substances chimiques, qui constituent des alternatives aux essais de cancérogenèse à long terme chez l'animal.

2 Les essais de transformation cellulaire *in vitro*

2.1 Définition de la transformation cellulaire

La transformation cellulaire *in vitro* est le processus de conversion qui transforme une cellule normale en une cellule présentant un phénotype pré-néoplasique dotée de propriétés oncogéniques (Elias & Cavelier, 1982 ; Vasseur *et al.*, 1998). Après plusieurs passages, les cellules issues de colonies transformées, acquièrent l'immortalité et un potentiel tumorigène, défini comme la capacité à développer des tumeurs *in vivo* après inoculation à des animaux isologues ou immunodéprimés (Berwald et Sachs, 1963 ; 1965). Dès 1978, Barrett et Tso's ont montré que la transformation cellulaire *in vitro* reproduisait les différents stades de la cancérogenèse *in vivo* (figure 1).

2.2 Modèles cellulaires utilisés pour l'étude des différents stades de la cancérogenèse

Plusieurs modèles cellulaires sont utilisés pour étudier les différents stades de la cancérogenèse *in vitro*. On appelle stades précoces, les étapes qui transforment une cellule « normale » en une cellule « pré-néoplasique ». Les étapes ultérieures transforment une cellule « pré-néoplasique » en une cellule « néoplasique » dans les stades tardifs de la transformation cellulaire.

▪ **Modèles cellulaires utilisés pour l'étude des stades précoces de la transformation cellulaire**

Les cellules embryonnaires de hamster Syrien constituent le système cellulaire le plus utilisé (Berwald & Sachs, 1963 ; Pienta *et al.*, 1977 ; DiPaolo & Casto, 1979 ; Barrett *et al.*, 1984). D'autres modèles comme les cellules épithéliales de souris, les cellules épithéliales de rat, les fibroblastes humains peuvent également être étudiés... (Barrett *et al.*, 1984). Ces cellules sont utilisées dans leurs premiers passages. Les cellules SHE sont normales, diploïdes, non différenciées et capables de métaboliser un grand nombre de cancérogènes. Ce modèle a été utilisé très tôt pour étudier le comportement de cellules normales au cours des étapes précoces de la cancérogenèse (Barrett & Ts'o, 1978 ; Barrett *et al.*, 1984).

Le critère de transformation est la mise en évidence de colonies transformées caractérisées par une structure désorganisée et une croissance anarchique. Dans le système SHE, l'apparition de colonies transformées est observée au bout de 8 jours de clonage.

Les cellules sont alors à un stade pré-néoplasique, et ne sont pas encore tumorigènes, mais peuvent le devenir après plusieurs passages et inoculation à de jeunes animaux isologues ou immunodéprimés (Berwald et Sachs, 1963 ; 1965).

▪ **Modèles cellulaires utilisés pour l'étude des stades tardifs de la transformation cellulaire**

Les lignées cellulaires murines BALB/3T3 et C3H 10T^{1/2} sont des systèmes également très étudiés (Heidelberger *et al.*, 1983). D'autres modèles moins courants comme les lignées cellulaires de hamster Syrien (i.e. BHK ou FOL-2), des lignées cellulaires de hamster Chinois (i.e. CHEF) peuvent également être utilisés... (Barrett *et al.*, 1984). Ces lignées cellulaires sont constituées de cellules anormales, aneuploïdes et présentent des capacités de métabolisation limitées (Schechtman, 1985). Ces lignées sont de bons modèles pour étudier le comportement de cellules à des stades avancés de leur transformation néoplasique, et notamment, le comportement que peuvent avoir ces cellules face à des agents anti-cancéreux utilisés en chimiothérapie.

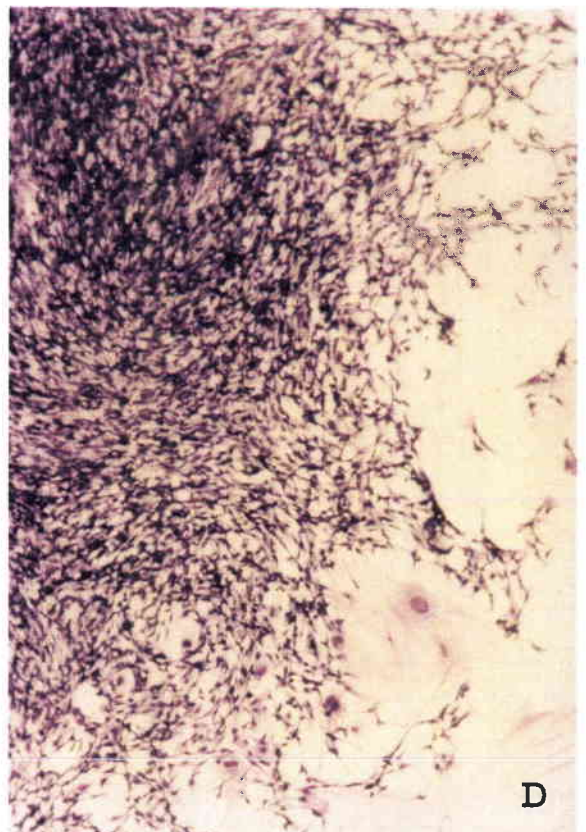
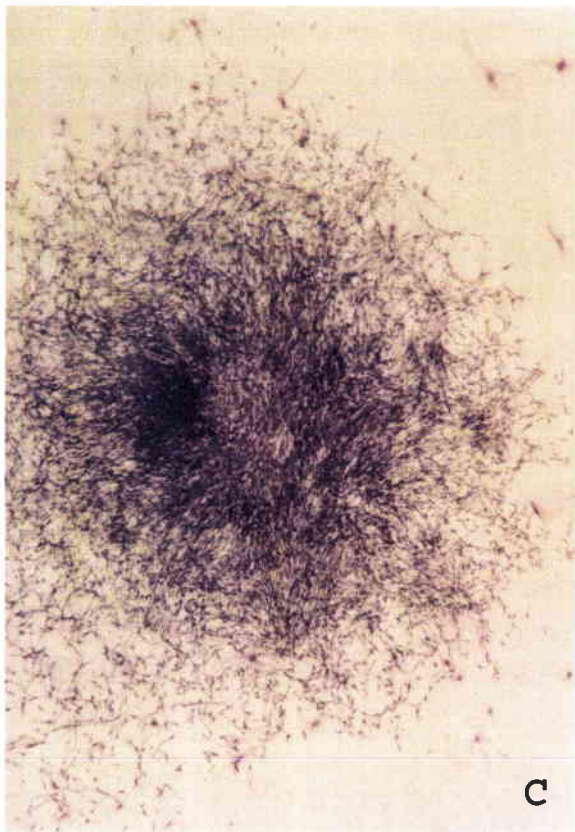
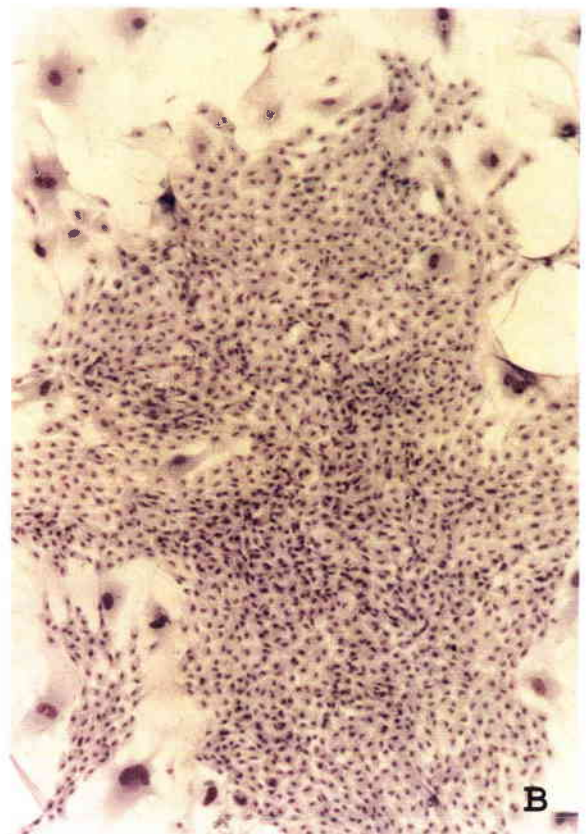
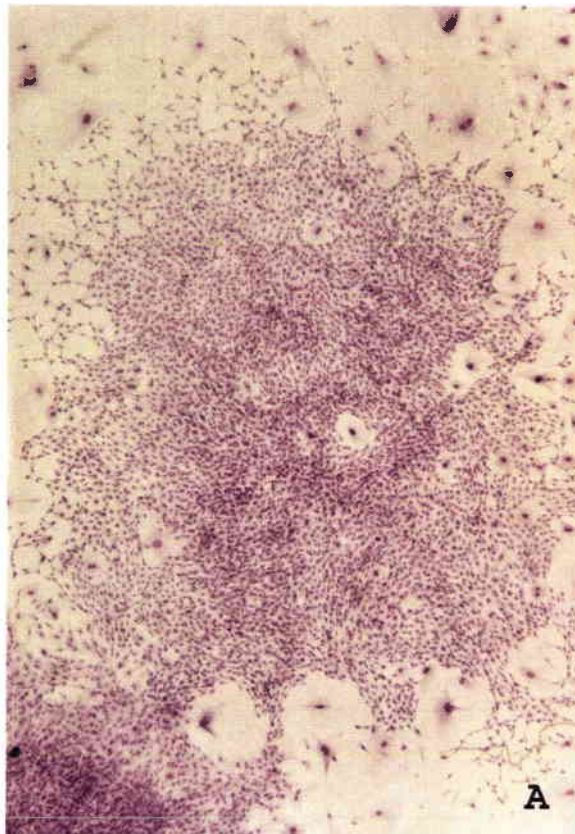


Figure 2 : Colonies normales de cellules SHE (A: x40 ; B: x80) et colonies transformées de cellules SHE (C: x40 ; D: x80).

Le critère de transformation est la formation de foyers de transformation (Type I, II, III, selon le degré de transformation). Ces foyers représentent des zones de forte densité cellulaire et/ou d'altération de la morphologie cellulaire par rapport au tapis cellulaire monocouche. L'apparition de foyers transformés est observée au bout de 4-6 semaines. Les cellules des foyers de type III sont généralement tumorigènes après implantation à un animal hôte approprié (animal isologue, souris immunodéprimées « souris nude ») ; les cellules des foyers de type II étant tumorigènes avec une plus faible probabilité.

2.3 Les essais de transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE)

Au début des années soixante, Berwald & Sachs ont été les premiers à décrire les étapes successives de la transformation morphologique, suite à une exposition avec des HAPs, comme le 3-méthylcholanthrène ou le benzo(a)pyrène (1963 ; 1965). Leurs travaux ont montré que des cellules primaires et normales cultivées *in vitro* pouvaient être morphologiquement transformées sous l'action de cancérogènes chimiques. Ces cellules, après plusieurs repiquages, induisent un développement tumoral plusieurs semaines après inoculation à de jeunes animaux isologues ou immunodéprimés. Ce sont ces résultats qui ont servi de base au développement des essais de transformation cellulaire pour l'étude de la cancérogenèse *in vitro* et la détection des cancérogènes chimiques.

L'évaluation de la transformation cellulaire est basée sur des critères phénotypiques (DiPaolo *et al.*, 1971). Le bouleversement de la communication des cellules avec leur environnement, et la perturbation de la dynamique de croissance des cellules, sont à l'origine du phénotype transformé. Morphologiquement, on observe (figure 2) :

- * un entrecroisement et un enchevêtrement des cellules dus à la perte de l'inhibition de contact et à la perte de l'inhibition cellule-dépendante.
- * une augmentation du ratio noyau/cytoplasme qui confère aux cellules un aspect filamenteux.

- ♦ une augmentation de la basophilie, phénomène qui accroît l'affinité du colorant pour la colonie et lui donne une couleur sombre.

L'acquisition du phénotype néoplasique peut être lié à :

- ♦ des altérations génétiques et génomiques (aneuploïdie, échanges chromosomiques...).
- ♦ à la perturbation et/ou de la défaillance du contrôle de mécanismes tels que le cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire, *via* l'activation de proto-oncogènes et/ou l'altération des gènes suppresseurs de tumeurs.

(DiPaolo *et al.*, 1971 ; Barrett *et al.*, 1983 ; Barrett et Flechter, 1987 ; Isfort *et al.*, 1994 ; Endo & Hieber, 1995 ; Tsutsui *et al.*, 1997).

A ce jour, plus de 500 agents chimiques ou physiques ont été testés sur ce système cellulaire et une concordance de plus de 80% a été montrée avec les essais *in vivo* sur rongeurs (Heidelberger *et al.*, 1983 ; Isfort *et al.*, 1996 ; Engelhardt *et al.*, 2004).

Différents protocoles ont également été développés dans le but d'améliorer les performances des essais de transformation *in vitro* : utilisation d'un schéma initiation/promotion (Chouroulinkov & Lasne, 1978 ; Bessi *et al.*, 1995) et acidification du milieu de culture des cellules SHE (Leboeuf *et al.*, 1989 ; Leboeuf *et al.*, 1992 ; Kerckaert *et al.*, 1996 ; Custer *et al.*, 2000).

Le test de transformation morphologique sur cellules SHE se révèle particulièrement performant pour la détection des substances cancérigènes en comparaison avec les tests de génotoxicité et de mutagenèse classiquement utilisés (test d'Ames, Mouse lymphoma, test micronoyaux...) (Annexe 1), mais également comparativement aux essais de transformation morphologique sur lignées cellulaires BALB/3T3 et C3H10T^{1/2} (OCDE, 2001 ; Vasseur *et al.*, 2004).

Les essais de transformation morphologique ont fait leurs preuves dans le domaine de la cancérogenèse in vitro et sont actuellement au programme de validation de l'OCDE.

2.4 Utilité des cellules SHE dans l'étude des mécanismes de la cancérogenèse

Le système cellulaire SHE a été utilisé très tôt pour l'étude mécanistique de la cancérogenèse. Les mécanismes épigénétiques de la transformation cellulaire sont multiples (voir paragraphe 1.2). Les mécanismes les plus étudiés comme facteurs de transformation possible sont l'inhibition des communications intercellulaires, les effets oxydatifs, l'inhibition de l'apoptose....

- De nombreux travaux font état d'une relation entre **l'inhibition des communications intercellulaires** et l'augmentation de la transformation cellulaire (Rivedal *et al.*, 1985 ; Mikalsen & Sanner, 1993 ; Cruciani *et al.*, 1997a ; Cruciani *et al.*, 1997b ; Rivedal *et al.*, 2000 ; Mally & Chipman, 2002). Cependant cette relation n'est pas systématique et d'autres mécanismes peuvent intervenir pour promouvoir la transformation cellulaire (Bessi *et al.*, 1994 ; Rivedal *et al.*, 2000).
- Les dommages à l'ADN consécutifs à un **stress oxydant**, sont également cités comme pouvant être des facteurs de la transformation cellulaire. En 2000, Zhang *et al.*, ont montré que l'acrylonitrile induisait la transformation cellulaire avec en parallèle une oxydation de l'ADN (OH8dG), et que ces effets étaient inhibés par un co-traitement avec des anti-oxydants type α -tocophérol et (-)-epigallocatechin-3 gallate (EGCG).
- Un **dérèglement de l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC)**, une enzyme impliquée dans la prolifération cellulaire et dans la synthèse de polyamines, a également été mis en évidence dans les cellules SHE lors d'une exposition avec des substances cancérogènes chez les rongeurs (MALD, DEHP) et aux concentrations induisant la transformation cellulaire *in vitro* (Dhalluin *et al.*, 1997 ; 1999). Parallèlement un traitement avec ces mêmes substances, a montré une **diminution de l'apoptose** ainsi qu'une augmentation de la protéine Bcl-2, une protéine qui augmente la durée de vie des cellules en inhibant l'apoptose.

Le dysfonctionnement de l'apoptose a été avancé comme un facteur pouvant favoriser l'induction de la transformation cellulaire.

II. L'APOPTOSE

Dans un organisme vivant, les cellules normales qui se divisent peuvent également participer activement à leur propre destruction grâce à un processus physiologique de mort cellulaire programmée appelé apoptose (Ameisen, 2003).

Ce processus, hautement conservé entre les espèces, est nécessaire pour le développement de l'organisme et le maintien de l'homéostasie cellulaire. Ainsi, on estime à plusieurs milliards, le nombre de cellules qui sont détruites chaque jour pour laisser la place à des cellules fonctionnellement plus compétentes.

A la fin du XIX^e, ces phénomènes de mort cellulaire furent décrits pour la première fois au cours de travaux sur la transformation larvaire. Toutefois, ces observations furent considérées comme la conséquence d'erreurs inévitables dues à la production massive de cellules pendant le développement embryonnaire. Ce n'est qu'au début des années 70 que Kerr *et al.*, ont introduit pour la première fois le concept d'apoptose. Les premiers travaux ont traité de l'importance de l'apoptose dans l'élimination de cellules et de tissus inutiles durant l'embryogenèse (par exemple, l'élimination des tissus qui joignent les doigts, permettant ainsi leur individualisation) (Ameisen, 1996 ; 2003).

Les études qui ont suivi, ont démontré l'importance de ce mécanisme dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. Ainsi l'apoptose régule les populations cellulaires en éliminant les cellules non fonctionnelles et/ou dangereuses pour l'organisme (par exemples, les cellules tumorales, les lymphocytes-T autoréactifs...) ou altérées (cellules mutées, infectées...).

La compréhension des mécanismes de l'apoptose a débordé le cadre de la cancérogenèse sur le plan médical et il apparaît maintenant que la plupart de nos maladies actuelles (maladies neuro-dégénératives, SIDA, hépatites...) sont liées à une défaillance des processus apoptotiques (Solary *et al.*, 1993 ; Thompson, 1995 ; Solary *et al.*, 2002).

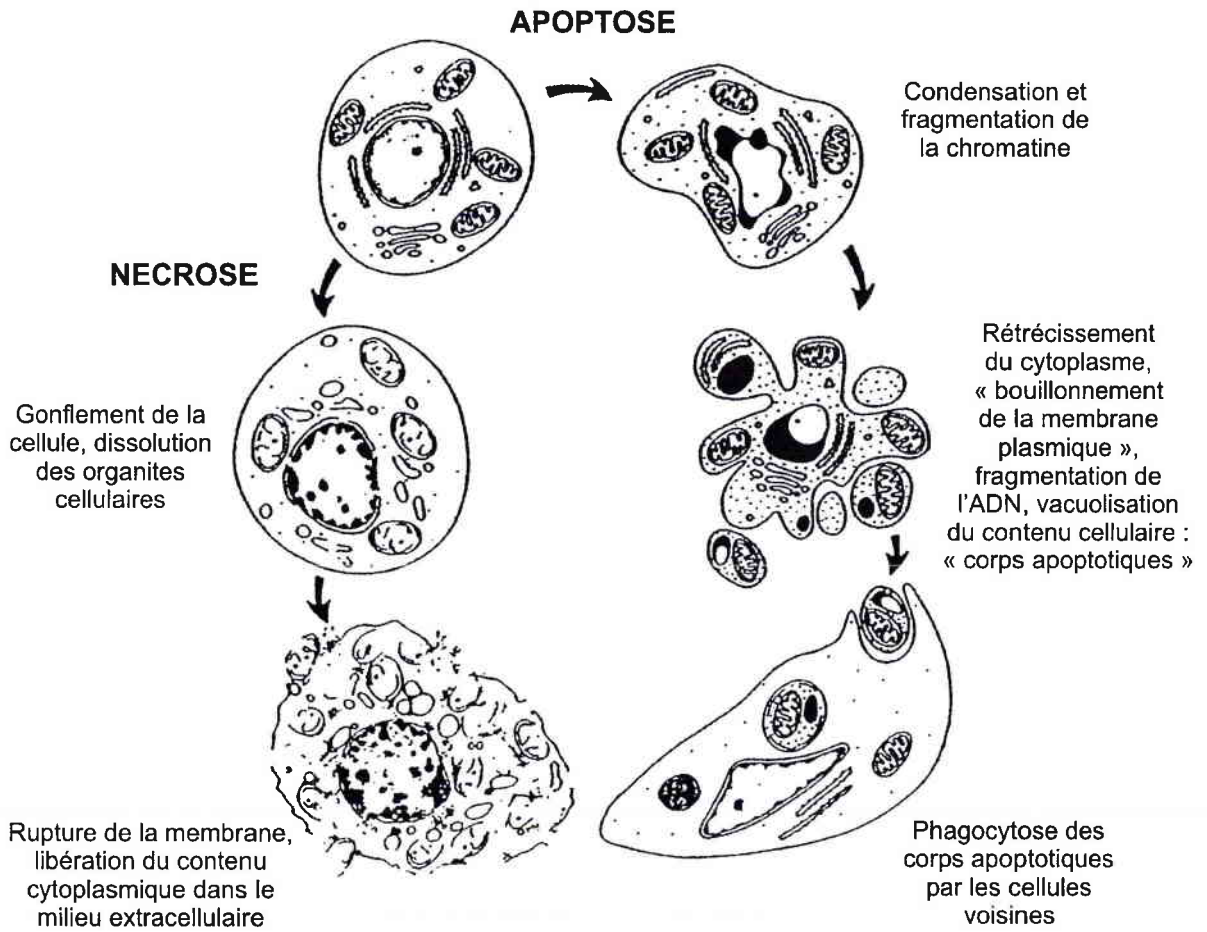


Figure 3 : Représentation schématique des changements morphologiques de la voie apoptotique et de la voie nécrotique (d'après Kerr *et al.*, 1994).

1 Caractéristiques morphologiques de l'apoptose et de la nécrose

L'élimination des cellules endommagées ou inutiles pour l'organisme peut se faire selon deux mécanismes distincts qui sont la nécrose et l'apoptose (figure 3).

La nécrose, consécutive à une lésion tissulaire ou cellulaire, s'accompagne d'une réaction inflammatoire. Elle est caractérisée par un gonflement de la cellule, une dilatation des mitochondries et une dissolution des organites cellulaires. La membrane plasmique finit par se rompre, libérant ainsi le contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire.

A l'opposé, l'apoptose est un mécanisme de mort cellulaire programmée, qui permet un renouvellement sélectif des cellules. Si la nécrose ressemble à l'« explosion » de la cellule, l'apoptose correspond plutôt à son « implosion ». En effet, pendant le processus apoptotique, le cytoplasme se rétrécit et la chromatine se condense ; cependant tous les organites cellulaires gardent leur intégrité. La membrane plasmique bouillonne, mais ne se rompt pas, évitant ainsi le relargage du contenu cytoplasmique dans le milieu extracellulaire (Wyllie, 1980). En fin d'apoptose, les cellules subissent une nécrose secondaire, qui les rend plus perméables ; ces cellules sont différenciées des cellules nécrotiques par la présence de chromatine condensée, prête à être vacuolisée.

Les fragments cellulaires résultant de la phase finale de l'apoptose, aussi appelés « corps apoptotiques » vont être éliminés par phagocytose (Alibert & Chimini, 2002). La phagocytose des cellules apoptotiques est tout à fait particulière dans le sens où les cellules à éliminer sont des cellules du soi et non des pathogènes. Contrairement aux autres formes classiques de phagocytose, elle n'engendre pas de réaction inflammatoire de la part du phagocyte. L'apparition, sur la surface externe de la cellule de résidus phosphatidylsérines, normalement retenus sur la face interne de la membrane plasmique, constitue le fondement de la reconnaissance par les phagocytes (Alibert & Chimini, 2002).

2 Mécanismes moléculaires de l'apoptose

2.1 Introduction

Succinctement, le processus apoptotique se décompose en trois phases.

- **la phase d'induction**, qui est réversible, va dépendre du signal inducteur et du type cellulaire. Ces signaux peuvent avoir :
 - ♦ une origine physique : les ultraviolets, les rayons X...
 - ♦ une origine chimique : certains xénobiotiques, notamment ceux utilisés en chimiothérapie tels que certains inhibiteurs des topoisomérase I et II (camptothécine, étoposide), les anti-métabolites (5-fluoro-2'-deoxyuridine, methotrexate), les inhibiteurs de la synthèse de protéines (cycloheximide) ... (Kaufmann & Earnshaw, 2000).
 - ♦ une origine biologique comme l'hypoxie, l'hyperthermie, la privation des facteurs de survie, les dommages de l'ADN, les infections virales, les signaux de morts, un dysfonctionnement de certains régulateurs de l'expression génique ou de la prolifération cellulaire...

- **la phase d'exécution** va dépendre du signal inducteur. Deux grandes voies sont impliquées dans cette phase. Il s'agit de :
 - ♦ la voie extrinsèque des récepteurs membranaires.
 - ♦ la voie intrinsèque mitochondriale.

Ces deux voies diffèrent selon leur mécanisme d'action, mais leur activation conduit au même but, c'est-à-dire à l'activation de protéases appelées caspases (cysteinyl aspartate-specific protéases).

- **la phase de dégradation** est irréversible. Cette phase est en grande partie sous le contrôle des caspases. Ce sont ces protéases qui une fois activées dégradent divers substrats nécessaires à la vie de la cellule, certaines enzymes participant au maintien de l'intégrité de l'ADN (comme la poly-ADP-ribose polymérase (PARP-1)).... Les caspases activent les endonucléases spécifiques de fragmentation de l'ADN (Cohen et Duke, 1984). C'est également pendant cette phase que la cellule acquiert les modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN).

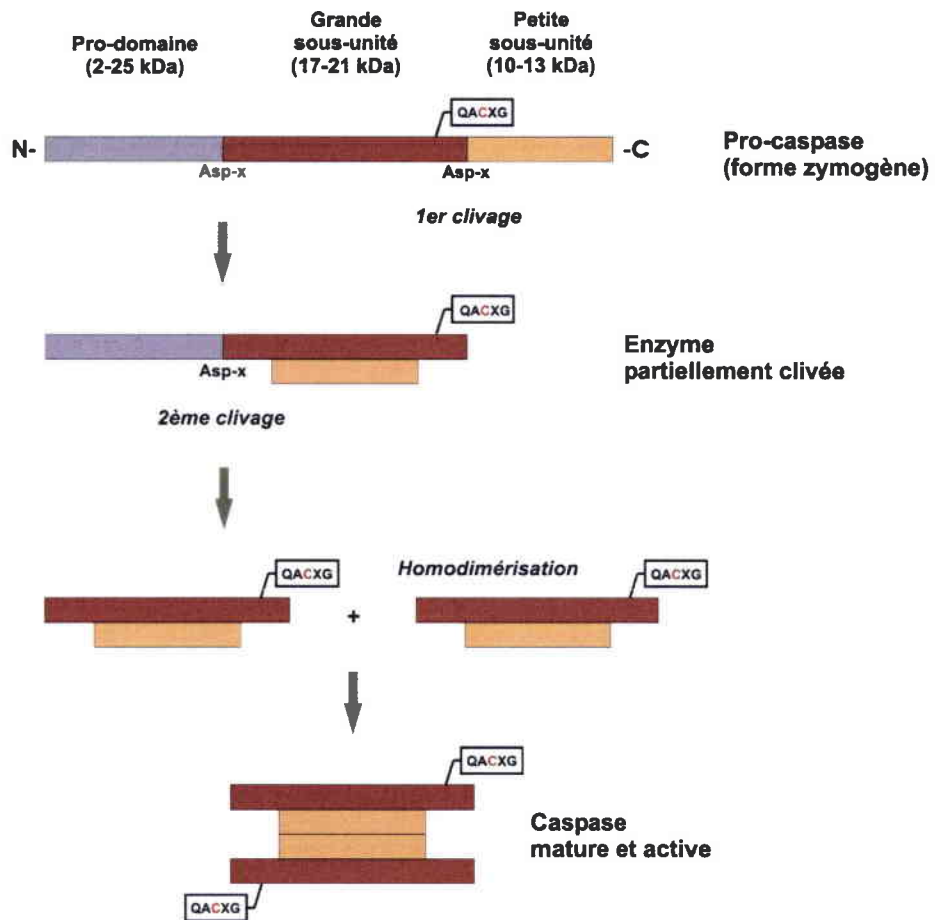


Figure 4 : Schéma d'activation des caspases. Dans leur forme inactive (zymogène), ces enzymes sont constituées d'un pro-domaine, d'une grande sous-unité (portant le site catalytique) et d'une petite sous-unité. Le clivage en deux étapes successives, libérant d'abord la petite sous-unité puis la grande sous-unité, conduit à la forme active de l'enzyme : deux hétérodimères composés chacun de l'association des deux sous-unités, et comprenant deux sites catalytiques (d'après Couzinet *et al.*, 2002).

2.2 Les caspases : acteurs principaux de l'exécution du processus apoptotique

Les caspases (cysteinyl aspartate-specific protéases) constituent une famille de protéases à cystéine (Thornberry & Lazebnik, 1998). De nombreuses publications ont montré le rôle primordial de ces protéases dans l'exécution du processus apoptotique :

- ♦ une sur-expression de ces protéases conduit à la mort cellulaire par apoptose des cellules (Köhler *et al.*, 2002).
- ♦ des inhibiteurs synthétiques ou naturels des caspases inhibent le processus apoptotique induit par divers stimuli (Leblanc *et al.*, 2003).
- ♦ des défaillances du processus apoptotique sont observées sur des animaux « knockout » déficients en une ou plusieurs caspases (Kuida *et al.*, 1998).

Chez les mammifères, il a été identifié à ce jour 14 caspases différentes. Ces enzymes sont présentes dans le cytoplasme sous la forme de pro-enzymes inactives, ou zymogènes.

Les pro-caspases (32-56 KDa) contiennent trois principaux domaines : un pro-domaine N-terminal, une grande sous-unité (17-21 KDa, domaine p20) et une petite sous-unité (10-13 KDa, domaine p10). L'activation des caspases implique la protéolyse de leur forme zymogène au niveau d'un résidu aspartique (figure 4). Deux étapes successives vont libérer d'abord la petite sous-unité puis la grande sous-unité. Il en résulte la formation d'un hétérodimère composé des deux sous-unités. La forme active de l'enzyme est un tétramère composé de deux hétérodimères contenant chacun un site actif pour cystéine bien conservé, le pentapeptide QACXG (Couzinet *et al.*, 2002 ; Köhler *et al.*, 2002).

Une classification simple sépare cette famille de protéases en deux classes selon leur pro-domaine et le rôle qu'elles tiennent pendant l'apoptose :

- **Caspases à long pro-domaine (caspase amont ou initiatrice) : les caspase-1, -2, -4, -8 et -9.**

Cette catégorie est à l'origine de l'activation en cascade des caspases. Elles servent d'intermédiaires dans la transduction des signaux de mort. Elles participent également à la

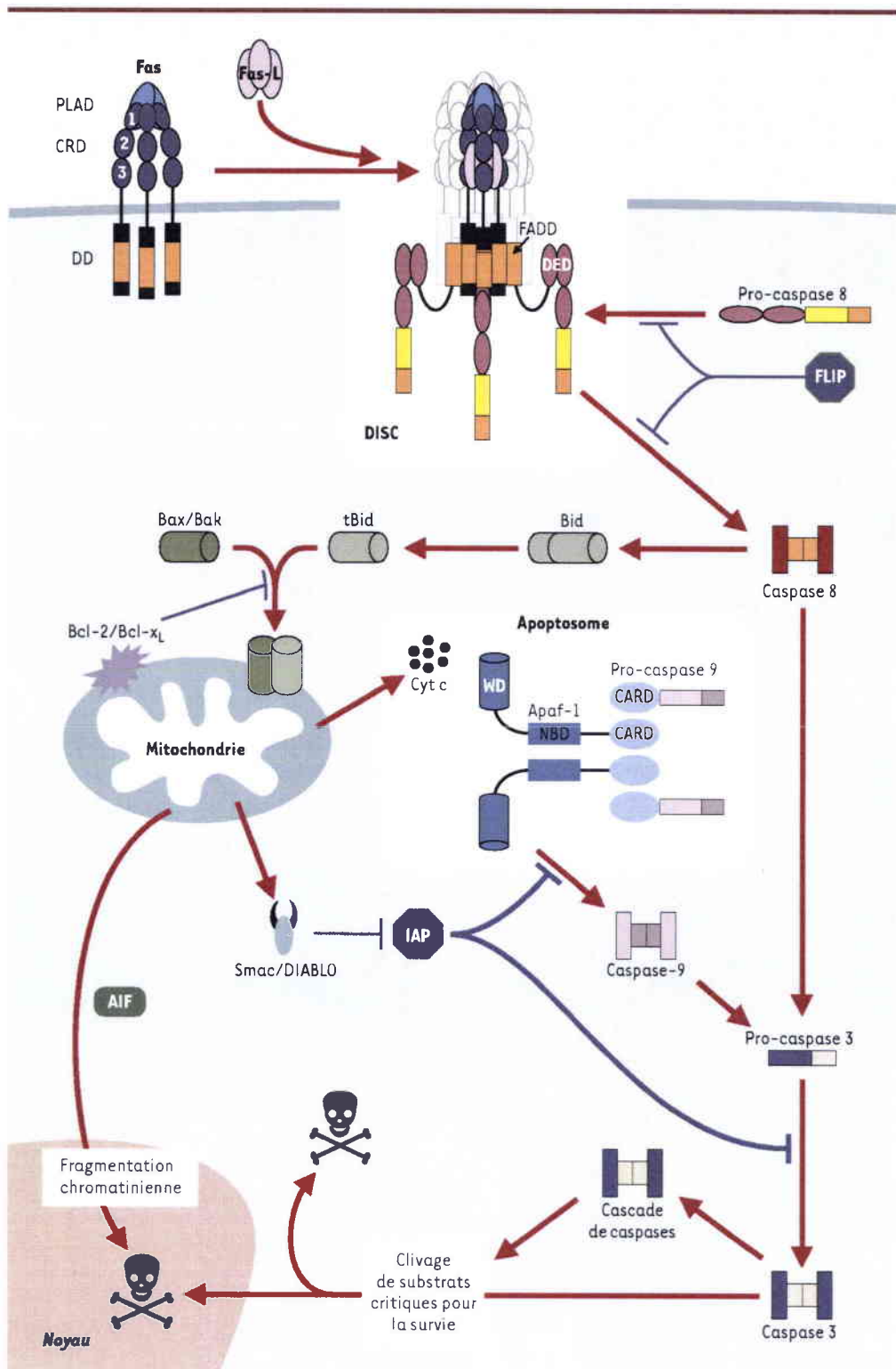


Figure 5 : Schéma général représentant les deux voies d'activation principales du déclenchement de la mort cellulaire (voie mitochondriale et voie des récepteurs de mort) (d'après Couzinet *et al.*, 2002).

formation de nombreux complexes protéiques qui régulent les voies apoptotiques. Un exemple très étudié est le complexe protéique appelé « apoptosome » (Cain *et al.*, 2002). Le cytochrome c , une protéine mitochondriale, interagit avec la protéine Apaf-1 (Apoptotic protease activating factor). En présence d'ATP (adénosine triphosphate), la pro-caspase-9 est recrutée. Ce complexe active la caspase-9, qui active ensuite la caspase-3, une caspase effectrice, en partie responsable des changements morphologiques caractéristiques qui apparaissent lors du processus apoptotique. Ce complexe est la cible de nombreuses protéines anti-apoptotiques qui cherchent à l'inhiber.

- **Caspases à domaine court (caspase aval ou effectrice) : les caspase-3, -6, -7 et -14.**

Ces caspases sont activées par les caspases initiatrices. L'activation de ces caspases est à l'origine du clivage de nombreuses protéines-substrats impliquées dans la plupart des événements biochimiques, structuraux ou morphologiques de l'apoptose.

Deux grandes voies conduisent à l'activation des caspases : la voie extrinsèque des récepteurs membranaires et la voie intrinsèque mitochondriale (figure 5).

2.3 Voies activatrices des caspases

2.3.1 La voie extrinsèque des récepteurs membranaires

La voie des récepteurs membranaires est activée par la liaison de ligands à des récepteurs de mort situés sur la surface cellulaire (Ashkenazi & Dixit, 1998). Certains membres de la superfamille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor ou Facteur Nécrosant des Tumeurs) peuvent comporter un domaine appelé domaine de mort (DD : Death Domain).

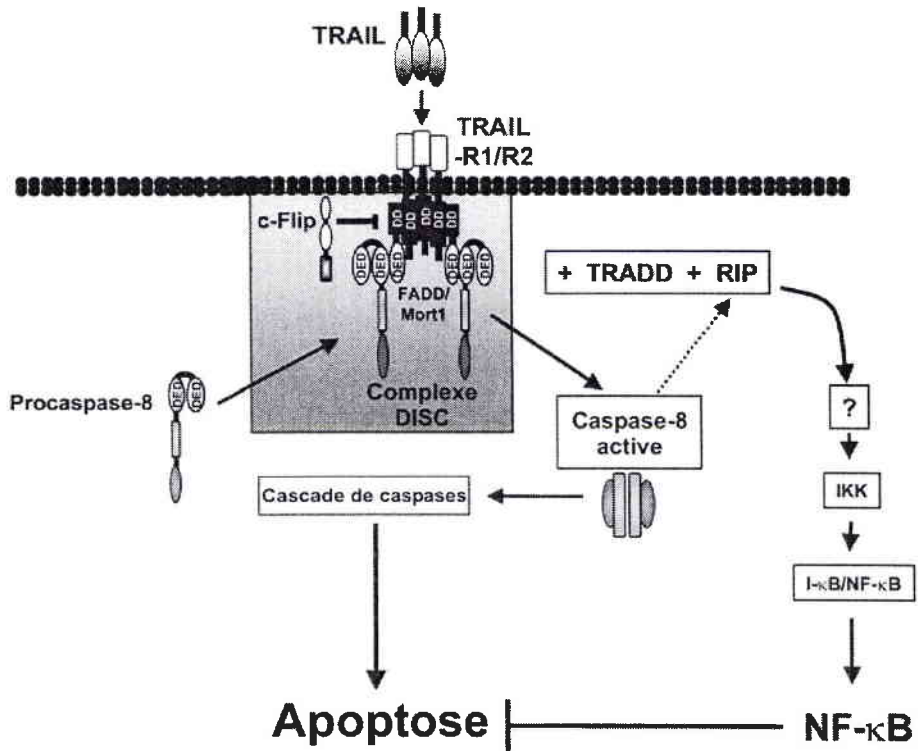
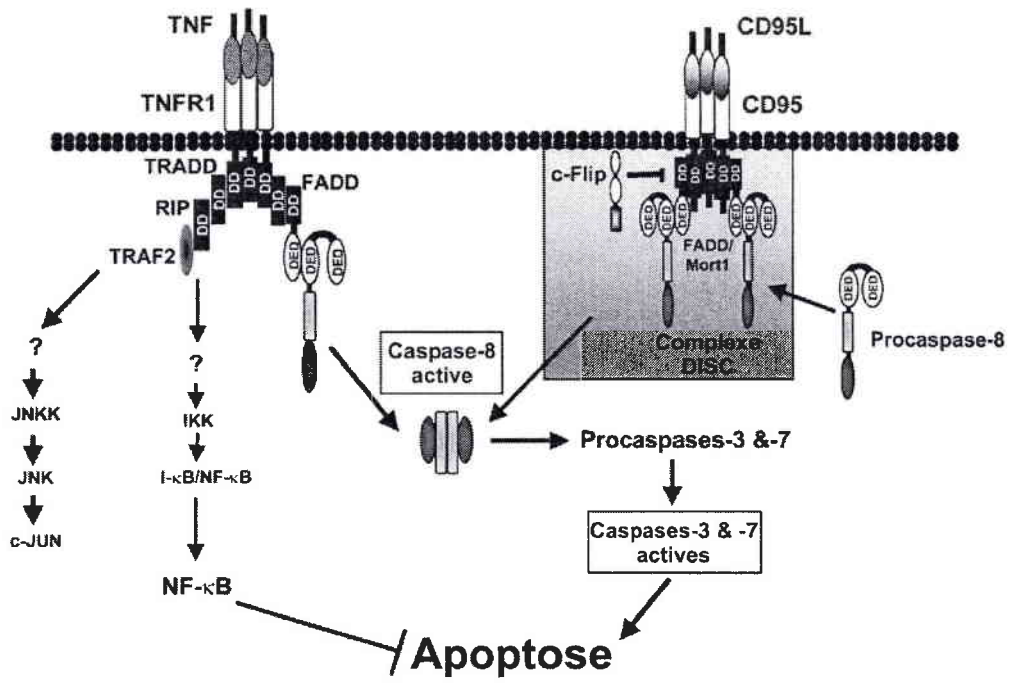


Figure 6 : Schéma des principaux récepteurs de mort : CD95, TNFR1 et TRAIL-R1/R2 (d'après Mac Farlane *et al.*, 2003)

On les appelle récepteurs de mort cellulaire (figure 6). On dénombre 7 récepteurs connus :

- ♦ **CD95** (APO-1 et Fas) : ce type de récepteur est impliqué dans l'élimination des lymphocytes T matures, de certains types de cellules cancéreuses ou infectées par un virus, de certaines cellules inflammatoires... (Ashkenazi & Dixit, 1998).
- ♦ **Tumor necrosis factor TNF-R1** : ce récepteur est activé par le ligand TNF, dont la production va être activée par les macrophages et cellules T, en réponse à une infection (Ashkenazi & Dixit, 1998).
- ♦ **DR3** (TRAMP, ws1-1, APO-3 et LARD) dont le mode d'action ressemble de près à celui de TNFR-1.
- ♦ **TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 1** (TRAIL-R1 appelé aussi DR4 et APO-2) : ce récepteur est principalement impliqué dans l'élimination des cellules tumorales.
- ♦ **TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor 2** (TRAIL-R2 appelé aussi DR5, TRICK et Killer) : de même que TRAIL-R1, ce récepteur participe en grande partie à l'élimination de certains types de cellules cancéreuses.
- ♦ **DR6.**
- ♦ **p75NGFR.**

La liaison d'un ligand à son récepteur de mort permet l'activation de ce récepteur. La plupart des récepteurs de mort recrutent une protéine adaptatrice Fas Associated Death Domain (FADD). Ce recrutement peut se faire directement (par exemple, dans le cas du récepteur CD95) ou par l'intermédiaire d'autres protéines adaptatrices comme la protéine TRADD (par exemple, dans le cas du récepteur TNFR1). La protéine FADD comporte deux domaines d'interactions protéiques : un domaine DD (Death Domain) et un domaine DED (Death Effector Domain). Grâce à ces domaines, FADD peut recruter la pro-caspase-8. L'association du récepteur de mort activé avec la protéine FADD et la pro-caspase-8 conduit à la formation d'un complexe multi-protéique appelé « DISC » (Death Inducing Signalling Complexe). Le recrutement des pro-caspases-8 dans le DISC permet leur auto-clivage et leur activation. Les caspases-8 actives vont alors cliver d'autres

caspases effectrices comme la caspase-3 ou la caspase-9 (Ashkenazi et Dixit, 1998 ; Couzinet *et al.*, 2002 ; Thorburn, 2004). Le recrutement de la caspase-8 dans le DISC peut également être inhibé par des protéines cellulaires, comme la protéine cFLIP (FLICE-Inhibitory protein).

La caspase-8 peut cliver la protéine à domaine BH3, Bid. Cette protéine, une fois clivée, est délocalisée vers la mitochondrie et active la voie mitochondriale intrinsèque. La protéine Bid permet ainsi de relier les deux voies d'activation des caspases, amplifiant le signal apoptotique des récepteurs de mort.

La voie des récepteurs TNFR1 et TRAIL R1/R2 apparaissent plus complexes que la voie de CD95. TNFR1 et TRAIL R1/R2 peuvent également recruter d'autres protéines comme la protéine RIP (receptor-interacting protein) et la protéine TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2), qui activent les voies NF- κ B et/ou JNK (c-Jun N-terminal kinase) (figure 6).

2.3.2 La voie intrinsèque mitochondriale

Les changements rapportés au niveau de la fonction et de la structure mitochondriale pendant le processus apoptotique, ont désigné la mitochondrie comme un organite tenant un rôle clé dans l'exécution du processus apoptotique (Green & Reed, 1998 ; Kroemer *et al.*, 1998).

La mitochondrie est un organite cellulaire, support de la respiration, impliquée dans la production d'énergie, la génération d'espèces réactives de l'oxygène et la régulation de l'apoptose. La mitochondrie serait apparue il y a 1,5 milliards d'années par association symbiotique d'une archéobactérie et d'un proto-eucaryote (Dyall & Johnson, 2000). Des caractéristiques morpho-physiologiques témoignent encore de cette origine endosymbiotique (Jacotot *et al.*, 2000):

- ♦ une double membrane délimitant deux compartiments (la matrice et l'espace inter-membranaire).
- ♦ un génome circulaire.
- ♦ des systèmes de transcription-traduction qui lui sont propres.

La mitochondrie a longtemps été considérée comme étant un organite uniquement impliqué dans la production d'énergie, ce qui lui a valu le surnom de « centrale

énergétique de la cellule ». Cependant, depuis quelques années, de nombreuses études ont impliqué la mitochondrie dans le processus apoptotique dont elle constitue une des principales voies de régulation (Green & Reed, 1998 ; Kroemer *et al.*, 1998 ; Desagher & Martinou, 2000 ; Regula *et al.*, 2003).

2.3.2.1 Mécanismes conduisant à la perméabilisation des membranes mitochondriales

Lorsque la cellule s'engage dans le processus apoptotique, on observe une perméabilisation des membranes mitochondriales, laquelle s'accompagne généralement d'une chute rapide du gradient électrochimique de la membrane mitochondriale interne. La chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) est un événement précoce de l'apoptose (Marchetti *et al.*, 1996). Cet événement est irréversible et par conséquent, la cellule est obligée de s'engager dans la voie apoptotique.

La chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) provoque la perte de l'homéostasie biochimique de la cellule : la synthèse de l'ATP est stoppée, les molécules Redox comme le NADH, le NADPH, le glutathion, sont oxydées et une augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS) est observée (Kroemer *et al.*, 1997 ; Kroemer & Reed, 2000).

La chute du potentiel mitochondrial transmembranaire est également associée à l'ouverture des mégapores mitochondriaux. L'ouverture de ces canaux permet le relargage de protéines apoptogènes mitochondriales appelées SIMP (pour Soluble Intermembrane Mitochondrial Proteins : cytochrome *c*, AIF, Smac/DIABLO...) dans le cytosol, et qui réguleront le processus apoptotique. La libération de ces protéines marque le début de l'activation en cascade des caspases qui conduira à la mort cellulaire.

Malgré les nombreuses études dont ils font l'objet, les mécanismes permettant la perméabilisation membranaire restent encore très controversés, et plusieurs modèles sont actuellement avancés.

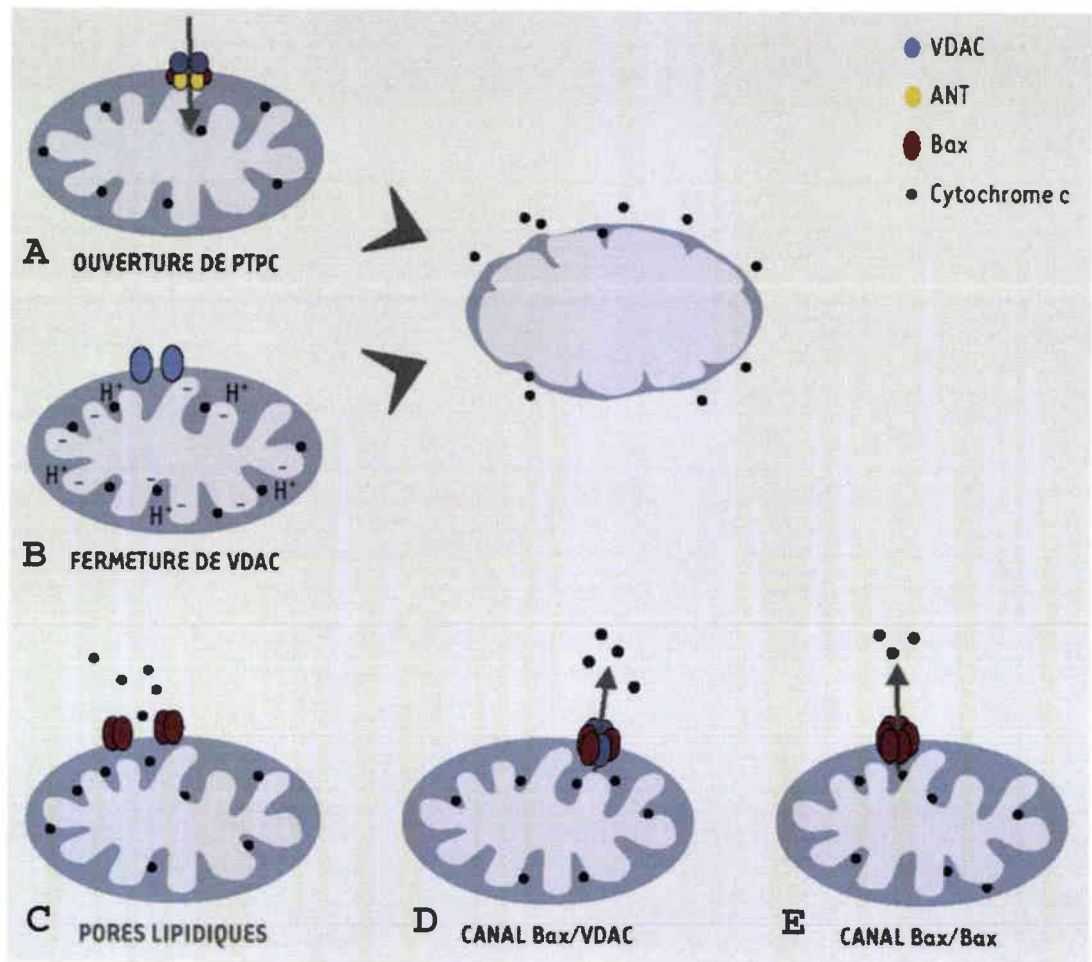


Figure 7 : Modèles conduisant à la perméabilisation des membranes mitochondriales et à la libération des SIMP (Soluble Intermembrane Mitochondrial Proteins) (soluble inter membrane mitochondrial proteins) de l'espace intermembranaire vers le cytosol. ANT : translocateur à adénine ; VDAC : voltage dependent anion channel (Couzinet et al., 2002)

Modèles reposant sur le gonflement de la matrice mitochondriale provoquant une rupture mécanique de la membrane mitochondriale externe :

- Un modèle fait état de l'ouverture d'un mégapore mitochondrial appelé PTPC (*permeability transition pore complexe*). Ce complexe multiprotéique est composé de la porine de la membrane mitochondriale externe, communément appelée VDAC (Voltage Dependent Anion Channel), d'un translocateur à adénine (ANT) inséré dans la membrane interne et de la cyclophiline D, située dans la matrice. Des molécules pro-apoptotiques (par exemple Bax) qui s'associent avec le PTPC, favorisent l'ouverture de ce mégapore et provoquent une dépolarisation, qui coïncide avec la chute du potentiel membranaire ($\Delta\Psi_m$) et le gonflement de la matrice mitochondriale. Ceci provoque la rupture mécanique de la membrane externe et par conséquent le relargage des constituants inter-membranaires (figure 7.A) de (Kroemer *et al.*, 1998 ; Regula *et al.*, 2003).
- Un second modèle met en cause la fermeture de VDAC, laquelle provoquerait un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial. L'accumulation de protons dans l'espace inter-membranaire, liée à ce dysfonctionnement va engendrer une production de radicaux libres ainsi qu'un gonflement matriciel (figure 7.B) (Zamzami & Kroemer, 2003).

Modèles proposant la formation de pores dans la membrane externe sans altérations physiques de la mitochondrie :

- La protéine pro-apoptotique Bax pourrait s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec d'autres membres de la famille de protéines Bcl-2. L'oligomérisation de Bax en réponse à certains stimuli apoptotiques lui permet de former des canaux dans la membrane mitochondriale externe (figure 7.C) (Epanand *et al.*, 2002).
- La protéine Bax pourrait influencer la formation de pores lipidiques (figure 7.D).

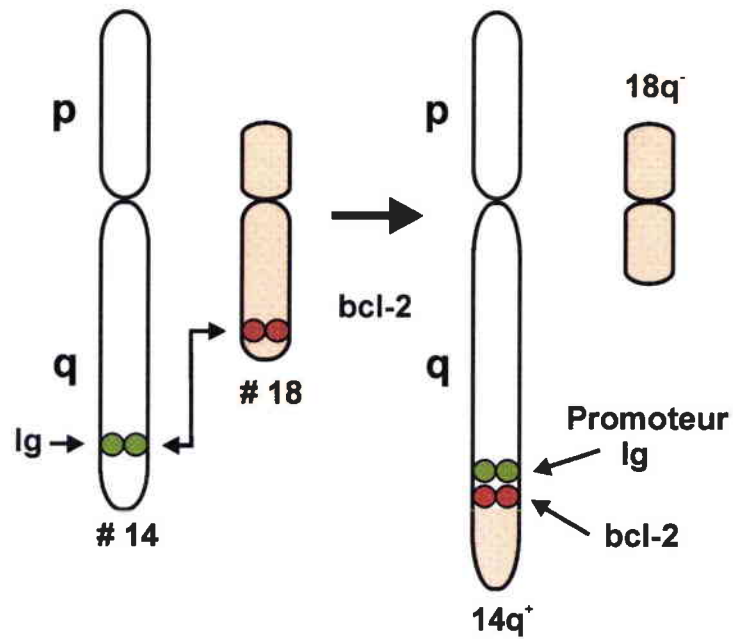


Figure 8 : Schéma de la translocation impliquant le chromosome 14 (région où sont synthétisées les chaînes lourdes des immunoglobulines (Ig) et le chromosome 18 (gène *bcl-2*). Cette translocation chromosomique aboutit à l'activation du gène *bcl-2* et caractérise certains types de lymphomes.

- Des protéines pro-apoptotiques, Bax et Bak, associées avec le VDAC seraient responsables de la formation de canaux hybrides (figure 7.E) (Esposti & Dive, 2003).

2.3.2.2 La famille de protéine Bcl-2 : des régulateurs importants de la voie mitochondriale

Bcl-2 est l'acronyme utilisé pour le gène *B-cell lymphoma/leukemia-2*. Une sur-expression de la protéine codée par ce gène (la protéine Bcl-2), a été identifiée initialement dans des lymphomes folliculaires. Dans ce cas, la sur-expression de cette protéine est due à une translocation chromosomique spécifique t(14;18) qui délocalise le gène *bcl-2* normalement situé sur le chromosome 18, dans la région du chromosome 14 où sont synthétisées les chaînes lourdes des immunoglobulines (IgH) (figure 8) (Reed, 1994). Suite à sa translocation chromosomique, *bcl-2* est sous le contrôle du promoteur fort du gène des chaînes lourdes des immunoglobulines, et exprimé de manière constitutive dans les cellules lymphoïdes B porteuses de la translocation. La sur-production des ARNm de *bcl-2* et de la protéine codée par ce gène (Bcl-2, 26 KDa) provoque une importante résistance à l'apoptose (Reed, 1994).

La protéine Bcl-2 est à l'origine d'une nouvelle classe d'oncogène car à la différence des autres oncogènes, Bcl-2 n'induit pas la prolifération cellulaire, mais augmente la durée de vie des cellules en inhibant l'apoptose.

A ce jour, plus d'une quinzaine de protéines homologues de Bcl-2 ont été mises en évidence. Cette famille de protéines constitue les régulateurs les plus importants de la voie apoptotique mitochondriale (Reed, 1997 ; Adams & Cory, 1998 ; Chao & Korsmeyer, 1998 ; Antonsson & Martinou, 2000 ; Burlacu, 2003 ; Borner, 2003 ; Kuwana & Newmeyer, 2003 ; Sprick & Walczak, 2004).

Ces protéines sont classées en deux sous-familles selon leurs fonctions.

- Le premier groupe est constitué de **protéines anti-apoptotiques** (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w, Mcl-1...). Ces protéines prolongent anormalement la durée de vie des cellules en inhibant l'apoptose (Reed, 1994).

Membres de la famille Bcl-2	Localisation dans les cellules normales	Localisation dans les cellules apoptotiques	Possibles interactions avec des protéines ou des récepteurs dans les cellules normales	Interactions avec des protéines ou des récepteurs dans les cellules apoptotiques	Modifications post-translacionnelles
Bcl-2	Insérée dans MME, RE, EN	Insérée dans MME, RE, EN	FKB38, BAP-31, pro-apoptotic Bax-like proteins (Bax, Bak) ?	BH3-seulement, autres ?	?
Mcl-1	Insérée dans MME, RE, EN ?	Insérée dans MME, RE, EN ?	Pro-apoptotic Bax-like proteins (Bax, Bak) ?	BH3-seulement, autres ?	?
Bcl-x_L	Cytosolique, insérée dans la MME & faiblement attachée à la MME	Insérée dans la MME	FKB38, BAP-31, pro-apoptotic Bax-like proteins (Bax, Bak) ?	BH3-seulement, autres ?	Changement de conformation (?)
Bcl-w	Faiblement attachée à la MME	Insérée dans la MME	Pro-apoptotic Bax-like proteins (Bax, Bak) ?	BH3-seulement, autres ?	Changement de conformation
Bax	Cytosolique, faiblement attachée à la MME et au RE	Insérée dans la MME Insérée dans le RE ?	14-3-3, Bif-1, Ku70, humanin	tBid (interaction transitoire ?)	Changement de conformation
Bak	Insérée dans MME, RE	Insérée dans la MME Insérée dans le RE ?	?	tBid (interaction transitoire ?)	?
Bad	Cytosolique	MME	14-3-3	Bcl-x _L	Phosphorylation
Bid	Cytosolique	MME	?	Bax, Bak (interaction transitoire ?)	Clivage protéolytique, phosphorylation, myristoylation
Bim/Bod	Associée au DLC-1 (microtubules)	Insérée dans la MME	DCL1	Membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	Phosphorylation
Bmf	Associée au DLC-2 (myosinV/actin-cytosquelette)	Insérée dans la MME	DCL2	Membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2	Phosphorylation

Tableau I : Localisations, translocations et modifications post-translacionnelles de quelques protéines de la famille Bcl-2

MME : Membrane mitochondriale Externe ; **RE** : Réticulum Endoplasmique ; **EN** : Enveloppe Nucléaire (d'après Schinzel *et al.*, 2004)

- Le second groupe est composé de **protéines pro-apoptotiques** (Bax, Bak, Bad, Bid, Bim (Adams & Cory, 1998). Ce groupe est divisé en deux catégories. Les protéines qui ne comportent que le domaine BH3, sont appelées « **BH3 seulement** » (en anglais, « BH3 only-proteins »; Bid, Bad, Bim, Bik, Noxa, Puma...). Elles se comportent comme des activateurs de la deuxième catégorie, c'est-à-dire, des protéines comportant plusieurs domaines BH, aussi appelées **protéines « multi-domaines »** ou protéines « Bax-like » (Bax, Bak, Bok...) (Sprick & Walczak, 2004).

Le ratio des protéines pro-apoptotiques sur les protéines anti-apoptotiques est un élément critique de la réponse aux stimuli apoptotiques et c'est ce ratio qui détermine si la cellule entre ou non en apoptose.

Dans les conditions normales, les protéines anti-apoptotiques peuvent être situées soit au niveau de la membrane mitochondriale externe, soit dans l'enveloppe nucléaire, soit dans le réticulum endoplasmique ou dans le cytosol. La plupart des protéines pro-apoptotiques sont localisées dans le cytosol et les microtubules ; pendant le processus apoptotique, la majorité de ces protéines se trouve localisée dans la membrane externe de la mitochondrie (tableau I) (Schinzel *et al.*, 2004).

Les domaines BH

Toutes les protéines de la famille Bcl-2 comportent au moins une des quatre régions hautement conservées, comme le montre l'alignement de leurs séquences protéiques (figure 9). Ces quatre régions sont appelées domaines BH, ce qui correspond à une abréviation pour « Bcl-2 Homologies ». Le domaine BH3 est commun à toutes les protéines (Parone *et al.*, 2002). La plupart des protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-Xl, Boo) comportent les quatre domaines (BH1, -2, -3, -4). Parmi les protéines pro-apoptotiques certaines ne comportent que le domaine BH3 (Bim/Bid/Bad...). Les autres protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bok...) comportent les domaines BH1,

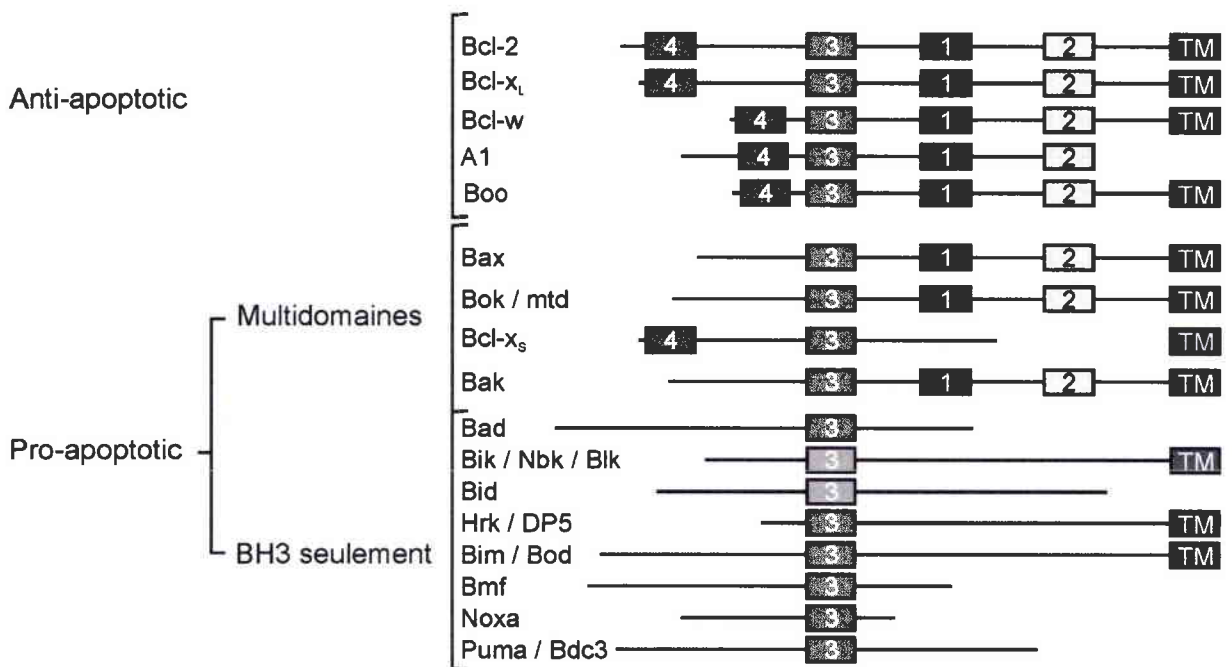


Figure 9 : Représentation schématique des domaines BH (Bcl-2 Homology) (BH1-4) des principaux membres de la famille de protéines Bcl-2 ; TM : région transmembranaire (d'après Coultas & Strasser, 2003).

BH2, et/ou BH3. Peu de protéines pro-apoptotiques, comme la protéine Bcl-xS, possèdent un domaine BH4 (Kelekar & Thompspon, 1998).

Les domaines BH sont déterminants dans l'activité biologique des protéines. Des mutations situées dans les domaines BH1 et BH2 des protéines Bcl-2 et Bcl-xL abolissent les fonctions anti-apoptotiques de ces protéines et bloquent leur hétérodimérisation avec d'autres protéines de la famille Bcl-2, par exemple Bax, Bak... (Oh *et al.*, 1997).

La protéine Bcl-2 peut être clivée en un fragment de 23 kDa (Tomicic and Kaina, 2001). Ce clivage a lieu sur un site cible de l'activité des caspases, dans la région d'acides aminés YEWD31↓AGD34↓A, ce qui provoque la suppression du domaine BH4, région connue pour être essentielle à l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 (Grandgirard *et al.*, 1998 ; Shimizu *et al.*, 2000).

Régulation de la voie apoptotique mitochondriale par la famille Bcl-2

La libération des facteurs apoptogènes, (la protéines AIF, le cytochrome *c*, endo G, Smac/Diablo...) marque le début de l'activation en cascade des caspases, qui conduira la cellule à la mort. Les protéines de la famille Bcl-2 contrôlent la libération de ces protéines mitochondriales.

Bax a été la première protéine de la famille Bcl-2 à être identifiée comme étant pro-apoptotique. C'est une protéine de 21 kDa prédominante dans le cytosol de la cellule. En présence de signaux apoptotiques, Bax est délocalisée du cytosol dans la membrane externe de la mitochondrie et participe à la libération de protéines de l'espace intermembranaire mitochondrial (SIMP), comme le cytochrome *c* (Brady & Gil-Gomez, 1998 ; Antonsson *et al.*, 2001). Les mécanismes par lesquels Bax libère ces protéines ne sont pas totalement élucidés. Il semblerait que Bax participe à la formation des pores mitochondriaux, ce qui faciliterait le mouvement des protéines à travers la membrane mitochondriale (Epanand *et al.*, 2002).

D'autres protéines de la famille Bcl-2 possèdent la capacité de former des pores, comme Bcl-2 et Bcl-xL. En 1996, une étude a montré que la structure tridimensionnelle de la protéine Bcl-xL était semblable à celle du domaine responsable de la formation de

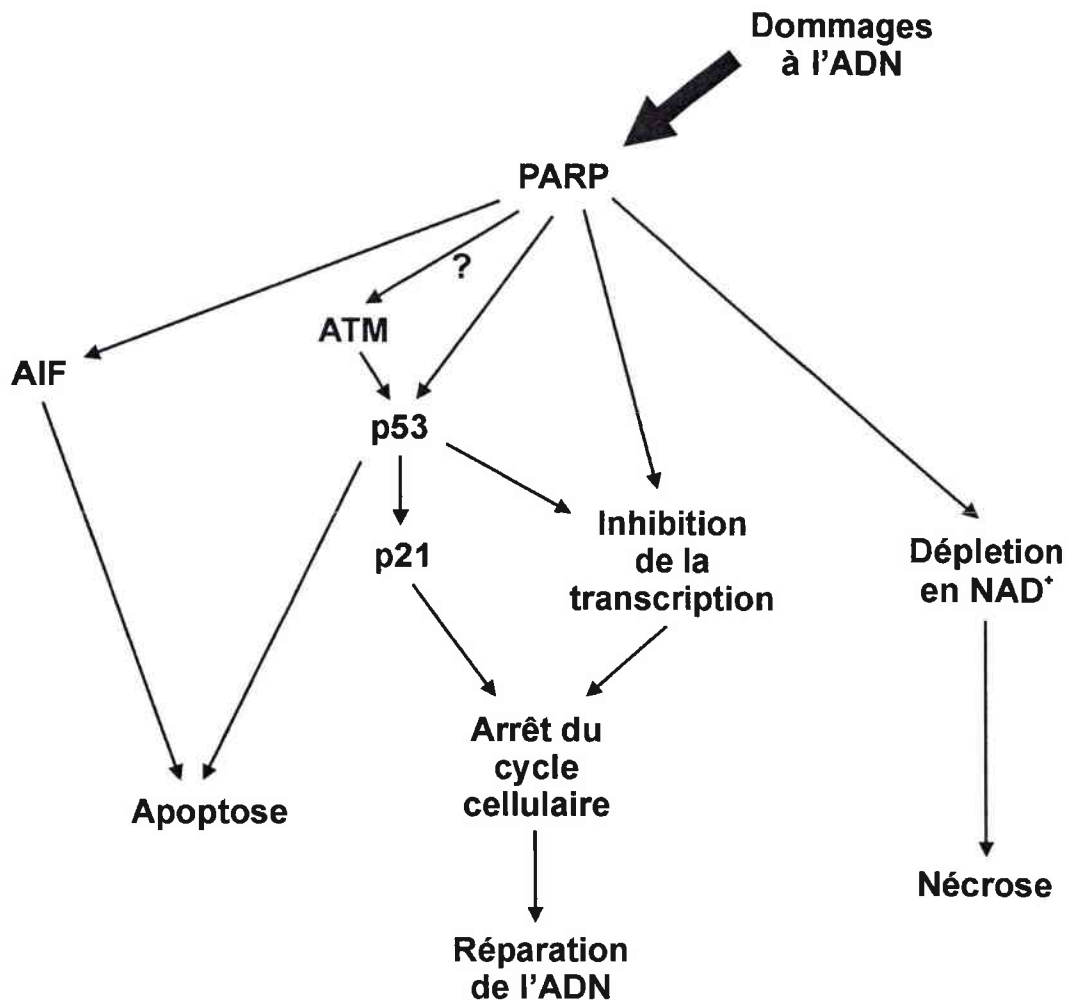


Figure 10 : Voies cellulaires pouvant être activées par la PARP suite à des dommages à l'ADN (d'après Bouchard *et al.*, 2003).

pores de certaines toxines bactériennes, comme la toxine diphtérique et les colicines (Muchmore *et al.*, 1996). Il semblerait que cette propriété soit commune à plusieurs membres de la famille Bcl-2 et qu'elle permettrait la formation de canaux ioniques régulant le passage des protéines mitochondriales (Minn *et al.*, 1997).

Les protéines anti-apoptotiques

Il a été montré que Bcl-2 et son homologue Bcl-xL, suppriment les changements qui apparaissent au niveau de la mitochondrie, comme la chute du potentiel mitochondrial transmembranaire ($\Delta\Psi_m$) (Decaudin *et al.*, 1997), la libération du cytochrome *c* (Yang *et al.*, 1997 ; Jurgensmeier *et al.*, 1998 ; Kluck *et al.*, 1997) et celle du facteur AIF (Susin *et al.*, 1996). Bcl-xL inhibe également l'activation des caspases en séquestrant la protéine Apaf-1, empêchant ainsi la formation du complexe « apoptosome » (Apaf-1/cytochrome *c*/pro-caspase 9) (Cain *et al.*, 2002). Bcl-2 empêche l'oligomérisation de Bax ainsi que son insertion dans la membrane mitochondriale, abolissant ainsi ses propriétés apoptotiques (Antonsson *et al.*, 2001).

Il a également été montré que la sur-expression de Bcl-2 dans les cellules transfectées Molt4 (Perry *et al.*, 1997a) et dans les cellules ES (Ewing's sarcoma, lignée cellulaire A4573) (Soldatenkov *et al.*, 1996), ainsi que la sur-expression de Bcl-xL dans les cellules transfectées HL60 (Ibrado *et al.*, 1996a ; Ibrado *et al.*, 1996b) inhibent le clivage de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP-1).

La PARP-1 est une enzyme qui synthétise le polymère poly(ADP-ribose) (pADPr) à partir de son substrat, le nicotinamide adénine dinucleotide (NAD^+) ce processus est également appelé poly(ADP-ribosyl)ation (Hoflack *et al.*, 1997a ; Bouchard *et al.*, 2003). Le pADPr est un facteur essentiel à la réparation de l'ADN ; il se fixe aux histones et aux protéines nucléaires, et facilite l'activité des enzymes de la réparation de l'ADN. La PARP intervient également dans le contrôle du cycle cellulaire, de la différenciation, de l'apoptose... (figure 10) (Bouchard *et al.*, 2003). Durant l'apoptose, la PARP-1 est clivée par les caspases (par exemple, la caspase-3 et la caspase-7) en deux fragments : un fragment de 89 kDa, qui contient le site catalytique, et un fragment de 24 kDa, qui contient le site de liaison à l'ADN (DBD : DNA Binding Domain) (Soldani

& Scovassi, 2002). La détection du fragment de 89 kDa est utilisé comme marqueur précoce de l'apoptose dans plusieurs types cellulaires (Soldatenkov *et al.*, 1996 ; Hoflack *et al.*, 1997b ; Perry *et al.*, 1997a ; Soldani & Scovassi, 2002). Dans certains cas, l'induction de l'apoptose ne peut se résumer à la présence du fragment de 89 KDa, car dans les cellules normales SHE, le fragment de 89 kDa ne persiste pas suite au clivage de la PARP-1 mais il est rapidement dégradé (Alexandre *et al.*, 2000b).

Les protéines pro-apoptotiques

Les protéines « multidomaines » Bax et Bak sont les deux seules protéines à pouvoir perturber directement les fonctions mitochondriales (Scorrano & Korsmeyer, 2003). Ces deux protéines s'homodimérisent ou s'hétérodimérisent, et forment des pores qui perméabilisent la membrane mitochondriale externe, et permettent la libération des protéines mitochondriales apoptogènes (cytochrome *c*, Smac Diablo, AIF...) (Scorrano & Korsmeyer, 2003). Les cellules MEF (mouse embryo fibroblasts) déficientes pour les deux protéines Bax (Bax ^{-/-}) et Bak (Bak ^{-/-}) sont résistantes à de nombreux stimuli apoptotiques (étoposide, UV, staurosporine...), ce qui confirme le rôle critique de ces protéines dans la voie apoptotique mitochondriale (Wei *et al.*, 2004). Bax et Bad, peuvent également s'hétérodimériser avec Bcl-2 et Bcl-xL, et ainsi perturber leur activité anti-apoptotique (Zha *et al.*, 1997).

Les protéines « BH3-seulement » sont inactives dans les conditions normales. L'activation de chaque protéine « BH3-seulement » a lieu en réponse à des stimuli bien particuliers. Par exemple, la protéine pro-apoptotique Bid est clivée en un fragment de 15 kDa suite à l'activation de la caspase-8. La protéine tronquée, tBid est délocalisée du cytosol vers la membrane mitochondriale externe, interagit avec les protéines mitochondriales et contribue à la libération du cytochrome *c*.

La protéine Bad est activée par des mécanismes de phosphorylation-déphosphorylation. Dans les conditions normales, elle est localisée dans le cytosol sous la forme phosphorylée, ce qui empêche son activité pro-apoptotique. Suite à un signal de

mort, Bad sera déphosphorylée et délocalisée du cytosol vers la membrane mitochondriale externe ce qui rétablit son activité pro-apoptotique (Zha *et al.*, 1997).

La protéine Bim est impliquée entre autre dans l'apoptose induite par les UV, dans la sélection des thymocytes... ; Bmf intervient dans l'apoptose induite par le détachement des cellules aussi appelée « Anoikis » ; l'expression de Noxa et Puma est activée par un mécanisme dépendant de P53 en réponse à des dommages à l'ADN... (Coultas & Strasser, 2003 ; Kuwana & Newmeyer, 2003).

Certaines de ces protéines (par exemple, Bim et Bid) se comportent comme des « activateurs » des protéines pro-apoptotiques « multidomaines » (Bax, Bak...). Bid et Bim sont capables de se lier directement aux protéines Bax ou Bak, et en conséquence, d'induire directement la libération du cytochrome *c*. Les protéines Bax et Bak sont essentielles à l'action des protéines « BH3-seulement » puisqu'il a été démontré que les cellules MEF déficientes pour ces deux protéines (Bax^{-/-} et Bak^{-/-}) sont complètement résistantes à l'apoptose induite par la sur-expression des protéines « BH3 » (Sprick & Walczak, 2004 ; Wei *et al.*, 2004).

Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L peuvent séquestrer les protéines BH3 « activateurs », empêchant ainsi l'activation de Bax et Bak (Cheng *et al.*, 2001).

Par contre, les protéines Bad et Bik, par exemple, se comportent plutôt comme des « sensibilisateurs » et vont empêcher les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-x_L de séquestrer les protéines « activateurs », renforçant ainsi les effets apoptotiques de Bim et Bid (Martin & Vuori, 2004).

2.4 Le rôle de P53 dans l'apoptose

Le gène suppresseur de tumeur *p53* code pour un facteur de transcription, la protéine P53. En réponse à un stress cellulaire (radiations UV, privation des facteurs de croissances, agents anti-cancéreux, activation inappropriée de proto-oncogènes, chocs thermiques, infections virales, hypoxie...), P53 bloque le cycle cellulaire dans la phase transitoire G1/S ou G2/M (Soussi, 2002). L'arrêt de la division cellulaire permet à la cellule de réparer les lésions et d'éviter la propagation de cellules altérées. En cas de dommages trop importants, P53 induit l'apoptose (Dlamini *et al.*, 2004 ; Meek, 2004).

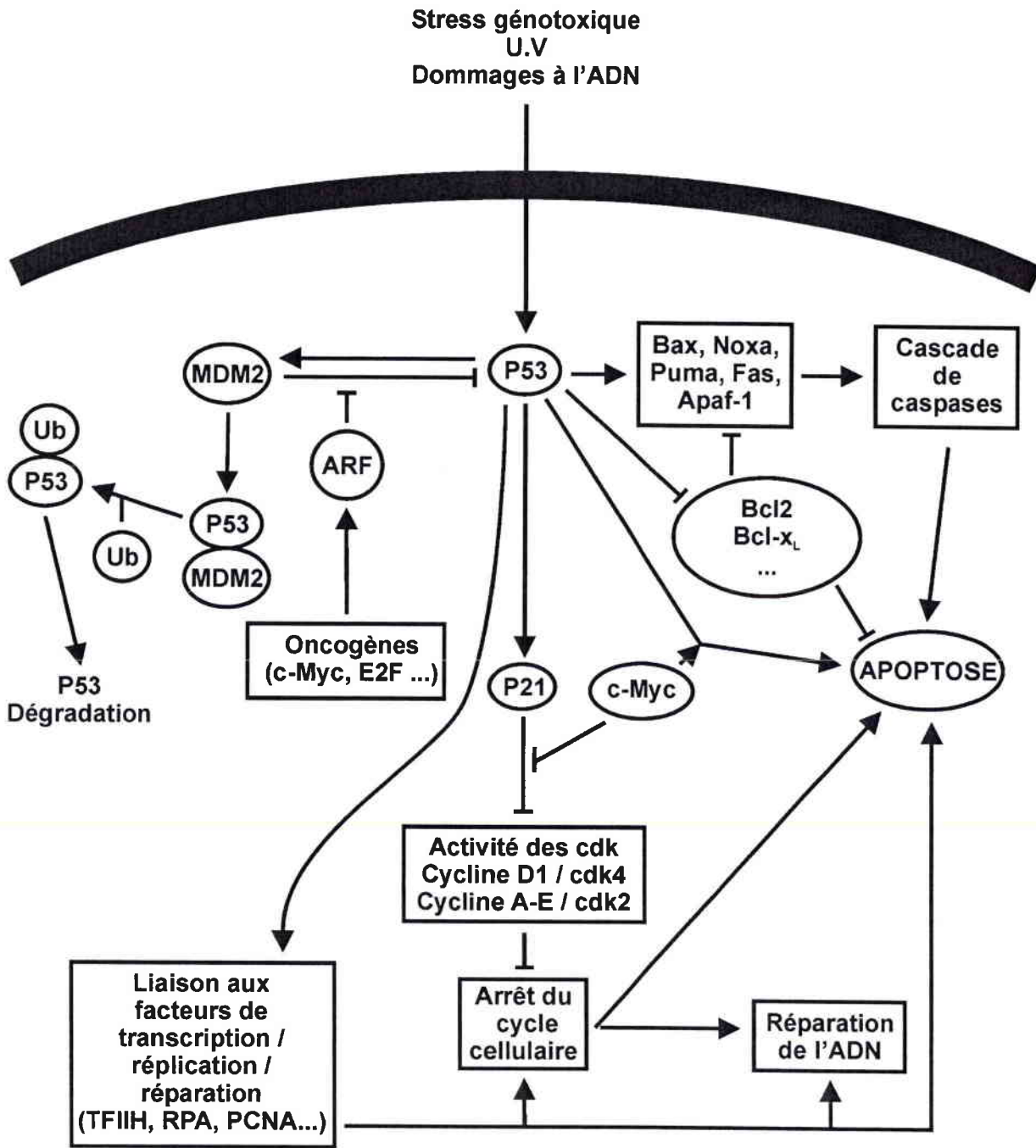


Figure 11: Voies d'activation de P53 en réponse à divers stress cellulaires (d'après Wang & Harris, 1997).

Dans les conditions normales, P53 est maintenue à un faible niveau d'expression et sa demi-vie est courte. Cela est dû à son interaction avec la protéine Mdm2, une E3 ubiquitine ligase, qui cible l'ubiquitylation et la dégradation de P53 (Michael & Oren, 2003). La liaison de Mdm2 au domaine de transactivation de P53 bloque l'interaction de P53 avec les systèmes de transcription. L'induction d'un stress cellulaire cause l'interruption de l'interaction P53-Mdm2, avec pour conséquence la stabilisation de P53. Les mécanismes qui provoquent l'interruption de l'interaction de P53-Mdm2 divergent selon l'origine du stress cellulaire (Meek, 2004). Par exemple, les dommages à l'ADN (UV, cassures...) induisent une série de phosphorylations qui perturbe l'équilibre P53-Mdm2 et inhibe la capacité de Mdm2 à dégrader P53 ; l'hypoxie ou de fortes doses d'UV provoquent la diminution de l'expression de *mdm2* ; un stress induit par les oncogènes (par exemple, c-Myc, E2F1...) induit la protéine p14^{ARF} (ARF) qui se lie à Mdm2 et l'empêche de promouvoir l'ubiquitylation et la dégradation de P53 (figure 11) (El-Deiry, 1998 ; Meek, 2004).

L'inactivation des interactions P53-Mdm2 conduit à la stabilisation de la protéine P53 et à des changements d'expression des gènes P53-dépendants (El-Deiry, 1998).

En cas de stress cellulaire, l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1/S ou G2/M implique l'activation de protéines comme P21, GADD45 (growth arrest and DNA-damage inducible gene #45) et 14-3-3 σ par P53. P21 activée inhibe les complexes Cycline D/Cdk4 et Cycline A-E/Cdk2, ce qui arrête le cycle cellulaire. P21 et GADD45 se lient également à PCNA (proliferating cell nuclear antigen), ce qui conduit également à l'arrêt du cycle cellulaire (El-Deiry, 1998 ; Müllauer *et al.*, 2001).

P53 induit l'apoptose en agissant sur la voie apoptotique mitochondriale (figure 12) (Hofseth *et al.*, 2004 ; Heiser *et al.*, 2004). Le gène *bax* possède un élément de réponse à P53 dans son promoteur ce qui permet à P53 d'activer sa transcription. P53 peut activer l'expression d'autres protéines mitochondriales comme Apaf-1, NOXA ou PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) et réprimer l'expression de protéines anti-apoptotiques comme Bcl-2 et Bcl-x_L (Thornborrow & Manfredi, 1999 ; Yu *et al.*, 2003 ; Dlamini *et al.*, 2004 ; Heiser *et al.*, 2004).

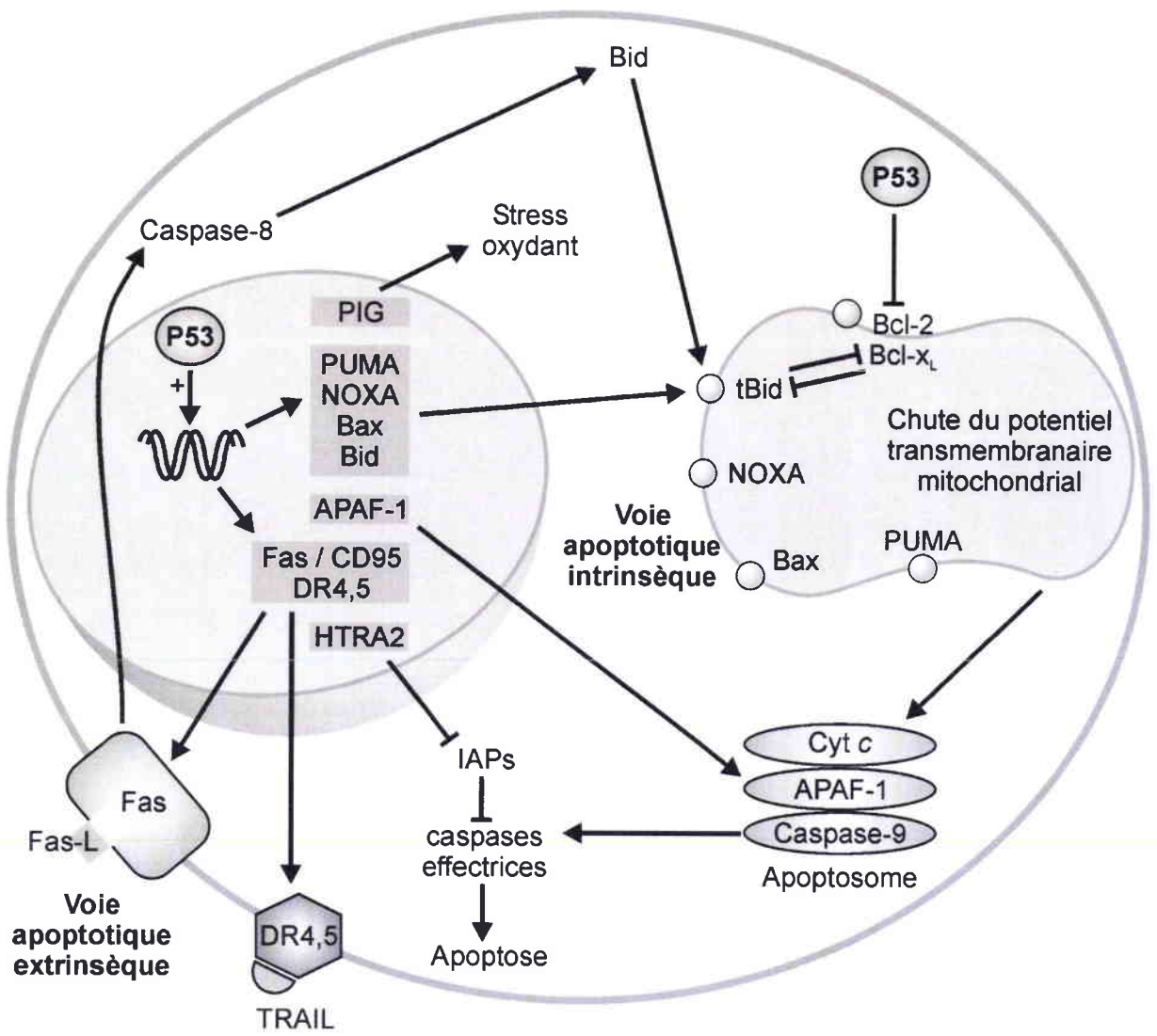


Figure 12 : Implication de P53 dans la voie apoptotique mitochondriale et dans la voie des récepteurs membranaires (Hofseth *et al.*, 2004).

P53 peut également agir autrement que par l'activation de gènes ou de protéines impliqués dans la régulation de l'apoptose. P53 peut être transloquée du noyau dans le compartiment membranaire de la mitochondrie (Marchenko *et al.*, 2000 ; Sansome *et al.*, 2001). La translocation de P53 vers la mitochondrie suite à un signal de mort est précoce, et induit la chute du potentiel mitochondriale transmembranaire, la libération du cytochrome *c* et l'activation de la caspase-3 (Marchenko *et al.*, 2000). De plus, l'apoptose induite par P53 est inhibée dans les cellules transfectées de la lignée cellulaire de souris 32D qui sur-expriment les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Marchenko *et al.*, 2000). Récemment, il a été montré que P53 pouvait également agir comme les protéines «BH3 sensibilisateurs» ; P53 se lie à la protéine Bcl-xL et libère les protéines pro-apoptotiques Bax et Bid séquestrées par Bcl-xL (Chipuk *et al.*, 2004).

P53 agit également sur la voie apoptotique des récepteurs membranaires et active la transcription des récepteurs Fas, DR4 et DR5 (Hofseth *et al.*, 2004 ; Sheikh & Huang, 2004) (figure 12).

2.5 La fonction double de *c-myc*: implication dans la croissance cellulaire et l'apoptose

S'il est reconnu que la sur-expression de *c-myc* contribue fortement à la prolifération et à la croissance cellulaire, il est maintenant établi que la sur-expression de Myc peut induire l'apoptose (Evan *et al.*, 1992 ; Thompson *et al.*, 1998 ; Vermeulen *et al.*, 2003).

Inversement, la perte de l'expression de Myc ou sa régulation négative conduit non seulement à l'atténuation de la croissance cellulaire et du cycle cellulaire, mais contribue également à la protection de la cellule contre certains mécanismes apoptotiques (Dong *et al.*, 1997 ; Canelles *et al.*, 1997 ; Genestier *et al.*, 1999 ; Adachi *et al.*, 2001 ; Sarkar *et al.*, 2003).

2.5.1 Activité transcriptionnelle du gène *c-myc*

Le proto-oncogène *c-myc* code pour un facteur de transcription c-Myc dont le rôle est primordial dans la progression du cycle cellulaire (Heikkila *et al.*, 1987). La protéine Myc (64 KDa) est une phosphoprotéine nucléaire. Le domaine C-terminal (C-ter) de la

Gènes	Régulation	Fonctions
ARF	Activée	Apoptose
Cad	Activée	Biosynthèse des pyrimidines
Cdc25	Activée	Phosphatase/cycle cellulaire
Cycline A	Activée	Régulateur du cycle cellulaire
Cycline D1	Activée ou réprimée	Régulateur du cycle cellulaire
Cycline E	Activée	Régulateur du cycle cellulaire
ISGF3 γ	Activée	Facteur de transcription
LDH-A	Activée	Enzyme métabolique
ODC	Activée	Biosynthèse des polyamines
p53	Activée	Facteur de transcription
C/EBP α	Réprimée	Facteur de transcription
λ 5	Réprimée	Promoteur viral
Lysozyme	Réprimée	Glycosidase
Albumine	Réprimée	Protéine sérique
Gadd 45	Réprimée	Arrêt de la croissance cellulaire
Ig E μ	Réprimée	Chaîne lourde immunoglobuline
Ig κ	Réprimée	Chaîne légère immunoglobuline
Trombospondin	Réprimée	Inhibiteur de l'angiogenèse

Tableau II : Exemples de gènes dont la transcription peut être régulée par c-Myc grâce à la séquence EMS (E-box-Myc-sequence) (d'après Fachini & Penn, 1998 ; Dang *et al.*, 1999).

protéine Myc contient les régions nécessaires à la transformation cellulaire maligne, à l'apoptose ainsi qu'à l'activité transcriptionnelle de Myc. C-ter comprend un domaine basic helix-loop-helix/leucine-zipper (b/HLH/Z), permettant l'oligomérisation avec d'autres protéines. Il contient également un site de reconnaissance spécifique à l'ADN, la séquence CACGTG appelée E-box-Myc-sequence (EMS), présente dans les gènes cibles de Myc. L'expression de *c-myc* est régulée par phosphorylation et/ou par des interactions avec d'autres protéines comme la protéine Max, une phosphoprotéine nucléaire (Facchini & Penn, 1998 ; Prendergast, 1999).

L'hétérodimère Myc/Max est nécessaire pour la fixation spécifique de Myc à l'ADN ainsi que pour son activité biologique, comme l'activation de gènes cibles, son rôle dans la prolifération cellulaire, la transformation cellulaire maligne et l'apoptose (Prendergast, 1999). L'hétérodimère Myc/Max reconnaît spécifiquement la séquence EMS (Claassen et Hann, 1999). Tous les gènes contenant cette séquence sont identifiés comme pouvant voir leur transcription activée ou réprimée par Myc. A ce jour, plus de 640 gènes pouvant être activés ou réprimés par Myc ont été identifiés (tableau II) (<http://myccancergene.org> ; Ben-Yosef *et al.*, 1998 ; Facchini & Penn, 1998 ; Dang *et al.*, 1999a ; O'Connell *et al.*, 2003 ; Zeller *et al.*, 2003).

D'autres complexes peuvent également se former. Le domaine C-Ter de Myc peut également interagir avec d'autres protéines (YY-1, AP2, BRCA-1, TFII-I, Miz-1...) et ces interactions peuvent influencer la liaison à l'ADN du complexe Myc/Max (Prendergast, 1999). Max peut également s'homodimériser ou former des hétérodimères avec d'autres protéines. Il s'agit des protéines de la famille Mad et de la protéine Mxil. Ces complexes répriment la transcription des gènes activés par Myc en rentrant en compétition avec le site de liaison spécifique EMS (Thompson, 1998).

2.5.2 Implication de *c-myc* dans la prolifération cellulaire

En général, l'expression de *c-myc* est corrélée avec l'activité prolifératrice de la cellule. L'expression de *c-myc* peut être stimulée par des signaux mitogènes ou par un ajout de facteurs de croissance. Il en résulte la production massive d'ARNm et l'augmentation de la traduction de la protéine Myc. Inversement, la privation des signaux mitogènes s'accompagne d'une chute brutale de l'expression de *c-myc*, caractérisée par une

chute des ARNm (Alexandre *et al.*, 2002) et de la protéine Myc, et cela indépendamment du cycle cellulaire (Dean *et al.*, 1986). En phase G₀ du cycle cellulaire, dans les cellules quiescentes, le taux d'expression de *c-myc* reste faible voire inexistant (Dean *et al.*, 1986 ; Thompson, 1998). Le taux d'expression de *c-myc* augmente lors du passage des cellules de la phase G1 à la phase S, ce qui indique que la protéine Myc est indispensable au passage des cellules en phase S (Heikkila *et al.*, 1987). De plus, *c-myc* agit au niveau de la transcription de gènes intervenant dans la régulation du cycle cellulaire, comme les protéines kinases cyclines-dépendantes (Cdk) (Obaya *et al.*, 1999), et favorise également la croissance cellulaire en supprimant la transcription de gènes impliqués dans l'arrêt de la croissance cellulaire comme *p21* (Dang *et al.*, 1999b).

L'altération de l'expression de *c-myc* a été étudiée dans de nombreuses cellules tumorales d'origines diverses tels que le cancer du sein, cancer du poumon, lymphome de Burkitt, leucémie myéloïde, ostéosarcomes, glioblastomes... (Nesbit *et al.*, 1999 ; Watanabe *et al.*, 1999). Dans les tissus tumoraux, une sur-expression de *c-myc* est généralement observée, ce qui a permis de montrer qu'une régulation non contrôlée de *c-myc* pouvait conduire à un phénotype tumoral (Nesbit *et al.*, 1999).

Lorsqu'il est dérégulé, Myc est capable d'induire la transformation de différents types cellulaires (CEF : chick embryo fibroblasts, REF : rodent embryo fibroblasts, la lignée cellulaire murine C3H10T1/2...) (Claassen & Hann, 1999). L'activation de *c-myc* ainsi que l'activation du gène *K-ras* sont des conséquences communes des changements génétiques retrouvés dans une grande majorité des cancers. La coopération de ces deux gènes dans la transformation *in vitro* et la cancérogenèse *in vivo*, a plusieurs fois été mise en évidence (Classen & Hann, 1999 ; Watanabe *et al.*, 1999).

Des interactions protéines-protéines peuvent moduler l'activité transformante de Myc. Par exemple, la protéine TRRAP (Transformation/transcription domain-Associated Protein) semble requise pour promouvoir la transformation induite par Myc. Au contraire, la protéine BIN-1 (Box-dependent myc-INTERacting protein ou Bridging Integrator-1) inhibe la transformation cellulaire induite par Myc (Claassen & Hann, 1999). Il a également été montré que Myc activait la transcription du gène *ODC* (Ornithine DéCarboxylase), un gène dont le rôle est essentiel à la prolifération cellulaire, et lié à la prolifération anarchique des cellules pendant le processus de transformation cellulaire

(Auvinen *et al.*, 1992 ; 2003). Myc peut également réprimer l'expression de gènes participant à l'adhésion cellulaire (*LFA-1* (lymphocyte function-associated antigen-1), $\alpha 3 \beta 1$, *Trombospondin...*) ; la régulation négative de ces gènes suppose que Myc peut contribuer à la perte de l'inhibition de contact, un mécanisme caractéristique de la transformation cellulaire (Claassen & Hann, 1999).

2.5.3 Implication de *c-myc* dans l'apoptose

L'implication de *c-myc* dans l'induction du processus apoptotique découverte en 1992 par Evans et ses collaborateurs fût inattendue. *c-myc* est un gène connu pour promouvoir la prolifération cellulaire dans les cellules normales, il n'y avait donc pas lieu de suspecter une relation entre l'apoptose et la prolifération cellulaire.

La lignée cellulaire de fibroblastes Rat-1/*c-MycER* est très utilisée pour l'étude des effets de la sur-expression de Myc sur l'apoptose. Elle est obtenue par la transfection de la lignée cellulaire Rat-1 avec *c-Myc* et le domaine de liaison aux stéroïdes du récepteur aux estrogènes (*Myc-ER*). L'activité de *c-Myc* est dépendante de la présence de 4-hydroxytamoxifène, qui active le récepteur ER (Genestier *et al.*, 1999).

Evans *et al.*, ont montré que la lignée cellulaire de fibroblastes Rat-1 échappe à l'apoptose dans un milieu dépourvu de facteurs de croissance. Par contre, la sur-expression de Myc dans la lignée cellulaire transfectée Rat-1/*c-MycER*, induit l'apoptose dans les mêmes conditions, à savoir, un milieu dépourvu de facteurs de croissance (Evan *et al.*, 1992).

La majorité des travaux a montré que Myc induit l'apoptose dans les lignées cellulaires dans lesquelles il a été transfecté et sur-exprimé. Très peu d'études ont démontré que la régulation négative ou la suppression de l'expression de Myc inhibait l'apoptose (Dong *et al.*, 1997 ; Canelles *et al.*, 1997 ; Genestier *et al.*, 1999 ; Adachi *et al.*, 2001 ; Sarkar *et al.*, 2003). Cependant, cette voie de régulation paraît tout aussi importante dans la compréhension des effets de Myc sur l'apoptose.

La lignée cellulaire UC est une variante de la lignée cellulaire U937, caractérisée par une faible expression de *c-Myc* et une résistance à l'apoptose ; la transfection de Myc dans ces cellules restaure l'apoptose induite par TNF α ou par anti-Fas (Dong *et al.*, 1997).

Il a été montré que, dans les lymphocytes T humains activés, TGF β -1 inhibe l'apoptose et l'expression du ligand FasL, et diminue l'expression de Myc (Genestier *et al.*, 1999) ; au contraire, dans les lymphocytes T transfectés qui sur-expriment c-Myc, l'apoptose et l'expression de FasL ne sont pas inhibées suite au traitement par TGF β -1 (Genestier *et al.*, 1999). De plus, la réduction de l'expression de Myc par l'utilisation d'oligonucléotides antisens dans les cellules U937, supprime l'apoptose induite par l'étoposide, suggérant que la réduction de Myc pourrait contribuer à la résistance à certaines substances utilisées en chimiothérapie (Dong *et al.*, 1997).

Les principales études sur la régulation de l'apoptose par c-*myc* ont montré que Myc pouvait interagir avec :

- **la voie apoptotique mitochondriale**

La sur-expression de c-Myc dans la lignée cellulaire Rat-1/c-MycER et dans les fibroblastes embryonnaires MEF/c-MycER induit la libération du cytochrome *c* et amplifie l'apoptose (Juin *et al.*, 1999 ; Klefstrom *et al.*, 2002).

Dans les cellules normales lutéales de rat, l'augmentation de c-*myc* est un facteur initiateur de l'apoptose induite par le droloxifène et contribue à l'augmentation du gène pro-apoptotique *bax* (Leng *et al.*, 2000). Le promoteur de *bax* possède des sites de liaison E-box-Myc-sequence (EMS) qui suggèrent que Myc peut réguler transcriptionnellement l'expression de *bax* (Mitchell *et al.*, 2000). La perte de *bax* dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF *bax*^{-/-}), implique la perte de la fonction pro-apoptotique de c-Myc (Mitchell *et al.*, 2000 ; Soucie *et al.*, 2001 ; Juin *et al.*, 2002 ; Klefstrom *et al.*, 2002). Cependant la réintroduction du seul domaine BH3 de *bax* en quantité appropriée dans les cellules MEF *bax*^{-/-} semble suffisante à la restauration de l'activité apoptotique de Myc (Juin *et al.*, 2002).

La régulation de *bax* par Myc n'est pas complètement élucidée. Il semble que Myc soit nécessaire pour l'activation de Bax et pour la libération du cytochrome *c* dans la lignée cellulaire Rat-1/c-MycER qui sur-exprime c-*myc* (Soucie *et al.*, 2001).

La transfection de Bcl-2 dans la lignée cellulaire Rat-1/c-MycER, inhibe l'apoptose induite par la sur-expression de c-Myc (Bissonnette *et al.*, 1992 ; Fanidi *et al.*, 1992) et cela sans affecter les propriétés mitogènes de c-Myc, suggérant que l'apoptose et la

prolifération cellulaire sont deux fonctions distinctes de c-Myc (Fanidi *et al.*, 1992). Cependant dans certains tissus épithéliaux, Bcl-2 ne peut bloquer l'apoptose induite par c-Myc (Trudel *et al.*, 1997; Prendergast, 1999).

▪ la voie apoptotique des récepteurs membranaires

La sur-expression de Myc augmente la sensibilité de certains récepteurs de mort cellulaire (comme Fas, TNF, TRAIL...) à l'apoptose (Hueber *et al.*, 1997 ; Pelengaris & Khan, 2003). Myc peut également réguler le ligand Fas des lymphocytes T activés (Brunner *et al.*, 2000). La sur-expression de c-Myc dans la lignée cellulaire transfectée Rat-1/c-MycER, peut également augmenter l'activité de la protéine FADD et de la protéine RIP, deux protéines adaptatrices des récepteurs de mort cellulaire. Dans ces conditions, l'amplification de la voie des récepteurs membranaires dépendante de la caspase-8, est également observée (Klefstrom *et al.*, 2002).

▪ la voie ARF-p53

La sur-expression de Myc peut être liée à l'induction du niveau des protéines P53 et ARF. Dans certains types cellulaires, la transcription de P53 peut être activée par Myc grâce à la région E-box (EMS) présente dans son promoteur. Le signal transmis par Myc à P53 peut également se faire *via* la protéine ARF, qui bloque les fonctions de Mdm2, une protéine impliquée dans la dégradation de P53 (Henrisson *et al.*, 2001).

L'implication de c-myc dans la prolifération cellulaire et dans l'apoptose est paradoxale et complexe.

Au vu des divers résultats obtenus dans la littérature, sur l'implication de Myc dans l'apoptose, il semblerait que les mécanismes de l'induction de l'apoptose par Myc soient fonction du type cellulaire étudiés, puisque l'apoptose induite par c-myc a le plus souvent été observée dans des lignées cellulaires construites génétiquement, de façon à permettre la sur-expression de c-Myc, ce qui se révèle très différent de ce que l'on peut observer dans des cellules normales non génétiquement modifiées.

De plus, c-myc coopère avec de nombreux gènes et protéines impliqués et/ou dans le cycle cellulaire et dans l'apoptose. La régulation de ces protéines par c-myc, est

ANOMALIES	PRINCIPALES TUMEURS & PATHOLOGIES
MUTATIONS	
p53	50% des tumeurs solides Syndrome de Li-Fraumeni
bax	Cancers colorectaux, estomac, hémopathies
bak	Cancers gastriques ou colorectaux
MEFV	Maladie périodique ou fièvre familiale méditerranéenne
Frataxine	Maladie de l'ataxie de Friedrich
Perforine	Lymphohistiocytose hémophagocytaire
DR4, DR5	Cancers du sein métastatique
Fas (CD95)	Hémopathies malignes Syndrome de Canale-Smith (syndrome auto-immun lymphoprolifératif) (type Ia)
Fas-ligand (CD95-L)	Syndrome de Canale-Smith (type Ib)
Caspase-10	Syndrome de Canale-Smith (type II)
Caspase-5	Cancers du colon, de l'estomac, de l'endomètre...
NEMO (IKK γ)	Incontinentia pigmenti
TRANSLOCATIONS CHROMOSOMIQUES	
t(14;18)(q32;q21) - bcl-2	Lymphomes folliculaires
t(11;18)(q21;q21) - IAP2-MLT1	Lymphomes du MALT
t(1;18)(q22;q32) - bcl-10	Lymphomes du MALT
METHYLATION DU PROMOTEUR	
Caspase-8	Neuroblastomes
Apaf-1	Mélanomes métastatiques
TMS1	Cancers du sein

Tableau III : Exemples d'anomalies de gènes régulateurs de la mort cellulaire dans certaines tumeurs et pathologies (d'après Tamm *et al.*, 2001; Solary *et al.*, 2002).

loin d'être complètement élucidée. Il a été montré que de nombreux gènes interagissant avec *c-myc*, contiendraient un élément de réponse à *c-myc* (*E-Box-Myc séquence*).

3 Implication du dysfonctionnement de l'apoptose dans la cancérogenèse et de diverses pathologies

Le maintien de l'homéostasie cellulaire dans les tissus résulte d'un équilibre entre le processus de prolifération cellulaire et la mort cellulaire. Les cellules qui s'engagent dans le processus néoplasique peuvent être caractérisées par des dysfonctionnements des gènes qui contrôlent ces deux processus (ex : *c-myc*, *p53*...). La possibilité d'une association entre ces lésions génétiques, un dysfonctionnement de l'apoptose et la formation de tumeurs, a ouvert de nouveaux axes de recherche concernant le rôle que pourrait tenir l'apoptose dans la prévention des tumeurs (Lyons & Clarke, 1997 ; Lowe & Lin, 2000).

Il est maintenant établi que le dysfonctionnement des mécanismes apoptotiques est impliqué dans la formation de certains cancers ainsi que dans de nombreuses maladies.

Certaines maladies neurodégénératives (chorée de Huntington, maladie de Parkinson...), le SIDA, les hépatites fulminantes virales, les accidents vasculaires cérébraux... résultent de la destruction massive de certaines populations cellulaires, provoquée par un déclenchement inapproprié de l'apoptose (Thompson, 1995 ; Solary *et al.*, 1993 ; 2002). En revanche, le blocage de l'apoptose empêche l'élimination de cellules anormales et contribue à leur prolifération, favorisant ainsi le processus de cancérogenèse (Thompson, 1995 ; Solary *et al.*, 1993 ; Solary *et al.*, 2002).

Des translocations chromosomiques conduisant à la sur-expression de protéines (Bcl-2...), des mutations qui altèrent la séquence codante de gènes pro-apoptotiques (*bax*, *p53*...), la méthylation des promoteurs de gènes régulateurs supprimant l'expression de leur protéines (caspase-8, Apaf-1...) sont associées à certaines tumeurs et pathologies (tableau III).

L'expression des membres de la famille de protéines Bcl-2 est altérée dans de nombreux cancers (tableau III) (Christensen *et al.*, 1999 ; Coultas & Strasser, 2003 ;

Heiser *et al.*, 2004 ; Juin *et al.*, 2004). Le gène suppresseur de tumeur *p53* est muté dans plus de 50% des tumeurs cancéreuses (Fisher, 2001).

Les dernières découvertes concernant l'apoptose ont ouvert de nouvelles perspectives médicales. Différentes stratégies thérapeutiques basées sur les voies d'activation des caspases, la fabrication de molécules modulatrices de l'apoptose (les récepteurs de mort ou leurs ligands), la mise au point d'agents pharmaceutiques capables de réguler ou d'activer des gènes, ou des produits de gènes impliqués dans les processus apoptotiques, sont actuellement très étudiées.

Les substances utilisées en chimiothérapie dans le traitement des cancers peuvent cibler les voies activatrices de l'apoptose. Par exemple, un traitement avec des agents anticancéreux NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drug) comme le sulindac ou l'indométhacine induit l'apoptose dans les cellules tumorales de colon HCT116, avec en parallèle une diminution de la protéine Bcl-x_L (Zhang *et al.*, 2000). Les cellules HCT116 Bax^{-/-} sont complètement résistantes à l'apoptose induite par un traitement avec les NSAIDs, suggérant l'importance du maintien de certaines protéines pro-apoptotiques dans ce genre de traitement (Zhang *et al.*, 2000).

Les expérimentations *in vitro* et *in vivo* sur des souris ont montré que l'utilisation d'oligonucléotides antisens bloquent les ARNm messagers de protéines anti-apoptotiques (par exemple Bcl-2, Bcl-x_L, Survivine, IAPs...) augmentait l'efficacité des traitements anti-cancéreux *via* l'augmentation de l'apoptose (Kiechle & Zhang, 2002 ; Juin *et al.*, 2004). Par exemple, l'utilisation d'ARNm antisens de survivine dans la lignée cellulaire A549 (adénocarcinome de poumon), résulte en la diminution de 70% des ARNm de survivine, avec en parallèle une augmentation de l'activité de la caspase-3, de la condensation de la chromatine nucléaire et de la fragmentation de l'ADN (Olie *et al.*, 2000).

La thérapie génique peut également être utilisée en cancérogenèse dans le but de rétablir le phénotype sauvage de *p53* dans les cellules cancéreuses (Tamm *et al.*, 2001 ; Hofseth *et al.*, 2004).

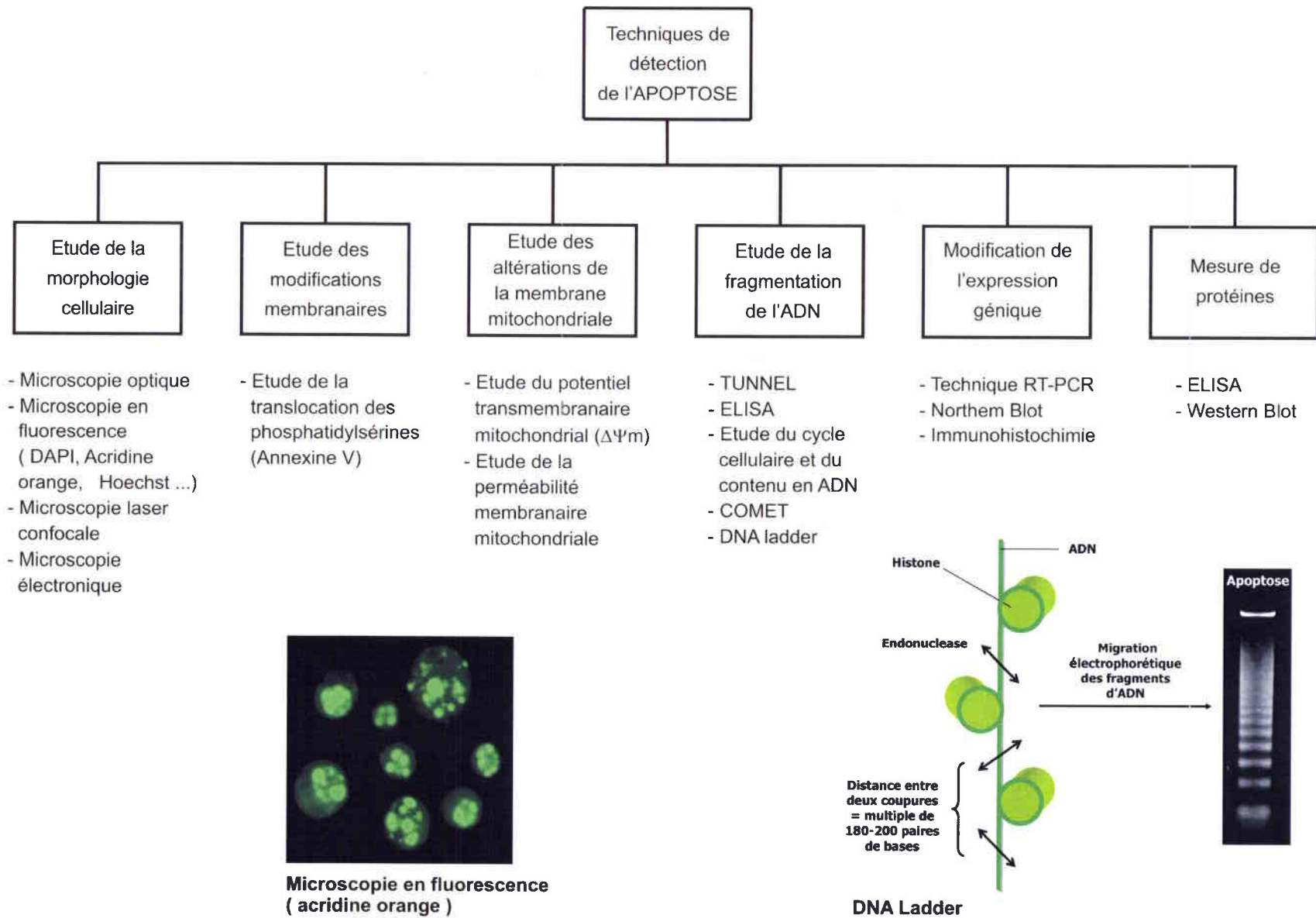


Figure 13 : Principales techniques d'observation et d'étude de l'apoptose.

4 Principales techniques d'observation et d'étude de l'apoptose

La compréhension des mécanismes apoptotiques a contribué au développement de nombreuses techniques permettant la détection de l'apoptose à différents niveaux (Sgonc & Gruber, 1998 ; Gobé & Harnon, 2001 ; Kiechle & Zhang, 2002). Les techniques les plus courantes sont énumérées dans la figure 13.

▪ *Etude de la morphologie cellulaire apoptotique*

Les changements morphologiques typiques, comme le bouillonnement de la membrane cytoplasmique ou la formation des corps apoptotiques peuvent être visualisés en microscopie optique. La condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN peuvent être observées en microscopie à fluorescence après marquage de l'ADN avec des fluorochromes comme l'acridine orange, le DAPI ou le réactif de Hoechst (figure 13) ; seules les cellules viables sont perméables à ces fluorochromes. Un marquage simultané avec le bromure d'éthidium (BET) ou à l'iodure de propidium (IP) permet la détection des cellules en nécrose ou en fin d'apoptose, car ces cellules sont perméables au BET et à l'IP.

▪ *La fragmentation de l'ADN*

Durant l'apoptose, des endonucléases spécifiques Ca^{2+} et Mg^{2+} dépendantes vont cliver l'ADN sur les sites de jonction entre les histones. La longueur des fragments est multiple de 180-200 paires de bases, ce qui correspond à la quantité d'ADN qui entoure une histone. Grâce au maintien de l'intégrité cellulaire, les fragments d'ADN restent localisés dans le milieu intracellulaire.

La fragmentation de l'ADN caractéristique de l'apoptose peut être visualisée après migration des fragments d'ADN sur un gel d'agarose. Un profil de migration de l'ADN en barreau d'échelle appelé « **DNA ladder** » est observé (figure 13).

La fragmentation de l'ADN peut également être mise en évidence par des techniques **ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)** qui permettent la quantification des fragments d'ADN dans le milieu intracellulaire.

La méthode **TUNNEL (TdT-mediated X-dUTP Nick End Labelling)**, est utilisée pour la détection des cassures d'ADN en bout de brin. Ces cassures peuvent être détectées grâce à un marquage enzymatique des extrémités 3'-OH, avec des nucléotides marqués (biotine, digoxigenin (DIG), fluoresceine). Le marquage enzymatique nécessite l'enzyme TdT (déoxynucléotidyl transférase terminale) et l'analyse des cellules marquées se fait, soit en microscopie à fluorescence, soit en cytométrie de flux.

La cytométrie de flux permet de quantifier l'ADN présent dans chaque cellule, et de définir dans quelle phase du cycle cellulaire la cellule se trouve (phase G₁, S, M, G₂). Les cellules en apoptose présentent un contenu en ADN moins important que les cellules normales et peuvent être caractérisées par un pic en pré-G₁. Il est possible de détecter ce pic après marquage de l'ADN.

- ***L'altération de la membrane cellulaire***

Durant l'apoptose, les phosphatidylsérines sont transloquées du cytoplasme vers la surface externe de la membrane cellulaire. L'apoptose peut être mesurée en cytométrie de flux par marquage des phosphatidylsérines à l'Annexine V. L'annexine V appartient à une famille de protéines, qui se lie préférentiellement aux phospholipides chargés négativement, comme les phosphatidylsérines, en présence de Ca²⁺. Les cellules à analyser sont traitées avec un colorant vital, l'iodure de propidium (IP) et avec l'annexine V conjuguée au FITC. Trois populations cellulaires distinctes peuvent être identifiées après analyse en cytométrie de flux : les cellules viables (V⁻,IP⁻), les cellules apoptotiques (V⁺,IP⁻) et les cellules nécrotiques ou en fin d'apoptose (V⁺,IP⁺) (Sgonc & Gruber, 1998).

- ***La mesure de la perméabilité membranaire et du potentiel mitochondrial membranaire ($\Delta\psi_m$)***

La perméabilité membranaire peut être mesurée par chargement de la matrice mitochondriale ou du cytosol avec la calcéïne, un fluorochrome hydrophile qui ne traverse pas la membrane mitochondriale intacte. Les variations du potentiel membranaire ($\Delta\psi_m$) peuvent être mises en évidence par cytométrie de flux à l'aide de sondes cationiques lipophiles fluorescentes comme le [DiOC₆(3)] (3,3'-dihexyloxycarbocyanine), la rhodamine 123 ou le JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-

tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide), en raison d'une fluorescence plus faible des cellules apoptotiques par rapport aux cellules normales (Castedo *et al.*, 2002).

▪ ***La modification de l'expression génique***

Les techniques classiques de biologie moléculaire, comme la RT-PCR, le Northern blotting, ... permettent la mesure de l'expression de gènes impliqués dans la régulation de l'apoptose.

▪ ***La mesure de l'expression de protéines***

De nombreuses protéines sont impliquées dans la régulation de l'apoptose (protéine de la famille Bcl-2, P53, Myc, cytochrome c , AIF...). Le Western blotting, appelé aussi immunoblotting, permet la détection de ces protéines spécifiques grâce à une technique de migration sur gel et l'utilisation d'anticorps spécifiques. Des techniques immuno-histochimiques et ELISA, utilisant des anticorps spécifiques des protéines à analyser, permettent également la détection de ces protéines.

▪ ***La mesure de l'activité des caspases et de leurs substrats***

Le Western blotting est couramment utilisé pour la détection du clivage protéolytique des caspases et de leurs substrats. Pour l'étude quantitative de l'activité des caspases, les techniques ELISA sont préférables ; elles sont basées sur la capacité des caspases à cliver un substrat sur un site spécifique. Le clivage du substrat entraîne une modification de la structure de la caspase qui permettra sa détection.

III. SUBSTANCES ETUDIÉES

Dans le cadre de ce travail sur l'étude des relations entre l'apoptose et la transformation cellulaire, nous avons étudié certains des mécanismes d'action trois substances :

- ♦ le **zinc**, en tant qu'inhibiteur apoptotique.
- ♦ le **di(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP)**, un cancérigène non-génotoxique chez les rongeurs (classé 3 par l'IARC), également connu comme inhibiteur apoptotique.
- ♦ l'**acide 2,4-dichlorophenoxyacétique (2,4-D)**, un cancérigène non-génotoxique (classé 2B par l'IARC).

L'étude bibliographique concernera les trois substances étudiées et leurs propriétés toxicologiques, génotoxiques et cancérigènes, et traitera plus particulièrement de leurs effets sur l'apoptose. Enfin, nous parlerons très brièvement des proliférateurs de peroxyosomes, dont font partie le DEHP et le 2,4-D.

1 Le zinc

Le zinc appartient aux métaux du groupe IIB de la classification périodique des éléments. C'est un élément trace, qui participe activement au maintien de l'intégrité fonctionnelle et structurale de la cellule.

De nombreuses protéines contenant du zinc ont été recensées et la plupart sont des métalloenzymes de type hydratase carbonique, phosphatase alcaline, peptidase ou alcool déshydrogénase. Le zinc joue également un rôle structural important dans un grand nombre de protéines et de facteurs de transcription en doigt de zinc (Zalewski *et al.*, 1993; Vasak *et al.*, 2000).

De ce fait, le zinc intervient dans des phénomènes biologiques aussi divers que la synthèse d'ADN, la régulation hormonale, la réparation des tissus, la lutte contre l'oxydation et la dégradation cellulaire, la stabilisation des microtubules du cytosquelette et de la membrane cellulaire, la mémoire, la vision, ...

La toxicité du zinc est faible (Léonard *et al.*, en 1986 ; IPCS, 2001). Les tests de mutagenèse classique n'ont pas mis en évidence d'effets mutagènes ni d'effets clastogènes du zinc. Le zinc n'est pas tératogène et une supplémentation en zinc peut empêcher la tératogénéicité d'autres métaux. Par contre, une déficience en zinc est tératogène (Léonard *et al.*, 1986).

Le zinc n'est pas considéré comme cancérigène (IPCS, 2001). La formation de tumeurs a toutefois été observée lors d'injection de zinc à forte dose ou lors d'application locale sur des tissus (Léonard *et al.*, 1986). Il a également été montré qu'un déficit en zinc retardait la croissance des cellules cancéreuses (Léonard *et al.*, 1986 ; IPCS, 2001). Les propriétés transformantes *in vitro* du zinc ont également été démontrées (Isfort *et al.*, 1996).

Effet du zinc sur l'apoptose

De nombreux auteurs ont rapporté le rôle du zinc dans l'inhibition du processus apoptotique (Sunderman, 1995 ; Seve *et al.*, 2002 ; Truong-tran *et al.*, 2001). Il a été démontré que :

- ♦ l'ajout de zinc dans le milieu de culture de cellules (cellules SHE, cellules prémonocytiques U937, cellules de Jurkat, lignée ML-1, HL60...) inhibe l'apoptose induite par divers stimuli chimiques (étoposide, peroxyde d'hydrogène, ricin...), physiques (rayonnement ultra-violet...) ou biologiques (TNF α , privation des facteurs de croissance...) (Alexandre *et al.*, 2000a ; Alexandre *et al.*, 2003 ; Fukamachi *et al.*, 1998 ; Seve *et al.*, 2002 ; Tamura *et al.*, 2002 ; Ganju & Eastman, 2003).
- ♦ la déplétion en zinc ou la chélation du zinc par des chélateurs, type TPEN (N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)éthylène diamine), induit l'apoptose *in vivo* (Jankowski-Henning *et al.*, 2000) et *in vitro* (Sunderman, 1995 ; Nakatani *et al.*, 2000 ; Kolenko *et al.*, 2001). L'apoptose induite par une déficience en zinc se traduit par les changements morphologiques typiques de l'apoptose, tels que la fragmentation nucléaire, la condensation de la chromatine et la formation des corps apoptotiques.

Le zinc exercerait ses effets anti-apoptotiques par les mécanismes suivants :

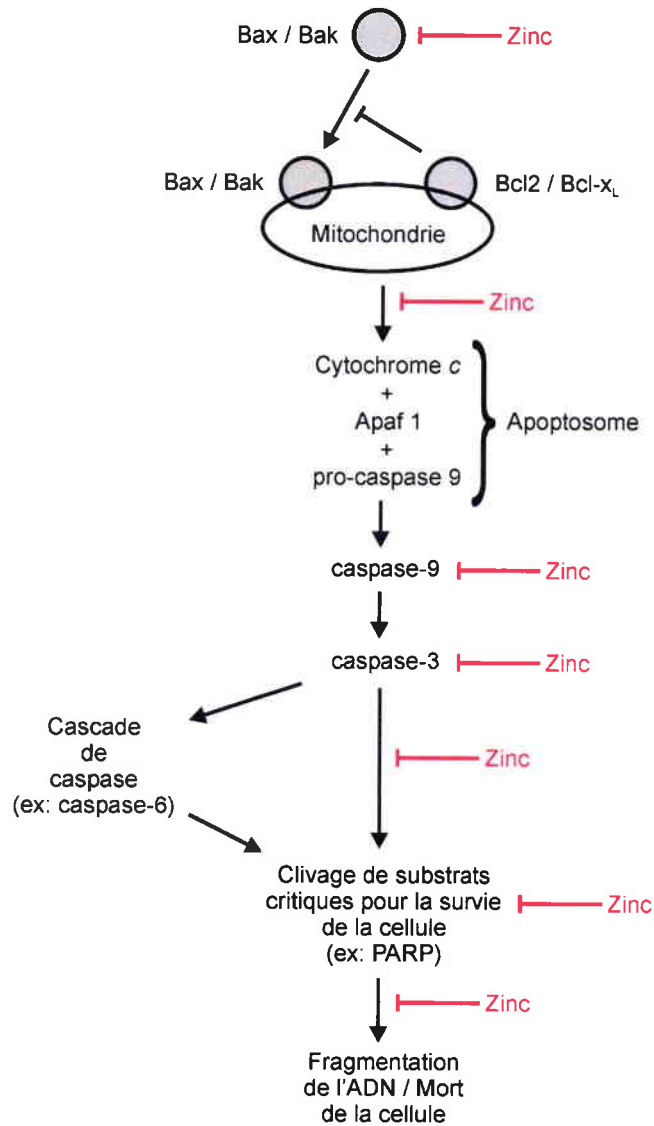


Figure 14 : Cibles cellulaires et mécanismes pouvant être inhibés par le zinc lors de l'apoptose impliquant la voie apoptotique mitochondriale.

▪ interaction avec certains régulateurs de l'apoptose

Les premiers travaux concernant l'inhibition de l'apoptose par le zinc ont rapporté que le zinc supprimait la fragmentation de l'ADN induite par l'apoptose en **inhibant les endonucléases calcium-dépendantes** (Cohen & Duke, 1984).

Plus récemment, il a été démontré que l'inhibition des endonucléases était une cible secondaire et que le zinc pouvait intervenir dans les phases précoces de l'apoptose, en amont de la fragmentation de l'ADN (Perry *et al.*, 1997b).

Le zinc exerce ses effets anti-apoptotiques en agissant sur différents compartiments cellulaires : le noyau (ex : les endonucléases $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ dépendantes...), le cytosol (ex : caspases...), les microtubules ou la mitochondrie (ex : les protéines Bax, Bcl-2, Bak, le cytochrome *c*...) (figure 14) (Cohen & Duke, 1984 ; Perry *et al.*, 1997b ; Fukamachi *et al.*, 1998 ; Tamura *et al.*, 2002 ; Ganju & Eastman, 2003).

L'apoptose induite par un stress chimique (ricin, étoposide, peroxyde d'hydrogène...) peut être inhibée par un ajout de zinc dans le milieu de culture ; dans ces conditions, des modifications de l'expression des **protéines mitochondriales de la famille Bcl-2** peuvent être observées (Fukamachi *et al.*, 1998 ; Ganju & Eastman, 2003). En 1998, Fukamachi *et al.*, ont montré que le zinc inhibe l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) dans la lignée cellulaire U937 en diminuant le ratio des protéines Bax/Bcl-2. De plus, l'inactivation par le zinc des protéines Bak et Bax dans les cellules ML-1 apoptotiques, empêche la libération du cytochrome *c* ainsi que toutes les étapes suivantes de l'apoptose (Ganju & Eastman, 2003).

Le zinc interagit également au niveau du processus protéolytique et de l'activation de certaines **caspases**. Le zinc bloque le mécanisme d'activation de la caspase-3 (Perry *et al.*, 1997b ; Chai *et al.*, 1999). Les caspase-8 et caspase-9, qui agissent en amont de la caspase-3 et participent à son activation, peuvent également être inhibées par le zinc (Chimienti *et al.*, 2001 ; Tamura *et al.*, 2002).

Une fois inactivées, ces caspases sont incapables de cliver leurs substrats. Ainsi, l'inhibition de la protéolyse de la PARP-1, une enzyme substrat de la caspase-3, est observée dans différents types cellulaires (Molt4, HL60, SHE...) suite à l'ajout de zinc dans le milieu de culture (Perry *et al.*, 1997b ; Alexandre *et al.*, 2000a). La caspase-6 intervient dans le clivage des lamines (par exemple, des protéines de l'enveloppe

nucléaire), une étape importante conduisant à la fragmentation de l'ADN. L'inhibition de la caspase-6 par le zinc pourrait contribuer à l'inhibition des changements morphologiques apoptotiques.

D'autre part, au moins deux études ont rapporté que le zinc interagissait avec **des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et/ou de prolifération cellulaire**. En 2000, Chai *et al.*, ont montré que la déplétion en zinc par le TPEN dans trois types de lignées cellulaires différentes (LIM1215, NCI-H292 et A549) conduisait à l'activation de la caspase-3 et au clivage de la protéine P21^{waf1/Cip1}. La perte de P21 induit l'activité de cdk2 et provoque l'entrée prématurée en phase S du cycle cellulaire ainsi que l'induction de l'apoptose (Chai *et al.*, 2000). Dans les cellules SHE cultivées en l'absence de facteurs de croissance, l'apoptose survient rapidement, et une diminution de l'expression du gène *c-myc* est observée ; l'ajout de zinc dans le milieu de culture rétablit l'expression de *c-myc* et inhibe l'apoptose induite par la privation des facteurs de croissance (Alexandre *et al.*, 2002).

▪ protection contre le stress oxydatif

La supplémentation de zinc protège la cellule des dommages induits par les substances réactives de l'oxygène (oxyradicaux). Au contraire, la déplétion en zinc dans les cellules 3T3 induit un stress oxydatif (Oteiza *et al.*, 2000). De plus, les effets du TPEN dans les cellules AEC (Airway Epithelial cells) et dans les lignées cellulaires A549 et NCI-H292 (human lung epithelial cell lines) peuvent être diminués de 50-60% si les cellules sont préalablement traitées avec des antioxydants, type vitamine E, vitamine C (Truong-Tran *et al.*, 2001). En 2000, Nakatani *et al.*, ont également montré que la chélation du zinc intracellulaire par le TPEN induit l'apoptose dans les hépatocytes de rat en culture avec en parallèle une activation de la caspase-3 et une diminution du taux intracellulaire de glutathion réduit (GSH). Ces effets sont supprimés par un ajout de zinc, mais également par un ajout de N-acetyl-L-cystéine (i.e. précurseur du glutathion), ce qui suggère que l'augmentation de la caspase-3 en réponse à la déplétion en zinc peut être reliée à la chute du taux de glutathion.

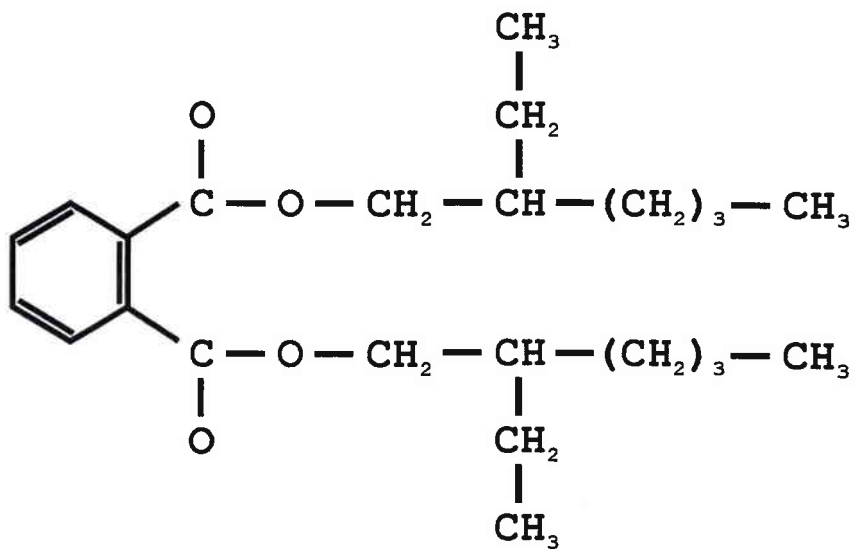


Figure 15 : Formule chimique di(2-éthylhexylphthalate) (DEHP)

2 Le DEHP et le 2,4-D : deux proliférateurs de peroxysomes

2.1 Le di(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP)

Le DEHP est un composé de la famille des phtalates (figure 15). Il est essentiellement utilisé comme plastifiant dans la fabrication des matières PVC (polychlorure de vinyle). On le retrouve dans de nombreux produits comme les revêtements de sol, les jouets, les dispositifs médicaux, les emballages alimentaires... Il a été montré que l'homme ingérait jusqu'à 30 µg/kg de poids corporel/jour de DEHP en tant que contaminant alimentaire (McKee *et al.*, 2004). Lors d'une exposition orale, le DEHP est hydrolysé par des estérases et conduit à la synthèse du mono-(2-ethylhexyl) phtalate (MEHP), son métabolite le plus toxique.

Comme la plupart des proliférateurs de peroxysomes, le DEHP est non-génotoxique puisqu'il répond négativement à tous les tests de mutagenèse et de cytogénétique classique (test d'Ames, test micronoyaux, locus HGPRT, synthèse non-programmée de l'ADN, aberrations chromosomiques, échange de chromatides sœurs...) (IPCS, 1992 ; Doull *et al.*, 1999).

Le DEHP, longtemps classé 2B par l'IARC, a récemment été reclassé en groupe 3, c'est-à-dire non-cancérigène chez l'homme (IARC, 2000). De nombreuses études *in vivo* chez les rongeurs ont confirmé le caractère hépatocancérogène du DEHP (recensées dans Doull *et al.*, 1999).

Deux mécanismes ont été proposés pour expliquer les effets de l'hépatocancérogenèse induite par le DEHP chez les rongeurs :

- ♦ l'induction de la prolifération des peroxysomes.
- ♦ l'augmentation de la prolifération des hépatocytes et de la synthèse de l'ADN associée à la suppression de l'apoptose (James *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 1998 ; Hasmall *et al.*, 1999 ; Goll *et al.*, 1999 ; Roberts *et al.*, 2002 ; Boitier *et al.*, 2003 ; Roberts *et al.*, 2004).

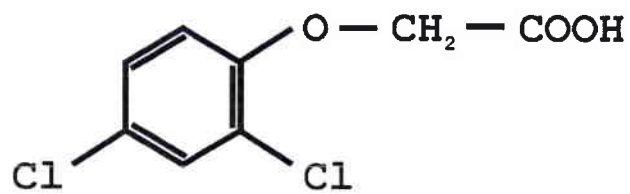


Figure 16 : Formule chimique et propriétés chimiques de l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)

La suppression de l'apoptose par le DEHP a été observée dans plusieurs systèmes cellulaires *in vitro* dont les cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE) (Dhalluin *et al.*, 1997) et les cellules de Sertoli (Kang *et al.*, 2002) et dans les hépatocytes de rongeurs *in vivo* et *in vitro* (James *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 1998 ; Hasmall *et al.*, 1999 ; Goll *et al.*, 1999 ; Roberts *et al.*, 2002 ; Boitier *et al.*, 2003 ; Roberts *et al.*, 2004).

D'autres mécanismes sont également considérés comme des facteurs de la cancérogenèse induite par le DEHP et indépendants de la prolifération des peroxyosomes, comme l'induction de la transformation morphologique des cellules SHE (Mikalsen *et al.*, 1993 ; Tsutsui *et al.*, 1993 ; Cruciani *et al.*, 1999) et l'inhibition des communications intercellulaires (Mikalsen *et al.*, 1993 ; Kang *et al.*, 2002).

Le DEHP est également incriminé comme perturbateur endocrinien et comme toxique sur la reproduction, susceptible d'entraîner des troubles de la reproduction et du développement (Okubo *et al.*, 2003 ; Latini *et al.*, 2004). Les effets du DEHP sur le système reproducteur ont essentiellement été étudiés sur les rongeurs (rats et souris). Les effets du DEHP et de son métabolite principal, le MEHP, sont majoritairement testiculaires (cellules de Sertoli) et ovariens (cellule de la granulosa) (Hoyer, 2001 ; Latini *et al.*, 2004). Dans de nombreux cas, l'ingestion par voie orale de DEHP conduit à des anomalies du système reproducteur et à l'atrophie testiculaire chez les mâles.

En effet, il a été montré que le DEHP intensifiait le processus apoptotique qui a lieu durant la spermatogenèse et qui permet l'élimination des cellules germinales surnuméraires ou non-fonctionnelles (Richburg *et al.*, 2000) *via* l'activation de la voie des récepteurs de mort (système Fas/FasL) (Lee *et al.*, 1999 ; Ichumira *et al.*, 2003 ; Kijima *et al.*, 2004).

2.2 L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D)

L'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (2,4-D) est un herbicide employé depuis une cinquantaine d'années sur les plantes à larges feuilles et également utilisé comme régulateur de croissance (figure 16). La toxicité de cet herbicide reste un sujet très étudié, de par ses effets cancérogènes et génotoxiques qui restent ambigus.

Le 2,4-D ne s'est pas révélé mutagène sur des cultures de cellules de mammifères lors des essais de cytogénétique (aberrations chromosomiques) et de mutagenèse (locus HGPRT) (Gollapudi *et al.*, 1999). Les essais de mutations reverses sur mutants bactériens (test d'Ames) et de tests de synthèse non programmée de l'ADN se sont eux révélés négatifs (Charles *et al.*, 1999a). Aucune augmentation significative des micronoyaux n'a été observée suite au traitement par le 2,4-D ou de ses dérivés (Charles *et al.*, 1999b). Cependant, les études concernant la synthèse non programmée de l'ADN, l'induction d'aberrations chromosomiques et l'échange de chromatides sœurs, restent controversées, du fait de résultats contradictoires (Kaioumova et Khabutdinova, 1998 ; Amer & Aly, 2001 ; Madrigal-Bujaidar *et al.*, 2001).

Le 2,4-D induit la prolifération des peroxysomes. Chez les rongeurs ce mécanisme est lié à l'hépatocarcinogénèse. Suite aux études menées sur le potentiel cancérogène du 2,4-D, l'IARC a classé le 2,4-D comme cancérogène 2B (IARC, 1991).

A fortes doses (100 à 300 mg/kg de poids corporel), le 2,4-D induit chez les mammifères (rats, souris, lapins, chiens, moutons, bovins, ...) des hépatites toxiques sub-aiguës responsables entre autre de nécroses locales, de la dégénérescence et de l'atrophie des hépatocytes. Un régime de 2 ans (0-300 mg/kg/jour) chez les rongeurs et chez le chien n'a montré aucun effet oncogénique (Charles *et al.*, 1996a ; Charles *et al.*, 1996b ; Garabrant & Philbert, 2002). Cependant, des études épidémiologiques tendent à montrer qu'il existerait une corrélation entre l'exposition au 2,4-D et l'augmentation de tumeurs malignes, mais les résultats restent insuffisants pour être significatifs (WHO, 1984 ; Garabrant & Philbert, 2002).

Il a été montré que la toxicité du 2,4-D pouvait être renforcée par la présence d'adjuvants dans les formulations commerciales (Holland *et al.*, 2002). En 2000, une étude de Oakes & Pollack sur des fractions mitochondriales de rat (essai SMP SubMitochondrial) a démontré que 50% de la toxicité de trois formulations commerciales de 2,4-D était due à la présence de ces adjuvants.

La présence d'impuretés, notamment de dibenzo-*p*-dioxines polychlorées, qui apparaissent lors de la synthèse des herbicides chlorophénoxylés est également un facteur important de leur toxicité (WHO, 1984 ; Oakes & Pollack, 1999 ; Holland *et al.*, 2002 ; Arias, 2003). L'exemple le plus marquant est sans doute celui de l'herbicide Agent

<i>IN VIVO</i>	CONCENTRATIONS	ANIMAUX	EFFECTS	REFERENCES
Formulation commerciale de 2,4-D "Gexan" (500 g/L DMA-2,4-D)	1.14 - 228 mg/kg	Rats Wistar (organes lymphoïdes)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Destruction de l'intégrité vasculaire du thymus ▪ Induction de la fragmentation de l'ADN dans les thymocytes ▪ Augmentation de la cytotoxicité <i>via</i> une augmentation de l'apoptose. 	Kaioumova <i>et al.</i> , 2001
<i>IN VITRO</i>	CONCENTRATIONS	TYPES CELLULAIRES	EFFETS	REFERENCES
commerciale de 2,4-D (500 g/L DMA-2,4-D)	1 - 5 mM (221 – 1105 µg/mL)	Lymphocytes humains et cellules de Jurkat cells	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Augmentation de l'apoptose détectée par la méthode TUNNEL et le DNA ladder ▪ Modification du potentiel mitochondrial membranaire ▪ Activation de la caspase-9 ▪ La transfection des cellules de Jurkat avec Bcl-2 inhibe l'apoptose induite par le 2,4-D 	Kaioumova <i>et al.</i> , 2001
2,4-D (?)	1 & 2 mM (221 – 442 µg/mL)	Cellules cérébrales granulaires	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Augmentation de l'apoptose détectée par la méthode TUNNEL ▪ Libération du cytochrome <i>c</i> ▪ Augmentation de la caspase-3 	De Moliner <i>et al.</i> , 2002
2,4-D (pure)	4, 8, 16 mM (884 – 3536 µg/mL)	HepG2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Augmentation de l'apoptose détectée par la méthode TUNNEL et l'Annexine V ▪ Modification du potentiel mitochondrial membranaire 	Tuschl & Schwab, 2003

Tableau IV : Principales études concernant les effets du 2,4-D sur l'apoptose

Orange, dont plus de 72 millions de litres ont été répandus sur plus de 3,6 millions d'hectares pendant la guerre du Vietnam dans le but de détruire toute la végétation (Nham Tuyet & Johansson, 2001). L'Agent Orange était constitué d'un mélange égal de 2,4-D et de 2,4,5-T, un herbicide chlorophénoxyolé également classé 2B par l'IARC. Ce mélange était fortement contaminé par des dioxines, notamment la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxine (TCDD), classée cancérigène 1 par l'IARC. En plus des conséquences écologiques catastrophiques, l'Agent Orange est la cause de l'apparition de forts taux de cancers dans la population vietnamienne (maladie de Hodgkin, lymphomes non-hodgkiniens, cancer de la prostate, des poumons, des bronches, du larynx, de la trachée...) (Frumkin, 2003) mais aussi responsable d'effets tératogènes importants (malformations congénitales, retard mental, mortalité infantile, ...) qui sont imputés à la TCDD (Nham Tuyet & Johansson, 2001).

Effets du 2,4-D sur l'apoptose

De fortes concentrations de 2,4-D (formulations commerciales ou matière active) (1-16 mM) se sont révélées induire l'apoptose dans divers types cellulaires *in vitro* (lymphocytes humains, cellules HepG2, cerebral granule cells) et *in vivo* (organes lymphoïdes) (tableau IV) (Kaioumova *et al.*, 2001a ; Kaioumova *et al.*, 2001b ; De Moliner *et al.*, 2002 ; Tuschl & Schwab, 2003). Dans leur étude, Kaioumova *et al.*, ont démontré que l'apoptose induite par le 2,4-D était indépendante de la voie apoptotique des récepteurs de mort (Fas et TNFR1) et du récepteur des hydrocarbures aromatiques polycycliques (récepteur Ah). Il semblerait que l'apoptose induite par le 2,4-D implique préférentiellement la voie apoptotique mitochondriale puisque la chute du potentiel mitochondrial membranaire ($\Delta\psi_m$), la libération du cytochrome *c*, l'activation de la caspase-3 et la fragmentation de l'ADN (tableau IV) ont été observées suite à un traitement avec le 2,4-D (Kaioumova *et al.*, 2001a ; Kaioumova *et al.*, 2001b ; De Moliner *et al.*, 2002 ; Tuschl & Schwab, 2003). DiPaolo *et al.*, ont également montré que le 2,4-D formait un adduit avec une protéine de 52 kDa de la membrane mitochondriale interne, suggérant que cet adduit était à l'origine de l'altération des fonctions mitochondriales

CATEGORIES	COMPOSES
Agents thérapeutiques /hypolipémiants	Gemfibrozil Clofibrate Ciprofibrate Fenofibrate WY-14,643 Nafénopin Méthyl clofénapate BR-931
Agents plastifiants	Di(2-éthylhexyl) phtalate (DEHP) Di(2-éthylhexyl) adipate (DEHA) Di- <i>n</i> -butyl phtalate (DBP)
Herbicides	Lactofen Fomesafen Acide 2,4-dichlorophénoxy acétique Acide 2,4,5-trichlorophénoxy acétique
Solvants et produits industriels	Trichloroéthylène (TCE) Perchloroéthylène Paraffines chlorées
Stéroïdes	Déhydroepiandrostérone (DHEA)
Arômes alimentaires et produits naturels	Citral Linalol Cinnamyl antranilate

Tableau V : Exemple de composés chimiques qui provoquent la prolifération des peroxyosomes hépatiques chez les rongeurs (d'après Corton *et al.*, 2000)

(DiPaolo *et al.*, 2001). Il a été avancé qu'à ces fortes doses, le 2,4-D exerçait sa toxicité *via* une induction de l'apoptose (Kaioumova *et al.*, 2001a ; Tuschl & Schwab, 2003).

A notre connaissance, aucune donnée pouvant suspecter une inhibition de l'apoptose par le 2,4-D n'a été rapportée.

2.3 Les proliférateurs de peroxysomes

Les peroxysomes sont des organites cellulaires retrouvés dans la plupart des espèces animales et dont la principale fonction métabolique est l'oxydation- β des acides gras et la synthèse du cholestérol (Corton *et al.*, 2000).

Les proliférateurs de peroxysomes hépatiques (HPPs) constituent une classe de substances chimiques, pour la plupart non-génotoxiques et cancérigènes chez les rongeurs (Corton *et al.*, 2000). Les HPPs incluent des agents thérapeutiques, hypolipémiants, des agents plastifiants, des herbicides, des stéroïdes, des solvants et des produits industriels, des arômes alimentaires et produits naturels... (tableau V). Les proliférateurs de peroxysomes induisent l'augmentation du nombre et/ou du volume des peroxysomes dans les hépatocytes de rongeurs. Ceci est associé à des altérations hépatiques incluant une augmentation du poids du foie (hypertrophie des hépatocytes et hyperplasie) corrélée à l'augmentation des enzymes hépatiques impliquées dans le métabolisme des acides gras (Corton *et al.*, 2000).

Chez les rongeurs, l'administration prolongée de la plupart des HPPs conduit à l'apparitions de tumeurs hépatiques (Corton *et al.*, 2000). Comme les proliférateurs de peroxysomes et leurs métabolites ne sont pas directement génotoxiques, différents mécanismes ont été proposés pour expliquer la cancérogenèse induite par ces substances chez les rongeurs :

- **L'altération du contrôle de la croissance des hépatocytes par l'augmentation de la prolifération cellulaire et/ou la suppression de l'apoptose** (James *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 1998 ; Hasmall *et al.*, 1999 ; Christensen *et al.*, 1999 ; Goll *et al.*, 1999 ; Roberts *et al.*, 2002 ; Boitier *et al.*, 2003 ; Roberts *et al.*, 2004).

L'augmentation de la prolifération cellulaire par les HPPs (le trichloroéthylène, le WY-14,643, l'acide dichloroacétique, l'acide trichloroacétique, ...) chez les rongeurs est le plus souvent corrélée à l'augmentation de l'expression de gènes régulateurs de la croissance cellulaire, comme *c-myc* et *c-jun* (Belury *et al.*, 1998 ; Tao *et al.*, 2000).

▪ **L'augmentation des dommages à l'ADN *via* l'induction du stress oxydant.**

La prolifération des peroxysomes altère l'équilibre entre la production et la dégradation des peroxydes, et conduit à l'apparition de substances réactives de l'oxygène, comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). En l'absence de HPPs, H_2O_2 est éliminé par la catalase, une enzyme peroxysomale ; en présence de HPPs, un excès de H_2O_2 peut être à l'origine de l'altération structurale et métabolique de certaines molécules dont la molécule d'ADN, et pourrait également contribuer à l'initiation du processus néoplasique (Seo *et al.*, 2004).

La plupart des effets pléiotropiques des proliférateurs de peroxysomes sont liés aux récepteurs PPAR (PPAR α , PPAR β , PPAR γ) (Peroxisome Proliferator-activated Receptors) (Keller *et al.*, 2000). Succinctement, les PPs activent les récepteurs PPAR, qui s'hétérodimérisent avec un autre récepteur, le récepteur RXR (retinoid X receptor) et se lient à l'élément de réponse spécifique à l'ADN, PPRE, localisé dans les promoteurs de gènes régulés par les PPs (Roberts *et al.*, 2004).

PPAR-RXR + séquence régulatrice PPRE \rightarrow \uparrow ARNm des gènes régulés par PPs

En absence de récepteur PPAR α (souris PPAR $^{-/-}$), les proliférateurs de peroxysomes sont incapables d'induire la synthèse de l'ADN, la prolifération des peroxysomes ou des tumeurs hépatiques. La suppression de l'apoptose par les proliférateurs de peroxysomes dans les hépatocytes de rongeurs est également corrélée à l'activité du récepteur PPAR α (Roberts *et al.*, 1998 ; Hasmall *et al.*, 2000). Dans les hépatocytes PPAR α $^{-/-}$, l'apoptose spontanée ou induite par TGF β 1 ne peut être inhibée suite à un traitement par les proliférateurs de peroxysomes (Hasmall *et al.*, 2000).

Cependant même si la plupart des HPPs induisent des effets hépatotoxiques, tous n'induisent pas systématiquement des effets hépatocancérogènes, c'est le cas du DBP [di-n-butyl phtalate] ou du BBP [n-butylbenzyl phtalate] (Seo et al., 2004).

**MATERIELS
ET METHODES**

Substances	Formule	Masse moléculaire	N° CAS	Origine	Solubilité	Activité
Chlorure de zinc	ZnCl ₂	136,3	7646-85-7	Merck	Eau	Métal du groupe IIB, inhibiteur apoptotique
Camptothécine	C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₄	348,4	7689-03-4	Sigma-Aldrich	DMSO	Inhibiteur des topoisomérases de type I, inducteur apoptotique
DEHP (di(2-ethylhexyl phtalate))	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390,6	117-81-7	Aldrich (99% de pureté)	DMSO	Plastifiant, proliférateur de peroxysomes hépatiques
2,4-D (acide 2,4-dichloro phenoxy acétique)	C ₈ H ₂ Cl ₂ O ₂ Na, H ₂ O	221,0	2702-72-9	Sigma (98% de pureté)	Eau	Herbicide, proliférateur de peroxysomes hépatiques
BaP (Benzo(a)pyrene)	C ₂₀ H ₁₂	252,3	50-32-8	Sigma-Aldrich	DMSO	Inducteur d'adduits à l'ADN, inducteur apoptotique
Fomesafen	C ₁₅ H ₁₀ ClF ₃ N ₂ O ₆ S	438,5	72178-02-0	don de Luz ORFILA	Eau	Herbicide, diphenylether proliférateur de peroxysomes hépatiques, inhibiteur apoptotique

Tableau VI : Caractéristiques générales des substances étudiées.

B. MATÉRIELS et MÉTHODES

I. PRODUITS CHIMIQUES UTILISÉS

Les caractéristiques générales des substances que nous avons utilisées sont présentées dans le tableau VI. Les concentrations utilisées sont notées ci-dessous.

	Concentrations	
	$\mu\text{g/mL}$	μM
BaP	0,1	0,4
	1	4
	10	40
Camptothécine	0,4	1,2
2,4-D	1	4,5
	2,5	11,3
	5	22,6
DEHP	3,9	10
	9,75	25
	19,5	50
Fomesafen	5	11,4
	10	22,8
Chlorure de zinc	13,6	100
	17	125
	20,4	150

II. CULTURE CELLULAIRE

1 Milieu de culture

Le milieu utilisé pour la culture des cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE) est le milieu DMEM (Dubelcco's modified Eagle's medium) préparé sans rouge

phénol (Invitrogen/Gibco) (Annexe 2) auquel on ajoute 2 g/L de NaHCO_3 (Sigma) afin que le pH du milieu soit de 7. Le milieu est ensuite filtré sur une membrane de porosité de 0,2 μm et conservé pendant 3 semaines au maximum à 4°C.

Pour la mise en culture des cellules, le milieu DMEM est complété avec 12% de sérum de veau fœtal (Hyclone), 1% d'une solution d'antibiotiques à 5 mg/mL de Streptomycine et 5000 IU/mL de Pénicilline (Invitrogen/Gibco) et 0,2% de d'antimycotiques Fungizone®, une solution d'Amphotéricine B à 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Invitrogen/Gibco). On appellera ce milieu « le milieu complet ».

2 Les cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE)

Les cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE) sont préparées dans notre laboratoire selon la méthode décrite par Pienta (1977) et modifiée par Elias (1989). Cette méthode consiste à prélever les embryons de femelles de hamster Syrien à leur treizième jour de gestation.

Les embryons prélevés sont séparés de façon à garder plusieurs lots distincts de cellules embryonnaires. Les embryons sont rincés avec du PBS (137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 8,1 mM Na_2HPO_4 ; 14,7 mM KH_2PO_4 ; 5H₂O ; pH 7,4).

Les tissus déjà différenciés comme les yeux, le cœur et les viscères sont retirés. Les embryons sont ensuite découpés finement et puis digérés avec une solution de dispase à 2 U/mL (10 mL) (Invitrogen/Gibco). La digestion se fait sous agitation à 37°C pendant 10 minutes.

Le surnageant cellulaire de cette première digestion est éliminé puis la fraction tissulaire est de nouveau soumise à deux digestions successives par 25 mL de dispase (2 U/mL).

Les surnageants de ces deux dernières digestions sont récupérés et filtrés sur gaze stérile, ce qui permet l'élimination des petits fragments tissulaires non digérés. L'action de la dispase est stoppée par l'ajout de milieu complet.

Chaque filtrat est ensuite centrifugé (1000g, pendant 10 minutes). Les culots cellulaires sont remis en suspension dans du milieu complet.

Les cellules viables sont comptées grâce au test d'exclusion au bleu trypan, un colorant ne marquant que les cellules perméables, donc mortes. Les cellules sont ensuite

ensemencées (4.10^6 cellules) dans des boîtes de Pétri (\varnothing 10 mm) (Corning) et mises à incuber dans une étuve thermostatée à 37°C , 10% de CO_2 et saturée en humidité. Le milieu de culture est renouvelé toutes les 24 heures.

Quand le tapis cellulaire est à confluence (en général, 48 à 72 heures après l'ensemencement), les cellules sont rincées avec du Tampon PBS. Le tapis cellulaire est dissocié à l'aide d'une solution de trypsine (Invitrogen/Gibco), en solution à 0,25% (w/v) dans du PBS (5 minutes au maximum à 37°C). Les cellules sont à nouveau centrifugées à $250g$ pendant 10 minutes afin d'éliminer toutes traces de trypsine et remises en suspension dans du milieu complet.

Elles sont ensuite congelées à raison de $1,5.10^6$ cellules par tube dans un milieu de congélation (milieu DMEM complété avec 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO ; Prolabo) et 10% de SVF). La congélation se fait par paliers progressifs : $\frac{1}{2}$ heure à 4°C , 4 heures à -20°C et une nuit à -80°C . Puis, elles sont mises dans de l'azote liquide (-170°C) et peuvent être conservées au maximum deux ans.

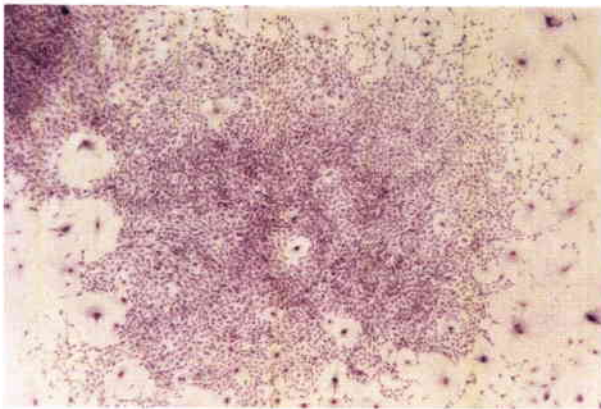
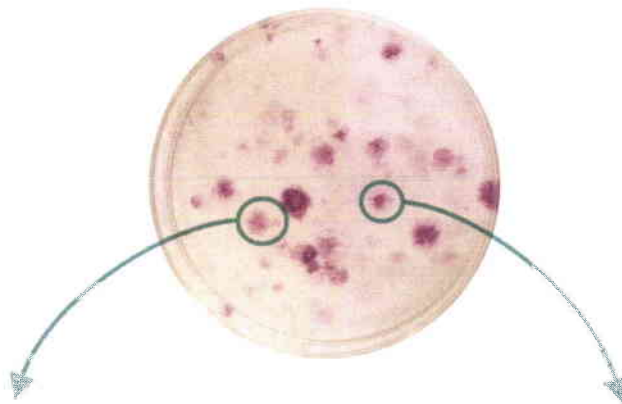
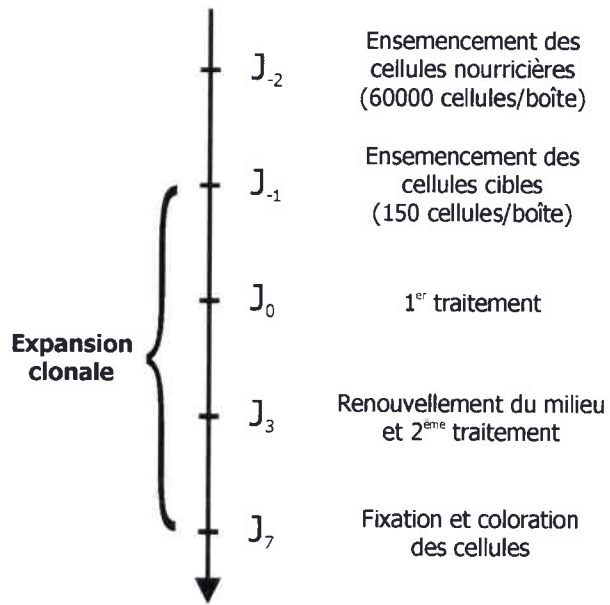
Les cellules sont testées par un ou deux repiquages (culture primaire et secondaire, respectivement) afin de limiter les phénomènes de dédifférenciation *in vitro*.

Le passage des cellules correspond à une trypsinisation, c'est-à-dire, une dissociation enzymatique du tapis cellulaire par la trypsine (0,25% dans du PBS). Lors de nos essais, les cellules ont été utilisées jusqu'à leur troisième passage au maximum, c'est-à-dire qu'elles ont subi au maximum trois trypsinisations.

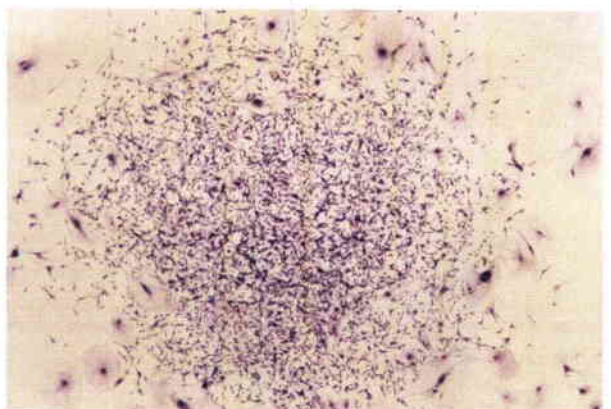
III. ESSAIS DE TRANSFORMATION CELLULAIRE *IN VITRO*

Ce essai à court terme consiste à étudier la morphologie des colonies de cellules, ensemencées en densité clonale, qui se sont développées pendant les sept jours de clonage, et au cours desquels, les cellules ont été exposées à l'une des substances étudiées.

Les cellules utilisées pour les essais de transformation cellulaire sont les cellules embryonnaires de hamster Syrien. Chaque lot cellulaire obtenu précédemment, correspondant chacun à un embryon, est testé pour évaluer l'efficacité de clonage (EC) et la transformation morphologique (Tf) induite par $1 \mu\text{g/mL}$ ($4 \mu\text{M}$) de benzo(a)pyrène



Colonie normale



Colonie transformée

Figure 17 : Protocole simplifié des essais de transformation morphologique des cellules SHE.

(BaP), une substance couramment utilisée comme témoin positif lors des essais de transformation cellulaire, classée cancérigène 2A par l'IARC.

Les lots de cellules qui présentent à la fois, les meilleurs taux pour la transformation cellulaire et l'efficacité de clonage sont utilisés pour servir de stock de cellules cibles pour les essais de transformation cellulaire.

Une partie des lots de cellules non-utilisés est irradiée (5000 rads). L'irradiation a été réalisée dans le service de radiothérapie de la clinique Claude Bernard à Metz. Ces cellules sont stockées dans l'azote liquide à raison de $10 \cdot 10^6$ par cryotube et serviront de stock de cellules nourricières. Suite à l'irradiation, ces cellules sont incapables de se diviser, mais vont fournir des facteurs nutritifs, nécessaires au bon déroulement du clonage des cellules cibles.

1 Protocole des essais de transformation cellulaire

Généralement, 10 boîtes de Pétri (\varnothing 60 mm) sont utilisées par concentration testée. Le milieu de culture utilisé est le milieu DMEM complété avec 12% de SVF, 1% d'une solution d'antibiotiques (ampicilline et streptomycine) et 0,2% d'antimycotiques (amphotéricin B).

Dans le cadre de cette thèse, les substances suivantes ont été testées :

- ♦ Le chlorure de zinc.
- ♦ Le 2,4-D, un cancérigène non-génotoxique, classé 2B par l'IARC.
- ♦ Le Benzo(a)pyrène, un cancérigène non-génotoxique, classé 2A par l'IARC, utilisé comme témoin positif lors des essais de transformation cellulaire.

A J₋₂, on procède à l'ensemencement de 60000 cellules nourricières par boîte de Pétri dans un volume de 2 mL de milieu de culture (figure 17).

A J₋₁, un volume de 2 mL contenant 150 cellules cibles, est utilisé pour ensemercer chaque boîte contenant déjà les cellules nourricières.

Dans le cas de cellules pré-traitées avec le zinc, la solution de ZnCl₂ est diluée extemporanément dans le milieu de culture, et est appliquée dès l'ensemencement des

cellules cibles à J₋₁.

À J₀, la substance à tester est appliquée dans un volume de 4 mL. Parallèlement, une série de boîtes traitées avec le BaP (1 µg/mL) servira de contrôle positif de la transformation cellulaire. Une série de boîtes sera également traitée avec le DMSO (0,02%), le témoin solvant utilisé pour nos essais avec le fomesafen et le BaP.

À J₃, le milieu culture est ôté et l'on procède à une seconde application de la substance à tester (4 mL). Les concentrations de la substance testée et des témoins, sont identiques à celles appliquées à J₀.

À J₇, le milieu est ôté et les boîtes sont rincées avec du PBS. Les cellules sont ensuite fixées à l'éthanol absolu pendant 10 minutes puis colorées au Giemsa (solution de bleu azur-éosine-bleu de méthylène) (10% dans l'eau MilliQ) pendant 20 minutes.

2 Etude quantitative de la transformation cellulaire morphologique

Les colonies transformées sont différenciées des colonies normales, par une croissance anarchique des cellules. Les cellules transformées sont caractérisées par un enchevêtrement et une superposition des cellules. Ces cellules présentent également une augmentation du ratio noyau/cytoplasme, ainsi qu'une augmentation de la basophilie, qui confère à la colonie une couleur sombre, après coloration avec le Giemsa.

Dans le but d'une évaluation quantitative de la transformation cellulaire (Tf), de l'efficacité de clonage (EC) et par conséquent de la toxicité des produits testés, deux indices sont utilisés (DiPaolo, 1980) :

- **le taux de transformation (Tf)** : il correspond au pourcentage du rapport du nombre de colonies transformées sur le nombre de colonies formées. Il permet d'évaluer la capacité d'une substance testée à transformer des colonies présentant un phénotype normal en colonies présentant un phénotype néoplasique.

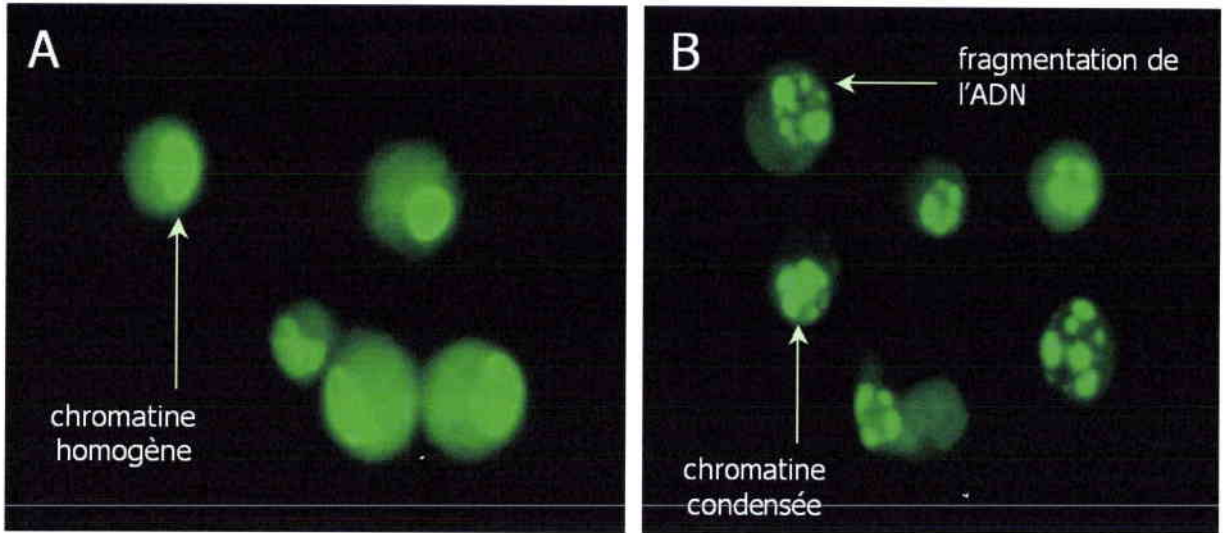


Figure 18 : Observation en microscopie à fluorescence (495 nm) des cellules SHE marquées à l'acridine orange. La photo A correspond à des cellules normales présentant une chromatine homogène. La photo B correspond à des cellules apoptotiques présentant une chromatine condensée et une fragmentation nucléaire.

- **l'efficacité de clonage (EC)** : elle correspond au pourcentage du rapport du nombre total de colonies obtenues sur le nombre de cellulesensemencées. Elle est exprimée en pourcentage. L'efficacité de clonage permet d'évaluer la capacité des cellules à former des colonies sur un milieu intoxiqué ou non.

Le test statistique utilisé pour l'analyse des résultats est un test statistique du χ^2 .

IV. DETECTION DE L'APOPTOSE

1 Etude de la morphologie des cellules en apoptose

Cette technique permet d'évaluer de façon quantitative l'apoptose dans les cellules SHE, après marquage de la chromatine des cellules avec des fluorochromes, acridine orange (Molecular Probes) et bromure d'éthidium (Sigma).

Pour le traitement, 2.10^6 cellules pour chaque concentration testée, sont mises en culture dans des boîtes de Pétri (\varnothing 60 mm) dans du milieu DMEM complété avec 5% de sérum. Après traitement, le milieu de culture est gardé de façon à récupérer les cellules qui se seraient décollées pendant le traitement. Les cellules sont récupérées par trypsinisation, et sont centrifugées à $1000g$ pendant 10 minutes. Le culot est ensuite remis en suspension dans du tampon PBS. L'étude des caractéristiques morphologiques de l'apoptose dans les cellules est réalisée en microscopie à fluorescence à 495 nm, après marquage de la suspension cellulaire par un mélange de fluorochromes : acridine orange ($150 \mu\text{g}/\text{mL}$) et de bromure d'éthidium ($250 \mu\text{g}/\text{mL}$). Les cellules viables ne sont perméables qu'à l'acridine orange et présentent une coloration verte de leur noyau. Les cellules mortes ou en fin d'apoptose sont perméables au bromure d'éthidium et présentent une coloration rouge de leur noyau. Les cellules non apoptotiques sont caractérisées par une chromatine homogène tandis que les cellules apoptotiques sont caractérisées par une chromatine condensée et/ou une fragmentation nucléaire (figure 18).

Le taux d'apoptose est exprimé par le pourcentage de cellules présentant une morphologie apoptotique sur le total de cellules comptées. Chaque lecture est réalisée en

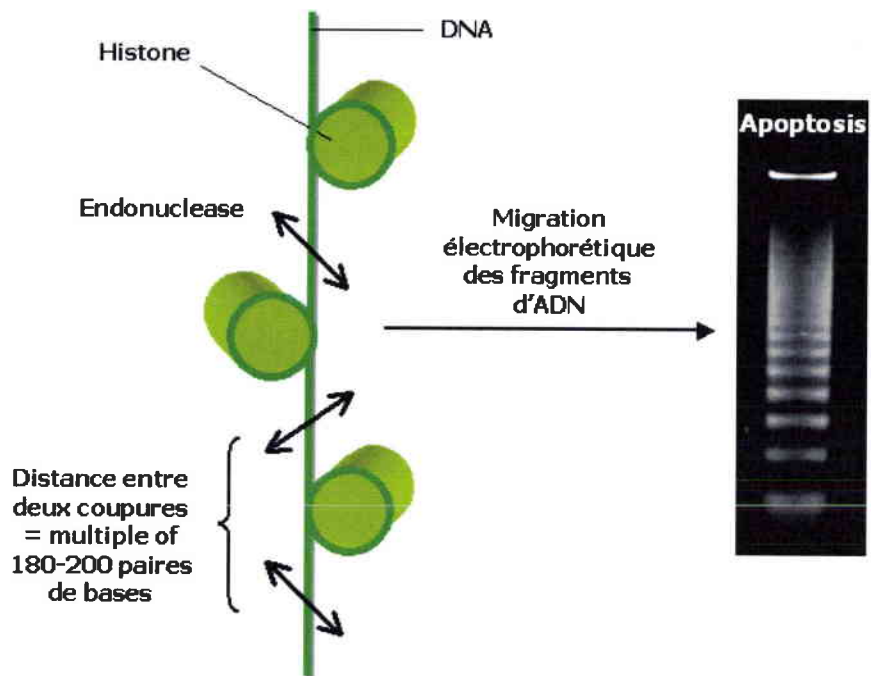


Figure 19 : Profil électrophorétique des fragments d'ADN apoptotiques (DNA ladder).

triplicat, et vérifiée par au moins trois essais.

2 DNA ladder

La fragmentation internucléosomiale de l'ADN par des endonucléases spécifiques, reste un des marqueurs les plus utilisés pour la mise en évidence de l'apoptose. Elle engendre des fragments multiples de 180-200 pb, ce qui donne en électrophorèse un profil en barreau d'échelle (DNA ladder) (figure 19). Ceci différencie l'apoptose de la nécrose qui induit une fragmentation aléatoire de l'ADN.

Les cellules (7.10^4 cellules par concentration testée) sont mises en culture dans des boîtes de Pétri (\varnothing 60 mm) dans du milieu DMEM complété avec 5% de SVF. Après traitement, le milieu de culture est récupéré. Les cellules sont grattées dans du tampon PBS. Le milieu de culture et les cellules sont centrifugés à 1000g pendant 10 minutes. La purification de l'ADN total (ADN fragmenté et ADN non fragmenté) est réalisée à l'aide du kit de détection « suicide track » (Oncogene) selon les instructions du fournisseur. La composition exacte des solutions du kit n'est pas indiquée par le fabricant.

L'ADN est extrait des cellules par un tampon de lyse fournit avec le kit. Après dégradation des ARN et isolation de l'ADN, l'ADN est précipité rapidement à l'isopropanol grâce à un co-précipitant (Pellet Paint®). Le mélange est ensuite centrifugé à 15000g pendant 10 minutes. Le culot d'ADN obtenu est lavé avec de l'éthanol à 75% puis remis en suspension dans le tampon de resuspension fourni avec le kit. L'ADN est mis à migrer sur un gel d'agarose (1,5% (w/v)) contenant 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromure d'éthidium dans le tampon TAE (Tris-Acetate-EDTA : 121,5 g Tris base ; 28,5 mL d'acétique glacial ; 100 mL d'une solution EDTA à 500 mM, pH 8 ; 1 litre d' H_2O). L'ADN de haut poids moléculaire ainsi que l'ADN fragmenté sont visualisés par une exposition sous les ultra-violets (UV).

V. ETUDE DE L'EXPRESSION DES GENES *BCL-2*, *BAX* ET *C-MYC* EN RT-PCR

La méthode en RT-PCR (Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction) permet d'analyser le taux d'ARNm spécifique d'un gène étudié. Cette technique consiste à rétrotranscrire de l'ARNm en sa séquence codante d'ADN (ADNc). Une fois la séquence d'ADNc obtenue, elle est amplifiée par PCR (Polymerase Chain Reaction), une technique d'amplification enzymatique *in vitro*. L'amplification est réalisée par une série de cycles de réplication faisant intervenir un couple d'amorces spécifiques du gène étudié et doit permettre d'obtenir une quantité d'ADN suffisante pour l'analyse de l'expression du gène étudié. Les gènes que nous avons étudiés lors de cette étude sont les gènes *bcl-2*, *bax* et *c-myc*.

1 Traitement des cellules SHE

Les cellules sont mises en culture, à raison $2 \cdot 10^6$ cellules par boîte de Pétri (\varnothing 60 mm) dans du milieu DMEM complété avec 5% ou 10% de SVF, selon les substances testées. Les substances à étudier sont diluées extemporanément dans le milieu de culture. Après traitement, le milieu de culture est ensuite récupéré. Les cellules sont grattées dans du tampon PBS à l'aide d'un grattoir préalablement trempé dans une solution 4M de guanidine thiocyanate (GATC) (Euromedex), qui empêche l'action des RNase. Le tout est récupéré puis centrifugé à $1000g$ à $4^{\circ}C$ pendant 10 minutes. Les cellules sont remises en suspension dans $100 \mu L$ de GATC puis congelées à $-80^{\circ}C$ en vue d'une utilisation ultérieure.

2 Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux se fait par une extraction au phénol-chloroforme. Afin de lyser les cellules, on ajoute à chaque échantillon cellulaire récupéré $300 \mu L$ d'Extract All (Eurobio), un produit à base de phénol. Les échantillons sont lysés pendant 5 minutes à température ambiante, puis $80 \mu L$ de chloroforme sont ajoutés au lysat

cellulaire. Le mélange est vortexé pendant 15 secondes puis centrifugé (12000g, 10 minutes, 4°C). On distingue trois phases :

- ♦ une phase translucide correspondant aux ARN.
- ♦ une phase blanche correspondant à l'ADN.
- ♦ une phase rose correspondant aux protéines.

La phase supérieure translucide contenant les ARN est récupérée et on y ajoute un volume équivalent d'isopropanol (200 µL). On laisse précipiter les ARN pendant 30 minutes à température ambiante. Les échantillons sont ensuite centrifugés (12000g, 5 minutes, 4°C). Le culot est lavé dans 400 µL d'éthanol 75% et passé au vortex. On procède à une nouvelle centrifugation à 12000g pendant 5 minutes. Le culot contenant les ARN est séché à l'air puis repris dans 20 µL d'une solution de diéthyl pyrocarbonate (DEPC ; Sigma) à 0,1%, qui protège de l'action des RNAses.

3 Dosage et vérification de l'intégrité des ARN totaux

Afin de déterminer la quantité d'ARN que l'on récupère, on procède à un dosage spectrophotométrique. Les échantillons sont dilués dans de l'eau DEPC (1/200). Deux dosages sont effectués à deux densités optiques différentes :

- ♦ un dosage à 260 nm correspondant au dosage des ARN.
- ♦ un dosage à 280 nm correspondant au dosage des protéines.

On considère que l'ARN récupéré est pur si le rapport de la $DO_{260\text{ nm}}/DO_{280\text{ nm}}$ est supérieur ou égal à 1,8. Sachant qu'une unité de DO à 260 nm correspond à 40 µg/mL d'ARN, on déduit la concentration en ARN récupéré. La concentration en ARN des échantillons est alors ajustée à 0,5 µg/µL dans de l'eau DEPC, ce qui constitue la concentration minimale requise pour les étapes d'amplifications ultérieures.

L'intégrité des ARN totaux obtenus est vérifiée par une électrophorèse sur un gel à 1% d'agarose dans du tampon TAE contenant 0,1 µg/mL de bromure d'éthidium (BET). A 2 µL d'échantillon d'ARN sont ajoutés 10 µL de tampon de charge spécifique aux ARN (solution de colorant bleu au xylène cyanol dans 5% de glycérol), nécessaire à la migration.

4 La transcription reverse (RT)

La transcription reverse est réalisée à l'aide du Kit d'amplification " Gene Amp " (P.E. France). La réaction nécessite 2 μL d'échantillon ARN et s'effectue dans un volume de 20 μL . L'amorce Oligo d(T) utilisée lors de la réaction de transcription reverse permet de rétrotranscrire uniquement les ARNm.

Réactifs	Solutions stocks	Concentrations finales	Volume/20 μL
Tampon PCR	10 x	1 x	2 μL
MgCl₂	25 mM	5 mM	4 μL
dGTP	10 mM	1 mM	2 μL
dATP	10 mM	1 mM	2 μL
dCTP	10 mM	1 mM	2 μL
dTTP	10 mM	1 mM	2 μL
Inhibiteur de RNase	20 U/ μL	1 U/ μL	1 μL
Reverse Transcriptase MuL V	50 U/ μL	2,5 U/ μL	1 μL
Amorces Oligo d(T)	50 μM	2,5 μM	1 μL
Echantillon	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	25 ng/ μL	2 μL
H₂O DEPC (0,1%)			1 μL

Le programme du thermocycleur pour la Reverse Transcription est constitué de trois étapes :

- ♦ une étape d'hybridation des amorces et de transcription de l'ADNc de 30 minutes à 42°C.
- ♦ une étape de dénaturation des enzymes de 5 minutes à 99°C.
- ♦ une étape de refroidissement et de conservation des échantillons à 4°C.

A la suite de ce programme, l'ADNc est prêt à être utilisé pour la réaction PCR. Les échantillons peuvent être conservés à -20°C en vue d'une utilisation ultérieure.

5 La réaction PCR (Polymérase Chain Reaction)

L'amplification de l'ADNc par PCR est également réalisée à l'aide du Kit d'amplification "Gene Amp" (PE France). La réaction s'effectue dans un volume de 40 μL .

Les quantités de réactifs sont concentrées deux fois puisque l'on tient compte des dilutions que l'on effectuera en rajoutant les amorces spécifiques du gène étudié, l'échantillon d'ADNc et l'eau milliQ. La solution de réactifs nécessaires à la PCR sera appelée Mix-PCR.

Mix PCR	Solutions stocks	Concentrations finales	Volume/20 μ L
Tampon PCR	10 x	2 x	4 μ L
MgCl₂	25 mM	4 mM	3,2 μ L
dGTP	10 mM	0,4 mM	0,8 μ L
dATP	10 mM	0,4 mM	0,8 μ L
dCTP	10 mM	0,4 mM	0,8 μ L
dTTP	10 mM	0,4 mM	0,8 μ L
AmpliTaq DNA polymérase	5 U/ μ L	0,05 U/ μ L	0,2 μ L
H₂O			9,4 μ L

Réactifs	Solutions stocks	Concentration finale	Volume/40 μ L	
Mix PCR	2 x	1 x	10 μ L	} Mélange pour l'amplification du 1er gène pendant X cycles, puis le programme PCR est stoppé pendant l'étape 2
Amorces 1er gène	10 μ M	0,25 μ M	1 μ L + 1 μ L	
H₂O			6 μ L	
Echantillon			2 μ L	
Mix PCR	2 x	1 x	10 μ L	} Mélange pour la co-amplification du 2nd gène, ajouté pendant l'arrêt du programme PCR pendant l'étape 2
Amorces 2nd gène	10 μ M	0,25 μ M	1 μ L + 1 μ L	
H₂O			8 μ L	

Le programme du thermocycleur pour la PCR est constitué de quatre étapes dont l'étape 2 est répétée X fois suivant le protocole expérimental choisi :

- ♦ **Etape 1** : une phase de dénaturation de 5 minutes à 94°C.
- ♦ **Etape 2** (répétée X fois suivant le protocole utilisé) :
 - une phase de dénaturation de 30 secondes à 94°C.
 - une phase d'appariement des amorces de 30 secondes à 55°C.
 - une phase d'élongation de 30 secondes à 72°C.
- ♦ **Etape 3** : une phase d'élongation finale de 5 minutes à 72°C.
- ♦ **Etape 4** : conservation des échantillons à 4°C.

Gènes	Séquences nucléidiques	Taille des produits PCR	Nombre de cycles	T°C d'hybridation des amorces	N° d'accession EMBL-EBI
<i>bcl-2</i>	5'-TAT-AAG-CTG-TCA-CAG-AGG-GGC-3' 5'-TGG-ATC-CAG-GTG-TGC-AGA-TGC-3'	500 bp	35	60°C	AJ582074
<i>bax</i>	5'-TCC-ACC-AAG-AAG-CTG-AGC-GAG-3' 5'-CCA-TCT-TCT-TCC-AGA-TGG-TGA-3'	411 bp	40	55°C	AJ582075
<i>c-myc</i>	5'-GAT-CAG-CTG-SAG-ATG-RTG-ACC-3' 5'-TTG-CGG-TTG-TTG-CTG-ATC-TG-3'	734 bp	40	60°C	AJ582076
<i>actine</i>	3'-GGA-YGA-YAT-GGA-GAA-RAT-CTG-G-5' 3'-CCT-GYT-TGC-TGA-YCC-ACA-TCT-G-5'	845 bp	33 (<i>bcl-2</i>) 28 (<i>bax</i>)	60°C (<i>bcl-2</i>) 55°C (<i>bax</i>)	
<i>gapdh</i>	5'-TCC-ATG-ACA-ACT-TTG-GCA-TCG-TGG-3' 5'-GTT-GCT-GTT-GAA-GTC-ACA-GGA-GAC-3'	377 bp	30	60°C	

Tableau VII : Caractéristiques des amorces utilisées pour les étapes de PCR.

Il est nécessaire de réaliser en parallèle de l'amplification de l'ADNc une co-amplification d'un gène exprimé de manière constitutive (gène de la β -actine pour *bcl-2* et *bax* ou de la *gapdh* pour *c-myc*). Cette co-amplification sert de témoin interne pour les réactions d'amplification. Cependant, le nombre de cycles variant pour les deux gènes co-amplifiés, il faut en tenir compte lors de la programmation du thermocycleur. Pour cela, le gène qui nécessite le plus grand nombre de cycles sera amplifié en premier. Dans un premier temps, seules les amorces spécifiques au gène amplifié seront ajoutées au Mix-PCR et à l'échantillon. Suivant le nombre de cycles désirés pour l'amplification du second gène, le thermocycleur est stoppé lors de l'étape 2 et l'on y ajoute les amorces spécifiques.

Les séquences et les conditions d'amplification des gènes étudiés, sont précisées dans le tableau VII. Les gènes que nous avons étudiés, n'ayant pas été séquencés chez le hamster Syrien, nous avons choisi des amorces spécifiques en comparant les séquences chez d'autres espèces de hamsters, le rat, la souris, l'homme... dans les banques de données en ligne (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>), et nous avons privilégié des zones bien conservées entre les espèces. Les amorces proviennent de chez Invitrogen (France).

L'ADN spécifique amplifié est mis en évidence par une électrophorèse sur gel d'agarose (1% dans un tampon TAE) contenant 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de bromure d'éthidium (BET). 10 μL d'échantillon PCR sont ajoutés à 2 μL de tampon de charge spécifique à l'ADN (solution de colorant bleu au xylène cyanol dans 50% de glycérol) et nécessaire à la migration. Parallèlement, on fait migrer un marqueur de taille (Euromedex) qui nous permet d'évaluer la taille en paire de bases des produits PCR obtenus. La migration des produits PCR est révélée sous UV et photographiée.

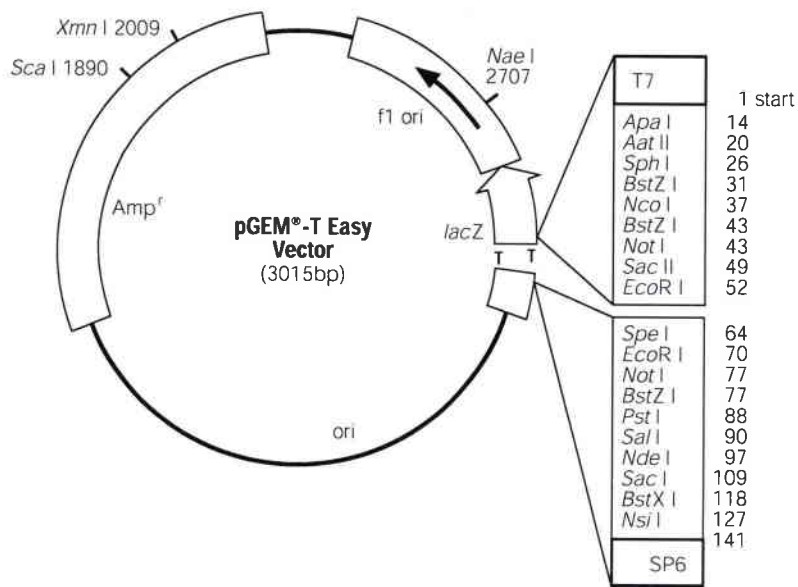


Figure 20 : Vecteur pGEM®-T Easy utilisé pour les étapes de clonage.

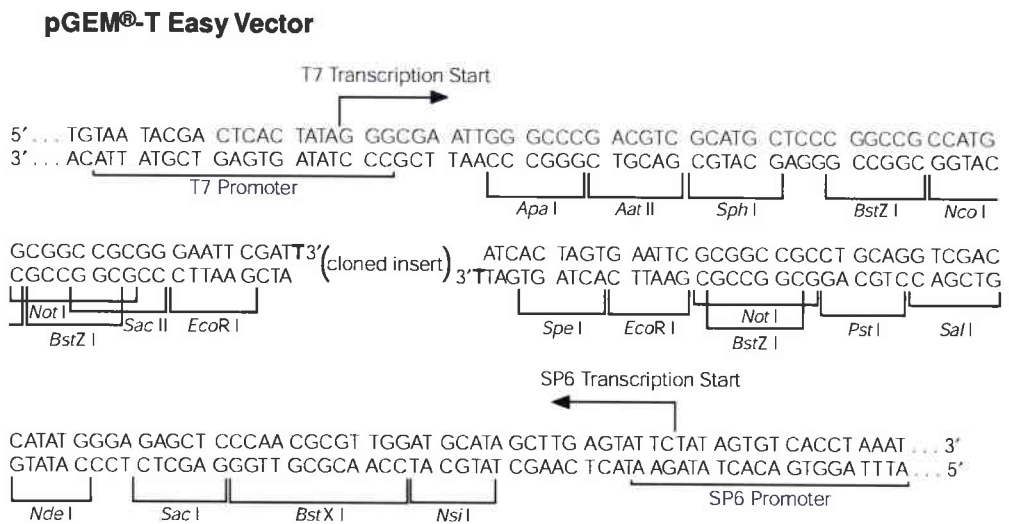


Figure 21 : Promoteur du vecteur pGEM®-T Easy.

VI. SEQUENÇAGE DES GENES CODANT POUR LES PROTEINES BCL-2, BAX ET C-MYC

1 Clonage

Les étapes de clonage sont réalisées à l'aide du kit pGEM[®]-T Easy Vector system (Promega).

Ce plasmide (figures 20 et 21) est préparé par le fournisseur par coupure du plasmide circulaire pGEM avec l'enzyme EcoRV et l'addition d'un T (Thymidine) à chaque extrémité terminale 3'. Les 3'-T saillants au site d'insertion augmentent l'efficacité de la ligation des produits PCR dans le plasmide

- ♦ en évitant la recircularisation du plasmide sur lui-même.
- ♦ en générant des extrémités cohésives adaptées aux produits PCR. En effet, lorsque les produits PCR sont destinés à être clonés, le programme de la PCR se termine par une élongation de 10 minutes à 72°C. Ces 10 minutes supplémentaires permettent à la Taq polymérase de générer naturellement des extrémités Adénine protubérantes. Ces extrémités Adénine protubérantes permettent le clonage dans le vecteur pGEM[®]-T Easy Vector.

Une première étape de ligation consiste à lier le produit PCR au plasmide. 3 µL de produit PCR sont mis en présence de 5 µL de tampon de ligation (Rapid Ligation Buffer), d'1 µL de T4 DNA ligase et de 50 ng de pGEM[®]-T Easy Vector. Le volume est complété à 10 µL. Le mélange est incubé pendant 1 heure à 37°C. A l'issue de l'incubation, un aliquot de 2 µL de produit de ligation est mis en présence de 200 µL de bactéries thermocompétentes (E.Coli, JM109). Le mélange est incubé pendant 30 minutes dans la glace, 50 secondes à 42°C puis de nouveau 5 minutes dans la glace. Le choc thermique permet l'insertion du plasmide dans la bactérie. On ajoute ensuite 200 µL de LB (Luria-Bertani, 1 L H₂O, 10 g de peptone, 5 g d'extrait de levure, 5 g NaCl). Le mélange est homogénéisé et 100 µL sont étalés sur milieu LB solide complémenté avec 100 µg/mL d'ampicilline, et d'une solution d'IPTG/Xgal (100 mM Isopropyl-β-D-

thiolgalactopyranoside (IPTG) et 50 mM 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside, 100 mM (Xgal)). Les boîtes sont placées à 37°C pour la nuit.

L'insertion du produit PCR se fait dans la région du gène codant pour la β -galactosidase. Cette enzyme qui produit une coloration bleue en présence de Xgal est inactivée par cette insertion. Les clones possédant l'insert seront identifiés par une coloration blanche alors que les clones qui ne possèdent pas l'insert seront bleus.

Pour une dizaine de clones recombinés, un quart de la colonie est prélevé. Une PCR est effectuée directement sur les colonies prélevées de façon à s'assurer de la présence du plasmide recherché.

Les clones répondant positivement à la PCR sont placés dans du milieu liquide (LB, complété avec 70 μ g/mL d'ampicilline), puis placés sous agitation à 37°C pendant une nuit. L'ADN va être extrait d'une partie de la culture et être utilisé pour le séquençage. L'autre partie est stockée à -80°C dans du glycérol à 80% (v/v) en cas de besoin pour une utilisation ultérieure.

2 Extraction et purification des ADN plasmidiques

Cette étape permet l'extraction et la purification de l'ADN plasmidique des clones recombinants à l'aide du kit GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma). La méthode consiste en une lyse alcaline en présence de SDS, suivie d'une étape d'adsorption de l'ADN sur une colonne comportant une membrane de silice. Toutes les étapes se déroulent à température ambiante. La composition exacte des solutions n'est pas indiquée par le fabricant du kit.

Une partie de chaque culture (1,5 mL) contenant les plasmides des clones recombinants est centrifugée à 12000g pendant 5 minutes à 4°C. Les surnageants sont éliminés et les culots sont resuspendus dans une solution de resuspension/RNase A (200 μ L). Les cellules sont ensuite lysées avec une solution de lyse (200 μ L) par inversion lente (5 à 10 fois) pendant 5 minutes au maximum. Une solution de neutralisation (350 μ L) est ajoutée et le mélange est homogénéisé par inversion lente pendant 10 secondes puis laissé dans la glace pendant 3 minutes. L'homogénat est ensuite centrifugé (12000g, 10 minutes, 4°C). Les débris cellulaires, les protéines, les lipides, l'ADN chromosomique vont être précipités. Le surnageant est récupéré, transféré sur une

colonne GenElute™ Miniprep et centrifugé (12000g, 1 minute, 4°C). Les plasmides sont alors retenus sur la couche de silice de la colonne. La colonne est ensuite lavée avec une solution de lavage (750 µL) pendant 5 minutes puis centrifugée (12000g, 1 minute, 4°C) afin d'éliminer toutes éventuelles contaminations. La colonne est ensuite recentrifugée pendant 2 minutes à 12000g afin d'éliminer toute trace d'éthanol. Une fois la colonne séchée, l'ADN plasmidique est élué avec un tampon d'éluion (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) (100 µL) grâce à une centrifugation (12000g, 1 minute, 4°C). L'ADN plasmidique se trouve maintenant dans l'éluat et est prêt pour le séquençage. L'éluat peut également être conservé à -20°C en vue d'une utilisation ultérieure. Le séquençage de l'ADN est effectué par Genome Express (Meylan, France), grâce aux amorces universelles T7 et Sp6.

La recherche d'homologies entre les séquences obtenues a été effectuée à l'aide du programme FASTA (Pearson & Lipman, 1988) sur les banques de données disponibles en ligne (<http://www.infobiogen.fr>). Les alignements de séquences ont été recherchés à l'aide des programmes ClustalW.

Un numéro d'accèsion EMBL (<http://www.ebi.ac.uk>) a été attribué aux séquences obtenues. Ces numéros sont notés dans le tableau VII (page 59).

VII. ETUDE DE L'EXPRESSION DES PROTEINES BCL-2 ET BAX PAR IMMUNOBLOTTING

1 Traitement des cellules

Les cellules SHE sont mises en culture, à raison $5 \cdot 10^6$ cellules par boîte de Pétri (Ø 100 mm) dans du milieu DMEM complété avec 5% de SVF. Les substances à étudier sont diluées extemporanément dans le milieu de culture.

2 Extraction et dosage des protéines

Après traitement, le milieu de culture et les cellules sont récupérés par grattage et

centrifugés à 1000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot cellulaire est rincé dans du tampon phosphate (PBS) puis à nouveau centrifugé à 1000g pendant 10 minutes à 4°C. Le culot ainsi récupéré est remis en suspension dans du tampon de lyse (50 mM Tris base ; 1 mM EDTA ; 0,2 mM PMSF ; 200 mM NaCl ; 0,1% SDS ; 1% Triton X-100 ; 0,5 µg/mL leupeptine ; 1 µg/mL pepstatine A). (Tous ces produits proviennent de chez Sigma, excepté le SDS et le Tris base qui proviennent de chez Euromedex). Le mélange est mis à incuber pendant 45 minutes dans la glace, puis centrifugé à 10000g pendant 30 minutes à 4°C, permettant ainsi la clarification du lysat cellulaire. Les protéines ainsi récupérées peuvent être conservées à -80°C.

Les protéines sont ensuite dosées à l'aide du kit DC Protein Assay (Biorad), basé sur la méthode de Lowry de dosage des protéines.

3 Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

L'électrophorèse en conditions dénaturantes permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire grâce au sodium dodécyl sulfate (SDS), un agent dénaturant. La concentration protéique de chaque échantillon déposé est ajustée de façon à déposer la même quantité de protéine dans chaque puits. Pour l'analyse de la protéine Bax, un dépôt de 15 µg est nécessaire tandis que pour l'analyse de la protéine Bcl-2, un dépôt de 30 µg est requis.

Chaque échantillon protéique est mélangé à un tampon de charge (1:2 ; v/v) contenant du SDS (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 ; glycérol 20% ; SDS 2% ; bleu de bromophenol 0,003% ; β-mercaptoethanol 5%). Ce tampon de charge dénature les protéines et leur confère une charge négative. Les échantillons sont portés à ébullition (100°C) dans un bain-marie pendant 4 minutes.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide (Ready Precast Gel, Biorad). Le gel de polyacrylamide est composé de deux parties. Un premier gel, le gel de concentration (ou stacking gel) contenant 4% d'acrylamide et un gel de séparation contenant 15% d'acrylamide. Un gel de séparation à 15% d'acrylamide permet de séparer correctement des protéines de l'ordre d'une vingtaine de kilodaltons (kDa). Les poids moléculaires des protéines étudiées Bax et Bcl-2 sont respectivement de 21 kDa et 26 kDa.

Anticorps	Type	Isotype	Concentration	Spécificité	Fournisseurs
anti-Bcl-2	monoclonal	Mouse IgG1	0,5 µg/mL	H, C, R, S, P	BD Transduction Laboratories Le Pont de Claix, France
anti-Bax	monoclonal	Mouse IgG1	1 µg/mL	H, R, S	BD Pharmingen Le Pont de Claix, France

Tableau VIII : Caractéristiques des anticorps anti-Bcl-2 et anti-Bax utilisés lors des Western blots. H : homme, C : chien, R : rat, S : souris, P : poulet.

Les échantillons sont ensuite mis à migrer dans un tampon d'électrophorèse (25 mM de tris base ; 192 mM de glycine ; 0,1 % de SDS) pendant 30 minutes à 200 volts. A l'issue de l'électrophorèse, le gel est récupéré puis équilibré pendant 20 minutes dans le tampon de transfert.

4 Transfert des protéines sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF)

La membrane PVDF (0,2 μ M, Biorad) utilisée pour le transfert des protéines est pré-hydratée pendant 2 minutes dans du méthanol. La membrane est équilibrée dans le tampon de transfert (25 mM de Tris, pH 8,3 ; 192 mM de glycine ; 20% de méthanol (v/v) ; 0,025% de SDS) pendant 20 minutes. Les protéines sont ensuite transférées sur la membrane. L'étape de transfert se fait à 4°C pendant 2 heures à 60 volts. Lorsque le transfert est terminé, la membrane est récupérée puis séchée, ce qui permet une meilleure adhésion des protéines à la membrane. Il est nécessaire de réhydrater la membrane pendant 2 minutes dans le méthanol avant son utilisation pour l'immunoblotting.

5 Immunoblotting

Avant de commencer l'immunoblotting, il est nécessaire de saturer les sites non spécifiques. La membrane est incubée pendant 1 heure 30 dans du tampon TBST-L (Tris buffer saline, (TBS : 8 g de NaCl ; 0,2 g de KCl ; 3 g de Tris base, H₂O), 0,1% de Tween 20 et additionné de 5% de lait écrémé en poudre. A l'issue de cette étape, l'hybridation peut commencer. Les anticorps anti-Bax (1 μ g/mL) ou anti-Bcl-2 (0,5 μ g/mL) sont dilués dans le tampon TBST-L (tableau VIII). La membrane est mise à incuber à température ambiante et sous agitation pendant une nuit avec l'un des deux anticorps. Le lendemain, la membrane est récupérée puis rincée dans le tampon TBST-L pendant 6 fois 10 minutes. L'étape de rinçage terminée, l'hybridation avec l'anticorps secondaire peut commencer. L'anticorps secondaire utilisé est un anticorps de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase ; il est également dilué dans le tampon TBST-L (1:15000). La membrane est mise à incuber pendant 1 heure à température ambiante et sous agitation. La membrane est ensuite de nouveau rincée dans le tampon TBST

(Tampon TBS et 0,1% de tween 20).

L'activité de la peroxydase est détectée à l'aide d'un kit de chimiluminescence (Immun-Star™ HRP Chemiluminescent Kit, Biorad). En présence de peroxyde d'hydrogène, l'enzyme HRP (horseradish peroxidase) qui est conjuguée au second anticorps, catalyse l'oxydation du luminol, utilisé comme substrat. Quand il est oxydé, le luminol retourne à son état initial, et produit de la lumière.

La membrane est ensuite placée dans une cassette avec un film autoradiographique (Kodak) pendant 2 minutes. Le film est ensuite développé (produits GBX Kodak).

RESULTATS

PRESENTATION GENERALE DES TRAVAUX

Ce travail vérifie l'hypothèse qu'un dysfonctionnement de l'apoptose favoriserait la transformation morphologique des cellules SHE, et étudie l'expression de certains gènes impliqués dans le contrôle de l'apoptose (*bcl-2*, *bax*, *c-myc*).

Cette recherche nous a amené à procéder par étapes, qui ont consisté :

- ♦ tout d'abord, à étudier la relation entre les effets anti-apoptotiques du zinc et son pouvoir transformant sur les cellules SHE, ainsi que l'interaction du zinc avec d'autres cancérrogènes. L'étude des mécanismes d'inhibition de l'apoptose par le zinc dans les cellules SHE a ensuite été entreprise (**article I et II**).
- ♦ à étudier les effets du DEHP sur l'apoptose dans les cellules SHE et les mécanismes mis en jeu ; le DEHP étant connu pour induire la transformation cellulaire (**article III**).
- ♦ à élargir l'étude du DEHP à un autre HPP cancérrogène non-génotoxique, le 2,4-D, et à étudier son pouvoir transformant dans les cellules SHE, ses effets sur l'apoptose et sur l'expression des gènes *bcl-2*, *bax* et *c-myc* (**article IV**).

C. RESULTATS

I. INFLUENCE DU ZINC SUR LA TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE DES CELLULES EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN

Afin de vérifier l'hypothèse d'une relation entre l'inhibition de l'apoptose et la transformation néoplasique, nous avons étudié les propriétés transformantes du zinc, un inhibiteur de l'apoptose.

Les études précédentes effectuées dans notre laboratoire avaient démontré que le zinc (100 μM soit 13,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) inhibait l'apoptose induite par la privation des facteurs de croissance dans les cellules SHE (Alexandre et al., 2002). La concentration de 100 μM de zinc a donc été utilisée pour étudier ses effets sur la transformation morphologique.

Tout d'abord, nous avons démontré que le zinc (100 μM) induisait significativement la transformation morphologique des cellules SHE suite à une exposition de 7 jours.

L'influence du zinc sur le potentiel transformant de substances cancérigènes a également été étudiée, notamment l'interaction du zinc avec :

- ♦ le benzo(a)pyrène (BaP), un cancérigène génotoxique, utilisé comme contrôle positif dans les essais de transformation morphologique des cellules SHE.
- ♦ le fomesafén, un herbicide cancérigène non-génotoxique chez les rongeurs, appartenant à la classe des diphénylethers et des proliférateurs de peroxysomes hépatiques.

Le co-traitement du zinc avec ces cancérigènes a montré que :

- ♦ le zinc augmente significativement ($P < 0,05$) les effets transformant du BaP (4 μM soit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

- ♦ le zinc augmente significativement ($P < 0,05$) les effets transformant du fomesafen ainsi que l'efficacité de clonage (EC) du fomesafen (11,4 μM soit 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

L'augmentation des effets transformants du BaP par le zinc, pourrait s'expliquer par l'augmentation de la viabilité de cellules génétiquement altérées par le BaP.

Nous n'avons pu démontrer que les effets de synergie du zinc sur le BaP, étaient liés à ses effets anti-apoptotiques. En effet, nous avons montré que le BaP induit l'apoptose, sans pouvoir mettre en évidence de blocage de ses effets apoptotiques par le zinc¹.

Par contre, la synergie zinc/fomesafen, sur la transformation cellulaire, pourrait s'expliquer par l'hypothèse d'une inhibition de l'apoptose. En effet, le fomesafen, comme le zinc, inhibe l'apoptose dans les cellules SHE¹. Ces effets se traduisent par l'augmentation de l'efficacité de clonage dans les cellules SHE. Ces résultats sous-entendent que l'apoptose se produirait lors de l'ensemencement des cellules SHE en densité clonale. L'inhibition de l'apoptose augmenterait la viabilité des cellules, expliquant l'augmentation de l'efficacité de clonage. L'augmentation de la transformation cellulaire s'expliquerait par l'augmentation de la viabilité de cellules anormales.

La seconde partie de cette étude consistait à étudier les effets du BaP et du zinc sur l'expression du gène *c-myc* - un gène impliqué dans la prolifération cellulaire et dont l'expression est augmentée dans certaines lignées transformées (Waters *et al.*, 1991 ; Dean *et al.*, 1986) - ainsi que sur l'expression du gène pro-apoptotique *bax*. Nous avons montré que :

- ♦ à la suite du traitement par le zinc et/ou le BaP, avec des concentrations de zinc et de BaP qui induisent la transformation cellulaire, **ni l'expression de *c-myc*, ni celle de *bax*, ne sont modifiées.**

¹ L'apoptose a été quantifiée grâce à l'analyse de la fragmentation de l'ADN par le BaP à l'aide d'un kit ELISA. Ce kit permet de distinguer les fragments d'ADN correspondant à de l'apoptose (présents dans le lysat cellulaire) des fragments d'ADN correspondant à de la nécrose (présents dans le surnageant). Les fragments d'ADN ont uniquement été détectés dans le lysat cellulaire, ce qui exclut un phénomène nécrotique. La technique du DNA ladder a également été utilisée ; elle permet la visualisation des fragments apoptotiques de l'ADN après migration sur un gel d'agarose.

- ♦ Une co-exposition de ces deux substances (zinc/BaP) ne modifie pas l'expression de *bax* (les effets sur *c-myc* restent à étudier).

Conclusion

Cette étude a démontré les effets transformants du zinc dans les cellules SHE. Le zinc et le fomesafen sont deux substances anti-apoptotiques, et un traitement avec ces substances augmente la transformation cellulaire et l'efficacité de clonage. Ces observations démontrent que l'inhibition de l'apoptose augmente la viabilité des cellules altérées et contribue à la transformation cellulaire.

Cette étude confirme les propriétés transformantes du BaP, et démontre qu'un co-traitement avec le zinc augmente significativement les effets transformants du BaP. Une augmentation de l'apoptose a été mise en évidence suite au traitement avec le BaP, ce qui peut être relié au faible taux d'efficacité de clonage observé lors des essais de transformation cellulaire. Nous n'excluons pas le fait que le faible taux d'efficacité de clonage peut en partie être du à la toxicité du BaP. L'augmentation des effets transformants du BaP par le zinc, n'est pas liée à une inhibition des effets apoptotiques du BaP par le zinc.

*Les résultats obtenus sur *c-myc*, montrent que ce gène n'est pas impliqué dans les phases précoces de la transformation cellulaire induite par le zinc ou par le BaP.*

*Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pas mis en évidence de modifications de l'expression de *bax* par le zinc et le BaP.*

*Ces travaux ont été publiés dans *Toxicology Letters* :*

Alexandre S., Rast C., Maire M.A., Orfila L. & Vasseur P., ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation (2003) *Toxicology Letters*, **142**, 77-87.

*Nous avons contribué à cet article par l'étude de l'expression du gène *bax* et par l'étude de l'apoptose par la technique du DNA ladder. Nous avons également participé à la réalisation des essais de transformation cellulaire.*

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Toxicology Letters 142 (2003) 77–87

**Toxicology
Letters**

www.elsevier.com/locate/toxlet

Short communication

ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation

S. Alexandre^a, C. Rast^a, M.A. Maire^a, L. Orfila^b, P. Vasseur^{a,*}^a *Faculté des Sciences, EBSE-Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, Campus Bridoux, rue Delestraint, Metz 57070, France*^b *Instituto de Investigaciones Farmacéuticas, Unidad de Cultivo Celular-Toxicología, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela*

Received 25 April 2002; received in revised form 2 July 2002; accepted 4 July 2002

Abstract

In order to test the hypothesis of a relationship between apoptosis and neoplastic transformation, we studied the transforming potency of zinc, known for its antiapoptotic effects. In this study, zinc chloride (100 μM) was shown to induce morphological transformation (MT) in Syrian hamster embryo (SHE) cells. It was also tested in combination with benzo(a)pyrene (BaP), a positive control for carcinogenicity, or fomesafen, a carcinogenic pesticide with hepatic peroxisomal proliferation properties. A co-exposure of the two carcinogens with 100 μM zinc increased cell transformation in SHE cells. These results were in agreement with the theory of a relationship between the inhibition of apoptosis and induction of cell transformation. The cloning efficiency (CE) of SHE cells seeded at clonal density was raised by zinc, fomesafen and furthermore by the mixture of the two chemicals, which could be explained by the antiapoptotic action of zinc and fomesafen on SHE cells. No change in *myc* and *bax* expressions was observed in zinc-treated SHE cells.

© 2003 Elsevier Science Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Apoptosis; Morphological transformation; Zinc

1. Introduction

Apoptosis, a cell suicide pathway, is implicated in various physiological events such as cell development, differentiation and the elimination of damaged cells (Wyllie et al., 1980). The defective regulation of apoptosis may contribute to the

etiology of cancer, and the impairment of normal cell death processes has been implicated in neoplastic transformation as several studies have shown (Wyllie, 1992; Schulte-Hermann et al., 1995; Christov et al., 1996; Wyllie, 1997). Tumorigenicity is often associated with the disruption of the genes activating apoptosis, or with the activation of antiapoptotic agents (Staunton and Gaffney, 1998). Zinc has also been shown to interfere with the apoptotic process. While zinc deficiency induces apoptosis *in vivo* and *in vitro* under

* Corresponding author. Tel.: +33-387-37-8501; fax: +33-387-37-8512.

E-mail address: vasseur@sciences.univ-metz.fr (P. Vasseur).

certain circumstances, zinc supplementation in diet or in culture medium blocks apoptosis in animals and in a number of cell types, including lymphoid cells, tumor cell lines and normal cells (Sunderman, 1995). In a previous study, we demonstrated that programmed cell death in serum-deprived Syrian hamster embryo (SHE) cells was totally inhibited by ZnCl_2 (Alexandre et al., 2000). In these cells, the addition of Zn^{2+} prevented the dramatic downregulation of *c-myc* protooncogene expression which follows serum deprivation (Alexandre et al., 2002). As zinc plays an important role in growth regulatory processes because it may suppress apoptosis and promote mitosis, the involvement of zinc in neoplastic transformation can be suspected.

In this work, we investigated the effect of ZnCl_2 on SHE cell transformation and its influence on the transforming potential of two carcinogens, benzo(a)pyrene (BaP) and fomesafen, a diphenyl ether herbicide. It could be suspected that zinc, as an inhibitor of apoptosis may interact with carcinogens, but differently according to their mechanism of carcinogenicity and their effects on apoptosis. BaP is a genotoxic carcinogen, used as a positive control in bioassays for genotoxicity and in the SHE cell transformation assay (Tu et al., 1986). Fomesafen is a non-genotoxic peroxisome proliferator, responsible for preneoplastic changes and hepatocellular carcinoma in long-term experiments on rodents (Krijt et al., 1999). Apoptosis, and the expressions of *c-myc* and *bax* were measured within the first hours of exposure of treated SHE cells plated at a high density independently of the MT assay.

SHE cells, used at early passages, constitute the basis of the in vitro transformation assay, for detecting genotoxic and non-genotoxic carcinogens (Berwald and Sachs, 1963; Tu et al., 1986; Bessi et al., 1995; Cruciani et al., 1997). Unlike other cell models used to search for carcinogenic potencies, i.e. the Balb/c 3T3 or C3H/10T_{1/2} cell line, SHE cells are primary cells and offer the advantages of being diploid, genetically stable, non-tumorigenic and of having metabolic capabilities of activating some classes of carcinogens (Pienta et al., 1977; Barrett and Ts'o, 1978; Barrett et al., 1979). The end-point used in the assay is the

morphological transformation (MT) of colonies which develop 8 days after the seeding of SHE cells at clonal density and their treatment. The relevance of the transformed phenotype as an indicator of neoplastic properties has been demonstrated by the ability of cells derived from morphologically transformed colonies to produce tumors when injected into isolog animals (Berwald and Sachs, 1963; Barrett and Ts'o, 1978; Barrett et al., 1979; Combes et al., 1999).

In the present study, it will be shown that 100 μM zinc in the culture medium, induces MT in SHE cells and increases the transforming effects of BaP and fomesafen. These results are discussed in relation to apoptosis and are in agreement with the theory of a relationship between the inhibition of apoptosis and induction of cell transformation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

BaP (C.A.S. number 50-32-8) was purchased from Sigma-Aldrich, ZnCl_2 (C.A.S. number 7646-85-7) from Merck. Fomesafen (C.A.S. number 72178-02-0) was provided by Zeneca (number 209393). BaP was dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), fomesafen and ZnCl_2 in water. The chemicals were diluted with culture medium just before use. DMSO was applied at a final concentration of 0.2%, which had no effect on cell response.

2.2. SHE cell culture

Primary cells of SHEs at 13 days gestation were prepared as described by Pienta et al. (1977) and modified by Elias et al. (1989). Eyes and viscera were removed and the remaining tissues were digested by dispase (1.2 U/ml). The cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) supplemented with 15% fetal calf serum (FCS; Hyclone), 2.2 g/l NaHCO_3 , and antibiotics (Gibco) at 37 °C in a 10% CO_2 humidified atmosphere; no phenol red was added in DMEM. Stock cells were preserved in liquid

nitrogen in several ampoules and were used in the transformation and apoptosis detection assays.

2.3. Transformation assay

The transforming effect of chemicals was studied in at least three independent series of assays according to the procedure described previously (Tu et al., 1986; Elias et al., 1989; Lasne et al., 1990; Bessi et al., 1994). To summarize, 150 target cells were seeded in 60 mm Petri dishes (Corning) with a feeder layer of 60 000 X-irradiated cells in complete medium (DMEM used for cell culture, pH 7, supplemented with 15% fetal calf serum). One hundred μM ZnCl_2 was introduced to the test medium at this time in zinc treated cells.

Twenty four hours after seeding, BaP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or fomesafen (1, 2.5 or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was applied, either alone or in association with ZnCl_2 , and left for a period of 7 days. The medium was renewed after 3 days of treatment. Ten dishes were used per treatment group in each series of experiment. On day 8, plates were washed with phosphate-buffered saline (PBS), cells were fixed with absolute ethanol and stained with 10% aqueous Giemsa. Colonies were scored under a stereomicroscope for cloning efficiency (CE) and MT. MT colonies were defined as colonies exhibiting an extensive criss-crossing and multi-layered growth pattern of cells. Each dish was coded and scored blind. Several independent experiments were conducted to study the cell transforming potency of the chemicals tested.

The frequencies of MT obtained from pooled data sets were compared in treated cultures and their concurrent experimental controls by means of the χ^2 -test. The CE of control and Zn-treated cells was compared by using the Wilcoxon (1945) signed rank test, which was applied on eight paired data obtained from five independent transformation assays and three experiments which specifically studied the CE. The dose–effect relationship in terms of an increasing linear trend for both the MT and the CE obtained in fomesafen experiments was tested by using the dose–response Armitage (1955) trend test.

2.4. DNA fragmentation

DNA fragmentation was determined using the ‘Cellular DNA Fragmentation ELISA’ kit (Roche Molecular Biochemicals). This assay is based on the quantitative detection of Bromodeoxyuridine (BrdU)-labeled DNA fragments. To summarize, after exposure to BrdU for 12 h, cells were reseeded into a 96-well microplate (10^4 cells per well) and treated for 5 h. At the end of the exposure time, microplates were centrifuged to collect all the cell material including possible detached cells. Thereafter, DNA fragmentation was measured separately in cell lysates and in supernatants in order to identify apoptosis and to discriminate between apoptosis and necrosis. In this purpose, supernatants and cell lysates were transferred separately into an anti-DNA precoated microtiter plate and analyzed using the ELISA procedure. After incubation, DNA was fixed and denatured by exonuclease III (Sigma-Aldrich). DNA fragmentation was measured spectrophotometrically (at 450 and 690 nm as the reference wavelength) after the anti-BrdU-peroxidase conjugate and the substrate solutions had been added. BrdU-labeled fragments measured in cell lysate denoted apoptotic fragmentation. Fragments released into the supernatant came from the necrotic cells and were considered to be markers of cytotoxicity. A serum-free DMEM medium was used as a positive control of DNA fragmentation related to apoptosis in SHE cells. Each condition was tested twice in at least three independent experiments. The Student’s *t*-test was used for statistical analysis.

2.5. RT-PCR analysis

Cells used for the RT-PCR analysis were sampled from a monolayer during the growing phase, 24 h after seeding. Total RNA was extracted from cells with Extract-All solution (Eurobio) and cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using oligo d(T)₁₆ as a primer and MuLV Reverse Transcriptase (50U) (Perkin–Elmer). cDNA samples were subjected to PCR amplification using the Perkin–Elmer kit with *c-myc* and *bax* primers specific to the SHE cell sequences,

GAPDH primers as an internal control for *c-myc* expression and *actin* primers as an internal control for *bax* expression. 500 μM H_2O_2 was used as a positive control for the induction of *bax* expression. The annealing temperature was 55 °C and the sense and antisense primers used were: (1) *c-myc*: GATCAGCTGSAGATGRTGACC and TTGCGGTTGTTGCTGATCTG (product: 731 bp), (2) *bax*: TCCACCAAGAAGCTGAGC-GAG and CCATCTTCTCCAGATGGTGA (product: 411 bp), (3) *actin*: GGAYGAYATGG-AGAARATCTGG and CCTGYTTGCTGAYC-CACATCTG (product: 845 bp), (4) *GAPDH*: TCCATGACAA-CTTTGGCATCGTGG and GTTGTCTGTTGAAGTCACAGGAGAC (product: 377 bp). RT-PCR analyses were performed several times on different batches of SHE cells.

2.6. Detection of 'DNA ladder' by gel electrophoresis

The purification of fragmented and non-fragmented DNA was carried out using Suicide-Track DNA Ladder Isolation kit (Oncogene) according to the manufacturer's instructions. To summarize, DNA was extracted from cells with a lysis buffer. After RNA degradation and DNA isolation, 2-propanol was applied to precipitate DNA. Pellets were washed with ethanol, resuspended, and loaded onto a 1.5% agarose gel containing 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ethidium bromide. Labeled-DNA was visualized by UV illumination.

3. Results

In preliminary studies, the effects of different concentrations of ZnCl_2 on the CE of SHE cells were evaluated in order to ascertain a non-toxic dose of Zn^{2+} which could be applied to SHE cells during the 8 day period of the cell transformation assay. While 300 μM , 1 and 10 mM ZnCl_2 were highly toxic and did not allow colony formation, 100 μM ZnCl_2 was found not to inhibit CE in the experimental conditions of the MT assay. This concentration of 100 μM was used to study the effects of zinc on the cell transformation process, as 100 μM zinc was also shown to inhibit

apoptosis in serum starved SHE cells (Fig. 1). Growth factor-deprived conditions induced a DNA ladder pattern of fragmentation characteristic of apoptosis in SHE cells, which was prevented by 100 μM zinc, or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fomesafen as demonstrated in the DNA ladder assay (Fig. 1). In contrast to zinc and fomesafen, BaP did not modify the DNA pattern of fragmentation (results not shown).

The results of the SHE transformation assays on zinc-treated cells showed that the addition of 100 μM ZnCl_2 to the test medium significantly increased the transformation frequency of SHE colonies to 2.2%, in comparison with 0.5% in the controls (χ^2 -test $P < 0.01$). This concentration raised significantly ($P < 0.05$) CE to 40%, compared with 34% in controls (Table 1).

Fomesafen induced a dose-dependent MT of SHE cells which was demonstrated using the Armitage trend test ($P < 10^{-5}$). The transformation frequency increased from 0.6% in the controls to 1.7, 2.4 and 3.6% after exposure to 1, 2.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fomesafen, respectively. A co-exposure of

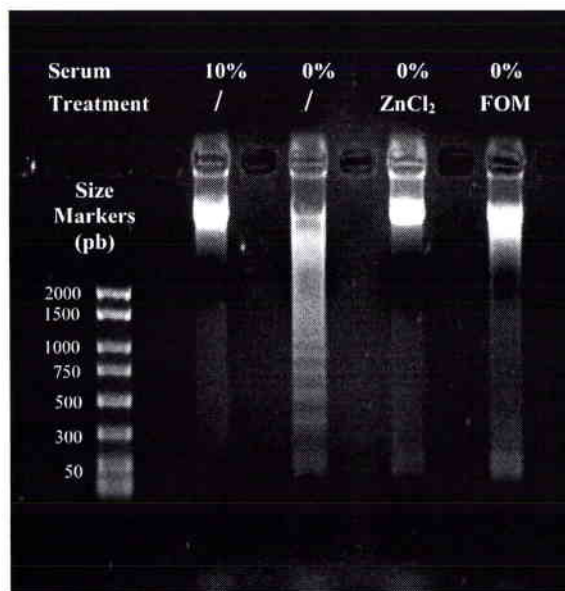


Fig. 1. DNA ladder pattern of fragmentation in SHE cells starved of serum for 8 h without or with addition of 100 μM ZnCl_2 or 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fomesafen (FOM). DNA was prepared using a 'Suicide-Track DNA ladder isolation' kit (Oncogene).

Table 1

Effects of zinc, added to the culture medium, on CE and transformation frequency in SHE cells seeded at clonal density in the MT assay

Zn (μM)	CE (%) ^a	Total number of colonies	Total number of transformed colonies	% transformation frequency
0	2568/7500 (34%)	2568	14	0.5
100	3033/7500 (40%)	3033	66	2.2

Results were obtained from five independent experiments.

^a Total number of colonies in the five experiments/pooled number of seeded cells (7500 = 5 × 10 × 150, i.e. Nb experiments × Nb dishes per concentration × Nb target SHE cells seeded).

fomesafen-treated cells to ZnCl₂ amplified the transformation effects which reached 2.3, 3.6 and 5.2% after treatment with 1, 2.5 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fomesafen, respectively, denoting additive effects

between the two chemicals (Fig. 2). With regard to CE, no toxicity was found with fomesafen; a significant induction of CE was even noted with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fomesafen. The dose–effect relationship of

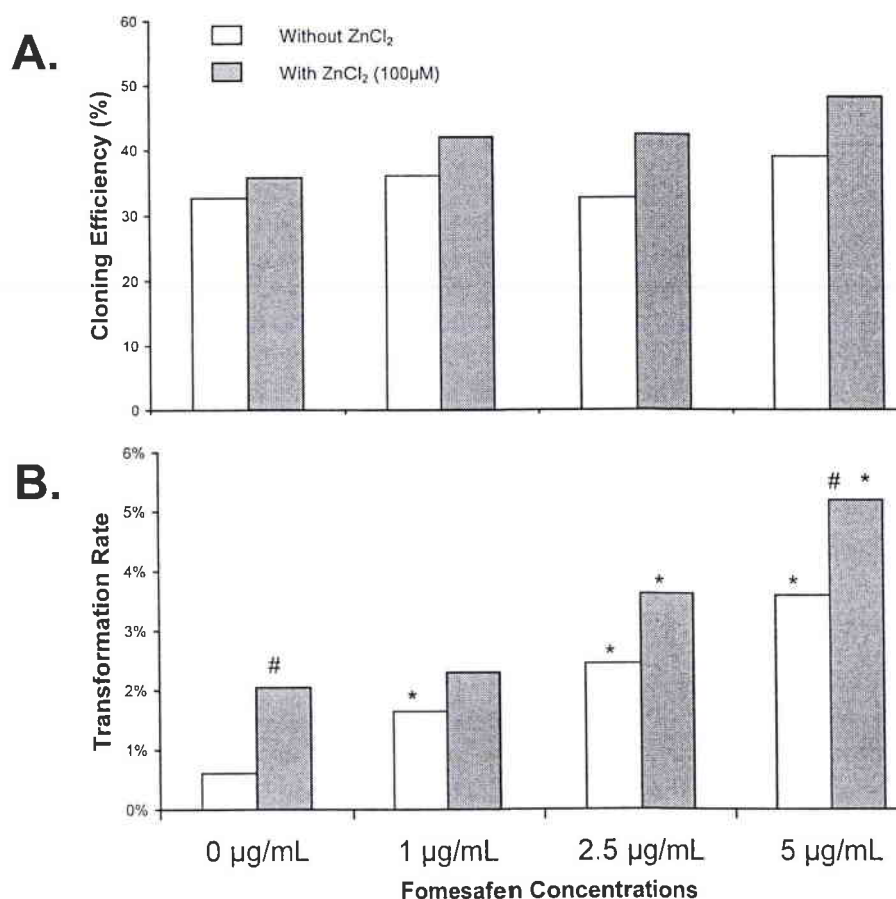


Fig. 2. Effect of fomesafen on CE (A) and, in parallel, on MT of SHE cells (B), with and without ZnCl₂ (100 μM). * Transformation rate significantly different from the respective control without fomesafen ($P < 0.05$). # Transformation rate significantly different from the respective control without ZnCl₂ ($P < 0.05$).

CE was shown using the Armitage trend test ($P < 10^{-5}$). A co-exposure to $ZnCl_2$ increased even more significantly the colony number registered with each concentration of fomesafen tested.

In cells exposed to BaP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), an induction of neoplastic transformation to 1.7% was registered in comparison with 0.6% in non-treated cells. A coexposure of SHE cells to $ZnCl_2$ and BaP, increased transformation frequency to 3.7%. The toxicity of BaP had an effect on CE, which fell from 35.3% in the control dishes, to 26.8% in the treated ones (Fig. 3). The decrease in CE in BaP-

exposed cells was not modified by Zn^{2+} application.

BaP and fomesafen were tested alone and in association with $ZnCl_2$ for their apoptotic effects in SHE cells cultured at a high density (Fig. 4). The DNA fragmentation assay demonstrated an induction of apoptosis after 5 h of exposure to 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BaP, which intensified with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BaP. DNA fragmentation was detected in the cell lysate but not in the supernatant, which allowed us to exclude any necrotic process. On the other hand, fomesafen was shown to reduce DNA fragmenta-

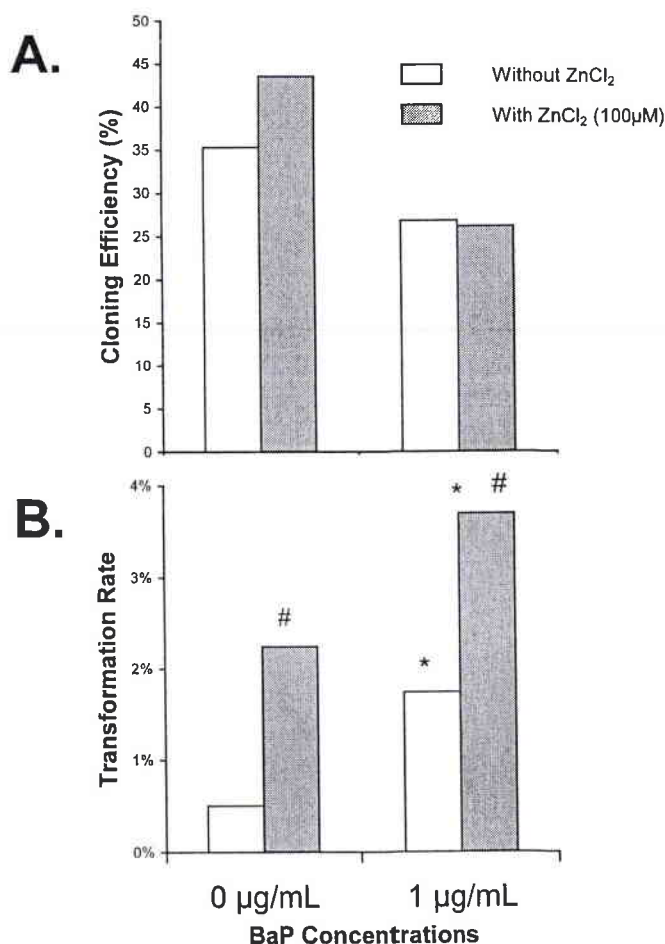


Fig. 3. Effect of BaP (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) on CE (A) and, in parallel, on MT of SHE cells (B), with and without $ZnCl_2$ (100 μM). * Transformation rate significantly different from the respective control (CON) without BaP ($P < 0.05$). # Transformation rate significantly different from the respective control without $ZnCl_2$ ($P < 0.05$).

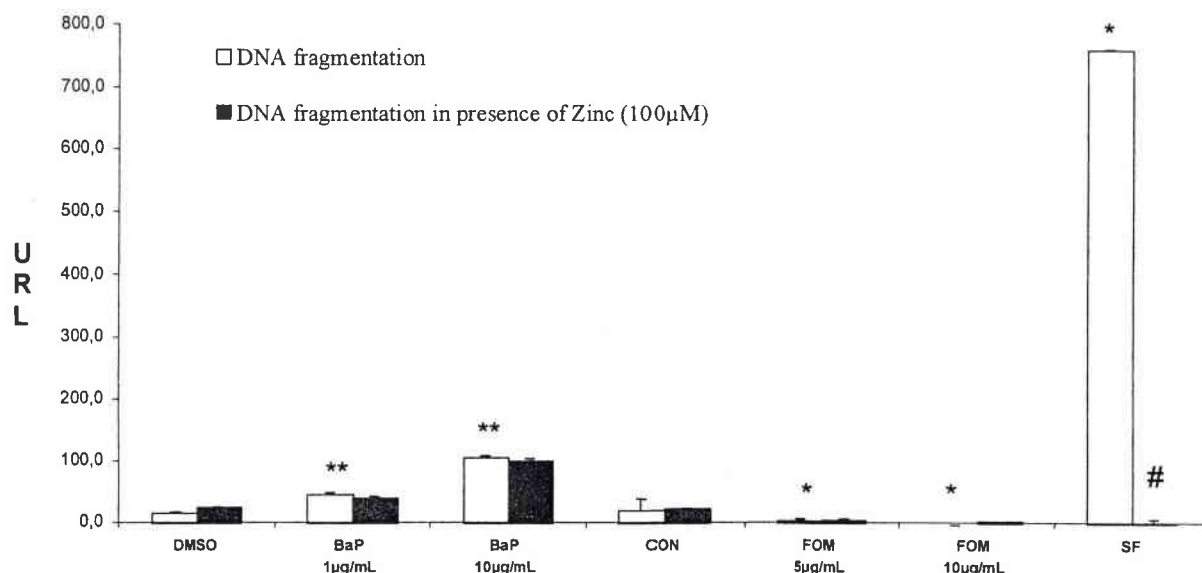


Fig. 4. DNA fragmentation measured by the Cellular DNA Fragmentation ELISA kit in SHE cells exposed to BaP (1 or 10 µg/ml), fomesafen (5 or 10 µg/ml) and serum-free medium used as a positive control. Cells exposed to BaP were compared with cells exposed to DMSO (DMSO). Cells exposed to fomesafen (FOM) or serum-free medium (SF) were compared with untreated cells (CON). Treatments were applied for 5 h with or without ZnCl₂ (100 µM). The method based on BrdU labelling of DNA allowed the spectrophotometric quantification (450 nm) of fragments due to apoptosis in cell lysate. Results are expressed in Unit of Relative Luminescence (URL); * results significantly different from control cells ($P < 0.05$), ** results significantly different from DMSO-treated cells ($P < 0.01$), # results significantly different from cells not treated with zinc ($P < 0.01$).

tion in a significant manner at 5 and 10 µg/ml. The results confirmed the antiapoptotic effects of fomesafen obtained with the DNA ladder assay, which demonstrated that 5 µg/ml fomesafen prevented apoptosis in serum free medium (Fig. 1).

Hundred micromolar ZnCl₂ applied with either BaP or fomesafen did not modify the results obtained with these chemicals used alone. On the other hand, 100 µM ZnCl₂ reduced the high level of DNA fragmentation in serum-deprived SHE cells (Fig. 4).

The gene expression of *c-myc* and *bax* measured after 5 h of exposure to 100 µM zinc were not modified in SHE cells seeded at a high density. Likewise, BaP had no effect on *c-myc* mRNA, which was produced at a similar level in treated cells to that of the controls (Fig. 5). The expression of *bax* in SHE cells exposed to BaP (0.1 and 1 µg/ml) with or without 100 µM ZnCl₂ was not modified, while it increased with the positive control (500 µM H₂O₂) (Fig. 6). No change in *c-*

myc and *bax* expression was found with 5 µg/ml fomesafen (results not shown).

4. Discussion

In this work, results obtained in the SHE cell transformation assays clearly demonstrated the implication of ZnCl₂ in neoplastic transformation. However, zinc has long been recognized as being a non-mutagenic agent with low toxicity. Though it has been shown to induce tumors after local injection, exposure to zinc alone is not considered to represent in itself a carcinogenic risk to humans (Leonard et al., 1986). Casto et al. (1979) demonstrated that zinc chloride did not affect the fidelity of DNA synthesis, but could enhance the frequency of adenovirus transformation in SHE cells, which corroborates the present results. The concentration of 100 µM zinc was shown to present antiapoptotic effects in SHE cells. This is in

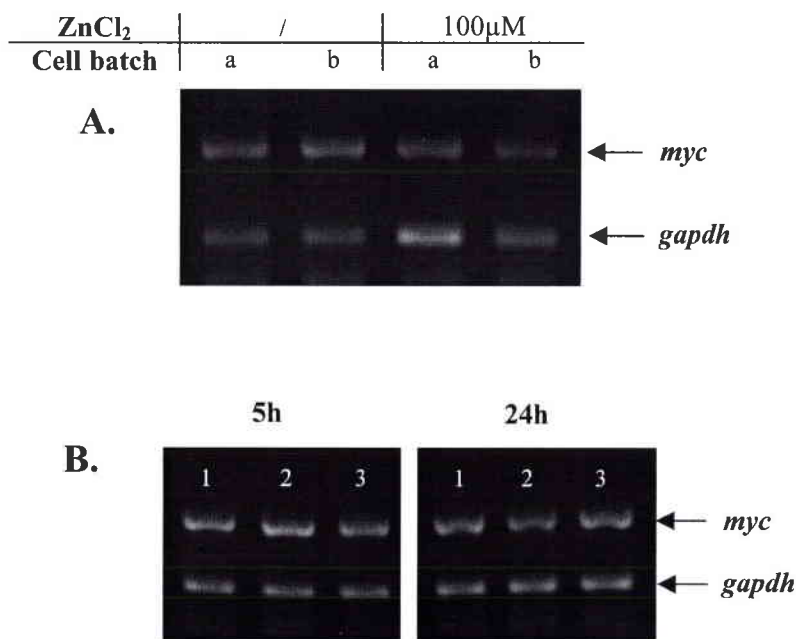


Fig. 5. RT-PCR analyses of *c-myc* (A) in two different batches of SHE cells exposed during 5 h to a complete medium supplemented or not with ZnCl₂ (100 µM). Measures of *c-myc* expression in SHE cells treated with BaP (B) at the concentration of 0.1 µg/ml (2) or 1 µg/ml (3) during 5 or 24 h vs. control cells (1). *gapdh* presented an internal control for *c-myc* expression.

agreement with the concentrations found to inhibit apoptosis in a variety of cells and ranging between 0.1 and 1 mM, as reported by several authors (Sunderman, 1995).

Fomesafen was found to exhibit transforming effects on SHE cells from 1 to 5 µg/ml and showed a dose–response relationship. These transforming properties were in agreement with its hepatic peroxisome proliferation properties, since several

carcinogenic hepatic peroxisome proliferators (HPPs) had been shown to induce SHE MT (Mikalsen et al., 1990a,b; Cruciani et al., 1999). Fomesafen prevented apoptosis as demonstrated by an inhibition of DNA ladder pattern and of basal DNA fragmentation. This property may explain that fomesafen maintained cell survival and enhanced colony formation as registered at 5 µg/ml in the transformation assay.

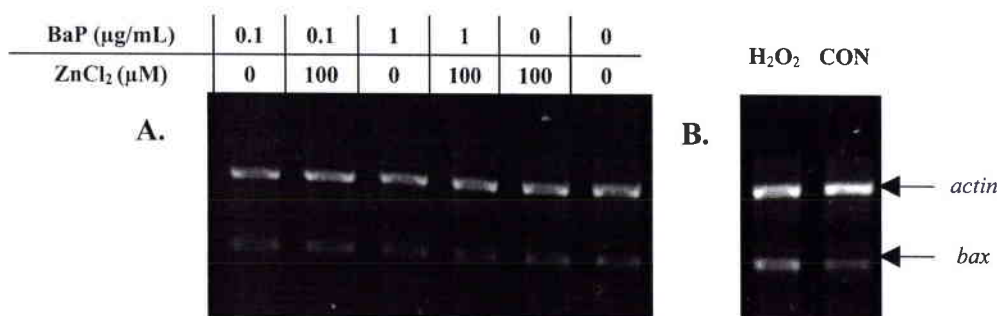


Fig. 6. RT-PCR analyses of *bax* in SHE cells exposed during 5 h to a complete medium supplemented or not with ZnCl₂ (100 µM) and BaP (0.1 or 1 µg/ml) (A). Measures of *bax* expression in SHE cells treated with H₂O₂ at the concentration of 500 µM during 5 h versus control cells (CON). *actin* presented an internal control for *bax* expression.

Other authors studying the mechanism through which HPP induce hepatocarcinogenicity, had also shown apoptosis to be suppressed in hamster hepatocytes in response to HPP treatment (James and Roberts, 1994). Rolfe et al. (1997) concluded that both the suppression of apoptosis and induction of mitosis may be required for hepatocarcinogenicity. Dhalluin et al. (1997) also demonstrated that apoptosis was inhibited by the HPP diethyl hexyl phthalate, when followed by a TPA treatment and resulted in a superinduction of ornithine decarboxylase.

Zinc and fomesafen are both antiapoptotic chemicals, and share the property of increasing both transformation frequency and CE. These results are consistent with the hypothesis that the inhibition of apoptosis, by increasing viability of altered cells, may induce cell transformation. Inhibiting programmed cell death in SHE cells could favor the development of abnormal cells which, instead of being normally eliminated, would produce transformed colonies, resulting in a higher level of transformation frequency.

The study confirmed the transforming potencies of BaP on SHE cells. These positive results for cell transformation were expected since 1 µg/ml BaP is commonly used as a positive control in cell transformation assay. BaP was demonstrated to slightly induce apoptosis and this result could be linked to the lower CE found in the transformation assay when cells were exposed to this chemical.

While zinc inhibits apoptosis induced by serum deprivation, it does not inhibit BaP-induced apoptosis. Therefore, the increase in MT when cells were exposed concurrently to BaP and ZnCl₂ could not result from an inhibition of apoptotic effects of BaP, but rather from additive effects of zinc and BaP.

In the present study, *c-myc* does not appear to be involved on the first step of the MT process in the treated SHE cells, while *c-myc* expression was found to be upregulated in some transformed cell lines (Waters et al., 1991; Dean et al., 1986). No change in *c-myc* expression was recorded after zinc treatment of SHE cells in serum-supplemented medium or after BaP and fomesafen treatment.

We investigated the effects of zinc on *bax* expression, since zinc had been shown to suppress the increase of Bax in apoptotic human premonocytic cells (Fukamachi et al., 1998). No significant modification of *bax* expression by zinc was noted in SHE cells plated at a high density. As apoptosis may be induced by a deregulated balance between the expression of the apoptotic oncogene *bax* and the antiapoptotic oncogene *bcl-2*, it would have been worthwhile to study *bcl-2* expression as well as other (anti)apoptotic agents, in order to elucidate the mechanism of zinc action.

In conclusion, we found that ZnCl₂ could induce MT by itself or applied in a co-exposure to BaP or fomesafen. From these results, it can be stated that the inhibition of apoptosis, by extending the viability of altered cells, results in an increase in transformation frequency. This study demonstrates that inhibition of apoptosis is an epigenetic mechanism which may lead to neoplastic transformation; yet, no synergistic effects could be demonstrated with a genotoxic carcinogen such as BaP.

Additional studies would be necessary to determine whether zinc influences *bcl-2* expression and to elucidate mechanisms of deregulation of both cell cycle control and of differentiation.

Acknowledgements

The authors thank La Ligue contre le Cancer and the French Ministry of the Environment for their financial support. They warmly acknowledge Tracy Carmona for her assistance in correcting this paper and thank Professor A. Maul for his help in statistical analysis.

References

- Alexandre, S., Rast, C., Nguyen-Ba, G., Vasseur, P., 2000. Detection of apoptosis induced by topoisomerase inhibitors and serum deprivation in Syrian hamster embryo cells. *Exp. Cell Res.* 255, 30–39.
- Alexandre, S., Rast, C., Nguyen-Ba, G., Vasseur, P., 2002. ZnCl₂ prevents *c-myc* repression and apoptosis in serum-deprived Syrian hamster embryo cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 11, 191–196.

- Armitage, P., 1955. Test for linear trend in proportions and frequencies. *Biometrics* 11, 375–386.
- Barrett, J.R., Ts'o, P.O.P., 1978. Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3761–3765.
- Barrett, J.R., Crawford, D.D., Mixer, L.O., Schechtmen, L.M., Ts'o, P.O.P., Pollack, R., 1979. Correlation of in vitro growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. *Cancer Res.* 39, 1507–1510.
- Berwald, Y., Sachs, L., 1963. In vitro cell transformation with chemical carcinogens. *Nature* 200, 1182–1184.
- Bessi, H., Rast, C., Nguyen-Ba, G., Vasseur, P., 1994. Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit gap junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line. *Cancer J.* 7, 248–253.
- Bessi, H., Rast, C., Rether, B., Nguyen-Ba, G., Vasseur, P., 1995. Synergistic effects of chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells. *Carcinogenesis* 16, 237–244.
- Casto, B.C., Meyers, J., DiPaolo, J.A., 1979. Enhancement of viral transformation for evaluation of the carcinogenic or mutagenic potential of inorganic metal salts. *Cancer Res.* 39, 193–198.
- Christov, K.T., Guzman, R.C., Swanson, S.M., Thordarson, G., Talamantes, F., Nandi, S., 1996. Cell proliferation and apoptosis during mammary carcinogenesis in pituitary isografted mice. *Carcinogenesis* 17, 1741–1746.
- Combes, R., Balls, M., Curren, R., Fischbach, M., Fusenig, N., Kirkland, D., Lasne, C., Landolph, J., LeBoeuf, R., Marquardt, H., McCormick, J., Müller, L., Rivedal, E., Sabbioni, E., Tanaka, N., Vasseur, P., Yamasaki, H., 1999. Cell transformation assays as predictors of human carcinogenicity, the reports and recommendations of ECVAM workshop 39. *ATLA* 27, 745–767.
- Cruciani, V., Rast, C., Durand, M.J., Nguyen-Ba, G., Vasseur, P., 1997. Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 18, 701–706.
- Cruciani, V., Rast, C., Alexandre, S., Nguyen-Ba, G., Vasseur, P., 1999. Peroxisome proliferator-induced transformation of Syrian hamster embryo cells: influence of experimental procedures. *Toxicol. In Vitro* 13, 445–457.
- Dean, M., Levine, R.A., Ran, W., Kindy, M.S., Sonenshein, G.E., Campisi, J., 1986. Regulation of *c-myc* transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *J. Biol. Chem.* 261, 9161–9166.
- Dhalluin, S., Gate, L., Vasseur, P., Tapiero, H., Nguyen-Ba, G., 1997. Dysregulation of ornithine decarboxylase activity, apoptosis and Bcl-2 oncoprotein in Syrian hamster embryo cells stage-exposed to di(2-ethylhexyl)phtalate and tetradecanoylphorbol acetate. *Carcinogenesis* 18, 2217–2223.
- Elias, Z., Poirot, O., Pezerat, H., Suquet, H., Schneider, O., Daniere, M.C., Terzetti, F., Baruthio, F., Cavelier, C., 1989. Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 10, 2043–2052.
- Fukamachi, Y., Karasaki, Y., Sugjura, T., Itoh, H., Abe, T., Yamamura, K., Higashi, K., 1998. Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of Bcl-2/Bax ratio. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246, 364–369.
- James, N.H., Roberts, R.A., 1994. The peroxisome proliferator class of non-genotoxic hepatocarcinogens synergize with epidermal growth factor to promote clonal expansion of initiated rat hepatocytes. *Carcinogenesis* 15, 2687–2694.
- Krijt, J., Stranska, P., Sanitak, J., Chlumska, A., Fakan, F., 1999. Liver preneoplastic changes in mice treated with the herbicide fomesafen. *Hum. Exp. Toxicol.* 18, 338–344.
- Lasne, C., Lu, Y.P., Orfila, L., Ventura, L., Chouroulinkov, I., 1990. Study of various transforming effects of the anabolic agents trenbolone and testosterone on Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 11, 541–547.
- Leonard, A., Gerber, G.B., Leonard, F., 1986. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutat. Res.* 168, 343–353.
- Mikalsen, S.O., Holen, I., Sanner, T., 1990a. Morphological transformation and catalase activity of Syrian hamster embryo cells treated with hepatic peroxisome proliferators, TPA and nickel sulfate. *Cell Biol. Toxicol.* 6, 1–13.
- Mikalsen, S.O., Kaalhus, O., Reith, A., Sanner, T., 1990b. Role of catalase and oxidative stress in hepatic peroxisome proliferator-induced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer* 46, 950–957.
- Pienta, R.J., Pooley, J.A., Lebherz, W.B., 1977. Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens. *Int. J. Cancer* 19, 642–655.
- Rolfe, M., James, N.H., Roberts, R.A., 1997. Tumor necrosis factor α (TNF α) suppress apoptosis and induces DNA synthesis in rodent hepatocytes: a mediator of hepatocarcinogenicity of peroxisome proliferator? *Carcinogenesis* 18, 2277–2280.
- Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Török, L., Ellinger, A., Müllauer, L., 1995. Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 82/83, 143–148.
- Staunton, M.J., Gaffney, M.D., 1998. Apoptosis: basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 122, 310–319.
- Sunderman, F.W., 1995. The influence of zinc on apoptosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 25, 134–142.
- Tu, A., Hallowell, W., Pallotta, S., Sivak, A., Lubet, R.A., Curren, R.D., Avery, M.D., Jones, C., Sedita, B.A., Huberman, E., Tennant, R., Spalding, J., Kouri, R.E., 1986. An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environ. Mutagen.* 8, 77–98.
- Waters, C.M., Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Moore, J.P., Evan, G.I., 1991. *c-myc* protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene* 6, 797–805.

Wilcoxon, F., 1945. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics* 1, 80–83.

Wyllie, A.H., 1992. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* 11, 95–103.

Wyllie, A.H., 1997. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell Biol.* 73, 189–197.

Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R., Currie, A.R., 1980. Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 68, 251–306.

II. EFFETS DU ZINC SUR L'EXPRESSION DE *bcl-2*, *bax* ET *c-myc* DANS LES CELLULES EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN

Notre objectif était de compléter l'étude précédente, en étudiant les mécanismes de l'inhibition de l'apoptose par le zinc dans les cellules SHE, aux concentrations induisant la transformation morphologique de ces cellules.

Dans la présente étude, nous avons étudié les effets transformants du zinc dans une gamme de concentrations supérieures à 100 μM (100 - 150 μM soit 13,6 - 20,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Une augmentation significative et dose-dépendante de la transformation cellulaire par le zinc, a également été observée aux concentrations 125 et 150 μM , concentrations qui se sont révélées non-cytotoxiques dans nos conditions expérimentales.

Ces résultats justifient le choix des concentrations 100 μM et 150 μM pour l'étude mécanistique de l'inhibition de l'apoptose par le zinc.

Nous avons étudié les effets du zinc sur :

- ♦ l'expression du proto-oncogène *c-myc*, impliqué à la fois dans l'apoptose et dans la prolifération cellulaire.
- ♦ sur l'expression de deux gènes régulateurs de la voie apoptotique mitochondriale, le gène anti-apoptotique *bcl-2* et le gène pro-apoptotique *bax*.

Les cellules SHE ont été traitées avec 100 μM et 150 μM de zinc.

L'analyse en RT-PCR a montré :

- ♦ une augmentation significative ($P < 0.05$) et dose-dépendante de l'expression de *bcl-2*.
- ♦ une diminution significative ($P < 0.05$) de l'expression de *bax* à 150 μM .
- ♦ aucun effet significatif ($P < 0.05$) sur l'expression de *c-myc*.

L'analyse par la technique du Western blotting a confirmé l'augmentation de la protéine Bcl-2 et la diminution de la protéine Bax, respectivement codées par les gènes *bcl-2* et *bax*.

L'étude des effets du zinc dans les cellules traitées avec la camptothécine, un inhibiteur des topoisomérases, a été entreprise, afin de vérifier l'étendue des effets anti-apoptotiques du zinc, et l'implication de *bcl-2* et *bax* dans leurs mécanismes.

Dans les cellules SHE, la camptothécine induit l'apoptose *via* la stabilisation de la protéine P53 (Alexandre *et al.*, 2000a).

Dans la présente étude, nous avons confirmé que la camptothécine (1,2 μM soit 0,4 $\mu\text{g/mL}$) induit l'apoptose des cellules SHE², et nous avons mis en évidence par la technique RT-PCR :

- ♦ l'augmentation de l'expression du gène pro-apoptotique *bax*.
- ♦ la diminution de l'expression du gène anti-apoptotique *bcl-2*.

Un co-traitement avec 150 μM de zinc inhibe les effets apoptotiques de la camptothécine dans les cellules SHE (mesurés par l'inhibition de la fragmentation de l'ADN et par la technique cytohistochimique à l'acridine orange) et nous avons montré que :

- ♦ le zinc diminue l'expression de *bax* induite par le traitement avec la camptothécine (1,2 μM).
- ♦ le zinc augmente l'expression de *bcl-2*, réprimée dans les cellules traitées avec la camptothécine (1,2 μM).

Tous les produits PCR, obtenus lors de ces expérimentations, ont été séquencés. Les résultats du séquençage ont montré que les produits PCR obtenus encodent les protéines attendues, c'est-à-dire Bcl-2, Bax et c-Myc.

² Les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN) ont été observés en microscopie à fluorescence après marquage de la chromatine avec des fluorochromes (acridine orange et BET), ainsi que par la technique du DNA ladder qui permet la visualisation des fragments apoptotiques de l'ADN après migration sur un gel d'agarose.

Conclusion

Les résultats obtenus ont montré que le zinc, appliqué seul ou en co-exposition avec la camptothécine, induisait des modifications de l'expression de gènes régulateurs de la voie apoptotique mitochondriale, à savoir, une modification du ratio bcl-2/bax, via l'augmentation de l'expression de bcl-2 et la diminution de l'expression de bax.

Nous avons également montré que les effets du zinc sur bcl-2 se produisent à des concentrations plus faibles (100 μ M) que celles utilisées pour mettre en évidence les effets sur bax (150 μ M). Une action du zinc plus marquée et plus précoce sur bcl-2 que sur bax reste à confirmer.

Les concentrations auxquelles nous avons mis en évidence ces effets, correspondent aux concentrations induisant la transformation morphologique in vitro des cellules SHE.

Changes in expression of *bcl-2* and *bax* in Syrian hamster embryo (SHE) cells exposed to $ZnCl_2$.

M.A. Maire, C. Rast, C. Pagnout and P. Vasseur.

Acceptée dans *Archives of Toxicology*.

Abstract

Zinc is involved in many physiological processes and plays a critical role in functional and structural cell. Zinc has been shown to induce morphological transformation of Syrian hamster embryo (SHE) cells in a range of concentrations from 100 μ M to 150 μ M. At these concentrations, zinc inhibited apoptosis in SHE cells. The present study aimed to elucidate the mechanisms of zinc action on the apoptotic pathway. Effects of 100 μ M and 150 μ M zinc on the expression of two members of the Bcl-2 family proteins and on the transcription factor, c-Myc, in SHE cells was investigated using RT-PCR. No effect on the proto-oncogene *c-myc* was observed. An up-regulation of *bcl-2* expression was found while *bax* expression was reduced. These changes have been corroborated by immunoblotting. Effects of zinc on *bcl-2/bax* ratio were confirmed in apoptotic camptothecin-treated SHE cells. Cloned and sequenced cDNAs obtained from RT-PCR amplifications allowed us to check the RT-PCR products encoded the expected proteins. This study demonstrated that zinc acts in the early phases of the apoptotic process through a modification of the *bcl-2/bax* ratio in normal and apoptotic SHE cells.

1. Introduction

Apoptosis is an active type of programmed cell death operating in physiological and pathological conditions such as embryogenesis, metamorphosis, cell growth regulation and tumor regression (Wyllie, 1992 ; Kerr *et al.*, 1993). Mechanisms of apoptosis have been subjected to extensive research since its defective regulation have been shown to contribute to the etiology of cancer and neoplastic transformation (Wyllie, 1992 ; Kerr *et al.*, 1993 ; Alexandre *et al.*, 2003). Apoptosis is characterized by

distinctive morphological cellular changes such as cell shrinkage, chromatin condensation and DNA fragmentation (Wyllie, 1980). These changes are governed by caspase (CysteinyI aspartate-specific proteinase) activation (Thornberry & Lazebnik, 1998). One biological pathway leading to the activation of caspases is the mitochondrial pathway (Green & Reed, 1998 ; Castedo *et al.*, 2002), which results in the permeabilization of the mitochondrial membrane and the subsequent release of cytochrome *c* involved with Apaf-1 and pro-caspase 9 in the formation of the apoptosome, a multi-protein complex (Cain *et al.*, 2002). In the mitochondrial pathway, the Bcl-2 protein family acts as a checkpoint in apoptosis. This family has both pro (e.g. Bax, Bak...) and anti (e.g. Bcl-2, Bcl-xl...) cell death properties and regulation of apoptosis involves a dynamic balance between these two categories of proteins (Adams & Cory, 1998 ; Chao & Korsmeyer, 1998 ; Jurgensmeier *et al.*, 1998 ; Borner, 2003). These proteins interact to form homodimers and heterodimers which regulate apoptosis (Chao & Korsmeyer, 1998). The proto-oncogene *c-myc*, is a transcription factor, which has been largely reported to act in the control of normal cell proliferation. During the last ten years, many studies have reported the dual role of *c-myc*, that is, it can drive both cell proliferation and apoptotic cell death (Evan *et al.*, 1992 ; Prendergast, 1999). In the apoptotic pathway, the role of *c-myc* could be closely linked to the Bcl-2 family proteins suggesting it could act in conjunction with Bax to promote apoptosis and the subsequent release of cytochrome *c* (Soucie *et al.*, 2001). It was shown that CHO cells overexpressing *c-myc* were protected from apoptosis by *bcl-2* transfection (Bissonnette *et al.*, 1992).

Zinc is a well-known apoptotic inhibitor (for review Seve *et al.*, 2002 ; Truong-tran *et al.*, 2001). Numerous studies have shown that zinc supplementation increased resistance to chemical apoptotic inducers or apoptosis induced by physical and immunologic stimuli (Alexandre *et al.*, 2003 ; Fukamachi *et al.*, 1998 ; Tamura *et al.*, 2002). On the other hand, zinc chelation or zinc depletion spontaneously induced apoptosis both *in vivo* (Jankowski-Henning *et al.*, 2000) and *in vitro* in many different cells (Sunderman, 1995).

Zinc can affect apoptotic processes at various levels. With regard to molecular hallmarks of apoptosis suppressed by zinc, it was first demonstrated that zinc can prevent DNA fragmentation by inhibiting the calcium/magnesium-dependent

endonucleases (Cohen & Duke, 1984), but recently, numerous *in vitro* studies demonstrated that endonucleases are a secondary target and that zinc can act upstream to the caspases cascade (Perry *et al.*, 1997). Indeed, it has been shown that zinc inhibits the apoptotic process by maintaining caspase-3 inactive (Tamura *et al.*, 2002 ; Chimienti *et al.*, 2001). Studies in malignant cell lines have shown that zinc depletion activates caspase-3. This activation affects the cell cycle by degrading P21 which is one of the major regulatory proteins of the cell cycle and a substrate for caspase-3 (Chai *et al.*, 2000). In the case of zinc chelation by N',N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN), caspase-3 activation may also be coupled with the regulation of cellular redox potential involving reduced glutathione (Nakatani *et al.*, 2000). Fukamachi *et al.*, reported that zinc supplementation can suppress apoptosis induced *in vitro* by hydrogen peroxide in a monocyte cell line U937 through a decrease in *bax* expression (1998). Alexandre *et al.*, demonstrated that 100 μM ZnCl_2 suppressed apoptosis in serum-deprived Syrian hamster embryo (SHE) cells and decreased *c-myc* expression subsequent to a deficiency in growth factors (2000 ; 2003).

SHE cells are normal diploid cells and are used in early passages to study mechanisms of neoplastic transformation *in vitro* (Berwald & Sachs, 1963 ; Pienta *et al.*, 1977 ; DiPaolo & Casto, 1979 ; Elias *et al.*, 1989 ; LeBoeuf *et al.*, 1989 ; Bessi *et al.*, 1994). The morphological transformation assay is an established *in vitro* short-term assay which mimics the early steps of chemical carcinogenesis *in vivo* (Berwald & Sachs, 1963). This assay allows the detection of both genotoxic and non-genotoxic carcinogenic chemicals and a good correlation was obtained between the ability of chemicals to induce tumours *in vivo* and SHE cell transformation *in vitro*. Moreover, SHE cells from transformed colonies induce tumours when transplanted back into hamsters (Berwald & Sachs, 1963 ; Barrett *et al.*, 1979 ; Combes *et al.*, 1999). Zinc anti-apoptotic properties may explain why zinc, at 100 μM concentration, induced cell transformation and potentiated the cell transforming effect of some chemical carcinogens (Alexandre *et al.*, 2003).

In this study, zinc induces the morphological transformation of SHE cells at 100, 125 and 150 μM concentrations. Hypothesizing a relation between cell transformation and the anti-apoptotic properties of zinc chloride, we chose these

concentrations to study mechanisms of zinc in apoptosis. First, we investigated *bcl-2*, *bax*, *c-myc* expression in zinc-treated Syrian hamster embryo cells. We have shown an up-regulation of *bcl-2* expression at 100 μM and 150 μM of zinc, and a decrease of *bax* expression at 150 μM of zinc. The modification of the Bcl-2 and Bax protein level was confirmed by western immunoblotting. These results suggest that zinc could target the early phases of apoptosis through a modification of the *bcl-2/bax* ratio. There were no changes in *c-myc* expression under the same conditions. cDNAs obtained from RT-PCR experiments have been subjected to cloning and sequencing to check that RT-PCR products encoded the expected proteins, Bcl-2, Bax and c-Myc. We also demonstrated that a co-treatment with zinc inhibited the apoptotic effect of camptothecin, a topoisomerase inhibitor known to activate the chemical pathways of apoptosis in SHE cells (DelBino *et al.*, 1991 ; Larsen & Skladanowski, 1998 ; Alexandre *et al.*, 2000).

2. Materials and methods

2.1. SHE cell culture

SHE cells were isolated from Syrian golden hamster embryo at day 13 of gestation using the procedure described by Pienta *et al.*, (1977) and in accordance with the modifications suggested by Elias *et al.*, (1989). Stock cells were preserved in liquid nitrogen. After thawing, passage-2 primary cells were pre-cultured until 80% confluency. Normal culture conditions for these cells are Dubbelco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 12% fetal calf serum (SVF) (Hyclone) for preculture and 5% fetal calf serum (SVF) for treatment, 2 g/L NaHCO_3 and 1% antibiotics (penicilin-streptomycin) at 37°C in a 10% CO_2 humidified atmosphere and pH 7.0. No phenol red was added in medium culture.

2.2. Transformation assay

The transforming potency of zinc chloride (C.A.S. n° 7646-85-7) (Merck) was studied in a range of concentrations from 100 μM to 150 μM in three independent series of assays according to the procedure previously described (Tu *et al.*, 1986 ; Elias

et al., 1989 ; Bessi *et al.*, 1994). To summarize, 150 target cells were seeded in 60 mm Petri dishes (Corning) with a feeder layer of 60000 X-irradiated cells in complete medium (DMEM used for cell culture, pH 7, supplemented with 15% fetal calf serum). The cells were treated 24 hr after seeding with ZnCl₂ (100, 125 or 150 µM). The cells were exposed to zinc for 7 days with a renewal of the medium after 3 days of treatment. Ten dishes were used per treatment group in each series of experiment. At the end of cell exposure (day 8), the medium was removed and the cells were washed with phosphate buffer saline (PBS), fixed with absolute ethanol and stained with 10% aqueous Giemsa. Colonies were scored under a stereomicroscope for cloning efficiency (CE) and morphological transformation (MT). The cloning efficiency was calculated as the total number of colonies per dish in all experiments on the total number of target cells seeded x 100. The morphological transformation frequency was calculated as the number of transformed colonies on the total number of colonies scored x 100. Transformed colonies were defined as colonies exhibiting an extensive criss-crossing and multi-layered growth pattern of cells. Each dish was coded and scored blind. Khi-2 test was used for statistical analysis.

2.3. DNA fragmentation analysis

2.3.1. Treatment

Cells used for DNA fragmentation analysis were sampled from a monolayer during the growing phase, 48 hr after seeding. Cells were trypsinized and treated during reseeded with camptothecin at concentration 0.4 µg/mL with or without zinc chloride at concentration 150 µM for 8 hr. Zinc chloride (C.A.S. n° 7646-85-7) (Merck) was dissolved in water, then the solution was filtered using a 0.2 µM membrane. Camptothecin (C.A.S. No. 7689-03-4) was purchased from Sigma-Aldrich and dissolved in DMSO. DMSO was used at a final concentration of 0.016%.

2.3.2. Fluorescence microscopy

After treatment, the cells and the culture media were harvested and centrifuged at 1000g for 10 min. Cell pellets were stained with acridine orange (0.15 mg/mL in PBS) and ethidium bromide (0.25 mg/mL in PBS) fluorochromes and observed using

fluorescence microscopy (495 nm). Living cells, which are permeable only to acridine orange, show a green nucleic staining ; dead cells permeable also to ethidium bromide have their nuclei colored in red. The cells with a condensed or fragmented chromatin pattern characteristic of apoptosis were counted as apoptotic, whereas those with a homogeneous chromatin pattern were counted as normal. Apoptotic cells were expressed as a percentage of total cells scored.

Each experiment was repeated in at least three independent series of assays. For each experiment, 3 slides per tested concentration were used and 100 cells per slide were scored. Statistical differences between control and treated cells were evaluated with Student's *t*-test. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$.

2.3.3. DNA ladder

The purification of fragmented DNA was carried out using the Suicide-Track DNA Ladder Isolation kit according to the manufacturer's instructions. To summarize, fragmented DNA was extracted from cells using a lysis buffer. After RNA degradation and DNA isolation, 2-propanol was applied to precipitate DNA fragments. Pellets were washed with ethanol, resuspended, then loaded onto a 1.5% agarose gel containing 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ethidium bromide. Labeled DNA was visualized by UV illumination.

The visualization of the DNA ladder pattern was confirmed by two independent experiments.

2.4. RT-PCR analysis

2.4.1. Treatment

Cells were trypsinized and treated during reseeding with zinc chloride at concentrations of 100 μM and 150 μM for 5 hr. The time exposure (5 hr) was chosen according to the results of Alexandre *et al.*, who showed that apoptosis occurred rapidly in SHE cells after growth factor deprivation and zinc chloride inhibited apoptosis within 5 hr of treatment (2000 ; 2002).

In case of a co-treatment with zinc chloride and camptothecin, cells were treated during reseeding with camptothecin (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with or without zinc chloride (150 μM) for 5 hr.

2.4.2. Expression of *bcl-2*, *bax* and *c-myc* RNA

Cells used for RT-PCR analyses were sampled from a monolayer during the growing phase, 48 hr after seeding. Total RNA was extracted from cells with Extract-All solution according to the manufacturer's instructions (Eurobio). The total RNA was quantified by optical density measurement at 260 nm and 280 nm. The integrity of RNA was confirmed by running 1 µg RNA on a 1% agarose gel. The cDNA was synthesized from 1 µg of total RNA using oligo d(T) as a primer and MuLV Reverse Transcriptase (50U) in a volume of 20 µL. The RT-PCR program used was : 30 min, 42°C (cDNA synthesis); 5 min, 94°C (denaturation). c-DNA samples were subjected to PCR amplification using the RNA PCR Core kit and Taq-polymerase (P.E. Applied biosystem) with *bcl-2* (1), *bax* (2) and *c-myc* (3) primers specific to the SHE cell sequences, *actin* (4) primer and *gapdh* (5) primer as internal controls (Eurogentec) : (1) *bcl-2* : 5'-TAT-AAG-CTG-TCA-CAG-AGG-GGC-3' and 5'-TGG-ATC-CAG-GTG-TGC-AGA-TGC-3' (product size 500 bp), (2) *bax* : 5'-TCC-ACC-AAG-AAG-CTG-AGC-GAG-3' and 5'-CCA-TCT-TCT-TCC-AGA-TGG-TGA-3' (product size 411 bp), (3) *c-myc* : 5'-GAT-CAG-CTG-SAG-ATG-RTG-ACC-3' and 5'-TTG-CGG-TTG-TTG-CTG-ATC-TG-3' (product size 734 bp), (4) *actine* : 3'-GGA-YGA-YAT-GGA-GAA-RAT-CTG-G-5' and 3'-CCT-GYT-TGC-TGA-YCC-ACA-TCT-G-5' (product size 845 bp) and (5) *gapdh* : 5'-TCC-ATG-ACA-ACT-TTG-GCA-TCG-TGG-3' and 5'-GTT-GCT-GTT-GAA-GTC-ACA-GGA-GAC-3' (product size 377 bp). The choice of oligonucleotides was carried out according to the sequences available in GenBank.

After an initiated denaturation at 94°C for 5 min, 40 temperature cycles were performed for *bax* and *c-myc*, and 35 temperature cycles were performed for *bcl-2*, at either 55°C (*bax* primers) or 60°C (*bcl-2* and *c-myc* primers) for 30 s, 72°C for 30 s and 94°C for 30 s. After the last cycle, a final extending step at 72°C for 5 min was added.

The products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and viewed by ethidium bromide staining. Signals were analyzed by densitometry and data were expressed as the ratios of the transcripts corresponding to the studied gene to the control gene (*actine* or *gapdh*).

Several independent experiments using different batches of SHE cells were carried out to study gene expression.

2.4.3. Statistical analysis

The mean values (\pm S.E.M; standard error mean) of the ratios of the RT-PCR products corresponding to the gene studied on the control gene obtained in independent experiments were analyzed. Statistical differences between control and treated cells were evaluated with Student's *t*-test. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$.

2.5. cDNA cloning and analysis

cDNA fragments obtained from PCR experimentations with Taq-polymerase were subjected to cloning and sequencing. These cDNA fragments were cloned into pGEM-T Easy vector (Promega) according to the manufacturer's instructions and using *E.coli* cells as bacterial strain. The vector had T7 and SP6 RNA polymerase promoters and contained the alpha-peptide coding region of the enzyme beta-galactosidase for X-Gal blue/white selection. After selection of recombinant clones and culture, bacteria were lysed and plasmid DNA isolation was performed using Genelute Plasmid Mini-prep Kit (Quiagen).

Both strands were sequenced using T7 (forward) and SP6 (reverse) primers (Genome Express, France). The homologies between our sequences and the database sequences were determined by using the Fasta program (Pearson & Lipman, 1988) (Infobiogen). Sequences which showed high similarities were then analyzed using Clustalw methods.

The three nucleotide sequences studied have been assigned EMBL accession numbers indicated in the results.

2.6. Western blotting

Cells were treated during reseeding with zinc chloride at concentrations of 100 μ M and 150 μ M for 5 hr, 8 hr and 12 hr.

After treatment, cells were harvested and centrifuged at 1000g for 10 min. The pellet was rinsed in PBS, then centrifuged at 1000g for 10 min. The pellet was subjected to protein quantification and was resuspended in a lysis buffer (50 mM Tris, pH 8 ; 1 mM EDTA ; 0.2 mM PMSF ; 200 mM NaCl ; 0.1% SDS ; 1% Triton X-100 ; 0.5 μ g/mL leupeptin ; 1 μ g/mL pepstatin). After 30 min incubation in ice, insoluble

materials were eliminated by means of 30 min-centrifugation at 10000g. Proteins concentrations were measured using the Biorad DC protein assay. After quantification, each sample, containing 15 µg for Bax analysis and 30 µg for Bcl-2 analysis, was mixed with the SDS-sample buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8 ; glycerol 20% ; SDS 2% ; bromophenol blue 0.003% ; β-mercaptoethanol 5%) and boiled for 4 min and subjected to SDS-PAGE with 4-20% gradient polyacrylamide gel (Ready Precast Gels, Biorad). The proteins were electrophoretically transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (PVDF transfer membrane, 0.2 µM, Biorad).

Protein-binding sites were saturated with 5% powdered non-fat milk in TBS with tween 20 (0.1%) (TBST-M) for 1 hr 30. The membrane was incubated overnight with monoclonal mouse antibodies against Bax (1:500) (BD, Pharmingen, Le Pont de Claix, France) or with monoclonal mouse antibodies against Bcl-2 (1:500) (BD, Transduction laboratories, Le Pont de Claix, France) in TBST-M. Then the membrane was washed six times in TBST-M and incubated for 1 hr with the horseradish peroxidase goat antibodies against mouse IgG (1:15000) (Biorad) in TBST-M. Peroxidase activity was detected by means of a chemiluminescent reaction developed using the luminol system (Immun-Star HRP Chemiluminescent Detection Kit, Biorad), then exposed to autoradiographic film (Kodak).

3. Results

3.1. Cell transformation

Zinc chloride induced morphological transformation (MT) of SHE cells with a dose response relationship. MT increased from 0.2% in non-treated cells to 0.8%, 2.0% and 3.3% respectively for the 100 μM , 125 μM and 150 μM concentrations (figure 1). No reduced cloning efficiency was observed at the tested concentrations of zinc (figure 1).

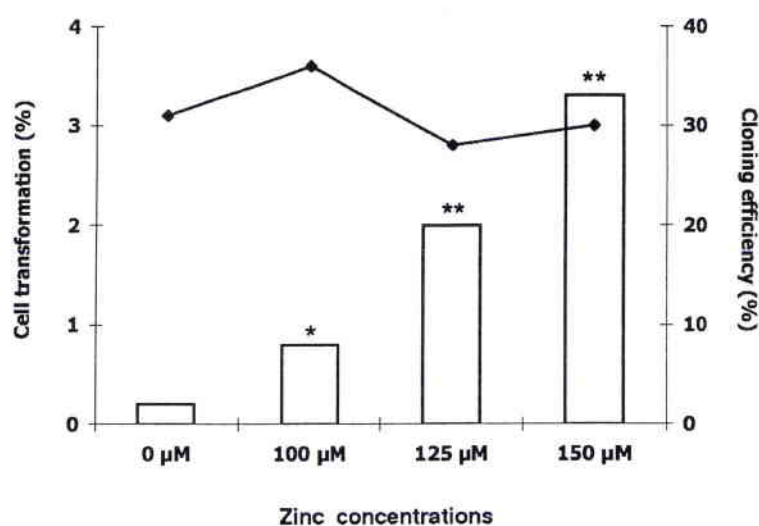


Figure 1 : Effect of ZnCl_2 (100 μM , 125 μM and 150 μM) on cloning efficiency and cell transformation.

* Transformation rate significantly different from the respective control ($P < 0.05$)

** Transformation rate significantly different from the respective control ($P < 0.01$)

3.2. DNA fragmentation detected by fluorescence microscopy and DNA ladder.

Microscopic observations of cells stained with acridine orange and ethidium bromide, which were exposed to camptothecin (0.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), showed typical features of apoptosis, such as chromatin condensation and nuclear fragmentation (figure 2). These morphological characteristics were inhibited by 150 μM zinc.

No effect was observed with DMSO, the control solvent for camptothecin, and with ZnCl_2 (150 μM) (figure 2).

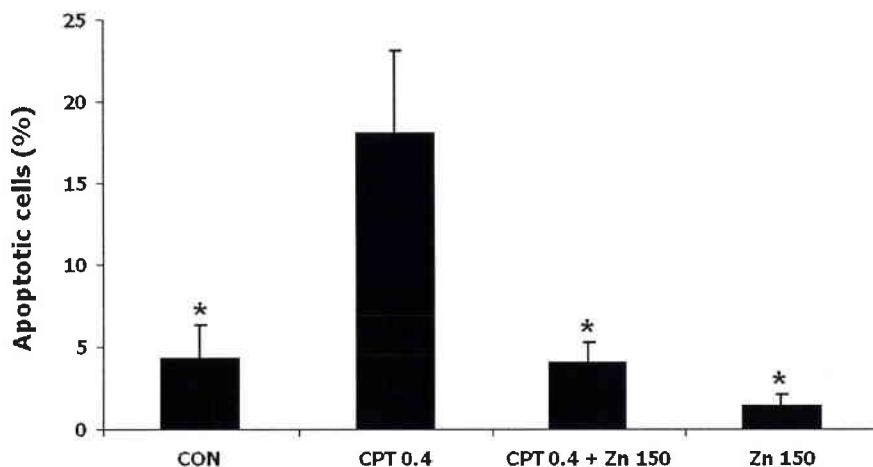


Figure 2 : Percentage of acridine orange-labeled cells containing condensed or fragmented nuclei observed under a fluorescence microscope in cells treated with camptothecin with or without ZnCl₂ versus the corresponding control (DMSO) for 8 hr. Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3 at each point). * *P* < 0.05 vs. camptothecin.

The typical DNA fragmentation ladder pattern induced by camptothecin (0.4 µg/mL) was inhibited by zinc (150 µM) confirming its anti-apoptotic properties (figure 3). The low M_{tw} staining in the tracks containing zinc corresponded to DNA degradation due to a low cytotoxicity of zinc treatment (15%, data not shown), and not to apoptotic DNA fragmentation.

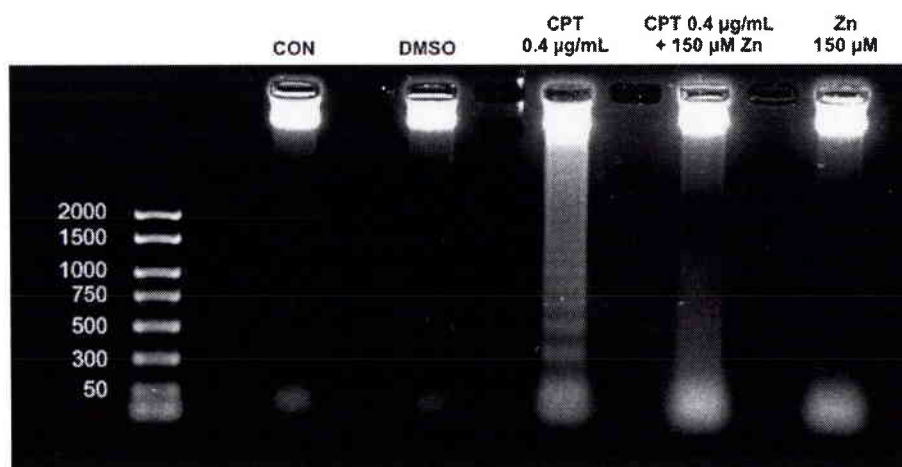


Figure 3 : Agarose gel electrophoresis of fragmented DNA in SHE cells exposed to 0.4 µg/mL of camptothecin with or without ZnCl₂ for 8 hr versus the corresponding control (CON for ZnCl₂ and DMSO for camptothecin).

3.3. Effect of ZnCl₂ treatment on the expression of the Bcl-2 and Bax proteins and on the expression of *bcl-2*, *bax* and *c-myc* RNA in camptothecin-treated and untreated SHE cells.

The expression of *bcl-2*, *bax* and *c-myc* RNA in SHE cells, after zinc treatment, was revealed by semi-quantitative PCR. A low level of *bcl-2* expression was observed in the control group, while its expression increased significantly ($P < 0.05$) in SHE cells treated with zinc chloride (100 μ M and 150 μ M) (figure 4). A dose-response relationship was registered between zinc chloride concentrations and the increase of *bcl-2* expression. Indeed, cells exhibited a 1.8-fold increase in *bcl-2* RNA level after treatment with 100 μ M ZnCl₂ and a 2.8-fold increase after treatment with 150 μ M, compared to the control group.

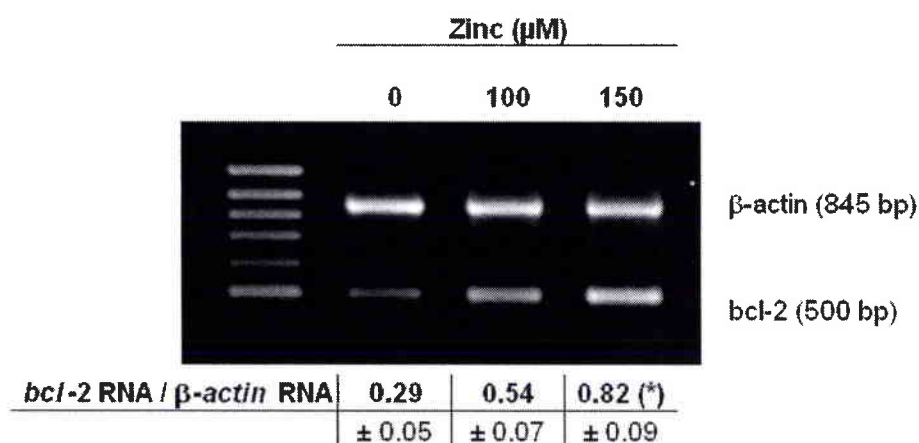


Figure 4 : RT-PCR analysis for changes in *bcl-2*/ β -actin ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *bcl-2* and β -actin genes and densitometric quantifications of changes in *bcl-2*/ β -actin ratio. Cells were treated for 5 hr with zinc chloride (100 μ M and 150 μ M). Values represent means \pm S.E.M. of separate experiments (n = 3 at each point) of the ratio of RT-PCR product of *bcl-2* to β -actin. * $P < 0.05$ vs. control.

Contrary to this, a significant ($P < 0.05$) down-regulation of *bax* (figure 5) in the same cells treated with 150 μ M zinc was observed. No effect on *bax* expression was found in cells treated with 100 μ M zinc.

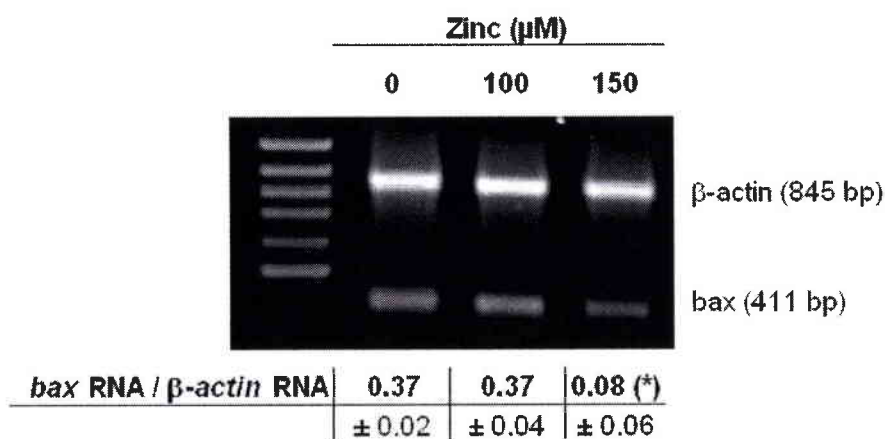


Figure 5 : RT-PCR analysis for changes in *bax*/ β -*actin* ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *bax* and β -*actin* genes and densitometric quantifications of changes in *bax*/ β -*actin* ratio. Cells were treated for 5 hr with zinc chloride (100 μM and 150 μM). Values represent means \pm S.E.M. of separate experiments ($n = 3$ at each point) of the ratio of RT-PCR product of *bax* to β -*actin*. * $P < 0.05$ vs. control.

Immunoblotting confirmed the modification of the *bcl-2*/*bax* ratio following zinc treatment, i.e. the increase of the Bcl-2 protein at 100 μM and 150 μM of zinc, and the decrease of the Bax protein at 150 μM of zinc (figures 6 and 7). The modification of the Bcl-2/Bax protein ratio was only observed at 12 hr ; no significant modifications were observed at 5 hr or 8 hr (data not shown).

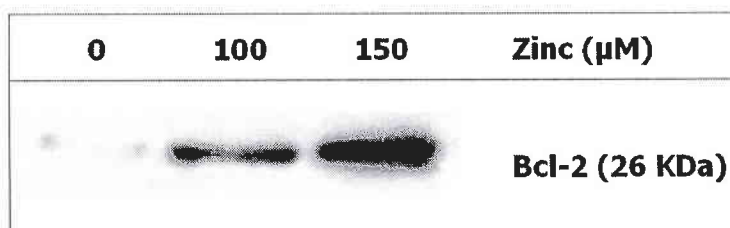


Figure 6 : Western blot detection of Bcl-2 expression in cells treated with 100 μM and 150 μM ZnCl_2 for 12 hr.

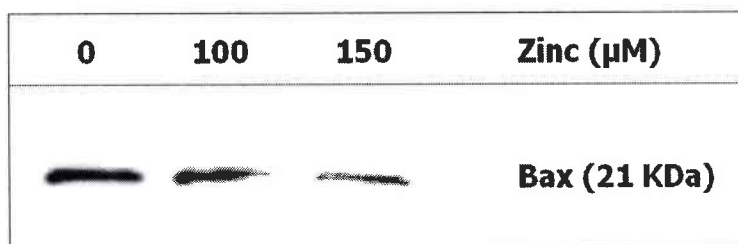


Figure 7 : Western blot detection of Bax expression in cells treated with 100 μM and 150 μM ZnCl₂ for 12 hr.

No changes in *c-myc* RNA expression was noted in these cells and at concentrations which induced changes in *bax* and *bcl-2* transcripts (figure 8).

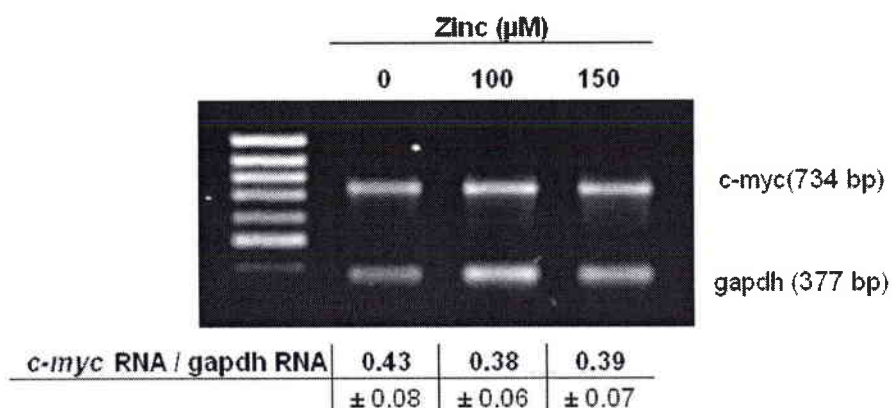


Figure 8 : RT-PCR analysis for changes in *c-myc/gapdh* ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *c-myc* and *gapdh* genes and densitometric quantification of changes in *c-myc/gapdh* ratio. Cells were treated for 5 hr with zinc chloride (100 μM and 150 μM). Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3 at each point) of the ratio of RT-PCR product of *c-myc* to *gapdh*. * *P* < 0.05 vs. control.

Effects of zinc on *bcl-2* and *bax* expression were confirmed in camptothecin-treated cells. The apoptotic inducer camptothecin decreased significantly the level of *bcl-2* expression (figure 9). A co-treatment with ZnCl₂ antagonized the effects of camptothecin, and the *bcl-2* expression returned to the control level (figure 9).

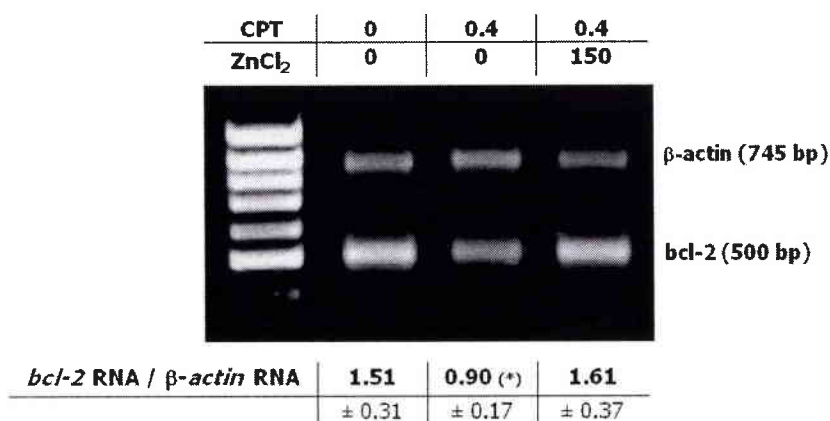


Figure 9 : RT-PCR analysis for changes in *bcl-2*/ β -*actin* ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *bcl-2* and β -*actin* genes and densitometric quantifications of changes in *bcl-2*/ β -*actin* ratio. Cells were treated for 5 hr with camptothecin (0.4 μ g/mL) with or without zinc chloride (150 μ M) versus the corresponding control (DMSO). Values represent means \pm S.E.M. of separate experiments (n = 3) of the ratio of RT-PCR product of *bcl-2* to β -*actin*. * $P < 0.05$ vs. control.

Conversely, camptothecin increased *bax* expression (figure 10) and a co-treatment with ZnCl₂ blocked the effects of camptothecin. The effects of ZnCl₂ on camptothecin-treated cells restored the basal expression of *bax* (figure 10).



Figure 10 : RT-PCR analysis for changes in *bax*/ β -*actin* ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *bax-2* and β -*actin* genes and densitometric quantifications of changes in *bax*/ β -*actin* ratio. Cells were treated for 5 hr with camptothecin (0.4 μ g/mL) with or without zinc chloride (150 μ M) versus the corresponding control (DMSO). Values represent means \pm S.E.M. of separate experiments (n = 3) of the ratio of RT-PCR product of *bcl-2* to β -*actin*. * $P < 0.05$ vs. control.

3.4. Cloning of cDNA encoding the hamster Bcl-2, Bax and c-Myc proteins

cDNA fragments corresponding to the hamster transcripts, obtained from RT-PCR amplifications of total RNA of SHE cells were subjected to cloning and sequencing.

The *bcl-2* (EMBL Accession No. AJ582074) nucleotides (500bp) sequence and the corresponding protein sequence (166 amino acids) are presented in figure 11. The amino acid sequence of Syrian hamster was compared with the known sequences of Chinese hamster (EMBL Accession No. AJ271720) and Human Bcl-2 homologues (EMBL Accession No. M14745). Ninety seven per cent similarity was found between the Syrian hamster and Chinese hamster, and 82% similarity between the Syrian hamster and Human Bcl-2 protein sequence.

A.

```

tataagctgtcacagaggggctacgagtgggatgccggagatgctggacgccgcgccctg      60
Y K L S Q R G Y E W D A G D A D A A P L
ggcgcccccccccccctggcatcttctccttccagcttgagagcaacccaacgcccgt      120
G A A P T P G I F S F Q L E S N P T P A
gtacacccgggacacgactgccaggacgtcgccactaaggcccatagtcgccaccgctggg      180
V E R D T T A R T S P L R P I V A T A G
cctgccctcagccccgtgccacctgtggtccacctgacctccgcccggctggggatgac      240
P A L S P V P P V V H L T L R R A G D D
ttctcccgtcgtaccgtcgcgacttcgcagagatgtccagtcagctgcatctgacgcc      300
F S R R Y R R D F A E M S S Q L H L T P
ttcaccgcgaggggacgctttgctacggtggtgaggaactcttcaggacggggtgaa      360
F T A R G R F A T V V E E L F R D G V N
tgggggaggattgtggtcttctttgagtcggtggggtcatgtgtgtggagagcgtcaac      420
W G R I V V F F E F G G V M C V E S V N
agggagatgtcacccctggtggacaacatcgccctgtggatgactgagtacctgaaccg      480
R E M S P L V D M I A L W M T E Y L N R
catctgcacacctggatcca                                             500
E L H T W I
    
```

Figure 11 : A, Nucleotides sequence of the *bcl-2* cDNA and deduced amino acids sequence of the Syrian hamster Bcl-2 protein.

B.

Chinese Hamster	YKLSQRGYEWDVGDVDAAPLGAAPTGFIFSFQESNPTFAVHRDMAARTSPLRPIVAT--	60
Syrian Hamster	YKLSQRGYEWDAGDADAAPLGAAPTGFIFSFQLESNPTFAVERDITARTSPLRPIVAT--	60
Human	YKLSQRGYEWDAGDVGAAPPGAAPGIFSSQPGHTPHTAASRDVARTSPLQTPAAPGA	60
Chinese Hamster	-TGPTLSPVPPVVHLLRRAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRD	120
Syrian Hamster	-AGPALSFPVPPVVHLLRRAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLELTPFTARGRFATVVEELFRD	120
Human	AAGPALSFPVPPVVHLLRQAGDDFSRRYRRDFAEMSRQLHLTPFTARGRFATVVEELFRD	120
Chinese Hamster	GVNWGRIVAFPEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHHTWI	169
Syrian Hamster	GVNWGRIVVFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHHTWI	169
Human	GVNWGRIVAFPEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHHTWI	169

Figure 11 : **B,** Comparison of amino acids sequences between Chinese hamster, human and Syrian hamster Bcl-2 homologues. Deduced sequence of the Syrian hamster Bcl-2 protein contains 166 aa. The alignment (Clustalw method) shows 97% similarity between Syrian hamster and Chinese hamster, and 82% between Syrian hamster and human.

The *bax* (EMBL Accession No. AJ582075) nucleotides sequence (411 bp) and the corresponding protein sequence (136 amino acids) are given in figure 12. Comparison of the amino acid sequence of Syrian hamster with the known sequences of rat (EMBL Accession No. AF235993) and Human Bax homologues (EMBL Accession No. L22473), revealed 98% similarity between the Syrian hamster and rat, and 96% similarity between the Syrian hamster and Human Bax protein sequence.

A.

ccaccaagaagctgagcgagtgtctcaggcgaatcggagatgagctggacagcaacatggag	62
T K K L S E C L R R I G D E L D S N M E	
ctgcagaggatgattgctaattgtggacacgaactcccccgagaggtctcttccgcgtt	122
L Q R M I A N V D T N S P R E V F F R V	
ccggctgacatgtttgccgatggcaacttcaactggggcgggttgttgccctctctac	182
A A D M F A D G N F N W G R V V A L F Y	
tttgctagcaaacgtgtgctcaaggcctgtgcaccaaagttcccagactaatcagaacc	242
F A S K L V L K A L C T K V P E L I R T	
atcatggctggacactggacttctccgagagcggctgcttctggatccaagaccag	302
I M G W T L D F L R E R L L V W I Q D Q	
ggtggctgggatggcctctctcactactcgggacaccacctggcagacagtgaccatc	362
G G W D G L L S Y F G T P T W Q T V T I	
tttggctggagtcctcactgcctcactcaccatctggaagaagatgg	411
F V A G V L T A S L T I W K K M	

Figure 12 : **A,** Nucleotides sequence of the *bax* cDNA and deduced amino acids sequence of the Syrian hamster Bax protein.

B.

Rat	TKKLSECLRRIGDELDSNMELQRMIAVDVTDSPREVFVRVAADMFDGNFNWGRVVALFY	60
Syrian hamster	TKKLSECLRRIGDELDSNMELQRMIAVDVTDSPREVFVRVAADMFDGNFNWGRVVALFY	60
Human	TKKLSECLKRIGDELDSNMELQRMIAAVDVTDSPREVFVRVAADMFDGNFNWGRVVALFY	60
Rat	FASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDGGWEGLLSYFGTPTWQTVTI	120
Syrian hamster	FASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDGGWDGLLSYFGTPTWQTVTI	120
Human	FASKLVLKALCTKVPELIRTIMGWTLDFLRERLLVWIQDGGWDGLLSYFGTPTWQTVTI	120
Rat	FVAGVLTASLTIWKKM	136
Syrian hamster	FVAGVLTASLTIWKKM	136
Human	FVAGVLTASLTIWKKM	136

Figure 12 : B, Amino acids sequences comparison between rat, human and Syrian hamster Bax homologues. Deduced sequence of the Syrian hamster Bax protein contains 136 aa. The alignment (Clustalw method) shows 98% similarity between Syrian hamster and rat, and 96% between Syrian hamster and human.

The *c-myc* (EMBL Accession No. AJ582076) nucleotides sequence (734 bp) and the corresponding protein sequence (244 amino acids) are shown in figure 13. 96% similarity between the Syrian hamster and the mouse (EMBL Accession No. X01023), and 91% similarity between the Syrian hamster and Human *c-Myc* (EMBL Accession No. V00568) were found after comparison between protein sequences.

A.

gatcagctggagatggtgaccgagctgcttggaggagacatggtgagtcagagcttcac	60
D Q L E M V T E L L G G D M V S Q S F I	
tgcgaccctgacgagcaaaccttcatcaagaacattatcatccaggactgtatgtggagc	120
C D P D D E T F I R N I I I Q D C M W S	
ggcttctcagccgcccgaagctggtctcggagaagctggcttctaccaggctgcgcgc	180
G F S A A A K L V S E K L A S Y Q A A R	
aaagacagcgcagcccgagccccgccccgggcgagcggctgctccacctctagcctg	240
K D S A S P S P A R G R S G C S T S S L	
tacctgcaggacctcaccgcccgcgctccgagtgcatgacctcgggtggtcttcccc	300
Y L Q D L T A A A S E C I D P S V V F P	
taccctcaacgacagcagcagctcgcceaatcctgtacctcgtccgactccacagcc	360
T P L N D S S S S P K S C T S S D S T A	
ttctctcctcctcggactcgtgctgctcctcagagtcctccccacgggcccagccccgag	420
F S P S S D S L L S S E S S P R A S P E	
cccctagtgtgcatgaggagacacctcccaccaccagcagcactctgaggaagaacaa	480
P L V L H E E T P P T T S S D S E E E Q	
gaagatgaggaagaattgatgtcgtgtctgtggaagaggcagccccctgctaagagg	540
E D E E E I D V V S V E K R Q P P A K R	
ttcgaatcagggctcatccccatcaggagggccacagcaaacctccacacagccccgtgtt	600
S E S G S S P S G G R S K P P H S P L V	
ctcaagagatgccatgtctccaagcaccagcacaactacgcagcgcceccctccacgagg	660
L K R C H V S T H Q H N Y A A P P S T R	
aaggactatcctgtcgtccaagagggccaagtggacagtggccgggtcctgaaacagatc	720
K D Y P A A K R A K L D S G R V L K Q I	
agcaacaaccgcaa	734
S N N R	

Figure 13 : A, Nucleotides sequence of the *c-myc* cDNA and deduced amino acids sequence of the Syrian hamster *c-Myc* protein.

B.

Mouse	DQLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAAR	60
Syrian Hamster DQLEMVTELLGGDMVVSQSFICDPDDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAAR	60
Human DQLEMVTELLGGDMVNQSFICDPDDETFIKNIIIQDCMWSGFSAAAKLVSEKLASYQAAR	60
Mouse	KDSTSLSPARGHSVCSTSSLYLQDLTAAASECIDPSVVFYPFLNDSSS-PKSCSTSSDSTA	120
Syrian Hamster KDSASPSFARGRSGCSTSSLYLQDLTAAASECIDPSVVFYPFLNDSSSSPKSCSTSSDSTA	120
Human KDSGSPNPARGHSVCSTSSLYLQDLTAAASECIDPSVVFYPFLNDSSS-PKSCASQDSSA	120
Mouse	FSPSSDSSLSS-SESSPRASPEPLVLEETPPTTSSDSEEEQEDEEEDVVSVEKRPQPAK	180
Syrian Hamster FSPSSDSSLSS-SESSPRASPEPLVLEETPPTTSSDSEEEQEDEEEDVVSVEKRPQPAK	180
Human FSPSSDSSLSSSTESSPQGSPEPLVLEETPPTTSSDSEEEQEDEEEDVVSVEKRPQAPGK	180
Mouse	RSESGSSPSRGHSKPPHSPLVLRCHVSTHQHNYAAPSTRKDYPAAKRAKLDGSRVLKQ	240
Syrian Hamster RSESGSSPSGGSKPPHSPLVLRCHVSTHQHNYAAPSTRKDYPAAKRAKLDGSRVLKQ	240
Human RSESGSPSAGGHSKPPHSPLVLRCHVSTHQHNYAAPSTRKDYPAAKRVKLDGSRVLRQ	240
Mouse	ISNNR	245
Syrian Hamster	ISNNR	245
Human	ISNNR	245

Figure 13 : **B,** Amino acids sequences comparison between mouse, human and Syrian hamster c-Myc homologues. Deduced sequence of the Syrian hamster c-Myc protein contains 244 aa. The alignment (Clustalw method) shows 96% similarity between Syrian hamster and mouse, and 91% between Syrian hamster and human.

4. Discussion

In this study we demonstrated that zinc induces neoplastic transformation of SHE cells in a range of concentrations from 100 μ M to 150 μ M confirming the results found with 100 μ M of zinc by Alexandre *et al.*, (2003). At 150 μ M, zinc was shown to inhibit camptothecin-induced apoptosis, which confirmed the antiaopoptotic effects of 100 μ M zinc on topoisomerase inhibitors (Alexandre *et al.*, 2000). Hypothesizing that a blocking of apoptosis may be associated with the induction of morphological transformation, we chose these concentrations to study the mechanisms of zinc in the inhibition of apoptosis in SHE cells. We demonstrated that exposure to ZnCl₂ at 100 μ M and at 150 μ M, increases *bcl-2/bax* ratio in normal SHE cells or in camptothecin-treated SHE cells. No effect on the expression of *c-myc* was observed following a zinc treatment.

Cloning and sequencing transcripts obtained from RT-PCR experiments allowed us to check that the corresponding cDNAs encoded the expected proteins. Large homologies between the protein sequences of Syrian hamster, rat, mouse and human were observed.

Bcl-2 is probably the best studied apoptotic suppressor (Reed, 1994) and it is known to prevent apoptosis in response to a large variety of stimuli. Its effects are determined by its interaction with Bax, a 21 kDa pro-apoptotic protein. Bax promotes apoptosis by inducing loss of the electrochemical gradient across the inner membrane of mitochondria and participates to the formation of the mitochondrial pores which influence the release of SIMP (soluble inter membrane proteins) such as cytochrome *c*, AIF, smac/Diablo (Green & Reed, 1998 ; Brady & Gil-Gomez, 1998). All these effects are suppressed by *bcl-2* (Antonsson *et al.*, 1997 ; Kluck *et al.*, 1997 ; Yang *et al.*, 1997 ; Cosulich *et al.*, 1999).

In this work, we have shown that zinc treatment led to an up-regulation of *bcl-2* at the concentrations of 100 μM and 150 μM zinc and to a down-regulation of *bax* at 150 μM zinc. Moreover, in SHE cells treated with camptothecin, *bcl-2* expression decreased whereas *bax* expression increased. The addition of zinc chloride in camptothecin-treated SHE cells inhibited these changes and restored the basal expression of *bcl-2* and *bax*. These results suggest that an increase of the *bcl-2/bax* ratio can be a target for zinc in relation to its anti-apoptotic properties.

In further experiments, it would be worth studying the mechanisms of the regulation of *bcl-2* by zinc. Zinc has been shown to enhance the transcriptional activity of some genes which contain specific zinc-finger regions (Dreosti, 2001 ; Truong-Tran *et al.*, 2001). To our knowledge, no studies have reported that *bcl-2* gene could have a metal-response element in its promoter/enhancer regions.

Consequently, zinc may act in the early phases of apoptotic pathway, before the activation of caspases cascade leading to DNA fragmentation and degradation. These results are in line with the inhibition of H_2O_2 -induced apoptosis by zinc tested at millimolar concentrations, parallel to a decrease of Bax expression in the cell lines U937 (Fukamachi *et al.*, 1998). In a recent study, Ganju and Eastman (2003) have reported that chemical inducers of apoptosis activated BH3 proteins such Bax and Bak, and the release of cytochrome *c*. They have also shown that zinc inhibited

apoptosis by preventing these changes.

The regulation of mitochondrial proteins is not the only target of zinc, and zinc is able to act at different levels on the apoptotic pathway. In 2002, Tamura *et al.*, have shown that zinc prevents ricin-induced apoptosis in U937 cell line (2002). They could not explain zinc effects by changes in Bcl-2, Bax or Bcl-xl expression but by an inhibition of the increase of caspase-3, caspase-6 and caspase-9.

In most studies, zinc has been reported to target late phases of apoptosis such as DNA fragmentation by inhibiting the calcium/magnesium-dependent endonuclease (Cohen & Duke, 1984) or caspase-3 (Perry *et al.*, 1997). Another target for zinc has been identified, the IAPs (inhibitors of apoptotic proteins) characterized by a domain known as BIR (Baculoviral IAP Repeat) (Holcik *et al.*, 2001). Zinc is able to link to this domain, which is implicated in the inhibition of cleavage and activation of caspases (for review, Seve *et al.*, 2002). The induction of metallothioneins was also postulated as a mechanism involved in the anti-apoptotic effects of zinc, but the induction of metallothioneins by zinc requires a pre-treatment of cells with this metal (Shimoda *et al.*, 2003). Zinc anti-apoptotic properties were often compared to *bcl-2* anti-apoptotic properties. Indeed, they can both prevent caspases cascade and protect cells from oxidative stress (for review, Truong-Tran *et al.*, 2001).

For some time, the proto-oncogene *c-myc* was known to act in cell proliferation. In 1992, Evan *et al.*, reported its effects in the apoptotic process under growth limiting conditions in cell lines. In cell lines genetically constructed to overexpress *c-myc*, transfection with *bcl-2* could suppress *c-myc* apoptotic function (Juin *et al.*, 1999). *C-myc* was reported to sensitize Rat-1 fibroblast cell constructs to apoptotic stimuli and to be able to induce the release of cytochrome *c* (Juin *et al.*, 1999).

In the present study, expression of *c-myc* was not changed after a zinc treatment which modified the *bcl-2/bax* ratio. This indicated that the expressions of *bcl-2* and *bax* are independent of *c-myc* expression in normal SHE cells, in our experimental conditions.

In conclusion, zinc was found to target the early phases of apoptotic pathway through a change in the expression of two proteins of the Bcl-2 family proteins, Bcl-2

and Bax.

Proteins which play a role in apoptosis are numerous and a better understanding of their mechanisms is necessary to know how these proteins interact with zinc since intracellular zinc levels influence the survival of cells. The study of anti-apoptotic properties of zinc represent important lines of research, not only in diseases where zinc homeostasis is often distorted (e.g. Alzheimer's disease) but also in the comprehension of cancer mechanisms, where an inhibition of apoptotic process may be involved.

Knowledge on the mechanisms of apoptosis in normal cells is also of interest in the chemotherapy of cancer.

The relevance of the present results resides in the fact that little is known about the apoptotic process in normal cells which had been less extensively investigated than cell lines, despite the interest to prevent resistance to apoptosis in normal cells, and to study mechanisms of carcinogenesis.

Acknowledgments

The authors thank Dr P. Poupin for constructive discussions and Pr A. Hammond for assistance in revising the English form of this paper.

They are grateful to Dr Methlin and his colleagues from the "Claude Bernard Hospital - Departement de Radiotherapie et de Chimiotherapie" for the preparation of irradiated SHE cells.

This study was funded by the French Ministry of Research and Direction for Prevention of Pollution and Environmental Risk of the Ministry of the Environment.

The authors declare that the experiments comply with the current law in France and with safety requirement.

Reference List

- Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 281: 1322-1326.
- Alexandre S, Rast C, Maire MA, Orfila L, Vasseur P (2003) ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation. *Toxicol Lett* 142: 77-87.

Alexandre S, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P (2000) Detection of apoptosis induced by topoisomerase inhibitors and serum deprivation in Syrian hamster embryo cells. *Exp Cell Res* 255: 30-39.

Alexandre S, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P (2002) ZnCl₂ prevents *c-myc* repression and apoptosis in serum-deprived Syrian hamster embryo cells. *Environ Toxicol Pharmacol* 11: 191-196.

Antonsson B, Conti F, Ciavatta AM, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC (1997) Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 277: 370-372.

Barrett J, Crawford DD, Mixter LO, Schechtmen LM, Ts'o POP, Pollack R (1979) Correlation of in vitro growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. *Cancer Res* 39: 1507-1510.

Berwald Y, Sachs L (1963) In vitro cell transformation with chemical carcinogens. *Nature* 200: 1182-1184.

Bessi H, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P (1994) Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit GAP junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line. *Cancer Journal* 7: 248-253.

Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR (1992) Apoptotic cell death induced by *c-myc* is inhibited by *bcl-2*. *Nature* 359:552-554.

Borner C (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Mol Immunol* 39:615-647.

Brady HJ, Gil-Gomez G (1998) Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *Int J Biochem Cell Biol* 30:647-650.

Cain K, Bratton SB, Cohen GM (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* 84:203-214.

Castedo M, Ferri K, Roumier T, Metivier D, Zamzami N, Kroemer G (2002) Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *J Immunol Methods* 265:39-47.

Chai F, Truong-Tran AQ, Evdokiou A, Young GP, Zalewski PD (2000) Intracellular zinc depletion induces caspase activation and p21 Waf1/Cip1 cleavage in human epithelial cell lines. *J Infect Dis* 182:85-92.

Chao DT, Korsmeyer SJ (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 16:395-419

Chimienti F, Seve M, Richard S, Mathieu J, Favier A (2001) Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochem Pharmacol* 62:51-62.

Cohen JJ, Duke RC (1984) Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *J. Immunol.* 132:38-42.

Combes R, Balls M, Curren RD, Fischbach M, Fusenig N, Kirkland D, Lasne C, Landolph J, LeBoeuf RA, Marquardt H, McCormick J, Müller L, Rivedal E, Sabbioni E, Tanaka N, Vasseur P, Yamasaki H (1999) Cell transformation assay as predictors of human carcinogenicity, the reports and recommendations of ECVAM, workshop 39. *ATLA* 27: 745-767.

Cosulich SC, Savory PJ, Clarke PR (1999) Bcl-2 regulates amplification of caspase activation by cytochrome *c*. *Curr Biol* 9:147-150.

- DelBino G, Lassota P, Darzynkiewicz Z (1991) The S-phase cytotoxicity of camptothecin. *Exp Cell Res* 193: 27-35.
- DiPaolo JA & Casto (1979) Quantitative studies of *in vitro* morphological transformation of Syrian hamster embryo by inorganic metal salts. *Cancer Res* 39: 1008-1013.
- Dreosti IE (2001) Zinc and the gene. *Mutat Res* 475:161-167.
- Elias Z, Poirot O, Daniere MC, Terzetti F, Marande AM, Dzwigaj S, Pezerat H, Fenoglio I, Fubini B (1989) Cytotoxic and transforming effects of silica particles with different surface properties in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicol in Vitro* 14:409-422.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein. *Cell* 69:119-128.
- Fukamachi Y et al. (1998) Zinc Suppresses Apoptosis of U937 Cells Induced by Hydrogen Peroxide through an Increase of the Bcl-2/Bax Ratio. *Biochem Biophys Res Commun* 246:364-369.
- Ganju N, Eastman A (2003) Zinc inhibits Bax and Bak activation and cytochrome *c* release induced by chemicals inducers of apoptosis but not by death-receptor-initiated pathways. *Cell Death Differ*, 10:652-661.
- Green D.R., Reed J.C. (1998) Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Holcik M, Gibson H, Korneluk RG (2001) XIAP: Apoptotic brake and promising therapeutic target. *Apoptosis* 6:253-261.
- Jankowski-Hennig MA, Clegg MS, Daston GP, Rogers JM, Keen CL (2000) Zinc-Deficient Rat Embryos Have Increased Caspase 3-like Activity and Apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 271:250-256.
- Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G (1999) c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome *c* release. *Genes Dev* 13:1367-1381.
- Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC (1998) Bax directly induces release of cytochrome *c* from isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:4997-5002.
- Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BV (1993) Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73:2013-2026.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997) The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 275:1132-1136.
- Larsen AK, Skladanowski A (1998) Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from uptake to cell death. *Biochim Biophys Acta* 1400: 257-274.
- LeBoeuf RA, Kerckaert GA, Poiley JA & Raineri R (1989) An interlaboratory comparison of enhanced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells cultured under conditions of reduced bicarbonate concentration and PH. *Mutat Res* 222: 205-218.
- Nakatani T, Tawaramoto M, Kennedy DO, Kojima A, Matsui-Yuasa I (2000) Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chem Biol Interact* 125:151-153.
- Pearson WR, Lipman DJ (1988) Improved tools for biological sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2444-2448.

Perry DK, Smyth MJ.; Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG, Hannun YA (1997) Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. *J Biol Chem* 30:18530-18533.

Pienta R.J., Poiley J.A., Lebherz III W.B. (1977) Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens. *Int J Cancer* 19:642-655.

Prendergast GC (1999) Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* 18:2967-2987.

Reed J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.*, 124, 1-6.

Seve M, Chimienti F, Favier A (2002) Role du zinc intracellulaire dans la mort cellulaire programmée: Role of intracellular zinc in programmed cell death. *Pathol Biol* 50:212-221.

Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M, Waalkes MP (2003) Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicological Sciences* 73:294-300.

Soucie EL, Annis MG, Sedivy J, Filmus J, Leber B, Andrews DW, Penn LZ (2001) Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Mol Cell Biol* 21:4725-4736.

Sunderman Jr FW (1995) The influence of zinc on apoptosis. *Ann Clin Lab Sci* 25:134-142.

Tamura T, Sadakata N, Oda T, Muramatsu T (2002) Role of zinc ions in ricin-induced apoptosis in U937 cells. *Toxicol Lett* 132:141-151.

Thornberry N.A., Lazebnik Y. (1998) Caspases: Enemies Within. *Science* 281:1316.

Truong-Tran AQ, Carter J, Ruffin RE, Zalewski PD (2001) The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *Biometals* 14:315-330.

Tu A, Hallowell W, Pallota S, Sivak A, Lubet RA, Curren RD, Avery MD, Jones C, Sedita BA, Huberman E, Tennant R, Spalding J, Kouri RE (1986) An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environ Mutagen* 8: 77-98.

Wyllie AH (1980) Cell death: The significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.

Wyllie AH (1992) Apoptosis and the regulation of cells numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev* 11:95-103.

Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones D.P, Wang X (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Science* 275:1129-1132.

III. LE DI-ETHYLHEXYLPHTALATE (DEHP) AUGMENTE LE RATIO *bcl-2/bax* ET MODIFIE L'EXPRESSION DE *c-myc* DANS LES CELLULES EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN

Cette étude concerne les effets du di(éthylhexyl)phtalate (DEHP) sur l'apoptose dans les cellules SHE. Le DEHP est considéré comme un cancérigène non-génotoxique et l'inhibition de l'apoptose a été évoquée comme un facteur pouvant contribuer à l'hépatocarcinogénèse chez les rongeurs. In vitro, ce composé induit la transformation cellulaire des cellules SHE (Cruciani et al., 1997), ce qui a justifié le choix de cette substance pour l'étude de la relation entre l'apoptose et la transformation cellulaire.

*De précédents travaux réalisés au sein de notre laboratoire ont montré que le DEHP induisait la transformation morphologique des cellules SHE aux concentrations 25 μM et 50 μM (Cruciani et al., 1997). Les effets du DEHP sur l'apoptose et sur l'expression des gènes *bcl-2*, *bax* et *c-myc* ont été étudiés dans la gamme de concentrations 10 - 50 μM (soit 3,9 - 19,5 $\mu\text{g/mL}$) afin de vérifier l'hypothèse d'une implication de l'apoptose dans la transformation cellulaire.*

Tout d'abord, nous avons démontré les propriétés inhibitrices de l'apoptose du DEHP dans les cellules SHE.

L'apoptose a été provoquée dans les cellules SHE, par la déficience en facteurs de croissance, obtenue par la privation de sérum. Dans les cellules SHE cultivées en absence de facteurs de croissance (milieu SF ; « serum free » ou « sans sérum »), l'apoptose survient rapidement. Au bout de 3 heures d'exposition dans un milieu SF, ces cellules présentent déjà les changements morphologiques typiques de l'apoptose (fragmentation de l'ADN et condensation de la chromatine)³.

Dans les cellules pré-traitées avec le DEHP (10-50 μM /24 heures), une diminution de l'apoptose, induite par la privation des facteurs de croissance, est observée aux concentrations 25 μM et 50 μM .

³ Les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN) ont été observés en microscopie à fluorescence après marquage de la chromatine avec des fluorochromes (acridine orange et BET).

Une fois les propriétés inhibitrices de l'apoptose du DEHP démontrées, l'expression des gènes *bcl-2*, *bax* et *c-myc* a été étudiée par RT-PCR sur des cellules ayant été traitées avec le DEHP (10, 25 et 50 μM /24 heures).

Le pré-traitement des cellules par le DEHP induit :

- ♦ une augmentation significative ($P < 0.05$) de l'expression de *bcl-2* à la plus forte concentration testée (50 μM).
- ♦ une diminution significative ($P < 0.05$) de l'expression de *c-myc*, observée à la même concentration (50 μM).
- ♦ aucun changement au niveau de l'expression de *bax*.

*En conclusion, cette étude a confirmé les effets anti-apoptotiques du DEHP dans les cellules SHE. Ces effets s'expliquent par une augmentation du ratio *bcl-2/bax*. Dans les cellules SHE cultivées normalement en présence de facteurs de croissance, le DEHP augmente l'expression de *bcl-2*, sans toutefois modifier l'expression de *bax*.*

*Parallèlement, une diminution de *c-myc* a été observée, démontrant des effets antagonistes de *bcl-2* et de *c-myc*, en réponse au traitement avec le DEHP.*

Les concentrations de DEHP, qui diminuent l'apoptose dans les cellules SHE correspondent aux concentrations auxquelles une induction de la transformation morphologique des cellules SHE a été démontrée.

De même que nos travaux sur le zinc, les résultats obtenus avec le DEHP confortent l'hypothèse qu'un dysfonctionnement de l'apoptose contribuerait à l'augmentation de la transformation morphologique des cellules SHE.

Di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) modifies *bcl-2/bax* ratio and changes *c-myc* expression in Syrian hamster embryo (SHE) cells.

M.A. Maire, C. Rast and P. Vasseur.

Soumise à *Toxicology Letters*.

Abstract

The objective of this work was to study the anti-apoptotic properties of the non-genotoxic rodent carcinogen, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in Syrian hamster embryo (SHE) cells. We demonstrated that a 24hr pre-treatment of SHE cells with 50 μ M DEHP inhibited apoptosis triggered by growth factors deprivation. The RNA expression levels of the regulator genes involved in the apoptotic pathway, *bcl-2*, *bax* and of *c-myc* were measured using RT-PCR. We showed that a 24 hr treatment of SHE cells with 50 μ M DEHP increased ($P<0.05$) the *bcl-2* expression, while *c-myc* expression was decreased. No effect on *bax* expression was observed in the range of 10-50 μ M.

The defective regulation of apoptosis caused by DEHP treatment could contribute to its carcinogenicity.

1 Introduction

The phthalate di-(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP), has been commonly used as a plasticizer in polyvinyl chloride (PVC) resins for manufacturing flexible vinyl products (Wams, 1987). The DEHP can be hydrolysed in mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) which is the most toxic metabolite of DEHP (Doull *et al.*, 1999). The toxicity of DEHP and its active metabolite MEHP, has been the topic of extensive research, especially concerning their carcinogenic and endocrine disrupting properties (Doull *et al.*, 1999 ; Akingbemi *et al.*, 2004 ; Latini *et al.*, 2004).

The carcinogenic potential of DEHP in rodents was established *in vivo* (Melnick *et al.*, 1987 ; Doull *et al.*, 1999) and was considered as the result of non-direct DNA-reactive mechanisms (reviewed in Doull *et al.*, 1999). DEHP induced morphological

transformation of SHE cells and inhibited gap junctional intercellular communication (GJIC) (Mikalsen & Sanner, 1993 ; Tsutui *et al.*, 1993 ; Cruciani *et al.*, 1999), two mechanisms related to *in vivo* carcinogenicity. Hepatocarcinogenesis in response to DEHP is preceded by peroxisome proliferation, hyperplasia and hepatocyte DNA synthesis (Goll *et al.*, 1999 ; Hasmall *et al.*, 1999 ; Corton *et al.*, 2000 ; Roberts *et al.*, 2000). The suppression of apoptosis has also been suggested to contribute to the hepatocarcinogenicity of DEHP (Goll *et al.*, 1999 ; Holmes and Rainsford, 2001; Roberts *et al.*, 2002 ; Kang *et al.*, 2002; Roberts *et al.*, 2004). Mechanisms of apoptotic inhibition by DEHP were not clearly elucidated. The activation of the peroxisome proliferator activated receptor α (PPAR α) was shown to be necessary in the suppression of apoptosis by peroxisome proliferators (PPs) (Roberts *et al.*, 1998 ; 2000 ; 2002 ; Boitier *et al.*, 2003) as apoptosis cannot be suppressed in PPAR α null transgenic mice with PPs-stimulated hepatocytes (Hasmall *et al.*, 2000). Roberts *et al.*, (2004) have reported that more than 261 genes were regulated by TGF β 1 as an apoptotic inducer. Among these genes, many pro- and anti-apoptotic genes related to the mitochondrial pathway (*e.g.* XIAP, Bak, Bad...) could be candidates for the effect of DEHP as a suppressor of TGF β 1-induced apoptosis (Roberts *et al.*, 2004).

The mitochondrial pathway is under control of the Bcl-2 protein family comprising either pro-apoptotic (Bax, Bak, Bad...) or anti-apoptotic (Bcl-2, Bcl-xl...) proteins (Reed, 1994 ; Adams & Cory, 1998 ; Chao & Korsmeyer, 1998). The regulation of apoptosis involves a dynamic balance between these two categories of proteins. Over-expression of the proto-oncogene *c-myc*, has been associated with deregulated cell proliferation and consequently with cancer (for review, Dang *et al.*, 1999). Recent studies supported that *c-myc* had a dual function in proliferation and induction of apoptosis. Over-expression of *c-myc* could induce apoptosis in Rat-1 transfected cell line, deprived of growth factors (Evan *et al.*, 1992) and the loss of its expression or its negative regulation could protect cells against the apoptotic process (Canelle *et al.*, 1997 ; Dong *et al.*, 1997 ; Genestier *et al.*, 1999 ; Adachi *et al.*, 2001).

Moreover, the expression of *bcl-2*, *bax* and *c-myc* are concomitantly regulated (Leng *et al.*, 2000). C-Myc has been involved in the transcriptional expression of *bax* (Mitchell *et*

et al., 2000). The loss of *bax* expression in mice led to the loss of the apoptotic function of c-Myc (Mitchell *et al.*, 2000 ; Soucie *et al.*, 2001 ; Juin *et al.*, 1999 ; Juin *et al.*, 2002 ; Klefstrom *et al.*, 2002). Myc could also be necessary to the activation of Bax and promote the release of cytochrome *c*, a mitochondrial protein which is essential for the activation of the caspase cascade in the apoptotic pathway (Juin *et al.*, 1999 ; Soucie *et al.*, 2001). On the other hand, c-Myc was reported to have antagonist effects with Bcl-2. Overexpression of Bcl-2 inhibits apoptosis induced by c-Myc overexpression (Bissonnette *et al.*, 1992 ; Fanidi *et al.*, 1992).

In the present study, we investigated the effects of DEHP on the expression of two mitochondrial associated genes, *bcl-2* and *bax* and on the transcription factor, *c-myc*, in Syrian hamster embryo (SHE) cells. SHE cells are primary cells, diploid, genetically stable, non-tumorigenic and have metabolic capacities in activating some classes of carcinogens (Alexandre *et al.*, 2003). In SHE cells, apoptosis occurred rapidly in serum-free medium and as a consequence of growth factors deficiency (Alexandre *et al.*, 2000a; 2000b; 2002). In this present work, we confirmed the anti-apoptotic effects of DEHP in SHE cells. The mechanisms involved an increase of the *bcl-2/bax* ratio *via* an up-regulation of *bcl-2* expression at 50 μM of DEHP. The *c-myc* expression decreased at the same concentration. No effect on *bax* expression was observed at DEHP concentrations in the range of 10 μM - 50 μM .

2 Materials and methods

2.1 SHE cell culture

SHE cells were isolated from Syrian hamster embryos at day 13 of gestation using the procedure described by Pienta *et al.*, (1977) and in accordance with the modifications suggested by Elias *et al.*, (1989). Stock cells were preserved in liquid nitrogen. After thawing, passage-2 primary cells were pre-cultured until 80% confluency. Normal culture conditions for these cells are Dubelcco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) supplemented with 12 % foetal calf serum (SVF) (Hyclone) for preculture,

2 g/L NaHCO₃ and 1 % antibiotics (penicillin-streptomycin) at 37°C in a 10 % CO₂ humidified atmosphere and pH 7.0. No phenol red was added in the culture medium.

2.2 DNA fragmentation analysis

2.2.1 Treatment

Cells used for DNA fragmentation analysis were sampled from a monolayer during the growing phase, 48h after seeding. Cells were trypsinized and treated during replating with DEHP at concentrations 25 µM and 50 µM for 24h. Then, culture medium was removed and cells were transferred in a serum free (SF) medium for 3 hours. DEHP (C.A.S. No. 117-81-7) was purchased from (Aldrich Chemicals). DEHP was dissolved in DMSO and DMSO was used at a final concentration of 0.1%.

2.2.2 Fluorescence microscopy

After treatment, the cells and the culture media were harvested and centrifuged at 1000g for 10 min. Cell pellets were stained with the fluorescent probes acridine orange (0.15 mg/mL in PBS) and ethidium bromide (0.25 mg/mL in PBS) and observed using fluorescence microscopy (495 nm). Living cells, which are permeable only to acridine orange, show a green nucleic staining while dead cells, permeable also to ethidium bromide, have their nuclei colored in red. The cells with a condensed or fragmented chromatin pattern characteristic of apoptosis were counted as apoptotic, whereas those with a homogeneous chromatin pattern were counted as normal. Apoptotic cells were expressed as a percentage of total cells scored.

Each experiment was repeated in at least three independent series of assays. For each experiment, 3 slides per tested concentration were used and 100 cells per slide were scored. Statistical differences between control and treated cells were evaluated with Student's *t*-test. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$.

2.3 Expression of *bcl-2*, *bax* and *c-myc* RNA

2.3.1 Treatment

Cells used for RT-PCR analysis were sampled from a monolayer during the growing phase, 48h after seeding. Cells were trypsinized and treated during reseeding with 10 μ M, 25 μ M and 50 μ M DEHP concentrations (Aldrich Chemicals) for 24h in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum at pH 7.0.

2.3.2 RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from cells with Extract-All solution according to the manufacturer's instructions (Eurobio). The total RNA was quantified by optical density measurement at 260 nm and 280 nm. The integrity of RNA was confirmed by running 1 μ g RNA on a 1% agarose gel. The cDNA was synthesized from 1 μ g of total RNA using oligo d(T) as a primer and MuLV Reverse Transcriptase (50U) in a volume of 20 μ L. The RT-PCR program used was : 30 min, 42°C (cDNA synthesis); 5 min, 94°C (denaturation). c-DNA samples were subjected to PCR amplification using the RNA PCR Core kit and Taq-polymerase (P.E. Applied biosystem) with *bcl-2*, *bax* and *c-myc* primers specific to the SHE cell sequences, *actin* primer and *gapdh* primer as internal controls (Eurogentec) (Table 1). The choice of oligonucleotides was carried out according to the sequences available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

Genes	Sequences	Size of PCR products (bp)	PCR cycles	Accession N° EMBL-EBI
<i>bcl-2</i>	5'-TAT-AAG-CTG-TCA-CAG-AGG-GGC-3' 5'-TGG-ATC-CAG-GTG-TGC-AGA-TGC-3'	500 bp	35	AJ582074
<i>bax</i>	5'-TCC-ACC-AAG-AAG-CTG-AGC-GAG-3' 5'-CCA-TCT-TCT-TCC-AGA-TGG-TGA-3'	411 bp	40	AJ582075
<i>c-myc</i>	5'-GAT-CAG-CTG-SAG-ATG-RTG-ACC-3' 5'-TTG-CGG-TTG-TTG-CTG-ATC-TG-3'	734 bp	40	AJ582076
<i>actine</i>	3'-GGA-YGA-YAT-GGA-GAA-RAT-CTG-G-5' 3'-CCT-GYT-TGC-TGA-YCC-ACA-TCT-G-5'	845 bp	33 (<i>bcl-2</i>) 28 (<i>bax</i>)	
<i>gapdh</i>	5'-TCC-ATG-ACA-ACT-TTG-GCA-TCG-TGG-3' 5'-GTT-GCT-GTT-GAA-GTC-ACA-GGA-GAC-3'	377 bp	30	

Table 1 : Sequences of primers and cycles used in RT-PCR analyse of *c-myc*, *bax* and *bcl-2* mRNA and the corresponding accession numbers EMBL-EBI.

After an initiated denaturation at 94°C for 5 min, 40 temperature cycles were performed for *bax* and *c-myc*, and 35 cycles for *bcl-2*, at either 55°C (*bax* primers) or 60°C (*bcl-2* and *c-myc* primers) for 30s, 72°C for 30s and 94°C for 30s. After the last cycle, a final extending step at 72°C for 5min was added.

The PCR products have been sequenced and cloned as described previously in Maire *et al.*, (2004). The sequences of the studied genes have been submitted to EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) for registration. Accession numbers are for AJ582074 (*bcl-2*), AJ582075 (*bax*), and AJ582076 (*c-myc*).

The products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Signals were analyzed by densitometry and data were expressed as the ratios of the transcripts corresponding to the studied gene to the control gene (*actine* for *bcl-2* and *bax* or *gapdh* for *c-myc*).

3 Results

3.1 Effects of DEHP on apoptosis

SHE cells grown in serum-deprived medium for 3h showed typical features of apoptosis, such as chromatin condensation and nuclear fragmentation, after staining with the flurochromes acridine-orange and ethidium bromide (figure 1B). A high percentage of apoptotic cells (31 %) was shown in serum deprived conditions after 3h treatment compared to control (3%) (table 2). A pre-treatment with DEHP (25 µM and 50 µM) for 24h reduced apoptosis triggered by serum deprivation (figure 1C). Anti- apoptotic effects were significant at 50 µM DEHP ($P<0.05$). No effect was registered in SHE cells pre-treated for 24h, with the control solvent DMSO (0.1%).

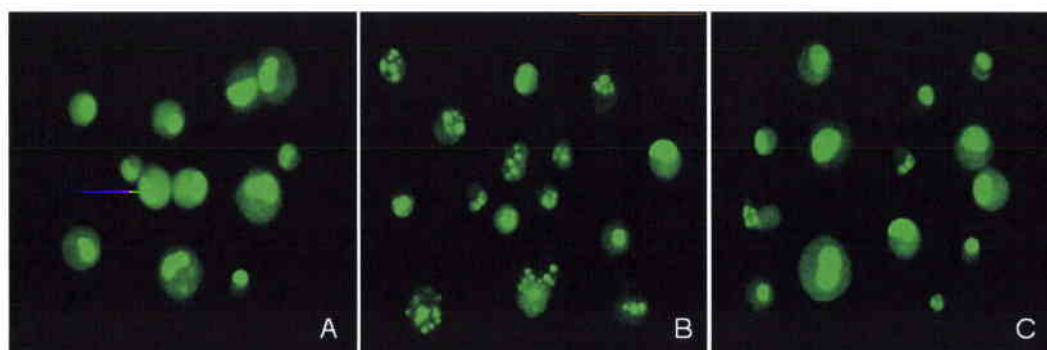


Figure 1 : Fluorescence microscopy observations of alive SHE cells exposed in serum-supplemented medium (A) or in serum free-medium (B). Picture (C) showed SHE cells pre-treated with 50 µM DEHP exposed in Serum-free medium for 3 hours. Sample were stained with a mixture of acridine-orange and ethidium bromide ; apoptotic cells were revealed by their condensed chromatin and fragmented nuclei. Living cells are colored in green, while dead cells (not shown) are red.

	% apoptosis	
a. Control SHE	3	± 1.6
b. Serum Free (SF)	31	± 1.5
c. SF + cells pre-treated with DMSO	33	± 5.0
d. SF + cells pre-treated with 25 µM DEHP	18	± 10.3
e. SF + cells pre-treated with 50 µM DEHP	15	± 2.6 *

Table 2 : Percentages of apoptotic cells quantified by nuclear modifications observed under a fluorescence microscope in SHE cells stained with acridine orange and ethidium bromide. Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3 at each point). * $P < 0.05$ vs. control.

1.1 Expression of *bcl-2*, *bax* and *c-myc* RNA

A concentration-dependent increase in *bcl-2* expression was observed in SHE cells treated with DEHP in the range of 25-50 µM in every independent experiments carried out. The increase in *bcl-2* expression was significant ($P < 0.05$) at the concentration of 50 µM DEHP (figure 2) with a 1.7-fold increase in *bcl-2* RNA level compared to the control solvent.

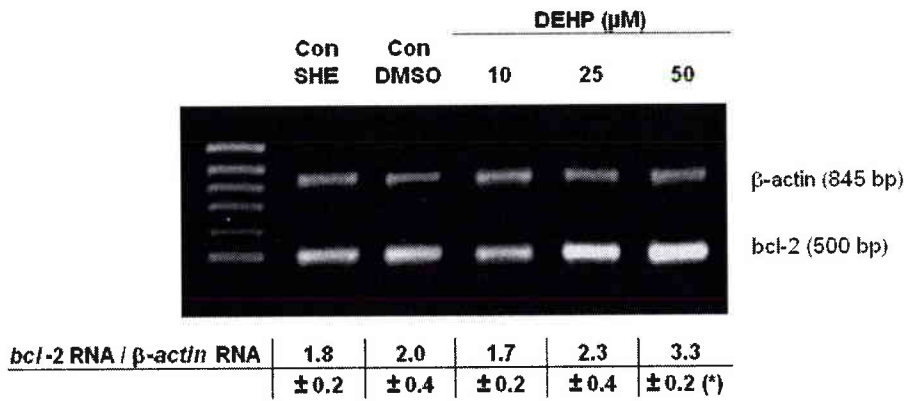


Figure 2 : RT-PCR products on agarose gel showing RNA expression of *bcl-2* and *β-actin* genes in SHE cells treated with 10 µM, 25 µM or 50 µM DEHP for 24 hr. Densitometric quantification of changes in *bcl-2/β-actin* ratio are expressed by means +/- S.E.M. of values obtained in separate experiments (n = 3 at each point) * $P < 0.05$ vs. control.

On the other hand, no significant effect on *bax* was observed in cells treated with DEHP in the range of 10-50 µM of DEHP (figure 3). The increase of the *bcl-2* expression led to a 2.3-fold increase of the *bcl-2/bax* ratio with 25 µM DEHP and to a 3.6-fold increase with 50 µM DEHP.

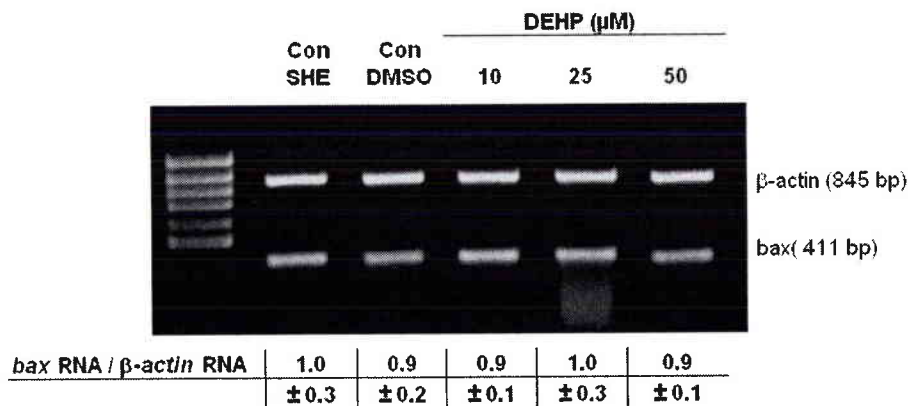


Figure 3 : RT-PCR products on agarose gel showing RNA expression of *bax* and *β-actin* genes in SHE cells treated with 10 µM, 25 µM or 50 µM DEHP for 24 hr. Densitometric quantification of changes in *bax/β-actin* ratio are expressed by means +/- S.E.M. of values obtained in separate experiments (n = 3 at each point) * $P < 0.05$ vs. control.

A significant ($P < 0.05$) down-regulation of *c-myc* RNA expression at the concentration of 50 µM DEHP ($P < 0.05$) was observed. Cells exhibited a 2.7-fold

decrease in *c-myc* RNA level after treatment with 50 μM DEHP compared to the control group (figure 3). No effect was registered at 10 μM and 25 μM DEHP.

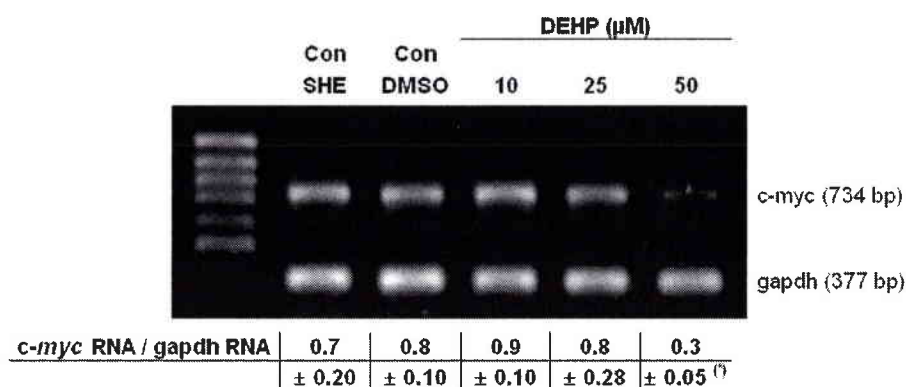


Figure 4 : RT-PCR products on agarose gel showing RNA expression of *c-myc* and *gapdh* genes in SHE cells treated with 10 μM , 25 μM or 50 μM DEHP for 24 hr. Densitometric quantification of changes in *c-myc/gapdh* ratio are expressed by means \pm S.E.M. of values obtained in separate experiments ($n = 3$ at each point) * $P < 0.05$ vs. control.

4 Discussion

In this work, the effects of the non-genotoxic rodent carcinogen DEHP, have been studied on the normal Syrian hamster embryo cells. We showed that an exposure with 50 μM DEHP on normal SHE cells caused an imbalance of the *bcl-2/bax* expression ratio, accompanied with a decrease of *c-myc* expression. The increase of the *bcl-2/bax* ratio may explain the anti-apoptotic effects of DEHP (50 μM) in SHE cells deprived of growth factors.

Little is known about the mechanisms of inhibition of apoptosis by DEHP. Bcl-2 and Bax are two mitochondrial associated proteins involved in the regulation of apoptosis (Chao & Korsmeyer, 1998 ; Borner 2003). The anti-apoptotic protein Bcl-2 inhibits the major effects of Bax by keeping closed the mitochondrial transition pores and preventing the release of cytochrome c and the subsequent activation of caspases cascade (Yang *et al.*, 1997; Antonsson *et al.*, 1997 ; Kluck *et al.*, 1997 ; Brady and Gil-Gomez, 1998).

In this work, we have shown that the expression of *c-myc* was down-regulated at DEHP concentration which increased *bcl-2* expression and inhibited apoptosis in normal SHE cells. Our results demonstrated that the anti-apoptotic chemical DEHP decreased *c-myc* expression at concentration which increase *bcl-2*, and support a involvement of *c-myc* in the apoptotic process.

The proto-oncogene *c-myc* which is usually involved in cell proliferation and cell cycle progression, has been shown to activate apoptosis (Nilsson *et al.*, 2003 ; Vermeulen *et al.*, 2003).

Links between c-Myc and the Bcl-2 protein family have not been clearly established. While *bax* contains c-Myc response element in its promoter (Mitchell *et al.*, 2000), no such *c-myc* responsive sequence has been found in *bcl-2*. c-Myc was shown to antagonize Bcl-2 effects, as Bcl-2 transfection suppressed apoptosis induced by over-expression of *c-myc* (Bissonette *et al.*, 1992). Our results confirm these antagonistic effects and suggest the hypothesis that *bcl-2* could contain c-Myc response element in its promoter as it was shown with *bax* (Mitchell *et al.*, 2000).

While most papers dealt with the induction of apoptosis by over-expression of c-Myc, only a few works have reported that loss of *c-myc* or negative regulation of *c-myc* could be associated with the protection against apoptotic process (Dong *et al.*, 1997 ; Canelles *et al.*, 1997 ; Genestier *et al.*, 1999 ; Adachi *et al.*, 2001). Dong *et al.*, (1997) have reported that the loss of *c-myc* in UC cells, an apoptosis-resistant variant from the human leukaemia monocytic U937 cells, was associated with the resistance to apoptosis. It has also been demonstrated that apoptosis and FasL expression could be inhibited *via* a downregulation of c-Myc expression in human T cells or T cell hybridomas (Genestier *et al.*, 1999). Moreover, use of antisense oligonucleotides to reduce c-Myc expression in U937 cells, suppressed etoposide-induced apoptosis as well as TNF- α -induced apoptosis, suggesting that c-Myc could play a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis (Dong *et al.*, 1997).

In 1997, Dhalluin *et al.*, have already demonstrated that Bcl-2 oncoprotein was up-regulated parallel to an inhibition of apoptosis in Syrian hamster embryo cells which have

been exposed to the tumour promotor TPA (12-O-tetradecanoyl-13-phorbol ester) after a pre-treatment with DEHP. In our work, we have demonstrated that DEHP, tested alone, caused modifications in the *bcl-2* gene expression, showing that the mitochondrial pathway could actively participate to the inhibition of apoptosis by DEHP.

DEHP-induced hepatocarcinogenesis in rodents has been associated with the suppression of apoptosis (James *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 1998 ; Hasmall *et al.*, 1999 ; Goll *et al.*, 1999 ; Roberts *et al.*, 2002 ; Boitier *et al.*, 2003 ; Roberts *et al.*, 2004). This is in line with the fact that the non-elimination of altered cells could contribute to carcinogenesis in rodents. Previous studies in our lab have shown that DEHP induced pre-neoplastic transformation of SHE cell (Cruciani *et al.*, 1999). The concentrations inducing cell transformation coincided with the ones which decreased apoptosis. So, the hypothesis that defective regulation of apoptosis caused by DEHP may be related with the increase of SHE cell transformation can be put forward.

In conclusion, we found that DEHP caused defective regulation of apoptosis by increasing *bcl-2/bax* expression ratio. Parallel to this, a modification of the *c-myc* expression was observed. Our work supports the hypothesis that the defective regulation of apoptosis may promote disordered cell growth and thereby contribute to carcinogenesis.

Acknowledgments

This study was funded by the French Ministry of Research and Direction for Prevention of Pollution and Environmental Risk of the Ministry of the Environment

Reference List

- Adachi S, Obaya AJ, Han Z, Ramos-Desimone N, Wyche JH, Sedivy JM (2001), c-Myc is necessary for DNA damage-induced apoptosis in the G₂ phase of the cell cycle, *Molecular and Cellular Biology* 21: 4929-4937.
- Adams JM, Cory S (1998), The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, *Science* 281: 1322-1326
- Akingbemi BT, Ge R, Klinefelter GR, Zirkin BR, Hardy MP (2004), Phthalate-induced Leydig cell hyperplasia is associated with multiple endocrine disturbances, *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 775-780.

- Alexandre S, Rast C, Maire MA, Orfila L, Vasseur P (2003), ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation, *Toxicology Letters* 142: 77-87.
- Alexandre S, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P (2000a), Detection of apoptosis induced by topoisomerase inhibitors and serum deprivation in syrian hamster embryo cells, *Experimental Cell Research* 255: 30-39.
- Alexandre S, Rast C, Nguyen-Ba G, Poirier GG, Vasseur P (2000b), PARP degradation in apoptotic Syrian hamster embryo (SHE) cells compared to HL60 cell line, *Biochimie* 82: 1115-1122.
- Alexandre S, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P (2002), ZnCl₂ prevents c-myc repression and apoptosis in serum-deprived Syrian hamster embryo cells, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11: 191-196.
- Antonsson B, Conti F, Ciavatta AM, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, Bernasconi L, Bernard A, Mermod JJ, Mazzei G, Maundrell K, Gambale F, Sadoul R, Martinou JC (1997), Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2, *Science* 277: 370-372.
- Bissonnette RP, Echeverri F, Mahboubi A, Green DR (1992), Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2, *Nature* 359: 552-554.
- Boitier E, Gautier JC, Roberts RA (2003), Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical model: relevance for human health and disease, *Comparative Hepatology* 2: 1-15.
- Borner C (2003), The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions, *Molecular Immunology* 39: 615-647.
- Brady HJ, Gil-Gomez G (1998), Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 30: 647-650.
- Canelles M, Delgado MD, Hyland KM, Lerga A, Richard C, Dang CV, Leon J (1997), Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells, *Oncogene* 14: 1315-1327.
- Chao DT, Korsmeyer SJ (1998), BCL-2 family: regulators of cell death, *Annual Review of Immunology* 16: 395-419.
- Corton JC, Lapinskas PJ, Gonzalez FJ (2000), Central role of PPAR[alpha] in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 448: 139-151.
- Cruciani V, Rast C, Alexandre S, Nguyen-Ba G, Vasseur P (1999), Peroxisome proliferator-induced transformation of Syrian hamster embryo cells: influence of experimental procedures, *Toxicology in Vitro* 13: 445-457.
- Dang CV, Resar LMS, Emison E, Kim S, Li Q, Prescott JE, Wonsey D, Zeller K (1999), Function of the c-Myc Oncogenic Transcription Factor, *Experimental Cell Research* 253: 63-77.
- Dhalluin S, Gate L, Vasseur P, Tapiero H, Nguyen-Ba G (1997), Dysregulation of ornithine decarboxylase activity, apoptosis and Bcl-2 oncoprotein in Syrian hamster embryo cells stage-exposed to di(2-ethylhexyl)phthalate and tetradecanoylphorbol acetate, *Carcinogenesis* 18: 2217-2223.
- Dong J, Naito M, Tsuruo T (1997), c-Myc plays a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells, *Oncogene* 15: 639-647.

- Doull J, Cattley R, Elcombe C, Lake BG, Swenberg J, Wilkinson C, Williams G, van Gemert M (1999), A cancer risk assessment of di(2-ethylhexyl)phthalate: application of the new U.S. EPA risk assessment guidelines, *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 29: 327-357.
- Elias Z, Poirot O, Daniere MC, Terzetti F, Marande AM, Dzwigaj S, Pezerat H, Fenoglio I, Fubini B (1989), Cytotoxic and transforming effects of silica particles with different surface properties in Syrian hamster embryo (SHE) cells, *Toxicology in Vitro* 14: 409-422.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ, Hancock DC (1992), Induction of apoptosis in fibroblasts by *c-myc* protein, *Cell* 69: 119-128.
- Fanidi A, Harrington EA, Evan GI (1992), Cooperative interaction between *c-myc* and *bcl-2* proto-oncogenes, *Nature* 359: 554-556.
- Genestier L, Kasibhatla S, Brunner T, Green DR (1999), Transforming growth factor β 1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of *c-Myc*, *Journal of Experimental Medicine* 189: 231-239.
- Goll V, Alexandre E, Viollon-Abadie C, Nicod L, Jaeck D, Richert L. (1999), Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures, *Toxicology and Applied Pharmacology* 160: 21-32.
- Hasmall SC, James NH, Macdonald N, West D, Chevalier S, Cosulich SC, Roberts RA (1999), Suppression of apoptosis and induction of DNA synthesis in vitro by the phthalate plasticizers monoethylhexylphthalate (MEHP) and diisononylphthalate (DINP) a comparison of rat and human hepatocytes in vitro, *Archives of Toxicology* 73: 451-456.
- Hasmall SC, James NH, Macdonald N, Gonzalez, F.J., Peters, J.M., Roberts RA (2000), Suppression of mouse hepatocyte apoptosis by peroxisome proliferators : role of PPAR α and TNF α , *Mutation Research* 448: 193-200.
- Holmes TJ, Rainsford KD (2001), Differential effects of non-genotoxic carcinogens and proliferating agents on cell growth, survival and apoptosis in hepatic cells in vitro, *Life Sciences* 69: 2975-2992.
- James NH, Soames AR, Roberts RA (1998), Suppression of hepatocyte apoptosis and induction of DNA synthesis by the rat and mouse hepatocarcinogen diethylhexylphthalate (DEHP) and the mouse hepatocarcinogen 1,4-dichlorobenzene (DCB), *Archives of Toxicology* 72: 790.
- Juin P, Hueber AO, Littlewood T, Evan G (1999), *c-Myc*-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome *c* release, *Genes & Development* 13: 1367-1381.
- Juin P, Hunt A, Littlewood T, Griffiths B, Swigart LB, Korsmeyer S, Evan G (2002), *c-Myc* functionally cooperates with Bax to induce apoptosis, *Molecular and Cellular Biology* 22: 6158-6169.
- Kang KS, Lee YS, Kim HS, Kim SH (2002), Di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced cell proliferation is involved in the inhibition of gap junctional intercellular communication and blockage of apoptosis in mouse Sertoli cells, *Journal of Toxicology and Environmental Health, part A* 65: 447-459.
- Kleefstrom J, Verschuren EW, Evan G (2002), *c-Myc* augments the apoptotic activity of cytosolic death receptor signaling by engaging the mitochondrial apoptotic pathway, *The Journal of Biochemistry* 277: 43224-43232.
- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD (1997), The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science* 275: 1132-1136.

- Latini G, Verroti A, De Felice C (2004), Di-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption : a review, *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic disorders* 4: 37-40.
- Leng Y, Gu ZP, Cao L (2000), Apoptosis induced by droloxifene and *c-myc*, *bax* and *bcl-2* mRNA expression in cultured luteal cells of rats, *European Journal of Pharmacology* 409: 123-131.
- Maire M.A., Rast C., Pagnout C., Vasseur P., (2004), Changes in expression of Bcl-2 and Bax in Syrian hamster embryo (SHE) cells treated exposed to ZnCl₂, *Archives of Toxicology*, in press.
- Melnick RL, Morrissey RE, Tomaszewski KE (1987), Studies by the National Toxicology Program on di(2-ethylhexyl)phthalate, *Toxicology and Industrial Health* 3: 99-118.
- Mikalsen SO, Sanner T (1993), Intercellular communication in colonies of Syrian hamster embryo cells and the susceptibility for morphological transformation, *Carcinogenesis* 14: 251-257.
- Mitchell KO, Ricci MS, Miyashita T, Dicker DT, Jin Z, Reed JC (2000), Bax is a transcriptional target and mediator of c-Myc-induced apoptosis, *Cancer Research* 60: 6318-6325.
- Nilsson JA, Cleveland JL (2003), Myc pathways provoking cell suicide and cancer, *Oncogene* 22: 9007-9021.
- Pienta R.J., Poiley J.A., Lebherz III W.B. (1977), Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens, *International Journal of Cancer* 19: 642-655.
- Reed JC (1994), Bcl-2 and the regulation of programmed cell death, *The journal of Cell Biology* 124: 1-6.
- Roberts RA, Chevalier S, Hasmall SC, James NH, Cosulich SC, Macdonald N (2002), PPAR α and the regulation of cell division and apoptosis, *Toxicology* 181-182: 167-170.
- Roberts RA, James NH, Hasmall SC, Holden PR, Lambe K, Macdonald N, West D, Woodyatt NJ, Whitcome D (2000), Apoptosis and proliferation in non-genotoxic carcinogenesis: species differences and role of PPAR α , *Toxicology Letters* 112-113: 49-57.
- Roberts RA, James NH, Woodyatt NJ, Macdonald N, Tummey A. (1998), Evidence for the supression of apoptosis by the peroxisome proliferato activated receptor alpha (PPAR α), *Carcinogenesis* 19: 43-48.
- Roberts RA, Michel C, Coyle B, Freathy C, Cain K, Boitier E (2004), Regulation of apoptosis by peroxisome proliferators, *Toxicology Letters* 149: 37-41.
- Soucie EL, Annis MG, Sedivy J, Filmus J, Leber B, Andrews DW, Penn LZ (2001), Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria, *Molecular and Cellular Biology* 21: 4725-4736.
- Tsutsui T, Watanabe E, Barrett JC (1993), Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis* 14: 611-618.
- Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR (2003), Cell cycle and apoptosis, *Cell Proliferation* 36: 165-175.
- Wams TJ (1987), Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant - a review, *The Science of The Total Environment* 66: 1-16.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X (1997), Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked, *Sciences* 275: 1129-1132.

IV. L'ACIDE 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIQUE (2,4-D) INDUIT LA TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE DES CELLULES EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN

Cette étude consistait à vérifier, si le 2,4-D, une substance apparentée au DEHP par ses propriétés cancérogènes, induisait la transformation morphologique des cellules SHE avec en parallèle une inhibition de l'apoptose.

Le 2,4-D est considéré comme un cancérogène non-génotoxique et comme un proliférateur de peroxysomes hépatiques. Ces propriétés communes avec le DEHP ont motivé notre choix pour cette substance.

Tout d'abord, les effets du 2,4-D sur la transformation morphologique des cellules SHE, ont été étudiés dans la gamme de concentrations (4,5 - 22,6 μM soit 1 - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Le 2,4-D a été appliqué pendant 7 jours et une **augmentation significative ($P < 0,01$) et dose-dépendante du taux de transformation a été observée aux concentrations 2,5 et 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.**

Le 2,4-D s'est révélé peu toxique à ces concentrations, comme en témoignent les taux d'efficacité de clonage, proches de ceux des témoins.

Parallèlement, un traitement de 7 jours avec le benzo(a)pyrène (4 μM soit 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilisé comme contrôle positif, augmente significativement ($P < 0,01$) la transformation morphologique des cellules SHE.

Les effets du 2,4-D sur l'apoptose⁴ ont été étudiés aux concentrations 1 - 2,5 - 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (traitement de 5 et 24 heures).

Afin d'identifier des effets anti-apoptotiques éventuels du 2,4-D, les cellules ont été pré-traitées (24 heures) avec des concentrations de 2,4-D, qui induisent la transformation cellulaire, puis exposées à un milieu dépourvu de facteur de croissance (serum free) (3 heures).

⁴ Les changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation de la chromatine et fragmentation de l'ADN) ont été observés en microscopie à fluorescence après marquage de la chromatine avec des fluorochromes (acridine orange et BET).

Le 2,4-D n'a pas d'effet sur l'apoptose, aux concentrations provoquant la transformation morphologique.

Ce n'est qu'à de très fortes concentrations (1-5 mM soit 221-1105 µg/mL) que le 2,4-D présente les effets apoptotiques décrits dans la littérature. Un fort taux de mortalité est observé à des concentrations supérieures (10-15 mM soit 2210-3315 µg/mL).

L'étude de l'expression des gènes *bcl-2*, *bax* et *c-myc* a été réalisée en RT-PCR sur des cellules ayant été traitées avec le 2,4-D (1 - 2,5 - 5 µg/mL/5 heures).

Ce traitement :

- ♦ n'a eu aucun d'effet sur l'expression de *bcl-2* et de *bax*, ce qui en accord avec l'absence d'effets apoptotiques observée.
- ♦ provoque une augmentation significative ($P < 0,05$) de l'expression de *c-myc* aux concentrations 2,5 et 5 µg/mL, concentrations auxquelles la transformation cellulaire est induite.

Conclusion

*Ce travail a mis en évidence le potentiel transformant du 2,4-D. Aucun effet sur l'apoptose, ni sur l'expression des gènes *bax* et *bcl-2*, n'a été observé suite à un traitement avec cette substance aux concentrations induisant la transformation morphologique des cellules SHE.*

*Une augmentation significative de l'expression de *c-myc* a été montrée aux concentrations de 2,4-D induisant la transformation morphologique. Dans cette étude, l'augmentation de l'expression de *c-myc* reste spécifique au 2,4-D et n'est pas observée avec un cancérigène type comme le BaP. En effet, nous avons à nouveau vérifié que l'expression de *c-myc* n'était pas augmentée par le BaP, conformément aux résultats obtenus précédemment.*

*En conclusion, le 2,4-D induit la transformation cellulaire mais sans inhiber l'apoptose. Le dérèglement de l'expression de *c-myc*, pourrait être un des facteurs de la transformation cellulaire induite par le 2,4-D.*

*Si le 2,4-D partage avec le DEHP les propriétés de proliférateur de peroxysomes hépatiques et de cancérigène épigénétique, ses mécanismes de toxicité cellulaire diffèrent, notamment en ce qui concerne l'expression de *bcl-2* et l'expression de *bax*, qui contrôlent l'apoptose, et celle de *c-myc* qui est augmentée, alors qu'elle diminue avec le DEHP.*

2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation.

M.A. Maire, C. Rast, and P. Vasseur.

Soumise à *Environmental Toxicology and Pharmacology*

Abstract

The aim of this work was to evaluate the transforming potential of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). 2,4-D was shown to significantly induce cell transformation at 2.5 µg/mL and 5 µg/mL. These concentrations also increase the expression of the transcription factor *c-myc* measured using RT-PCR.

The effects of 2,4-D on apoptosis were investigated. Cytohistochemistry using the fluorochromes acridine orange and ethidium bromide, was used to observe apoptotic characteristics of DNA fragmentation. No effect of 2,4-D on induction or inhibition of apoptosis was found at 2,4-D concentrations inducing cell transformation. This was confirmed by unchanged expressions of *bcl-2* and *bax*, two regulator genes of apoptosis. Induction of apoptosis effects in SHE cells was registered at concentrations too higher in the range of 220-3500 µg/mL.

1. Introduction

The Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay is used for the detection of chemical carcinogenicity *in vitro*. This assay is based on the conversion of normal to preneoplastic cells (DiPaolo *et al.*, 1971). In SHE cells, which are normal, diploid and metabolically competent, phenotypic changes occur rapidly after exposure to chemical carcinogens. The morphologically-transformed phenotype is characterized by the loss of contact inhibition and a random orientation pattern of growth in three dimensions. After subcultures, cells with a morphologically transformed phenotype led to the formation of tumors when transplanted back into newborn hamsters which validated morphological transformation of colonies as a predictive criterion for carcinogenicity in

vivo (Berwald & Sachs, 1963, 1965; Takahashi *et al.*, 2002). The SHE cell system also provides a suitable model for the study of the mechanisms of carcinogens and in particular epigenetic mechanisms of non-genotoxic carcinogens, which are less known than genotoxic carcinogens. Gap junctions inhibition and ornithine decarboxylase augmentation have been associated with SHE cell transformation (Cruciani *et al.*, 1997 ; Dhalluin *et al.*, 1997 ; Rivedal *et al.*, 2000). Studies on oncogenes expression have been investigated and the deregulated activation of cellular growth-related oncogenes such as *c-myc* have been correlated to neoplastic transformation in several cell systems : SHE cells (Ebert *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 2002), C3H/10T^{1/2} (Parfett *et al.*, 2000), rat liver cell line TRL 1215 (Chen *et al.*, 2001), BALB/3T3 (Fang *et al.*, 2002).

The defective regulation of apoptosis, an active program cell death, has also been proposed as a mechanism, which could enhance cell transformation of chemicals carcinogens (Alexandre *et al.*, 2003).

2,4-D is a selective systemic auxin-type herbicide extensively used throughout the world for the past 50 years and whose carcinogenicity, mutagenicity and genotoxicity were the subject of conflicting results. Most studies have shown a moderate toxicity of 2,4-D on mammals. In 1999, three reports on 2,4-D genotoxicity (Charles *et al.*, 1999a ; Charles *et al.*, 1999b ; Gollapudi *et al.*, 1999) gave negative results on classical mutagenicity and cytogenetic assays (e.g. Ames test, micronuclei, HGPRT locus, unscheduled DNA synthesis). However, induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges (SCE) have been reported on mice in recent studies (Amer & Aly, 2001 ; Madrigal-Bujaidar *et al.*, 2001). Concerning its carcinogenicity, data are not sufficient to draw definitive conclusions and it could not be concluded that 2,4-D induced pre-neoplastic and neoplastic lesions on dogs and rodents after subchronic dietary exposure (Charles *et al.*, 1996a ; Charles *et al.*, 1996b ; for review, in Garabrant & Philbert, 2002). On the other hand, 2,4-D was associated with soft tissues sarcoma, non-Hodgkin's lymphoma and Hodgkin's disease in some epidemiological studies (Garabrant & Philbert, 2002). Studies on 2,4-D toxicity demonstrated that the addition of surfactants in commercial formulations increased the toxicity of the herbicide, and also raised the problem of impurities produced during the synthesis of the herbicide (Oakes & Pollack, 1999 ; Holland *et al.*, 2002 ; Arias, 2003). Besides the problem of toxic effects caused by impurities, the question of the carcinogenic potential of 2,4-D itself is posed.

2,4-D induced hepatic peroxisome proliferation in rodents (WHO, 1984 ; Mikalsen *et al.*, 1990). This mechanism has been suggested to explain the carcinogenicity of some HPPs *via* an inhibition of apoptosis (Goll *et al.*, 1999 ; Holmes and Rainsford, 2001 ; Roberts *et al.*, 2002 ; Kang *et al.*, 2002 ; Roberts *et al.*, 2004). Apoptosis was shown to be defective after peroxisome proliferator (PPs) treatment such as the hypolipidaemic drug, nafenopin, and the phthalate plasticizer 2-diethylhexylphthalate (Hasmall *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2002); the survival of damaged cells was suggested to contribute to hepatocarcinogenesis. To our knowledge no study has reported the anti-apoptotic effects of 2,4-D. On the opposite side, 2,4-D was shown to induce apoptosis at high concentrations (1-16 mM)(table 1) ; classic manifestations such as mitochondrial membrane potential disruption, release of cytochrome *c*, activation of caspase-3 and DNA fragmentation have been described following 2,4-D treatment in several cell types, e.g. lymphoid organs (Kaioumova *et al.*, 2001a), human lymphocytes (Kaioumova *et al.*, 2001b), cerebral granule cells (De Moliner *et al.*, 2002) and in HepG2 cells (Tuschl & Schwab, 2003).

Furthermore, toxicity of 2,4-D has been studied in the range from 50 µg/mL to 3500 µg/mL (0.2 - 16 mM). Low doses of 2,4-D which are non-cytotoxic and more relevant to environmental concentrations needed to be evaluated (WHO, 1984 ; Holland *et al.*, 2002).

In this study, we investigated effects of low concentrations of 2,4-D (1 to 5 µg/mL). The transforming cell potency of 2,4-D (98%) on the SHE cell transformation assay and its effects on apoptosis were evaluated. 2,4-D was shown to induce cell transformation. It also increased the expression of *c-myc* RNA. Benzo(a)pyrene, a genotoxic carcinogen, was used as positive control for morphological transformation but no effect on *c-myc* expression has been registered. No effect on apoptosis and on the expression of mitochondria-associated genes *bax* and *bcl-2* was observed at 2,4-D concentrations inducing cell transformation.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

2,4-D (98% purity) (C.A.S. n° 94-75-7) was purchased from Sigma (Lyon, France) and dissolved in water. Benzo(a)pyrene (C.A.S. n° 50-32-8) was purchased from Sigma-Aldrich and dissolved in DMSO (C.A.S. No. 67-68-5) (Prolabo-VWR, Strasbourg). DMSO was used at a final concentration of 0.02%, which had no effect on cell response. The chemicals were diluted in culture medium just before use. The fluorochromes acridine orange and ethidium bromide (BET) were purchased from Molecular Probes-Invitrogen (Cergy-Pontoise, France) and Sigma (Lyon, France), respectively.

2.2. SHE cell culture

SHE cells were isolated from Syrian golden hamster embryo at day 13 of gestation using the procedure described by Pienta *et al.* (1977) and in accordance with the modifications suggested by Elias *et al.* (1989). The cells were grown in Dubbelco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco-Invitrogen, Cergy Pontoise) containing 12% foetal calf serum (FCS) (Hyclone), 2 g/L de NaHCO₃, and 1% antibiotics (penicillin-streptomycin) (Gibco-Invitrogen, Cergy Pontoise) at 37°C in a 10% CO₂ humidified atmosphere and pH 7.0. No phenol red was added in the medium culture.

2.3. Transformation assay

The transforming potency of 2,4-D was studied in a range of concentrations from 1 µg/mL to 5 µg/mL in four independent series of assays according to the procedure previously described (Tu *et al.*, 1986 ; Elias *et al.*, 1989 ; Bessi *et al.*, 1994). To summarize, 150 target cells were seeded in 60 mm Petri dishes (Corning) with a feeder layer of 60000 X-irradiated cells in complete medium (DMEM used for cell culture, pH 7, supplemented with 12% foetal calf serum). The cells were treated 24 hr after seeding with 2,4-D (1 µg/mL, 2,5 µg/mL and 5 µg/mL). Ten dishes were used per treatment group in each series of experiment. The transforming potential of the well-known carcinogen, benzo(a)pyrene, was also evaluated as positive control.

The cells were exposed to the chemicals (2,4-D and BaP) for 7 days with a renewal of the medium after 3 days of treatment. At the end of cell exposure (day 8), the medium

was removed and the cells were washed with phosphate buffer saline (PBS), fixed with absolute ethanol and stained with 10% aqueous Giemsa. Colonies were scored under a stereomicroscope for cloning efficiency (CE) and morphological transformation (MT). The cloning efficiency was calculated as the total number of colonies per dish in all experiments on the total number of target cells seeded x 100. The morphological transformation frequency was calculated as the number of transformed colonies on the total number of colonies scored x 100. Transformed colonies were defined as colonies exhibiting an extensive criss-crossing and multi-layered growth pattern of cells. Each dish was coded and scored blind.

The frequencies of MT obtained from pooled data set were compared in treated cultures and their concurrent experiment control by means of the χ^2 test. The dose effect relationship in term of an increasing linear trend for MT was tested by using the dose response Armitage trend test (1955).

2.4. Apoptosis assays

2.4.1. Treatment

Cells were sampled from a monolayer during the growing phase, 48 hr after seeding.

To determine if 2,4-D induced apoptosis, cells were trypsinized and treated during reseeding with 2,4-D at concentrations which induced cell transformation (1- 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 5 hr and for 24 hr in DMEM culture medium supplemented with 5% SVF and 1% antibiotics. Higher concentrations (220 – 3500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) were also tested according to the positive results demonstrated in literature (Kaioumova *et al.*, 2001a, 2001b and Tuschl & Schwab, 2003).

To determine if 2,4-D inhibited apoptosis, cells were pre-treated with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 2,4-D concentrations for 24 hr in DMEM medium. After pre-treatment the medium was removed and cells were resuspended in DMEM deprived of growth factors (Serum free medium, SF) for 3 hr. The time of exposure (3h) was chosen according to the results of Alexandre *et al.*, (2000; 2002) who showed that apoptosis occurred rapidly in SHE cells (within 1-5 hr) after growth factor deprivation.

2.4.2. DNA fragmentation analysis

After treatment, the cells and the culture media were harvested and centrifuged at 1000g for 10 min. Cell pellets were stained with the fluorescent probes acridine orange (0.15 mg/mL in PBS) and ethidium bromide (0.25 mg/ml in PBS) and observed using fluorescence microscopy (495 nm). Living cells, which are permeable only to acridine orange, show a green nucleic staining; dead cells, permeable also to ethidium bromide, have their nuclei colored in red. The cells with a condensed or fragmented chromatin pattern characteristic of apoptosis were counted as apoptotic, whereas those with a homogeneous chromatin pattern were counted as normal. Apoptotic cells were expressed as a percentage of total cells scored. Each experiment was repeated in several independent experiments. For each experiment, 3 slides per concentration were tested and 100 cells per slide were scored. The mean values (\pm S.E.M ; standard error mean) corresponding to counting were analyzed. Statistical differences between control and treated cells were evaluated with the Student's *t*-test. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$.

2.5. Expression of *c-myc*, *bcl-2* and *bax* RNA

2.5.1. Treatment

Cells used for RT-PCR analysis were sampled from a monolayer during the growing phase, 48 hr after seeding. Cells were trypsinized and treated during reseeding with 1, 2.5 and 5 $\mu\text{g/mL}$ of 2,4-D for 5 hr in DMEM culture medium supplemented with 5% SVF and 1% antibiotics. Cells were also treated with 0.1 and 1 $\mu\text{g/mL}$ of benzo(a)pyrene for 5 hr.

2.5.2. RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from cells with Extract-All solution according to the manufacturer's instructions (Eurobio). Total RNA was quantified by optical density measurement at 260 nm and 280 nm. The integrity of RNA was confirmed by running 1 μg RNA on a 1% agarose gel. The cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using oligo d(T) as a primer and MuLV Reverse Transcriptase (50U) in a volume of 20 μL . The RT-PCR program used was : 30 min, 42°C (cDNA synthesis); 5 min, 94°C

(denaturation). c-DNA samples were subjected to PCR amplification using the RNA PCR Core kit and Taq-polymerase (P.E. Applied biosystem) with *bcl-2*, *bax* and *c-myc* primers specific to the SHE cell sequences, and *actin* primer and *gapdh* primer as internal controls (Eurogentec) (table 2).

Genes	Sequences	Size of PCR products (bp)	PCR cycles	Accession N° EMBL-EBI
<i>bcl-2</i>	5'-TAT-AAG-CTG-TCA-CAG-AGG-GGC-3' 5'-TGG-ATC-CAG-GTG-TGC-AGA-TGC-3'	500 bp	35	AJ582074
<i>bax</i>	5'-TCC-ACC-AAG-AAG-CTG-AGC-GAG-3' 5'-CCA-TCT-TCT-TCC-AGA-TGG-TGA-3'	411 bp	40	AJ582075
<i>c-myc</i>	5'-GAT-CAG-CTG-SAG-ATG-RTG-ACC-3' 5'-TTG-CGG-TTG-TTG-CTG-ATC-TG-3'	734 bp	40	AJ582076
<i>actine</i>	3'-GGA-YGA-YAT-GGA-GAA-RAT-CTG-G-5' 3'-CCT-GYT-TGC-TGA-YCC-ACA-TCT-G-5'	845 bp	33 (<i>bcl-2</i>) 28 (<i>bax</i>)	
<i>gapdh</i>	5'-TCC-ATG-ACA-ACT-TTG-GCA-TCG-TGG-3' 5'-GTT-GCT-GTT-GAA-GTC-ACA-GGA-GAC-3'	377 bp	30	

Table 2 : Sequences of primers and cycles used in RT-PCR analyse of *c-myc*, *bax* and *bcl-2* mRNA and the corresponding accession numbers EMBL-EBI.

The choice of oligonucleotides was carried out according to the sequences available in GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

After an initiated denaturation at 94°C for 5 min, 40 temperature cycles were performed for *bax* and *c-myc*, and 35 temperature cycles were performed for *bcl-2*, at either 55°C (*bax* primers) or 60°C (*bcl-2* and *c-myc* primers) for 30 s, 72°C for 30 s and 94°C for 30 s. After the last cycle, a final extending step at 72°C for 5 min was added.

The products were electrophoresed on 1.5% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. Signals were analyzed by densitometry and data were expressed as the ratios of the transcripts corresponding to the *c-myc* gene to the control gene, *gapdh*. At least, three independent experiments using different batches of SHE cells were carried out to study gene expression. The mean values (+/- S.E.M; standard error mean) of the ratios of the RT-PCR products corresponding to the gene studied on the control gene obtained in independent experiments were analyzed. Statistical differences

between control and treated cells were evaluated with the Student's *t*-test. Differences were considered to be significant if $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Cell transformation

2,4-D was tested in four independent experiments at concentrations ranging from 1 µg/mL to 5 µg/mL.

2,4-D induced morphological transformation (MT) of SHE cells (figures 1 & 2, table 3) at the concentrations of 2.5 and 5 µg/mL ($P < 0.01$). MT was increased in a dose dependent manner with 2.4% and 3.8% at 2.5 µg/mL and 5 µg/mL respectively ($P < 0.01$) (figure 1 and table 3). The positive trend of the MT-dose relationship was shown to be significant with the Armitage test ($p < 10^{-5}$). No change on cloning efficiency was observed, indicating no cytotoxic effect of 2,4-D at these concentrations. 2,4-D (5 µg/mL) was as efficient as the positive control benzo(a)pyrene (BaP) (1 µg/mL), to induce cell transformation (figure 1).

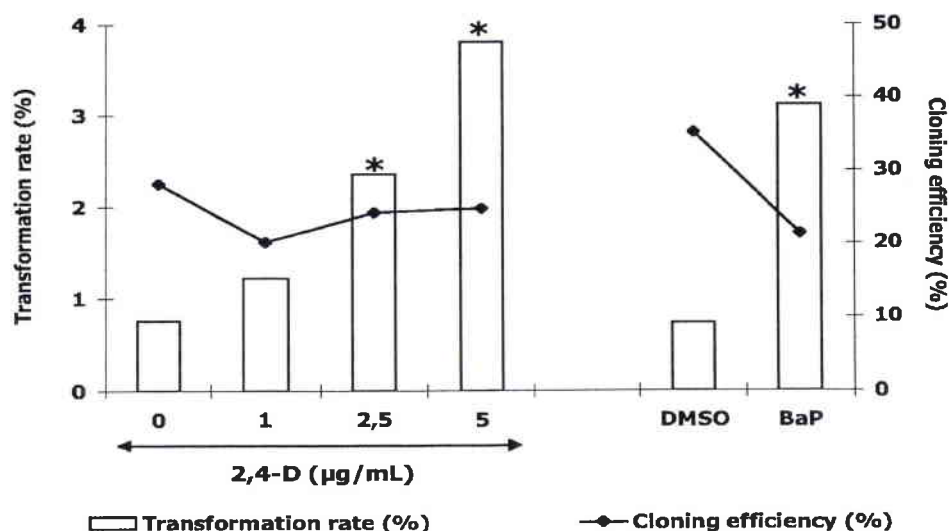


Figure 1 : Effects of 2,4-D (1 µg/mL, 2.5 µg/mL and 5 µg/mL) on cloning efficiency (CE) and transformation frequency in the SHE cells seeded at clonal density in the MT assay.
* Transformation rate significantly different from the respective control ($P < 0.01$).

2,4-D treatment (µg/mL)	Cloning efficiency (%)	Transformed colonies	
		Ratio	%
0	28.2	13/1732	0.8
1	20.2	10/819	1.2
2.5	24.2	42/1782	2.4*
5	24.8	68/1786	3.8*
DMSO (0.02%)	35.2	10/1372	0.7
BaP (1µg/mL)	21.4	21/641	3.1*

Table 3 : Effects of 2,4-D, tested during 7 days, on cloning efficiency (CE) and transformation frequency in SHE cells seeded at clonal density.
* Transformation rate significantly different from the respective control ($P < 0.01$).

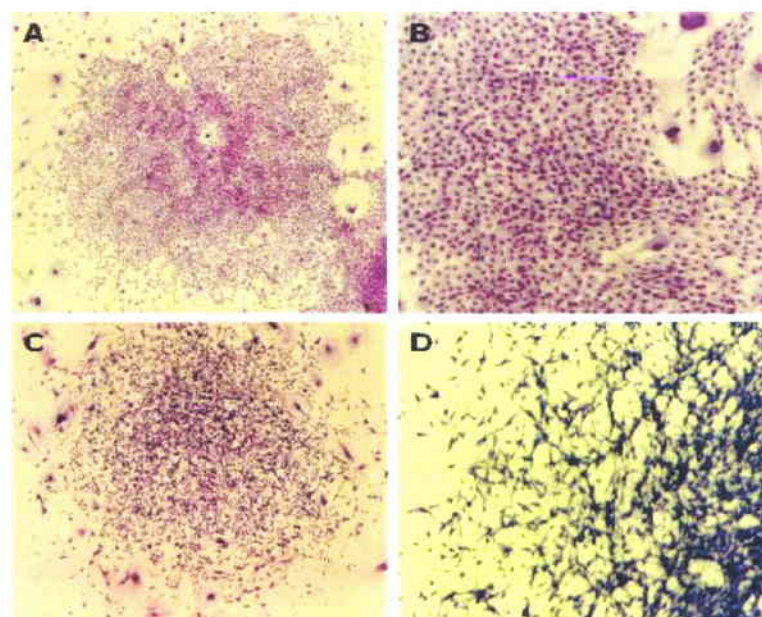


Figure 2 : Photomicrographs of normal SHE cells colonies (x40:A and x80:B) and of transformed SHE cells colonies by 5 µg/mL of 2,4-D (x40: C and x80: D) at pH 7.0 by 2,4-D.

DNA fragmentation

Microscopic examinations of SHE cells exposed to low 2,4-D concentrations (1 to 5 µg/mL) for 5 h or 24 h and stained with acridine orange and ethidium bromide, did not show any induction of apoptosis, which would have been characterized by condensed chromatin and fragmented DNA (figure 3).

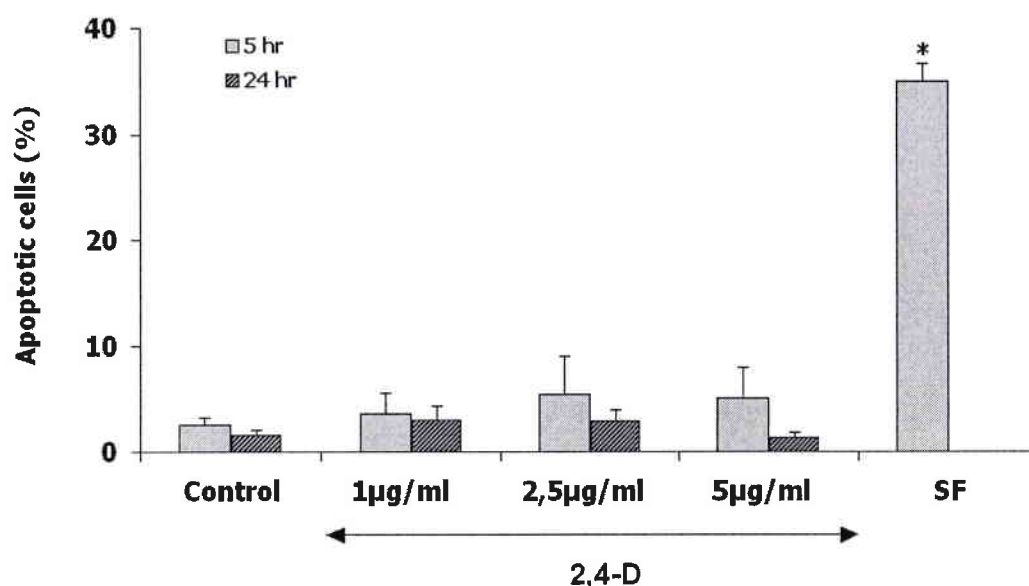


Figure 3 : Percentage of acridine orange-labeled cells containing condensed or fragmented nuclei observed in under a fluorescence microscope in cells treated with 2,4-D (1 µg/mL, 2.5 µg/mL and 5 µg/mL) versus the corresponding control for 5 hr and 24 hr. Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3 at each point). * $P < 0.05$ vs. Con.

We also analyzed 2,4-D effects on apoptotic SHE cells. SHE cells grown in a culture medium deprived of growth factors (serum-free), showed typical features of apoptosis, such as chromatin condensation and nuclear fragmentation after 3 hr. No anti-apoptotic effect was noted with SHE cells pre-treated with 2,4-D (1-5 µg/mL) for 24 h after 3 h of exposition to a serum free medium (figure 4).

In a second step, we explored effects of 2,4-D at higher concentrations (440 – 3500 µg/mL). After 24 h of treatment with 2,4-D (220 – 3500 µg/mL), apoptosis was induced at 440 µg/mL (16%) and 1100 µg/mL (20%) while low cytotoxicity was noted (3% and 7%, at 440 µg/mL and 1100 µg/mL concentrations respectively); Only 10% of apoptosis was observed at 2200 µg/mL 2,4-D; this level of concentration was highly cytotoxic (89% and 100% mortality, at 2200 µg/mL and 3500 µg/mL concentrations, respectively) (data not shown). No effect has been observed after 5 h of treatment (data not shown).

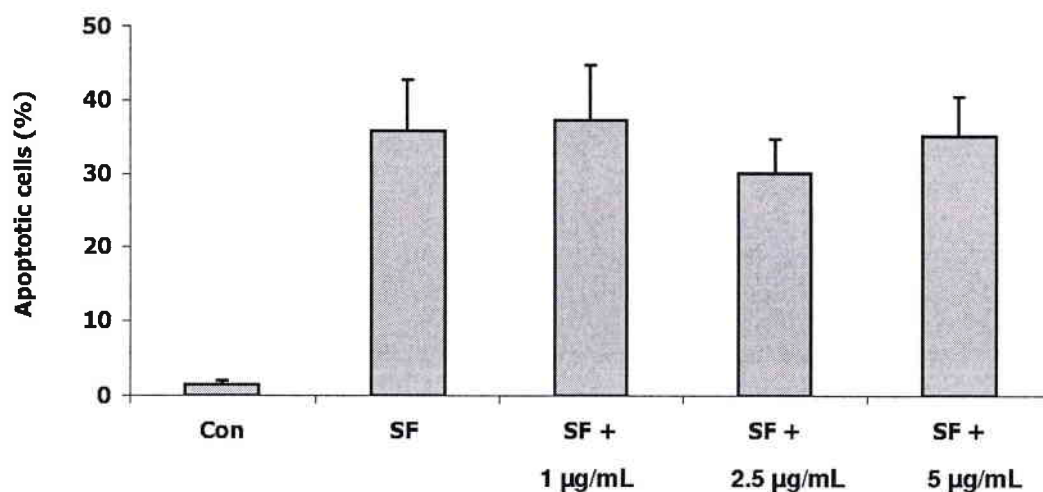


Figure 4 : Percentage of acridine orange-labeled cells containing condensed or fragmented nuclei observed in under a fluorescence microscope in cells pre-treated with 2,4-D (1 µg/mL, 2.5 µg/mL and 5 µg/mL) for 24 hr, then culture medium was removed and cells were exposed to a culture medium deprived of growth factors (Serum free medium, SF) for 3 hr. Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3 at each point). * $P < 0.05$ vs. SF (Serum Free medium).

3.3. RT-PCR and cDNA cloning

A significant up-regulation ($P < 0.05$) of *c-myc* RNA was observed in cells treated with 2.5 and 5 µg/mL 2,4-D (figure 5). Cells treated with 2,4-D exhibited a 2.3-fold increase in *c-myc* RNA level after treatment at both concentrations tested.

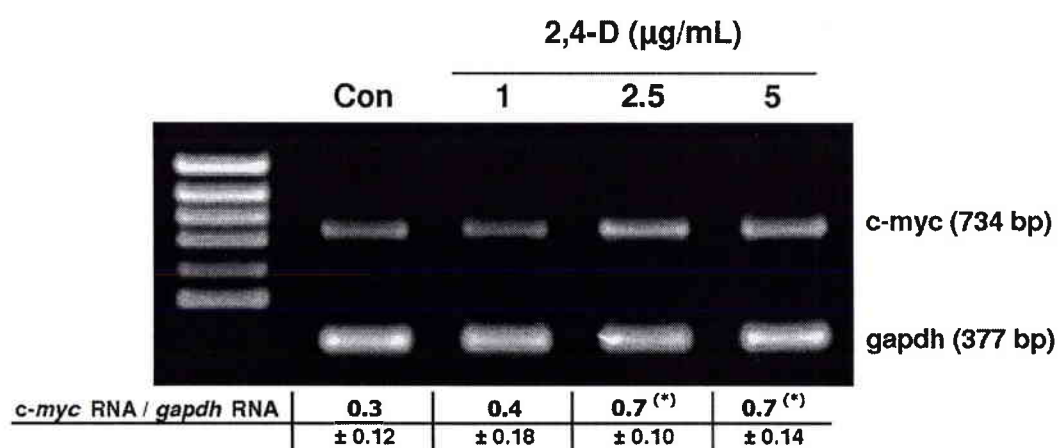


Figure 5 : RT-PCR analysis for changes in *c-myc/gapdh* ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *c-myc* and *gapdh* genes and densitometric quantifications of changes in *c-myc/gapdh* ratio. Cells were treated for 5 hr with 2,4-D (1 µg/mL, 2.5 µg/mL and 5 µg/mL). Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3) of the ratio of RT-PCR product of *c-myc* to *gapdh*. * $P < 0.05$ vs. control.

In cells treated with benzo(a)pyrene, no change at *c-myc* expression was observed (figure 6).

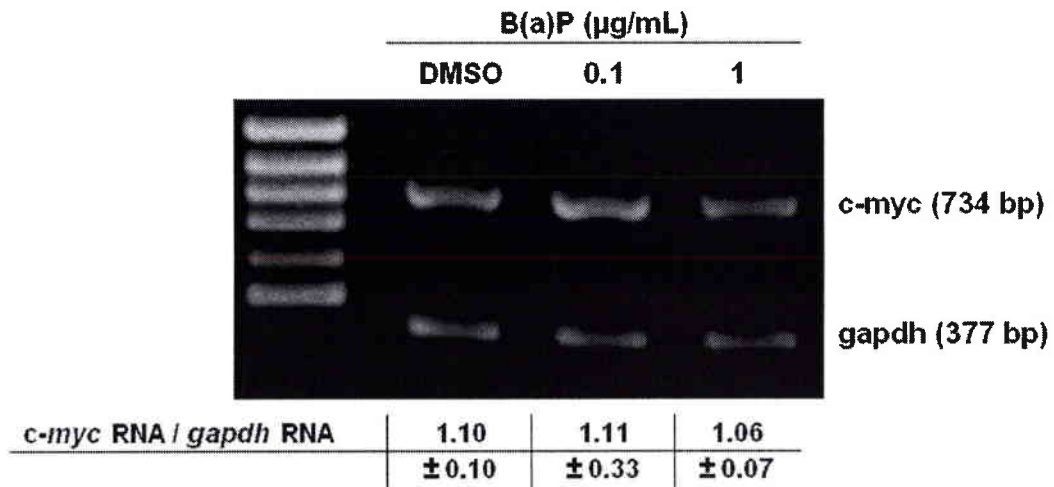


Figure 6 : RT-PCR analysis for changes in *c-myc/gapdh* ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *c-myc* and *gapdh* genes and densitometric quantifications of changes in *c-myc/gapdh* ratio. Cells were treated for 5 hr with B(a)P (0.1 µg/mL and 1 µg/mL). Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3) of the ratio of RT-PCR product of *c-myc* to *gapdh*. * *P* < 0.05 vs. control.

Furthermore, no change in *bcl-2* and *bax* expression was observed at the 2,4-D concentrations tested (1 - 5 µg/mL) (figure 7 and 8).

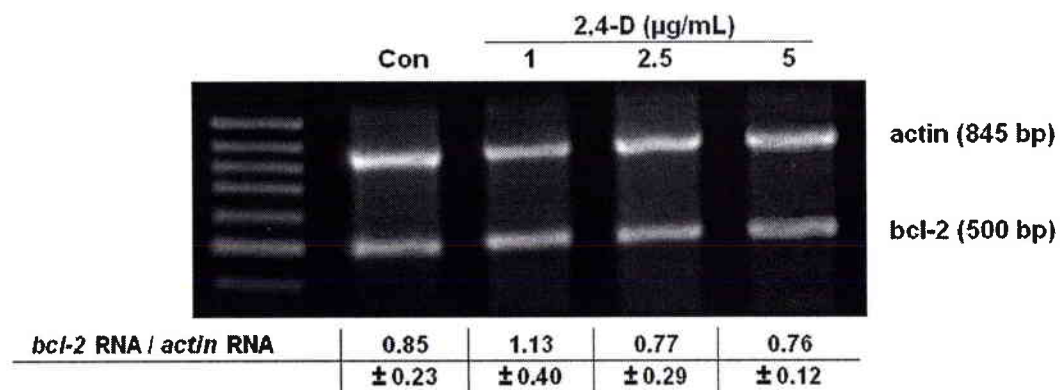


Figure 7 : RT-PCR analysis for changes in *bcl-2/actin* ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *bcl-2* and β -*actin* genes and densitometric quantifications of changes in *bcl-2/β-actin* ratio. Cells were treated for 5 hr with 2,4-D (1 µg/mL, 2.5 µg/mL and 5 µg/mL). Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3) of the ratio of RT-PCR product of *bcl-2* to β -*actin*. * *P* < 0.05 vs. control.

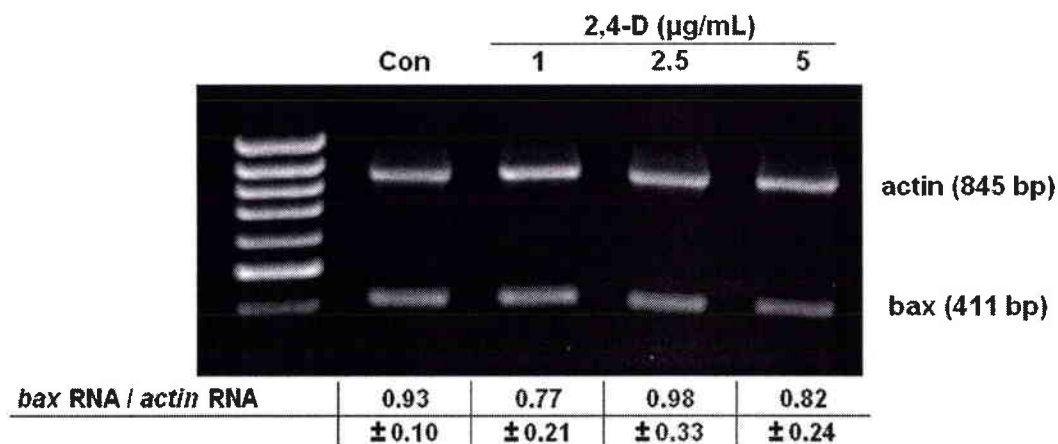


Figure 8 : RT-PCR analysis for changes in *bax/actin* ratio. RT-PCR product on agarose gel showing RNA expression of *bax* and β -*actin* genes and densitometric quantifications of changes in *bax/β-actin* ratio. Cells were treated for 5 hr with 2,4-D (1 µg/mL, 2.5 µg/mL and 5 µg/mL). Values represent means +/- S.E.M. of separate experiments (n = 3) of the ratio of RT-PCR product of *bax* to β -*actin*. * $P < 0.05$ vs. control.

The PCR products have been cloned and sequenced according to the procedure described in Maire *et al.*, (2004), to check that the PCR product encoded the expected proteins Bcl-2, Bax and c-Myc. The sequences of the studied genes have been submitted to EMBL-EBI (European Bioinformatics Institute) for registration and are available in <http://www.ebi.ac.uk> with the following accession numbers : AJ582074 (*bcl-2*), AJ582075 (*bax*), and AJ582076 (*c-myc*).

4. Discussion

In this report, we demonstrated the transforming effect of the 2,4-D in the normal SHE cells. An increase in *c-myc* expression followed 2,4-D treatment at concentrations which induced cell transformation (2.5 µg/mL and 5 µg/mL), while no change in *c-myc* expression was observed with BaP at transforming concentration.

The proto-oncogene *c-myc* actively participated in the control of cell proliferation. In primary cells, *c-myc* is required for the progression from G1 to S phase and the entry in the S phase of the cell cycle (Heikkila *et al.*, 1987 ; Obaya *et al.*, 1999). Its deregulated

expression has been associated with the increase of cell proliferation and has been demonstrated to contribute to cell transformation (Nilsson & Cleveland, 2003). The activation of *c-myc* occurred in more than 70% of human cancers, suggesting it could be an essential factor of tumorigenesis (Nesbit *et al.*, 1999 ; Nilsson & Cleveland, 2003).

Our results corroborate the findings of several studies in which peroxisome proliferators were also reported to overexpress *c-myc* (Belury *et al.*, 1998 ; Ge *et al.*, 2002). Indeed, Ge *et al.*, (2002) demonstrated that 2,4-D and three other peroxisome proliferators (Wy-14,643, dibutyl phthalate and gemfibrozil) decreased the methylation of the *c-myc* gene in B6C3F1 mice liver. The hypomethylation of genes was reported as a non-genotoxic mechanism which contributes to cancer development by promoting aberrant growth-related gene expression (Szyf *et al.*, 2004). In 2002, Takahashi *et al.*, have demonstrated that the acquisition of the neoplastic phenotype of SHE cells exposed to arsenic was correlated with *c-myc* overexpression and with hypomethylation of this proto-oncogene. Similar results have been found in established cell lines in which cell transformation was also related to the increase of *c-myc* expression level in case of the mouse C3H/10T^{1/2} cell line treated with di-n-butyltin dichloride (Parfett *et al.*, 2000), of the rat liver cell line TRL 1215 treated with arsenite (Chen *et al.*, 2001) or of the BALB/3T3 cell lines treated with cadmium (Fang *et al.*, 2002).

However, a treatment with benzo(a)pyrene did not affect *c-myc* expression at transforming concentrations, suggesting that the increase of *c-myc* expression is specific to 2,4-D and not a general marker of cell transformation *in vitro*.

Alexandre *et al.*, (2003) demonstrated that the inhibition of apoptosis was a mechanism explaining cell transforming properties of chemical carcinogens. Several peroxisome proliferators have been reported to inhibit hepatocyte apoptosis (James *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 2000). In this study, no effect on inhibition or induction of apoptosis has been observed at 2,4-D concentrations which induced morphological transformation ; this was confirmed by the absence of effects on *bax* and *bcl-2* genes in SHE cells.

Pure and commercial 2,4-D concentrations up to 3000 fold superior to our tested concentrations (1-16 mM or 220-3500 µg/mL, table 1) have been shown to promote apoptosis in human lymphocytes (Kaioumova *et al.*, 2001b), in cerebral granule cells (De Moliner *et al.*, 2002), in lymphoid organs (Kaioumova *et al.*, 2001a) and in HepG2 cells

(Tuschl & Schwab, 2003); it was claimed that 2,4-D exerted its cytotoxicity by an induction of apoptosis (Kaioumova *et al.*, 2001a ; Tuschl & Schwab, 2003). The concentrations of 440 and 1100 µg/mL 2,4-D also induced apoptosis in SHE cells, but at the highest concentrations (2200 and 3500 µg/mL), 2,4-D was highly cytotoxic for SHE cells (data not shown).

Several studies have discussed the fact that 2,4-D toxicity could be strengthened by the components of the technical herbicide formulations. The importance of impurities, such as dioxins, generated during the synthesis of the herbicide has been raised, and said to contribute to its possible carcinogenicity (WHO, 1984). The commercial formulations were generally proven to be more toxic than the active components (Holland *et al.*, 2002) and toxicity assays on rat liver mitochondria have demonstrated that 50% of the overall toxicity of three commercial formulations of 2,4-D (e.g. Agent Orange, Agent Orange diluted with diesel fuel and a tree and blackberry killer) was due to the presence of the coformulants, such as surfactants and diesel fuel (Oakes & Pollak, 2000).

Nevertheless, the present study clearly indicates that treatment with the active ingredient 2,4-D induces SHE cell transformation at low concentrations and could be related to an increase of the proto-oncogene *c-myc* expression. Our results on 2,4-D support the hypothesis that early changes in the growth-related proto-oncogene *c-myc* expression can be correlated with the ability of 2,4-D to promote cell transformation.

These findings support suspicion on carcinogenic potential of 2,4-D. The normal SHE cell system could be helpful to understand mechanisms of 2,4-D, whose toxicological studies by means of *in vitro* models for genotoxicity have led to inconclusive results.

Acknowledgments

The authors thank Pr A. Hammond for assistance in revising the English form of this paper. They are grateful to Dr Methlin and his colleagues from the “Claude Bernard Hospital - Departement de Radiotherapie et de Chimiotherapie” for the preparation of irradiated SHE cells.

This study was funded by the French Ministry of Research and Direction for Prevention of Pollution and Environmental Risk of the Ministry of the Environment.

References List

- Alexandre S, Rast C, Maire MA, Orfila L, Vasseur P. 2003. ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation. *Toxicology Letters* 142:77-87.
- Alexandre S, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P. 2000. Detection of apoptosis induced by topoisomerase inhibitors and serum deprivation in syrian hamster embryo cells. *Experimental Cell Research* 255:30-39.
- Alexandre S, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P. 2002. ZnCl₂ prevents c-myc repression and apoptosis in serum-deprived Syrian hamster embryo cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 11:191-196.
- Amer SM, Aly FAE. 2001. Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 494:1-12.
- Arias E. 2003. Sister chromatid exchange induction by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in chick embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 55:338-343.
- Armitage P. 1955. Test for linear trend in proportions and frequencies. *Biometrics* 11:375-386.
- Belury MA, Moya-Camarena SY, Sun H, Snyder E, Davis II JW, Cunningham ML, Vanden Heuvel JP. 1998. Comparison of dose-response relationships for induction of lipid metabolizing and growth regulatory genes by peroxisomes proliferators in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* 151:254-261.
- Berwald Y, Sachs L. 1963. In vitro cell transformation with chemical carcinogens. *Nature* 200:1182-1184.
- Berwald Y, Sachs L. 1965. In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *Journal of the National Cancer Institute* 35:641-661.
- Bessi H, Rast C, Nguyen-Ba G, Vasseur P. 1994. Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit GAP junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line. *The Cancer Journal* 7:248-253.
- Charles JM, Bond DM, Jeffries TK, Yano BL, Stott WT, Johnson KA, Cunny HC, Wilson RD, Bus JS. 1996a. Chronic Dietary Toxicity/Oncogenicity Studies on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Rodents. *Fundamental and Applied Toxicology* 33:166-172.
- Charles, Jeffrey M., Cunny H.C, Wilson R.D, Bus J.S, Lawlor T., Cifone M.A, Fellows M., and Gollapudi B. 1999a. Ames assays and unscheduled synthesis assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation Research* 444, 207-216.
- Charles, Jeffrey M., Cunny H.C, Wilson R.D, Ivett J.L, Murli H., Bus J.S, and Gollapudi B. 1999b In vivo micronucleus assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation Research* . 234 : 444, -227.
- Charles JM, Dalgard DW, Cunny HC, Wilson RD, Bus JS. 1996b. Comparative Subchronic and Chronic Dietary Toxicity Studies on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, Amine, and Ester in the Dog. *Fundamental and Applied Toxicology* 29:78-85.
- Chen H, Zhao CQ, Diwan BA, Merrick BA, Waalkes MP. 2001. Association of c-myc overexpression and hyperproliferation with arsenite-induced malignant transformation. *Toxicology and Applied Pharmacology* 175:260-268.
- Cruciani V, Rast C, Durand M-J, Nguyen-Ba G, Vasseur P. 1997. Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 18:701-706.

- De Moliner KL, Evangelista de Duffard AM, Soto E, Duffard R, Adamo AM. 2002. Induction of apoptosis in cerebellar granule cells by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. *Neurochemical Research* 27:1439-1446.
- Dhalluin S, Gate L, Vasseur P, Tapiero H, Guyen-Ba G. 1997. Dysregulation of ornithine decarboxylase activity, apoptosis and Bcl-2 oncoprotein in Syrian hamster embryo cells stage-exposed to di(2-ethylhexyl)phthalate and tetradecanoylphorbol acetate. *Carcinogenesis* 18:2217-2223.
- DiPaolo, J. A., Nelson R.L., and Donovan P.J. 1971. Morphological, oncogenic and karyological characteristics of Syrian hamster embryo cells transformed *in vitro* by carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Cancer Research* 31, 1118-1127.
- Ebert R, Barrett JC, Wiseman RW, Pechan R, Reiss E, Röllich G, Schiffmann D. 1990. Activation of cellular oncogenes by chemical carcinogens in Syrian hamster embryo fibroblasts, *Environmental Health Perspectives* 88: 175-178.
- Elias Z, Poirot O, Daniere MC, Terzetti F, Marande AM, Dzwigaj S, Pezerat H, Fenoglio I, Fubini B. 1989. Cytotoxic and transforming effects of silica particles with different surface properties in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicology in Vitro* 14:409-422.
- Fang MZ, Woongchon M, Cho MH. 2002. Cadmium affects genes involved in growth regulation during two-stage transformation of Balb/3T3 cells. *Toxicology* 177:253-265.
- Garabrant DH, Philbert MA. 2002. Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, epidemiology and toxicology. *Critical Reviews in Toxicology* 32:233-257.
- Ge R, Tao L, Kramer PM, Cunningham ML, Pereira MA. 2002. Effect of peroxisome proliferator on the methylation and protein level of the c-Myc protooncogene in B6C3F1 mice liver. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology* 16:41-47.
- Goll V., Alexandre E., Viollon-Abadie C., Nicod L., Jaeck D., Richert L. 1999. Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology* 160:21-32.
- Gollapudi B., Charles J. M., Linscombe V. A., Day S. J., Bus J. S. 1999. Evaluation of the genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives in mammalian cell cultures. *Mutation Research* 444, 217-225.
- Hasmall S., James N.H., Macdonald N., Gonzalez F.J., Peters J.M., Roberts R.A., 2000. Suppression of mouse hepatocyte apoptosis by peroxisome proliferators: role of PPAR α and TNF α , *Mutat. Res.* 448, 193-200.
- Heikkilä R, Schwab G, Wickstrom E, Loke SL, Pluznik DH, Watt R, Neckers LM. 1987. A c-myc antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry S phase but not progress from G₀ to G₁. *Nature* 328:445-449.
- Holland NT, Duramad P, Rothman N, Figs LW, Blair A, Hubbard A, Smith MT. 2002. Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 521:165-178.
- Holmes TJ, Rainsford KD. 2001. Differential effects of non-genotoxic carcinogens and proliferating agents on cell growth, survival and apoptosis in hepatic cells *in vitro*. *Life Sciences* 69:2975-2992.
- James NH, Soames AR, Roberts RA. 1998. Suppression of hepatocyte apoptosis and induction of DNA synthesis by the rat and mouse hepatocarcinogen diethylhexylphthalate (DEHP) and the mouse hepatocarcinogen 1,4-dichlorobenzene (DCB). *Archives of Toxicology* 72:790.
- Kaioumova D, Kaioumov F, Opelz G, Susal C. 2001a. Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. *Chemosphere*. 43:801-805.

- Kaioumova D, Susal C, Opelz G. 2001b. Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Human Immunology* 62:64-74.
- Kang KS, Lee YS, Kim HS, Kim SH. 2002. Di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced cell proliferation is involved in the inhibition of gap junctional intercellular communication and blockage of apoptosis in mouse Sertoli cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part A* 65:447-459.
- Madrigal-Bujaidar E, Hernandez-Ceruelos A, Chamorro G. 2001. Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed in vivo. *Food and Chemical Toxicology* 39:941-946.
- Maire M.A., Rast C., Pagnout C., Vasseur P., 2004, Changes in expression of Bcl-2 and Bax in Syrian hamster embryo cells exposed to ZnCl₂, sous presse.
- Mikalsen S-O. 1990. Morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by aminobenzyl alcohols and nitrobenzyl alcohols is correlated with intracellular communication. *Cancer Letters* 52, 203-208.
- Nesbit C.E., Tersak J.M., and Prochownik E.V. 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* 18, 3004-3016.
- Nilsson JA, Cleveland JL. 2003. Myc pathways provoking cell suicide and cancer. *Oncogene* 22:9007-9021.
- Oakes DJ, Pollak JK. 1999. Effects of a herbicide formulation, Tordon 75D(R), and its individual components on the oxidative functions of mitochondria. *Toxicology* 136:41-52.
- Oakes DJ, Pollak JK. 2000. The *in vitro* evaluation of the toxicities of three related herbicide formulations containing ester derivatives of 2,4,5-T and 2,4-D using sub-mitochondrial particles. *Toxicology* 151: 1-9.
- Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM. 1999. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 18:2934-2941.
- Parfett CLJ, Marquardt T, Pilon R. 2000. Promotion of Morphological Transformation by di-n-butyltin Dichloride in C3H/10T1/2 Cells: Prediction by Prior Expression of Tumour Promoter-Responsive Genes. *Food and Chemical Toxicology* 38:339-349.
- Pienta R.J., Poiley J.A., Leberz III W.B. 1977. Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens. *The International Journal of Cancer* 9:642-655.
- Rivedal E, Mikalsen S-O, Sanner T. 2000. Morphological transformation and effect on gap junction intercellular communication in Syrian hamster embryo cells as screening tests for carcinogens devoid of mutagenic activity. *Toxicology in Vitro* 14:185-192.
- Roberts RA, Chevalier S, Hasmall SC, James NH, Cosulich SC, Macdonald N. 2002. PPAR α and the regulation of cell division and apoptosis. *Toxicology* 181-182:167-170.
- Roberts RA, James NH, Hasmall SC, Holden PR, Lambe K, Macdonald N, West D, Woodyatt NJ, Whitcome D. 2000. Apoptosis and proliferation in non-genotoxic carcinogenesis: species differences and role of PPAR α . *Toxicology Letters* 112-113:49-57.
- Roberts RA, James NH, Woodyatt NJ, Macdonald N, Tummey A. 1998. Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α). *Carcinogenesis* 19:43-48.
- Roberts RA, Michel C, Coyle B, Freathy C, Cain K, Boitier E. 2004. Regulation of apoptosis by peroxisome proliferators. *Toxicology Letters* 149:37-41.

Szyf M, Pakneshan P, Rabbani SA. DNA demethylation and cancer: therapeutic implications. *Cancer Letters In Press, Corrected Proof*.

Takahashi M, Barrett JC, Tsutsui T. 2002. Transformation by inorganic arsenic compound of normal Syrian hamster embryo cells into a neoplastic state in which they become anchorage-independant and cause tumors in newborn hamsters. *The International Journal of Cancer* 99:629-634.

Tu A, Hallowell W, Pallota S, Sivak A, Lubet RA, Curren RD, Avery MD, Jones C, Sedita BA, Huberman E, Tennant R, Spalding J, Kouri RE. 1986. An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environmental Mutagenesis* 8:77-98.

Tuschl H, Schwab C. 2003. Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 41:385-393.

World Health Organization. 1984. Acide (dichloro-2,4 phenoxy acétique acide (2,4-D)). *Critères d'hygiène de l'Environnement* 29:181p.

Wyllie AH. 1992. Apoptosis and the regulation of cells numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer and Metastasis Review* 11:95-103.

DISCUSSION

	Transformation Morphologique des cellules SHE	Apoptose	<i>bcl-2</i>	<i>bax</i>	<i>c-myc</i>	Contexte
Camptothécine	ND*	↑	↓	↑	=	Stabilisation P53
Privation des facteurs de croissance (SF)	ND	↑	ND	=	↓	Aucun effet sur P53
Zinc	↑	↓	↑	↓	=	Relation Zinc / c-myc
Zinc + SF	ND	↓	ND	ND	↑	
DEHP	↑	↓	↑	=	↓	HPPs / PPAR ?
2,4-D	↑	=	=	=	↑	
Fomesafen	↑	↓	ND	=	ND	
BaP	↑	↑	ND	→	=	Stabilisation P53

Tableau IX : Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors de cette étude. (ND : non déterminé ; HPPs : proliférateurs de peroxyosomes hépatiques).

* Etude en cours.

D. DISCUSSION

Ce travail consistait d'une part à vérifier l'hypothèse qu'une inhibition de l'apoptose contribuerait à l'augmentation de la transformation morphologique des cellules SHE, et d'autre part, à étudier certains mécanismes d'inhibition de l'apoptose. Les résultats obtenus lors de cette étude sont résumés dans le tableau IX.

Ces résultats mettent en évidence que :

- ♦ *les substances inhibitrices de l'apoptose que nous avons testées, à savoir le zinc, le fomesafen et le DEHP, induisent la transformation cellulaire, supportant l'hypothèse que l'inhibition de l'apoptose pourrait être un facteur de la transformation cellulaire des cellules SHE par ces substances.*
- ♦ *l'inhibition de l'apoptose n'explique pas les effets transformants de cancérogènes épigénétiques de la catégorie des HPPs de manière générale, puisque le 2,4-D, qui comme le DEHP est considéré comme un cancérogène non-génotoxique et proliférateur de peroxysomes, induit la transformation morphologique sans inhiber l'apoptose.*
- ♦ *le DEHP et le zinc exercent leurs effets anti-apoptotiques via une augmentation du ratio de *bcl-2/bax*, deux gènes régulateurs de la voie apoptotique.*
- ♦ *l'expression de *c-myc* diffère selon les substances testées, suggérant des mécanismes d'action de *myc* divers, en réponse aux substances transformantes.*

Apoptose & transformation cellulaire des cellules SHE traitées avec le zinc, le DEHP et le 2,4-D.

Le zinc induit la transformation morphologique des cellules SHE. L'induction de la transformation cellulaire peut s'expliquer par les effets anti-apoptotiques du zinc dans les cellules SHE. Ces effets ont été démontrés dans les cellules SHE rendues apoptotiques par une déficience en facteur de croissance du milieu de culture, d'une part, et d'autre part, par un traitement avec la camptothécine, un inhibiteur des topoisoméras.

De précédents travaux réalisés au sein de notre laboratoire avaient démontré les propriétés anti-apoptotiques du zinc dans les cellules SHE cultivées en l'absence de facteurs de croissance, à des concentrations induisant la transformation cellulaire

(Alexandre *et al.*, 2000c ; 2002). Nous avons montré que le zinc inhibait l'apoptose induite par la camptothécine, à des concentrations induisant la transformation cellulaire.

Le zinc potentialise les effets transformants de deux cancérigènes, le BaP, un cancérigène génotoxique, et le fomesafen, un cancérigène non-génotoxique.

Le zinc et le fomesafen augmentent significativement le taux de transformation, mais augmentent aussi l'efficacité de clonage. Les effets anti-apoptotiques du zinc et du fomesafen pourraient être la cause de l'augmentation de l'efficacité de clonage. Par ailleurs, un déficit de l'apoptose empêcherait l'élimination des cellules altérées et contribuerait à l'augmentation du nombre de colonies transformées.

Quant au BaP, la diminution de l'efficacité de clonage lors des essais de transformation cellulaire montre qu'il a un effet toxique. La diminution de l'efficacité de clonage peut également résulter de l'activité apoptotique du BaP, confirmant ainsi son activité répressive sur la croissance des cellules et sur la formation des colonies. Un co-traitement avec le zinc n'augmente pas l'efficacité de clonage, mais contribue à l'augmentation de la transformation cellulaire en empêchant l'élimination par apoptose des cellules génétiquement altérées par le BaP.

De ces observations, nous avons conclu que les propriétés anti-apoptotiques du zinc, pourraient être un facteur de la transformation cellulaire, en empêchant l'apoptose des cellules altérées et en permettant leur prolifération.

Le DEHP et le 2,4-D, ont été choisis pour tester la similitude sur le plan mécanistique, pouvant exister entre deux substances apparentées, et regroupées au sein de la catégorie des HPPs. Nous avons mis en évidence le caractère transformant du 2,4-D à de faibles concentrations. Quant au DEHP, ses propriétés transformantes avaient déjà été plusieurs fois démontrées sur le système cellulaire SHE (Mikalsen *et al.*, 1993 ; Tsutsui *et al.*, 1993 ; Cruciani *et al.*, 1999).

Dans cette étude, le DEHP diminue l'apoptose induite par la privation des facteurs de croissance à des concentrations induisant la transformation cellulaire (Cruciani *et al.*, 1999). En 1997, Dhalluin *et al.*, avaient démontré qu'un pré-traitement des cellules SHE avec le DEHP, suivi d'une exposition à un promoteur de tumeur (TPA), inhibait l'apoptose induite par la privation des facteurs de croissance. Nous avons démontré dans

cette étude, que le DEHP appliqué seul, diminue également l'apoptose des cellules SHE. Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux ayant montré les effets anti-apoptotiques du DEHP à la fois dans des conditions *in vivo* et *in vitro* (James *et al.*, 1998 ; Roberts *et al.*, 2000 ; Kang *et al.*, 2002).

Les concentrations de 2,4-D qui induisent la transformation cellulaire, n'ont montré aucun effet inhibiteur ou inducteur sur l'apoptose. Plusieurs études avaient montré qu'à de fortes concentrations (1-16 mM), le 2,4-D induisait l'apoptose dans divers types cellulaires (lymphocytes humains, cellules HepG2, cerebral granule cells), et il a été avancé que le 2,4-D exerçait sa toxicité *via* une induction de l'apoptose (Kaouimova *et al.*, 2001a et 2001b ; De Moliner *et al.*, 2003 ; Tuschl & Schwab, 2003). Nos travaux ont montré qu'à la concentration 2 et 5 mM, le 2,4-D induisait l'apoptose des cellules SHE, confirmant les résultats de la littérature obtenus sur d'autres types cellulaires. Cependant, ces effets sont sans rapport avec les effets transformants du 2,4-D, et l'on peut s'interroger sur la signification de ces résultats à de si fortes concentrations.

Les résultats obtenus sur le zinc et le DEHP démontrent l'inhibition de l'apoptose à des concentrations qui induisent la transformation cellulaire, et nous permettent de suspecter que l'inhibition de l'apoptose est un facteur de la transformation cellulaire.

Il est évident que l'inhibition de l'apoptose n'est qu'un des mécanismes de la transformation cellulaire. L'exemple du 2,4-D et du DEHP illustre bien le fait que des substances apparentées sur la base de certains effets biologiques (HPPs, PPARs, cancérogènes épigénétiques...) divergent sur d'autres aspects de leur profil toxicologique, et que d'autres mécanismes entrent en jeu dans le processus de transformation cellulaire. Même si le 2,4-D et le DEHP présentent des similitudes sur le plan mécanistique, le 2,4-D est dépourvu des effets anti-apoptotiques manifestés par le DEHP.

Implication de *bcl-2* et *bax* dans la régulation de l'apoptose par les substances étudiées.

Les protéines Bcl-2 (anti-apoptotique) et Bax (pro-apoptotique) participent activement au contrôle du processus apoptotique, et le ratio de ces deux protéines conditionne l'entrée de la cellule en apoptose.

Dans cette étude, un traitement avec le zinc augmente l'activité transcriptionnelle de *bcl-2* et diminue celle de *bax*, ce qui a été confirmé par l'étude de l'expression des protéines Bcl-2 et Bax par Western blotting.

Les travaux de Cohen et Duke, en 1984, avaient tout d'abord démontré que le zinc inhibait l'action des endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN. Plusieurs études avaient ensuite montré que le zinc agissait en amont de la fragmentation de l'ADN en inhibant l'activation de caspases, notamment les caspase-3, -6 et -9 (Perry *et al.*, 1997b ; Tamura *et al.*, 2002). Notre étude conforte les résultats obtenus par Fukamachi *et al.*, en 1998 et par Ganju & Eastman en 2003, suggérant que le zinc agirait bien avant l'activation des caspases et de la fragmentation de l'ADN, par la régulation de protéines impliquées dans la voie apoptotique mitochondriale.

Nous avons montré que la camptothécine induisait l'apoptose des cellules SHE par une augmentation de la transcription de *bax* et une diminution de la transcription de *bcl-2*. Les modifications obtenues sur l'expression de *bax* et *bcl-2* sont liées à la protéine P53. L'apoptose induite par la camptothécine dans les cellules SHE est P53-dépendante (Alexandre *et al.*, 2000). Le gène *bax* possède un élément de réponse à P53 dans son promoteur ce qui permet à P53 d'activer sa transcription, et inversement, P53 peut également réprimer l'expression de *bcl-2* (Thornborrow & Manfredi, 1999 ; Dlamini *et al.*, 2004 ; Heiser *et al.*, 2004 ; Hofseth *et al.*, 2004).

Le zinc inhibe les effets apoptotiques de la camptothécine en augmentant le ratio *bcl-2/bax*, c'est-à-dire en manifestant des effets inverses à ceux de la camptothécine sur l'expression de *bax* et de *bcl-2*.

De même que la camptothécine, le BaP induit l'apoptose et stabilise P53 (Ko *et al.*, 2004). Toutefois, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de *bax* dans les cellules traitées avec le BaP, ni d'effets du zinc sur les effets apoptotiques du BaP.

Il aurait été intéressant d'étudier les effets du BaP sur bcl-2, compte tenu de ses effets comme perturbateurs de la voie apoptotique mitochondriale, rapportés dans la littérature, et notamment son implication dans la diminution de l'expression de bcl-2 (Ko et al., 2004). Ces résultats seraient à explorer dans les cellules SHE.

Les mécanismes de régulation de l'expression de bcl-2 et de bax par le zinc restent à élucider. Il a été montré que le zinc augmente la transcription de gènes contenant des domaines spécifiques en doigts de zinc (Dreosti et al., 2001 ; Truong-Tran et al., 2001). A notre connaissance, aucune étude n'a rapporté que bcl-2 ou bax contenait un élément de réponse aux métaux dans son promoteur.

L'induction des métallothionéines a également été suggérée comme pouvant être à l'origine des effets anti-apoptotiques du zinc. Cependant, l'induction des métallothionéines nécessite un pré-traitement par le zinc, et n'explique pas les effets anti-apoptotiques dans le cas d'une co-exposition (Shimoda et al., 2003).

L'étude mécanistique des effets du DEHP sur les cellules SHE a montré que le DEHP augmentait la transcription de *bcl-2*. Contrairement au zinc, le DEHP ne diminue pas l'expression de *bax*.

L'inhibition de l'apoptose par les proliférateurs de peroxysomes (DEHP, Wy-14,643, nafénopine, ...) a souvent été associée au récepteur PPAR α . En effet, les effets apoptotiques des proliférateurs de peroxysomes ne sont pas observés dans les hépatocytes de rongeurs dépourvus de récepteurs PPAR α (Hasmall *et al.*, 2000).

L'altération des protéines de la famille Bcl-2 a également été désignée comme un facteur de l'hépatocarcinogénèse chez les souris (Christensen *et al.*, 1999). Ainsi, chez les souris, le proliférateur de peroxysomes, Wy-14,643, augmente l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et BAG-1, de la même façon que le DEHP (Christensen *et al.*, 1999). Dans les tumeurs (adénomes) résultant d'un traitement à long terme par le Wy-14,643, l'expression de Bcl-2 est augmentée dans plus de 80% des cas (Christensen *et al.*, 1999).

Les résultats obtenus avec le DEHP ont montré que bcl-2 intervenait dans l'inhibition de l'apoptose par les proliférateurs de peroxysomes.

Il aurait été intéressant de vérifier si le fomesafen, en tant que HPPs, inhibiteur apoptotique et inducteur de la transformation cellulaire, modifiait également l'expression de bcl-2.

A l'inverse des autres HPPs testés, le 2,4-D n'a aucun effet sur l'apoptose, ce qui a été corroboré par l'absence d'effet sur bcl-2 et bax.

Nous ne savons pas comment les membres de la famille Bcl-2 sont régulés par les HPPs. Les gènes de cette famille pourraient contenir la séquence PPRE dans leur promoteur et ainsi être régulés via l'activation des PPARs. Si la plupart des proliférateurs de peroxyssomes activent les PPARs, il semblerait que dans le cas du DEHP, le PPAR α et le PPAR γ soient préférentiellement activés par le métabolite du DEHP, c'est-à-dire, le MEHP. Quant au 2,4-D, peu de travaux concernent la relation 2,4-D/PPARs. En 1999, Maloney et Waxman, ont rapporté que le 2,4-D n'activait ni le PPAR α et ni le PPAR γ , et ils avaient supposé que les métabolites du 2,4-D (glucoronides, glycine, conjugués de la taurine...) pourraient activer les PPARs. A notre connaissance, ces résultats n'ont pas été confirmés.

Lors de cette étude, nous n'avons pas pu apporter la preuve directe que le zinc et le DEHP inhibaient l'apoptose dans les colonies du test de transformation cellulaire, c'est-à-dire, obtenues après ensemencement des cellules en densité clonale (150 cellules/boîtes, soit 20 cellules/mL de milieu). En effet, les essais permettant la détection d'un phénomène apoptotique ou anti-apoptotique (microscopie en fluorescence, DNA ladder, RT-PCR, Western blotting) nécessitent de pouvoir disposer d'une masse de cellules SHE, et la faible quantité de matériel biologique disponible dans les colonies transformées, est un facteur limitant dans la mise en œuvre de ces essais.

L'adaptation au test de transformation cellulaire des techniques utilisées dans cette étude ou la mise en œuvre de nouvelles techniques, comme l'immunohistochimie ou le développement de techniques telles que le DNA/RNA microarrays, qui ne nécessitent qu'une faible quantité de cellules, nous permettraient d'appréhender les mécanismes génétiques mis en jeu.

Différence de l'expression de c-myc en réponse au traitement par le zinc, le DEHP et le 2,4-D

Toutes les substances que nous avons testées induisent la transformation morphologique des cellules SHE. Des travaux sur différents types cellulaires en culture (SHE, rat liver cell line TRL1215, C3H/10^{1/2} et BALB/3T3) ont démontré que la sur-expression de c-myc pouvait être corrélée avec l'acquisition du phénotype néoplasique

(Ebert *et al.*, 1990 ; Parfett *et al.*, 2000 ; Chen *et al.*, 2001 ; Fang *et al.*, 2002 ; Takahashi *et al.*, 2002).

Dans notre étude, l'expression de *c-myc* s'est révélée très différente selon les substances étudiées.

Les traitements avec le zinc et le BaP ne modifient pas l'expression de *c-myc*, suggérant que la dérégulation de *c-myc* n'intervient pas dans les premières étapes de la transformation cellulaire induite par ces deux substances. Toutefois, il existe tout de même une relation entre le zinc et *c-myc*, puisqu'en l'absence de facteur de croissance, le zinc est capable de maintenir l'expression de *c-myc*, normalement réprimée dans ces conditions (Alexandre *et al.*, 2002).

Une augmentation de l'expression de *c-myc* a été observée aux concentrations auxquelles le 2,4-D induit la transformation morphologique des cellules SHE. Ces résultats sont en accord avec les études ayant montré qu'un traitement avec certains proliférateurs de peroxysomes était corrélé à l'augmentation de *c-myc* (Belury *et al.*, 1998 ; Ge *et al.*, 2002). La modification du profil de méthylation de l'ADN a été désignée comme pouvant être la cause de la sur-expression de *c-myc* suite à un traitement avec des proliférateurs de peroxysomes types comme le Wy-14,643 (Ge *et al.*, 2002).

Quant au DEHP, on pouvait s'attendre à ce que l'expression de *c-myc* soit augmentée de la même façon qu'avec le 2,4-D, compte tenu de leurs similitudes sur le plan mécanistique, en tant qu'inducteurs de la transformation cellulaire et proliférateurs de peroxysomes. Lors de nos expérimentations, nous avons observé au contraire, que le DEHP diminue l'expression de *c-myc*.

On peut en déduire que la dérégulation de l'expression de *c-myc* comme facteur de transformation cellulaire n'intervient pas dans les étapes précoces de la transformation morphologique des cellules SHE par le DEHP. Nous n'excluons pas le fait que l'expression de *c-myc* pourrait être augmentée dans les phases tardives de la transformation cellulaire, ce qui serait en accord avec ses propriétés prolifératrices et transformantes, observées dans les lignées cellulaires transformées.

Dans notre étude, il semblerait plutôt que l'expression de *c-myc* dans les premières étapes de la transformation cellulaire soit corrélée à l'inhibition de l'apoptose. Nous avons

montré des effets antagonistes de *c-myc* et *bcl-2*, puisque l'expression de *c-myc* diminue tandis que celle de *bcl-2* augmente.

La plupart des études ont montré que la sur-expression de *c-myc* pouvait être associée à l'induction de l'apoptose (Evan *et al.*, 1992 ; Thompson *et al.*, 1998 ; Vermeulen *et al.*, 2003). Inversement, la diminution ou la suppression de *c-myc* a également été impliquée dans l'inhibition de l'apoptose, ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus avec le DEHP (Dong *et al.*, 1997 ; Canelles *et al.*, 1997 ; Genestier *et al.*, 1999 ; Adachi *et al.*, 2001 ; Sarkar *et al.*, 2003).

La coopération entre *c-myc* et les membres de la famille de protéines Bcl-2 lors du processus apoptotique a plusieurs fois été mise en évidence, mais les mécanismes de cette interaction ne sont que partiellement élucidés (Bissonnette *et al.*, 1992 ; Fanidi *et al.*, 1992 ; Mitchell *et al.*, 2000 ; Soucie *et al.*, 2001 ; Juin *et al.*, 2002 ; Klefstrom *et al.*, 2002).

Le gène *bax* contient dans son promoteur un élément de réponse à *c-myc* (E-box séquence) et il a été démontré que *bax* pouvait être activé par *c-myc* (Mitchell *et al.*, 2000). Dans notre étude sur le DEHP, l'expression de *bax* reste stable, ce qui est en accord avec le fait que l'expression de *bax* ne peut être activée par *c-myc*, puisque l'expression de *c-myc* diminue.

Nous ne savons pas si *bcl-2* possède également l'élément de réponse à *c-myc*, mais cela serait tout à fait possible, compte tenu des homologues de séquences existant entre les membres de la famille Bcl-2.

L'étude de l'expression de c-myc a montré des différences en réponse aux traitements par des substances transformantes.

Dans les premières étapes de la transformation morphologique induite par le zinc et le BaP, il semblerait que c-myc ne soit ni impliqué dans la prolifération cellulaire, ni dans l'inhibition de l'apoptose, puisque son expression reste inchangée. Par contre, l'augmentation de c-myc observée lors du traitement avec le 2,4-D, pourrait être un facteur de la transformation cellulaire induite par le 2,4-D.

Les résultats obtenus suite au traitement avec le DEHP, supposent que l'expression de c-myc ne serait pas augmentée dans les premières étapes de la transformation cellulaire, mais au contraire que sa diminution contribuerait à l'inhibition de l'apoptose. Nous n'excluons pas le fait que l'expression de c-myc pourrait être augmentée dans les phases tardives de la transformation cellulaire, ce qui serait en

accord avec ses propriétés prolifératrices et transformantes, observées dans les lignées cellulaires transformées.

Biodisponibilité des substances testées, et notamment du zinc.

Lors des expérimentations *in vitro*, on se heurte au problème de la biodisponibilité des substances dans le milieu de culture, pour l'extrapolation des résultats obtenus *in vitro* au contexte *in vivo*, et notamment dans le cas du zinc.

La question posée est celle de la signification des effets du zinc *in vitro*, et de leur transposition au contexte *in vivo*. En effet, les concentrations intracellulaires de zinc n'excèdent pas 20 μM . On peut considérer que les concentrations de 100 à 150 μM , auxquelles nous avons obtenu des effets transformants, sont largement supérieures aux concentrations physiologiques. En fait, les concentrations nominales ne correspondent pas aux concentrations biodisponibles, compte tenu de l'adsorption du zinc par les protéines sériques du milieu de culture, qui diminue considérablement les concentrations réellement biodisponibles *in vitro*. En effet, nous avons pu montrer que la concentration en zinc était diminuée de 50% dans un milieu supplémenté par 12-15% de sérum de veau fœtal (Alexandre *et al.*, 2000c).

Par exemple, dans un milieu complété à 15% de sérum, 300 μM de zinc sont nécessaires pour inhiber l'apoptose induite par la camptothécine (Alexandre *et al.*, 2000a), tandis que dans un milieu à 5% de sérum, 150 μM de zinc suffisent à inhiber les effets de la camptothécine. Toutefois, pour les essais de transformation cellulaire, la concentration de 5% de sérum est insuffisante pour assurer le clonage cellulaire de ces cellules primaires ou secondaires.

Ceci pourrait expliquer l'incapacité du zinc à inhiber l'apoptose induite par le BaP et par conséquent, à modifier l'expression de *bax*, car lors de ces premiers essais, la concentration de sérum utilisée était de 15%. A ce taux de sérum, le zinc n'est pas suffisamment biodisponible pour inhiber l'apoptose induite par le BaP.

Des essais complémentaires à des concentrations en sérum inférieures à 15%, seraient nécessaires, afin de vérifier les effets anti-apoptotiques du zinc sur l'apoptose induite par le BaP.

**CONCLUSIONS
ET PERSPECTIVES**

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le but de ce travail consistait d'une part, à étudier l'hypothèse qu'une défaillance des processus apoptotiques favoriserait la transformation cellulaire, et d'autre part, à élucider certains des mécanismes moléculaires de substances inhibitrices de l'apoptose.

Ce travail a été réalisé sur les cellules embryonnaires de hamster Syrien. Ces cellules permettent d'étudier les stades précoces de la transformation cellulaire, mais aussi le comportement de cellules normales face à des substances potentiellement cancérigènes.

- ♦ Dans la première partie de cette étude, nous avons mis en évidence que toutes les substances anti-apoptotiques testées, à savoir le zinc, le DEHP et le fomesafen, induisaient la transformation morphologique des cellules SHE.

Les résultats obtenus confortent l'hypothèse qu'un traitement avec des substances anti-apoptotiques augmenterait la viabilité de cellules altérées, et contribuerait à l'augmentation de la transformation cellulaire.

- ♦ Les expérimentations réalisées avec le 2,4-D, une substance partageant des propriétés communes avec le DEHP (cancérogène non-génotoxique et proliférateur de peroxysomes), ont montré que le 2,4-D augmentait la transformation morphologique des cellules SHE mais sans inhiber l'apoptose. Les mécanismes de la transformation cellulaire induite par des cancérigènes non-génotoxiques sont divers et ne sont pas uniquement liés à un dysfonctionnement du processus apoptotique. Inversement, l'absence d'effets au niveau apoptotique ne garantit pas l'absence d'effets transformants.

Lors de ces expérimentations nous n'avons pu établir qu'une relation entre les effets transformant de ces substances et leur implication dans la perturbation du processus apoptotique, puisque les techniques utilisées dans cette étude ne nous permettent pas d'étudier l'apoptose dans des cellules ensemencées en densité clonale. Des expérimentations ultérieures seraient nécessaires afin d'adapter les techniques d'étude de l'apoptose aux conditions du test de transformation cellulaire.

♦ La seconde partie de cette étude avait pour but d'étudier certains mécanismes de l'inhibition de l'apoptose par le zinc et le DEHP. Nous avons montré que ces substances exerçaient leurs effets anti-apoptotiques *via* une augmentation du ratio *bcl-2/bax*, suggérant que ces substances perturberaient le fonctionnement de la voie apoptotique mitochondriale. Des différences ont toutefois été observées, puisque le zinc augmente à la fois l'expression des gènes *bcl-2* et diminue celle de *bax* tandis le DEHP augmente uniquement l'expression de *bcl-2*.

Des études complémentaires seraient nécessaires afin de vérifier si bcl-2 et bax contiennent dans leur promoteur un élément de réponse aux métaux, qui pourrait expliquer l'augmentation de bcl-2 et la diminution de bax, en réponse à un traitement par le zinc.

L'étude de l'expression d'autres membres de la famille Bcl-2, comme Bcl-xL ou les protéines pro-apoptotiques BH3, au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel, serait utile pour approfondir les mécanismes anti-apoptotiques du zinc et du DEHP.

Compte tenu des effets observés sur les gènes régulateurs de la voie apoptotique mitochondriale, il serait également intéressant d'observer les conséquences de ces effets, au niveau des protéines mitochondriales (par exemple le cytochrome c), qui participent à la promotion du processus apoptotique, et dont l'activation est sous le contrôle de la famille des protéines Bcl-2.

♦ Lors de nos expérimentations, l'étude de l'expression de *c-myc* s'est révélée très différente en réponse aux substances transformantes testées.

♦ Tout d'abord, l'augmentation de l'expression de *c-myc* pourrait être un facteur de la transformation cellulaire. Cependant cette relation n'a seulement été observée avec le 2,4-D. En effet, ni le zinc, ni le DEHP, ni le BaP n'ont montré d'augmentation de *c-myc*, suggérant que l'augmentation de *c-myc* n'intervient pas dans les premières étapes de la transformation cellulaire induite par ces substances. La relation entre le zinc et *c-myc* mérite d'être étudiée. Si le zinc, dans les conditions de culture normales ne modifie pas l'expression de *c-myc*, il maintient au contraire l'expression de ce proto-oncogène, normalement réprimée en l'absence de facteurs de croissance.

♦ L'expression de *c-myc* diminue suite au traitement avec le DEHP, parallèlement à l'augmentation de l'expression de *bcl-2*. Nous avons supposé que l'expression de *c-myc* était corrélée avec l'inhibition de l'apoptose, et qu'en conséquence, *c-myc* pourrait interagir avec certains gènes de la voie apoptotique mitochondriale.

Ces résultats montrent que l'implication de *c-myc* dans l'apoptose et dans la transformation cellulaire, est très complexe.

Dans le cas de la sur-expression de c-myc par le 2,4-D, des études complémentaires seraient utiles afin de déterminer les mécanismes qui activent c-myc. L'étude du profil de méthylation de l'ADN pourrait être envisagée, compte tenu des résultats de la littérature qui ont montré que l'hypométhylation de c-myc, en réponse à certains proliférateurs de peroxysomes, pouvait être corrélée à l'augmentation de son expression.

Les mécanismes d'action de c-myc lors du processus apoptotique nécessiteraient d'être approfondis afin de comprendre comment bcl-2 et ses homologues coopèrent avec c-myc pendant l'apoptose.

Les mécanismes de contrôle de l'expression de *c-myc* diffèrent selon les types cellulaires, ainsi qu'il ressort de nos résultats et de ceux de la littérature.

Il est essentiel de travailler avec des cellules normales pour étudier les étapes précoces de la cancérogenèse. En cela, le modèle cellulaire SHE fournit un modèle pertinent et très utile pour les études de toxicologie fondamentale et des mécanismes de la cancérogenèse.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Adachi S., Obaya A.J., Han Z., Ramos-Desimone N., Wyche J.H. & Sedivy J.M. (2001) c-Myc is necessary for DNA damage-induced apoptosis in the G₂ phase of the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* **21** (15), 4929-4937.
- Adams J.M. & Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family : arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-1326.
- Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G. & Vasseur P. (2000a) Detection of apoptosis induced by topoisomerase inhibitors and serum deprivation in syrian hamster embryo cells. *Experimental Cell Research* **255** (1), 30-39.
- Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G., Poirier G.G. & Vasseur P. (2000b) PARP degradation in apoptotic Syrian hamster embryo (SHE) cells compared to HL60 cell line. *Biochimie* **82** (12), 1115-1122.
- Alexandre S. (2000c) Apoptose et transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster Syrien. *Thèse de Doctorat. Université de Metz*.
- Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G. & Vasseur P. (2002) ZnCl₂ prevents c-myc repression and apoptosis in serum-deprived Syrian hamster embryo cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **11**, 191-196.
- Alexandre S., Rast C., Maire M.A., Orfila L. & Vasseur P. (2003) ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation. *Toxicology Letters* **142** (1-2), 77-87.
- Alibert M. & Chimini G. (2002) L'élimination des cellules apoptotiques : une phagocytose bien particulière. *Medecine/Sciences* **18** (853), 860.
- Ameisen J.C. (1996) Le suicide des cellules. *Pour la Science* **224**, 52-59.
- Ameisen J.C. (2003) *La sculpture du vivant. Le suicide cellulaire ou la mort créatrice*, Edition du seuil, Paris, 457p.
- Amer S.M. & Aly F.A. (2001) Genotoxic effect of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid and its metabolite 2,4-dichlorophenol in mouse. *Mutation Research* **494** (1-2), 1-12.
- Antonsson B. & Martinou J.C. (2000) The Bcl-2 Protein Family. *Experimental Cell Research* **256** (1), 50-57.
- Antonsson B.C. (2001) Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell and Tissue Research* **306** (3), 347-361.
- Arias E. (2003) Sister chromatid exchange induction by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in chick embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55** (3), 338-343.
- Ashkenazi A. & Dixit V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* **281** (5381), 1305-1308.
- Auvinen M., Paasinen A., Andersson L.C. & Holtta E. (1992) Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature* **360** (6402), 355-358.

- Auvinen M., Jarvinen K., Hotti A., Okkeri J., Laitinen J., Janne O.A., Coffino P., Bergman M., Andersson L.C., Alitalo K. & Holtta E. (2003) Transcriptional regulation of the ornithine decarboxylase gene by c-Myc/Max/Mad network and retinoblastoma protein interacting with c-Myc. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35** (4), 496-521.
- Barrett J.C. & Ts'O P. (1978) Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **75**(8), 3761-3765.
- Barrett J.C., Thomassen D.G. & Hesterberg T.W. (1983) Role of gene and chromosomal mutations in cell transformation. *Annals of the New York Academy of Sciences* **407** 291-300.
- Barrett J.C., Hestenberg T.W. & Thomassen D.G. (1984) Use of cell transformation system for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis. *Pharmacological Reviews* **36**(2), 53-68.
- Barrett J.C. & Flechter W.F. (1987) Cellular and molecular mechanisms of multistep carcinogenesis in cell culture models. In: pp. 73-116 Boca Raton.
- Belury M.A., Moya-Camarena S.Y., Sun H., Snyder E., Davis II J.W., Cunningham M.L. & Vanden Heuvel J.P. (1998) Comparison of dose-response relationships for induction of lipid metabolizing and growth regulatory genes by peroxisome proliferators in rat liver. *Toxicology and Applied Pharmacology* **151**, 254-261.
- Ben Yosef T., Yanuka O., Halle D. & Benvenisty N. (1998) Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors. *Oncogene* **17** (2), 165-171.
- Bertram J.S. (2000) The molecular biology of cancer. *Molecular Aspects of Medicine* **21** (6), 167-223.
- Berwald Y. & Sachs L. (1963) *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens. *Nature* **200** 1182-1184.
- Berwald Y. & Sachs L. (1965) *In vitro* transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *Journal of the National Cancer Institute* **35** (4), 641-661.
- Bessi H., Rast C., Nguyen-Ba G. & Vasseur P. (1994) Chlorothalonil promotes morphological transformation in hamster embryo cells but does not inhibit GAP junctional intercellular communication either in SHE cells or in the V79 cell line. *The Cancer Journal* **7** (6), 248-253.
- Bessi H., Rast C., Rether B., Nguyen-Ba G. & Vasseur P. (1995) Synergistic effects of chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells. *Carcinogenesis* **16** (2), 237-244.
- Bissonnette R.P., Echeverri F., Mahboubi A. & Green D.R. (1992) Apoptotic cell death induced by c-myc is inhibited by bcl-2. *Nature* **359** 552-554.
- Boitier E., Gautier J.C. & Roberts R.A. (2003) Advances in understanding the regulation of apoptosis and mitosis by peroxisome-proliferator activated receptors in pre-clinical model: relevance for human health and disease. *Comparative Hepatology* **2** (3), 1-15.
- Borner C. (2003) The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. *Molecular Immunology* **39** (11), 615-647.

- Bouchard V.J., Rouleau M. & Poirier G.G. (2003) PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimental Hematology* **31** (6), 446-454.
- Brady H.J. & Gil-Gomez G. (1998) Bax. The pro-apoptotic Bcl-2 family member, Bax. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **30** (6), 647-650.
- Brambilla G. & Martelli A. (2004) Failure of the standard battery of short-term tests in detecting some rodent and human genotoxic carcinogens. *Toxicology* **196** (1-2), 1-19.
- Brunner T., Kasibhatla S., Pinkoski M.J., Frutschi C., Yoo N.J., Echeverri F., Mahboubi A. & Green D.R. (2000) Expression of FasLigand in activated T cells is regulated by c-Myc. *The Journal of Biochemistry* **275** (13), 9767-9772.
- Burlacu A. (2003) Regulation of apoptosis by Bcl-2 family proteins. *Journal of Molecular and Cellular Medicine* **7** (3), 249-257.
- Cain K., Bratton S.B. & Cohen G.M. (2002) The Apaf-1 apoptosome: a large caspase-activating complex. *Biochimie* **84** (2-3), 203-214.
- Canelles M., Delgado M.D., Hyland K.M., Lerga A., Richard C., Dang C.V. & Leon J. (1997) Max and inhibitory c-Myc mutants induce erythroid differentiation and resistance to apoptosis in human myeloid leukemia cells. *Oncogene* **14** 1315-1327.
- Castedo M., Ferri K., Roumier T., Metivier D., Zamzami N. & Kroemer G. (2002) Quantitation of mitochondrial alterations associated with apoptosis. *Journal of Immunological Methods* **265** (1-2), 39-47.
- Chai F., Truong-Tran A.Q., Ho L.H. & Zalewski P.D. (1999) Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: a review. *Immunology and Cell Biology* **77** 272-278.
- Chai F., Truong-Tran A.Q., Evdokiou A., Young G.P. & Zalewski P.D. (2000) Intracellular zinc depletion induces caspase activation and p21 Waf1/Cip1 cleavage in human epithelial cell lines. *The Journal of Infectious Diseases* **182**, 85-92.
- Chao D.T. & Korsmeyer S.J. (1998) BCL-2 family: regulators of cell death. *Annual Review of Immunology* **16** 395-419.
- Charles J.M., Bond D.M., Jeffries T.K., Yano B.L., Stott W.T., Johnson K.A., Cunny H.C., Wilson R.D. & Bus J.S. (1996a) Chronic Dietary Toxicity/Oncogenicity Studies on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Rodents. *Fundamental and Applied Toxicology* **33** (2), 166-172.
- Charles J.M., Dalgard D.W., Cunny H.C., Wilson R.D. & Bus J.S. (1996b) Comparative Subchronic and Chronic Dietary Toxicity Studies on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, Amine, and Ester in the Dog. *Fundamental and Applied Toxicology* **29** (1), 78-85.
- Charles J.M., Cunny H.C., Wilson R.D., Bus J.S., Lawlor T., Cifone M.A., Fellows M. & Gollapudi B. (1999a) Ames assays and unscheduled synthesis assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation Research* **444**, 207-216.

- Charles J.M., Cunny H.C, Wilson R.D, Ivett J.L, Murli H., Bus J.S. & Gollapudi B. (1999b) *In vivo* micronucleus assays on 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives. *Mutation Research* **444**, 227-234.
- Cheng E., Wei M.C., Weiler S., Flavell R.A., Mak T.W., Lindsten T. & Korsmeyer S. (2001) Bcl-2, Bcl-xL sequestrer BH3 domain-only molecules preventing Bax- and Bak-mediated mitochondrial apoptosis. *Cell* **8**, 705-711.
- Chimienti F., Seve M., Richard S., Mathieu J. & Favier A. (2001) Role of cellular zinc in programmed cell death: temporal relationship between zinc depletion, activation of caspases, and cleavage of Sp family transcription factors. *Biochemical Pharmacology* **62** (1), 51-62.
- Chipuk J.E., Kuwana T., Bouchier-Hayes L., Droin N.M., Newmeyer D.D., Schuler M. & Green D.R. (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303** (1010), 1014.
- Chouroulinkov I. & Lasne C. (1978) Two-stage (initiation-promotion) carcinogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Bulletin Du Cancer* **65** (3), 255-264.
- Christensen J.G., Romach E.H., Healy L.N., Gonzales A.J., Anderson S.P., Malarkey D.E., Corton J.C., Fox T.R., Cattley R.C. & Goldsworthy T.L. (1999) Altered *bcl-2* family expression during non-genotoxic hepatocarcinogenesis in mice. *Carcinogenesis* **20** (8), 1583-1590.
- Claassen G.F. & Hann S.R. (1999) Myc-mediated transformation: the repression connection. *Oncogene* **18**, 2925-2933.
- Cohen J.J. & Duke R.C. (1984) Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei leads to cell death. *Journal of Immunology* **132**, 38-42.
- Combes R., Balls M., Curren R.D., Fischbach M., Fusenig N., Kirkland D., Lasne C., Landolph J., LeBoeuf R.A., Marquardt H., McCormick J., Müller L., Rivedal E., Sabbioni E., Tanaka N., Vasseur P. & Yamasaki H. (1999) Cell transformation assay as predictors of human carcinogenicity, the reports and recommendations of ECVAM, workshop **39**, *ATLA* **27**, 745-767.
- Corton J.C., Lapinskas P.J. & Gonzalez F.J. (2000) Central role of PPAR[alpha] in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **448** (2), 139-151.
- Coultas L. & Strasser A. (2003) The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Seminars in Cancer Biology* **13**, 115-123.
- Couzinet A., Hérincs Z. & Hueber A.O. (2002) Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. *Medecine/Sciences* **18**, 841-852.
- Cruciani V., Mikalsen S.-O., Vasseur P. & Sanner T. (1997a) Effects of peroxisome proliferators and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate on intracellular communication and connexin43 in two hamster fibroblast systems. *International Journal of Cancer* **73**, 240-248.
- Cruciani V., Rast C., Durand M.-J., Nguyen-Ba G. & Vasseur P. (1997b) Comparative effects of clofibrate and methyl clofenapate on morphological transformation and intercellular communication of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* **18** (4), 701-706.

- Cruciani V., Rast C., Alexandre S., Nguyen-Ba G. & Vasseur P. (1999) Peroxisome proliferator-induced transformation of Syrian hamster embryo cells: influence of experimental procedures. *Toxicology in Vitro* **13**, 445-457.
- Custer L., Gibson D.P., Aardema M.J. & LeBoeuf R.A. (2000) A refined protocol for conducting the low pH 6.7 Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay. *Mutation Research* **455** (1-2), 129-139.
- Dang C.V., Resar L.M.S., Emison E., Kim S., Li Q., Prescott J.E., Wonsey D. & Zeller K. (1999a) Function of the c-Myc Oncogenic Transcription Factor. *Experimental Cell Research* **253** (1), 63-77.
- Dang C.V. (1999b) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis and metabolism. *Molecular and Cellular Biology* **19**, 1-11.
- De Moliner K.L., Evangelista de Duffard A.M., Soto E., Duffard R. & Adamo A.M. (2002) Induction of apoptosis in cerebellar granule cells by 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid. *Neurochemical Research* **77** (11), 1439-1446.
- Dean M., Levine R.A., Ran W., Kindy M.S., Sonenshein G.E. & Campisi J. (1986) Regulation of c-myc transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *The Journal of Biochemistry* **261** (20), 9161-9166.
- Decaudin D., Geley S., Hirsch F., Castedo M., Marchetti P., Macho A., Kofler R. & Kroemer G. (1997) Bcl-2 and Bcl-X_L antagonize the mitochondrial dysfunction preceding nuclear apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Cancer Research* **57** 62-67.
- Desagher S. & Martinou J.C. (2000) Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends in Cell Biology* **10** 369-377.
- Dhalluin S., Gate L., Vasseur P., Tapiero H. & Nguyen-Ba G. (1997) Dysregulation of ornithine decarboxylase activity, apoptosis and Bcl-2 oncoprotein in Syrian hamster embryo cells stage-exposed to di(2-ethylhexyl)phthalate and tetradecanoylphorbol acetate. *Carcinogenesis* **18** (11), 2217-2223.
- Dhalluin S., Elias Z., Poirot O., Gate L., Pages N., Tapiero H., Vasseur P. & Nguyen-Ba G. (1999) Apoptosis inhibition and ornithine decarboxylase superinduction as early epigenetic events in morphological transformation of Syrian hamster embryo cells exposed to 2-methoxyacetaldehyde, a metabolite of 2-methoxyethanol. *Toxicology Letters* **105** (2), 163-175.
- DiPaolo O., de Duffard A.M. & Duffard R. (2001) *In vivo* and *in vitro* binding of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid to a rat liver mitochondrial protein. *Chemico-Biological Interactions* **137** (3), 229-241.
- DiPaolo J.A., Nelson R.L. & Donovan P.J. (1971) Morphological, oncogenic and karyological characteristics of Syrian hamster embryo cells transformed *in vitro* by carcinogenic polycyclic hydrocarbons. *Cancer Research* **31**, 1118-1127.
- DiPaolo J.A. & Casto B.C. (1979) Quantitative studies of *in vitro* morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by inorganic metal salts. *Cancer Research* **39**, 1008-1013.

- Dlamini Z., Mbita Z. & Zungu M. (2004) Genealogy, expression and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacology & Therapeutics* **101**, 1-15.
- Dong J., Naito M. & Tsuruo T. (1997) c-Myc plays a role in cellular susceptibility to death receptor-mediated and chemotherapy-induced apoptosis in human monocytic leukemia U937 cells. *Oncogene* **15**, 639-647.
- Doull J., Cattley R., Elcombe C., Lake B.G., Swenberg J., Wilkinson C., Williams G. & van Gemert M. (1999) A Cancer Risk Assessment of Di(2-ethylhexyl)phthalate: Application of the New U.S. EPA Risk Assessment Guidelines. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **29** (3), 327-357.
- Dreosti I.E. (2001) Zinc and the gene. *Mutation Research* **475**,161-167.
- Dyall S.D. & Johnson P.J. (2000) Origins of hydrogenosomes and mitochondria : evolution and organelle biogenesis. *Current Opinion in Microbiology* **3** 404-411.
- Ebert R., Barrett J.C., Wiseman R.W., Pechan R., Reiss E., Röllich G. & Schiffmann D. (1990) Activation of cellular oncogenes by chemical carcinogens in Syrian hamster embro fibroblasts. *Environmental Health Perspectives* **88**, 175-178.
- El-Deiry W.S. (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Seminars in Cancer Biology* **8**, 345-357.
- Elias Z. & Cavelier C. (1982) Utilisation des tests de transformation cellulaire dans la détection des cancérogènes chimiques. *Bulletin Du Cancer* **69** (1), 33-57.
- Elias Z., Poirot O., Daniere M.C., Terzetti F., Marande A.M., Dzwigaj S., Pezerat H., Fenoglio I. & Fubini B. (1989) Cytotoxic and transforming effects of silica particles with different surface properties in Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Toxicology in Vitro* **14**, 409-422.
- Endo S. & Hieber L. (1995) Chromosome alterations that correlate with progression to immortality in Syrian hamster embryo cells transformed by gamma-irradiation. *International Journal of Radiation Biology* **67** 177-186.
- Engelhardt G., Schwind K.-R. & ler B. (2004) The testing of chemicals in the Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay for assessment of carcinogenic potential. *Toxicology in Vitro* **18** (2), 213-218.
- Epand R.F., Martinou J.C., Montessuit S., Epand R.M. & Yip C.M. (2002) Direct evidence for membrane pore formation by the apoptotic protein Bax. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **298** 744-749.
- Esposti M.D. & Dive C. (2003) Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304** (3), 455-461.
- Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z. & Hancock D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69** (1), 119-128.
- Facchini L.M. & Penn L.Z. (1998) The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **12** (9), 633-651.

- Fang M.Z., Woongchon M. & Cho M.H. (2002) Cadmium affects genes involved in growth regulation during two-stage transformation of Balb/3T3 cells. *Toxicology* **177**, 253-265.
- Fanidi A., Harrington E.A. & Evan G.I. (1992) Cooperative interaction between *c-myc* and *bcl-2* proto-oncogenes. *Nature* **359** 554-556.
- Fisher D.E. (2001) The p53 tumor suppressor: critical regulator of life & death in cancer. *Apoptosis* **6**, 7-15.
- Frumkin H. (2003) Agent orange and cancer : an overview for clinicians. *Environmental carcinogens* **53** (4), 245-255.
- Fukamachi Y., Karasaki Y., Sugiura T., Itoh H., Abe T., Yamamura K. & Higashi K. (1998) Zinc Suppresses Apoptosis of U937 Cells Induced by Hydrogen Peroxide through an Increase of the Bcl-2/Bax Ratio. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **246** (2), 364-369.
- Ganju N. & Eastman A. (2003) Zinc inhibits Bax and Bak activation and cytochrome *c* release induced by chemicals inducers of apoptosis but not by death-receptor-initiated pathway. *Cell Death and Differentiation* **10**, 652-661.
- Garabrant D.H. & Philbert M.A. (2002) Review of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid, epidemiology and toxicology. *Critical Reviews in Toxicology* **32** (4), 233-257.
- Ge R., Tao L., Kramer P.M., Cunningham M.L. & Pereira MA. (2002) Effect of peroxisome proliferator on the methylation and protein level of the *c-Myc* protooncogene in B6C3F1 mice liver. *Journal of Biochemical Molecular Toxicology* **16**, 41-47.
- Genestier L., Kasibhatla S., Brunner T. & Green D.R. (1999) Transforming growth factor β 1 inhibits Fas ligand expression and subsequent activation-induced cell death in T cells via downregulation of *c-Myc*. *Journal of Experimental Medicine* **189** (2), 231-239.
- Gobé G. & Harnon B. (2001) Apoptosis : Morphological criteria and other assays. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-6.
- Goll V., Alexandre E., Viollon-Abadie C., Nicod L., Jaeck D. & Richert L. (1999) Comparison of the effects of various peroxisome proliferators on peroxisomal enzyme activities, DNA synthesis and apoptosis in rat and human hepatocyte cultures. *Toxicology and Applied Pharmacology* **160**, 21-32.
- Gollapudi B., Charles J. M., Linscombe V. A., Day S. J. & Bus J. S. (1999) Evaluation of the genotoxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its derivatives in mammalian cell cultures. *Mutation Research* **444**, 217-225.
- Grandgirard D., Studer E., Monney L., Belser T., Fellay I., Borner C. & Michel M.R. (1998) Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells : evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *The EMBO Journal* **17** (5), 1268-1278.
- Green D.R. & Reed J.C. (1998) Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281**, 1309-1312.
- Harris C.C. (1991) Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1900s. *Cancer Research* **51**, 5023s-5044s.

- Hasmall S.C., James N.H., Macdonald N., West D., Chevalier S., Cosulich S.C. & Roberts R.A. (1999) Suppression of apoptosis and induction of DNA synthesis *in vitro* by the phthalate plasticizers monoethylhexylphthalate (MEHP) and diisononylphthalate (DINP) a comparison of rat and human hepatocytes *in vitro*. *Archives of Toxicology* **73**, 451-456.
- Hasmall S.C., James N.H., Macdonald N., Gonzalez F.J., Peters J.M. & Roberts R.A. (2000) Suppression of mouse hepatocyte apoptosis by peroxisome proliferators: role of PPAR[alpha] and TNF[alpha]. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **448** (2), 193-200.
- Heidelberger C., Freeman A.E., Pienta R.J., Sivak A., Bertram J.S., Casto B.C., Dunkel V.C., Francis M.W., Kakunaga T., Little J.B. & Schechtman L.M. (1983) Cell transformation by chemical agents - a review and analysis of the literature. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutation Research* **114**, 283-385.
- Heikkila R., Schwab G., Wickstrom E., Loke S.L., Pluznik D.H., Watt R. & Neckers L.M. (1987) A *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry S phase but not progress from G₀ to G₁. *Nature* **328**, 445-449.
- Heiser D., Labi V., Erlacher M. & Villunger A. (2004) The Bcl-2 protein family and its role in the development of neoplastic disease. *Experimental Gerontology*, **39**: 1125-1135.
- Henrisson M., Lindström M. & Wiman K.G. (2001) Inactivation of Myc-induced p53 dependent apoptosis in human tumors. *Apoptosis* **6**, 133-137.
- Hoflack J.C., Durand M.J., Poirier G.G., Maul A. & Vasseur P. (1997a) Alteration in methylmethanesulfonate-induced poly(ADP-ribosylation) by 2-butoxyethanol in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* **18** (12), 2333-2338.
- Hoflack J.C., Vasseur P. & Poirier G.G. (1997b) Glycol ether induce death and necrosis in human leukemia cells. *Biochemistry and Cell Biology* **75** 415-425.
- Hofseth L.J., Hussain S.P. & Harris C.C. (2004) p53: 25 years after its discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* **25** (4), 177-181.
- Holland N.T., Duramad P., Rothman N., Figgs L.W., Blair A., Hubbard A. & Smith M.T. (2002) Micronucleus frequency and proliferation in human lymphocytes after exposure to herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid *in vitro* and *in vivo*. *Mutation Research* **521** (1-2), 165-178.
- Hoyer P.B. (2001) Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochemical Pharmacology* **62** (12), 1557-1564.
- Hueber A.O., Zornig M., Lyon D., Suda T., Nagata S. & Evan G. (1997) Requirement for the CD95 receptor-ligand pathway in c-Myc-induced apoptosis. *Science* **278**, 1305-1309.
- IARC (1991) Occupational exposure in insecticides exposure and some pesticides. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, *IARC Monographs* **53**, Lyon, France, 426p.
- IARC (2000) Some Industrial Chemicals. *IARC Monographs* **77**, Lyon, France, 564p.

- Ibrado A.M., Huang Y., Fang G. & Bhalla K. (1996a) Bcl-xl overexpression inhibits taxol-induced Yama protease activity and apoptosis. *Cell Growth and Differentiation* **7**, 1087-1094.
- Ibrado A.M., Huang Y., Fang G., Liu L. & Bhalla K. (1996b) Overexpression de Bcl-2 or Bcl-xL inhibits Ara-C-induced CPP32/Yama protease activity and apoptosis of human acute myelogenous leukemia HL-60 cells. *Cancer Research* **56**, 4743-4748.
- Ichimura T., Kawamura M. & Mitani A. (2003) Co-localized expression of FasL, Fas, Caspase-3 and apoptotic DNA fragmentation in mouse testis after oral exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate. *Toxicology* **194** (1-2), 35-42.
- IPCS (1992) *Diethylhexyl phthalate (DEHP)*, *Environmental Health Criteria* **131**, World Health Organization, Genève, Suisse.
- IPCS (2001) *Zinc*, *Environmental Health Criteria*, **221**, World Health Organization, Genève, Suisse.
- Isfort R.J., Cody D.B., Doersen C.J., Kerckaert G.A. & LeBoeuf R.A. (1994) Alteration in cellular differentiation, mitogenesis, cytoskeleton and growth characteristics during Syrian hamster embryo cell multistep *in vitro* transformation. *International Journal of Cancer* **59**, 114-125.
- Isfort R.J., Kerckaert G.A., Cody D.B., Carter J., Driscoll K.E. & LeBoeuf R.A. (1996) Isolation and biological characterization of morphological transformation-sensitive Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* **17** (5), 997-1005.
- Jacotot E., Ferri K.F. & Kroemer G. (2000) Apoptose et mitochondries Le cote obscur de l'organite. *Annales de l'Institut Pasteur* **11** (4), 19-36.
- James N.H., Soames A.R. & Roberts R.A. (1998) Suppression of hepatocyte apoptosis and induction of DNA synthesis by the rat and mouse hepatocarcinogen diethylhexylphthalate (DEHP) and the mouse hepatocarcinogen 1,4-dichlorobenzene (DCB). *Archives of Toxicology* **72** (784), 790.
- Jankowski-Hennig M.A., Clegg M.S., Daston G.P., Rogers J.M. & Keen C.L. (2000) Zinc-Deficient Rat Embryos Have Increased Caspase 3-like Activity and Apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **271** (1), 250-256.
- Juin P., Hueber A.O., Littlewood T. & Evan G. (1999) c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome *c* release. *Genes & Development* **13** (11), 1367-1381.
- Juin P., Hunt A., Littlewood T., Griffiths B., Swigart L.B., Korsmeyer S. & Evan G. (2002) c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Molecular and Cellular Biology* **22** (17), 6158-6169.
- Juin P., Geneste O., Raimbaud E. & Hickman J.A. (2004) Shooting at survivors: Bcl-2 family members as drug target for cancer. *Biochimica & Biophysica Acta* **1644** 251-260.
- Jurgensmeier J.M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D. & Reed J.C. (1998) Bax directly induces release of cytochrome *c* from isolated mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95** (9), 4997-5002.
- Kaioumova D. & Khabutdinova L.K. (1998) Cytogenetic characteristics of herbicides production workers in Ufa. *Chemosphere* **37**(9), 1755-1759.

- Kaioumova D., Kaioumov F., Opelz G. & Susal C. (2001a) Toxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on lymphoid organs of the rat. *Chemosphere* **43** (4-7), 801-805.
- Kaioumova D., Susal C. & Opelz G. (2001b) Induction of apoptosis in human lymphocytes by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Human Immunology* **62** (1), 64-74.
- Kang K.S., Lee Y.S., Kim H.S. & Kim S.H. (2002) Di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced cell proliferation is involved in the inhibition of gap junctional intercellular communication and blockage of apoptosis in mouse Sertoli cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, part A* **65**, 447-459.
- Kaufmann S.H. & Earnshaw W.C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Experimental Cell Research* **256**, 42-49.
- Kelekar A. & Thompson C.B. (1998) Bcl-2-family proteins : the role of the BH3 domain in apoptosis, *Trends in Cell Biology* **8**, 324-330.
- Keller J.M., Collet P., Bianchi A., Huin C., Bouillaud-Kremarik P., Becuwe P., Schohn H., Domenjoud L. & Dauça M. (2000) Implications of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in development, cell lifestatus and disease. *The International Journal of Developmental Biology* **44** 429-442.
- Kerckaert G.A., LeBoeuf R.A. & Isfort R.J. (1996) pH effects on the lifespan and transformation frequency of Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Carcinogenesis* **17**(9), 1819-1824.
- Kerr J.F.R., Winterford C.M. & Harmon B.V. (1994) Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013-2026.
- Kiechle F. & Zhang X. (2002) Apoptosis : biochemical aspect and clinical implication. *Clinica Chimica Acta* **326**, 27-45.
- Kijima K., Toyosawa K., Yasuba M., Matsuoka N., Adachi T., Komiyama M. & Mori C. (2004) Gene expression analysis of the rat testis after treatment with di(2-ethylhexyl) phthalate using cDNA microarray and real time PCR. *Toxicology and Applied Pharmacology, In press, corrected proof*.
- Klefstrom J., Verschuren E.W. and Evan G. (2002) c-Myc augments the apoptotic activity of cytosolic death receptor signaling by engaging the mitochondrial apoptotic pathway. *The Journal of Biochemistry* **277** (45), 43224-43232.
- Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R. and Newmeyer D.D. (1997) The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* **275**, 1132-1136.
- Ko C.B., Kim S.J., Park C., Kim B.R., Shin C.H., Choi S., Chung S.Y., Noh J.H., Jeun J.H., Kim N.S., Park R. (2004) Benzo(a)pyrene-induced apoptotic death of mouse hepatoma Hepa1c1c7 via activation of intrinsic caspase cascade and mitochondrial dysfunction. *Toxicology* **199**, 35-46.
- Köhler C., Orrenius S. & Zhivotovsky B. (2002) Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *Journal of Immunological Methods* **265**, 97-110.

- Kolenko V.M., Uzzo R.G., Dulin N., Hauzman E., Bukowski R. & Finke J.H. (2001) Mechanisms of apoptosis induced by zinc deficiency in peripheral blood T lymphocytes. *Apoptosis* **6**, 419-429.
- Kroemer G., Zamzami N. & Susin S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunology Today* **18** (1), 44-51.
- Kroemer G., Dallaporta B. & Resche-Rigon M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annual Review of Physiology* **60**, 619-642.
- Kroemer G. & Reed J.C. (2000) Mitochondrial control of cell death. *Nature Medecine* **6** (5), 513-519.
- Kuida K., Haydar T.F., Kuan C.Y., Gu Y., Taya C., Karasuyama H., Su M.S., Rakic P. & Flavell R.A. (1998) Reduced Apoptosis and Cytochrome c-Mediated Caspase Activation in Mice Lacking Caspase 9. *Cell* **94**, 325-337.
- Kuwana T. & Newmeyer D.D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Current Opinion in Cell Biology* **15** (6), 691-699.
- Latini G., Verroti A. & De Felice C. (2004) Di-ethylhexyl phthalate and endocrine disruption : a review. *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic disorders* **4**, 37-40.
- LeBlanc A.C. (2003) Natural cellular inhibitors of caspases. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **27**, 215-229.
- LeBoeuf R.A., Kerckaert G.A., Poiley J.A. & Raineri R. (1989) An interlaboratory comparison of enhanced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells cultured under conditions of reduced bicarbonate concentration and pH. *Mutation Research* **222** (3), 205-218.
- LeBoeuf R.A., Lin P., Kerckaert G.A. & Gruenstein E. (1992) Intracellular acidification is associated with enhanced morphological transformation in Syrian hamster embryo cells. *Cancer Research* **1** (52), 144-148.
- Lee J., Richburg J.H., Shipp E.B., Meistrich M.L. & Boekelheide K. (1999) The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis. *Endocrinology* **140** (2), 852-858.
- Leng Y., Gu Z.P. & Cao L. (2000) Apoptosis induced by droloxifene and *c-myc*, *bax* and *bcl-2* mRNA expression in cultured luteal cells of rats. *European Journal of Pharmacology* **409** (2), 123-131.
- Leonard A., Gerber G.B. & Leonard F. (1986) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mutation Research* **168**, 343-353.
- Lowe S.W. & Lin A.W. (2000) Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* **21** (3), 485-495.
- Lyons S.K. & Clarke A.R. (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *British Medical Bulletin* **52**, 554-569.
- MacFarlane M. (2003), TRAIL-induced signalling and apoptosis, *Toxicology Letters* **139**, 89-97.

- Madrigal-Bujaidar E., Hernandez-Ceruelos A. & Chamorro G. (2001) Induction of sister chromatid exchanges by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in somatic and germ cells of mice exposed *in vivo*. *Food and Chemical Toxicology* **39** (9), 941-946.
- Mally A. & Chipman J.K. (2002) Non-genotoxic carcinogens: early effects on gap junctions cell proliferation and apoptosis in the rat. *Toxicology* **180**, 233-248.
- Maloney E.K. & Waxman D.J. (1999) *trans*-activation of PPAR α and PPAR γ by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology* **161**, 209-218.
- Marchenko N.D., Zaika A. & Moll U.M. (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. *The Journal of Biological Chemistry* **275** (21), 16202-16212.
- Marchetti P., Castedo M., Susin S.A., Zamzami N., Hirsch T., Macho A., Haeflner A., Hirsch F., Geuskens M. & Kroemer G. (1996) Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *The Journal of Experimental Medicine* **184** (3), 1155-1160.
- Martin S.S. & Vuori K. (2004) Regulation of Bcl-2 proteins during anoikis and amorphosis, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1692**, 145-157.
- Meek D.W. (2004) The p53 response to DNA damage. *DNA Repair* **3**, 1049-1056.
- Michael D. & Oren M. (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Seminars in Cancer Biology* **13**, 49-58.
- Mikalsen S.O. & Sanner T. (1993) Intercellular communication in colonies of Syrian hamster embryo cells and the susceptibility for morphological transformation. *Carcinogenesis* **14** (2), 251-257.
- Minn A.J., Vélez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M. & Thompson C.B. (1997) Bcl-x_L forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* **385**, 353-357.
- Mitchell K.O., Ricci M.S., Miyashita T., Dicker D.T., Jin Z. & Reed J.C. (2000) Bax is a transcriptional target and mediator of c-Myc-induced apoptosis. *Cancer Research* **60**, 6318-6325.
- Muchmore S.W., Sattler M., Liang H., Meadows R.P., Harlan J.E., Yoon H.S., Nettlesheim D., Chang B.S., Thompson C.B., Wong S.L., Ng S.C. & Fesik S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* **381**, 335-341.
- Müllauer L., Gruber P., Sebinger D., Buch J., Wohlfart S. & Chott A. (2001) Mutations in apoptosis genes : a pathogenic factor for human disease. *Mutation Research* **488**, 211-231.
- Nakatani T., Tawaramoto M., Kennedy D.O., Kojima A. & Matsui-Yuasa I. (2000) Apoptosis induced by chelation of intracellular zinc is associated with depletion of cellular reduced glutathione level in rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions* **125**, 151-153.
- Nham Tuyet L.T. & Johansson A. (2001) Impact of chemical warfare with agent orange on women's reproductive lives in Vietnam: A pilot study. *Reproductive Health Matters* **9** (18), 156-164.
- Nesbit C.E., Tersak J.M. & Prochownik E.V. (1999) MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene* **18**, 3004-3016.

- Oakes D.J. & Pollak J.K. (1999) Effects of a herbicide formulation, Tordon 75D(R), and its individual components on the oxidative functions of mitochondria. *Toxicology* **136** (1), 41-52.
- Oakes D.J. & Pollak J.K. (2000) The *in vitro* evaluation of the toxicities of three related herbicide formulations containing ester derivatives of 2,4,5-T and 2,4-D using sub-mitochondrial particles. *Toxicology* **151**, 1-9.
- O'Connell B.C., Cheung A.F., Simkevitch C.P., Tam W., Ren X., Mateyak M.K. & Sedivy J.M. (2003) A large scale genetic analysis of c-Myc regulated gene expression patterns. *The Journal Of Biological Chemistry* **278** (14), 12563-12573.
- Obaya A.J., Mateyak M.K. & Sedivy J.M. (1999) Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* **18**, 2934-2941.
- OCDE (2001) Detailed review paper on non-genotoxic carcinogens detection : the performance of *in vitro* cell transformation assays. OCDE, *Environmental Health and Safety Publication* **31**.
- Oh Y.J., Uhland-Smith A., Kim J.E. & O'Malley K.L. (1997) Regions outside of the Bcl-2 homology domains, BH1 and BH2 protect a dopaminergic neuronal cell line from staurosporine-induced cell death. *Molecular Brain Research* **51** (1-2), 133-142.
- Okubo T., Suzuki T., Yokoyama Y., Kano K. & Kano I. (2003) estimation of estrogenic and anti-estrogenic activities of some phthalate diesters and monoesters by MCF-7 cell proliferation assay *in vitro*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **26** (8), 1219-1224.
- Olie R.A., Simoes-Wüst A.P., Baumann B., Leech S.H., Fabbro D., Stahel R.A. & Zangemeister-Wittke U. (2000) A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy. *Cancer Research* **60**, 2805-2809.
- Oteiza P., Clegg M.S., Zago M.P. & Keen C.L. (2000) Zinc deficiency induces oxidative stress and AP-1 activation in 3T3 cells. *Free Radical Biology and Medicine* **28** (7), 1091-1099.
- Parfett C.L., Marquardt T. & Pilon R. (2000) Promotion of Morphological Transformation by di-n-butyltin Dichloride in C3H/10T1/2 Cells: Prediction by Prior Expression of Tumour Promoter-Responsive Genes. *Food and Chemical Toxicology* **38**, 339-349.
- Parone P.A., James D. & Martinou J.C. (2002) Mitochondria: regulating the inevitable, *Biochimie* **84**, 105-111.
- Pearson W.R. & Lipman D.J. (1988) Improved tools for biological sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **85**, 2444-2448.
- Pelengaris S. & Khan M. (2003) The many faces of c-MYC. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **416** (2), 129-136.
- Perry D.K., Smyth M.J., Wang H.G., Reed J.C., Duriez P., Poirier G.G., Obeid L.M. & Hannun Y.A. (1997a) Bcl-2 acts upstream of the PARP protease and prevents its activation. *Cell Death and Differentiation* **4**, 29-33.
- Perry D.K., Smyth M.J., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Duriez P., Poirier G.G. & Hannun Y.A. (1997b) Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. *The Journal of Biological Chemistry* **30** (25), 18530-18533.

- Pienta R.J., Poiley J.A. & Leberz III W.B. (1977) Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable *in vitro* bioassay for identifying diverse carcinogens. *International Journal of Cancer* **19**, 642-655.
- Prendergast G.C. (1999) Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene* **18** (19), 2967-2987.
- Reed J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *The Journal of Cell Biology* **124** (1-2), 1-6.
- Reed J.C. (1997) Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* **387**, 773-776.
- Regula K.M., Ens K. & Kirshenbaum L.A. (2003) Mitochondria-assisted cell suicide: a license to kill. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **35**, 559-567.
- Richburg J.H. (2000) The relevance of spontaneous- and chemically-induced alterations in testicular germ cell apoptosis to toxicology. *Toxicology Letters* **112-113**, 79-86.
- Rivedal E., Sanner T., Enomoto T. & Yamasaki H. (1985) Inhibition of intercellular communication and enhancement of morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by TPA. Use of TPA-sensitive and TPA-resistant cell lines. *Carcinogenesis* **6**(6), 899-902.
- Rivedal E., Mikalsen S.O. & Sanner T. (2000) Morphological transformation and effect on gap junction intercellular communication in Syrian hamster embryo cells as screening tests for carcinogens devoid of mutagenic activity. *Toxicology in Vitro* **14** (2), 185-192.
- Roberts R.A., James N.H., Woodyatt N.J., Macdonald N. & Tummey A. (1998) Evidence for the suppression of apoptosis by the peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α). *Carcinogenesis* **19** (1), 43-48.
- Roberts R.A., Chevalier S., Hasmail S.C., James N.H., Cosulich S.C. & Macdonald N. (2002) PPAR α and the regulation of cell division and apoptosis. *Toxicology* **181-182**, 167-170.
- Roberts R.A., Michel C., Coyle B., Freathy C., Cain K. & Boitier E. (2004) Regulation of apoptosis by peroxisome proliferators. *Toxicology Letters* **149** (1-3), 37-41.
- Sansome C., Zaika A., Marchenko N.D. & Moll U.M. (2001) Hypoxia death stimulus induces translocation of p53 protein to mitochondria. *FEBS Letters* **488**, 110-115.
- Sarkar D., Leszczyniecka M., Kang D.C., Lebedeva I.V., Valerie K., Dhar S., Pandita T.K. & Fischer P.B. (2003) Down-regulation of Myc as a potential target for growth arrest induced by human polynucleotide phosphorylase (*hPNPase^{old-35}*) in human melanoma cells. *The Journal of Biological Chemistry* **278** (27), 24542-24551.
- Schechtman L.M. (1985) Metabolic activation of procarcinogens by subcellular enzyme fractions in the C3H10T^{1/2} and BALB/c3T3 cell transformation systems. In: Kakunaga T. & Yamasaki H. (Eds), 137-162, *International Agency for Research on Cancer*, Lyon.
- Schinzel A., Kaufmann T. & Borner C. (2004) Bcl-2 family members: intracellular targeting, membrane-insertion and changes in subcellular localization. *Biochimica & Biophysica Acta* **1644**, 95-105.

- Scorrano L. & Korsmeyer S.J. (2003) Mechanisms of cytochrome *c* release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **304** (3), 437-444.
- Seo K.W., Kim K.B., Kim Y.J., Choi J.Y., Lee K.T. & Choi K.S. (2004) Comparison of oxidative stress and changes of xenobiotic metabolizing enzymes induced by phthalates in rats. *Food and Chemical Toxicology* **42**, 107-114.
- Seve M., Chimienti F. & Favier A. (2002) Role du zinc intracellulaire dans la mort cellulaire programmée: Role of intracellular zinc in programmed cell death. *Pathologie Biologie* **50** (3), 212-221.
- Sgonc R. & Gruber J. (1998) Apoptosis detection: an overview. *Experimental Gerontology* **33** (6), 525-533.
- Sheikh M.S. & Huang Y. (2004) Death receptors as targets of cancer therapeutics. *Current Cancer Drug Targets* **4**, 97-104.
- Shimizu S., Konishi A., Kodama T. & Tsujimoto Y. (2000) BH4 domain of antiapoptotic Bcl-2 family members closes voltage-dependant anion channel and inhibits apoptotic mitochondrial changes and cell death. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97** (7), 3100-3105.
- Shimoda R., Achanzar W.E., Qu W., Nagamine T., Takagi H., Mori M. & Waalkes M.P. (2003) Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicological Sciences* **73**, 294-300.
- Solary E., Bertrand R. & Pommier Y. (1993) Le rôle de l'apoptose dans la genèse et le traitement du cancer. *Medecine/Sciences* **9**, 667-675.
- Solary E., Bettaieb A., Dubrez-Daloz L. & Garrido C. (2002) Implications physiopathologiques des altérations des gènes impliqués dans la régulation de la mort cellulaire. *Medecine/Sciences* **18**, 861-873.
- Soldani C. & Scovassi A.I. (2002) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: an update. *Apoptosis* **7**, 321-328.
- Soldatenkov V.A., Notario V. & Dritschilo A. (1996) Expression of the human Bcl-2 increase resistance of Edwing's sarcoma cells to apoptosis and inhibits poly(ADP-ribose)polymerase cleavage induced by radiation. *International Journal of Oncology* **9**, 547-551.
- Soucie E.L., Annis M.G., Sedivy J., Filmus J., Leber B., Andrews D.W. & Penn L.Z. (2001) Myc potentiates apoptosis by stimulating Bax activity at the mitochondria. *Molecular and Cellular Biology* **21** (14), 4725-4736.
- Soussi T. (2002) Cycle cellulaire et apoptose. *Medecine/Sciences* **4** (16), 469-472.
- Sprick M.R. & Walczak H. (2004) The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1644**, 125-132.
- Sunderman Jr F.W. (1995) The influence of zinc on apoptosis. *Annals of Clinical and Laboratory Science* **25** (2), 134-142.

- Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M. & Kroemer G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *Journal of Experimental Medicine* **184**, 1331-1341.
- Takahashi M., Barrett J.C. & Tsutsui T. (2002) Transformation by inorganic arsenic compound of normal Syrian hamster embryo cells into a neoplastic state in which they become anchorage-independent and cause tumors in newborn hamsters. *The International Journal of Cancer* **99**, 629-634.
- Tamm I., Schriever F., & Dorken B. (2001) Apoptosis: implications of basic research for clinical oncology. *The Lancet Oncology* **2** (1), 33-42.
- Tamura T., Sadakata N., Oda T. & Muramatsu T. (2002) Role of zinc ions in ricin-induced apoptosis in U937 cells. *Toxicology Letters* **132** (2), 141-151.
- Tao L., Yang S., Xie M., Kramer P.M. & Pereira M.A. (2000) Hypomethylation and overexpression of c-jun and c-myc protooncogenes and increased DNA methyltransferase activity in dichloroacetic and trichloroacetic acid-promoter mouse liver tumors. *Cancer Letters* **158**, 185-193.
- Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
- Thompson E.B. (1998) The many roles of c-Myc in apoptosis. *Annual Review of Physiology* **60**, 575-600.
- Thorburn A. (2004) Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signalling* **16**, 139-144.
- Thornberry N.A. & Lazebnik Y. (1998) Caspases: Enemies Within. *Science* **281**, 1312-1316.
- Thornborrow E.C. & Manfredi J.J. (1999) One mechanism for cell type-specific regulation of the *bax* promoter by the tumor suppressor p53 response element. *The Journal of Biological Chemistry* **274** (47), 33747-33756.
- Tomicic M.T. & Kaina B. (2001) Hamster Bcl-2 Protein Is Cleaved *in Vitro* and in Cells by Caspase-9 and Caspase-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **281** (2), 404-408.
- Trudel M., Lanoix J., Barisoni L., Blouin M.J., Desforges M., L'Italien C. & D'Agati V. (1997) c-Myc-induced apoptosis in polycyclic disease is Bcl-2 and p53 independent. *The Journal of experimental Medicine* **186** (11), 1873-1884.
- Truong-Tran A.Q., Carter J., Ruffin R.E. & Zalewski P.D. (2001) The role of zinc in caspase activation and apoptotic cell death. *BioMetals* **14**, 315-330.
- Tsutsui T., Watanabe E. & Barrett J.C. (1993) Ability of peroxisome proliferators to induce cell transformation, chromosome aberrations and peroxisome proliferation in cultured Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* **14** (4), 611-618.
- Tsutsui T., Taguchi S., Tanaka Y. & Barrett J.C. (1997) 17 β -estradiol, diethylstilbestrol, tamoxifen, toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformation and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells. *International Journal of Cancer* **70**, 188-193.

- Tuschl H. & Schwab C. (2003) Cytotoxic effects of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology* **41** (3), 385-393.
- Vasak M. & Hasler D.W. (2000) Metallothioneins: new functional and structural insights. *Current Opinion in Chemical Biology* **4** (2), 177-183.
- Vasseur P., Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G., Elias Z. & Poirot O. (1998) Cell transformation assays. Non-genotoxic carcinogens : mechanisms based detection methods *Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement*, 1-21.
- Vasseur P., Alexandre S., Bessi H., Maire M.A., Rast C., Elias Z. & Lasne C. (2004) The Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation assay as a predictor of carcinogenicity, UKEMS - United Kingdom Environmental Mutagen Society, 27th Annual Meeting, University of Loughborough, 4th- 7th july 2004, *communication orale*.
- Vermeulen K., Berneman Z.N. & Van Bockstaele D.R. (2003) Cell cycle and apoptosis. *Cell Proliferation* **36**, 165-175.
- Wang X.W. & Harris C.C. (1997) p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *Journal of Cellular Physiology* **173**, 247-255.
- Watanabe E., Shimokado K., Asahara T., Dohi K. & Niwa O. (1999) Analysis of the *c-myc*, *K-ras* and *p53* genes in methylchloranthrène-induced mouse sarcomas. *Japanese Journal of Cancer Research* **90**, 40-47.
- Wei M.C., Zong W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panoutsakopoulou V., Ross A.J., McGregor G.R., Thompson C.B. & Korsmeyer S. (2004) Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* **292**, 727-730.
- WHO/OMS (1984) Acide dichloro-2,4-phenoxyacétique (2,4-D), *Critères d'hygiène de l'environnement*. Genève, Suisse.
- Wyllie A.H. (1980) Cell death: The significance of apoptosis. *International Review of Cytology* **68**, 251-306.
- Yamasaki H., Mesnil M., Omori Y., Mironov N. & Krutovskikh V. (1995) Intercellular communication and carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **333** (1-2), 181-188.
- Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.-I., Jones D.P. & Wang X. (1997) Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Sciences* **275**, 1129-1132.
- Yu J., Wang Z., Kinzler K.W., Vogelstein B. & Zhang L. (2003) PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100** (4), 1931-1936.
- Zalewski P.D., Forbes I.J. & Betts W.H.. (1993) Correlation of apoptosis with change in intracellular labile Zn(II) using Zinquin[(2-methyl-8-*p*-toluenesulphonamido-6-quinolyloxy)acetic acid], a new specific fluorescent probe for Zn(II). *Biochemical Journal* **295**, 403-408.

Zamzami N. & Kroemer G. (2003) Apoptosis : mitochondrial membrane permeabilization - The (W)hole story ? *Current Biology* **13**, R71-R73.

Zeller,K., Jegga,A.G., Aronow,B.J., O'Donnell,K.A. & Dang,C.V. (2003) An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor : identification of direct genomic targets. *Genome Biology* **4**, R69.

Zha J., Harada H., Osipov K., Jockel J., Waksman G. & Korsmeyer S.J. (1997) BH3 Domain of BAD Is Required for Heterodimerization with BCL-XL and Pro-apoptotic Activity. *Journal of Biological Chemistry* **272** (39), 24101-24104.

Zhang H., Kamendulis L. M., Jiang J., Xu Y. & Klaunig J. E. (2000) Acrylonitril-induced morphological transformation in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* **21**(4), 727-733.

Zhang L., Yu J., Park B.H., Kinzler K.W. & Vogelstein B. (2000) Role of Bax in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* **290**, 989-992.

ANNEXES

ANNEXE 1

Comparaison de la performance du test de transformation morphologique des cellules SHE avec les tests de génotoxicité et de cytogénétique classique (OCDE., 2001 ; Vasseur *et al.*, 2004).

	Ames	Mouse Lymphoma L5178Y (MLA)	Transformation Morphologique des cellules SHE	Aberrations chromosomiques (ABS) <i>in vitro</i>	Micronoyaux (MN) <i>in vivo</i>
Concordance	51 %	78 %	83 %	62 %	50 %
Sensibilité	38 %	93 %	88 %	61 %	48 %
Spécificité	82 %	39 %	70 %	63 %	58 %
Prédictivité positive	83 %	79 %	86 %	77 %	80 %
Prédictivité négative	36 %	69 %	74 %	45 %	25 %
Faux positifs	62 %	7 %	11 %	39 %	52 %
Faux négatifs	18 %	61 %	30 %	37 %	42 %

Concordance : pourcentage de corrélation entre l'expérimentation *in vivo* et *in vitro* $(a+b)/(a+b+c+d)*100$

Sensibilité : Pourcentage de cancérogènes qui sont trouvés positifs en transformation cellulaire $(a/a+c)*100$

Spécificité : Pourcentage de non-cancérogènes qui sont trouvés négatifs en transformation cellulaire $(d/b+d)*100$

Prédictivité positive : Pourcentage de positifs en transformation cellulaire qui sont cancérogènes $(a/a+b)*100$

Prédictivité négative : Pourcentage de négatifs en transformation cellulaire qui sont non-cancérogènes $(d/c+d)*100$

Faux positifs : $b/b+d$

Faux négatifs : $c/a+c$

<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>	
	Cancérogènes	Non-cancérogènes
+	a	b
-	c	d

ANNEXE 2**Composition du Milieu de Eagle Modifié par Dulbecco (DMEM)¹**

COMPOSANTS	mg/mL
SELS INORGANIQUES	
CaCl ₂ (anhydre)	200,00
Fe(NO ₃) 9H ₂ O	0,10
KCl	400,00
MgSO ₄ (anhydre)	97,67
NaCl	6400,00
NAH ₂ PO ₄ H ₂ O	125,00
AUTRES COMPOSANTS	
D-Glucose	1000,00
Pyruvate de Sodium	15,00
ACIDES AMINES	
L-Arginine HCl	84,00
L-Cystine 2H ₂ O	62,77
L-Glutamine	584,00
Glycine	30,00
L-Histidine HCl H ₂ O	42,00
L-Isoleucine	105,00
L-Leucine	105,00
L-Lysine HCl	146,00
L-Méthionine	30,00
L-Phénylalanine	66,00
L-Sérine	42,00
L-Thréonine	95,00
L-Tryptophane	16,00
L-Tyrosine (sel dissodique)	104,18
L-Valine	94,00
VITAMINES	
Pantothénate de Calcium	4,00
Chlorure de Choline	4,00
Acide folique	4,00
I-inositol	7,20
Nicotinamide	4,00
Pyridoxine HCl	4,00
Riboflavine	0,40
Thiamine HCl	4,00

¹ Le milieu DMEM utilisé correspond au milieu DMEM en poudre n° 31600 de chez Gibco/Life Technologies commandé sans rouge de phénol.