



HAL
open science

Apoptose et transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE)

Stéphanie Alexandre

► **To cite this version:**

Stéphanie Alexandre. Apoptose et transformation morphologique des cellules embryonnaires de hamster syrien (SHE). Biologie animale. Université Paul Verlaine - Metz, 2000. Français. NNT : 2000METZ053S . tel-01775491

HAL Id: tel-01775491

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775491>

Submitted on 24 Apr 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>

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	20001765
Cote	S/M2 00/53
Loc	Magasin

UNIVERSITE DE METZ - UFR Sci F.A.

Ecotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale
E.B.S.E.

THESE

présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur ès Sciences, mention
« Toxicologie de l'Environnement »

le 21 Juillet 2000

**APOPTOSE ET TRANSFORMATION
MORPHOLOGIQUE DES CELLULES
EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN (SHE)**

Stéphanie ALEXANDRE

Membres du jury :

Professeur G. DIRHEIMER

Université de Strasbourg - Rapporteur

Docteur H. OHSHIMA

Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon - Rapporteur

Professeur J.F. FERARD

Université de Metz - Examineur

Docteur G. NGUYEN-BA

CNRS, Châtenay Malabry - Examineur

Docteur J.C. HOFACK

Procter & Gamble, Bruxelles - Examineur

Docteur C. LASNE

Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Paris, Examineur

Professeur P. VASSEUR

Université de Metz - Directeur de Thèse

UNIVERSITE DE METZ - UFR Sci F.A.

**Ecotoxicité, Biodiversité, Santé Environnementale
E.B.S.E.**

THESE

présentée en vue de l'obtention du grade de
Docteur ès Sciences, mention
« Toxicologie de l'Environnement »

le 21 Juillet 2000

**APOPTOSE ET TRANSFORMATION
MORPHOLOGIQUE DES CELLULES
EMBRYONNAIRES DE HAMSTER SYRIEN (SHE)**

Stéphanie ALEXANDRE

Membres du jury :

Professeur G. DIRHEIMER

Université de Strasbourg - Rapporteur

Docteur H. OHSHIMA

Centre International de Recherche sur le Cancer, Lyon - Rapporteur

Professeur J.F. FERARD

Université de Metz - Examineur

Docteur G. NGUYEN-BA

CNRS, Châtenay Malabry - Examineur

Docteur J.C. HOFACK

Procter & Gamble, Bruxelles - Examineur

Docteur C. LASNE

Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, Paris, Examineur

Professeur P. VASSEUR

Université de Metz - Directeur de Thèse

Avant-propos

Je tiens à remercier en premier lieu le Professeur Paule VASSEUR, qui a dirigé ce travail de recherche. C'est votre enseignement, dès la Licence, qui a révélé en moi cette vocation pour la toxicologie. Votre encadrement exceptionnel, vos larges connaissances, votre assistance de tous les instants ont grandement contribué au bon déroulement de cette thèse.

Je remercie tout particulièrement le Professeur DIRHEIMER et le Docteur OHSHIMA d'avoir accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Je remercie le Docteur NGUYEN-BA pour ses conseils dans la réalisation de cette recherche. Merci également d'être membre de mon jury de thèse.

Je suis très reconnaissante au Docteur LASNE et au Professeur FERARD d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse et de participer à sa critique.

Merci au Docteur HOFLACK, qui m'a initiée à la poly(ADP-ribosyl)ation et qui me fait l'honneur aujourd'hui de juger ce travail.

Je remercie le Comité de la Moselle de la Ligue contre le Cancer, le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, ainsi que le Ministère de l'Education Nationale, de la Recherche et de la Technologie, d'avoir financé cette recherche.

Je remercie le Docteur FROMENT de l'Hôpital Bon Secours (Metz) de m'avoir permis d'accéder au cytomètre de flux du service d'anatomopathologie, ainsi que M. SOULADGES pour son aide technique.

Tous mes remerciements au Professeur BURNEL (Faculté de Médecine, Nancy) pour avoir réalisé les analyses de zinc dans les milieux de culture.

Merci Claudine d'avoir toujours été là quand j'en avais besoin. Ta grande expérience m'a beaucoup apporté tout au long de cette thèse. Je n'oublierai jamais les moments que nous avons passés côte à côte.

Merci à Carole et Dominique de m'avoir toujours soutenue. Merci Anne-Marie pour ton amitié, tes petites recettes et tes "références bibliographiques".

Merci à toute l'équipe des "Ex-Récollets", petits et grands, pour avoir su créer au sein du laboratoire une ambiance incomparable de travail collectif, d'échanges, d'amitié,... et de rires.

Merci à Myriam, Nicolas, Julie, Amélie, Marie, Corinne, Patrick,... et surtout Xavier qui a supporté ma mauvaise humeur (et c'est peu de le dire!) durant toute la rédaction de cette thèse.

LISTE DES ABBREVIATIONS

5FU	5-Fluorouracile
A	Absorbance
Aa	Acide aminé
Ac-DEVD-AFC	Acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluoromethyl-coumarine
ADNc	ADN complémentaire
AFC	7-amido-4-trifluoromethyl-coumarine
AIF	Apoptosis-inducing factor
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor
BaP	Benzo(a)pyrene
BIN-1	Box-dependent myc-interacting protein-1
BrdU	Bromodésoxyuridine
CD95	Récepteur membranaire du facteur Fas
CD95L	Ligand du récepteur CD95
cIAP	Cellular inhibitor of apoptosis
CPT	Camptothécine
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phtalate
DEPC	Diéthyl pyrocarbamate
DIG	Digoxygénine
DMEM	Milieu de Dulbecco modifié par Eagle
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétracétique
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ETP	Etoposide
FADD	Fas-associated death domain
FOM	Fomesafén
GATC	Guanidine isothiocyanate
HL60	Lignée lymphocytaire humaine
HPP	Inducteur des proliférateurs de peroxyosomes hépatiques
IGF	Insulin growth factor
JNK	Jun N-terminal kinase

MMS	Méthyl méthane sulfonate
ODC	Ornithine decarboxylase
PARP	Poly(ADP-ribose)polymérase
PBS	Tampon phosphate
PBSMT	Tampon phosphate supplémenté en lait et en Tween20
PCNA	Proliferating-cell nuclear antigen
PMSF	Phénylméthylsulfonyl fluoride
RIP	Receptor-interacting protein
RNase	Ribonucléase
RPMI	Milieu du Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse transcription et polymerase chain reaction
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SHE	Cellules embryonnaires de hamster Syrien
SHE Tr	Lignée de cellules SHE transformées par la Némalite
SVF	Sérum de veau foetal
TF	Transcription factor
TMB	3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine
TNAF2	TNFR-associated factor-2
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	TNF receptor
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol 13-acétate
TRADD	TNFR-associated death domain
TRRAP	Transactivation/transformation-domain associated protein
VB	Vinblastine
XRCC1	X-ray repair cross-complementing 1

I. INTRODUCTION	5
II. ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	
A. APOPTOSE	7
1. Introduction	7
2. Relation entre apoptose et cancérogenèse	8
3. Caractéristiques de l'apoptose	10
Critères morphologiques	10
Critères biochimiques	11
4. Mécanismes moléculaires du processus apoptotique	13
Phase d'initiation de la mort cellulaire	13
Phase de décision	15
Phase d'exécution de l'apoptose	17
5. La protéine P53	18
6. Myc	19
7. La poly(ADP-ribose)polymérase et son clivage lors de l'apoptose	22
8. Zinc et apoptose	24
B. Transformation cellulaire	27
1. Les produits cancérogènes	27
2. Les essais de transformation morphologique	29
Critères de transformation	30
Modèles cellulaires utilisés en transformation	30
III. MATERIEL ET METHODES	
A. Produits chimiques utilisés	33
B. Cellules et conditions de culture	34
1. Cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE)	34
Primocultures	34
Cellules SHE de type Tr	35
Conditions de culture	35

2. Cellules HL60	36
C. Détection de l'apoptose	37
1. Etude morphologique	37
2. Etude de la fragmentation de l'ADN	37
Electrophorèse en gel d'agarose	37
Méthode ELISA	38
3. Analyses en Western blot de la PARP et de ses produits éventuels de dégradation	40
Préparation des échantillons, électrophorèse et transfert	40
Détection de la PARP par un anticorps anti-PARP	42
Détection de la PARP par un anticorps anti-polymère	43
4. Activité de la caspase-3	44
D. Détection de la protéine P53	44
1. Analyse en Western blot	45
2. Immunochimie directe	45
E. Détection de la protéine Akt	46
F. Analyse en RT-PCR de l'expression des gènes <i>myc</i> , <i>bax</i> et <i>p21</i>	46
1. Principe	46
2. Mode opératoire	46
Préparation des ARN	46
Transcription reverse	47
Réaction PCR	48
G. Cytométrie de flux	49
H. Analyse du zinc	50
I. Essai de transformation morphologique	50
1. Principe	50
2. Protocole	50
3. Expression des résultats	51

IV. RESULTATS

A. Détection de l'apoptose induite par des inhibiteurs de topoisomérases et la privation de sérum dans les cellules embryonnaires de hamster Syrien	53
Introduction	54
Sensibilité des cellules SHE et HL60 à la privation de sérum et aux inhibiteurs de topoisomérases	54
Détection du clivage de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP)	55
DNA Ladder	56
Activation de la caspase-3	56
Stabilisation de la protéine P53	57
Expression du gène <i>myc</i>	57
Effet du zinc sur l'apoptose	57
Application d'autres agents apoptotiques sur les cellules SHE	58
Expression des gènes <i>bax</i> et <i>p21</i>	58
Etude de la protéine Akt	59
Discussion	59
B. Dégradation de la PARP dans les cellules embryonnaires de hamster Syrien	72
Introduction	73
Résultats	73
Discussion	74
C. Influence du zinc sur l'expression de <i>myc</i> en relation avec l'apoptose	86
Introduction	87
Résultats	87
Discussion	88
D. Influence du zinc sur la transformation morphologique des cellules SHE	95
Introduction	96
Résultats	96
Discussion	98

V. DISCUSSION

Induction, détection et caractéristiques de l'apoptose des cellules SHE et HL60	111
Effet du zinc dans le processus apoptotique	114
Inhibition de l'apoptose et transformation morphologique	115
Importance du zinc, notamment du zinc labile et biodisponible.	117
Transformation cellulaire et expression génique	117

VI. CONCLUSION 119

VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

VIII. ANNEXE

I. INTRODUCTION

L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus physiologique essentiel, qui permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en éliminant les cellules inutiles ou dangereuses pour l'organisme. Un dysfonctionnement de ce mécanisme est impliqué dans divers états pathologiques, comme les maladies neurodégénératives, les maladies auto-immunes et les infections virales. La théorie selon laquelle le cancer serait la conséquence d'une défaillance du processus apoptotique a été avancée, et est actuellement très étudiée.

La cancérogenèse est un phénomène complexe résultant du déséquilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Longtemps, les recherches ont porté sur les mécanismes de dérégulation de la croissance cellulaire. Plus récemment, l'apoptose est apparue comme un facteur essentiel du développement d'un phénotype tumoral. Des relations ont par ailleurs été établies entre les capacités des cellules à échapper à l'apoptose et l'agressivité des cancers ou leur résistance aux agents anti-tumoraux.

Dans cette recherche, nous avons étudié l'hypothèse qu'une inhibition du processus apoptotique participerait au développement d'un phénotype néoplasique. Cette étude a été réalisée sur les cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE). Ce modèle cellulaire est à la base d'un essai de transformation morphologique, pour la détection des substances cancérogènes, génotoxiques et non-génotoxiques. Les cellules SHE sont des cellules normales, diploïdes et utilisées à ce titre pour étudier les mécanismes qui président aux premières étapes du développement d'un processus néoplasique.

La recherche d'une relation entre l'inhibition de l'apoptose et l'induction d'un phénotype transformé nous a conduits à étudier les facteurs et les caractéristiques de l'apoptose dans les cellules SHE. Nos premiers travaux ont en effet montré que certains marqueurs d'apoptose considérés infailibles, n'étaient pas retrouvés dans les cellules SHE apoptotiques. Ce qui nous a amenés à reconsidérer l'apoptose, certes comme un mécanisme intangible dans ses grandes lignes, mais susceptible de présenter des variations dans son expression en fonction du type cellulaire. En effet, l'apoptose dans ses relations avec la cancérogenèse a surtout été étudiée *in vitro* sur des lignées de cellules transformées, dans l'objectif d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie et de rechercher des traitements qui élimineraient par apoptose les cellules tumorales spécifiquement. Les facteurs d'apoptose ont été identifiés à partir de ces travaux, et les marqueurs cellulaires de ce processus ont été décrits principalement dans les cellules transformées. Peu d'études ont été conduites sur des cellules

normales. Il nous a donc fallu déterminer les facteurs d'apoptose dans les cellules SHE et définir ses indicateurs, avant d'entreprendre l'étude des relations entre ce processus et la transformation cellulaire.

Nous avons étudié les cellules SHE, comparativement à la lignée HL60 dont les caractéristiques apoptotiques sont bien connues. Notre but était de vérifier la validité des méthodes de détection de l'apoptose mises en oeuvre, retrouver les résultats publiés dans la littérature scientifique et démontrer les différences pouvant exister entre les cellules normales SHE et les lignées de cellules transformées plus classiquement étudiées expérimentalement.

Les agents inhibiteurs d'apoptose ont été ensuite utilisés pour analyser leur implication dans la transformation cellulaire et leurs effets d'interactions avec des substances cancérigènes, inducteurs ou inhibiteurs de l'apoptose. Le zinc a été retenu comme inhibiteur du processus apoptotique. Il a été appliqué seul, ainsi qu'en co-exposition avec deux autres substances cancérigènes : le benzo(a)pyrene qui est un cancérigène génotoxique, inducteur de l'apoptose, et le fomesafen, un cancérigène non-génotoxique, inhibiteur de l'apoptose dans les cellules SHE.

II. ANALYSE
BIBLIOGRAPHIQUE

A. APOPTOSE

1. Introduction

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée, distinct de la nécrose, physiologiquement actif, au cours duquel la cellule prend part activement à sa propre destruction. Ce "suicide cellulaire" n'intervient pas uniquement à la suite d'une agression de la cellule, mais participe également aux processus de développement, d'homéostasie et de différenciation. L'apoptose est caractérisée par un ensemble de modifications morphologiques stéréotypées et propres à ce type de mort cellulaire (Wyllie *et al.*, 1980).

Observé pour la première fois à la fin du XIX^{ème} siècle, ce phénomène particulier a tout d'abord été négligé ; mais, dès les années 50, les biologistes se sont intéressés à nouveau à l'apoptose afin d'expliquer les processus d'embryogenèse et de morphogenèse.

En effet, il a été rapidement mis en évidence que, chez les métazoaires, l'apoptose jouait un rôle fondamental au cours du développement embryonnaire et fœtal. Elle modèle l'embryon, permet l'élimination des tissus ancestraux qui n'ont plus de fonction dans l'espèce (l'appendice caudal de l'embryon humain, les branchies et la queue du têtard) ; elle élimine les tissus qui joignent les doigts pour permettre la formation des pattes chez les mammifères et les oiseaux, participe à l'ouverture des différents orifices et à la formation des organes. La complexité de ce mécanisme particulier de mort cellulaire se manifeste spécialement dans le système immunitaire et le cerveau, dans lesquels l'apoptose n'a pas un rôle structural, mais permet l'émergence d'une fonction.

La mort cellulaire n'intervient pas uniquement au cours de l'embryogenèse, elle permet également de maintenir l'homéostasie des tissus durant toute la vie de l'organisme. L'apoptose est un mécanisme efficace d'élimination des cellules indésirables, que ce soient les cellules produites en excès (neurones), les cellules reconnues comme étrangères ou qui ont acquis des propriétés dangereuses pour l'organisme (cellules tumorales, lymphocytes auto-réactifs,...) et toutes autres cellules mutées, sénescents, infectées ou endommagées (Raff, 1992).

L'altération du processus apoptotique est impliquée dans diverses maladies humaines. Une activation excessive de l'apoptose participe à des pathologies aiguës (intoxications, chocs septiques, ischémies) ou chroniques, telles les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer) et le sida. Au contraire, une inhibition de la mort cellulaire peut entraîner des malformations, des maladies auto-immunes et participe sans doute à l'établissement d'un caractère néoplasique dans les cellules tumorales (Thompson, 1995).

2. Relation entre apoptose et cancérogenèse

La progression néoplasique est considérée comme le résultat d'un déséquilibre entre le taux de prolifération cellulaire et le taux de mort cellulaire (Evan et Littlewood, 1998). La question qui se pose à ce niveau, et qui suscite cette recherche, est de savoir si l'inactivation de l'apoptose est un processus général induisant la cancérogenèse.

Plusieurs argumentations ont été avancées pour mettre en évidence le rôle de l'apoptose dans l'établissement du phénotype transformé. On constate que la tumorigénicité est souvent associée à l'activation de plusieurs mécanismes anti-apoptotiques. Ainsi, beaucoup de cancers humains possèdent des mutations au niveau de gènes impliqués dans l'apoptose. Une surexpression de *bcl-2*, un agent anti-apoptotique, est reportée dans de nombreux types tumoraux en relation avec une apoptose réduite, tels les lymphomes folliculaires, les carcinomes de l'endomètre, du sein, du colon et du rein (Staunton et Gaffney, 1998). Les kinases *Alb* inhibent l'apoptose et une intense expression du gène *Alb* est associée à une apoptose minimale dans les chondrosarcomes et liposarcomes (Staunton et Gaffney, 1998). Une dérégulation de l'expression du gène *myc*, un gène souvent impliqué dans l'apoptose, est associée à divers phénomènes néoplasiques comme le lymphome de Burkitt, les leucémies myéloïdes et plasmatiques, les carcinomes du sein, du col de l'utérus, du colon, certains carcinomes pulmonaires, les ostéosarcomes et glioblastomes (Nesbit *et al.*, 1999). Des mutations sur le gène *p53* se retrouvent dans plus de 50% des cancers humains et l'inactivation de la protéine, qui participe à la réparation et à la mise en place du processus apoptotique, semble jouer un rôle important dans la tumorigénèse. Par exemple, les patients atteints du syndrome de Li-Fraumeni, qui ne possèdent qu'une seule copie correcte du gène *p53*, développent de nombreuses tumeurs primaires, dans une large variété de tissus, à un âge relativement précoce (Pich, 1998 ; Wang, 1999).

De nombreux modèles de cellules humaines ou animales, ainsi que l'étude des animaux transgéniques, ont permis de suggérer un rôle de l'apoptose dans l'initiation et le développement du cancer. Par exemple, dans les lignées lymphoïdes humaines qui surexpriment *bcl-2* et *bcl_{XL}*, la fréquence de mutations induites par le peroxyde d'hydrogène est augmentée en parallèle à une extension de la survie des cellules (Cherbonnel-Lassere et Dosanjh, 1997). Les souris transgéniques *p53^{+/-}* ou *p53^{-/-}* développent spontanément des tumeurs avec une fréquence plus élevée que les souris sauvages (Attardi et Jacks, 1999).

Certains produits ou association de produits réputés cancérigènes ont la capacité d'induire des molécules inhibitrices de l'apoptose. Bcl-2, par exemple, est induite par le diethylhexylphthalate (DEHP) et le BaP, lorsque ces deux substances sont associées au TPA dans les cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE) (Dhalluin *et al.*, 1997).

L'apoptose est un phénomène que l'on retrouve tant dans les cellules normales que dans les cellules cancéreuses. La mort cellulaire programmée exerce, en effet, un rôle majeur dans la limitation de l'expansion de la population des cellules tumorales. On retrouve des phénomènes d'apoptose dans tous les types de cancers, au stade de progression tumorale, c'est à dire bien après les événements initiaux de transformation. Ainsi, les voies de prolifération et de mort cellulaire semblent couplées, et le fait d'entrer en apoptose serait une conséquence normale de la machinerie de prolifération cellulaire (Wyllie, 1992 ; Kerr *et al.*, 1994).

Quand pourrait intervenir une limitation de l'apoptose favorisant le processus de cancérogenèse ? L'hypothèse la plus probable de l'implication de l'apoptose dans le phénomène de cancérogenèse serait la possibilité qu'un processus de mort cellulaire défectueux entraîne la persistance de cellules mutées ou endommagées qui autrement auraient été éliminées (Wyllie, 1997).

3. Caractéristiques de l'apoptose

Critères morphologiques

Les modifications morphologiques observées lors de la nécrose sont très différentes de celles observées lors de l'apoptose, comme les décrivent Wyllie et ses collaborateurs (1980).

La nécrose, résultat de la mort instantanée des cellules soumises à des altérations trop importantes, se caractérise par un gonflement de la cellule et des organites intracellulaires suivi d'une lyse membranaire et d'une inflammation des tissus sains adjacents suite à la libération du contenu intracellulaire.

Le phénomène d'apoptose n'a été découvert que très tard ; en effet, il est souvent ponctuel, de courte durée et ne produit aucune inflammation des tissus susceptible de le mettre en évidence. La séquence des modifications morphologiques de la mort cellulaire programmée débute par des changements au niveau nucléaire. La chromatine se condense et la membrane nucléaire perd sa forme régulière ; ensuite, le noyau commence à se fragmenter. Parallèlement, le cytoplasme se rétracte et la membrane plasmique, sans perdre son imperméabilité, bouillonne et forme des protubérances. Le contenu de la cellule est divisé et vacuolisé dans de petites capsules membranaires appelées "corps apoptotiques". Dans les tissus, ces vacuoles seront phagocytées par les cellules adjacentes. L'absence d'inflammation, ainsi que le maintien de l'intégrité des organites intracellulaires, permettent l'élimination des cellules apoptotiques sans endommager le tissu (Wyllie *et al.*, 1980).

L'observation des modifications morphologiques est la méthode la plus ancienne pour détecter un phénomène apoptotique dans les cellules en culture. En microscopie simple, sans même de marquage, on peut aisément distinguer le bouillonnement de la membrane plasmique et les corps apoptotiques. En microscopie à fluorescence, l'ADN cellulaire est préalablement marqué par des colorants fluorescents comme l'acridine orange, le réactif d'Hoechst ou le DAPI, ce qui permet de révéler la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire. Un marquage simultané au bromure d'éthidium ou à l'iodure de propidium permet de distinguer les cellules en nécrose ou en fin d'apoptose qui intègrent ces colorants, des cellules en apoptose imperméables. Les cellules en fin d'apoptose subissent une nécrose secondaire qui les rend plus perméables ; ces cellules se différencient cependant des cellules nécrotiques par la présence de chromatine condensée, prête à être vacuolisée.

Critères biochimiques

Une fois initiée, l'apoptose conduit au clivage spécifique de diverses molécules cellulaires. La mort cellulaire programmée n'est pas accompagnée d'une digestion sauvage et inconsidérée des protéines. Ce sont des éléments bien précis qui sont clivés d'une manière coordonnée, habituellement sur un site unique, ce qui provoque la perte ou le changement de fonction de l'élément (Thornberry et Lazebnik, 1998). Cette phase de dégradation est caractérisée par l'activation d'enzymes cataboliques et en particulier une classe de protéases associées à l'apoptose, les caspases. Celles-ci s'activent en cascade, entraînent la destruction de certains composants cellulaires et activent les endonucléases responsables du découpage de la chromatine. Cette dégradation est à l'origine du désassemblage de la cellule ; mais, elle facilite également le processus apoptotique en éliminant l'activité de diverses protéines impliquées dans la sauvegarde de la cellule (Cohen, 1997 ; Nicholson et Thornberry, 1997 ; Mignon *et al.*, 1998).

Certaines méthodes de détection de l'apoptose mesurent l'activité des caspases. Ces protéases, une fois activées, peuvent être mises en évidence par des immunoessais en microtitration, simples et quantitatifs, basés sur la capacité des caspases à cliver un substrat sur un site spécifique. Généralement, le clivage du substrat entraîne une modification de sa structure qui permet sa détection.

Un autre aspect de la phase de dégradation est la perturbation de certains composants de la membrane plasmique, avec une perte de l'asymétrie lipidique. Cette modification de la structure membranaire est utilisée comme système de reconnaissance par les phagocytes, dont la mission est d'éliminer les cellules apoptotiques avant qu'elles ne subissent une nécrose secondaire avec ses conséquences inflammatoires.

Ces perturbations membranaires constituent la base de certains essais permettant la distinction des cellules en apoptose par rapport au reste de la population cellulaire. La phosphatidylsérine, par exemple, est un composant de la membrane plasmique, transloqué lors du processus de mort programmée, de l'intérieur vers l'extérieur de la membrane ; sa délocalisation est fréquemment utilisée dans la détection de l'apoptose. L'annexine-5 possède une affinité élevée pour les résidus de phosphatidylsérine et, couplée à une molécule

colorante, permet de visualiser l'externalisation de ce composé. Lorsque l'intégrité membranaire est perturbée, comme dans les cellules nécrotiques, l'annexine-5 peut également accéder à la phosphatidylsérine interne ; un marquage simultané, destiné à distinguer les cellules en nécrose, est alors indispensable.

Le marqueur le plus utilisé pour la détection de l'apoptose est la fragmentation de l'ADN, qui a la particularité de s'effectuer de manière internucléosomale. De plus, grâce au maintien de l'intégrité membranaire, les fragments d'ADN ne sont retrouvés que dans le milieu intracellulaire. Ce type de dégradation s'effectue par l'activation d'endonucléases qui clivent l'ADN sur les sites de jonction entre les histones. La quantité d'ADN enroulé autour des histones étant d'une longueur de 180 à 200 pb, des fragments multiples de cette valeur seront retrouvés dans le milieu intracellulaire. En faisant migrer ces fragments en gel d'agarose, on peut observer leur disposition en barreaux d'échelle communément appelée "DNA Ladder", qui est spécifique de l'apoptose (Wyllie, 1980).

Des fragments plus larges (50-300 kpb) ont également été découverts, mais ils ne sont pas observés dans toutes les conditions d'apoptose (Bortner *et al.*, 1995).

Plusieurs méthodes sont couramment appliquées pour mettre en évidence les fragments d'ADN dans le processus apoptotique.

- *La disposition de l'ADN en barreaux d'échelle après migration en gel d'agarose est considérée comme un marqueur qualitatif fiable de l'apoptose.*
- *La cytométrie de flux permet de détecter les cellules en apoptose, après marquage de l'ADN. En fonction de la quantité d'ADN présent, il est ainsi possible de déterminer dans quelle phase du cycle cellulaire (G_1 , S ou G_2/M) se trouve chaque cellule. Lors du processus apoptotique, une nouvelle population correspondant aux cellules en apoptose, apparaît sous forme d'un pic en pré- G_1 , ce type de cellules présentant un contenu en ADN moins important que les cellules normales.*
- *Les cassures d'ADN en bout de brin sont plus fréquentes dans les cellules en apoptose que dans les cellules en nécrose. La méthode TUNEL (TdT-mediated X-dUTP Nick End Labelling) est utilisée pour la détection de ce type de fragmentation en bout de brin, du côté 3'-OH, par l'insertion de nucléotides marqués (Biotine, DIG, fluorescéine), grâce à l'enzyme TdT (désoxynucléotidyl transférase terminale). L'analyse des cellules marquées se fait en microscopie ou par cytométrie de flux.*

Tableau I. Principaux substrats des caspases lors du processus apoptotique, selon Nicholson et Thornberry (1997)

Protéine clivée	Résultat	Site d'action	Conséquence du clivage
PARP	Répression	Réparation de l'ADN	Empêche la réparation
DNA-PKcs	Répression	Réparation de l'ADN	Empêche la réparation
U1-70K snRNP	Répression	Epissage de l'ARNm	Réduction de la transcription
hnRNP-C	Répression	Epissage de l'ARNm	Réduction de la transcription
SREBP	Activation	Biosynthèse des stérols	Elévation des stérols
D4-GDI	Répression	Maintien de la Rho-GTPase	Désassemblage du cytosquelette
Huntingtine	Répression	?	Perturbation métabolique
DFF45	Activation	Fragmentation de l'ADN	Désassemblage du génome
Cad	Répression	Inhibiteur de DFF45	Désassemblage du génome
DNA-RC C140	Répression	Réplication de l'ADN	Arrêt de la réplication
PKC δ	Activation	Progression du cycle cellulaire	Arrêt en G ₂ /M
Rb	Répression	Progression du cycle cellulaire	Arrêt en G ₁
Mdm2	Répression	Régulation de p53	Accumulation de p53
Fak	Répression	Régulation de l'adhésion cellulaire	Détachement
NuMA	Répression	Maintien de l'intégrité de la structure nucléaire	Désassemblage nucléaire
Pro-caspases	Activation	Exécution de l'apoptose	Activation des protéases de l'apoptose
Fodrine	Répression	Cytosquelette cortical	Désassemblage cellulaire
Actine	Répression	Micofilaments du cytosquelette	Désassemblage cellulaire
Gas2	Répression	Micofilaments du cytosquelette	Désassemblage cellulaire
Lamines	Répression	Constituants de l'enveloppe nucléaire	Désassemblage cellulaire
Gelsoline	Activation	Désassemblage des filaments d'actine	Désassemblage cellulaire

- *La détection spécifique dans le milieu intracellulaire des fragments de l'ADN, par des méthodes ELISA, permet de différencier un phénomène apoptotique d'un phénomène nécrotique, caractérisé par le relargage du contenu cellulaire et donc par l'apparition de fragments d'ADN dans le milieu extracellulaire.*

Divers autres composants cellulaires sont clivés spécifiquement par les caspases. Ce clivage protéolytique aura pour conséquence la dégradation de la structure cellulaire (lamines, fodrine, actine), l'activation de protéines impliquées dans le déroulement du processus apoptotique (procaspases, endonucléases,...), mais aussi l'inactivation de protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire (PARP, DNA-PKcs,...) (Patel *et al.*, 1996 ; Thornberry et Lazebnik, 1998). Il semble que la mise hors service des fonctions d'homéostasie et de réparation facilite le désassemblage cellulaire. On connaît de nombreux substrats des caspases (Tableau I), mais la conséquence de leur dégradation n'est pas toujours connue.

Les techniques de Western blot sont utilisées pour visualiser le clivage des procaspases en caspases et la dégradation des différents substrats de l'apoptose comme la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP). Le clivage de la PARP en deux fragments stables, dont nous parlerons plus en détail par la suite, est un phénomène très fréquemment utilisé comme marqueur spécifique de l'apoptose.

4. Mécanismes moléculaires du processus apoptotique

Phase d'initiation de la mort cellulaire

L'apoptose est un mécanisme qui peut être induit par différents types de stimuli comme un traitement chimique, un retrait des facteurs trophiques ou une exposition à un environnement défavorable comme des radiations ionisantes ou une ischémie. Selon Wertz et Hanley (1996), on distingue, à un niveau moléculaire, cinq classes d'inducteurs d'apoptose qui se différencient par le site primaire d'action au niveau cellulaire.

a. Les agents réagissant avec la surface cellulaire

- Certaines molécules se fixent à des récepteurs spécifiques appelés "death receptors" situés sur la membrane plasmique et qui ont pour rôle de transmettre

le signal d'apoptose. Les récepteurs les mieux caractérisés sont CD95 (aussi appelés Fas ou Apo1) et TNFR1 (p55 ou CD120a). L'apoptose sous la dépendance de ces récepteurs peut s'observer dans le cas de l'élimination, à la fin de la réponse immunitaire, des cellules T matures activées, et de l'élimination de cellules cancéreuses, inflammatoires ou infectées.

- L'absence de fixation de certains ligands, comme les facteurs de croissance ou de survie, sur leur récepteur spécifique, peut également entraîner l'apoptose.
 - Les produits qui perturbent le flux des ions au travers de la membrane plasmique (Ca^{2+} ionophores, composés inhibant les antiports Na^+/H^+ , ...) sont des inducteurs d'apoptose.
- b. Les agents modifiant le milieu cytoplasmique et perturbant les organites intracellulaires comme :
- les oxydants qui entraînent de nombreuses altérations protéiques et dommages aux membranes,
 - les chélateurs de métaux qui agissent principalement en empêchant le zinc de jouer son rôle anti-apoptotique,
 - les inhibiteurs de la synthèse protéique,
 - les produits modifiant les gradients ioniques des membranes intracellulaires,
 - les produits altérant le contenu en ATP.
- c. Les perturbateurs du cytosquelette qui altèrent les microtubules (taxol) ou les microfilaments (cytochalasine).
- d. Les composés agissant au niveau nucléaire :
- les perturbateurs de l'ADN (5FU, inhibiteurs de topoisomérases,...),
 - les agents modifiant l'expression des gènes (glucocorticoïdes,...).
- e. Les composés perturbant les signaux intracellulaires
- en modifiant la phosphorylation des protéines,
 - en intervenant au niveau de la transduction des signaux.

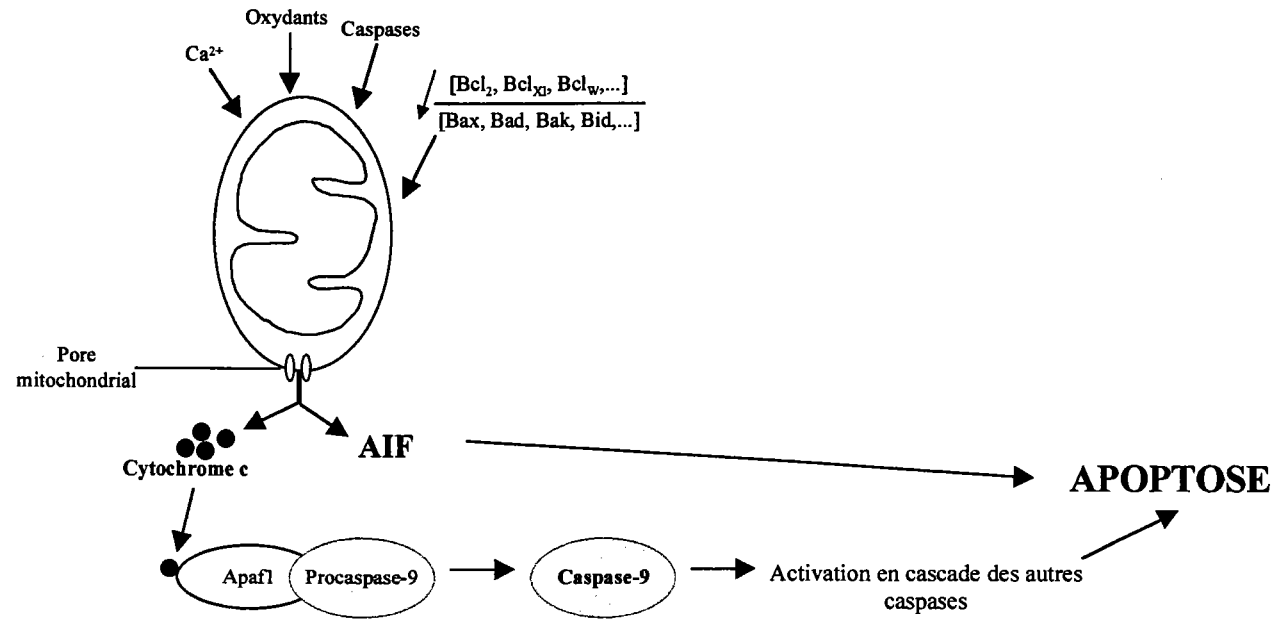


Figure 1. Modulation de l'apoptose par la régulation des flux ioniques entre la mitochondrie et le cytoplasme

Phase de décision

Apoptose induite par des agents cytotoxiques

Cette phase, au cours de laquelle la cellule décide d'entrer en apoptose, fait intervenir des protéines "arbitres" qui sont principalement des protéines de la famille Bcl-2, généralement associées à la membrane externe des mitochondries. Cette famille contient deux types de protéines : celles qui inhibent le processus apoptotique (Bcl-2, Bcl_{xL}, Bcl_w,...) et celles qui l'induisent (Bax, Bak, Bad, Bid,...). C'est la proportion, au niveau des pores mitochondriaux, des protéines inductrices d'apoptose par rapport aux protéines inhibitrices qui décidera de l'exécution de la mort cellulaire (Adams et Cory, 1998). La régulation des protéines de la famille Bcl-2 peut se faire au niveau transcriptionnel, par une induction ou une répression génique, mais également par des modifications post-transcriptionnelles des protéines ; des phénomènes de phosphorylation, par exemple, peuvent entraîner un changement dans leur capacité d'interagir les unes avec les autres (Allen *et al.*, 1998).

Ces protéines couplées aux pores mitochondriaux, comme le canal VDAC (voltage-dependent anion channel), contrôlent les flux ioniques entre la mitochondrie et le cytoplasme (Martinou, 1999). Pour permettre le relargage du contenu mitochondrial et induire l'apoptose, les protéines favorisant l'ouverture des canaux doivent s'accumuler dans la membrane mitochondriale, ou alors la composition des canaux en inhibiteurs de cette ouverture doit diminuer. Le choix de l'apoptose se caractérise par une transition de perméabilité mitochondriale ($\Delta\psi_m$) qui est la modification du gradient électrochimique de la membrane mitochondriale interne due à l'ouverture des canaux mitochondriaux (Zamzami *et al.*, 1996 ; Green et Reed, 1998). Les possibilités d'homo-, d'hétéro- ou d'oligomérisation entre les membres de la famille Bcl-2 compliquent la délicate balance qui contrôle le signal pro- ou anti-apoptotique (Shimizu *et al.*, 1999).

D'autres stimuli sont capables d'affecter les pores mitochondriaux et de provoquer leur ouverture comme les espèces réactives de l'oxygène, une élévation du Ca²⁺ cytosolique ou l'action des caspases activées (Zamzami *et al.*, 1995 ; Kass et Orrenius, 1999).

Le relargage du contenu mitochondrial produit l'activation des caspases effectrices de l'apoptose grâce à la libération du cytochrome c ainsi que du facteur AIF (apoptosis inducing factor). Le cytochrome c constitue un complexe avec l'élément Apaf-1 et la procaspase-9

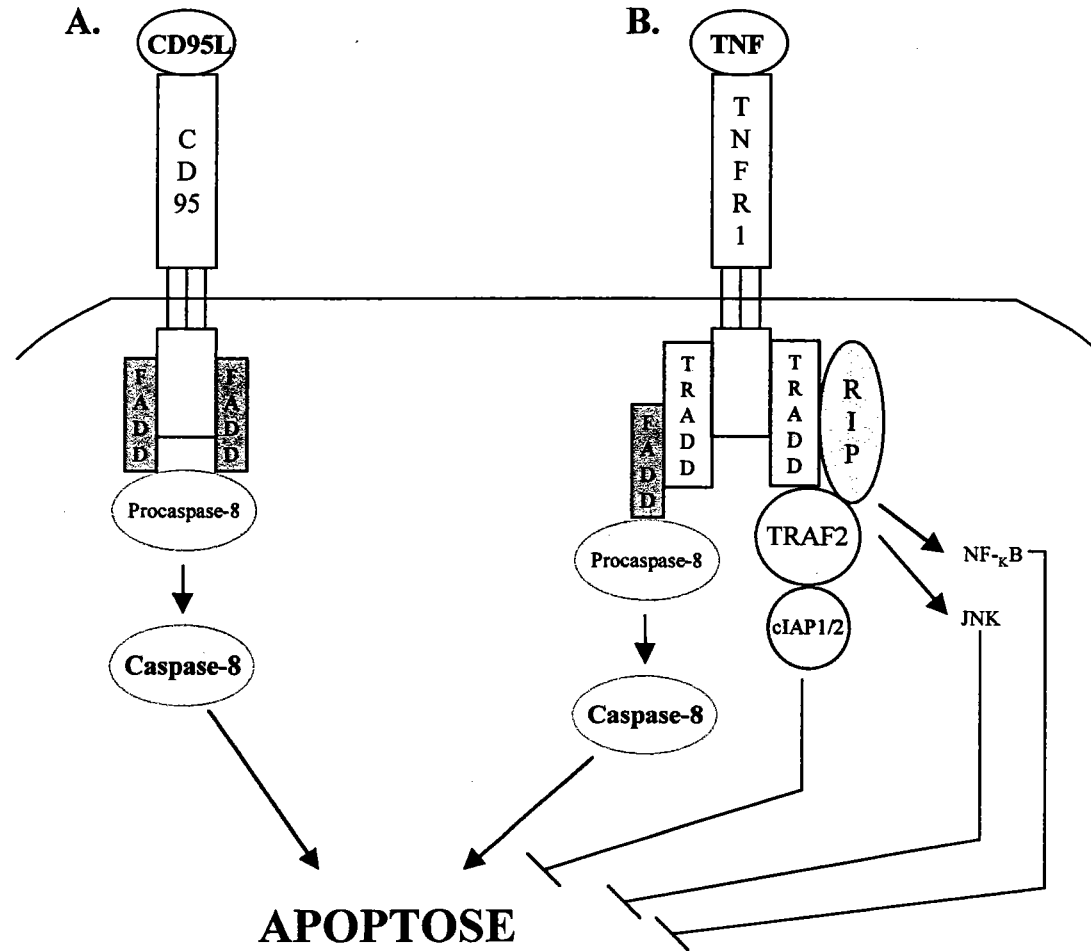


Figure 2. Activation de l'apoptose par la voie des récepteurs CD95 et TNFR1 selon Ashkenazi et Dixit (1998).

destiné à activer la procaspase-9 en caspase-9. La caspase-9 activera à son tour les autres caspases nécessaires à l'exécution de la mort cellulaire (Susin *et al.*, 1996 ; Fearnhead *et al.*, 1998 ; Slee *et al.*, 1999).

Ces mécanismes sont repris dans la figure 1.

Apoptose induite par les récepteurs CD95 et TNFR1

Le récepteur **CD95** est impliqué dans trois types d'apoptose : l'élimination des lymphocytes T matures, l'élimination des cellules cancéreuses ou infectées par un virus et l'élimination de certains types de cellules inflammatoires. Dans le cas de la mort cellulaire conduite par ce récepteur, une protéine intracellulaire appelée FADD (Fas-associated death domain) vient s'associer au récepteur activé. FADD acquiert ainsi la capacité de se fixer à la procaspase-8 qui s'oligomérisent et s'active en s'auto-clivant. La caspase-8 peut alors activer la caspase-9 et les autres caspases essentielles au processus apoptotique (Allen *et al.*, 1998 ; Ashkenazi et Dixit, 1998) (Fig. 2A).

Le récepteur **TNFR1** ne peut induire l'apoptose que dans de rares cas, sauf si la synthèse protéique est bloquée. Son activité est, en effet, essentiellement anti-apoptotique. La fixation du facteur TNF, produit par les macrophages activés et les cellules T en réponse à une infection, sur le récepteur TNFR1 entraîne l'interaction du récepteur avec le facteur TRADD (TNFR-associated death domain). Cette protéine recrute différentes molécules notamment TRAF2 (TNFR-associated factor-2) et RIP (Receptor-interacting protein) nécessaires à l'activation de NF- κ B et de JNK/AP-1, deux facteurs anti-apoptotiques qui induisent l'inflammation. TRAF2 peut également fixer et activer cIAP1 et cIAP2 (cellular inhibitor of apoptosis-1 et -2), ce qui renforce l'activité inhibitrice d'apoptose de TNFR1.

Par contre, l'apoptose induite par ce récepteur ne se fait que par l'association de TRADD avec la protéine FADD et l'activation subséquente de la caspase-8, comme dans le cas du récepteur CD95 (Allen *et al.*, 1998 ; Ashkenazi et Dixit, 1998) (Fig. 2B).

Bien que cette voie d'induction de l'apoptose ne fasse pas intervenir la mitochondrie, un relargage du cytochrome c est néanmoins observé, mais il fait suite à l'activation des caspases et contribue à l'amplification du phénomène apoptotique (Green et Reed, 1998)

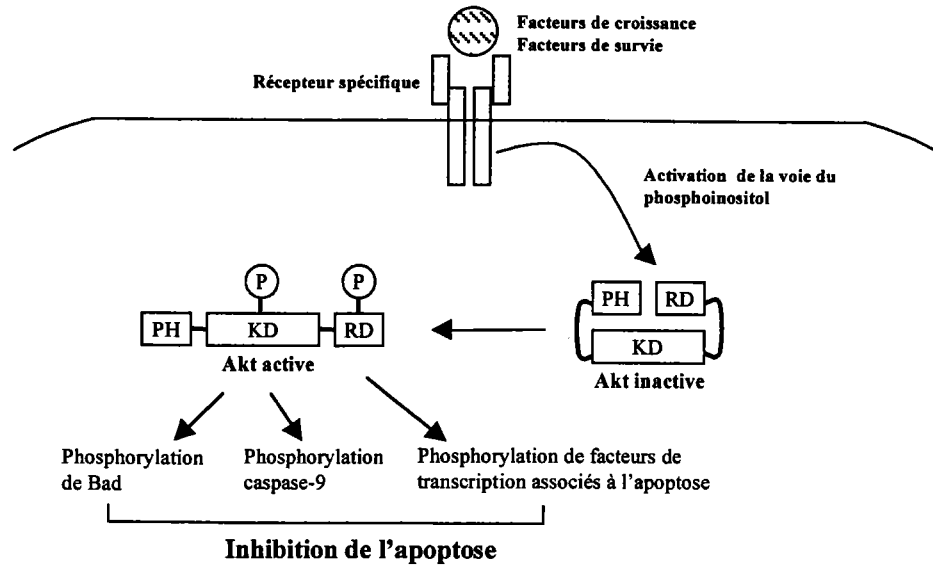


Figure 3. Voie d'inactivation de l'apoptose par la protéine kinase Akt, selon Hemmings (1997).

PH, domaine de fixation de la protéine aux phospholipides membranaires;

KD, domaine kinase;

RD, domaine de régulation.

Voie Akt

Dans certains types cellulaires, l'induction de l'apoptose par l'absence d'un ou de plusieurs facteurs de croissance est en partie attribuable à l'inactivation de la sérine-thréonine kinase Akt (également nommée PKB) (Fig. 3). C'est ainsi pour les neurones, dans le système nerveux central, dont la survie dépend du facteur IGF (Dudek *et al.*, 1997). Akt est phosphorylée par la voie des phosphoinositides, qui se déclenche par la fixation des facteurs de croissance ou de survie sur leur récepteur spécifique (Burgering et Coffey, 1995). La phosphorylation de Akt conduit à son activation (Hemmings, 1997). Deux substrats de Akt, en relation avec le processus apoptotique, ont récemment été identifiés : la protéine Bad, de la famille Bcl-2 (DelPeso *et al.*, 1997), et la caspase-9 (Brunet *et al.*, 1999), la phosphorylation de ces deux éléments inhibant leurs effets pro-apoptotiques. L'inactivation de Akt, en absence des facteurs de croissance, favorise l'induction de l'apoptose en rendant aux protéines Bad et caspase-9 leur pleine activité. Akt pourrait également réguler certains facteurs de transcription associés au déclenchement du processus apoptotique, tel le facteur FKHRL1 (Brunet *et al.*, 1999).

Phase d'exécution de l'apoptose

Les caspases constituent une famille de protéases associées au processus apoptotique et essentielles à sa parfaite exécution. Les différentes caspases partagent des ressemblances dans leur séquence d'acides aminés, leur structure et leur spécificité de substrat (Nicholson et Thornberry, 1997). Elles sont toutes exprimées sous forme de proenzymes contenant trois domaines : une partie amino-terminale, une large et une petite sous-unité. L'activation des procaspases consiste en l'élimination du domaine amino-terminal et l'association des deux sous-unités restantes qui forment un hétérodimère. Certaines caspases s'associent entre elles pour former des tétramères. La cascade d'activation des caspases est complexe et sans doute différente d'un tissu à un autre, d'une espèce à une autre. D'une manière générale, les premières des caspases à être activées sont les caspase-9 et caspase-8. La caspase-9 est essentiellement activée par sa liaison avec le complexe cytochrome c et Apaf-1 et la caspase-8 grâce au facteur FADD activé dans le système des récepteurs. Ces deux caspases propagent le signal de mort cellulaire et activent à leur tour d'autres caspases (Thornberry et Lazebnik, 1998). Dans les extraits de cellules humaines Jurkat, ce sont notamment les caspases-2, -3, -6,

-7, -8 et -10 qui sont activées par la caspase-9. Dans ce même modèle, la caspase-3 est requise pour l'activation des caspases-2, -6, -8 et -10, et participe ainsi à la boucle d'amplification impliquant la caspase-9 (Slee *et al.*, 1999).

Les caspases sont des protéases parmi les plus spécifiques, qui ne clivent les protéines qu'après l'aspartate. La caspase-3, par exemple, est spécifique d'un site DEVDG et ne clive que les protéines contenant ce site, entre l'aspartate et la glycine (Porter et Jänicke, 1999).

Les caspases participent à un processus de destruction planifié. L'activation de ces protéases spécifiques entraîne l'isolement de la cellule en apoptose des autres cellules, la réorganisation du cytosquelette, l'arrêt des processus de réplication et de réparation de l'ADN, l'interruption de l'épissage, la destruction de l'ADN, le désassemblage de la membrane nucléaire, la préparation de la cellule à la phagocytose par la désorganisation de la membrane plasmique et enfin la désintégration de la cellule en corps apoptotiques. Le rôle des différentes caspases dans chacune des étapes de l'apoptose n'est pas réellement défini et peut varier en fonction des tissus et des espèces (Cohen, 1997).

5. La protéine P53

p53 est un gène suppresseur de tumeur qui se trouve muté dans 50% des cancers humains. Plus de 7500 types de mutations de *p53*, associés à des tumeurs, ont été recensés et les sites mutés sont retrouvés sur plus de la moitié des codons qui constituent le gène *p53* (Pfeifer et Holmquist, 1997 ; Bérout et Soussi, 1998).

Par son activité transcriptionnelle principalement, la protéine P53 est un élément du processus de réponse à une altération de l'ADN et participe au maintien de l'intégrité génomique (Janus *et al.*, 1999). La perte du caractère sauvage de P53 est caractérisée par une augmentation de la fréquence d'amplification génique d'autres séquences d'ADN, des réarrangements chromosomiques et des mutations (Wang et Harris, 1997).

Dans de nombreux types cellulaires, une altération de l'ADN s'accompagne de l'augmentation du taux de la protéine P53 dans la cellule (Salazar *et al.*, 1997 ; Calmels *et al.*, 1997 ; Yang et Duerksen-Hughes, 1998). Cette accumulation de la protéine n'est pas associée à une induction de l'expression du gène, mais est la conséquence d'une modification post-transcriptionnelle qui stabilise la protéine. Il s'ensuit une induction de l'activité transcriptionnelle de P53 lui permettant d'activer différents gènes. Dans des conditions

normales, sans altération de l'ADN, P53 est éliminée régulièrement, ce qui maintient son niveau stable dans la cellule. Cette élimination s'effectue par l'intermédiaire d'une autre protéine, Mdm2, qui en se fixant directement à P53, l'inactive et déclenche le processus de sa dégradation (Lozano et Montes de Oca Luna, 1998). Les modifications qui conduisent à la stabilisation et à l'activation de la protéine ne sont pas bien définies ; cependant, un mécanisme de phosphorylation et acétylation de la protéine est proposé (Sakaguchi *et al.*, 1998). Cette phosphorylation/acétylation de P53, provoquant sans doute des modifications structurales, protège la protéine qui ne peut plus s'associer à Mdm2, le médiateur de son inhibition et de sa dégradation (Thut *et al.*, 1997 ; Haupt *et al.*, 1997 ; Fuchs *et al.*, 1998).

Les principales cibles de P53 se situent au niveau de la régulation du cycle cellulaire, de l'induction de l'apoptose et de la réparation. En réponse à un dommage à l'ADN, les gènes *p21 (waf1)*, *gadd45* vont être activés par la protéine P53, ce qui entraîne généralement un arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ ou G₂ (Muschel et McKenna, 1996 ; El-Deiry, 1998). La protéine P21 agit en inhibant les kinases cycline-dépendantes nécessaires à la progression du cycle cellulaire et en inhibant également la protéine PCNA, conduisant à un blocage de l'étape d'élongation de la réplication de l'ADN (Chen *et al.*, 1995).

P53 induit également la transcription des gènes *bax* et *fas* et inhibe celle du gène *bcl-2* ; et lorsque les altérations cellulaires se révèlent être trop importantes, un mécanisme apoptotique, dépendant de l'augmentation du taux des protéines Bax et Fas et à la diminution de Bcl-2, peut être enclenché (Yonish-Rouach, 1997 ; Brady et Gil-Gomez, 1998).

P53 intervient dans la réparation de l'ADN par ses capacités à se fixer aux composants de la machinerie de réparation notamment aux DNA hélicases, XPD et XPB qui font partie du facteur de transcription TFIIH, et au facteur CSB. Ces deux facteurs sont impliqués dans la réparation. P53 aurait également une activité endonucléasique qui la ferait participer directement à la réparation (Janus *et al.*, 1999).

6. Myc

Le proto-oncogène *myc* est impliqué dans des processus cellulaires importants comme la prolifération, la différenciation, l'apoptose et, en cas de dérégulation, dans les phénomènes néoplasiques. Une expression altérée de ce gène est retrouvée dans une variété de tumeurs humaines comme les carcinomes du col de l'utérus, du sein, du colon et certains carcinomes

Tableau II. Gènes régulés transcriptionnellement par Myc, selon Facchini et Penn (1998)

Gènes régulés par Myc	Fonction cellulaire du gène cible	Effet
α -prothymosine	Inconnue	Activation
cad	Biosynthèse des pyrimidines	Activation
cdc25a	Phosphatase du cycle cellulaire	Activation
ECA39	Inconnue	Activation
eIF-4E	Facteur d'initiation de la traduction	Activation
ISGF3 γ	Facteur de transcription	Activation
LDH-A	Enzyme métabolique	Activation
MrDb	ARN hélicase	Activation
ODC	Biosynthèse de polyamines	Activation
p53	Facteur de transcription	Activation
<i>rcl</i>	Inconnue	Activation
AdMLP	Promoteur viral	Activation/répr
α 3 β 1	Adhésion cellulaire	Répression
λ 5	Promoteur viral	Répression
Albumine	Marqueur de différenciation	Répression
C/EBP α	Facteur de transcription	Répression
c-myc	Facteur de transcription	Répression
Cycline D1	Régulateur du cycle cellulaire	Répression
gadd153/CHOP	Régulateur du cycle cellulaire/réparation	Répression
gadd34	Régulateur du cycle cellulaire/réparation	Répression
gadd45	Régulateur du cycle cellulaire/réparation	Répression
gas 1	Arrêt de la croissance	Répression
Ig μ	Heavy-chain immunoglobuline	Répression
Igk	Light-chain immunoglobuline	Répression
LFA-1	Adhésion cellulaire	Répression
Lysozyme	Glycosidase-marqueur de différenciation	Répression
MHC I	Peptide de reconnaissance d'antigène	Répression
mim-1	Protéine myéloïde	Répression
neu	Oncogène	Répression
p27	Cycle cellulaire	Répression
PDGF β R	Récepteur de facteurs de croissance	Répression
TdT	DNA polymérase	Répression
Thrombospondine-1	Inhibiteur de l'angiogenèse	Répression

Tableau III. Protéines se fixant à Myc et intervenant dans ses fonctions au niveau de la transactivation génique, de la transformation cellulaire et de l'apoptose, selon Sakamuro et Prendergast (1999).

Protéines interagissant avec Myc	Transactivation	Transformation cellulaire	Apoptose
Au niveau de sa partie amino-			
p107	—	—	?
BIN-1	—	—	+
TRRAP	?	+	—
MM-1	—	—	?
AMY-1	+	?	?
Pam	?	?	?
α -Tubuline	?	?	?
Au niveau de sa partie carboxy-			
Max	+	+	+
YY1	—	—	?
AP2	—	?	?
TFII-I	—	?	?
BRCA1	—	—	?
Miz-1	—	?	?

— : effet inhibiteur, + : effet inducteur ou nécessaire, ? : effet non-déterminé.

pulmonaires, dans les ostéosarcomes, glioblastomes et leucémies myéloïdes (Facchini et Penn, 1998).

Dans les cellules non tumorales, l'expression de *myc* est totalement dépendante de la présence des facteurs de croissance (Dean *et al.*, 1986). Le retrait du sérum induit dans les cellules en culture, une chute brutale des taux d'ARNm et des protéines Myc, quelle que soit la position des cellules dans le cycle cellulaire (Waters *et al.*, 1991). Dans les cellules en quiescence, le taux de Myc est indétectable ; par contre, lorsque l'on ajoute des facteurs de croissance, le gène *myc* est à nouveau exprimé de manière très importante dans les premières heures de croissance ; le taux diminue ensuite jusqu'à un niveau d'expression bas, mais notable et qui reste stable tout le long du cycle cellulaire (Thompson *et al.*, 1985).

Myc est une phosphoprotéine nucléaire qui agit en tant que facteur de transcription, activateur ou répresseur (Persson et Leder, 1984). Pour une fixation spécifique à l'ADN, Myc s'hétérodimérise avec un partenaire, Max, qui est indispensable à toutes les fonctions biologiques de la protéine (Amati *et al.*, 1992). Le complexe Myc/Max reconnaît la séquence spécifique de l'ADN CA(C/T)GTG appelée EMS (E box Myc sequence) et active les gènes qui contiennent ce site (Cole et McMahan, 1999). Myc peut également réprimer certains gènes via la séquence Inr (YYCAYYYYY) qui est le site d'activation transcriptionnelle par TFII-I. Myc est capable de se fixer au complexe TFII-I-ADN et d'inhiber ainsi la transcription des gènes activés par TFII-I. Cependant, les gènes inhibés par Myc ne contiennent pas tous la séquence Inr ; d'autres mécanismes d'inhibition sont donc probables (Claassen et Hann, 1999). Le tableau II récapitule les gènes dont l'expression serait sous la dépendance de Myc. Des liens ont été établis entre l'expression de ces gènes et l'expression de *myc*, mais aucune dépendance directe n'a été prouvée. Seul le gène *cad* est directement sous l'influence de Myc (Boyd *et al.*, 1998). Il est donc difficile de mettre en évidence les mécanismes d'action de cette protéine étant donné que ses cibles réelles sont loin d'être établies.

Myc peut également se fixer à d'autres protéines (Tableau III), mais les mécanismes résultant de telles interactions restent pour la plupart à élucider (Sakamuro et Prendergast, 1999).

Les mécanismes de l'action biologique de Myc ne sont pas encore démontrés. Actuellement, nous ne pouvons faire que des suppositions basées sur les différentes interactions de Myc avec les autres protéines et avec ses cibles transcriptionnelles.

⇒ Dans les cellules normales, Myc est une protéine requise pour le passage des cellules de la phase G₁ à la phase S (Heikkila *et al.*, 1987). Le mécanisme par lequel Myc intervient dans le **contrôle de la croissance cellulaire** est inconnu, mais pourrait être relié à la régulation des ARNr (Schmidt, 1999) et des kinases cycline-dépendantes (Obaya *et al.*, 1999).

⇒ *myc* peut induire un phénomène de **transformation néoplasique** lorsqu'il est dérégulé et associé à la mutation d'autres gènes comme le gène *ras* (Land *et al.*, 1983). L'association de Myc avec la protéine BIN-1 inhibe son potentiel transformant, alors que la fixation de TRAPP est requise pour la transformation. La voie d'induction de la transformation serait principalement une voie de répression génique (Claassen et Hann, 1999). En effet, Myc peut réprimer différents gènes associés à l'inhibition de la transformation :

- *LFA-1* et *α3β1* sont deux gènes impliqués dans le contact entre les cellules ; leur répression permet la perte de l'adhésion cellulaire,
- *mim-1* et *C/EBPα* sont des gènes associés à la différenciation,
- *gadd*, *gas* et *p27* participent à l'arrêt du cycle cellulaire.

Myc peut également activer la transcription du gène de l'*ODC*, une enzyme clé de la synthèse des polyamines, essentielle à la prolifération et qui semble liée à la multiplication anarchique des cellules lors de la transformation néoplasique (Auvinen, *et al.*, 1992 ; Bello-Fernandez *et al.*, 1993).

⇒ Paradoxalement, Myc semble jouer un rôle important dans le processus apoptotique induit par divers stimuli (Prendergast, 1999). La protéine BIN-1, qui s'associe à Myc, est un élément indispensable à l'induction de l'apoptose et n'est pas requise pour les autres fonctions de Myc. Les premières expériences *in vitro*, démontrant l'implication de *myc* dans la mort cellulaire programmée, ont été réalisées par Evan et ses collaborateurs (1992), dans des conditions limitant la croissance.

- Dans le cas d'un retrait des facteurs de croissance, certains types cellulaires, qui échappent à l'apoptose lorsque leur taux de protéine Myc est normal, privilégient la voie apoptotique lorsque *myc* est surexprimé (Evan *et al.*, 1992 ; Gibson *et al.*, 1995 ; Xu *et al.*, 1996 ; Alarcon *et al.*, 1996). Une expression élevée de *myc* sensibilise également certaines cellules dans d'autres cas d'apoptose, comme celle

induite par TNF- α dans la lignée SNU-16 (Park *et al.*, 1998), par l'interféron α dans la population cellulaire des lymphomes de Burkitt (Milner *et al.*, 1993) ou encore la mort par récepteur des cellules T d'hybridomes (Shi *et al.*, 1992).

- Cependant, des phénomènes d'inhibition de l'expression du gène ont également été associés à une induction de l'apoptose. C'est le cas de la lignée WEHI231 des lymphomes B immatures chez lesquels une réduction de l'expression de *myc* provoque un phénomène apoptotique sans autre stimulus (Wu *et al.*, 1996). Dans ce même type cellulaire, un maintien de l'expression de *myc* inhibe l'apoptose (Fischer *et al.*, 1994).

L'implication paradoxale de Myc dans l'induction de la croissance et dans la régulation de la mort cellulaire, ainsi que les observations contradictoires sur l'expression de *myc* au cours de l'apoptose, permet d'émettre une hypothèse sur un mode d'action en deux étapes de cette protéine dans le processus apoptotique :

- lors de la prolifération, Myc amorcerait la mort cellulaire avec l'aide de Max en activant la transcription des gènes nécessaires à l'apoptose ;
- quand les conditions deviennent défavorables, en absence de sérum par exemple, Myc déclencherait l'apoptose en association avec BIN-1 et les protéines produites lors de l'amorçage (Prendergast, 1999).

Ainsi, l'importance du phénomène apoptotique dépend de l'état initial de la cellule et la mort cellulaire est d'autant plus rapide que les cellules sont en prolifération.

7. La poly(ADP-ribose)polymérase et son clivage lors de l'apoptose

La poly(ADP-ribose)polymérase (PARP) est une enzyme associée à la chromatine et activée en présence de cassures à l'ADN, produites directement par des agents génotoxiques ou indirectement suite à la réparation par excision de base (Boulikas, 1993). Son activité se traduit par la synthèse d'un polymère, le poly(ADP-ribose), à partir du NAD⁺ (Alvarez-Gonzalez et Mendoza-Alvarez, 1995). Le polymère synthétisé est transféré sur un nombre limité de protéines nucléaires auxquelles il se fixe de manière covalente. Les protéines cibles

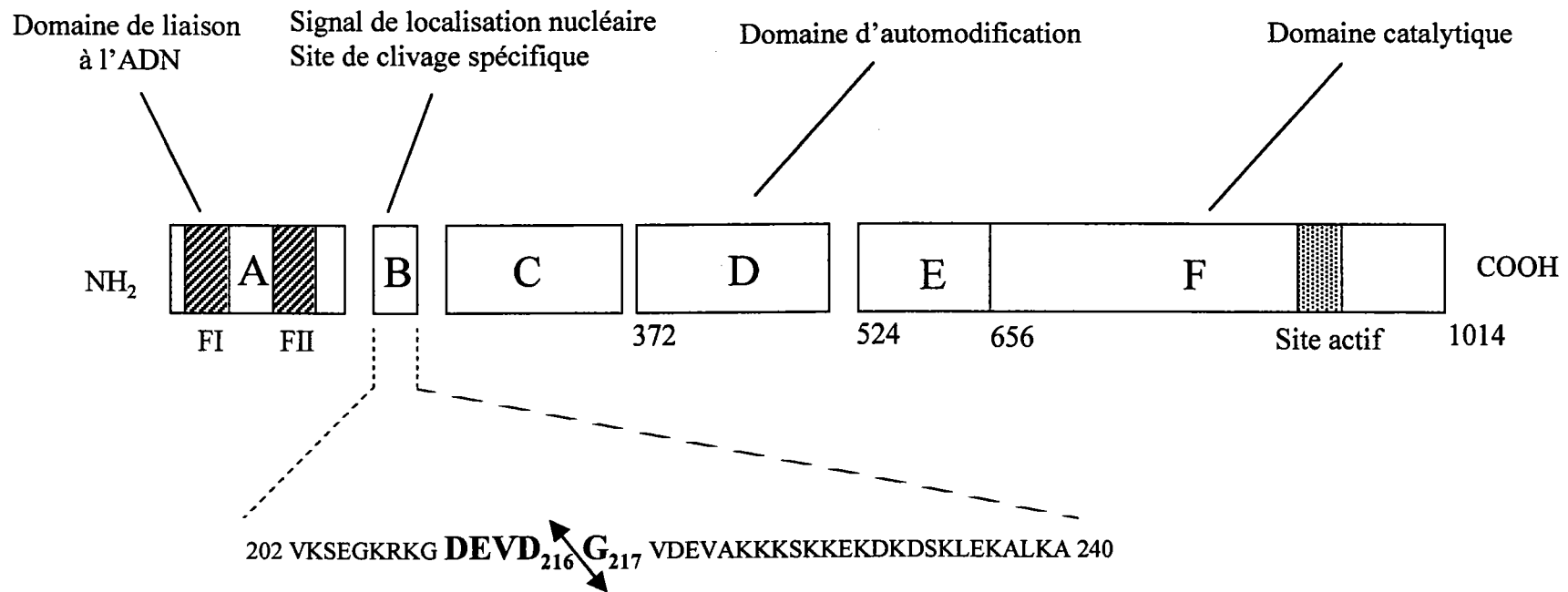


Figure 4. Représentation schématique des différents modules fonctionnels de la PARP humaine, selon Oliver Pozo *et al.* (1998). FI et FII désignent les deux doigts de zinc.

sont des protéines impliquées dans l'architecture de la chromatine (histones, lamines) ou le métabolisme de l'ADN (topoisomérases, facteurs de réplication) ; la PARP elle-même est un accepteur privilégié du poly(ADP-ribose) (Althaus *et al.*, 1995). La fixation des chaînes d'ADP-ribose, chargées négativement, entraîne une perte de l'affinité des protéines pour l'ADN et donc une inactivation de leurs fonctions. L'état initial des protéines modifiées est restauré grâce à la courte demi-vie des molécules de polymères et à l'activité de la poly(ADP-ribose)glycohydrolase qui le dégrade rapidement (Desnoyers *et al.*, 1995). La poly(ADP-ribose)polymérase est, par conséquent, caractérisée par son action immédiate suite aux dommages à l'ADN et par son fonctionnement qui est un fort consommateur d'énergie.

L'implication de la PARP dans le maintien de l'intégrité génomique semble essentiellement liée à son rôle dans la réparation par excision de base. En effet, la PARP possède la capacité de se fixer au facteur XRCC1 qui interagit lui-même avec deux autres partenaires : l'ADN ligase III et l'ADN polymérase β . Dans ce complexe, la PARP semble jouer un rôle de détecteur des cassures à l'ADN ; elle recrute immédiatement XRCC1, d'une part pour protéger les extrémités du brin d'ADN, et d'autre part pour attirer sur le site de lésion les autres partenaires de la réparation (Dantzer *et al.*, 1999 ; Masson *et al.*, 1998).

La poly(ADP-ribose)polymérase est une protéine de 113kDa extrêmement bien conservée au cours de l'évolution (Uchida et Miwa, 1994). Elle est constituée de quatre parties importantes (OliverPozo *et al.*, 1998) (Fig. 4).

1. Le domaine amino-terminal comprenant 2 doigts de zinc (FI et FII), agit comme détecteur des cassures simple brin de l'ADN (Ménissier-deMurcia *et al.*, 1989). Sur le site de cassure, la PARP induit une courbure de l'ADN en V qui permet vraisemblablement son activation (Masson *et al.*, 1995).
2. Le module B contient à la fois le signal d'adressage nucléaire de la protéine et le site de clivage spécifique de l'apoptose comprenant la séquence DXXD reconnue par les caspases.
3. Le domaine D contient le site d'automodification, sur lequel vient se fixer une partie des molécules de poly(ADP-ribose) synthétisées au niveau du domaine catalytique ; cette fixation permet la régulation négative de la protéine.
4. Sur la partie carboxy-terminale se situe le domaine catalytique de l'enzyme, qui synthétise le polymère et est activé 500 fois par la fixation d'ADN endommagé sur le site amino-terminal (Rosenthal *et al.*, 1997).

Le clivage spécifique de la PARP en deux fragments de 89 et 24kDa est considéré par beaucoup d'auteurs comme un marqueur sensible pour la détection précoce de l'apoptose. En effet, cette coupure est observée dans de nombreux types cellulaires répondant à une vaste gamme de stimuli apoptotiques (Soldatenkov *et al.*, 1995 ; Duriez *et al.*, 1997 ; Ubol *et al.*, 1996 ; Meßmer *et al.*, 1996, 1998 ; Geley *et al.*, 1997 ; An et Knox, 1996 ; Whitacre et Berger, 1997). La nécrose n'est pas caractérisée par cette fragmentation spécifique de la PARP (Shah *et al.*, 1996).

Dans certains cas, la protéolyse de la PARP est précédée par une activation de l'enzyme et une production de poly(ADP-ribose) (Bernardi *et al.*, 1995 ; Donzelli *et al.*, 1997 ; Rosenthal *et al.*, 1997 ; Scovassi *et al.*, 1998).

Le site spécifique de clivage de la PARP est l'élément DEVDG, la coupure intervenant toujours après Asp216 et Gly217. Les caspases sont les protéases responsables de la dégradation spécifique de la PARP lors de l'apoptose. (Lazebnik *et al.*, 1994 ; Nicholson *et al.*, 1995). La PARP est l'un des substrats des caspases, notamment les caspases-3, -6 et -7 (Cohen, 1997) ; cependant, la caspase-3 semble être l'enzyme ayant le plus d'affinité avec la PARP.

8. Zinc et apoptose

Le rôle essentiel que tient le zinc dans la survie, la croissance et le métabolisme des organismes unicellulaires et pluricellulaires, est en partie expliqué par son implication dans la structure des métalloenzymes, des facteurs de transcription à doigt de zinc et des hormones (Zalewski *et al.*, 1993). Le zinc est un métal du groupe IIb, essentiel pour l'intégrité fonctionnelle et structurale des cellules eucaryotes. Sa présence est requise dans des situations aussi variées que l'expression génique, la synthèse de l'ADN, la catalyse enzymatique, le stockage et le relargage des hormones, la réparation des tissus, la neurotransmission, les processus de mémoire et les processus visuels. Le zinc est également un agent cytoprotecteur qui protège les cellules de l'oxydation et de la dégradation, et stabilise les microtubules du cytosquelette et les membranes cellulaires (Chai *et al.*, 1999).

La toxicité de cet élément est faible ; il n'est pas mutagène et ne possède que très peu d'effets clastogènes. Le zinc peut induire des tumeurs, mais uniquement après des injections locales et

il est donc considéré comme ne présentant pas, par lui-même, de risque cancérigène pour l'homme. Il n'est pas tératogène ; par contre, une déficience en zinc présente un risque pour la santé humaine et surtout pour le développement des organismes (Léonard *et al.*, 1986).

De nombreuses études résumées par Sunderman (1995) ont mis en évidence les effets des ions Zn^{2+} sur le processus apoptotique. Il a été démontré qu'une déficience en zinc pouvait entraîner l'apoptose *in vivo* et *in vitro*. Les travaux *in vivo* de différentes équipes ont mis en lumière les faits suivants :

- une alimentation dépourvue de zinc entraîne, chez des rats, une déficience en cet élément qui conduit à une augmentation des corps apoptotiques dans la muqueuse du petit intestin ;
- les souris soumises à une nourriture déficiente en zinc montrent une atrophie thymique et un dysfonctionnement des cellules T helper ; de plus, elles souffrent de phénomènes d'acrodermatites (lésions dermiques au niveau des pattes et de la queue) et d'entéropathies ;
- une déficience en zinc entraîne un retard de développement de jeunes souris.

In vitro, on peut relever :

- une diminution de la prolifération ainsi que de la viabilité des cellules exposées à un milieu dépourvu de zinc, notamment dans les lignées Molt3, Raji et HL60 ;
- une apoptose accrue dans les cellules exposées à un chélateur du zinc, comme le TPEN (tetrakis(2-pyridylmethyl)-ethylenediamine), capable de traverser les membranes cellulaires.

Une supplémentation en zinc est capable d'entraîner une inhibition de l'apoptose *in vivo*. Par exemple, les souris NAW/W1 auxquelles on a injecté de manière sous-cutanée de l'acétate de zinc, présentent une réduction de la fragmentation de l'ADN thymique observée suite à l'injection de lipopolysaccharide de *S. typhimurium*.

Les essais *in vitro* de supplémentation sont nombreux et montrent la prévention par le zinc de la mort cellulaire de divers types de cellules en culture (thymocytes, lymphocytes, cellules tumorales,...) induites par différents stimuli physiques, chimiques ou immunologiques. Les concentrations de zinc relevées dans la littérature comme étant capables d'inhiber l'apoptose sont très variables et s'étalent de 50 μ M à 5mM (Sunderman, 1995).

La première activité anti-apoptotique du zinc, qui a été mise en évidence, est son action inhibitrice des endonucléases Ca^{2+} , Mg^{2+} -dépendantes responsables de la fragmentation de l'ADN (Cohen et Duke, 1984). Des études ont démontré, par la suite, que le zinc est capable d'agir en amont de la fragmentation de l'ADN en inhibant le mécanisme d'activation des caspases et plus particulièrement celui de la caspase-3 (Perry *et al.*, 1997 ; Chai *et al.*, 1999). Le zinc pourrait également intervenir au niveau de la prise de décision de la mort cellulaire. En effet, dans les cellules U937, l'apoptose induite par le peroxyde d'hydrogène est inhibée par le sulfate de zinc avec en parallèle une augmentation du ratio Bcl-2/Bax (Fukamachi *et al.*, 1998).

B. Transformation cellulaire

La cancérogenèse est un processus biologique complexe permettant l'évolution d'une cellule normale vers un stade tumoral. Les perturbations cellulaires à l'origine d'un état néoplasique sont induites par de multiples facteurs qui peuvent être de type endogène (génétiques, endocriniens, immunologiques,...) ou de type exogène (chimiques, physiques, viraux).

On distingue au moins trois étapes dans l'établissement d'un phénotype cancéreux.

- ⇒ L'**initiation**, irréversible, correspond à une ou plusieurs modifications du génome ; ces modifications peuvent persister après l'intervention des systèmes de réparation : la cellule est dite "initiée".
- ⇒ La **promotion**, réversible, est la phase durant laquelle les mécanismes de régulation du cycle cellulaire, de la différenciation ou de l'expression génique sont perturbés ; la cellule initiée, devenue indépendante des processus de régulation, prolifère de manière anarchique, ce qui donne une tumeur dans le cas des tissus solides et une densité cellulaire anormalement élevée dans le cas du tissu sanguin ou lymphocytaire.
- ⇒ La **progression** se traduit par une autonomie et une agressivité des cellules tumorales qui acquièrent la capacité d'envahir d'autres tissus que le tissu d'origine et de former des métastases.

1. Les produits cancérogènes

Actuellement les substances cancérogènes sont divisées en deux groupes.

- Les initiateurs agissent directement au niveau des bases de l'ADN avec pour conséquences des cassures, des adduits, des pontages,... Ces altérations, si elles ne sont pas réparées, vont entraîner lors de la réplication des modifications plus ou moins importantes de la séquence des nucléotides de l'ADN. Ces modifications peuvent concerner des séquences codantes et s'ensuivent des conséquences graves pour la cellule et ses descendantes, si des gènes cruciaux pour le contrôle du cycle cellulaire, de la prolifération ou la différenciation sont touchés.

Ces substances génotoxiques sont aisément détectables par les tests de mutagenèse classiques.

- Les agents non-génotoxiques sont plus difficiles à mettre en évidence car ce sont des substances qui n'agissent pas directement au niveau de la molécule d'ADN et échappent donc au screening communément appliqué. Les expérimentations animales à long terme et les études épidémiologiques sont les seuls moyens disponibles actuellement pour la détection de ce type de produits. Ces substances, dont l'action est épigénétique, provoquent des perturbations des systèmes de régulation des gènes, de différenciation, de prolifération qui peuvent allonger la survie des cellules initiées et induire leur multiplication.

Les cibles cellulaires de ces produits sont multiples et impliquent des mécanismes comme :

- la perturbation des signaux de transduction qui contrôlent la croissance cellulaire et la différenciation,
- l'activation de protéines kinases et l'inhibition de phosphatases,
- l'activation du métabolisme des polyamines,
- l'action sur les enzymes impliquées dans la réplication, la transcription ou la réparation de la molécule d'ADN,
- l'augmentation de la production des radicaux libres,
- les altérations structurales et fonctionnelles des membranes cytoplasmiques et des systèmes de communication intercellulaire,
- l'inhibition des mécanismes d'apoptose,
- les modifications du profil de méthylation de la molécule d'ADN,
- l'inhibition des télomérases,
- ... (Durand *et al.*, 1997)

- Certaines substances sont des cancérigènes complets et possèdent à la fois une activité inductrice et une activité promotrice de tumeur.

La variété des mécanismes impliqués dans la cancérogenèse et surtout la cancérogenèse non-génotoxique explique la difficulté du screening des substances à potentiel néoplasique.

La législation européenne impose des expérimentations animales à long terme pour la détection du potentiel cancérogène des substances médicamenteuses, des additifs alimentaires et de certains pesticides ; mais aucun essai n'est prévu pour les autres substances chimiques, qui ne sont testées qu'*in vitro* par des essais à court terme. Actuellement, les méthodes

alternatives standardisées pour la détection des cancérogènes sont essentiellement basées sur la mise en évidence de modifications géniques. Les produits non-génotoxiques échappent donc au screening imposé par la législation, alors que selon l'« US National Toxicology Program », les cancérogènes non-génotoxiques représentent 40% des produits cancérogènes. Les essais *in vitro* de transformation morphologique des cellules en culture, qui intègrent les différentes altérations produites par les substances testées et reflètent un état global de la cellule après ces altérations, méritent notre intérêt dans le choix des méthodes alternatives. Ils permettent en outre de détecter des produits tant génotoxiques que non-génotoxiques

2. Les essais de transformation morphologique

Dès 1943, les études d'Earle mettent en évidence une corrélation entre les changements morphologiques des cellules en culture et l'oncogénicité de ces cellules *in vivo*. Mais ce sont Berwald et Sachs (1963) qui définissent le phénotype transformé qu'acquièrent certaines cellules lorsqu'elles sont au contact de substances cancérogènes et mettent en place le premier test de transformation cellulaire sur cellules SHE. Les différents travaux qui vont suivre confirmeront la relation entre la capacité de certains produits à induire des tumeurs *in vivo* et leurs potentialités à transformer les cellules *in vitro* (DiPaolo *et al.*, 1969 ; Pienta *et al.*, 1977 ; Barrett *et al.*, 1979). Il sera également démontré que les cellules morphologiquement transformées deviennent immortelles, voir malignes, de manière beaucoup plus fréquente que les cellules normales (DiPaolo *et al.*, 1971 ; Elias *et al.*, 1989, 1995) ; et ces cellules, lorsqu'elles sont réinjectées à un animal isologue, sont capables de former des tumeurs (Berwald et Sachs, 1963).

Le concept d'initiation/promotion développé par Berenblum (1941) sera repris par Barrett et Ts'o (1978), qui démontrent que la transformation cellulaire *in vitro* est un processus multi-étapes et que les produits cancérogènes peuvent intervenir à différents stades du développement du phénotype transformé.

Le processus de transformation cellulaire *in vitro* se révèle donc très proche de la cancérogenèse *in vivo*, ce qui permet la détection du potentiel cancérogène par ce type d'essai.

Critères de transformation

Le potentiel cancérigène d'une substance appliquée en culture cellulaire se caractérise par la formation de colonies transformées ou de foyers de transformation, selon le type d'essai utilisé. Ce phénotype transformé a été défini comme le bouleversement du comportement social et de la perte de la capacité d'inhibition de contact des cellules. La transformation morphologique se distingue par une structure cellulaire désorganisée, en relation avec des modifications du cytosquelette et avec l'empilement et l'entrecroisement des cellules au sein d'une colonie (Chouroulinkov et Lasne, 1976). Les cellules transformées utilisées à des passages ultérieurs montrent également une capacité à se développer dans un milieu semi-solide et à induire des tumeurs chez des animaux isologues ou immunodéprimés.

L'apparition d'un phénotype transformé est un critère intégrateur d'un ensemble de perturbations d'origines génétique et épigénétique pouvant être à l'origine du développement d'un processus néoplasique.

Modèles cellulaires utilisés en transformation

Trois principaux systèmes ont été développés pour la détection du potentiel transformant d'une substance : les lignées cellulaires C3H10T_{1/2} et BALB/c-3T3, et les cellules primaires SHE.

1. Lignées cellulaires

Les systèmes C3H10T_{1/2} (Reznikoff *et al.*, 1973) et BALB/c-3T3 (Kakunaga, 1973) sont des lignées cellulaires murines qui sont très utilisées dans les essais de transformation.

Le critère de transformation est la présence de foyers morphologiquement transformés, qui représentent des zones de forte densité cellulaire et/ou d'altération de la morphologie cellulaire par rapport au tapis confluent environnant. Les foyers de transformation peuvent être visualisés après 40 jours d'essai.

Les lignées cellulaires établies ont l'avantage d'être faciles à maintenir en culture. Cependant, elles présentent des capacités de métabolisation limitées, elles sont aneuploïdes et ne peuvent donc pas représenter le comportement de cellules normales face à la cancérogenèse. De plus, un temps assez long (au minimum 4 semaines) est nécessaire pour voir apparaître un phénotype transformé, avec un risque non négligeable de contamination des cultures.

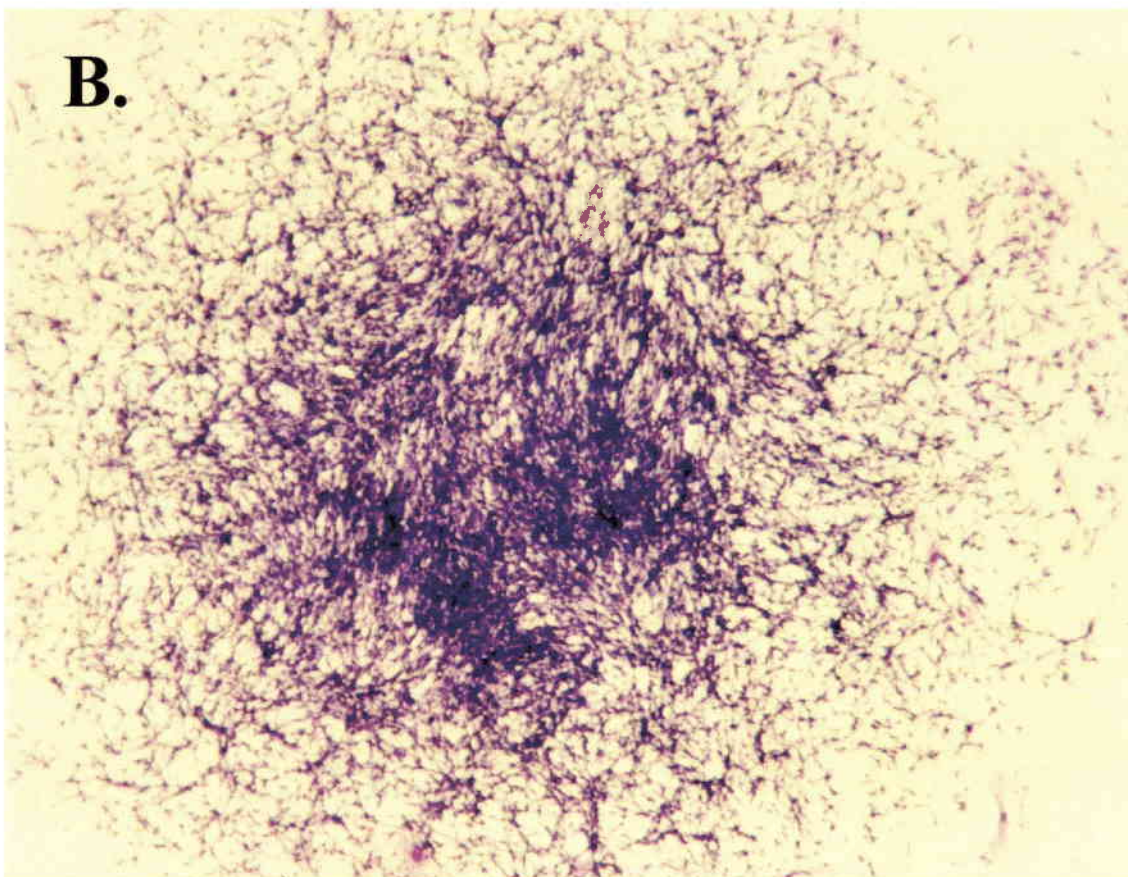
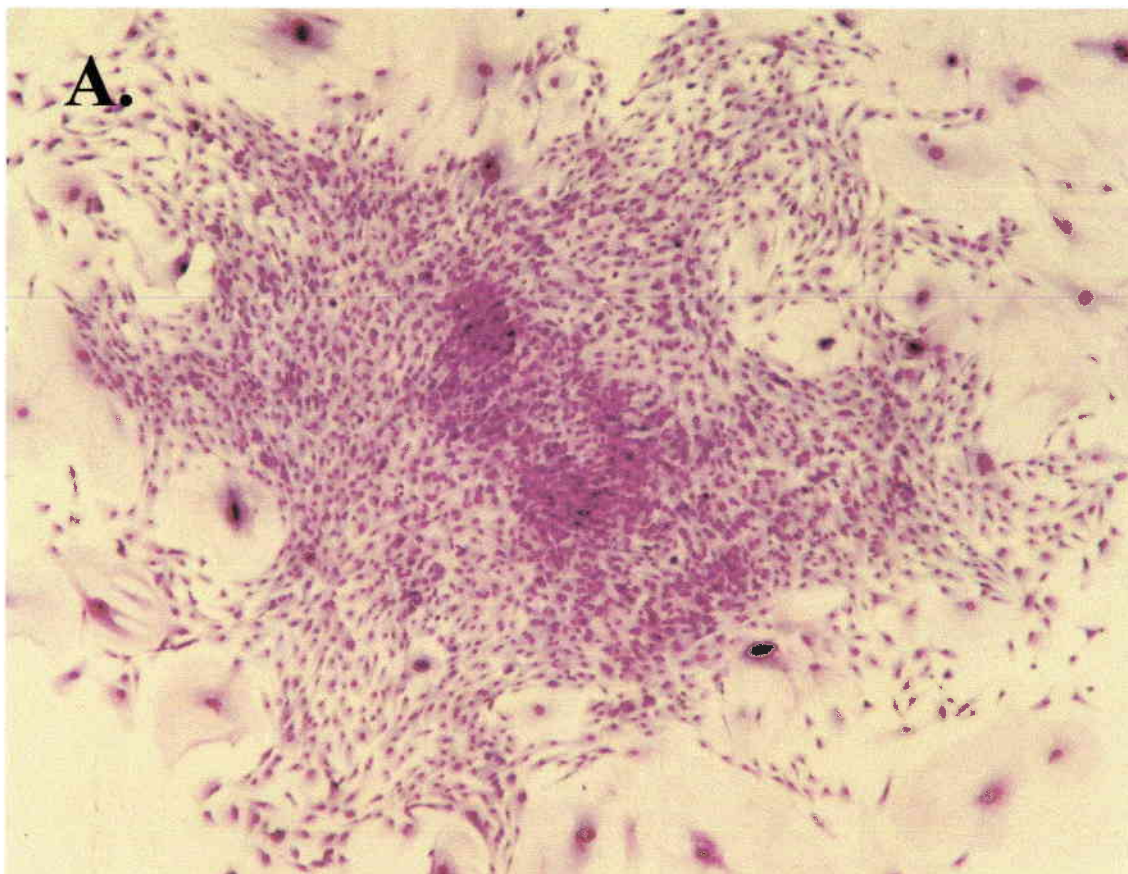


Figure 5. Colonie normale (A) comparée à une colonie morphologiquement transformée (B).

Ce sont plutôt des modèles représentatifs des étapes terminales du processus de transformation néoplasique.

2. Cultures primaires

Les cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE), obtenues à partir d'embryons de 13 jours, sont les cellules primaires les plus utilisées pour la détection d'un potentiel transformant.

Les colonies transformées se distinguent des colonies normales par leur structure désorganisée et une multiplication anarchique résultant d'une perte de l'inhibition de contact des cellules (Fig. 5).

Morphologiquement, on observera :

- un entrecroisement et un empilement des cellules qui peuvent pousser en multicouches,
- une augmentation de la basophilie qui donne une couleur sombre à la colonie,
- une diminution du rapport cytoplasme/noyau qui donne un aspect filamenteux aux cellules.

Les capacités de transformation d'une substance seront caractérisées, dans le système SHE utilisé à densité clonale, par l'apparition, au bout de 8 jours de traitement, de colonies morphologiquement transformées.

Un très grand nombre d'agents chimiques et physiques a été testé sur ce système, incluant des molécules organiques et des substances inorganiques, telles que des fibres, des minéraux, des métaux. Des agents cancérigènes pour l'homme ou les mammifères, non détectés par les tests de mutation ponctuelle comme le test d'Ames, se sont révélés transformants dans ce système ; c'est le cas de l'amiante, des proliférateurs de peroxyosomes hépatiques, du diethylstiboestrol,... Nous avons produit une synthèse des essais de transformation cellulaire réalisés par les équipes françaises, en vue d'une standardisation de l'essai par l'OCDE pour la détection *in vitro* des agents cancérigènes (Vasseur *et al.*, 1998). Cette synthèse est présentée en annexe. Une revue sur les performances de l'essai utilisant les cellules SHE comparées aux lignées a été réalisée tout récemment par le Ministère de l'Environnement pour l'établissement d'une ligne directrice de l'OCDE sur les essais de transformation cellulaire (Lasne, 2000). Cette revue souligne la supériorité des cellules SHE, par rapport aux lignées, pour la détection d'un potentiel cancérigène (Tableau IV). Les résultats obtenus avec 128

Tableau IV. Résumé des performances des essais de transformation utilisant les cellules SHE, BALB/c3T3 et C3H10T_{1/2} en comparaison avec le test d'Ames (Lasne, 2000).

	Cellules SHE	Cellules C3H10T _{1/2}	Cellules BALBc/3T3	Test d'AMES
Sensibilité	84%	71%	62%	56%
Spécificité	81%	67%	62%	75%
Valeur prédictive positive	89%	83%	72%	
Valeur prédictive négative	74%	50%	51%	
Concordance globale des résultats	78%	55%	54%	64%

Sensibilité : pourcentage de cancérogènes induisant la transformation cellulaire sur le nombre total de cancérogènes testés,

Spécificité : pourcentage de substances non-cancérogènes n'induisant pas la transformation sur le nombre total de substances non-cancérogènes testées,

Valeur prédictive positive : pourcentage de cancérogènes induisant la transformation sur le nombre total de substances positives en transformation,

Valeur prédictive négative : pourcentage de substances non-cancérogènes donnant un résultat négatif en transformation sur le nombre total de substances négatives en transformation.

Tableau V. Corrélation entre le potentiel cancérogène des substances *in vivo* et leur réponse dans le test de transformation morphologique utilisant des cellules SHE en densité clonale. D'après Lasne (2000)

Groupe de substances chimiques	Cancérogénicité <i>in vivo</i>	Réponse obtenue dans l'essai de transformation	Nombre de substances
Positifs	+	+	65/83
Faux positifs	+	-	13/83
Cancérogènes donnant une réponse équivoque	+	?	5/83
Négatifs	-	-	35/45
Faux négatifs	-	+	8/45
Non cancérogènes donnant une réponse équivoque	-	?	2/45

substances (83 cancérogènes et 45 non cancérogènes) ont été rapportées ; sur les 83 substances reconnues cancérogènes *in vivo*, 65 sont détectées par le système SHE. Parmi les 45 substances non cancérogènes, on ne compte que 8 faux positifs (Tableau V).

Les cellules SHE ont l'avantage d'avoir gardé leurs capacités de métabolisation, d'être diploïdes et de représenter le comportement de cellules normales. La toxicité et la transformation sont analysées sur les mêmes cellules, ce qui est également intéressant expérimentalement.

Cependant, l'utilisation de ce système cellulaire demande une préparation périodique de cellules primaires. Il existe des variations de susceptibilité d'un stock de cellules à l'autre. De même, la qualité du sérum aura un rôle déterminant sur la sensibilité des cellules SHE aux produits transformants. Il sera donc important d'évaluer les systèmes cellules-sérum performants en terme de sensibilité à la transformation et donc de présélectionner les lots de cellules et les lots de sérum appropriés pour ces essais.

III. MATERIEL ET METHODES

A. Produits chimiques utilisés

		Activité
Benzo(a)pyrene (BaP) Masse molaire : 252,3 N° CAS : 50-32-8 Origine : Sigma-Aldrich	$C_{20}H_{12}$	Inducteur d'adduits à la molécule d'ADN
Camptothécine (CPT) Masse molaire : 348,4 N° CAS : 7689-03-4 Origine : Sigma-Aldrich	$C_{20}H_{16}N_2O_4$	Inhibiteur des topoisomérases de type I
Etoposide (ETP, VP16) Masse molaire : 588,6 N° CAS : 33419-42-0 Origine : Sigma-Aldrich	$C_{29}H_{32}O_{13}$	Inhibiteur des topoisomérases de type II
5-fluorouracile (5FU) Masse molaire : 130,1 N° CAS : 51-21-8 Origine : Sigma-Aldrich	$C_4H_3N_2O_2F$	Inhibiteur de l'aminoisobutyrate pyruvate aminotransférase
Fomesafen Masse molaire : 438,5 N° CAS : 72178-02-0 Origine : généreusement donné par ORFILA L.	$C_{15}H_{10}ClF_3N_2O_6S$	Inducteur des proliférateurs de peroxyosomes hépatiques
Méthyl méthane sulfonate (MMS) Masse molaire : 110,13 N° CAS : 66-27-3 Origine : Merck	$C_2H_6O_3S$	Agent méthylant la molécule d'ADN
Vinblastine (VB) Masse molaire : 909,1 N° CAS : 143-67-9 Origine : Sigma-Aldrich	$C_{46}H_{58}N_4O_9 \cdot H_2SO_4$	Perturbateur de l'organisation des microtubules

B. Cellules et conditions de culture

1. Cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE)

Primocultures

Les cellules SHE primaires sont obtenues au laboratoire à partir d'embryons prélevés sur une femelle hamster, à 13 jours de gestation, selon la méthode décrite par Pienta *et al.* (1977) et modifiée par Elias *et al.* (1989).

Plus précisément, 13 jours après l'accouplement, la femelle hamster est légèrement anesthésiée à l'éther et décapitée. Toutes les manipulations qui suivent sont effectuées stérilement. Les embryons sont immédiatement extraits des deux cornes utérines et rincés dans un tampon phosphate (PBS) contenant 1% d'une solution d'antibiotiques à 50.000 µg/mL de streptomycine et 50.000 UI/mL de pénicilline (Gibco BRL). Chaque embryon est traité séparément afin de constituer des lots distincts de cellules, provenant d'embryons différents. Les tissus différenciés à ce stade, comme les yeux, le cœur et l'appareil digestif, sont éliminés.

Chaque embryon est ensuite découpé finement et exposé à une solution de dispase (2U/mL) à 37°C et sous agitation. Après cette première digestion de 30 min, le surnageant cellulaire obtenu est éliminé et les tissus non dissociés sont traités à nouveau à la dispase durant 30 min. Les surnageants obtenus sont filtrés sur deux couches de gaze et les amas cellulaires restants subissent une nouvelle digestion jusqu'à la complète dissociation des tissus. Les surnageants successifs sont centrifugés 10 min à 250 g, les culots résultants sont remis en suspension dans un milieu DMEM supplémenté en sérum (15%) et en antibiotiques (1%).

Après comptage, les cellules dissociées sont mises en culture dans des grandes boîtes de Pétri (Ø 10cm) à raison de 5.10^6 cellules par boîte et cultivées jusqu'à confluence avec un changement de milieu toutes les 24 h. Le tapis de cellules confluentes obtenu est trypsiné ; les cellules sont dénombrées et congelées dans un milieu DMEM contenant 10% de sérum et 10% de diméthyl sulfoxyde (DMSO). Les cryotubes sont remplis à raison de 1,5 à 5.10^6 cellules/mL. La congélation s'effectue de manière progressive ; après 30 min dans la glace, 4

h à -20°C , une nuit à -80°C , les cryotubes sont plongés dans l'azote liquide et conservés jusqu'à 2 ans. Le stade des cellules congelées à ce point est noté comme passage 0 ; les cellules SHE primaires ne sont utilisées que jusqu'au 5^{ème} passage à l'extrême, c'est à dire qu'elles subissent au plus 5 trypsinisations.

Les lots de cellules obtenus sont testés selon deux critères : leur capacité à proliférer en densité clonale et leur aptitude à se transformer sous l'action d'un cancérigène type, comme le BaP.

Cellules SHE de type Tr

Au contraire des précédentes, les cellules SHE Tr correspondent à une lignée établie de cellules transformées. Elles ont été obtenues par l'application d'une fibre de brucite, la némalite ($10\mu\text{g/mL}$), un contaminant naturel des fibres d'amiante, reconnue comme cancérigène puissant sur les cellules SHE primaires. Le caractère immortel des cellules a été obtenu par des repiquages successifs (Elias *et al.*, 1995).

Les cellules SHE transformées se divisent plus rapidement que les cellules SHE primaires, ne possèdent pas d'inhibition de contact et induisent des tumeurs très rapidement et très efficacement chez le hamster nouveau-né (100% en 6 semaines après 24 passages).

Les cellules SHE Tr utilisées dans cette étude proviennent du laboratoire de Cancérogenèse – Institut National de Recherche Scientifique (INRS) – Dr Z. Elias – Vandoeuvre-les-Nancy.

Conditions de culture

Le milieu utilisé est un milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) sans rouge de phénol, fournit sous forme lyophilisée (Gibco BRL), auquel on ajoute $2,2\text{g/L}$ de NaHCO_3 pour atteindre un pH de 7, lors de la remise en solution. Le milieu est ensuite stérilisé par filtration sur $0,2\mu\text{m}$ et conservé 3 semaines au maximum à 4°C .

La culture des cellules SHE s'effectue dans le milieu DMEM supplémenté par 15% de sérum de veau fœtal (SVF) (PerBio) et 1% de la solution d'antibiotiques. Le lot de sérum utilisé (H389) a été sélectionné pour ses capacités à favoriser le clonage des cellules SHE et à mettre en évidence le caractère transformant d'une substance.

Les cellules SHE conservées dans l'azote liquide sont rapidement décongelées à 37°C, diluées dans du milieu complet (DMEM+15%sérum+antibiotiques) et centrifugées 10 min à 250g afin d'éliminer le milieu de congélation contenant du DMSO, toxique. Le culot cellulaire est repris dans le milieu complet et les cellules sontensemencées à raison de 10.000 cellules/cm² au minimum. La multiplication des cellules se déroule dans une atmosphère saturée en humidité, contenant 10% de CO₂, à une température de 37°C.

Les repiquages s'effectuent grâce à une dissociation enzymatique du tapis cellulaire. Les cellules préalablement rincées au PBS sont exposées quelques minutes, à 37°C, à de la trypsine (Gibco BRL), en solution à 0,25% (w/v) dans du PBS. Lorsque les cellules sont décollées, la trypsine est diluée dans du milieu complet qui, par l'action du sérum, inhibe son activité. Les cellules sont ensuite centrifugées 10 min à 250g, reprises dans un milieu complet et prêtes à être réensemencées.

2. Cellules HL60

Les cellules HL60 constituent une lignée de lymphocytes provenant du sang périphérique d'une personne de 36 ans de type caucasien atteinte d'une leucémie promyélocytaire (Collins *et al.*, 1977). Elles ont la particularité de ne pas exprimer la protéine P53 (Wolf et Rotter, 1985). La lignée HL60 utilisée dans cette étude provient de la Collection Européenne de Cultures Cellulaires (ECACC N°98070106).

Le milieu utilisé est le milieu RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) obtenu sous forme de poudre (Sigma-Aldrich) auquel on ajoute 2g/L de NaHCO₃ ; le pH de ce milieu est de 7,4. Les cellules sont cultivées dans le milieu RPMI supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (même lot de SVF que pour la culture des cellules SHE) et 1% du mélange d'antibiotiques (streptomycine et pénicilline). L'incubation est réalisée dans une atmosphère saturée en humidité, à 5% de CO₂ et 37°C. Ce type de cellules, qui se développent en suspension, est maintenu en culture par des repiquages périodiques qui sont de simples dilutions et qui permettent de conserver une densité cellulaire de 5.10⁵ à 1,5.10⁶ de cellules/mL.

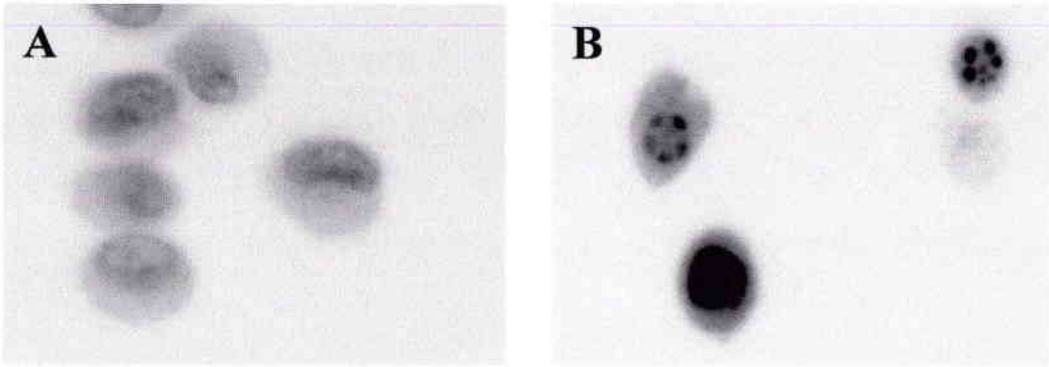


Figure 6. Observation en microscopie à fluorescence de cellules SHE normales, présentant un noyau homogène (A), et de cellules en apoptose, dans lesquelles on distingue une condensation de la chromatine et une fragmentation nucléaire (B).

C. Détection de l'apoptose

L'apoptose des cellules SHE et HL60 a essentiellement été testée dans des essais à court terme basés sur des critères morphologiques, biochimiques et moléculaires.

1. Etude morphologique

Après traitement, les cellules sont récupérées, centrifugées 10 min à 250g et marquées par un mélange d'acridine orange (150µg/mL) et de bromure d'éthidium (250µg/mL) dans du PBS. La suspension cellulaire est immédiatement étalée sur lame et observée en microscopie à fluorescence à 495 nm. Les cellules viables, qui ne sont perméables qu'à l'acridine orange, montrent une coloration verte de leur noyau ; les cellules mortes, également perméables au bromure d'éthidium, ont un noyau coloré en rouge. Les cellules en apoptose sont caractérisées par une chromatine condensée et/ou une fragmentation nucléaire selon le stade du processus de mort cellulaire. Les cellules non-apoptotiques présentent une chromatine homogène (Fig. 6). Le taux d'apoptose est exprimé par le pourcentage de cellules présentant une morphologie apoptotique sur le total des cellules comptées. Le marquage au bromure d'éthidium permet déterminer si l'apoptose est à un stade plus ou moins avancé. Chaque lecture est réalisée en duplicat et vérifiée par au moins un autre essai.

2. Etude de la fragmentation de la molécule d'ADN

Electrophorèse en gel d'agarose

L'apoptose se caractérise par une digestion internucléosomale de la molécule d'ADN qui génère des fragments de longueurs multiples à 180-200 pb. Cette fragmentation particulière peut se mettre en évidence par une électrophorèse en gel d'agarose qui révèle une configuration de la molécule d'ADN en barreaux d'échelle, plus communément appelée "DNA Ladder".

Dans notre étude, la purification du matériel génétique a été réalisée grâce au kit "Suicide-Track" (Oncogene) selon les instructions du fournisseur. L'ADN est tout d'abord extrait des cellules par un tampon de lyse ; à ce stade, les fragments d'ADN peuvent être séparés de la

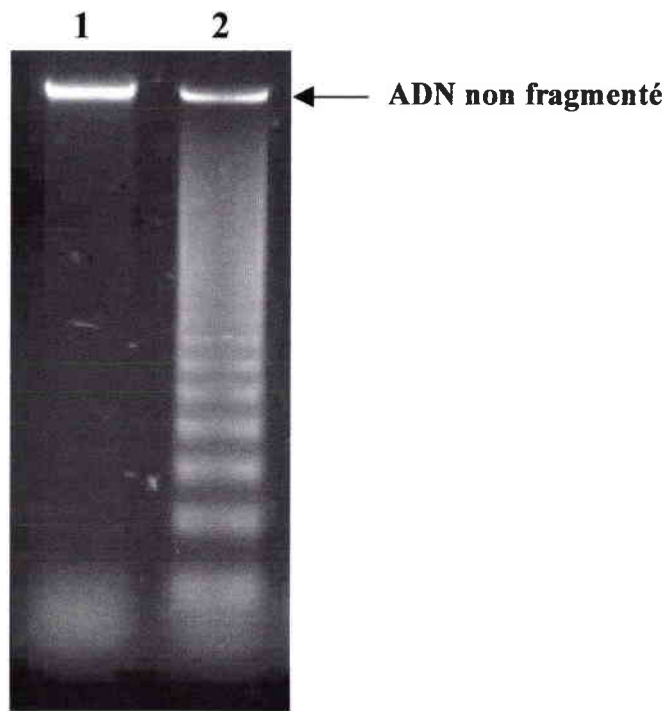


Figure 7. Migration en gel d'agarose de l'ADN extrait de cellules SHE non-apoptotiques (1) et de cellules SHE en apoptose (2).

chromatine de haut poids moléculaire par une centrifugation de 5 min à 15.000g, mais la méthode permet également d'analyser tout le contenu en ADN, qu'il soit fragmenté ou non. Les ARN sont ensuite dégradés et l'ADN est précipité rapidement à l'isopropanol grâce à un co-précipitant qui accélère le mécanisme de précipitation. Le culot obtenu après une centrifugation de 5 min à 15.000g est rincé à l'éthanol, resuspendu dans un tampon fourni dans le kit et déposé sur un gel d'agarose (1,5% (w/v) dans un tampon Tris-Acetate-EDTA) contenant 0,1µg/mL de bromure d'éthidium. L'ADN de haut poids moléculaire ainsi que les fragments sont visualisés par une exposition aux UV. L'apoptose est caractérisée par une configuration en barreaux d'échelle des fragments d'ADN (Fig. 7).

Méthode ELISA

Principe

La technique utilisée dans le kit "Cellular DNA Fragmentation ELISA" (Roche Molecular Biochemicals) permet de distinguer les fragments intracellulaires d'ADN, que l'on retrouve typiquement lors de l'apoptose, des fragments relargués dans le milieu extracellulaire par les cellules nécrotiques. Préalablement à l'exposition aux inducteurs d'apoptose, l'ADN cellulaire est marquée à la bromodeoxyuridine (BrdU). Après traitement des cellules, les fragments d'ADN sont récupérés dans le surnageant, ainsi que dans le lysat cellulaire et analysés par une méthode ELISA réalisée grâce à un couple d'anticorps monoclonaux de souris : le premier dirigé contre l'ADN et le second contre le BrdU. L'anticorps anti-ADN fixé au fond de la microplaque piège les fragments marqués par le BrdU. Après une dénaturation de l'ADN, qui permet une mise en évidence des sites BrdU, les fragments sont reconnus par le second anticorps associé à une peroxydase. L'ajout du substrat de l'enzyme, la 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (TMB), permet la quantification photométrique de la fragmentation de l'ADN.

Mode opératoire

Les cellules SHE sont décongelées,ensemencées à forte densité (50.000 cellules/cm²) dans du milieu complet contenant 1mM de BrdU et incubées 17 h. Le tapis cellulaire est alors trypsinisé et les cellules réensemencées dans une microplaque à 96 puits à raison de 10.000 cellules/puits dans 100µL ; le traitement inducteur d'apoptose est appliqué dans les 100µL que l'on ajoute ensuite. Quant aux cellules HL60, elles sont également repiquées dans du milieu contenant 1mM de BrdU à raison de 1.10⁶ cellules/mL et incubées 17 h. Les cellules

ainsi marquées sont traitées de la même manière que les cellules SHE. Les cellules étant marquées par un agent intercalant, leur exposition aux substances testées doit être de courte durée. Le kit ne prévoit qu'une intoxication de 6 h maximum ; nous avons cependant prolongé l'application des produits jusqu'à 24 h. Des puits contenant du milieu d'intoxication sans cellules sont également incubés ; ceux-ci constitueront les témoins négatifs de la fragmentation retrouvée dans le milieu extracellulaire, pour chaque produit testé.

Le surnageant est récupéré et les cellules sont lysées afin de libérer les fragments d'ADN retenus dans le milieu intracellulaire. Le surnageant et le lysat sont déposés dans des microplaques ELISA à fond plat dont les puits ont préalablement été recouverts d'anticorps anti-ADN (clone MCA-33) par une incubation de 1 h à 37°C. Les échantillons sont laissés à 4°C durant une nuit pour permettre la fixation des fragments sur les anticorps anti-ADN. Après trois lavages par le tampon de lavage, les fragments d'ADN sont dénaturés par l'action d'une endonucléase III (Roche) à une concentration de 10U/mL dans une solution de MgCl₂ (0,66mM) et de β-mercaptoéthanol (1mM) dans du Tris 66mM à pH 8, appliquée pendant 30 min à 37°C, afin de pouvoir rendre accessible les sites BrdU au second anticorps. Les plaques sont à nouveau lavées et soumises au deuxième anticorps anti-BrdU couplé à une peroxydase (clone BMG 6H8) durant 1 h 30 à température ambiante. Après un dernier lavage, 100µL de substrat de l'enzyme (TMB) sont ajoutés et les plaques sont incubées à l'obscurité et sous agitation jusqu'au développement d'une coloration bleue (10 à 30 min). La réaction est stoppée par l'addition de 25µL de H₂SO₄ 4M et la couleur passe du bleu au jaune. La mesure spectrophotométrique est réalisée avec un lecteur à microplaques à 450 nm, avec soustraction du bruit de fond à 690 nm.

L'exposition des cellules est effectuée en triplicat et les résultats sont confirmés par d'autres essais indépendants. Les moyennes des mesures sont comparées entre elles par un test *t* de Student.

L'intensité de la coloration est fonction du taux de fragmentation de l'ADN, mais également de la durée de l'interaction de l'enzyme avec son substrat ; les résultats d'un essai ne sont pas directement comparables à ceux d'un essai réalisé de manière indépendante. Il est donc important d'avoir un témoin positif et un témoin négatif de la fragmentation pour chaque essai.

3. Analyses en Western blot de la PARP et de ses produits éventuels de dégradation

La technique de Western blot, ou immunoblotting, permet l'analyse de protéines spécifiques après séparation par électrophorèse sur gel en polyacrylamide-SDS et transfert sur membrane. La détection des protéines est réalisée par un couple d'anticorps dont le premier reconnaît la protéine à analyser et le second, portant une enzyme qui permet sa détection, se fixant au premier anticorps.

Préparation des échantillons, électrophorèse et transfert

Après traitement, les cellules sont récupérées (par grattage dans le cas des cellules SHE et par simple pipetage pour les cellules HL60), réparties en deux aliquots et centrifugées 10 min à 1000g. Un des culots obtenu, qui servira à la quantification des protéines, est resuspendu dans un tampon de lyse (50mM Tris, pH 8; 1mM EDTA; 0,2mM PMSF; 200mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 0,5µg/mL leupeptine; 1µg/mL pepstatine), incubé 30 min dans la glace et centrifugé (10.000g) 30 min à 4°C, afin d'éliminer les matières insolubles. Les concentrations protéiques sont mesurées dans le surnageant obtenu grâce au kit "Bio-Rad DC" (Bio-Rad) basé sur la méthode de Bradford de dosage des protéines. Le second culot est resuspendu dans un tampon de charge (62,5M Tris, pH 6,8; 6M Urée; 10% glycérol; 2% SDS; 0,003% bleu de bromophénol; 5% β-mercaptoéthanol ajouté extemporanément) et exposé à un traitement aux ultrasons (30 secondes, 40% du cycle) qui permet une extraction et une solubilisation de la PARP. Chaque échantillon est déposé sur le gel en polyacrylamide-SDS en quantité ajustée en fonction du dosage protéique effectué précédemment afin d'obtenir des concentrations identiques de protéines dans chaque puits. Pour l'analyse de la PARP, un dépôt de 20µg de protéines est requis.

Le gel utilisé pour la migration électrophorétique est constitué de deux parties : les protéines sont déposées sur un gel de compression à 4% de polyacrylamide, de 5mm de hauteur ; ensuite elles passeront sur un gel de séparation à 8% de polyacrylamide (6cm de hauteur).

La composition des gels est la suivante :

• gel de compression (5 mm)

Composants	Solutions stocks	Concentrations dans la solution finale (eau milliQ)
Acrylamide/BisAcrylamide (Bio-rad)	30% (29:1)	4% Acrylamide
Tris pH 6,8	0,5 M	125 mM
SDS	10% (w/v)	0,1% (w/v)
Temed		0,05% (v/v)
Persulfate d'ammonium		0,1% (w/v)

• gel de séparation (6 cm)

Composants	Solutions stocks	Concentrations dans la solution finale (eau milliQ)
Acrylamide/BisAcrylamide (Bio-Rad)	40% (37,5:1)	8% acrylamide
Tris pH 8,8	1,5 M	375 mM
SDS	10% (w/v)	0,1% (w/v)
Temed		0,025% (v/v)
Persulfate d'ammonium		0,1% (w/v)

L'utilisation de minigels permet une séparation rapide des protéines. Les échantillons, préalablement chauffés 15 min à 65°C, sont déposés sur le gel de compression et exposés à une tension de 100V jusqu'au gel de séparation (30 min environ), et ensuite à une tension de 150V, durant 1 h 30 environ, jusqu'à la totale séparation des protéines. Le tampon d'électrophorèse est constitué de 0,1% de SDS et 192mM de glycine dans un tampon Tris à 25mM. Il peut être préparé en solution concentrée 10 fois et conservée à 4°C. Dans un des puits du gel, un marqueur de poids moléculaire est déposé, afin de situer la zone dans laquelle la protéine doit être recherchée (Bio-rad).

L'électrophorèse est suivie par le transfert des protéines sur membrane. Le gel contenant les protéines est lavé dans la solution de transfert (Tris 25mM, pH 8,3; glycine 192mM; méthanol 20% v/v) durant 30 min, afin d'éliminer les traces de SDS. Pendant ce temps, la membrane de difluorure de polyvinylidène (PVDF; NEN Research Product) est préhydratée dans de l'éthanol à 95% durant 1 min, rincée 5 min dans de l'eau milliQ et équilibrée 20 min dans le tampon de transfert. La membrane est ensuite appliquée sur le gel, dans l'appareil de transfert,

et la tension électrique fournie permet le transfert des protéines du gel sur la membrane. Le transfert est réalisé 2 h à 4°C et 60V. La membrane est ensuite séchée à température ambiante pour induire une forte liaison des protéines à la membrane, qui peut ainsi être conservée à 4°C pendant plusieurs semaines.

Une coloration au Ponceau S de la membrane (0,1% (w/v) de Ponceau S dans 5% (v/v) d'acide acétique) pendant 1 min permet de confirmer les quantités de protéines déposées dans chaque puits, ainsi que le bon déroulement de la migration et du transfert. La coloration est éliminée par un lavage de 5 min dans le tampon PBSMT (PBS, pH 7,4; 5% de lait écrémé en poudre; 0,1%(v/v) de Tween 20) et l'immunoblotting peut commencer. Toutes les étapes qui suivent sont réalisées sous agitation et à température ambiante.

Détection de la PARP par un anticorps anti-PARP

La membrane est tout d'abord saturée pendant une 1 h dans une solution de PBSMT. L'anticorps anti-PARP (C-2-10, anticorps monoclonal de souris) est ensuite appliqué au 1/10.000 dans le tampon PBSMT, durant toute la nuit. La membrane est ensuite lavée 1×15 min, puis 4×5 min avec du PBSMT et exposée pendant 1 h à un second anticorps de chèvre anti-souris couplé à la peroxydase (Sigma), dilué au 1/50.000 dans le PBSMT. La membrane est à nouveau lavée 5 fois comme précédemment et rincée 30 min dans du PBS.

Les protéines sont alors révélées par chimiluminescence grâce au réactif Renaissance (NEN Research Product). La peroxydase est mise en contact avec le luminol contenu dans le réactif et les bandes de fixation des anticorps sont signalées par l'émission de photons permettant l'impression d'un film photographique (Kodak). Une exposition du film de 5 à 10 min est généralement suffisante pour l'observation de résultats, après révélation et fixation (réactifs Fnac).

L'anticorps anti-PARP C-2-10 nous a généreusement été fourni par l'équipe du Dr Poirier. Le site de reconnaissance de cet anticorps se situe entre les acides aminés 216 et 375 de la PARP juste à l'extrémité du site de clivage spécifique de l'apoptose (entre Asp216 et Gly217). Dans les cellules HL60 ainsi que dans de nombreux autres types cellulaires en apoptose, il met en évidence la PARP entière ainsi que son fragment apoptotique de 89kDa.

Détection de la PARP par un anticorps anti-polymère

Principe

La détection de la PARP, ainsi que celle de son ou ses fragments apoptotiques, peut se faire indirectement par une méthode basée sur le maintien de l'activité catalytique de l'enzyme après la migration et le transfert des protéines (Shah *et al.*, 1995). La PARP, ainsi que les fragments qui possèdent encore le domaine catalytique (le fragment 89kDa, par exemple) peuvent être renaturés et activés sur la membrane par leur substrat, le NAD⁺. Le poly(ADP-ribose), fourni par l'activation de la polymérase et qui se fixe de façon covalente sur le site d'automodification, est ensuite détecté par l'anticorps anti-polymère (LP96-10) fourni par l'équipe du Dr Poirier.

Protocole

Après la migration et le transfert des protéines, une solution renaturante (50mM Tris, pH 8; 100mM NaCl; 1mM DTT; 0,3% (v/v) Tween 20) contenant 20µM d'acétate de Zn(II) et 2mM de MgCl₂ est appliquée 1 h sur la membrane. La réaction enzymatique est ensuite démarrée avec du tampon de renaturation frais supplémenté en Zn²⁺ et Mg²⁺ auquel on ajoute 100µM de NAD⁺. Après 1 h d'incubation, la membrane est lavée 4×15 min dans du tampon de renaturation et 4×15 min dans un tampon SDS (50mM Tris, pH 8; 100mM NaCl; 1mM DTT; 2% SDS) destiné à éliminer toutes les molécules de polymère qui ne sont pas fixées de manière covalente.

La membrane est prête pour l'immunoblotting, dont la première étape est une saturation des sites antigéniques par une incubation de 1 h dans du PBSMT. L'anticorps anti-polymère (LP96-10, anticorps polyclonal de lapin) est appliqué au 1/5.000 dans le PBSMT, durant une nuit. La membrane est alors successivement lavée au PBS contenant 2M d'urée et 0,05% de Tween 20 (3×7 min) et ensuite au PBS complémenté par 0,1% de Tween 20 (1×10 min). Le second anticorps (IgG anti-lapin conjugué à la peroxydase, Sigma) est appliqué 45 min dilué au 1/2500 dans le PBSMT. Après lavages de la membrane au PBSMT (1×15 min, puis 4×5 min), et ensuite 30 min au PBS, les bandes sont révélées comme précédemment par chimiluminescence avec le réactif Renaissance (NEN Research Products).

4. Activité de la caspase-3

Dans de nombreux types cellulaires, la caspase-3 est considérée comme une enzyme clé de l'apoptose. De ce fait, l'activité de cette protéase est fréquemment dosée en relation avec le processus apoptotique.

Dans cette étude, nous avons analysé la caspase-3 par une méthode FIENA (Fluorometric Immunosorbent Enzyme Assay) dont les réactifs sont fournis sous forme de kit par Roche et qui permet la détection spécifique et quantitative de l'activité de la caspase-3 en microplaques.

Les cellules traitées par un inducteur d'apoptose sont récupérées par grattage, divisées en deux aliquots et centrifugées à 1000g pendant 10 min. Un des culots obtenu, qui servira à la quantification des protéines, est resuspendu dans un tampon de lyse (50mM Tris, pH 8; 1mM EDTA; 0,2mM PMSF; 200mM NaCl; 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 0,5µg/mL leupeptine; 1µg/mL pepstatine), incubé 30 min dans la glace et centrifugé (10.000g) 30 min à 4°C, afin d'éliminer les matières insolubles. Les concentrations protéiques sont mesurées dans le surnageant obtenu grâce au kit "Bio-Rad DC" (Bio-Rad) basé sur la méthode de Bradford de dosage des protéines. Les cellules du second culot sont lysées 1 min dans une solution contenant 10mM de DTT à 4°C, et centrifugées 15 min à 1800g. Les surnageants sont dilués afin d'obtenir la même quantité de protéines dans tous les échantillons. Ces échantillons sont ensuite déposés sur une microplaque préalablement recouverte d'anticorps anti-caspase-3 et incubés 1 h à 37°C. La plaque est ensuite lavée et l'Acétyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-trifluorométhyl-coumarin (Ac-DEVD-AFC) servant de substrat à la caspase-3 est ajouté. Si la caspase-3 est active, l'Ac-DEVD-AFC est clivé et l'AFC est libérée en générant une fluorescence. La réaction enzymatique se déroule à 37°C et 2 h sont généralement suffisantes pour mettre en évidence une activation de l'enzyme. La mesure fluorométrique est réalisée sur un lecteur de microplaques à fluorescence avec des longueurs d'onde d'excitation de 380nm et d'émission de 538nm.

D. Détection de la protéine P53

Les cellules HL60 étant *p53*-nulles, la détection de la protéine n'a été réalisée que sur les cellules SHE, par deux techniques : une quantification de la protéine par Western blot et par une méthode immunochimique, directement sur les cellules en culture. La méthode

d'immunochimie directe, qui ne modifie pas la structure de la protéine, a l'avantage de permettre la distinction entre P53 normale et P53 mutée.

1. Analyse en Western blot

Les cellules traitées sont récupérées de la même manière que pour l'analyse de la PARP. Les conditions de migration, de transfert, d'immunoblotting et de révélation sont également identiques. L'anticorps primaire utilisé pour détecter P53 est l'anticorps monoclonal de souris DO7 (Dako) dilué au 1/1.000 et appliqué 2 h seulement ; l'anticorps secondaire est un anticorps de chèvre anti-IgG de souris conjugué à la peroxydase (Sigma) dilué au 1/50.000 et appliqué 1 h.

2. Immunochimie directe

Les cellules sont exposées aux substances à tester directement sur des lames LabTek en verre traitées pour la culture cellulaire (Labsystem). Après exposition, le tapis cellulaire est rincé au PBS et fixé par un mélange de méthanol et d'acétone (3/7 (v/v)), à -20°C pendant 5 min. Les lames sont ensuite séchées à l'air libre et les cellules sont perméabilisées par un bain de 10 min dans du Triton X-100 (0,2%(v/v) dans du PBS). Après 3 rinçages des lames et 1 lavage de 10 min au PBS, les sites non-spécifiques sont saturés par 0,1% de gélatine et 1% de SVF dans du PBS pendant 2 h à température ambiante. Les anticorps primaires sont appliqués directement, dilués dans du PBS contenant 1% de lait écrémé en poudre, et les lames sont incubées 1 nuit à 4°C . Les anticorps anti-P53 que nous avons utilisés sont de deux types : l'anticorps de souris DO7 (Dako) est dilué au 1/100 et reconnaît aussi bien la protéine normale que la protéine mutée ; l'anticorps de souris Pab240 (Roche) utilisé à $5\mu\text{g/mL}$ n'est spécifique que de la protéine mutée. Après 3 rinçages rapides et un lavage de 10 min au PBS, un second anticorps est appliqué (IgG de cheval anti-souris couplé à la biotine, Vector Laboratories), dilué au 1/50 dans du PBS, pendant 1 h à température ambiante. Les lames, à nouveau rincées et lavées, sont soumises pendant 45 min, à température ambiante, à une solution de streptavidine-peroxydase (Vector Laboratories) (1/250 dans du PBS). L'ajout d'un substrat de la peroxydase, le VIP (Vector Laboratories), permet la visualisation de la protéine P53 sous la forme d'une coloration violette au niveau nucléaire. La réaction enzymatique est très rapide, et il suffit de 5 min pour voir la couleur apparaître.

Cette méthode permet la mesure qualitative de la stabilisation de la protéine P53 et la détection d'un éventuel phénomène de mutation.

E. Détection de la protéine Akt

Les cellules traitées sont récupérées de la même manière que pour l'analyse de la PARP. Les conditions de migration, de transfert, d'immunoblotting et de révélation sont également identiques.

L'anticorps spécifique de Akt, phosphorylée ou non, est l'anticorps de mouton anti-Akt1 (Upstate Biotechnology), utilisé à une concentration de 1µg/mL durant une nuit. L'anticorps primaire utilisé pour détecter Akt phosphorylée est l'anticorps de mouton anti-phospho-Akt1 (Upstate Biotechnology) à une concentration de 2µg/mL, appliqué la nuit entière. L'anticorps secondaire destiné à révéler les deux anticorps primaires est un anticorps de souris anti-IgG de mouton conjugué à la peroxydase (Sigma) dilué au 1/2.000 et appliqué 1 h durant.

F. Analyse en RT-PCR de l'expression des gènes *myc*, *bax* et *p21*

1. Principe

La technique de RT-PCR (Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction) permet d'évaluer le taux d'ARNm spécifique d'un gène particulier, et d'analyser ainsi, indirectement, l'expression de ce gène. Après extraction de l'ARN, une transcription reverse transforme tout l'ARN en ADNc (ADN complémentaire) qui sera amplifié par des cycles de réplication successifs, grâce à des amorces spécifiques des gènes à étudier, jusqu'à l'obtention d'un taux d'ADN détectable.

2. Mode opératoire

Préparation des ARN

Les cellules sont récupérées par grattage pour les cellules SHE, ou par simple pipetage pour les cellules HL60. Toutes les étapes ultérieures sont effectuées dans la glace. Les cellules sont centrifugées à 1000g pendant 10 min et resuspendue dans 100µL d'une solution 4M de

Tableau VI. Composition du milieu réactif nécessaire à la transcription reverse d'un échantillon (20 μ L).

Réactifs	Solutions stocks	Concentrations de la solution de travail	Volumes/20 μ L
Tampon PCR	$\times 10$	$\times 1$	2 μ L
MgCl ₂	25mM	5mM	4 μ L
dGTP	10mM	1mM	2 μ L
dATP	10mM	1mM	2 μ L
dTTP	10mM	1mM	2 μ L
dCTP	10mM	1mM	2 μ L
Inhibiteur de RNase	20U/ μ L	1U/ μ L	1 μ L
Transcriptase reverse MuLV	50U/ μ L	2,5U/ μ L	1 μ L
Amorces Oligo d(T) ₁₆	50 μ M	2,5 μ M	1 μ L
Echantillon	0,5 μ g/ μ L	25ng/ μ L	2 μ L
DEPC (0,1%)			1 μ L

La solution stock de tampon PCR est constituée de KCl (500mM) et de Tris-HCl (100mM), pH 8,3.

guanidine isothiocyanate (GATC) qui inhibe les RNase. Les cellules en suspension sont lysées par 300 μ L d'Extract-All (Eurobio), un produit à base de phénol, qui participe également à l'extraction de l'ARN. A ce lysat, on ajoute 80 μ L de chloroforme, et trois phases de différentes couleurs vont apparaître après une centrifugation de 10 min à 12.000g. La phase inférieure phénol-chloroforme rouge contient les protéines, l'interphase blanche l'ADN et la phase supérieure transparente les ARN. La phase supérieure est délicatement prélevée (200 μ L) et on lui ajoute 200 μ L d'isopropanol afin de précipiter les ARN. Après 30 min de précipitation, les ARN sont centrifugés 10 min à 12.000g et lavés à l'éthanol absolu. Après séchage, les culots d'ARN sont repris dans une solution de diéthyl pyrocarbamate (DEPC) (0,1%) et dosé au spectrophotomètre à 260nm (1 unité d'absorbance = 40 μ g/mL d'ARN). Les solutions d'ARN sont ajustées à une concentration de 0,5 μ g/ μ L et une migration en gel d'agarose (1% dans un tampon Tris-Acetate-EDTA) contenant 0,1 μ g/mL de bromure d'éthidium permet de vérifier l'intégrité de ces ARN. La migration de 2 μ L d'ARN ne peut se faire que grâce à l'ajout de 10 μ L de tampon de charge spécifique contenant 5% de glycérol et un colorant bleu au xylène cyanol.

Transcription reverse

Tous les réactifs nécessaires à la transcription reverse sont contenus dans le kit 'Gene Amp' (Perkin Elmer). La réaction s'effectue dans un volume de 20 μ L, dans des microtubes certifiées sans RNase. Pour un échantillon (20 μ L), les quantités de réactifs nécessaires sont reprises dans le tableau VI.

La transcription reverse s'effectue en 1 cycle constitué de 3 étapes :

- la transcription proprement dite à 42°C pendant 30 min,
- une dénaturation de 5 min à 99°C,
- un refroidissement des échantillons à 4°C.

L'ADNc est prêt à être répliqué.

Réaction PCR

Tous les réactifs nécessaires à la réaction PCR sont également contenus dans le kit 'Gene Amp' (Perkin Elmer). La réaction s'effectue dans un volume de 40 μ L. Les étapes d'amplification se déroulent de la manière suivante :

- dénaturation initiale	94°C	5 min	
- dénaturation	94°C	30 sec	} boucle d'amplification répétée \times fois
- appariement des amorces	55°C	30 sec	
- élongation	72°C	30 sec	
- élongation finale	72°C	5 min	
- conservation	4°C		

La co-amplification de l'ADNc d'un gène exprimé de manière constitutive comme le gène *gapdh* ou *actine*, en parallèle à l'amplification de l'ADNc d'un gène spécifique, permet le contrôle du processus de transcription reverse et d'amplification ; elle est indispensable pour la comparaison des échantillons entre eux. Le nombre de cycles n'étant pas toujours pareil pour les deux gènes co-amplifiés, la réaction s'effectue en deux étapes : dans une première série de cycles, le milieu réactif ne contient que les amorces du gène qui requiert le plus grand nombre de cycles ; les amorces de l'autre gène ne sont ajoutées que dans la seconde partie de la manipulation.

Une solution de départ concentrée deux fois (S2) est préparée pour tous les échantillons. La composition de cette solution est donnée dans le tableau VII, pour 10 échantillons soit 200 μ L.

Tableau VII. Quantités nécessaires pour constituer le milieu réactif de la PCR, concentré deux fois, pour 10 échantillons (200 μ L).

Réactifs	Solutions stocks	Concentrations dans la solution S2 ($\times 2$)	Volumes/200 μ L
Tampon PCR	$\times 10$	$\times 2$	40 μ L
MgCl ₂	25mM	3 à 4mM	24 à 32 μ L
dGTP	10mM	0,4mM	8 μ L
dATP	10mM	0,4mM	8 μ L
dTTP	10mM	0,4mM	8 μ L
dCTP	10mM	0,4mM	8 μ L
AmpliTaq DNA polymerase	5U/ μ L	0,1U/ μ L	4 μ L
Eau milliQ			ajustement à 200 μ L

Tableau VIII. Amorces spécifiques aux gènes *actine*, *gapdh*, *bax*, *p21* et *myc*, concentrations en chlorure de magnésium et nombre de cycles pour des conditions optimales d'amplification.

Gène étudié	Type cellulaire	Amorces	Taille du produit obtenu	Concentration MgCl ₂	Nombre de cycles
<i>actine</i>	HL60 et SHE	- GGA YGA YAT GGA GAA RAT CTG G - CCT GYT TGC TGA YCC ACA TCT G Solutions mères 20µM	845 pb		
<i>gapdh</i>	SHE	- TCC ATG ACA ACT TTG GCA TCG TGG - GTT GCT GTT GAA GTC ACA GGA GAC Solutions mères 10µM	377 pb		
<i>bax</i>	SHE	- TCC ACC AAG AAG CTG AGC GAG - CCA TCT TCT TCC AGA TGG TGA Solutions mères 10µM	411 pb	2 mM	40 cycles par rapport à 30 cycles <i>actine</i>
<i>p21</i>	SHE	- CMG TGG ACA GYG AGC AGY TG - ATA GAA ATC TGT YAK GCT GGT C Solutions mères 10µM	371 pb	1,5 mM	39 cycles par rapport à 33 cycles <i>actine</i>
<i>myc</i>	HL60	- ACT ATG ACC TCG ACT ACG ACT C - CTG CAG GTA CAR GCT GGA GGT G Solutions mères 10µM	509 pb	2,5 mM	37 cycles par rapport à 30 cycles <i>actine</i>
<i>myc</i>	SHE	- GAT CAG CTG SAG ATG RTG ACC - TTG CGG TTG TTG CTG ATC TG Solutions mères 10µM	731 pb	2 mM	40 cycles par rapport à 32 cycles <i>gapdh</i>

A : adénine
T : thymine
G : guanine
C : cytosine

K : G ou T
M : A ou C
R : A ou G
S : G ou C
Y : C ou T

Cette solution est répartie dans deux tubes différents auxquels on associe des amorces différentes. Au premier tube, on ajoute les amorces du gène qui demande le plus de cycles et on obtient une solution composée de 100µL de solution S2, 10µL de chaque première amorce (amont et aval) et 60µL d'eau milliQ. Dans chaque tube PCR sont déposés 18µL de cette solution auxquels on ajoute 2µL de chaque préparation d'ARN. La première série de cycles peut commencer.

La seconde série de cycles est initiée par un mélange composé de 100µL de la solution S2, 10µL de chaque seconde amorce et 80µL d'eau milliQ. 20µL de cette solution sont déposées dans chaque tube PCR et la réaction se poursuit en présence des deux séries d'amorces.

L'ADN spécifique est révélé par la migration en gel d'agarose, contenant 0,1µg/mL de bromure d'éthidium, de 10µL de la solution obtenue après la PCR, auxquels on ajoute 2µL d'un tampon de charge à 50% de glycérol. Les bandes d'ADN amplifié sont mises en évidence sous UV.

La plupart des gènes que nous avons étudiés n'ont pas encore été séquencés chez le hamster. Pour choisir des amorces spécifiques, susceptibles de se fixer sur la séquence d'ADN du hamster, nous avons comparé les séquences chez l'homme, le rat, la souris,... et avons privilégié des zones bien conservées entre les espèces. La banque de données GenBank nous a servi de base dans la recherche des séquences d'ADN. Les amorces utilisées pour les différents gènes étudiés, ainsi que la taille des produits obtenus, les concentrations en MgCl₂ requises et le nombre de cycles nécessaires sont reportés dans le tableau VIII. Les amorces ont été commandées chez Eurogentec (Belgique).

G. Cytométrie de flux

La cytométrie de flux est une technique d'analyse basée sur le tri des cellules marquées ; elle permet notamment de déterminer dans quelles phases du cycle cellulaire se trouvent une population de cellules.

Une fois traitées, les cellules SHE et HL60 sont récupérées, centrifugées à 1000g (10 min) et remises en suspension dans du PBS. Après une nouvelle centrifugation à 1000g (10 min), les cellules sont fixées à l'éthanol à 70% à 4°C et conservées une nuit à 4°C.

Le marquage de l'ADN par une solution d'iodure de propidium (50µg/mL dans du PBS) est réalisé 1 h avant l'analyse en cytométrie de flux (Becton Dickinson).

10.000 cellules sont triées par le cytomètre en fonction de leur quantité d'ADN ; il est possible de distinguer ainsi 3 populations cellulaires : les cellules en phase G₁, en phase G₂/M et en phase S. Lors de phénomènes apoptotiques, une nouvelle population, correspondant aux cellules en apoptose apparaît en pré-G₁.

H. Analyse du zinc

Les concentrations en zinc dans les milieux de culture ont été déterminées en spectrométrie d'émission atomique (Beckman, Spectra—Span V, type DCP). La mesure du zinc a été réalisée directement dans les milieux de culture (zinc total), ainsi que dans les milieux filtrés sur une membrane de porosité 10kDa (zinc libre + zinc fixé aux macromolécules <10kDa).

I. Essai de transformation morphologique

1. Principe

Ce protocole initialement décrit par Berwald et Sachs (1963, 1965) et modifié par Pienta *et al.* (1977) permet l'évaluation du potentiel transformant d'une substance sur les cellules SHE primaires, cultivées en densité clonale. L'exposition des cellules cibles aux substances testées est de 7 jours, et la formation de colonies morphologiquement transformées constitue la base de cet essai à court terme. Pour permettre le clonage, les cellules cibles sontensemencées sur un tapis de cellules nourricières, qui sont des cellules SHE irradiées à 5000 rads qui ne se divisent plus, mais fournissent tous les facteurs essentiels à la survie des cellules cibles.

2. Protocole

Les cellules nourricières sont mises en culture à J-1 dans 2mL de milieu DMEM comprenant 15% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% du mélange d'antibiotiques, à raison de 60.000 cellules par boîte de 6cm de diamètre (Corning). A J0, 150 cellules cibles dans 2mL de milieu sont ajoutées dans chaque boîte.

Le traitement débute à J1, avec la première application de la substance dans 4mL de milieu complet ajoutés aux 4mL de milieu déjà contenu dans la boîte. Au bout de 3 jours, la totalité du milieu est aspirée, les cellules sont retraitées 4 jours consécutifs par la même concentration de la substance testée, appliquée dans 4 mL de milieu. Dans le cas de cellules traitées par le

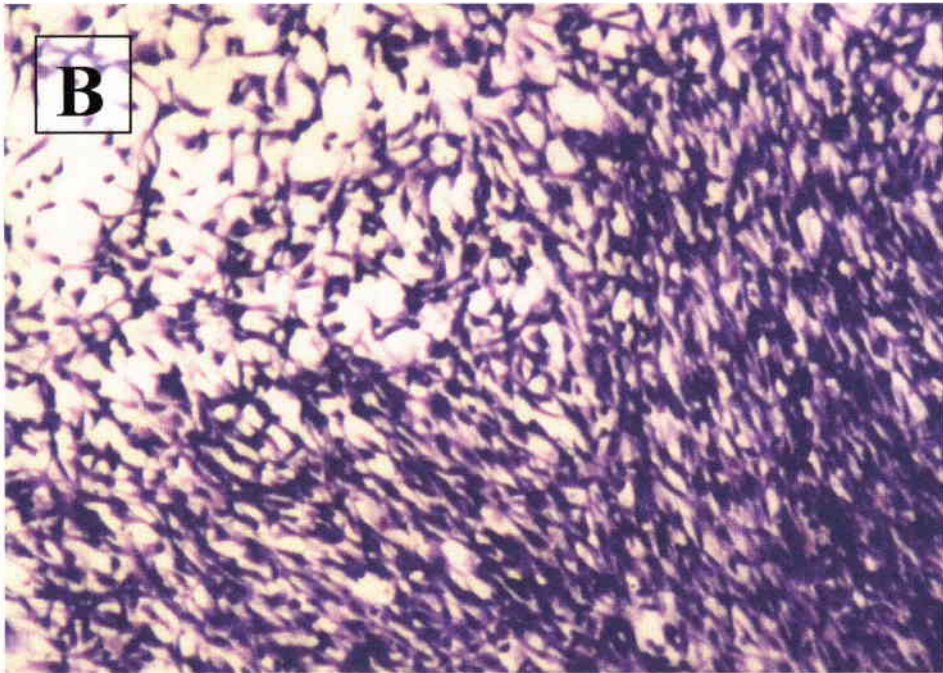
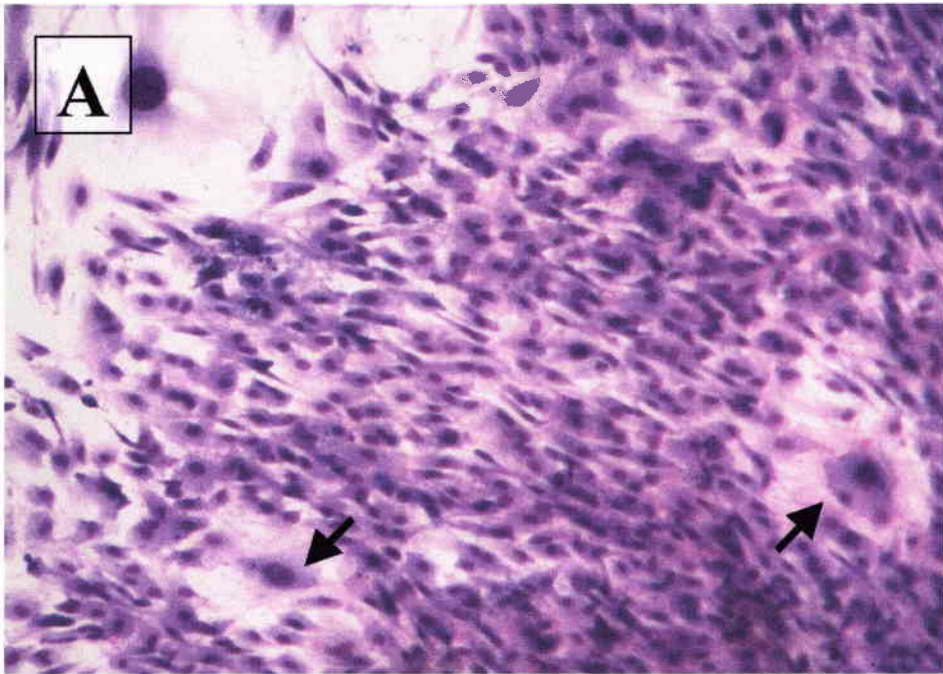


Figure 8. Cellules d'une colonie normale (A) et d'une colonie transformée par le BaP (1 μ g/ml) (B). Les flèches indiquent les cellules nourricières.

zinc, la solution de $ZnCl_2$ est diluée extemporanément dans le milieu de culture et est appliquée dès l'ensemencement des cellules cibles en J0. Chaque quantité de milieu ajouté aux cellules sera ensuite complétée de la même manière.

A la fin du traitement (J8), les boîtes sont vidées et les cellules rincées au PBS, fixées à l'éthanol absolu et colorées au Giemsa (10% dans de l'eau milliQ).

Le BaP est utilisé à la concentration unique de $1\mu\text{g/mL}$ ($4\mu\text{M}$) et le fomesafen aux concentrations de 1, 2,5 et $5\mu\text{g/mL}$. Dix boîtes sont réalisées pour chaque concentration des substances testées. Le BaP étant en solution dans du DMSO, à chaque traitement de ce produit correspond un contrôle négatif dans lequel la substance est remplacée par une quantité équivalente de DMSO. Les témoins négatifs du fomesafen et du $ZnCl_2$, conservés en solution aqueuse, sont simplement constitués du milieu sans la substance.

L'efficacité de clonage et la fréquence de transformation morphologique sont évaluées par observation des colonies à la loupe binoculaire (Olympus).

3. Expression des résultats

A l'inverse de cellules constituant les colonies normales, qui croissent de manière ordonnée et respectent l'inhibition de contact, les cellules contenues dans les colonies transformées ont tendance à croître de manière anarchique ; et on peut observer un enchevêtrement ainsi qu'une superposition des cellules. De plus, l'architecture cellulaire étant modifiée, les cellules transformées présentent une augmentation du ratio noyau/cytoplasme qui confère à la colonie une couleur très sombre (Fig. 8).

L'efficacité de clonage est définie comme le nombre de colonies formées par rapport au nombre de cellules ciblesensemencées $\times 100$. Ce pourcentage permet d'évaluer la toxicité de la substance étudiée.

La fréquence de transformation morphologique est le nombre de colonies transformées sur le nombre total de colonies comptées $\times 100$.

L'analyse statistique est réalisée par le test du χ^2 .

Objectifs de l'étude et présentation des résultats

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes apoptotiques en relation avec la transformation morphologique des cellules SHE cultivées en densité clonale. Notre but était de tester l'hypothèse selon laquelle une apoptose déficiente interviendrait dans le processus de mise en place et d'évolution d'un phénotype néoplasique.

Le mécanisme de la mort cellulaire programmée a tout d'abord été exploré dans les cellules SHE en culture primaire, en comparaison avec des cellules de lignées, la lignée HL60 et la lignée SHE Tr. Différentes techniques d'analyse du processus apoptotique ont été utilisées, afin de mieux définir le phénomène de la mort cellulaire des cellules SHE : ses inducteurs, ses répresseurs, ses caractéristiques. Les trois premières parties de l'étude traitent donc du processus apoptotique dans les différents types cellulaires testés, avec comme étapes :

- la détection de l'apoptose dans les cellules SHE et la comparaison des résultats avec ceux obtenus dans les cellules de la lignée HL60,
- la dégradation de la PARP, en relation avec le processus apoptotique,
- l'étude du gène *myc*, en parallèle avec l'inhibition de l'apoptose par le zinc.

Dans la dernière étape de l'étude, nous avons appliqué nos connaissances, concernant l'apoptose et son inhibition par le zinc, à l'essai de transformation morphologique. Le zinc a été testé seul, et en association avec deux cancérogènes : le BaP, une substance génotoxique qui est inductrice d'apoptose, et le fomesafén, un herbicide non-génotoxique, inhibiteur du processus apoptotique.

IV. RESULTATS

A. Détection de l'apoptose induite par des inhibiteurs de topoisomérases et la privation de sérum dans les cellules embryonnaires de hamster Syrien.

Publication n°1 : Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G. and Vasseur P.
(2000) Detection of apoptosis induced by topoisomerase inhibitors and serum deprivation in Syrian hamster embryo cells, *Experimental Cell Research*, 255, 30-39.

Introduction

Différentes techniques de détection d'apoptose ont été mises en œuvre afin de déterminer la sensibilité des cellules SHE à divers stimuli apoptotiques, plus particulièrement aux inhibiteurs de topoisomérases et à la privation de sérum. Les réactions des cellules SHE ont été comparées à celles de la lignée cellulaire HL60. Les méthodes utilisées pour la détection de l'apoptose ont été les suivantes :

- mise en évidence de la condensation de la chromatine et de la fragmentation nucléaire en microscopie à fluorescence après marquage des cellules à l'acridine orange,
- mesure intracellulaire des fragments d'ADN par une méthode ELISA,
- détection du fragment 89kDa de la PARP par Western blot avec l'anticorps anti-PARP C-2-10,
- visualisation de la configuration en barreaux d'échelle de l'ADN fragmenté ("DNA Ladder") après migration des fragments en gel d'agarose,
- mesure de l'activité de la caspase-3 par une méthode immunoenzymatique de microtitration en fluorescence.

Nous avons également étudié l'implication d'autres facteurs pouvant être associés à l'apoptose comme :

- la stabilisation de la protéine P53 ,
- la phosphorylation de la protéine Akt

} deux paramètres détectés
} en Western blot,

- une modification de l'expression des gènes *myc*, *bax* et *p21*, mise en évidence par une technique de RT-PCR.

Le zinc sous forme de chlorure a également été testé sur les phénomènes apoptotiques telles les modifications de la morphologie nucléaire ou la dégradation de la PARP, afin de vérifier ses capacités à inhiber l'apoptose.

Sensibilité des cellules SHE et HL60 à la privation de sérum et aux inhibiteurs de topoisomérases

Les cellules ont été exposées à un milieu de culture sans sérum, à la camptothécine (0,4 ou 0,8µg/mL) ou à l'étoposide (40µg/mL) pour une durée de 5 ou 24 h. L'apoptose a ensuite été

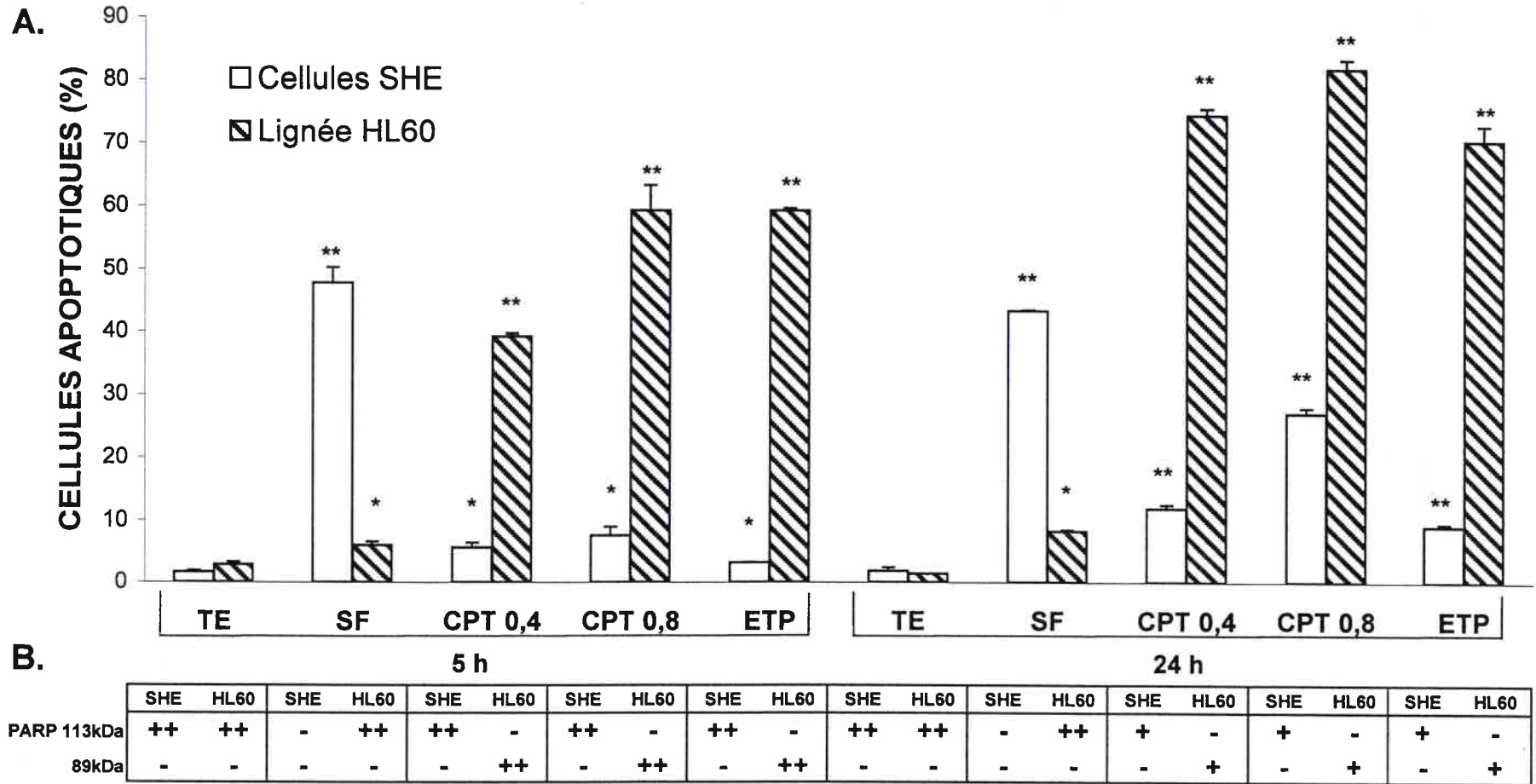


Figure 9. Induction de l'apoptose, quantifiée en microscopie à fluorescence, par les modifications nucléaires des cellules SHE et HL60, marquées à l'acridine orange (A). En parallèle, analyse en Western blot de la protéine PARP (113kDa) et de son fragment apoptotique de 89kDa (B). Les cellules sont exposées 5 h ou 24 h à un milieu sans sérum (SF), à la camptothécine 0,4 µg/mL (CPT 0,4), à la camptothécine 0,8 µg/mL (CPT 0,8) ou à l'étoposide 40 µg/mL (ETP) et comparées aux cellules témoins (TE). Résultats significativement différents des témoins : $p < 0.05$ (*) et $p < 0.01$ (**).

mesurée en microscopie à fluorescence qui met en évidence les modifications nucléaires des cellules apoptotiques après marquage à l'acridine orange (Fig. 9A). Les résultats obtenus montrent une forte dépendance des cellules SHE aux facteurs de croissance. Un retrait du sérum entraîne un phénomène apoptotique important dès 5 h de traitement. Par contre, l'apoptose est beaucoup plus faible avec l'utilisation des inhibiteurs de topoisomérases même après 24 h d'exposition. La mesure des fragments d'ADN dans les compartiments intra et extracellulaire des cellules SHE confirme les résultats obtenus en microscopie à fluorescence. La quantité importante de fragments, générés dans les cellules privées de sérum, n'est pas relarguée dans le milieu extracellulaire, ce qui traduit le maintien de l'intégrité membranaire caractéristique de l'apoptose et non de la nécrose.

L'étude en microscopie à fluorescence des cellules HL60, auxquelles nous avons comparé les cellules SHE, a révélé une résistance de ce type cellulaire à la privation de sérum et une forte sensibilité aux inhibiteurs de topoisomérases (Fig. 9A). Le maintien de l'intégrité membranaire des cellules exposées aux inhibiteurs de topoisomérases a également été vérifié par la méthode ELISA de dosage de fragments d'ADN et confirme le processus apoptotique des cellules HL60 exposées aux inhibiteurs de topoisomérases.

L'activité des inhibiteurs de topoisomérases dépendant de la position des cellules dans le cycle cellulaire, une étude en cytométrie de flux du contenu en ADN cellulaire a été réalisée. Juste avant l'exposition aux substances, la répartition des cellules dans les phases G₁, G₂/M et S sont respectivement de 56, 31 et 13% pour les cellules SHE et de 54, 38 et 8% pour la lignée HL60.

Détection du clivage de la poly(ADP-ribose)polymérase (PARP)

En parallèle à la visualisation de l'apoptose en microscopie à fluorescence, nous avons tenté de mettre en évidence, dans les deux types cellulaires, la PARP (113kDa) ainsi que son fragment apoptotique de 89kDa par une technique en Western blot utilisant l'anticorps anti-PARP C-2-10 (Fig. 9B). La lignée des cellules HL60 montre un signal unique à 113kDa dans les conditions de contrôle ainsi que dans un milieu dépourvu de sérum. L'apoptose induite par les inhibiteurs de topoisomérases s'accompagne d'un signal de 89kDa caractéristique de l'apoptose ; ce fragment de la PARP reste stable même après 24 h d'exposition.

La PARP 113kDa des cellules SHE est détectée par l'anticorps anti-PARP dans les conditions de contrôle ainsi qu'en présence d'inhibiteurs de topoisomérases. Par contre, dans un milieu

Type cellulaire	Cellules HL60				Cellules SHE			
	TE	ETP	ETP	ETP	TE	SF	SF	SF
Exposition								
Heures	5	1	3	5	5	1	3	5

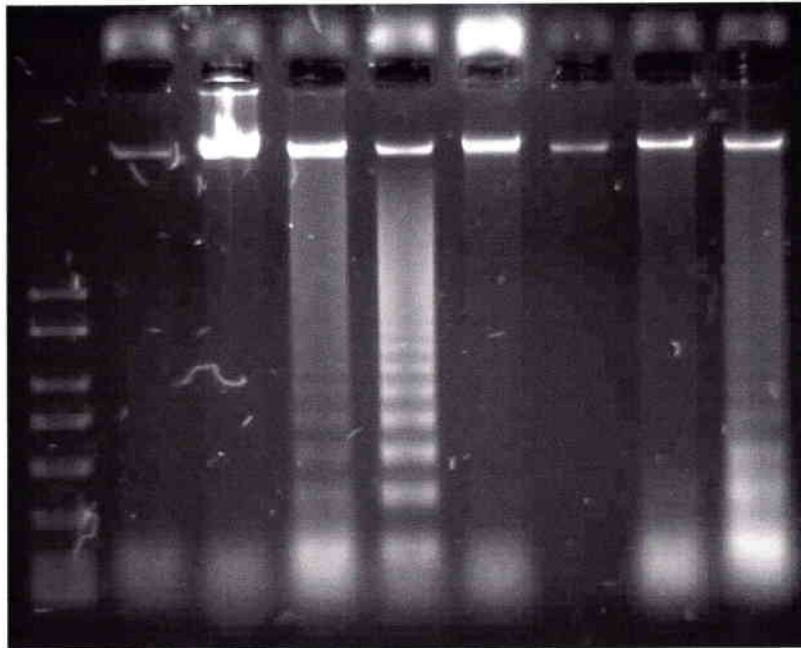


Figure 10. Electrophorèse en gel d'agarose de l'ADN total, fragmenté ou non, des cellules HL60 exposées à 40 µg/mL d'étoposide (ETP) et des cellules SHE privées de sérum (SF) pour une durée de 1, 3 ou 5 h, en comparaison avec les cellules témoins (TE) correspondant au temps 5 h.

L'ADN est préparé selon les instructions du kit "Suicide-Track DNA ladder isolation" (Oncogene).

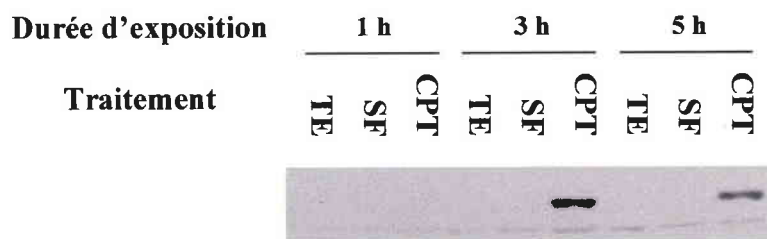


Figure 11. Analyse en Western blot de la stabilisation de la protéine P53, dans les cellules SHE exposées à un milieu sans sérum (SF), ainsi qu'à la camptothécine 0,4 µg/mL (CPT), pendant 1, 3 ou 5 h, en comparaison avec les cellules contrôles (TE).

sans sérum, le signal 113kDa disparaît totalement, sans qu'il y ait cependant apparition d'un autre fragment reconnu par l'anticorps C-2-10.

DNA Ladder

Bien que le phénomène apoptotique ait déjà été mis en évidence par la morphologie nucléaire ainsi que par la formation de fragments intracellulaires d'ADN, nous avons préféré confirmer le caractère apoptotique de la mort cellulaire des cellules SHE, induite par l'absence de sérum, au moyen de la détection de la configuration en barreaux d'échelle ou "DNA Ladder" des fragments d'ADN. Dans les cellules SHE exposées à un milieu sans sérum, tout comme dans la lignée HL60 traitée à l'étoposide, une séparation en gel d'agarose des fragments d'ADN révèle une configuration typique de l'apoptose (Fig. 10).

Activation de la caspase-3

La caspase-3 est une protéase dont l'activation est essentielle dans l'exécution du processus apoptotique de nombreux types cellulaires, notamment la lignée HL60. Dans cette étude, les cellules HL60 montrent une nette activation de cette enzyme dans les premières heures de l'apoptose induite par l'étoposide. Par contre, les cellules SHE privées de sérum ne présentent aucune modification de l'activité de la caspase-3 en relation avec l'apoptose (Tableau IX).

Tableau IX. Activité spécifique de la caspase-3 exprimée en unités relatives de fluorescence après 3, 4 ou 5 h d'exposition des cellules HL60 à l'étoposide (40µg/mL) et des cellules SHE à un milieu déplété en sérum(SF), par rapport à leur témoin respectif.

Temps d'exposition	Cellules HL60		Cellules SHE	
	Témoin	Etoposide	Témoin	SF
3 h	2107	7443	1057	1148
4 h	1888	4346	1240	1282
5 h	1494	2464	1031	1154

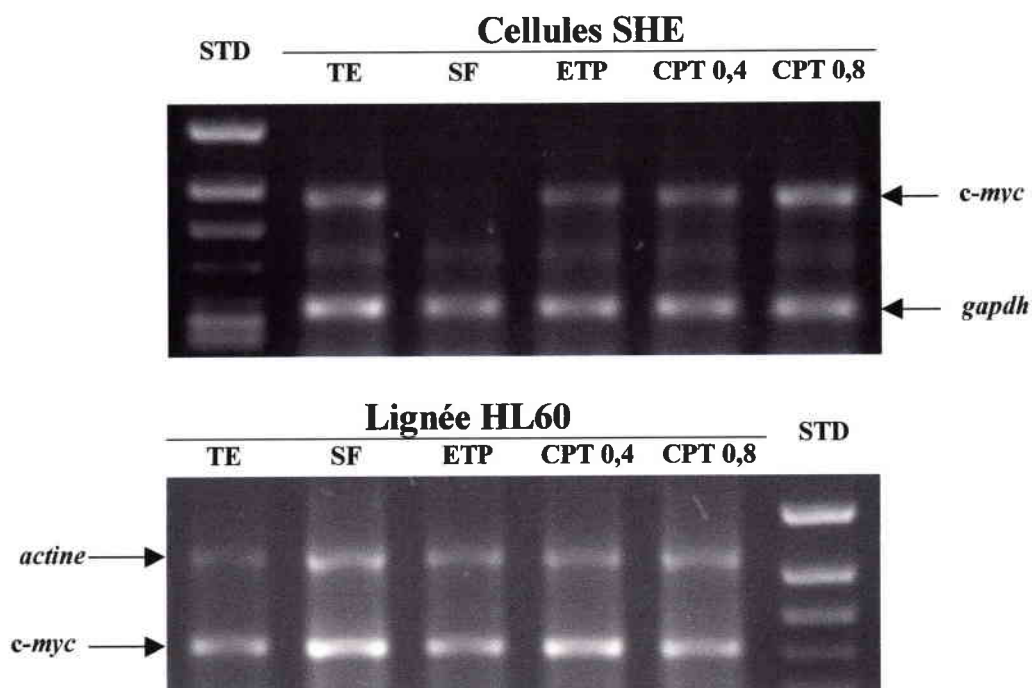


Figure 12. Analyse en RT-PCR de l'expression de *myc* dans les cellules SHE et la lignée HL60, après 3 h de traitement par un milieu sans sérum (SF), par l'étoposide 40µg/mL (ETP), par la camptothécine 0,4µg/mL (CPT 0,4) ou 0,8µg/mL (CPT 0,8), en comparaison avec les cellules témoins (TE). La coamplification de l'ADNc de la *gapdh* représente un contrôle interne pour les cellules SHE, et l'*actine* un contrôle interne pour les cellules HL60.

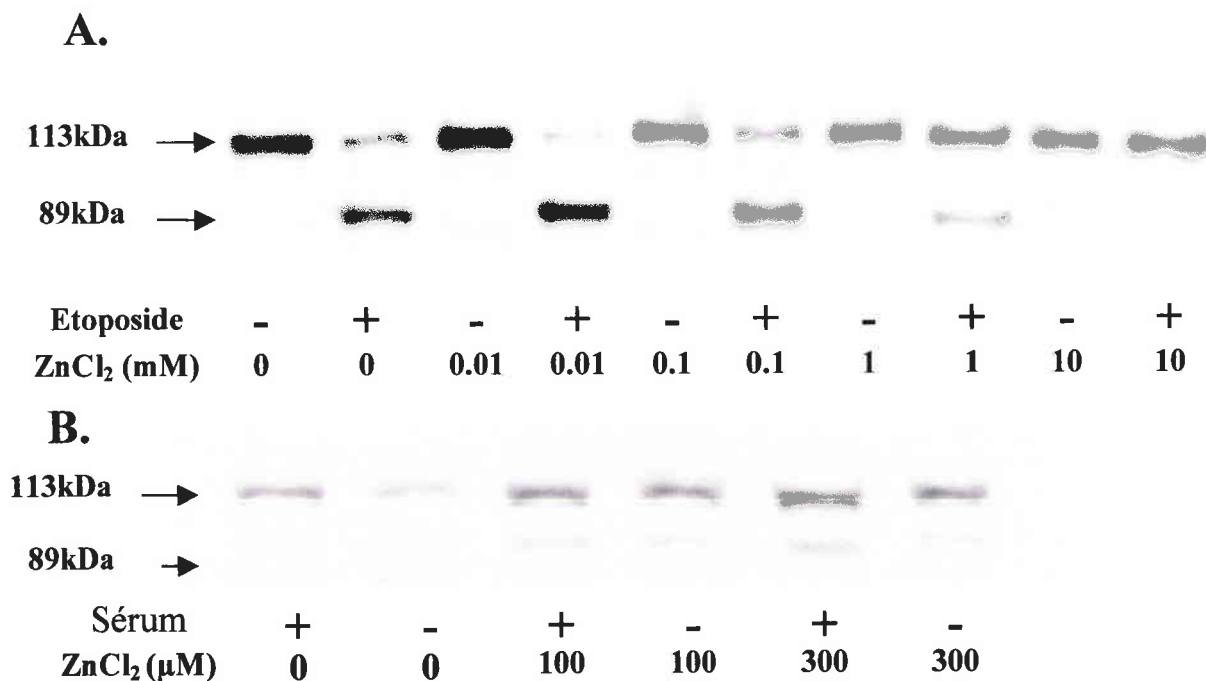


Figure 13. Détection en Western blot de l'inhibition du clivage de la PARP par ZnCl₂ dans les cellules HL60 exposées à l'étoposide (40 µg/mL) (A) et dans les cellules SHE privées de sérum (B) pendant 5 hr.

Stabilisation de la protéine P53

Le dosage de la protéine P53 n'a pas été appliqué aux cellules HL60, celles-ci étant *p53*-nulles. Les cellules SHE, quant à elles, montrent une stabilisation de la protéine après 3 h d'exposition à la camptothécine (0,4µg/mL). Un milieu sans sérum, par contre, est incapable d'induire une hausse de la quantité de protéine P53 (Fig. 11). La camptothécine à 0,8µg/mL, ainsi que l'étoposide (40µg/mL), produisent également la stabilisation de P53.

Expression du gène *myc*

L'expression du gène *myc* a été étudiée dans les cellules HL60 et SHE exposées durant 3 h à un milieu sans sérum ainsi qu'aux inhibiteurs de topoisomérases, l'étoposide et la camptothécine. Après 5 h de traitement, aucune des conditions testées n'affecte l'expression de *myc* dans les cellules HL60. De même, l'expression du gène reste stable dans les cellules SHE traitées par les inhibiteurs de topoisomérases. Par contre, une disparition complète des ARNm de *myc* est observée dans les cellules SHE privées de sérum (Fig. 12).

Effet du zinc sur l'apoptose

Le zinc est fréquemment rapporté comme étant un inhibiteur de l'apoptose. Dans cette étude, nous avons mis en évidence une action du ZnCl₂ sur la mort cellulaire des cellules SHE privées de sérum et des cellules HL60 traitées à l'étoposide. Dans ces deux cas, le zinc empêche la dégradation de la PARP (Fig. 13) et permet le maintien de la structure nucléaire des cellules soumises au stimulus inducteur d'apoptose ; ni condensation de la chromatine, ni fragmentation nucléaire ne sont observées.

Les cellules SHE, exposées à un milieu sans sérum, sont plus sensibles au zinc qui agit dès la concentration de 100µM. Une concentration minimale de 1mM est nécessaire pour l'inhibition de l'apoptose des cellules HL60, intoxiquées dans un milieu supplémenté en sérum.

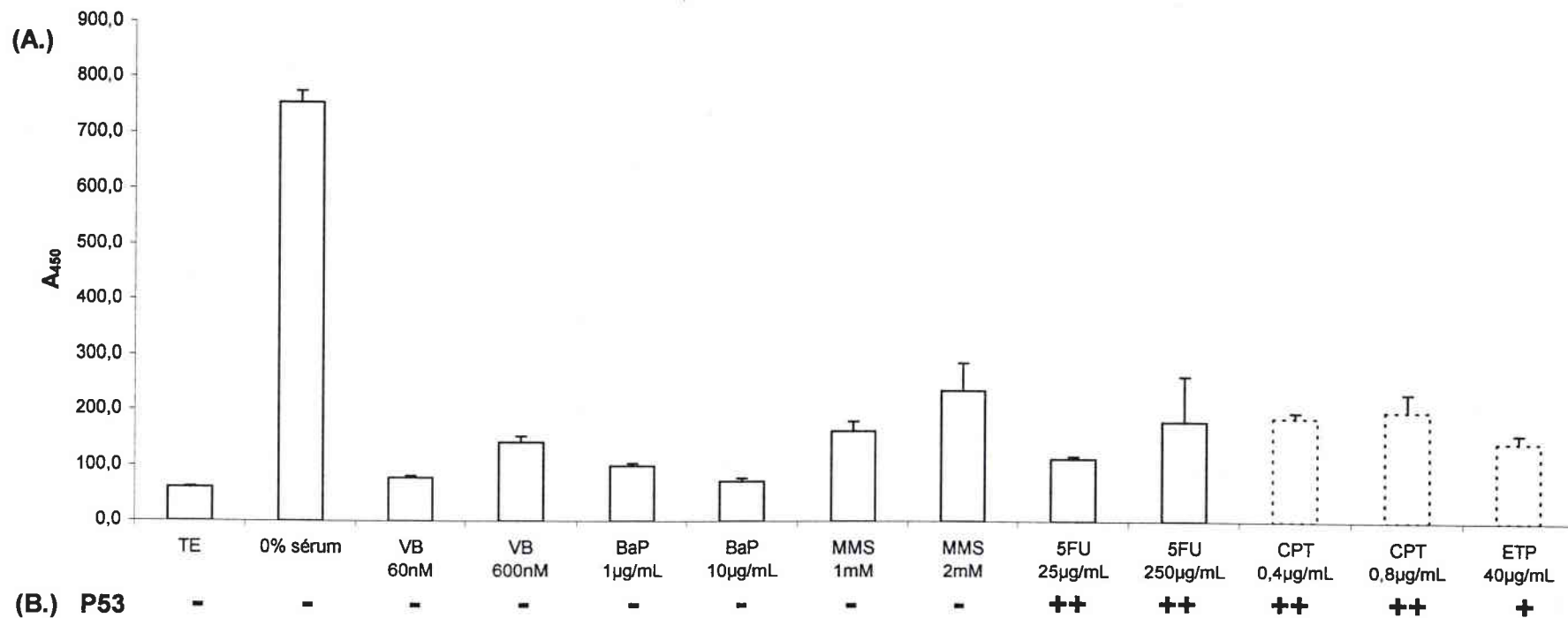


Figure 14. Fragments d'ADN, dans le milieu intracellulaire des cellules SHE exposées à un milieu sans sérum (0% sérum), à la vinblastine (VB), au benzo(a)pyrene (BaP), au méthyl méthane sulfonate (MMS) et au 5-fluorouracile (5FU), durant 5 h, en comparaison avec les cellules non traitées (TE) (A) ; les histogrammes en pointillés représentent le niveau de réponse que nous aurions pu observer avec une intoxication des cellules à la camptothécine (CPT) et à l'étoposide (ETP) sur la base des résultats observés précédemment avec ces deux substances. La quantification des fragments se fait par une méthode ELISA basée sur le marquage de l'ADN au BrdU et un dosage spectrophotométrique à 450 nm. Parallèlement, sont reprises les données concernant la stabilisation de la protéine p53 détectée en Western blot (B).

- : pas de stabilisation, + : stabilisation nette, ++ : stabilisation très nette.

Application d'autres agents apoptotiques sur les cellules SHE

D'autres produits ont été testés en tant qu'agents inducteurs d'apoptose sur les cellules SHE

- comme :
- la vinblastine (VB, 60 et 600nM),
 - le BaP (1 et 10 μ g/mL),
 - le méthyl méthane sulfonate (MMS, 1 et 2mM),
 - le 5-fluorouracile (5FU, 25 et 250 μ g/mL).

Les effets de ces agents ont été mis en évidence par la formation de fragments d'ADN détectés dans le milieu intracellulaire (Fig. 14A). En parallèle sont indiquées les mesures de stabilisation de P53 en Western blot (Fig. 14B). Les résultats montrent que les substances utilisées sont des inducteurs de l'apoptose moins puissants que le retrait des facteurs de croissance. Pour information, nous avons indiqué sur la figure les valeurs que nous serions supposées obtenir avec une exposition aux inhibiteurs de topoisomérases. Ces valeurs ont été déduites par rapport aux valeurs des cellules témoins et des cellules exposées au milieu sans sérum, relevées en parallèle. La stabilisation de la protéine P53 n'est observée que dans le cas d'une intoxication au 5FU et, comme nous l'avons vu précédemment, avec les inhibiteurs de topoisomérases.

Expression des gènes *bax* et *p21*

L'expression du gène *bax*, ainsi que l'expression du gène *p21*, deux gènes sous la dépendance principale de P53, ont également été visualisées dans les cellules SHE en relation avec l'exposition au milieu sans sérum et aux inhibiteurs de topoisomérases. Rappelons que la protéine Bax est un facteur inducteur de l'apoptose et que la protéine P21 participe à l'arrêt du cycle cellulaire. L'expression du gène *bax* ne semble pas en relation avec l'induction de l'apoptose en absence de sérum et n'est pas modifiée par l'application d'inhibiteurs de topoisomérases dans un traitement à court terme de 3 h (Fig. 15). L'expression de *p21*, par contre, est amplifiée dès 3 h d'intoxication à la camptothécine (0,4 μ g/mL) (Fig. 16). Une hausse de la quantité des ARNm de *p21* a également été retrouvée dans les cellules exposées à la camptothécine (0,8 μ g/mL) et à l'étoposide (40 μ g/mL). Une étude en cytométrie de flux des cellules exposées aux inhibiteurs de topoisomérases n'a par ailleurs montré aucun arrêt net du cycle cellulaire.

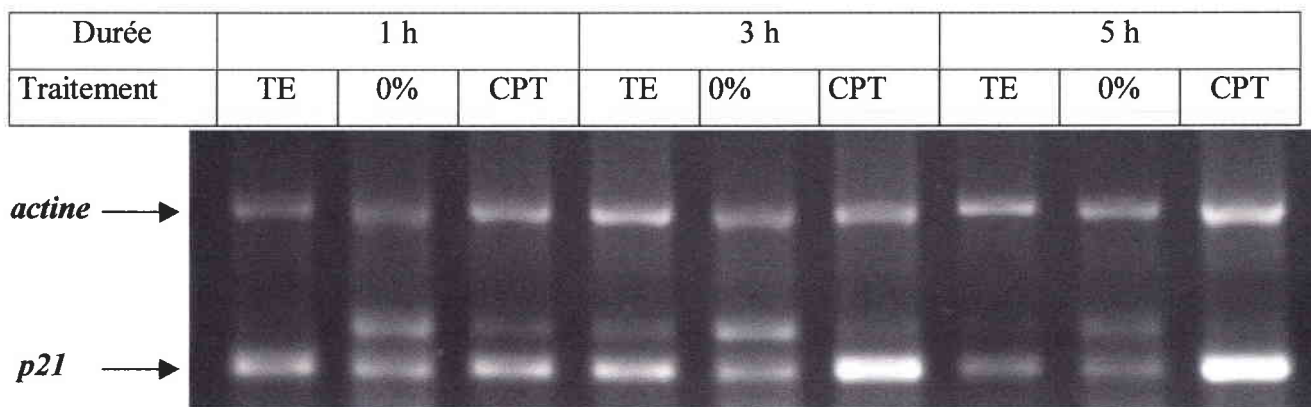


Figure 16. Détection de l'expression du gène *p21* et de l'*actine* en RT-PCR dans les cellules SHE exposées à un milieu sans sérum (0%) ou à la camptothécine 0,4 μ g/mL (CPT) durant 1, 3 ou 5 h, comparées aux cellules témoins (TE).

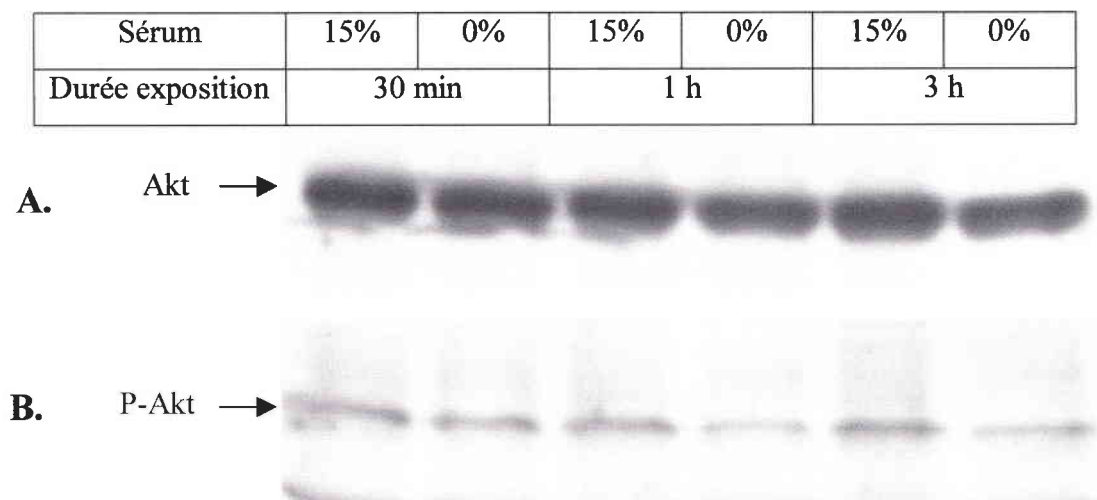


Figure 17. Détection en Western blot de la protéine Akt (A), et plus particulièrement de sa forme phosphorylée (B), dans les cellules SHE exposées à un milieu sans sérum pendant 30 min, 1 h ou 3 h.

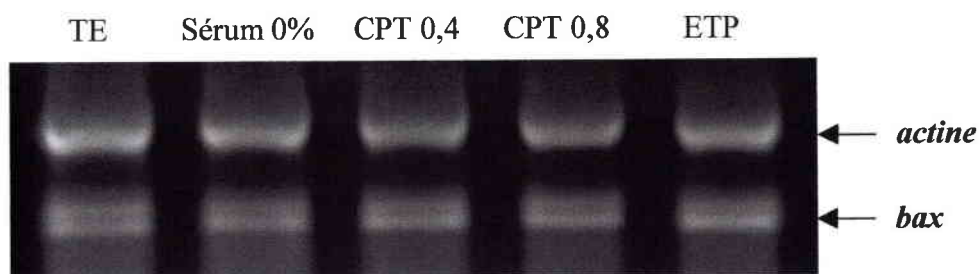


Figure 15. Détection des ARNm de *bax*, et de l'*actine* témoin interne de l'expression génique constitutive, par une technique de RT-PCR, dans les cellules SHE traitées 3 h par un milieu sans sérum (Sérum 0%), par la camptothécine à 0,4 μ g/mL (CPT 0,4) ou à 0,8 μ g/mL (CPT 0,8) ou par l'étoposide à 40 μ g/mL (ETP). Les cellules traitées sont comparées aux cellules sans traitement (TE).

Etude de la protéine Akt

L'étude de la protéine Akt des cellules SHE exposées à un milieu sans sérum pendant 30 min, 1 h et 3 h a été réalisée par une technique en Western blot. La phosphorylation de cette protéine indique son activation et, de ce fait, son activité anti-apoptotique. L'utilisation de l'anticorps anti-Akt, qui reconnaît la protéine quel que soit son état de phosphorylation, indique que les quantités de protéines Akt sont identiques dans les cellules traitées par le milieu sans sérum et dans les cellules témoins (Fig. 17A). L'application des anticorps anti-phospho-Akt, qui ne se fixent que sur la protéine phosphorylée, ne montre aucune différence entre les cellules cultivées à 15% de sérum et les cellules privées de sérum (Fig. 17B).

Le tableau X résume les principaux résultats obtenus concernant l'induction de l'apoptose dans les cellules SHE et HL60.

Discussion

Les résultats montrent que les cellules SHE et HL60 ne sont pas sensibles aux mêmes inducteurs d'apoptose. Les inhibiteurs de topoisomérases n'ont que peu d'effets sur les cellules SHE tandis qu'ils induisent une apoptose rapide dans les cellules HL60. Cette différence de sensibilité n'est pas expliquée par une variation dans la répartition des cellules au niveau du cycle cellulaire ; rappelons que les inhibiteurs de topoisomérases induisent préférentiellement l'apoptose sur les cellules en phase S (DelBino *et al.*, 1991 ; Larsen et Skladanowski, 1998).

Tableau X. Résumé des caractéristiques apoptotiques observées dans les deux types cellulaires, SHE et HL60.

	<i>Cellules SHE</i>		<i>Lignée HL60</i>	
	Privation de sérum	Inhibiteurs de topoisomérases	Privation de sérum	Inhibiteurs de topoisomérases
Apoptose	+++	+	+	+++
Morphologie nucléaire	Condensation de la chromatine Fragmentation nucléaire			
ADN	Fragments d'ADN détectés dans le milieu intracellulaire			
	Configuration des fragments d'ADN en "DNA Ladder"			
PARP	Disparition de la protéine Pas de fragment 89kDa		Clivage de la PARP avec apparition du fragment spécifique 89kDa	
caspase-3	Aucune activation	ND	ND	Activation
Stabilisation P53	-	+++	Lignée <i>p53</i> -nulle	
Expression <i>myc</i>	Inhibition	Stable	Stable	Stable
Expression de <i>p21</i>	Stable	Induite	ND	ND
Expression de <i>bax</i>	Stable	Stable	ND	ND
Phosphorylation Akt	Stable	ND	ND	ND

- : aucune induction ; + : faible induction ; +++ : forte induction ; ND : non déterminé.

Les cellules SHE entrent en apoptose immédiatement après un retrait de sérum ; la lignée HL60, par contre, semble peu dépendante des facteurs de croissance et aucun phénomène de mort cellulaire ne suit la privation de sérum. La faible induction de l'apoptose des cellules SHE par les autres substances chimiques testées (VB, BaP, MMS, 5FU) démontre que la plus grande résistance de ces cellules à la camptothécine et à l'étoposide, par rapport au retrait des facteurs de croissance, n'est pas inhérente à ce type de substances, inhibitrices des topoisomérases, mais se retrouve également avec l'application d'autres molécules chimiques.

En ce qui concerne la mise en évidence des phénomènes apoptotiques, les cellules SHE ne présentent pas les mêmes caractéristiques d'apoptose que les cellules HL60.

Exposées à l'étoposide, la lignée des cellules **HL60** répond positivement à tous les tests classiques de mesure d'apoptose utilisés dans cette étude. On observe dans ce type cellulaire des modifications de la morphologie nucléaire, des fragments intracellulaires d'ADN, une configuration en barreaux d'échelle de ces fragments après migration en gel d'agarose, un clivage de la PARP avec un fragment 89kDa spécifique de l'apoptose et une activation de la caspase-3.

L'apoptose des cellules **SHE** est caractérisée par les modifications de la morphologie nucléaire ainsi que par la fragmentation spécifique de l'ADN ; par contre, la PARP disparaît des cellules en apoptose sans fournir de fragment 89kDa détectable et l'activité de la caspase-3 reste stable durant le processus apoptotique.

Le zinc sous forme de chlorure induit une inhibition des phénomènes liés à l'apoptose dans les deux types cellulaires.

Les cellules HL60 exposées aux inhibiteurs de topoisomérases ou à un milieu sans sérum ne montrent pas de modification de l'expression de *myc*. Le processus d'apoptose de ces cellules n'est pas non plus lié à une activité de la protéine P53, cette lignée étant *p53*-nulle.

La privation de sérum induit chez les cellules SHE une inhibition de l'expression du gène *myc*; mais aucune stabilisation de la protéine P53, aucune déphosphorylation de Akt, ni de modification dans l'expression des gènes *bax* et *p21* n'est observée. Les inhibiteurs de topoisomérases ne semblent pas influencer sur *bax*. Par contre, ils induisent une stabilisation de P53, qui est suivie d'une induction de l'expression de *p21*, ce qui confirme le caractère sauvage fonctionnel de la protéine P53.

En conclusion de cette première partie, nous pouvons dire que les cellules SHE ne réagissent pas de la même façon que la lignée HL60 aux inducteurs de l'apoptose. Les cellules SHE sont très sensibles au retrait des facteurs de croissance et sont peu affectées par les substances chimiques testées. L'exposition de ces cellules à un milieu sans sérum conduit à une apoptose rapide caractérisée par des modifications de la morphologie nucléaire, une fragmentation de l'ADN spécifique de l'apoptose, une inhibition de l'expression du gène myc. Par contre, l'apoptose ne peut être détectée ni par la présence du fragment 89kDa de la PARP, ni par une activation de la caspase-3, ni par la stabilisation de P53, et ni par des modifications dans l'expression des gènes bax et p21.

Ainsi, la détection de l'apoptose ne peut se faire que par l'association de différents critères et il est dangereux de ne se fier qu'à un seul paramètre. En effet, certains éléments reportés comme caractéristiques de l'apoptose dans la plupart des cellules, et notamment dans la lignée HL60, ne sont pas mis en évidence dans d'autres types cellulaires comme nous pouvons le voir ici pour le fragment 89kDa de la PARP ou l'activation de la caspase-3 que l'on ne retrouve pas dans les cellules SHE en apoptose.

Le zinc, sous forme de chlorure, s'est confirmé inhiber le processus apoptotique des cellules SHE privées de sérum et des cellules HL60 exposées aux inhibiteurs de topoisomérases.

Detection of Apoptosis Induced by Topoisomerase Inhibitors and Serum Deprivation in Syrian Hamster Embryo Cells

S. Alexandre,* C. Rast,* G. Nguyen-Ba,† and P. Vasseur,*¹

*Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz, F-57070 Metz Cedex, France; and †Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS-URA 1218, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, F-92290 Châtenay-Malabry, France

The sensitivity of normal diploid Syrian hamster embryo (SHE) cells to apoptosis was tested after treatment with the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide and after serum withdrawal. Programmed cell death (PCD) was identified through morphological, biochemical, and molecular changes and compared with that of HL60 cell line. The results showed that topoisomerase inhibitors, which were shown to be potent PCD inducers in the HL60 cell line, induced a weaker apoptotic response in SHE cells than after growth factor deprivation. In addition, serum-free medium, which rapidly induced apoptosis in SHE cells, did not affect the HL60 cell line. In both cell types, PCD was expressed by condensed chromatin, fragmented nuclei, and DNA laddering on electrophoretic gels, an indisputable sign of apoptosis. In apoptotic HL60 cells, the cleavage of 113-kDa poly-(ADP-ribose)polymerase (PARP) resulted in the so-called apoptotic 89-kDa fragment and was associated with increased caspase-3 activity. In apoptotic SHE cells, PARP degraded early but the degradation profile was not characterized by the appearance of an 89-kDa fragment. Moreover, no activation of caspase-3 was noted. ZnCl₂, which is known to prevent protease activity responsible for apoptosis features, inhibited PARP cleavage and nuclear modifications induced by apoptotic stimuli in both cell types, but with a higher sensitivity in SHE cells. Apoptosis induced by serum deprivation was linked with *c-myc* negative regulation in SHE cells, but not with p53 protein accumulation, while topoisomerase inhibitors led to p53 stabilization without any change in *c-myc* expression. Serum-free medium and topoisomerase inhibitors did not modify *c-myc* expression in the HL60 cell line. The overall results demonstrated that apoptosis, which is a carefully regulated process of cell death, may proceed through mechanisms varying according to cell type or apoptosis inducer. In addition, markers which are generally considered hallmarks of apoptosis may fail to appear in some cell types. © 2000 Academic Press

Key Words: normal cells; etoposide; camptothecin; PARP; caspase-3 activity; *c-myc*; p53.

INTRODUCTION

Apoptosis, a cell suicide pathway, not only occurs naturally during cell development and differentiation, but also acts to eliminate damaged cells after injury [1]. Various stimuli can induce the apoptotic process in cultured cells, including the withdrawal of growth factors, ionizing irradiation, and treatment with DNA-damaging agents like topoisomerase inhibitors [2]. As alterations in cell survival are known to contribute to the pathogenesis of a number of human diseases, including neurodegenerative disorders, autoimmune diseases, and cancer [3], human cell lines are widely used to study the apoptotic process. One example is the HL60 cell line on account of its high sensitivity to apoptotic chemical stimuli [4–6]. In contrast, little is known about this process in normal cells, which have been less extensively investigated [7], despite interest in the study of the dysregulation of the carefully controlled mechanisms of cell death.

In this study, we investigated apoptosis in primary Syrian hamster embryo (SHE) cells, which are normal, diploid, and genetically stable. Indeed, this model is recommended for detecting carcinogenicity expressed *in vitro* by SHE cell transformation [8]. A relationship had been shown between spontaneous transformation and senescence by Endo *et al.* [9]. The hypothesis that neoplastic transformation could result from impairments in normal cell death processes as well as cell proliferation deregulation [10–13] led us to study the sensitivity of SHE cells to apoptosis. This is the first step in elucidating the relationship between programmed cell death and SHE cell transformation.

Apoptosis was compared in primary SHE cells and the HL60 cell line using various techniques based on morphological, molecular, and biochemical changes related to the apoptotic process. Nuclear condensation and fragmentation, which are part of the early events of apoptosis [14], were evaluated by fluorescence mi-

¹ To whom correspondence should be addressed at the Centre des Sciences de l'Environnement EBSE, Faculté des Sciences, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France. Fax: (33) 3 87 39 96 99.

scopy observations of cells labeled with acridine orange. Nuclear modifications characteristic of apoptosis are associated with the cleavage of DNA in the internucleosomal region leading to fragments which are multiples of units comprising 180–200 bp. This results in a specific pattern of fragmentation named a “DNA ladder” produced by standard agarose gel electrophoresis, which allows us to unequivocally recognize the apoptotic process [15]. The leakage of DNA fragments into extracellular compartments was studied to identify necrosis. A BrdU-labeling of DNA and an ELISA detection of DNA fragmentation were used to quantify the intracellular apoptotic fragments and the fragments released in the supernatant due to cytotoxicity.

Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) has been shown to be a key participant in DNA base excision repair and in the maintenance of genome [16, 17]. In most cell types, programmed cell death is accompanied by an early and unique cleavage of PARP into 89- and 24-kDa fragments which contain the active site and the DNA-binding domain of the enzyme, respectively. The PARP 89-kDa fragment detected in Western blot is used extensively as a hallmark of apoptosis [18–20]. Another specific feature is the cascade of protease activation required for apoptosis to be executed. Caspase-3 is one of these activated death proteases, which acts at the nuclear level and catalyzes the specific cleavage of many key cellular proteins, including PARP. As caspase-3 plays a central role in mediating nuclear apoptosis [21], its activity was evaluated in this study, in correlation with PARP cleavage. Caspase-3 activity has recently been demonstrated to be inhibited by Zn^{2+} , a well-known negative regulator of apoptosis [22]. Therefore, the influence of $ZnCl_2$ was also tested on PARP proteolysis and on the nuclear modifications associated with apoptosis in SHE primary cells and the HL60 cell line.

p53 and *c-myc* were investigated to better understand the mechanism of apoptosis. The p53 tumor-suppressor gene product is a member of the DNA damage-response pathway. After cellular stress-induced stabilization and activation, the p53 protein regulates the transcription of a number of genes leading to cell cycle arrest and/or to apoptosis [23]. The accumulation of this protein was revealed through Western blot analysis.

c-Myc, in addition to its role as a competence factor for proliferation, has also been shown to regulate apoptosis in some cell types. In the continual presence of growth factors, basal *c-myc* expression remains stable throughout the cell cycle. To achieve functional c-Myc activity within the cell, active and continuous synthesis of both *c-myc* RNA and protein is required [24]. The RT-PCR process allowed us to check modifications in *c-myc* mRNA production.

Apoptosis was induced with the topoisomerase inhibitors etoposide and camptothecin and by means of serum deprivation.

MATERIALS AND METHODS

Cell cultures and treatments. SHE primary cell cultures were prepared from 13-day-old golden Syrian hamster embryos, as described by Elias *et al.* [25] and were stored in liquid nitrogen. Only two-passage cells were used in this study. Normal culture conditions for these cells are DMEM (Gibco BRL), pH 7.0, supplemented with 15% fetal calf serum (FCS) (Hyclone) and 10% CO_2 . After thawing, passage-1 primary SHE cells were precultured until confluent. Cells were then trypsinized and treated during reseeding. Human Caucasian promyelocytic leukemia cells (HL60) provided by the European Collection of Cell Cultures (ECACC No. 98070106) were kept in RPMI medium (Sigma-Aldrich) containing 10% FCS and 5% CO_2 . The HL60 cell suspension was diluted with fresh medium just before treatment. The apoptosis inducers etoposide and camptothecin were obtained from Sigma-Aldrich.

Fluorescence microscopy. After treatment, the cells and the culture media were harvested and centrifuged at 250g for 10 min. Cell pellets were stained with acridine orange (0.15 mg/ml) and ethidium bromide (0.25 mg/ml in PBS) fluorescent probes 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 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 conducted in duplicate and repeated in at least three independent series of assays.

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 17 h, cells were reseeded into a microplate (10^5 cells/well) and treated for 5 or 24 h. Supernatant and cell lysate were transferred 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 markers of cytotoxicity. Each condition was tested twice in at least three independent experiments.

Western blot analysis of PARP and p53 proteins. After treatment, cells were harvested, divided in two aliquots, and centrifuged at 1000g for 10 min. One of the two pellets was used for protein quantification and was resuspended in 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 a 30-min incubation in ice, insoluble materials were eliminated by a 30-min centrifugation at 10,000g. Protein concentrations were measured using the Bio-Rad DC protein assay. The other pellet was resuspended in loading buffer (62.5 mM Tris, pH 6.8; 6 M urea; 10% glycerol; 2% SDS; 0.003% bromophenol blue; 5% 2-mercaptoethanol) and subjected to ultrasonic treatment to extract and solubilize PARP and p53. Equal amounts of proteins from the different samples were resolved in 8% SDS-polyacrylamide gel by electrophoresis. Samples were electrophoretically transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (polyscreen PVDF transfer membrane; NEN Research Products). All further steps were carried out at room temperature. Protein binding sites were saturated with 5% powdered nonfat milk in PBS supplemented with Tween 0.1% (PBS-MT) for 1 h. The sheets were incubated for 1 night with polyclonal mouse antibodies against human PARP C-2-10 (1:10,000) or 2 h with mouse anti-human p53 (DO7; Dako) (1:1000) in PBS-MT followed by a 1-h exposure to

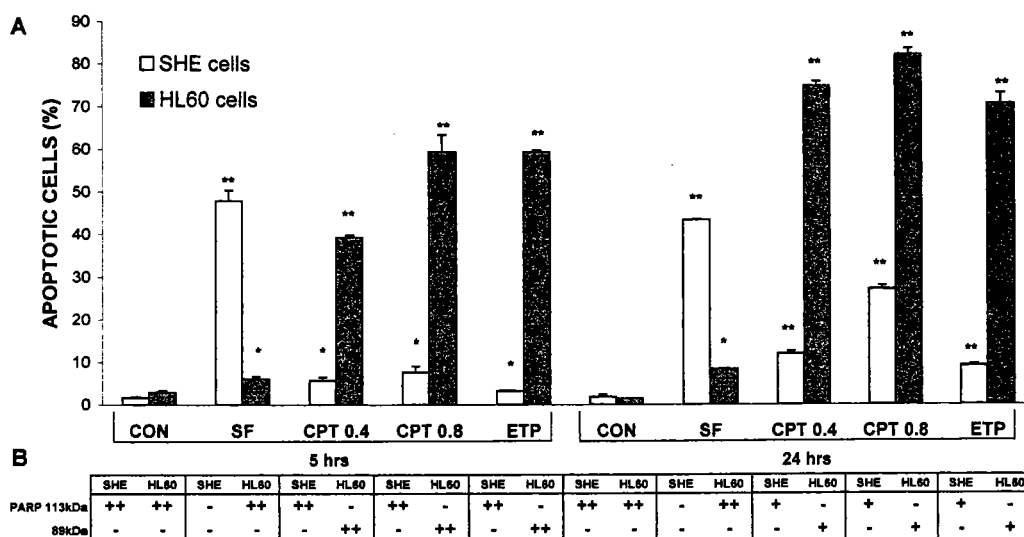


FIG. 1. Apoptosis induction quantified by nuclear modifications observed under a fluorescence microscope in SHE and HL60 cells stained with acridine orange (A) in parallel with Western blot of the 113-kDa PARP protein and of its 89-kDa fragment (B). Treated cells were exposed to serum-free medium (SF), camptothecin 0.4 $\mu\text{g/ml}$ (CPT 0.4), camptothecin 0.8 $\mu\text{g/ml}$ (CPT 0.8), and etoposide 40 $\mu\text{g/ml}$ (ETP) for 5 and 24 h and compared to control cells (CON). Results significantly different from the respective controls: * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

horseradish peroxidase goat antibodies against mouse IgG (1:50,000) (Sigma-Aldrich) in PBS-MT. Peroxidase activity was detected with a chemiluminescence reaction developed using the luminol system (Renaissance; NEN Research Products). Anti-PARP monoclonal antibody C-2-10, kindly provided by G. Poirier, recognizes an epitope in the DNA-binding domain of PARP between amino acids 216 and 375, and it is currently used on HL60 to detect PARP (113 kDa) as well as its apoptotic fragment (89 kDa). In preliminary studies, the C-2-10 anti-PARP antibody was demonstrated to react also with the entire PARP of SHE cells.

Detection of DNA ladder by gel electrophoresis. The purification of fragmented and nonfragmented 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 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide. Labeled DNA was visualized by UV illumination.

Caspase-3 activity. This activity was measured using the fluorometric immunosorbent enzyme assay (FIENA) with the Caspase-3 Activity Assay kit (Roche Molecular Biochemicals). Cells were harvested, centrifuged at 1000g, and incubated in a lysis buffer. After a 1800g centrifugation, supernatant was added into an anti-caspase-3-precoated microtiter plate for a 1-h incubation. Activated caspase-3 converts substrate solution (Ac-DEVD-AFC) into a product (AFC) measured by fluorescence (380/538 nm).

RNA isolation and RT-PCR analysis. Total RNA was extracted from cells with Extract-All solution (Eurobio) and cDNA was synthesized from 1 μg of total RNA using oligo(dT)₁₆ as a primer and MuLV reverse transcriptase (50 U) (Perkin-Elmer). cDNA samples were subjected to PCR amplification using the Perkin-Elmer kit with *c-myc* primers specific to the HL60 cell line or the SHE cell sequence, *GAPDH* primers as an internal control for SHE cells, and *actin* primers as an internal control for the HL60 cell line. The annealing temperature was 55°C and the primers used were (1) hamster *c-myc*, GATCAGCTGSAGATGRTGACC and TTGCGGTTGTTGCTGATCTG (product 731 bp); (2) human *c-myc*, ACTATGACCTCGACTACGACTC and CTGCAGGTACARGCTGGAGGTG (product 509 bp); (3)

actin, GGAYGAYATGGAGAARATCTGG and CCTGYTTGCTGAYC-CACATCTG (product 845 bp); (4) *GAPDH*, TCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG and GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC (product 377 bp).

Statistical analysis. The statistical differences in the number of apoptotic cells and DNA fragmentation between the control and the treated cells were tested with the Student *t* test.

RESULTS

Sensitivity of HL60 and SHE Cells to Apoptosis Inducers

Cells cultured in serum-free medium or exposed to camptothecin and etoposide for 5 or 24 h were analyzed using fluorescence microscopy to detect chromatin condensation and nuclear fragmentation. It appeared that the behavior of the two cell types exposed to the apoptosis inducers differed according to the treatment applied (Fig. 1A). Around 50% of SHE cells underwent apoptosis after 5 h in a serum-free medium, while HL60 cells were only weakly affected by a starvation of growth factors, even after a 24-h treatment (less than 8% apoptosis).

In contrast, topoisomerase inhibitors rapidly induced apoptosis in HL60 cells, with 40 to 60% apoptotic cells after 5 h and more than 70% after 24 h. On the other hand, the number of apoptotic SHE cells was below 8% with camptothecin or etoposide after 5 h of treatment. After 24 h, the influence of topoisomerase inhibitors, particularly camptothecin, was more noticeable. Yet, the number of apoptotic cells (27%) after 24 h of exposure to 0.8 $\mu\text{g/ml}$ camptothecin remained low compared with the number produced by a lack of serum

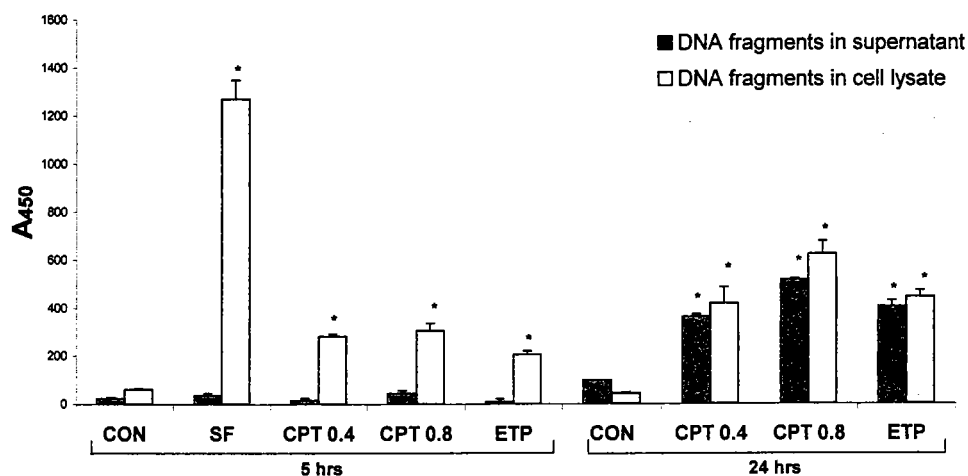


FIG. 2. DNA fragmentation measured by the Cellular DNA Fragmentation ELISA kit in SHE cells exposed to serum-free medium (SF), camptothecin 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CPT 0.4), camptothecin 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CPT 0.8), and etoposide 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ETP), for 5 and 24 h, versus untreated cells (CON). The method based on BrdU labeling of DNA allowed the spectrophotometric quantification (450 nm) of fragments in cell lysate (intracellular fragments) and in supernatant medium due to membrane disruption. *Results significantly different from the respective control ($P < 0.01$).

in SHE cells or by topoisomerase inhibitors in HL60 cells.

The cleavage of PARP in HL60 and the appearance of an 89-kDa PARP fragment paralleled the development of apoptotic features which were observed using fluorescence microscopy (Fig. 1B). After a 5-h treatment with camptothecin or etoposide, PARP 113-kDa completely disappeared and only the 89-kDa fragment was visible. With serum-free medium, no alteration of the PARP 113-kDa signal was noted.

On the other hand, in serum-starved SHE cells, the 113-kDa band totally disappeared after 5 h of treatment, but neither the 89-kDa fragment nor any other fragment was detected. The effects of topoisomerase inhibitors did not modify the PARP signal after 5 h; after a 24-h exposure, the PARP 113-kDa band seemed less intense but no fragment resulting from PARP cleavage could be visualized.

DNA fragmentation was measured in SHE cell lysate and in the supernatant using BrdU labeling of DNA, in order to discriminate an apoptotic process from necrosis (Fig. 2). After 5 h, DNA fragmentation measured in the intracellular compartment confirmed the results of fluorescence microscopic observations, with a high signal under serum-free conditions and a weak fragmentation after treatment with topoisomerase inhibitors. Only apoptosis was detected after a 5-h exposure, as no increase in extracellular DNA fragments was recorded. After 24 h of treatment with camptothecin or etoposide, the number of necrotic cells had increased to the same order of magnitude as apoptotic cells.

Early Detection of Apoptosis

The progression of apoptosis during the first 5 h of treatment was investigated in depth in serum-deprived SHE cells and in 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ etoposide-treated HL60. Nuclear modifications (Fig. 3) appeared rapidly in SHE cells, which underwent 28% apoptosis after 1 h, while the percentage of apoptotic cells increased to 43 and 55% after 3 and 5 h, respectively. Apoptosis was later initiated in etoposide-treated HL60 cells and progressed mainly between 3 (18%) and 5 h (67%).

In HL60 cells exposed to etoposide, the 89-kDa fragment was recorded after 3 h while 113-kDa PARP was still visible. After 5 h, intact PARP almost entirely disappeared and was replaced by the 89-kDa apoptotic fragment (Fig. 4A). No decrease in the PARP signal of SHE cells was detected after 1 h without serum. After 3 h of treatment, the 113-kDa band had slightly diminished, and totally disappeared after 5 h. No other signal than that of the 113-kDa was detectable (Fig. 4B). The DNA fragmentation ladder pattern was clear in both HL60 and SHE cells after 5 h and confirmed the occurrence of an apoptotic process (Fig. 5). This pattern of fragmentation was already visible in HL60 after 3 h.

Caspase-3 Activity

HL60 exposed to etoposide presented a high caspase-3 activity, more intense after 3 h than after 5 h of treatment (Table 1). In contrast, no activity was detected in serum-starved SHE cells however long the exposure time. No activity was found after either 1 or 2 h (data not shown).

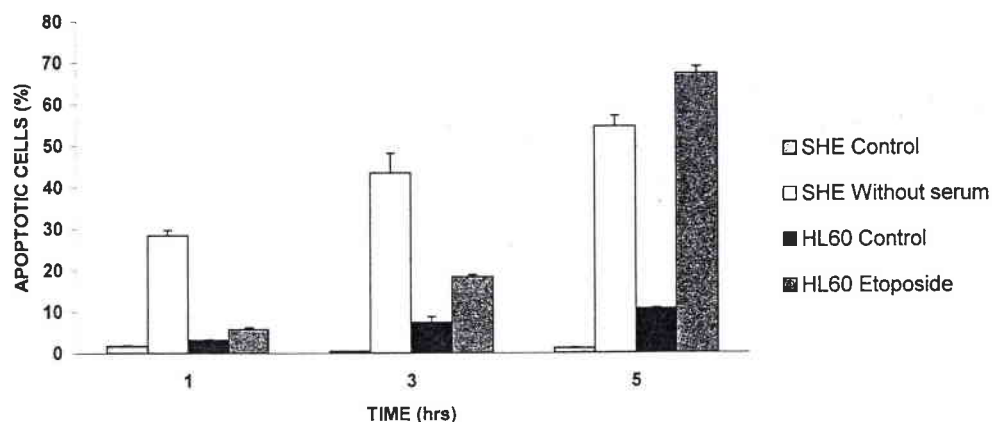


FIG. 3. Early detection of apoptosis by fluorescence microscopy in serum-deprived SHE cells and HL60 cells exposed to 40 $\mu\text{g/ml}$ etoposide over 1, 3, and 5 h.

ZnCl₂ Inhibition of Apoptosis

ZnCl₂ was added at the beginning of treatment, consisting in serum-free medium in SHE cells and etoposide in HL60 cells, for 5 h. PARP proteolysis and nuclear modifications were investigated. ZnCl₂ induced no change of PARP signal in untreated HL60 or SHE cells, while it clearly reduced PARP cleavage in treated cells (Fig. 6). In etoposide-treated HL60, the 89-kDa fragment became less visible and did not appear at 1 and 10 mM

ZnCl₂, respectively (Fig. 6A). These two concentrations dramatically decreased in a dose-dependent manner the number of apoptotic HL60 cells, which were simultaneously exposed to etoposide (Table 2). Concentrations of 10 and 100 μM ZnCl₂ were much less effective.

SHE cells were more sensitive than HL60 to ZnCl₂ treatment, which appeared toxic at concentrations above 100 μM . One hundred micromolar ZnCl₂ was shown to prevent PARP degradation (Fig. 6B) and to

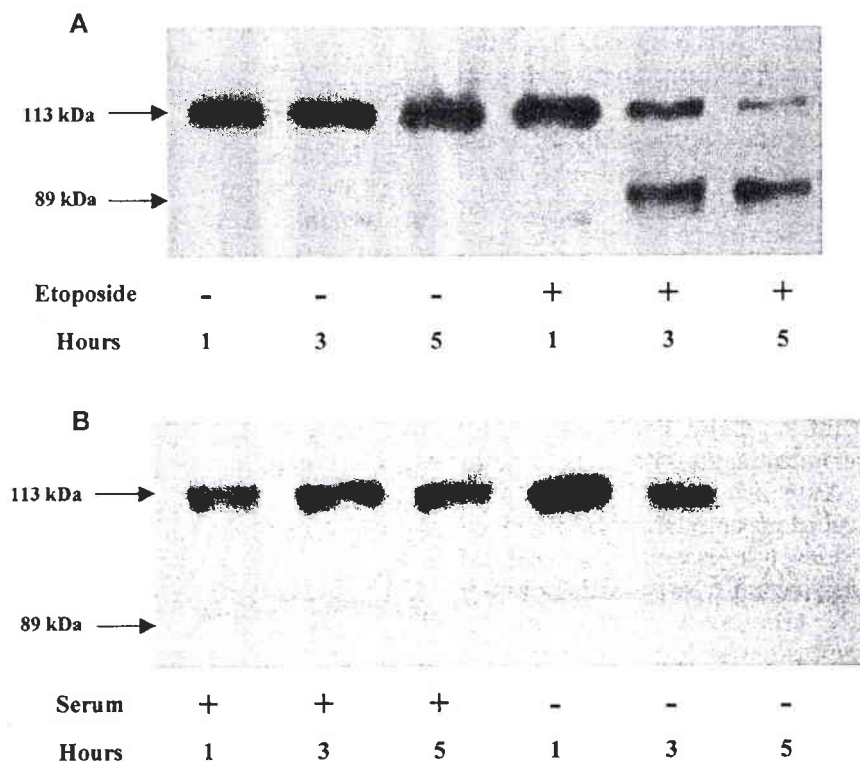


FIG. 4. Detection of PARP and of its apoptotic fragment in HL60 cells exposed to 40 $\mu\text{g/ml}$ etoposide (A) and in serum-deprived SHE cells (B) for 1, 3, and 5 h. PARP and the 89-kDa fragment were analyzed by Western blotting using the monoclonal anti-PARP antibody C-2-10.

Cell type	HL60 cells				SHE cells			
	CON	ETP	ETP	ETP	CON	SF	SF	SF
Exposition								
Hours	5	1	3	5	5	1	3	5

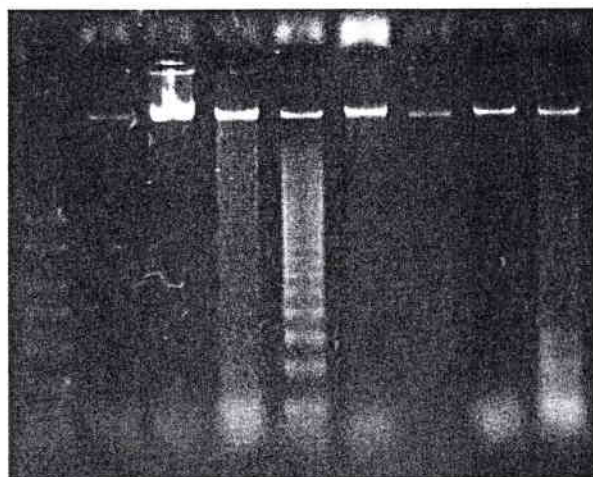


FIG. 5. Agarose gel electrophoresis of fragmented DNA in HL60 cells exposed to 40 $\mu\text{g/ml}$ etoposide (ETP) and in serum-deprived SHE cells (SF) for 1, 3, and 5 h versus the corresponding control (CON) after 5 h. DNA was prepared using a Suicide-Track DNA Ladder Isolation kit (Oncogene).

totally suppress the development of apoptosis triggered by serum deprivation. No nuclear condensation and fragmentation was observed in serum-starved SHE cells (Table 2).

p53 Protein Stabilization

p53 levels were investigated using Western blot analysis in SHE cells exposed to serum-free medium or camptothecin (0.4 $\mu\text{g/ml}$) for 1 to 5 h (Fig. 7). HL60 cells were not included in these experiments because of their *p53*-null status [26]. *p53* protein was not detectable either in untreated cells or in serum-deprived cells. On the other hand, camptothecin caused the levels of *p53* to increase substantially with time and this increase was detectable from 3 h after the administration of the chemical. Exposure to camptothecin (0.8 $\mu\text{g/ml}$) or etoposide (40 $\mu\text{g/ml}$) also induced *p53* stabilization after 5 h (data not shown).

c-myc Expression

We examined *c-myc* expression during the apoptosis process (Fig. 8). Cells were harvested 3 h after treatment and *c-myc* mRNA was analyzed by reverse transcription and a polymerase chain reaction (RT-PCR). Both control cells exhibited a basal rate of *c-myc* mRNA. In the HL60 cell line, no change was observed in *c-myc* expression whatever the treatment used, whether serum deprivation or topoisomerase inhibitors. The results obtained

from SHE cells indicated that only serum deprivation induced a *c-myc* repression.

DISCUSSION

In this study, apoptosis was explored in SHE primary cells using complementary techniques and with the HL60 cell line, a well-described model, for comparison. Chromatin condensation and nuclear fragmentation were detected with microscopic examination using fluorescent probes. The DNA-ladder pattern allowed us to unequivocally identify apoptosis in the treated SHE and HL60 cells. The results demonstrated a rapid induction of apoptosis, within the first 5 h of treatment, in serum-deprived primary SHE cells but not in the cell line. On the other hand, the topoisomerase inhibitors camptothecin and etoposide induced a rapid HL60 apoptosis, but had a much slower effect on SHE cells. At the same time, controls of membrane integrity did not show any permeabilization to ethidium bromide and DNA fragments. Therefore necrosis, which may share some morphological features of cell death, could be excluded. Topoisomerase inhibitors are known to selectively induce apoptosis in replicating cells, camptothecin exerting its main killing activity on cells in S phase [27, 28]. Cell cycle analysis by flow cytometry showed that the repartition of SHE cells in G_1 , S, and G_2/M phases (56, 31, and 13%) was close to that of the HL60 cell line (54, 38, and 8%). Therefore, the lower sensitivity of SHE cells to topoisomerase inhibitors cannot be explained by the cell cycle distribution.

After 3 h of treatment with etoposide on HL60 cells, nuclear modifications and DNA and PARP degradation were observed and also increased after 5 h. In serum-deficient SHE cells, chromatin condensation and nuclear fragmentation appeared after 1 h, preceding a decrease in the PARP 113-kDa signal and the DNA-ladder pattern, which could be detected after 3 and 5 h of exposure, respectively. Apoptosis induced in etoposide-exposed HL60 cells and in serum-deprived SHE cells appeared globally at the same time and presented

TABLE 1

Caspase-3-Specific Activity Expressed in Relative Fluorescence Units after 3, 4, or 5 h Exposure of HL60 Cells to 40 $\mu\text{g/ml}$ Etoposide and of SHE Cells to Serum-Free Medium

Time of exposure	HL60 cells		SHE cells	
	Control	Etoposide	Control	Serum-free
3 h	2107	7443	1057	1148
4 h	1888	4346	1240	1282
5 h	1494	2464	1031	1154

Note. The activity was measured using a FIENA method as described under Materials and Methods.

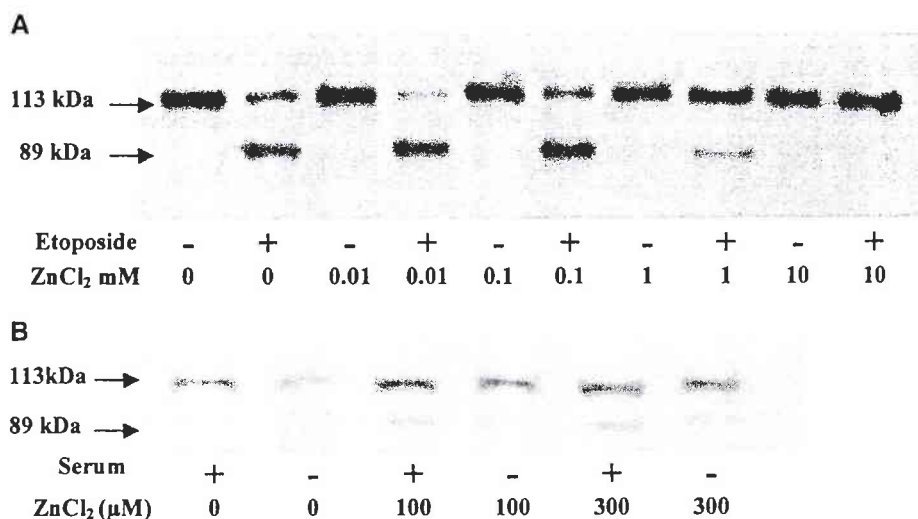


FIG. 6. Western blot detection of PARP cleavage inhibition by ZnCl₂ in HL60 cells exposed to etoposide (40 µg/ml) (A) and serum-starved SHE cells (B) for 5 hrs.

FIG. 6. Western blot detection of PARP cleavage inhibition by ZnCl₂ in HL60 cells exposed to etoposide (40 µg/ml) (A) and SHE cells serum starved (B) for 5 h.

the classic characteristics of programmed cell death (PCD), i.e., morphological changes and DNA fragmentation. Usually, serum deprivation is a routine approach for synchronizing cells in G₀ [29]. SHE cells under serum-deprived conditions did not enter quiescence and underwent apoptosis directly. No external factor was present to explain this SHE cell response. This rapid PCD after serum withdrawal had already been observed in normal cells like AKR-2B mouse fibroblasts [30] and the Balb/c3T3 cell line [31] and in transformed cells such as PC12 pheochromocytoma cell line [32] or A549 lung carcinoma cell line [33].

TABLE 2

Apoptosis Inhibition by ZnCl₂ in HL60 Cells Exposed to 40 µg/ml Etoposide and in Serum-Deprived SHE Cells after 5 h of Treatment

ZnCl ₂	HL60		SHE	
	Control	Etoposide	Control	Serum free
0	2.9 ± 1.2	60.9 ± 5.90	5.2 ± 0.52	44.7 ± 4.39
100 µM	—	—	4.0 ± 1.28	0.3 ± 0.42
300 µM	—	—	8.3 ± 3.54	Tox.
1 mM	1.0 ± 0.70	9.7 ± 5.56	Tox.	Tox.
10 mM	2.4 ± 0.96	1.0 ± 1.41	Tox.	Tox.

Note. ZnCl₂ was added at the beginning of treatment and results were expressed as a percentage of acridine orange-labeled cells containing condensed or fragmented nuclei observed under a fluorescence microscope. —, non-determined values; Tox., toxic concentrations.

Differences in the expression of apoptosis induced with DNA-damaging agents or with serum withdrawal induction, which were noted in a few studies, could not be found here. In the human lung carcinoma cell line A549, serum deprivation led to condensed chromatin, but not to the nuclei fragmentation observed in etoposide-treated cells [33]. Simm *et al.* [30] mentioned the precocity of morphological changes in apoptotic serum-deprived AKR-2B mouse fibroblasts, like in the present study, but did not observe DNA fragmentation following nuclear condensation. These authors presumed that stress-induced apoptosis is subject to considerable cell-type specificity and that apoptosis occurs through different pathways involving different mediators depending on the apoptosis-inducing agents [32]. Our results support this hypothesis on the variability of the response in different cell types. While apoptotic SHE cells failed to present some of the characteristic features of PCD, apoptosis in HL60 cells totally followed the canonical pathways of

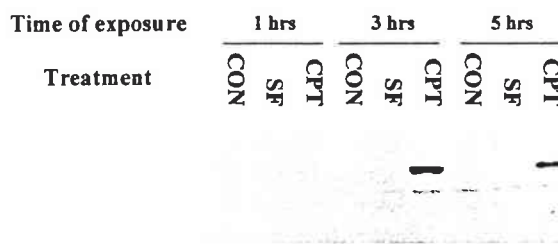


FIG. 7. Western blot analysis of p53 stabilization in SHE cells treated with serum-free medium (SF) or camptothecin 0.4 µg/ml (CPT) versus control cells (CON) for 1, 3, or 5 h.

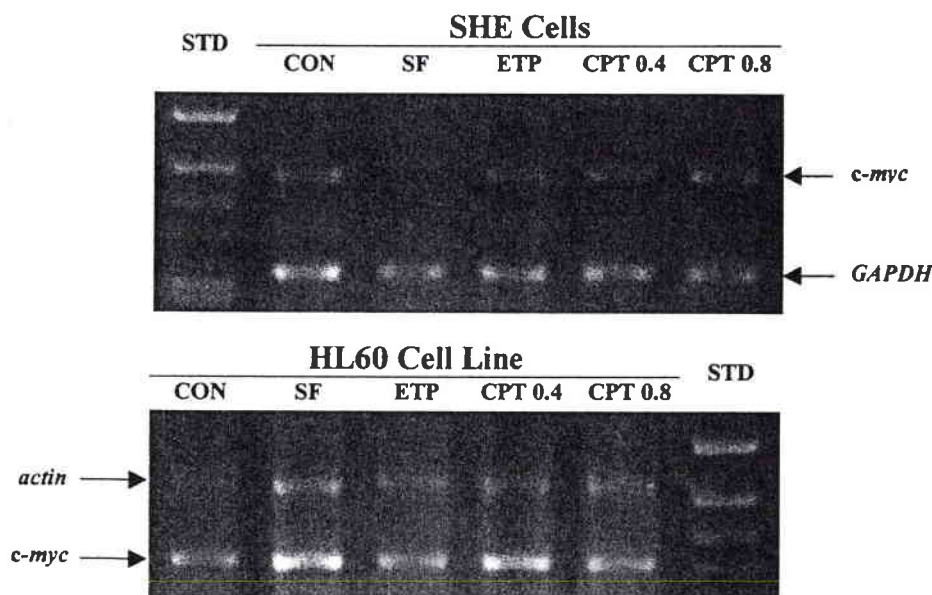


FIG. 8. RT-PCR analyses of *c-myc* expression in SHE cells and the HL60 cell line after 3 h of treatment with serum-free medium (SF), etoposide 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ETP), camptothecin 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CPT 0.4), and camptothecin 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (CPT 0.8) versus control cells (CON). Coamplification of *GAPDH* cDNA represented an internal control for SHE cells and *actin* an internal control for the HL60 cell line.

programmed cell death, with rapid DNA degradation, production of the PARP 89-kDa fragment, and activation of caspase-3 involved in nuclear degradations.

The unique 89-kDa fragment of PARP was often considered an early and reliable hallmark of apoptosis in different types of cells [34] and was used to distinguish apoptotic and necrotic cell death [20]. Previous studies had shown that the anti-PARP antibody C-2-10 employed in this work reacted with intact PARP and its apoptotic fragment of 89-kDa in many human [34, 35], rat [36], and mouse [37] cell lines, responding to a wide range of apoptotic agents such as viruses, irradiation, and DNA-damaging chemicals. An ICE-like protease had been shown to be responsible for the early, specific, and unique apoptotic cleavage of PARP in a DEVD site between Asp 216 and Gly 217, resulting in the separation of the two zinc-finger DNA-binding domains of the protein [18, 19]. Caspase-3, in its activated form, was later implicated as the main cause of apoptotic modifications, such as PARP degradation.

The expression of apoptosis in SHE cells differed from that in HL60. No apoptotic fragment resulting from PARP cleavage could be seen, whereas apoptosis was clearly identified through fluorescence microscopy, the DNA-ladder pattern, and the ELISA detection of DNA fragmentation. Although the 113-kDa protein rapidly disappeared during apoptosis induced by serum withdrawal, no other signal was revealed by Western blot analysis. It can be presumed that PARP cleavage results in a different pattern of fragmentation from the typical one, which explains the failure of immunological detection: PARP may be cleaved at a site(s)

other than the DEVD one, resulting in a defect in fragment recognition by the C-2-10 antibody. This hypothesis is consistent with the fact that no activation of caspase-3 was registered in apoptotic SHE cells.

As PARP disappears during SHE cell apoptosis, it can be presumed that another caspase or protease degrades PARP in a site different from the DEVD sequence. Caspase-independent apoptosis had already been observed in the human Hep3B cell line, but in this case, the 113-kDa signal intensity of PARP did not decrease [38]. The authors suggested that a yet-unidentified protease with trypsin-like activity contributed in part to apoptosis in these cells. Another explanation for the nonrecognition of PARP fragments by the C-2-10 antibody is that this antibody, initially prepared for human cells, is unable to react with the hamster fragment due to species specificity, though it easily recognizes the entire 113-kDa protein. This defect in immunological recognition can also be invoked to explain the absence of caspase-3 activity in SHE cells. A nonrecognition of hamster caspase-3 by the antibody reagent provided in the kit cannot be excluded.

The apoptosis inhibition effect of zinc is a well-known phenomenon and it was found to induce a potent decrease in caspase-3 activity [22]. The mechanism by which Zn^{2+} acts on cell death is not fully understood and it could be supposed that its action is not only limited to the caspase-3 protease inhibition but also to other caspases and cell death proteases. In both cell types, the HL60 cell line and SHE primary cells, PARP degradation and nuclear apoptotic modifications were inhibited by ZnCl_2 , with a higher sensitivity for SHE cells, which were affected by 100 μM ,

whereas HL60 cells needed 1 mM ZnCl₂. The difference in effective concentrations may be explained by a higher bioavailability of the metal in the medium devoid of serum. Seric proteins constitute biological materials with high adsorption capacities, limiting the concentrations of zinc bioavailable for the cells.

Unlike HL60, SHE cells underwent apoptosis rapidly and intensively after serum depletion. This underlines the high dependency of primary cell culture on growth factors, while cell lines require much less cell growth stimulation. This result is consistent with previous findings demonstrating that the clonal growth of SHE cells and their transforming capacities closely depend on serum quality [39, 40]. On the other hand, the weak apoptotic response of SHE cells after exposure to DNA-damaging agents could explain their sensitivity to malignant transformation because cell death dysfunction is now considered a factor influencing tumor promotion and cell proliferation disorder. Indeed Dhalluin *et al.* [13] demonstrated that cell transformation of SHE cells exposed to the combined effects of nongenotoxic carcinogens was associated with an induction of bcl-2 and a subsequent inhibition of apoptosis.

To gather further information on the pathway of apoptosis, we investigated p53 protein and *c-myc* expression. Unlike the HL60 cell line, which is p53 null, SHE cells showed p53 protein stabilization when exposed to topoisomerase inhibitors, which demonstrates the DNA-damaging activity of these chemicals on SHE cells without the occurrence of massive apoptosis. On the other hand, no accumulation of p53 was observed in serum-deprived cells, suggesting a p53-independent pathway of apoptosis. However, serum deprivation of SHE cells was associated with a negative regulation of *c-myc* expression. The importance of *c-myc* in regulating apoptosis had already been demonstrated in different cell types [41, 42] but molecular events associated with *c-myc*-induced apoptosis are not well-defined. The HL60 cell line underwent apoptosis in a p53-independent manner because of its p53-null status. Moreover, topoisomerase inhibitors led to apoptosis without change in *c-myc* expression. Similarly, no change in *c-myc* expression was observed under serum-free conditions, which seems to be related to the capacity of HL60 cells to escape apoptosis.

In conclusion, SHE primary cells responded differently from the HL60 model to the apoptosis inducers studied. Programmed cell death in SHE cells was principally induced by growth factor depletion while HL60 showed a high sensitivity to topoisomerase inhibitors. HL60 cell apoptosis was expressed by nuclear condensation and fragmentation, a DNA-ladder pattern, increased caspase-3 activity, and PARP cleavage in two fragments, including the 89-kDa fragment, recognized by the C-2-10 anti-PARP antibody. During programmed cell death, SHE cells first showed nuclear modifications and second the DNA-fragmentation lad-

der pattern. Yet, no caspase-3 activity was detectable and, though PARP totally disappeared during the apoptotic process, no fragment was revealed in Western blot analysis. This result underlines the fact that while PARP cleavage is a criterion for apoptosis, the diagnosis of apoptosis cannot rely exclusively on the appearance of its 89-kDa fragment, as it may fail to appear.

Apoptosis induced by serum deprivation in SHE cells was associated with *c-myc* repression but not with p53 stabilization, while topoisomerase inhibitors induced p53 accumulation without massive apoptosis. HL60 cells underwent apoptosis after treatment with topoisomerase inhibitors in a p53- and *c-myc*-independent manner.

Overall, these results support the hypothesis that a specific pathway of apoptosis is induced by serum withdrawal in SHE primary cells.

This research was funded by grants from the French Ministry of Research and "La Ligue contre le Cancer." The authors thank these organizations for their financial support. They are grateful to Dr Froment and his colleagues of the Anatomic-pathology Laboratory of "Bon Secours" Hospital for their assistance in cell cycle analysis. They warmly acknowledge Tracy Carmona for her assistance in correcting this paper.

REFERENCES

1. Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., and Currie, A. R. (1980). Cell death: The significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* **68**, 251-306.
2. Wertz, I. E., and Hanley, M. R. (1996). Diverse molecular provocation of programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 359-364.
3. Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456-1462.
4. Shimizu, T., and Pommier, Y. (1996). DNA fragmentation induced by protease activation in p53-null human leukemia HL60 cells undergoing apoptosis following treatment with the topoisomerase I inhibitor camptothecin: Cell-free system studies. *Exp. Cell Res.* **226**, 292-301.
5. DiPietrantonio, A. M., Hsieh, T., and Wu, J. M. (1999). Activation of caspase 3 in HL60 cells exposed to hydrogen peroxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 477-482.
6. Gorczyca, W., Bruno, S., Darzynkiewicz, R. J., Gong, J., and Darzynkiewicz, Z. (1992). DNA strand breaks occurring during apoptosis: Their early *in situ* detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int. J. Oncol.* **1**, 639-648.
7. Stinchcombe, S., Buchmann, A., Bock, K. W., and Schwarz, M. (1995). Inhibition of apoptosis during 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin-mediated tumour promotion in rat liver. *Carcinogenesis* **16**, 1271-1275.
8. 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., and Kouri, R. E. (1986). An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environ. Mutagen.* **8**, 77-98.
9. Endo, S., Metzler, M., and Hieber, L. (1994). Nonrandom karyotypic changes in a spontaneously immortalized and tumorigenic Syrian hamster embryo cell line. *Carcinogenesis* **15**, 2387-2390.
10. Christov, K. T., Guzman, R. C., Swanson, S. M., Thordarson, G., Talamantes, F., and Nandi, S. (1996). Cell proliferation and

- apoptosis during mammary carcinogenesis in pituitary isografted mice. *Carcinogenesis* **17**, 1741–1746.
11. Wyllie, A. H. (1992). Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: An overview. *Cancer Metastasis Rev.* **11**, 95–103.
 12. Schulte-Hermann, R., Bursch, W., Grasl-Kraupp, B., Török, L., Ellinger, A., and Müllauer, L. (1995). Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **82/83**, 143–148.
 13. Dhalluin, S., Gate, L., Vasseur, P., Tapiero, H., and 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 tetradecanoyl-phorbol acetate. *Carcinogenesis* **18**, 2217–2223.
 14. Kerr, J. F. R., Winterford, C. M., and Harmon, B. V. (1994). Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013–2026.
 15. Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* **284**, 555–556.
 16. Satoh, M. S., and Lindahl, T. (1992). Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature* **356**, 356–358.
 17. de Murcia, G., Dantzer, F., Trucco, C., Rolli, V., Oliver, F. J., Niedergang, C., and Ménissier-de Murcia, J. (1998). Poly(ADP-ribose)polymerase is required for maintenance of genomic integrity during base excision repair. *Nucleic Acids Mol. Biol.* **12**, 83–102.
 18. Lazebnik, Y. A., Kaufmann, S. H., Desnoyers, S., Poirier, G. G., and Earnshaw, W. C. (1994). Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature* **371**, 346–347.
 19. Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., Lazebnik, Y. A., Munday, N. A., Raju, S. M., Smulson, M. E., Yamin, T. T., Yu, V. L., and Miller, D. K. (1995). Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**, 37–43.
 20. Shah, G. M., Shah, R. G., and Poirier, G. G. (1996). Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose)polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **229**, 838–844.
 21. Porter, A. G., and Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.* **6**, 99–104.
 22. Perry, D. K., Smyth, M. J., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Duriez, P., Poirier, G. G., and Hannun, Y. A. (1997). Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. *J. Biol. Chem.* **272**, 18530–18533.
 23. Wang, X. W., and Harris, C. C. (1997). p53 tumor-suppressor gene: Clues to molecular carcinogenesis. *J. Cell Physiol.* **173**, 247–255.
 24. Facchini, L. M., and Penn, L. Z. (1998). The molecular role of Myc in growth and transformation: Recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.* **12**, 633–651.
 25. Elias, Z., Poirot, O., Pezerat, H., Suquet, H., Schneider, O., Danieri, M. C., Terzetti, F., Baruthio, F., Fournier, M., and Cavalier, C. (1989). Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* **10**, 2043–2052.
 26. Wolf, D., and Rotter, V. (1985). Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 790–794.
 27. DelBino, G., Lassota, P., and Darzynkiewicz, Z. (1991). The S-phase cytotoxicity of camptothecin. *Exp. Cell Res.* **193**, 27–35.
 28. Larsen, A. K., and Skladanowski, A. (1998). Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: From drug uptake to cell death. *Biochem. Biophys. Acta* **1400**, 257–274.
 29. Coats, S., Flanagan, W. M., Nourse, J., and Roberts, J. M. (1996). Requirement of p27^{Kip1} for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* **272**, 877–880.
 30. Simm, A., Bertsch, G., Frank, H., Zimmermann, U., and Hoppe, J. (1997). Cell death of AKR-2B fibroblasts after serum removal: A process between apoptosis and necrosis. *J. Cell Sci.* **110**, 819–828.
 31. Tamm, I., Kikuchi, T., Krueger, J., and Murphy, J. S. (1992). Dissociation between early loss of actin fibres and subsequent cell death in serum-deprived quiescent Balb/C-3T3 cells. *Cell. Signalling* **4**, 675–686.
 32. Lindenboim, L., Diamond, R., Rothenberg, E., and Stein, R. (1995). Apoptosis induced by serum deprivation of PC12 cells is not preceded by growth arrest and can occur at each phase of the cell cycle. *Cancer Res.* **55**, 1242–1247.
 33. Huang, Y., Chan, A. M. L., Liu, Y., Wang, X., and Holbrook, N. J. (1997). Serum withdrawal and etoposide induce apoptosis in human lung carcinoma cell line A549 via distinct pathways. *Apoptosis* **2**, 199–206.
 34. Whitacre, C. M., and Berger, N. A. (1997). Factors affecting topotecan-induced programmed cell death: Adhesion protects cells from apoptosis and impairs cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase. *Cancer Res.* **57**, 2157–2163.
 35. Melkova, Z., Lee, S. B., Rodriguez, D., and Esteban, M. (1997). Bcl-2 prevents nitric oxide-mediated apoptosis and poly(ADP-ribose)polymerase cleavage. *FEBS Lett.* **403**, 273–278.
 36. Kangas, A., Nicholson, D. W., and Hölttä, E. (1998). Involvement of CPP32/caspase-3 in c-Myc-induced apoptosis. *Oncogene* **16**, 387–398.
 37. Ubol, S., Park, S., Budihardjo, I., Desnoyers, S., Montrose, M. H., Poirier, G. G., Kaufmann, S. H., and Griffin, D. E. (1996). Temporal changes in chromatin, intracellular calcium, and poly(ADP-ribose)polymerase during Sindbis virus-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *J. Virol.* **70**, 2215–2220.
 38. Adjei, P. N., Kaufmann, S. H., Leung, W. Y., Mao, F., and Gores, G. J. (1996). Selective induction of apoptosis in Hep 3B cells by topoisomerase I inhibitors: Evidence for a protease-dependent pathway that does not activate cysteine protease P32. *J. Clin. Invest.* **98**, 2588–2596.
 39. Rivedal, E., and Haddeland, U. (1996). Role of serum in the morphological transformation of Syrian hamster embryo cells: Characterization and partial purification of protein factors in foetal bovine serum. *Toxicol. in Vitro* **10**, 217–227.
 40. Schuman, R. F., Pienta, R. J., Poiley, J. A., and Leberer, W. B., III (1979). Effect of fetal bovine serum on 3-methylcholanthrene-induced transformation of hamster cells *in vitro*. *In Vitro* **15**, 730–735.
 41. Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* **69**, 119–128.
 42. Milner, A. E., Grand, J. A., Waters, C. M., and Gregory, C. D. (1993). Apoptosis in Burkitt lymphoma cells is driven by c-myc. *Oncogene* **8**, 3385–3391.

B. Dégradation de la PARP dans les cellules embryonnaires de hamster Syrien

Publication n°2 : Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G., Poirier G.G. and Vasseur P., PARP degradation in apoptotic Syrian hamster embryo (SHE) cells compared to HL60 cell line, *Biochimie*, soumis.

Fragments d'ADN dans le surnageant
 Fragments d'ADN dans le lysat cellulaire

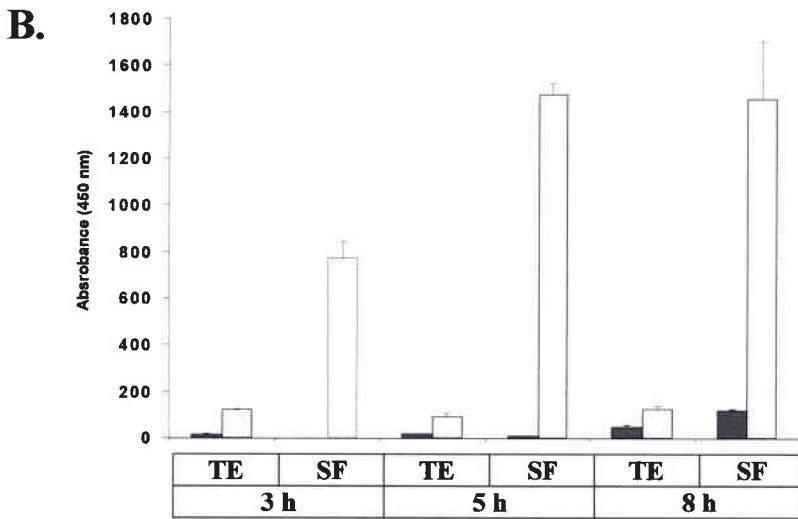
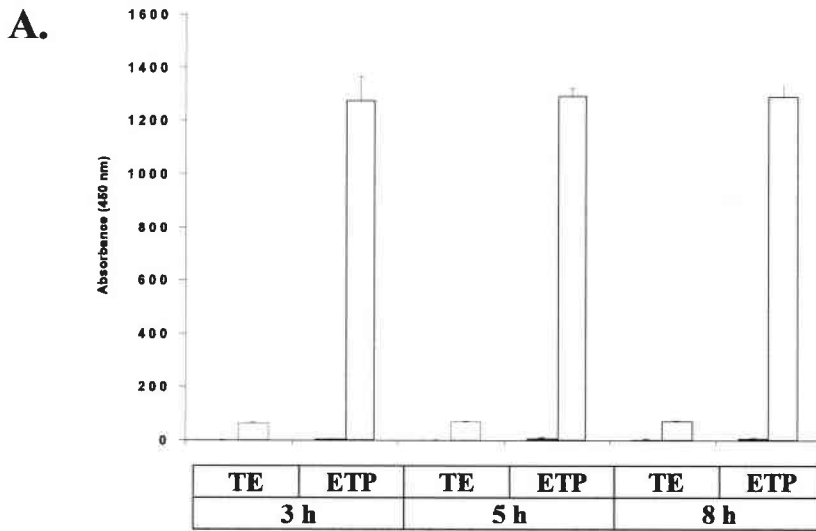


Figure 18. Fragmentation de l'ADN, mesurée à l'aide du kit "Cellular DNA fragmentation ELISA" (Roche), dans les cellules HL60 exposées à 40µg/mL d'étoposide (A) et dans les cellules SHE privées de sérum(SF) (B) pour une durée de 3, 5 ou 8 h, par rapport aux cellules contrôles (TE).

La méthode, basée sur le marquage de l'ADN par le BrdU, permet la mesure spectrophotométrique (450nm) des fragments d'ADN dans le lysat cellulaire, en relation avec l'apoptose, et dans le surnageant, lorsque les membranes cellulaires sont endommagées suite à un phénomène nécrotique.

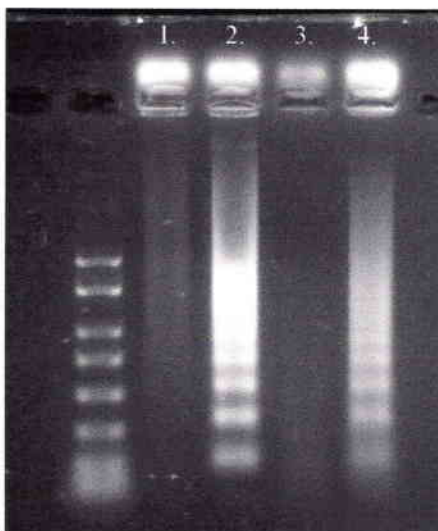


Figure 19. Configuration en "DNA ladder" des fragments d'ADN des cellules HL60 exposées à 40 µg/mL d'étoposide (2), et des cellules SHE privées de sérum (4) pendant 5 h comparées aux cellules témoins HL60 (1) ou SHE (3).

Introduction

Les résultats précédents ayant montré une dégradation de la PARP, dans les cellules SHE apoptotiques, non conforme au profil attendu, nous nous sommes concentrés sur la détection du fragment 89kDa de la PARP dans les cellules SHE en apoptose. Ce fragment 89kDa est considéré dans de nombreux types cellulaires comme un marqueur fiable et précoce de la mort cellulaire programmée. Dans notre précédente étude, nous n'avions pu détecter ce fragment alors que l'apoptose était évidente dans les cellules SHE privées de sérum.

Nous avons donc utilisé deux méthodes de visualisation en Western blot de la PARP et de son fragment :

- une application directe de l'anticorps C-2-10 reconnaissant une région de la PARP allant de l'Aa 216 à l'Aa 375,
- une technique basée sur le maintien de l'activité catalytique de la PARP et de son fragment apoptotique 89kDa après électrophorèse et transfert sur membrane. Ainsi, lorsque l'on rajoute le substrat de l'enzyme, le NAD⁺, il y a formation de poly(ADP-ribose) directement sur la membrane, au niveau de la PARP et de ses fragments lorsqu'ils ont conservé leur activité polymérasique et qu'ils peuvent encore fixer le polymère.

Le fragment 89kDa typique de l'apoptose porte le site catalytique de l'enzyme et possède donc toujours l'activité polymérasique, ainsi que le site d'automodification qui permet la fixation covalente du polymère.

L'anticorps LP96-10 reconnaît les molécules de polymère, qui sont identiques dans toutes les espèces. Cette méthode a donc l'avantage de permettre le marquage de la PARP dans les types cellulaires qui répondraient négativement aux anticorps anti-PARP.

Nous avons utilisé un milieu sans sérum pour induire l'apoptose des cellules SHE et nous avons comparé leur réponse à celle des cellules HL60 exposées à l'étoposide (40µg/mL).

Résultats

La voie apoptotique empruntée par les cellules SHE privées de sérum et par les cellules HL60 traitées par l'étoposide, a été confirmée par l'apparition de fragments d'ADN intracellulaires

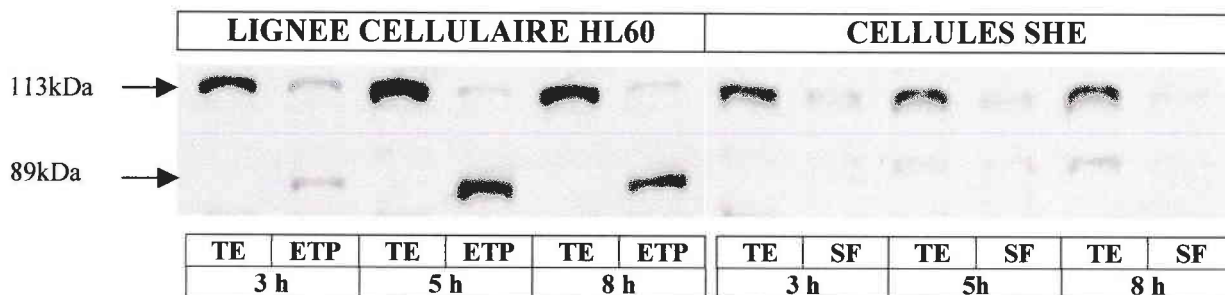


Figure 20. Détection de la PARP et de son fragment 89kDa en Western blot, avec l'aide de l'anticorps anti-PARP C-2-10, dans les cellules HL60 exposées à 40µg/mL d'étoposide (ETP) et dans les cellules SHE privées de sérum (SF), durant 3, 5 ou 8 h, et comparées aux cellules contrôles (TE).

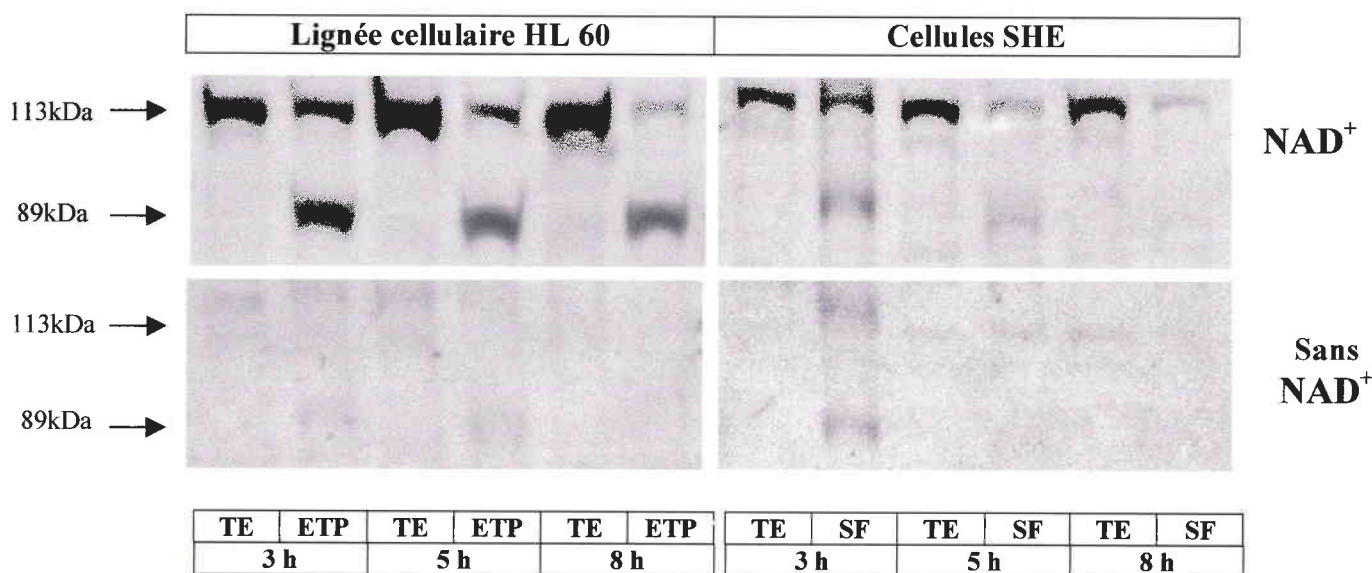


Figure 21. Détection de la PARP et de son fragment apoptotique en Western blot, après activation ou non des protéines par le NAD⁺. L'anticorps utilisé est l'anticorps anti-polymère LP96-10. Les cellules HL60 exposées à 40µg/mL d'étoposide (ETP), ainsi que les cellules privées de sérum (SF), durant 3, 5 ou 8 h, ont été testées et comparées aux cellules témoins (TE), non traitées par un stimulus apoptotique.

(Fig. 18) et par la configuration en barreaux d'échelle de ces fragments après migration en gel d'agarose (Fig. 19).

En Western blot, l'utilisation de l'anticorps **C-2-10** reconnaissant la protéine entière (113kDa) ou les fragments portant le site de fixation de l'anticorps (Fig. 20) met en évidence :

- dans les cellules HL60 témoins, un seul signal de 113kDa,
- dans les cellules HL60 exposées à l'étoposide, une disparition progressive du signal 113kDa qui laisse place à un signal de 89kDa typique de l'apoptose,
- dans les cellules SHE témoins, un seul signal de 113kDa,
- dans les cellules SHE privées de sérum, une disparition du signal 113kDa, mais sans apparition d'un ou plusieurs autres signaux.

L'anticorps **LP96-10**, spécifique du poly(ADP-ribose), a été appliqué aux protéines fixées sur la membrane et activées ou non par du NAD^+ (Fig. 21). Les résultats obtenus sont les suivants :

- en présence de NAD^+ , les cellules HL60 témoins ne montrent qu'un seul signal de 113kDa ; sans NAD^+ , aucun signal n'est détecté ;
- les cellules HL60 traitées par l'étoposide montrent, au fur et à mesure du processus apoptotique, une disparition du signal 113kDa, remplacé par un signal de 89kDa ; et cela uniquement en présence de NAD^+ ; aucune bande n'apparaît sans NAD^+ ;
- en présence de NAD^+ , les cellules SHE témoins ne montrent qu'un seul signal de 113kDa ; sans NAD^+ , aucun signal n'est détecté ;
- dans les cellules SHE après 3 h de privation de sérum, l'activation par le NAD^+ permet la détection de deux signaux, de 113kDa et d'environ 89kDa ; ces deux bandes s'atténuent à 5 h pour disparaître à 8 h. Sans activation par le NAD^+ , on observe également ces deux signaux après 3 h de traitement, mais plus faiblement.

Discussion

La lignée des cellules **HL60**, témoin du bon fonctionnement des techniques mises en œuvre pour la détection de la PARP et de son fragment apoptotique, se comporte comme nous l'attendions, avec un clivage de la PARP au cours du processus apoptotique et la mise en place d'un fragment 89kDa stable. Les deux méthodes utilisées mettent en évidence ce clivage spécifique.

Dans le cas des cellules SHE, bien que l'apoptose soit démontrée par d'autres méthodes, la détection classique du clivage de la PARP par un anticorps anti-PARP ne permet pas de détecter de fragment 89kDa, caractéristique du processus apoptotique dans de nombreux types cellulaires. De même, l'utilisation de l'anticorps anti-polymère ne met en évidence qu'un fragment transitoire de la PARP, fragment que l'on retrouve avec et sans activation par le NAD^+ .

Le fait que l'anticorps anti-PARP ne reconnaisse que la PARP entière des cellules SHE et que ce signal de 113kDa disparaisse lors de l'apoptose permet de poser deux hypothèses :

1. la dégradation de la PARP ne suit pas les étapes de clivage classiquement décrites, passant par la formation d'un fragment 89kDa, et se trouve dégradée aspécifiquement en petits fragments non reconnaissables par l'anticorps anti-PARP ;
2. la PARP est clivée spécifiquement en deux fragments, mais le site de clivage diffère du site DEVDG reconnu par la caspase-3, ce qui altère la fixation de l'anticorps.

Cette dernière hypothèse est supportée par le fait que le site de fixation de l'anticorps C-2-10 (Aa 216 à Aa 375) se trouve juste à côté du site de clivage spécifique. En effet, différentes études ont montré que le fragment 89kDa est obtenu par une coupure spécifique de la PARP au niveau du site DEVDG, plus précisément entre Asp 216 et Gly 217. Si le site de clivage est décalé, il se peut que l'anticorps ne reconnaisse plus le fragment alors qu'il reconnaît la PARP entière. De plus, nous avons vu précédemment que la caspase-3 n'était pas activée dans les cellules SHE en apoptose. Or, c'est principalement par cette enzyme que la PARP est clivée de manière spécifique, c'est à dire toujours entre Asp 216 et Gly 217. Il est donc possible que nous soyons en présence d'une apoptose indépendante de la caspase-3 et donc que le site de clivage soit différent du site habituel.

Les bandes révélées par l'anticorps anti-polymère après activation par le NAD^+ montrent la présence d'un fragment proche de 89kDa dans les cellules SHE en apoptose ; mais ce fragment est transitoire et semble avoir une activité assez faible compte tenu du fait que le fragment sans activation par le NAD^+ est déjà poly(ADP-ribosyl)é. Ce signal obtenu sans NAD^+ provient vraisemblablement de l'activation de la PARP qui survient à la suite de la dégradation de l'ADN dans les toutes premières phases de l'apoptose. Le polymère

synthétisé, puis fixé sur le domaine d'automodification de la PARP avant son clivage, expliquerait le signal sur la membrane, obtenu avec et sans NAD^+ , suite à l'application des anticorps anti-polymère.

Les résultats obtenus par cette méthode sont cohérents avec les deux hypothèses précédemment évoquées :

- un fragment proche de 89kDa semble présent dans les premières heures de l'apoptose, mais il n'est pas détecté par l'anticorps anti-PARP, ce qui viendrait conforter l'hypothèse selon laquelle le site de clivage spécifique serait décalé ;
- le fragment détecté par les anticorps anti-polymère disparaît progressivement suggérant que la PARP continue d'être dégradée aspécifiquement, au fur et à mesure que l'apoptose se poursuit.

En conclusion, dans les cellules SHE, la dégradation de la poly(ADP-ribose)polymérase en relation avec l'apoptose ne s'effectue pas selon le processus classique, observé dans la plupart des cellules. En effet, le site de clivage spécifique de la PARP semble différent et pourrait être décalé par rapport au site d'action spécifique de la caspase-3 ; le fragment obtenu ne peut donc pas être reconnu par l'anticorps anti-PARP (C-2-10). De plus, la dégradation se prolongerait au-delà du premier clivage, ce qui expliquerait le faible marquage par les anticorps anti-polymère, le fragment 89kDa-like ne persistant pas dans les cellules. Le fragment 89kDa de la PARP ne peut servir de marqueur d'apoptose dans les cellules SHE.

PARP Degradation in Apoptotic Syrian Hamster Embryo (SHE) cells compared to HL60 Cell Line.

S. Alexandre, C. Rast, G. Nguyen-Ba, G.G. Poirier and Vasseur P.

Biochimie, soumis.

Abstract

In this study, we attempted to identify apoptotic Syrian hamster embryo (SHE) cells by detecting the specific cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). Apoptosis was unequivocally identified in serum-deprived SHE cells. After protein electrophoresis and transfer, the anti-PARP antibody (C-2-10) was applied in order to visualize PARP degradation and the anti-polymer antibody (LP96-10) was used to identify polymerase activity on the membrane after renaturation and NAD⁺ activation of PARP and its expected 89-kDa fragment. Results showed that PARP rapidly disappeared during apoptosis in SHE cells, but the resulting fragment remained undetectable with the anti-PARP antibody and no stable polymerase activity of this fragment was measured using anti-polymer antibody. Serum-starved SHE cells were compared to the etoposide-treated HL60 cell line as a control for typical apoptosis-related PARP cleavage. These results underline the fact that while PARP degradation is a criterion for apoptosis, the diagnosis of apoptosis cannot rely exclusively on the appearance of its 89-kDa fragment as this signal may fail to appear in some cell systems.

Key words : SHE cells, apoptosis, PARP degradation.

Introduction

Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) has been shown to be a key participant in DNA base excision repair and in the maintenance of genome through its activity in poly(ADP-ribose) polymer (pADPr) synthesis [1, 2]. In most cell types, programmed cell death is accompanied by an early and unique cleavage of PARP between Asp 216 and Gly 217 which separates the site bearing the catalytic and automodification domains (89-kDa) from the other part of the protein (24-kDa) [3, 4]. The 89-kDa fragment comprises the catalytic site with polymerase activity and the site able to fix the polymer but this fragment is unable to bind DNA and to initiate DNA repair. The formation of the 89-kDa fragment resulting from the specific pattern of PARP cleavage is considered to be a hallmark of apoptosis [5-8].

The apoptotic cleavage of the protein is usually detected in Western blot by anti-Poly(ADP-ribose)polymerase antibodies which recognize PARP and its 89-kDa fragment [6, 9]. PARP and its 89-kDa fragment have been shown to conserve their basal activity in pADPr synthesis after electrophoresis and transfer. Thus, when NAD^+ , the substrate of the enzyme, is added to the membrane, PARP-specific fragmentation can also be visualized using anti-poly(ADP-ribose)polymer antibodies, since the synthesis of the polymer by PARP and the 89-kDa induces their own poly(ADP-ribosyl)ation [10].

In the present study, we have attempted to identify apoptosis in Syrian hamster embryo (SHE) cells by detecting PARP specific cleavage. SHE cells are normal, diploid and genetically stable, and are used to study the mechanisms of the transformation process leading to neoplasia [11].

The hypothesis that impairment in programmed cell death as well as cell proliferation deregulation could contribute to neoplastic transformation [12] led us to study the sensitivity of these cells to apoptosis. SHE cells undergo massive apoptosis when they are exposed to serum-free medium, as demonstrated in previous studies [13] by microscopy observations of chromatin condensation and nuclear fragmentation, and by a 'DNA ladder' pattern formation in Southern blot. In contrast to transformed cell lines, SHE cells have been shown not to be very sensitive to apoptotic chemical inducers, such as the topoisomerase inhibitors etoposide and camptothecin [13]. As the present study's aim was to identify PARP fragmentation as a biomarker of apoptosis, we chose experimental conditions which would induce clear apoptotic signals. Therefore, serum deprivation was chosen as a means of inducing programmed cell death (PCD) in SHE cells. The results in SHE cells were compared to those of the HL60 cell line, since the latter has been extensively studied as a model for apoptosis and PARP specific cleavage [3,10,14,15]. Etoposide was used to induce PCD in HL60 cells, because these cells are not sensitive to serum deprivation.

Materials and methods

Cell cultures and treatments

SHE primary cell cultures were prepared from 13-day-old golden-Syrian-hamster embryos, as described by Elias *et al.* (1989) [16] and were stored in liquid nitrogen. Normal culture conditions for these cells are DMEM (Gibco BRL) pH 7.0 supplemented with 15% fetal calf serum (FCS) (Hyclone) and 10% CO_2 . After thawing, primary SHE cells were precultured until confluent. Cells were then trypsinized and treated during reseeding.

The serum-free medium used to induce apoptosis in SHE cells was consisted of DMEM, pH 7.0, without any supplementation of serum. Apoptosis was initiated by transferring SHE cells from DMEM with 15% FCS into serum-free DMEM medium. No other culture condition was modified.

Human Caucasian promyelocytic leukaemia cells (HL60) provided by the European Collection of Cell Cultures (ECACC n° 98070106) were kept in RPMI medium (Sigma-Aldrich) containing 10% FCS and 5% CO₂. The HL60 cell suspension was diluted with fresh medium just before treatment. The apoptosis inducer etoposide was obtained from Sigma-Aldrich and dissolved in DMSO to make up a stock solution. Just before the treatment of HL60 cells, etoposide was diluted in RPMI medium supplemented with 10% serum to obtain a concentration of 40µg/ml.

Fluorescence microscopy

After treatment, the cells and the culture media were harvested, and centrifuged at 250g for 10 mins. Cell pellets were stained with acridine orange (0.15 mg/ml) and ethidium bromide (0.25 mg/ml in PBS) fluorescent probes, and observed using fluorescence microscopy (495nm). Living cells which are permeable only to acridine orange show a green nucleic staining; dead cells, permeable also to ethidium bromide, have their nuclei coloured red. The cells with a condensed or fragmented chromatin pattern characteristic of apoptosis were counted as apoptotic, whereas those with a homogenous chromatin pattern were counted as normal.

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)-labelled DNA fragments. To summarize, after exposure to BrdU for 17 hrs, cells were reseeded onto a microplate (10⁵ cells/well) and treated for 3, 5 or 8 hrs. Supernatant and cell lysate were transferred into an anti-DNA precoated microtiter plate and analyzed using the ELISA procedure. After incubation, DNA was fixed and denatured using exonuclease III (Sigma-Aldrich). DNA fragmentation was measured spectrophotometrically (at 450 nm and 690 nm as the reference wavelengths) after the anti-BrdU-peroxidase conjugate and the substrate solutions had been added. BrdU-labelled fragments measured in cell lysate denoted apoptotic fragmentation. Fragments released into the supernatant came from the necrotic cells and were considered to be markers for cytotoxicity.

The results presented are the average value of three independent experiments.

Detection of 'DNA ladder' by gel electrophoresis

The purification of fragmented DNA was carried out using the Suicide-Track DNA Ladder Isolation kit (Oncogene) 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 0.1µg/ml ethidium bromide. Labelled-DNA was visualized by UV illumination.

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

Preparation of cell extracts, electrophoresis and transfer

After treatment, cells were harvested, divided in two aliquots and centrifuged at 1000g for 10 mins. One of the two pellets was used for protein quantification and was resuspended in a lysis buffer (50mM Tris, pH 8; EDTA 1mM; PMSF 0.2mM; NaCl 200mM; SDS 0.1%; Triton X100 1%; 0.5µg/ml leupeptin; 1µg/ml pepstatin). After a 30 min-incubation in ice, insoluble materials were eliminated by means of a 30 min-centrifugation at 10,000g.

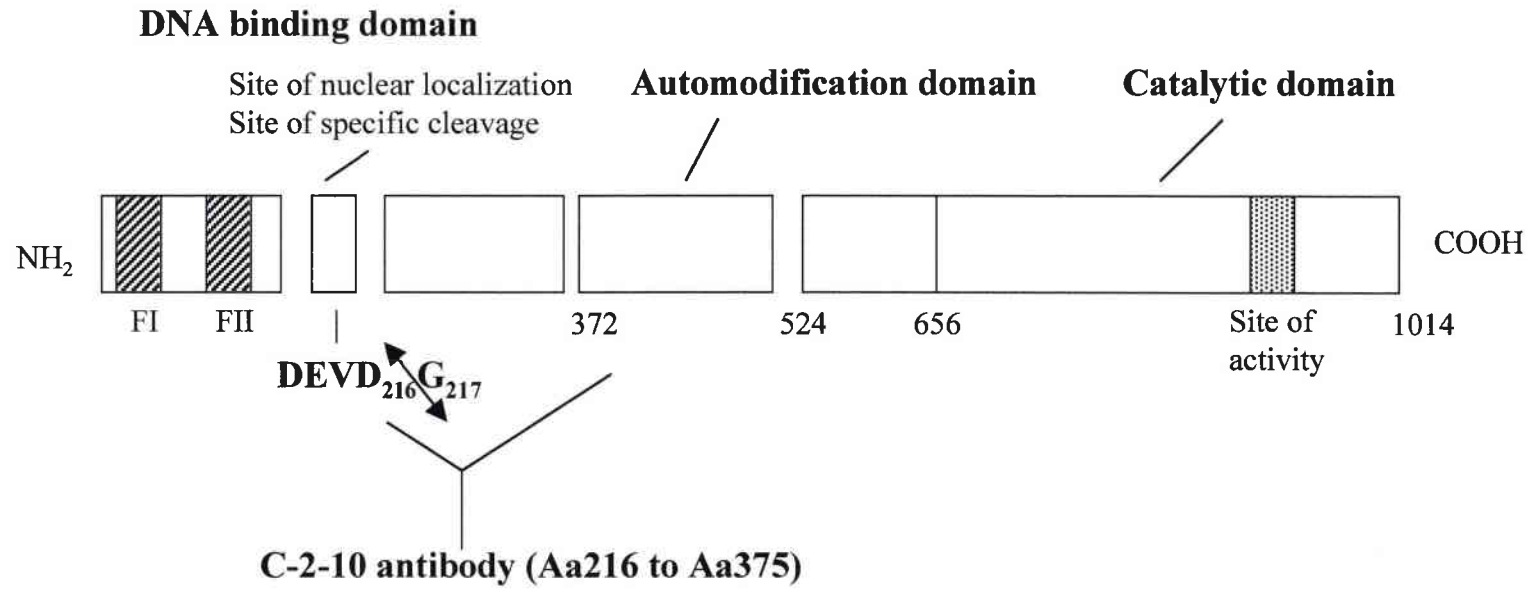


Fig. 1. Schematical structure of human PARP representing the different functional domains according to the description of Oliver Pozo *et al.* [18]. The DNA binding domain contains the two zinc fingers (FI and FII) and the nuclear localization signal. The site recognized by the C-2-10 antibody is also represented.

Protein concentrations were measured using the Biorad DC protein assay. The other pellet was resuspended in loading buffer (62.5mM Tris, pH 6.8 ; 6M urea ; 10% glycerol ; 2% SDS ; 0.003% bromophenol blue ; 5% 2-mercaptoethanol) and subjected to ultrasonic treatment to extract and solubilize PARP. Equal amounts of protein from the different samples were resolved in 8% SDS-polyacrylamide gel by electrophoresis. Samples were electrophoretically transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (Polyscreen PVDF transfer membrane, NEN Research Products).

Immunoblotting with anti-PARP antibody (C-2-10)

All further steps were carried out at room temperature. Protein-binding sites were saturated with 5% powdered nonfat milk in PBS supplemented with tween 0.1% (PBS-MT) for 1 hr. The sheets were incubated for one night with polyclonal mouse antibodies against human PARP C-2-10 (1:10,000) in PBS-MT followed by a 1 hr-exposure to horseradish peroxidase goat antibodies against mouse IgG (1:50,000) (Sigma-Aldrich) in PBS-MT. Peroxidase activity was detected by means of a chemiluminescence reaction developed using the luminol system (Renaissance, NEN Research Products). The anti-PARP monoclonal antibody C-2-10 recognizes an epitope in the DNA-binding domain of PARP between amino acids 216 and 375 [17], next to the site of the apoptotic cleavage which appears between Asp 216 and Gly 217 ; this antibody is currently used on HL60 to detect PARP (113-kDa) as well as its apoptotic fragment (89-kDa). Figure 1 shows a schematic representation of human PARP [18]. In preliminary studies, the C-2-10 anti-PARP antibody was also demonstrated to react with the entire PARP of SHE cells. This antibody was kindly provided by G. Poirier. Results were confirmed by at least three independent experiments.

PARP activation and visualization by anti-pADPr antibody

The method of activation has been described previously by Shah *et al.* (1995) [10]. In short, the membrane was incubated for 1 hr in renaturation buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 0.3% Tween 20) containing 20 μ M Zn(II)acetate, and 2 mM MgCl₂. The enzymatic reaction started with fresh renaturation buffer supplemented with Zn²⁺, and Mg²⁺ along with 100 μ M of NAD⁺. After a 1 hr-incubation, unprocessed NAD⁺ was removed by four 15-min washes with renaturation buffer. The polymer pADPr was removed from non-covalently modified proteins during four 15-min washes with SDS wash buffer (50 mM Tris, pH 8.0; 100 mM NaCl; 1 mM DTT; 2% SDS). All steps were carried out in PBS containing 5% nonfat dry milk and 0.1% Tween 20 (PBSMT). The blots were blocked by four washes of 15 mins each, which also removed SDS. They were left to react overnight with anti-pADPr (LP96-10) (1:5,000) [19] and then with horseradish peroxidase-labeled anti-rabbit IgG (1:5,000) (Sigma-Aldrich). Peroxidase activity was detected by means of a chemiluminescence reaction developed using the luminol system (Renaissance, NEN Research Products). The anti-pADPr antibody was kindly provided by G. Poirier. Results were confirmed by at least three independent experiments.

Statistical analyses

The results were subjected to Student's t-test. Tests for data normality and ANOVA analysis had been carried out beforehand.

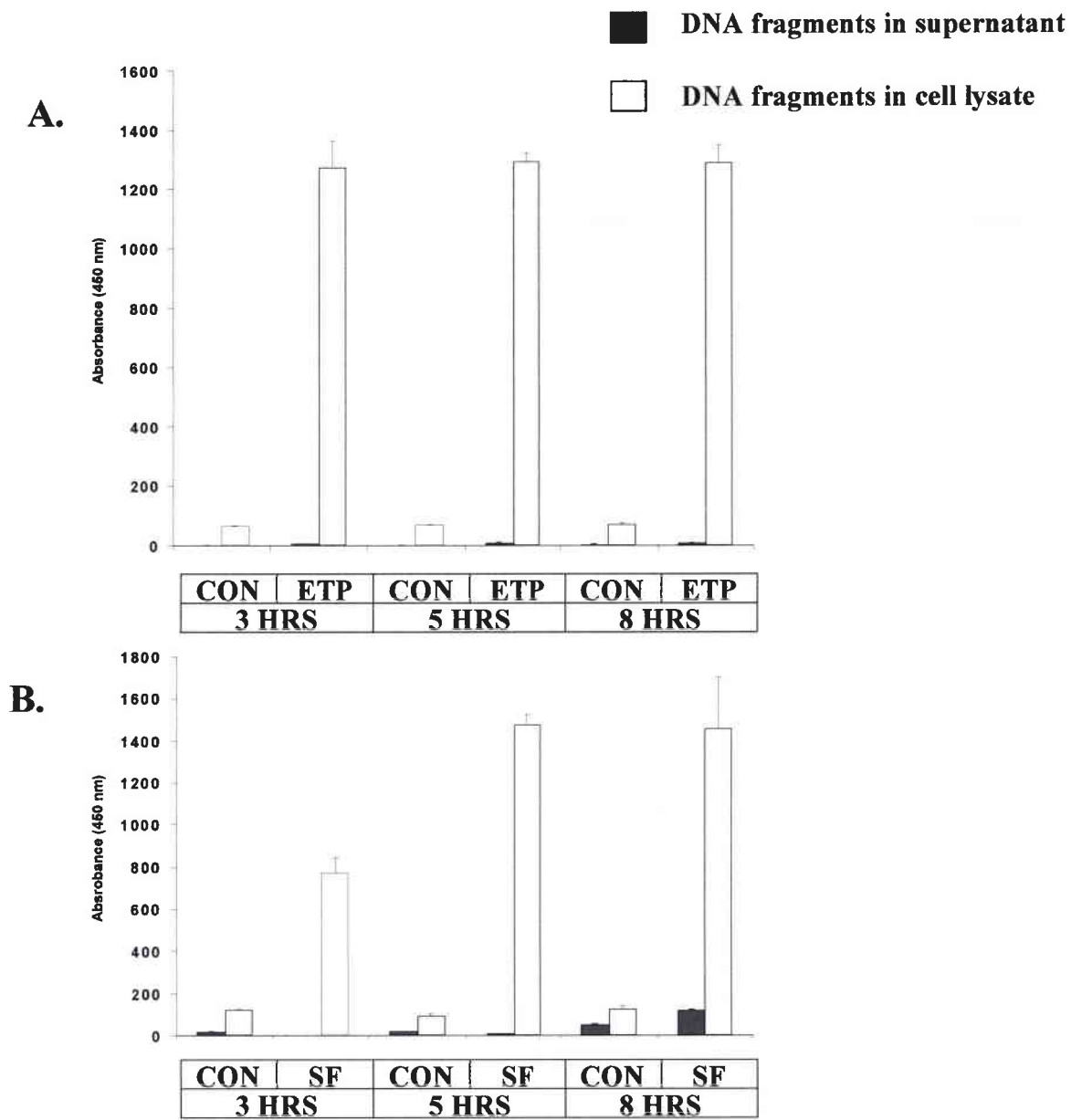


Fig. 2. DNA fragmentation measured by the 'Cellular DNA fragmentation ELISA' kit in HL60 cells (A) exposed to etoposide (40 μ g/ml) and serum-starved SHE cells (B) for 3, 5 and 8 hrs.

This method, based on BrdU-labelling of DNA, allowed the spectrophotometric quantification (450 nm) of fragments in cell lysate (intracellular fragments) and fragments resulting from membrane disruption in supernatant medium. Values represent means \pm S.D. of three independent measures.

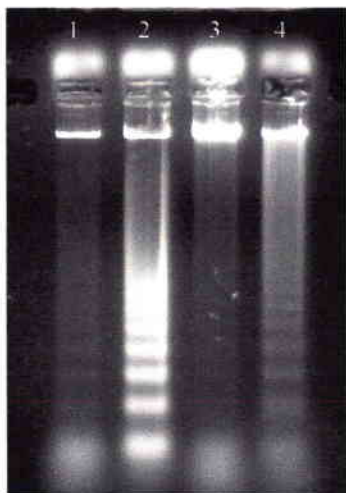


Fig. 3. DNA ladder pattern of fragmentation in HL60 cells exposed to 40 μ g/ml etoposide (2), and SHE cells starved of serum (4) for 5 hrs versus the corresponding control in HL60 cells (1) and SHE cells (3).

DNA was prepared using a 'Suicide-Track DNA ladder isolation' kit (Oncogene).

Results

Apoptosis was first studied in serum-deprived SHE cells and HL60 exposed to etoposide (40 μ g/ml) using the 'Cellular DNA fragmentation ELISA' assay. This assay measured DNA-fragmentation within cells, but also extracellular DNA fragments released from necrotic cells. Measurements after 3, 5 and 8 hrs of exposure showed that DNA fragmentation developed rapidly in both cell types (Fig. 2). DNA fragmentation in HL60 cells reached its highest level after less than 3 hrs of exposure to etoposide (40 μ g/ml), and this high level was maintained during the following 5 hrs. In serum-deprived SHE cells, DNA fragmentation increased with time up to 5 hrs and remained stable at 8 hrs. No significant increase in extracellular DNA fragments could be detected in the two cell types whatever the length of exposure, which demonstrated that cell death was caused by apoptosis and not by necrosis. The DNA fragmentation ladder pattern was clear in both HL60 and SHE cells after 5 hrs of treatment and confirmed that an apoptotic process had occurred (Fig. 3). These results were also corroborated by fluorescence microscopic observations of cells stained with acridine orange and ethidium bromide which showed typical features of apoptosis, such as chromatin condensation and nuclear fragmentation. Figure 4 represents modifications of nuclear morphology of SHE cells exposed to serum-free medium (B) compared to cells in normal control conditions of serum (A).

Western blot analysis of HL60 and SHE cell proteins using anti-PARP antibody (C-2-10) (Fig. 5) showed a 113-kDa signal in both sets of control cells. In HL60 cells, after 3 hrs of etoposide treatment, a second signal typical of apoptosis appeared at 89-kDa in addition to the 113-kDa signal. This 89-kDa band intensified after 5 and 8 hrs of treatment while the 113-kDa band disappeared almost completely. The 89-kDa signal could still be detected after 24 hrs of treatment, indicating the strong stability of the fragment (data not shown). In SHE cells, the signal for entire PARP (113-kDa) decreased dramatically after 3 hrs of serum deprivation and disappeared totally after 8 hrs of treatment. Only the 113-kDa band was recorded with the anti-PARP antibody and no 89-kDa signal was detected. These results were confirmed by several other experiments where each cell types followed its own pattern of PARP degradation, which has been described above.

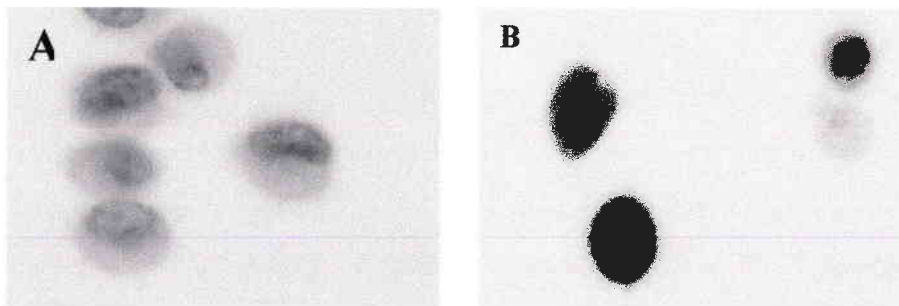


Fig. 4. Fluorescence microscopy observations of SHE cells in serum-supplemented medium (A) or exposed to serum-free conditions (B) for 5hrs. Samples were stained with a mixture of acridine orange and ethidium bromide ; apoptotic cells were revealed by their condensed chromatin and fragmented nuclei.

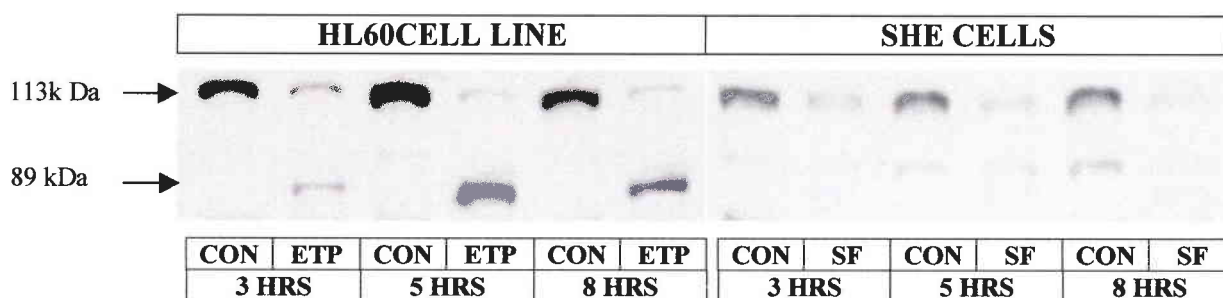


Fig. 5. Detection of PARP and of its apoptotic fragment using the anti-PARP antibody C-2-10 in HL60 cells exposed to etoposide (40µg/ml) (ETP) and serum-deprived SHE cells (SF) versus respective control cells (CON).

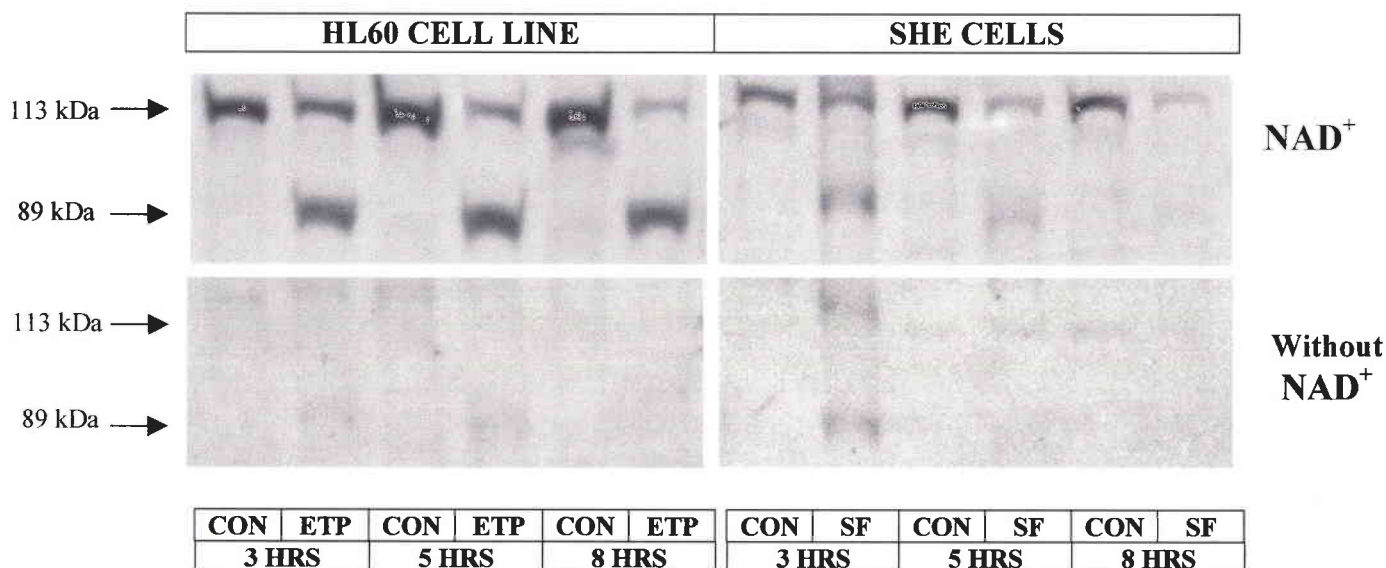


Fig. 6. Detection of PARP and of its apoptotic fragment using anti-pADPr antibody (LP96-10), after NAD⁺ incubation of the membrane or not, in HL60 cells exposed to etoposide (40µg/ml) (ETP) and serum-starved SHE cells (SF) versus respective control cells (CON).

The detection of isolated PARP and its 89-kDa fragment was also attempted using the anti-pADPr antibody (LP96-10) which revealed the pADPr polymer generated after the addition of NAD^+ to the transfer membrane (Fig. 6). In the presence of NAD^+ , HL60 control cell samples showed a unique signal at 113-kDa. After 3 hrs of exposure to etoposide, a second band appeared at 89-kDa which intensified after 5 and 8 hrs when the 113-kDa band progressively disappeared. Without NAD^+ , no pADPr signal was observed in HL60. In control SHE cells, the membrane exposed to NAD^+ revealed one band at 113-kDa which was not observed without NAD^+ . After 3hrs of serum withdrawal, another signal around 89-kDa was noted in SHE samples in addition to the 113-kDa one. The 113-kDa and 89-kDa were more intense with NAD^+ than without. After 5 hrs, these two bands had greatly decreased and had disappeared after 8 hrs. Several independent experiments were conducted, which confirmed these results.

Discussion

In the present study, we attempted to apply the Western blot analysis of PARP specific cleavage, which is described as an early hallmark of programmed cell death, to the detection of apoptosis in SHE cells. The HL60 cell line exposed to etoposide was used as a control of the reliability of the methods for detecting PARP cleavage. As HL60 cells did not undergo apoptosis in response to serum starvation and SHE cells were little sensitive to etoposide [13], two different apoptosis inducers were taken for the two models. In these conditions, apoptosis was unequivocally identified in SHE and HL60 cells, which presented the characteristic features of apoptotic cells, i.e. chromatin condensation, nuclear fragmentation, ladder configuration of DNA fragments after electrophoresis, and intracellular localization of DNA fragments associated with the maintenance of membrane integrity. The release of a small number of DNA fragments into the extracellular compartment was observed only after 5 hrs of experiment with SHE cells, as a result of membrane damage during the final steps of apoptosis.

In HL60 cells, the anti-PARP antibody (C-2-10) recognized the 113-kDa PARP and its 89-kDa fragment in apoptotic cells, as expected. In control SHE cells, the antibody also recognized PARP 113-kDa, but no 89-kDa fragment could be visualized in serum-deprived conditions during the disappearance of PARP.

A NAD⁺-dependent polymerase activity was measured on the membrane, revealing PARP 113-kDa from both control SHE and HL60 cells. In HL60 cells exposed to etoposide, a signal was obtained with the entire PARP and its 89-kDa fragment. In apoptotic SHE cells, the anti-polymer antibody detected a transitory 89-kDa fragment. PARP and this fragment appeared poly(ADP-ribosyl)ated in the first 3 hrs of treatment in apoptotic cells, with and without activation of the enzyme by NAD⁺. These poly(ADP-ribosyl)ation signals may result from a polymerase activity on the membrane in the presence of NAD⁺, but also from poly(ADP-ribosyl)ation of PARP during the first phase of apoptosis preceding its degradation [20]. The 113-kDa and 89-kDa signals detected with the anti-pADPr antibody rapidly disappeared after 3 hrs in apoptotic SHE cells, in contrast to apoptotic HL60 cells in which the 89-kDa signal intensified with time.

It appeared that the pattern of PARP cleavage in SHE cells differed from that observed in the HL60 cell line and did not lead to a persistent fragment. It could be hypothesized that PARP degradation continues after its first cleavage. Caspase-3 is an important protease of the apoptosis [21], the activation of which leads to the specific cleavage of PARP and the generation of the 89-kDa fragment as found in HL60 [3]. No induction of caspase-3 activity was noted in apoptotic SHE cells [13]. This is consistent with the fact that PARP degradation in SHE cells did not follow the classical pattern of apoptotic cleavage catalyzed by caspase-3 which is generally described. It could be presumed that other proteases than caspase-3 are involved in the proteolysis of PARP occurring in apoptotic SHE cells.

The fact that no 89-kDa band was identified with the anti-PARP antibody is consistent with the transitory signal obtained with the anti-polymer antibody. It can be supposed that PARP in SHE cells is cleaved by other proteases than caspase-3, at a site other than the DEVD one ; the protein degradation may deteriorate the site recognized by C-2-10 antibody and also the domain of the protein able to fix the polymer. Our results support the conclusion that the 89-kDa fragment does not persist during apoptosis in SHE cells, whereas it does in HL60 cells. Therefore, the search for this fragment cannot be used as a general biomarker of apoptosis, because it cannot be detected in some cell models.

Conclusion

The results showed that PARP rapidly disappeared during apoptosis in SHE cells, but the degradation did not produce a persistent 89-kDa fragment. This fragment remained undetectable with the anti-PARP antibody and was briefly detected with the anti-pADPr

antibody. These results underline the fact that while PARP cleavage is a criterion for apoptosis, the diagnosis of apoptosis cannot rely exclusively on the presence of a 89-kDa fragment as the signal may escape detection.

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 revising the English form of this paper.

References

1. Satoh M.S., Lindahl T., Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair, *Nature* 356 (1992) 356-358.
2. de Murcia G., Dantzer F., Trucco C., Rolli V., Oliver F.J., Niedergang C., Ménissier-de Murcia J., Poly(ADP-ribose)polymerase is required for maintenance of genomic integrity during base excision repair, *Nucleic Acids Mol Biol* 12 (1998) 83-102.
3. Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G., Earnshaw W.C., Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE, *Nature* 371 (1994) 346-347.
4. Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., Munday N.A., Raju S.M., Smulson M.E., Yamin T.T., Yu V.L., Miller D.K., Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis, *Nature* 376 (1995) 37-43.
5. Whitacre C.M., Berger N.A., Factors affecting topotecan-induced programmed cell death: adhesion protects cells from apoptosis and impairs cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase, *Cancer Res* 57 (1997) 2157-2163.
6. Meßmer U.K., Reimer D.M., Reed J.C., Brüne B., Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2, *FEBS Letters* 384 (1996) 162-166.
7. An S., Knox K.A., Ligation of CD40 rescues Ramos-Burkitt lymphoma B cells from calcium ionophore- and antigen receptor-triggered apoptosis by inhibiting activation of the cysteine protease CPP32/Yama and cleavage of its substrate PARP, *FEBS Letters* 386 (1996) 115-122.
8. Estoppey S., Rodriguez I., Sadoul R., Martinou J.C., Bcl-2 prevents activation of CPP32 cysteine protease and cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase and U1-70kD proteins in staurosporine-mediated apoptosis, *Cell Death Differ* 4 (1997) 34-38.
9. Rosenthal D.S., Ding R., Simbulan-Rosenthal C.M.G., Vaillancourt J.P., Nicholson D.W., Smulson M., Intact evidence for the early synthesis, and subsequent late apopain-mediated suppression, of poly(ADP-ribose) during apoptosis, *Exp Cell Res* 232 (1997) 313-321.
10. Shah G.M., Kaufmann S.H., Poirier G.G., Detection of poly(ADP-ribose)polymerase and its apoptosis-specific fragment by a nonisotopic activity-Western blot technique, *Anal Biochem* 232 (1995) 251-254.
11. 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., An interlaboratory comparison of transformation in

- Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals, *Environ Mutagenesis* 8 (1986) 77-98.
12. Schulte-Hermann R., Bursch W., Grasl-Kraupp B., Török L., Ellinger A., Müllauer L., Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis, *Toxicol Lett* 82/83 (1995) 143-148.
 13. Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G., Vasseur P., Detection of apoptosis induced by topoisomerase inhibitors and serum deprivation in Syrian hamster embryo (SHE) cells, *Exp Cell Res* 255 (2000) 30-39.
 14. Shah G.M., Shah R.G., Poirier G.G., Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose)polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells, *Biochem Biophys Res Comm* 229 (1996) 838-844.
 15. DiPietrantonio A.M., Hsieh T., Wu J.M., Activation of caspase 3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide, *Biochem Biophys Res Comm* 255 (1999) 477-482.
 16. Elias Z., Poirot O., Pezerat H., Suquet H., Schneider O., Daniere M.C., Terzetti F., Baruthio F., Fournier M., Cavelier C., Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells, *Carcinogenesis* 10 (1989) 2043-2052.
 17. Lamarre D., Talbot B., deMurcia G., Laplante C., Leduc Y., Mazen A., Poirier G.G., Structural and functional analysis of poly(ADP-ribose)polymerase : an immunological study, *Biochem Biophys Acta* 950 (1988) 147-160.
 18. Oliver Pozo F.J., de la Rubia Sanchez G., Niedergang C., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G., La poly(ADP-ribose)polymerase : un facteur de survie, *Médecine/Sciences* 14 (1998) 1196-1203.
 19. Affar E.B., Duriez P.J., Shah R.G., Sallmann F.R., Bourassa S., Küpper J.H., Bürkle A., Poirier G.G., Immunodot blot method for the detection of poly(ADP-ribose) synthesized in vitro and in vivo, *Anal Biochem* 259 (1998) 280-283.
 20. Donzelli M., Negri C., Mandarino A., Rossi L., Prosperi E., Frouin I., Bernardi R., Bürkle A., Scovassi I., Poly(ADP-ribose) synthesis: a useful parameter for identifying apoptotic cells, *Histochem J* (1997) 831-837.
 21. Porter A.G., Jänicke R.U., Emerging roles of caspase-3 in apoptosis, *Cell Death Differ* 6 (1999) 99-104.

C. Influence du zinc sur l'expression de *myc* en relation avec l'apoptose

Publication n°3 : Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G. and Vasseur P.,
Influence of $ZnCl_2$ on *c-myc* expression in relation with apoptosis,
Oncogene, soumis.

Type cellulaire	SHE normales		Lignée SHE Tr	
Sérum	15%	0%	15%	0%

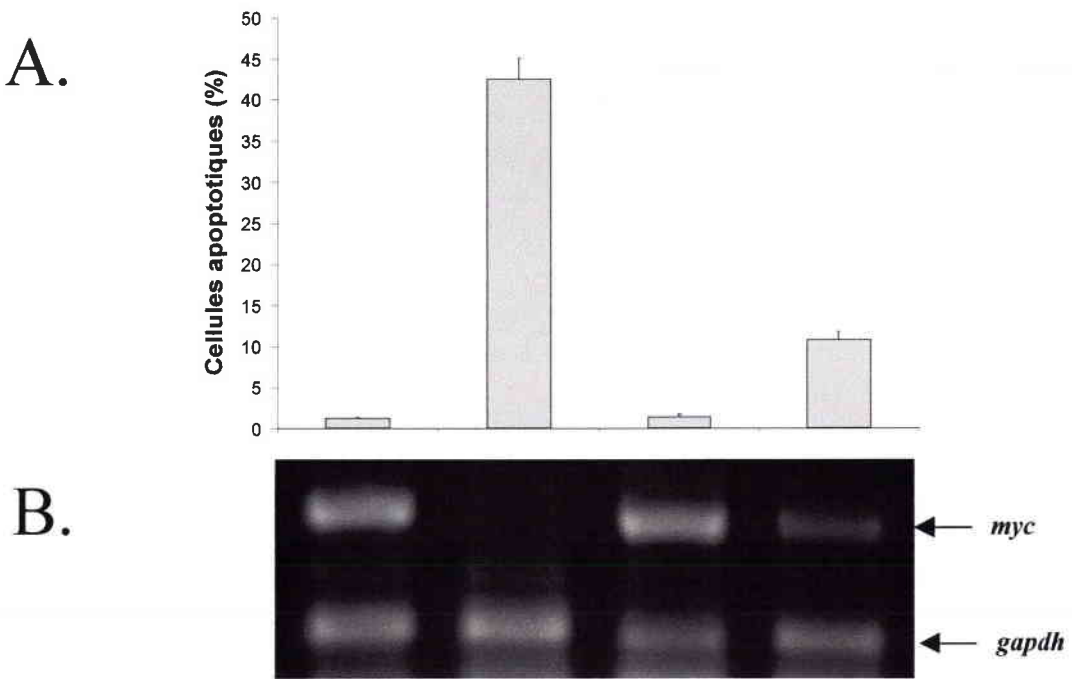


Figure 22. Etude de l'induction de l'apoptose, quantifiée par les modifications nucléaires observées en microscopie à fluorescence (495nm), des cellules SHE normales ou de la lignée des cellules SHE transformées (Tr), exposées 5 h à un milieu sans sérum (A). Analyse en RT-PCR de l'expression de *myc* dans les cellules SHE normales et la lignée SHE Tr, après 3 h de traitement par un milieu sans sérum. La coamplification de l'ADNc de la *gapdh* représente un contrôle interne.

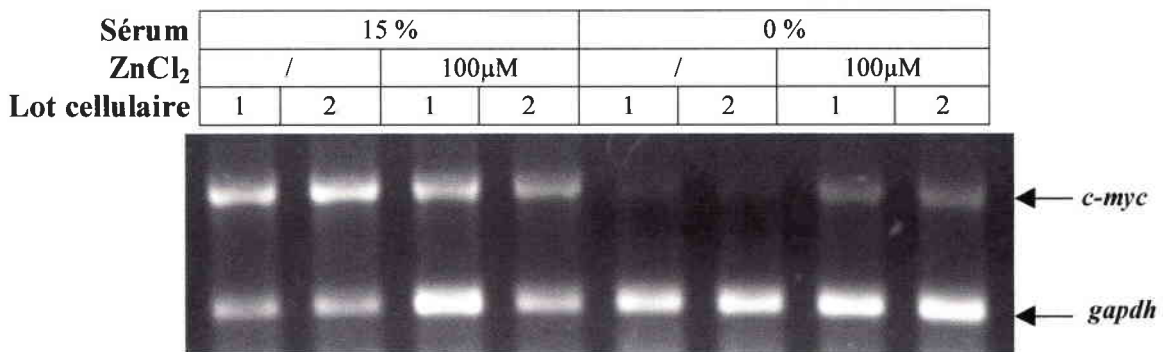


Figure 23. Analyse en RT-PCR de l'expression du gène *myc*, et du gène *gapdh* comme témoin, dans deux lots de cellules SHE normales. Les cellules ont été exposées 5 h à un milieu complet (15%) ou sans sérum (0%), supplémenté ou non par 100µM de ZnCl₂.

Introduction

L'apoptose induite par la privation des facteurs de croissance dans les cellules SHE s'accompagne d'une répression du gène *myc*. D'autre part, le zinc est décrit comme un inhibiteur puissant du processus apoptotique des cellules SHE privées de sérum.

Dans cette partie de l'étude, nous avons étudié l'action du zinc sous forme de chlorure sur l'expression du gène *myc* dans les cellules SHE en apoptose. Dans le cas d'une privation de sérum, la lignée des cellules HL60 ne répond pas de la même manière que les cellules SHE normales. En effet, les cellules HL60 n'entrent pas en apoptose et l'expression du gène *myc* reste stable dans ces conditions. Afin de déterminer si le type cellulaire ou le statut des cellules (normale ou transformé) était à l'origine des différentes réponses enregistrées, nous avons étudié la réaction d'une lignée de cellules SHE transformées par la némalite (SHE Tr), en comparaison avec les cellules SHE primaires. Les deux types cellulaires ont été caractérisés par leur contenu en protéine P53.

Nous avons par ailleurs étudié les effets du zinc sur l'expression du gène *bax* en relation avec l'apoptose.

Résultats

L'apoptose a été déterminée en microscopie à fluorescence par la condensation de la chromatine et la fragmentation nucléaire des cellules préalablement marquées à l'acridine orange (Fig. 22A). Le taux d'apoptose est très élevé dans les cellules SHE normales privées de sérum pendant 3h ; parallèlement, on observe une inhibition de l'expression du gène *myc* dans ces conditions (Fig. 22B). Les cellules transformées ont une apoptose réduite et ne montrent qu'une faible inhibition de l'expression de *myc* dans un milieu sans sérum.

Nous avons précédemment déterminé qu'une concentration de 100 μ M de ZnCl₂ inhibait la mort des cellules SHE privées de sérum. Les résultats de la figure 23 montrent que le zinc à 100 μ M empêche l'inhibition de l'expression de *myc* dans des cellules SHE primaires exposées à un milieu sans sérum, alors que l'expression de ce gène est totalement inhibée sans ZnCl₂. Le zinc à cette concentration ne présente aucun effet sur l'expression de *myc* en présence de sérum.

Durée traitement	5 heures				24 heures	
ZnCl ₂	/	100μM	300μM	1mM	/	100μM

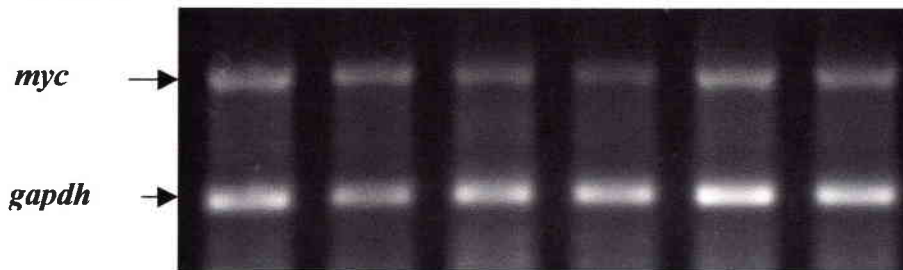


Figure 24. Analyse en RT-PCR de l'expression du gène *myc*, et de la *gapdh* comme témoin, dans les cellules SHE normales exposées durant 5 ou 24 h à un milieu complet (15% de sérum) supplémenté ou non en ZnCl₂.

Sérum	15 %				0 %			
ZnCl ₂	/		100μM		/		100μM	
Lot cellules	1	2	1	2	1	2	1	2

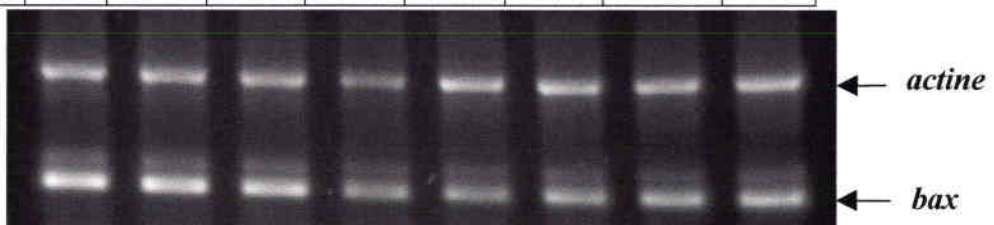


Figure 25. Analyse en RT-PCR de l'expression du gène *bax* en comparaison avec l'expression de l'*actine*, dans deux lots différents de cellules SHE normales (1 et 2) exposées à un milieu complet (15% de sérum) ou sans sérum (0%), supplémenté ou non par du ZnCl₂ (100μM) durant 5 h.

Le zinc étant moins disponible dans un milieu supplémenté en sérum, nous avons appliqué des concentrations supérieures à 100 μ M de ZnCl₂, notamment 300 μ M et 1mM, sur les cellules SHE normales cultivées à 15% de sérum (Fig. 24). Ces concentrations élevées ne produisent aucun effet sur l'expression du gène *myc* des cellules SHE après 5 h d'exposition. Cependant, nous avons noté que les concentrations de 300 μ M et 1mM réduisent les capacités des cellules à se fixer sur le fond de la boîte. Une exposition de 24 h à 100 μ M de chlorure de zinc ne modifie pas plus l'expression de *myc* ; les concentrations de 300 μ M et 1mM provoquent, après 24 h, une toxicité qui se traduit par la dégradation des ARNm.

En ce qui concerne le gène *bax*, dont une induction de l'expression peut être à l'origine de l'apoptose, la figure 25 représente son expression dans les cellules SHE primaires privées de sérum pendant 3 h en présence ou non de ZnCl₂ (100 μ M). L'expression de *bax* n'est modifiée par aucune des conditions testées, ni par l'absence de sérum, ni par l'ajout de zinc et le taux d'ARNm spécifique du gène reste semblable à celui des témoins.

Les cellules SHE primaires et transformées se différencient par leur taux respectif de protéines P53. La détection de P53 a été réalisée ici par immunohistochimie directement sur les cellules en tapis à l'aide des anticorps **DO7**, reconnaissant P53 normale et mutée, et **Pab240**, spécifique de P53 mutée uniquement (Fig. 26). Sans traitement, les cellules SHE primaires ne montrent aucune accumulation de P53 ; par contre, les cellules transformées présentent une stabilisation de la protéine, qui de plus apparaît mutée. Avec un traitement au 5FU (25 μ g/ml) pendant 5 h, les cellules primaires accumulent P53, mais la protéine ne montre pas de mutation.

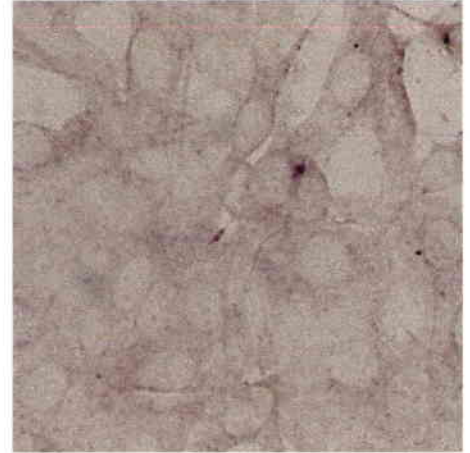
Discussion

myc est un gène reconnu dans nombre de types cellulaires comme un modulateur de la sensibilité à l'apoptose, qu'elle soit induite par la privation de sérum ou par d'autres stimuli. Son expression est directement liée à la présence de facteurs de croissance. Dans cette étude, nous avons constaté que le maintien de l'expression de *myc* par le zinc concordait avec une inhibition de l'apoptose. La lignée des cellules Tr s'est montrée peu sensible à la privation de sérum ; le phénomène apoptotique est presque inexistant et l'expression de *myc* est maintenue même après un retrait du sérum. Les observations réalisées sur la lignée des cellules HL60 sont identiques à celles relevées dans les cellules Tr. Les résultats montrent qu'une résistance à la privation de sérum pourrait être une caractéristique partagée par les lignées transformées ; cette résistance ne serait donc pas liée au type cellulaire. Les résultats obtenus avec ces deux

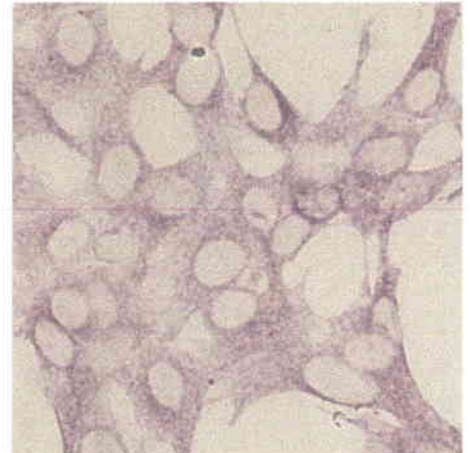
**Anticorps DO7
spécifiques de P53 normale et mutée**

**Anticorps Pab240
spécifiques de P53 mutée**

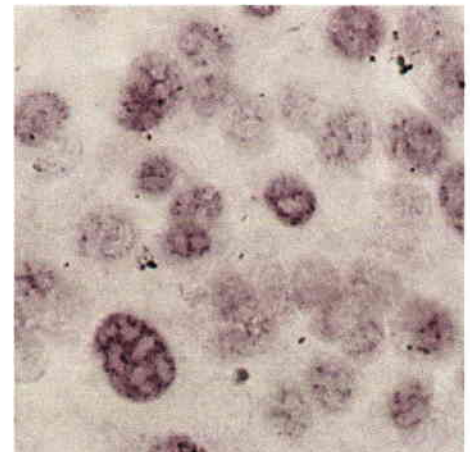
**SHE primaires
Sans traitement**



**SHE primaires
Traitement 5FU**



**SHE Tr
Sans traitement**



**Figure 26. Marquage immunohistochimique de la protéine P53 dans les cellules SHE transformées (Tr) et les cellules SHE primaires normales, avec l'anticorps DO7 qui reconnaît les protéines P53 normale et mutée, et avec l'anticorps Pab240 qui est spécifique de P53 mutée.
Les cellules SHE primaires surexpriment P53 après une intoxication de 5 h au 5FU (25µg/mL).**

lignées sont à prendre avec précaution lorsqu'il s'agit d'élucider les mécanismes de perturbations à l'origine de la transformation de cellules normales. De nombreux gènes sont modifiés dans les lignées transformées ; notons ici la présence d'une protéine P53 surexprimée et mutée dans les cellules SHE Tr.

On connaît les effets du zinc sur l'apoptose depuis de nombreuses années, mais le mode précis de son action reste obscur. Certains auteurs pensent qu'il agit principalement sur les endonucléases dégradant l'ADN ; d'autres affirment qu'il inhibe l'activation des caspases ou qu'il modifie le ratio Bcl-2/Bax. Une modulation de l'expression du gène *bax* ne semble pas intervenir dans l'apoptose induite par l'absence de sérum dans les cellules SHE. De même, le zinc n'a aucune influence sur l'expression de ce gène. Afin de compléter cette étude sur les facteurs induisant l'apoptose des cellules SHE, il aurait été intéressant d'analyser le gène *bcl-2* et de vérifier si son expression pouvait être liée aux effets anti-apoptotiques du zinc. Malheureusement, les essais en RT-PCR que nous avons tentés n'ont pas permis de détecter l'expression du gène *bcl-2* ; de même, l'analyse de la protéine en Western blot n'a pas été possible.

Dans les cellules SHE, myc est inhibé lors de l'apoptose par retrait des facteurs de croissance. ZnCl₂ intervient dans l'expression de myc en maintenant son expression en même temps qu'il inhibe l'apoptose. Cette régulation pourrait représenter une nouvelle cible du zinc dans l'inhibition de l'apoptose.

Influence of ZnCl₂ on c-myc expression in relation with apoptosis

S. Alexandre, C. Rast, G. Nguyen-Ba and Vasseur P.

Oncogene, soumis.

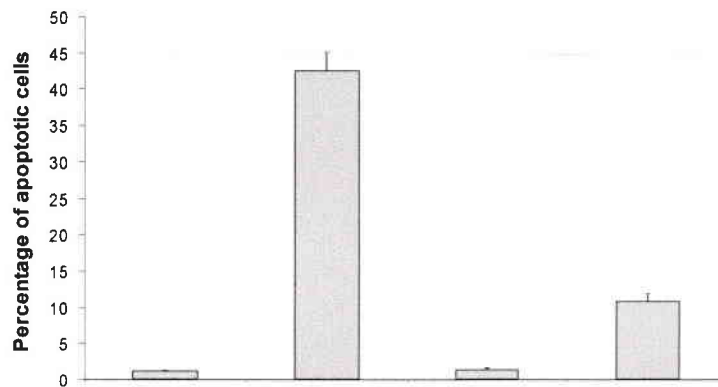
Abstract

In this study, we investigate the influence of ZnCl₂ on the expression of c-myc protooncogene in normal and transformed Syrian hamster embryo (SHE) cells in relation to apoptosis induced by serum withdrawal. Normal primary SHE cells exposed to a serum-free medium undergo rapid apoptosis characterised by a dramatic downregulation of c-myc transcription. In these normal cells treated with ZnCl₂, c-myc expression is maintained in serum-starved conditions while apoptosis is inhibited. The regulation of c-myc expression appears to be a target for zinc as an inhibitor of apoptosis. Zn²⁺ possibly prevents cell death by sustaining the level of c-myc transcription. The hypothesis that maintenance of c-myc expression allows cells to escape apoptosis is in accordance with results in transformed SHE cells which underwent low apoptosis and poor downregulation of c-myc in serum-deprived conditions.

The c-myc protooncogene is an important regulator of growth promotion, differentiation and apoptosis. A deregulated expression of this gene is often observed in tumour cells (Nesbit *et al.*, 1999). c-Myc mainly acts as a transcription factor and its biological activity in proliferation, malignant transformation and apoptosis is dependent on its binding to DNA in a sequence-specific manner in association with Max protein (Blackwood and Eisenman, 1991 ; Facchini and Penn, 1998). c-myc is an immediate early gene whose transcription correlates directly with mitogenic stimulation. In quiescent cells, c-myc mRNA and the resulting protein are undetectable but c-myc expression is rapidly induced by mitogen or serum stimulation to reach a transient maximum which is followed by a gradual decline to a detectable steady-state level in proliferating cells (Thompson *et al.*, 1985). Serum withdrawal leads to c-myc downregulation resulting in cell cycle arrest or apoptosis depending on cell type or growth conditions. We previously demonstrated that a downregulation of the c-myc gene paralleled apoptosis induced by serum deficiency in normal Syrian hamster embryo (SHE) cells, while no change was recorded in the transformed HL60 cell line. Moreover, ZnCl₂ blocked the apoptotic process in SHE cells, inhibiting morphological and biochemical features of

Cell type	Normal cells		Tr transformed cell line	
Serum	15%	0%	15%	0%

A.



B.



Figure 1 : Study of apoptosis induction quantified by nuclear modifications observed under a fluorescence microscope (495nm) in SHE cells, normal or transformed, exposed to complete or serum-free medium for 5 hrs and further stained with acridine orange (0.15mg/ml) ; the cells with a condensed or fragmented chromatin pattern characteristic of apoptosis were counted as apoptotic, whereas those with a homogenous chromatin pattern were counted as normal ; apoptotic cells were expressed as a percentage of total cells scored (A). In parallel, the figure shows the RT-PCR analysis of the *c-myc* mRNA of SHE cells exposed to the previous conditions for 3 hrs. Total RNA was extracted from cells with Extract-All solution (Eurobio) and cDNA was synthesised from 1µg 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* primers specific to the SHE cell sequence, with *gapdh* primers as an internal control. The annealing temperature was 55°C and the primers used were: hamster *c-myc*: GATCAGCTGSAGATGRTGACC and TTGCGGTTGTTGCTGATCTG (product: 731 bp), *gapdh*: TCCATGACAA-CTTTGGCATCGTGG and GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC (product: 377 bp) (B).

apoptosis such as chromatin condensation, nuclear fragmentation, PARP cleavage and DNA degradation (Alexandre *et al.*, 2000).

The implication of Zn^{2+} in modulating apoptosis is a well-known phenomenon studied for a long time in deprivation or supplementation experiments. *In vitro* and *in vivo* studies showed that Zn^{2+} deficiency can induce spontaneous apoptosis while Zn^{2+} supplementation has protective effects against the apoptotic death induced by a variety of agents (Sunderman, 1995). As Zn^{2+} prevents DNA fragmentation, its influence on apoptosis was initially attributed to an inhibition of Ca^{2+} and Mg^{2+} -dependent endonuclease (Cohen and Duke, 1984). But more recently, its site of action was thought to be located upstream in the apoptotic pathway. Zn^{2+} blocks the caspase way leading to the apoptotic PARP cleavage (Perry *et al.*, 1998). Activation of caspase-3, the enzyme responsible for the PARP degradation, seems to be prevented by an inhibition of caspase-6 or caspase-9, both of which are involved in caspase-3 activation (Takahashi *et al.*, 1996 ; Chai *et al.*, 1999). Another supposed target is the Bcl₂/Bax ratio which was reported to increase in Zn^{2+} -supplemented U937 cells (Fukamachi *et al.*, 1998). Though the flux of zinc play a pivotal role in a number of physiological events such as cell death and proliferation, the mechanisms of its action are not fully understood.

Syrian hamster embryo (SHE) cells are normal diploid cells and were shown to be particularly sensitive to serum deficiency-induced apoptosis when used at early passages (Alexandre *et al.*, 2000). In this study, we wanted to determine whether sensitivity to growth factor deprivation also holds true in transformed SHE cells, and furthermore, to investigate *c-myc* expression in relation to programmed cell death in normal cells. Moreover, this study allowed us to better define the site of action of Zn^{2+} in the inhibition of apoptosis. The role of *c-myc* expression in apoptosis has been widely investigated in tumour cells or in conditions of upregulation in transfected cells, but little is known about its role in normal cells, despite the interest of these models in elucidating mechanisms of perturbation of cell cycle control.

The transformed SHE-cell line (Tr) used in this study is derived from normal SHE cells exposed to nemalite, an asbestos fibre analogue (Elias *et al.*, 1997) and possesses tumorigenic properties. We found that after a 5hr-exposure to serum-deficient medium, normal SHE cells undergo massive apoptosis (40%) while the Tr cell line is rather insensitive to growth factor deprivation and shows only 10 % of apoptotic cells (FIG 1A). In serum-supplemented conditions, the level of *c-myc* expression measured using the RT-PCR technique is the same in both cell types. In contrast, removing serum from the medium totally inhibits *c-myc* transcription in normal SHE cells, while *c-myc* expression in the Tr cell line is only slightly

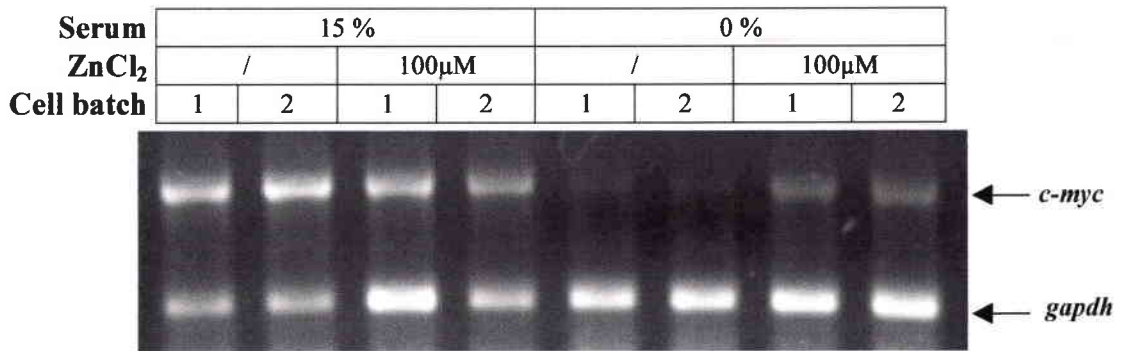


Figure 2 : RT-PCR analysis of the *c-myc* mRNA of two batches of SHE cells exposed for 5 hrs to serum-free medium supplemented or not with ZnCl₂ (100 μ M) versus the corresponding controls. The method is explained in figure 1.

reduced (FIG 1B). These first results underline the fact that *c-myc* regulation is related to the apoptotic process, and suggest a connection between the dramatic decrease in *c-myc* transcription and the incapability of cells of escaping cell death.

The influence of ZnCl_2 as an inhibitor of the apoptotic pathway was tested here on *c-myc* expression in normal SHE cells. In serum-starved medium, we noted that a concentration of $100 \mu\text{M}$ ZnCl_2 inhibited apoptosis in these cells (Alexandre *et al.*, 2000). No change in *c-myc* expression was found in Zn^{2+} -treated SHE cells in serum-supplemented medium. The present results show that *c-myc* expression is totally blocked after 5 hours without serum, but is maintained in the presence of ZnCl_2 ($100 \mu\text{M}$) despite the deprivation of growth factors. Though slightly lower, the *c-myc* transcription rate remains quite high in this latter condition (FIG 2).

In this work, we demonstrated that, in serum-deprived conditions, (i) normal primary SHE cells undergo apoptosis concurrently with a dramatic downregulation of the *c-myc* protooncogene ; (ii) exposure to ZnCl_2 inhibits cell death in normal SHE cells while the *c-myc* expression level remains high. These results allowed us to conclude that *c-myc* expression is a target for zinc, as an inhibitor of programmed cell death. They also led us to hypothesise that the maintenance of *c-myc* expression is responsible for the blockage of apoptosis in normal cells. The limited apoptosis and the poor downregulation of *c-myc* in the serum-deprived Tr cell line concur with this hypothesis, although the results could be explained by the transformed status of the cells, as will be discussed below.

The occurrence of the apoptotic process in normal serum-starved SHE cells is in agreement with the fact that apoptosis is a common process which is engaged unless cells receive sufficient survival signals to negate it (Raff, 1992). The low level of *c-myc* mRNA in these conditions is coherent with the close correlation between *c-myc* expression and the proliferating potential of the cell. In the presence of growth factors, basal *c-myc* expression remains steady throughout the cell cycle. But, upon growth factor withdrawal, *c-myc* mRNA and the resulting protein levels decline until they are undetectable (Dean *et al.*, 1986 ; Waters *et al.*, 1991). The Tr transformed cell line appears little sensitive to serum deprivation. The basal level of *c-myc* expression in proliferation conditions does not appear to be overexpressed in these cells compared to normal SHE cells, and in a serum-deprived medium the Tr cell line only slightly downregulates *c-myc* expression. An identical response was obtained in the serum-starved HL60 cell line, which sustained basal *c-myc* expression without entering apoptosis (Alexandre *et al.*, 2000). Thus, these results reflect the independence of transformed cells as regards growth factor deficiency (Waters *et al.*, 1991). Consequently, the

dramatic downregulation of *c-myc* expression in correlation with apoptosis cannot be seen as a causality factor. On the other hand, the fact that $ZnCl_2$ inhibits apoptosis in SHE cells and sustains *c-myc* expression even upon serum withdrawal could support the hypothesis that maintaining *c-myc* expression prevents apoptosis in normal SHE cells.

This work underlines the fact that Zn^{2+} plays a role in the regulation of *c-myc* transcription. A link between *c-myc* transcription and Zn^{2+} exposure had already been suggested in the HuH-7 cell line where $ZnSO_4$ tends to induce *c-myc* expression (Xu *et al.*, 1996).

The hypothesis that apoptosis is inhibited by sustaining a high *c-myc* transcription level holds true here in the event of serum deficiency. This assumption is consistent with the induction of apoptosis by TGF- β or immunoglobulin in the immature B cell lymphoma cell line, which is preceded by a decline in *c-myc* expression and can be prevented by stabilising the c-Myc protein (Fischer *et al.*, 1994 ; Wu *et al.*, 1996). Yet, generalising to any apoptotic factor or cell-type would invite criticism, since stress-induced apoptosis is subject to cell specificity and apoptosis occurs through different pathways depending on the apoptosis-inducing agents. Indeed, apoptosis caused by topoisomerase inhibitors in normal SHE cells was not accompanied with a decreased level in *c-myc* transcription, but was related to p53 stabilisation which was induced by DNA damage (Alexandre *et al.*, 2000). Moreover, these mechanisms may differ in untransformed and transformed cells, the latter being characterised by a deregulation of protooncogenes and tumour suppressor genes. For instance, in Burkitt lymphoma (Milner *et al.*, 1993), in CD3 cross-linked T cell hybridomas (Shi *et al.*, 1992), in TNF- α exposed SNU-16 (Park *et al.*, 1998), apoptosis was blocked by the downregulation of *c-myc* expression ; likewise, programmed cell death upon serum withdrawal was triggered by an overexpression of *c-myc* in cell lines like CHO (Gibson *et al.*, 1995) or Rat-1 (Evan *et al.*, 1992). In these cell lines, conditions leading to higher levels of c-Myc proteins predispose cells to apoptosis, and no decrease in *c-myc* expression was observed in conjunction with programmed cell death, unlike SHE cells.

In conclusion, the regulation of *c-myc* expression appears to be a novel target for zinc as an inhibitor of apoptosis in normal cells. Yet, the molecular events responsible for Zn^{2+} effects remain to be elucidated. The results also support the hypothesis that the inhibition of *c-myc* downregulation in SHE cells and the maintenance of its expression at basal level allow cells to escape apoptosis triggered by serum deprivation. The pattern of *c-myc* regulation illustrates a growth factor dependency and is specific to normal cells, whereas transformed cells failed to regulate its transcription in the same way. This study underlines the variability of response in

different cell types, and therefore the need to investigate an untransformed cellular model in order to elucidate the mechanisms of cell death.

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 revising the English form of this paper.

References

- Alexandre S, Rast C, Nguyen-Ba G and Vasseur P. (2000). *Exp. Cell Res.*, **255**, 30-39.
- Blackwood EM and Eisenman RN. (1991). *Science*, **251**, 1211-1217.
- Chai F, Truong-Tran AQ, Ho LH and Zalewski PD. (1999). *Immunol. Cell Biol.*, **77**, 272-278.
- Cohen JJ and Duke RC. (1984). *J. Immunol.*, **132**, 38-42.
- Dean M, Levine RA, Ran W, Kindy MS, Sonenshein GE and Campisi J. (1986). *J. Biol. Chem.*, **261**, 9161-9166.
- Elias Z, Poirot O, Danière MC, Terzetti F and Marande M. (1997). *Mut. Res.*, **379**, S198.
- Evan GI, Wyllie AH, Gilbert CS, Littlewood TD, Land H, Brooks M, Waters CM, Penn LZ and Hancock DC. (1992). *Cell*, **69**, 119-128.
- Facchini LM and Penn LZ. (1998). *FASEB J.*, **12**, 633-651.
- Fischer G, Kent SC, Joseph L, Green DR and Scott DW. (1994). *J. Exp. Med.*, **179**, 221-228.
- Fukamachi Y, Karasaki Y, Sugiura T, Itoh H, Abe T, Yamamura K and Higashi K. (1998). *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **246**, 364-369.
- Gibson AW, Cheng T and Johnston RN. (1995). *Exp. Cell Res.*, **218**, 351-358.
- Milner AE, Grand RJA, Waters CM and Gregory CD. (1993). *Oncogene*, **8**, 3385-3391.
- Nesbit CE, Tersak JM and Prochownik EV. (1999). *Oncogene*, **18**, 3004-3016.
- Park IC, Park MJ, Lee SH, Choe TB, Jang JJ and Hong SI. (1998). *Cancer Lett.*, **125**, 17-23.
- Perry DK, Smyth MJ, Stennicke HR, Salvesen GS, Duriez P, Poirier GG and Hannun YA. (1997). *J. Biol. Chem.*, **272**, 18530-18533.
- Raff MC. (1992). *Nature*, **356**, 397-400.
- Shi Y, Glynn JM, Guilbert LJ, Cotter TG, Bissonnette RP and Green DR. (1992). *Science*, **257**, 212-214.
- Sunderman FW. (1995). *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **25**, 134-142.
- Takahashi A, Alnemri ES, Lazebnik YA, Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Moir RD, Goldman RD, Poirier GG, Kaufmann SH and Earnshaw WC. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 8395-8400.
- Thompson CB, Challoner PB, Neiman PE and Groudine M. (1985). *Nature*, **314**, 363-366.
- Waters CM, Littlewood TD, Hancock DC, Moore JP and Evan GI. (1991). *Oncogene*, **6**, 797-805.
- Wu M, Arsur M, Bellas RE, Fitzgerald MJ, Lee H, Schauer SL, Sherr DH and Sonenshein GE. (1996). *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5015-5025.
- Xu J, Xu Y, Nguyen Q, Novikoff PM and Czaja MJ. (1996). *Am. J. Physiol.*, **270**, G60-G70.

D. Influence du zinc sur la transformation morphologique des cellules SHE

Publication n°4 : Alexandre S., Rast C., Orfila L. and Vasseur P.,

ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation and increases Benzo(a)pyrene and Fomesafen effects, *Carcinogenesis*, soumis.

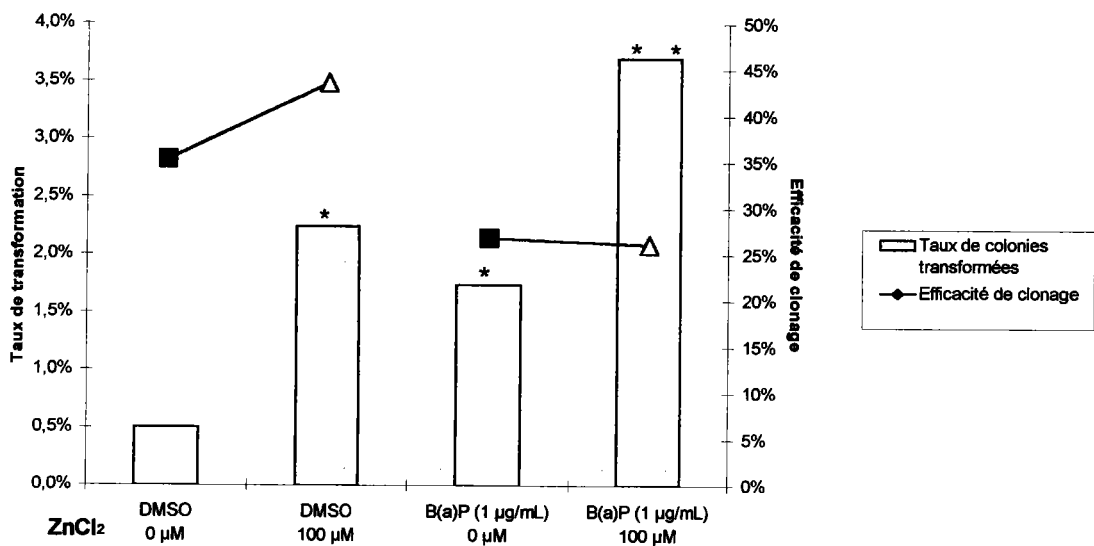


Figure 27A : Effet du BaP (1µg/mL) sur l'efficacité de clonage, en présence de ZnCl₂ (100µM) (triangle) ou non (carré), et sur la transformation morphologique (histogramme) des cellules SHE. Les cellules traitées par le DMSO représentent les cellules témoins.

* Taux de transformation significativement différent du contrôle sans B(a)P ($p < 0.05$).

* Taux de transformation significativement différent du contrôle sans ZnCl₂ ($p < 0.05$).

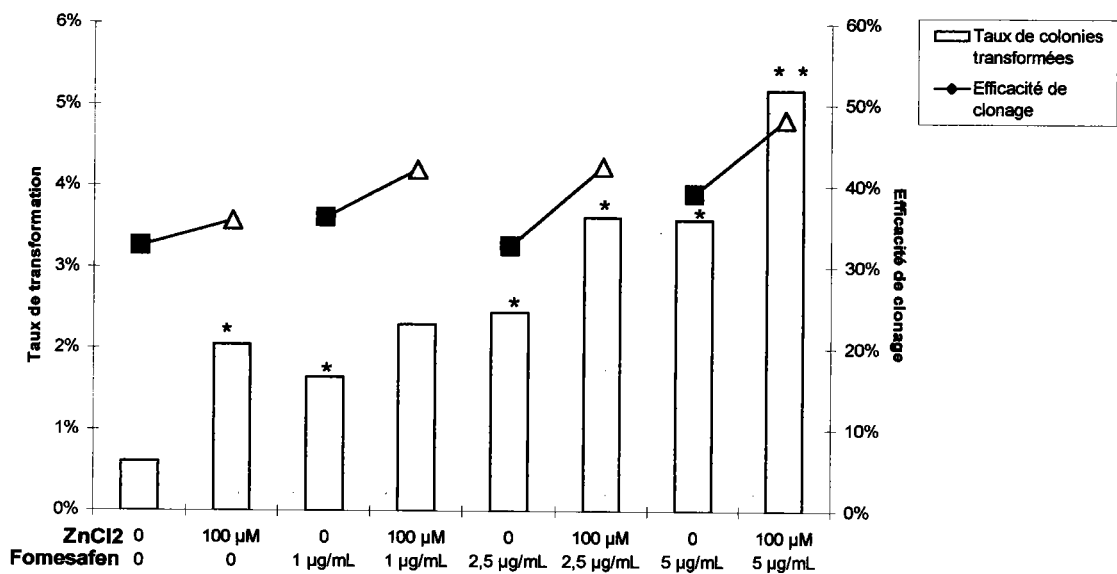


Figure 27B : Effet du Fomesafen en association avec ZnCl₂ (100µM) sur l'efficacité de clonage, en présence d'un supplément en zinc (triangle) ou non (carré), et sur la transformation morphologique (histogramme) des cellules SHE.

* Taux de transformation significativement différent du contrôle sans fomesafen ($p < 0.05$).

* Taux de transformation significativement différent du contrôle sans ZnCl₂ ($p < 0.05$).

Introduction

Après avoir identifié les facteurs pro- et anti-apoptotiques dans les cellules SHE, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle une inhibition de l'apoptose pourrait favoriser le développement d'un phénotype néoplasique. Les précédentes études ayant confirmé le zinc comme un inhibiteur du processus apoptotique des cellules SHE, nous avons étudié les effets de cet élément dans le cadre de l'essai de transformation morphologique. Dans cet essai, les cellules SHE sont testées en densité clonale. Le zinc sous forme de chlorure a été appliqué seul ainsi qu'en association avec deux autres substances : le BaP et le fomesafen, respectivement inducteur et inhibiteur de l'apoptose dans les cellules SHE.

Le BaP, cancérigène génotoxique fréquemment utilisé en tant que contrôle positif du test de transformation morphologique (Tu *et al.*, 1986), s'était révélé inducteur d'apoptose dans les cellules SHE. Le fomesafen est un herbicide appartenant à la catégorie des inducteurs des proliférateurs de peroxyosomes (HPPs), classés cancérigènes non-génotoxiques (Krijt *et al.*, 1999). Le caractère non-génotoxique de cette substance, ainsi que sa capacité à inhiber l'apoptose que nous avons démontrée préalablement, ont motivé le choix du fomesafen pour une étude en parallèle au BaP.

Résultats

Nous avons montré précédemment que le $ZnCl_2$ inhibait l'apoptose des cellules SHE induite par un milieu sans sérum à une concentration de $100\mu M$; ce qui se traduit par le maintien des principales structures membranaires, la préservation de l'intégrité de l'ADN, l'inhibition de la dégradation de la PARP et le maintien d'un taux basal d'expression du gène *myc*. Des essais préliminaires ont également démontré que cette concentration de $100\mu M$ de $ZnCl_2$ convenait à la croissance des cellules SHE dans les conditions de clonage. Des concentrations plus élevées de zinc comme 200, $300\mu M$ ou 1mM inhibent partiellement ou totalement la formation de colonies.

Le zinc utilisé seul s'est révélé induire de manière significative la transformation morphologique, en parallèle à une augmentation de l'efficacité de clonage. De plus, en association avec le BaP ou le fomesafen, il permet une amplification du potentiel transformant des deux produits.

Le BaP à la concentration de $1\mu g/mL$ augmente le taux de transformation des colonies SHE. Il présente une certaine toxicité qui se traduit par une diminution de l'efficacité de clonage

- Fragmentation de l'ADN
- ▨ Fragmentation de l'ADN en présence de zinc (100μM)

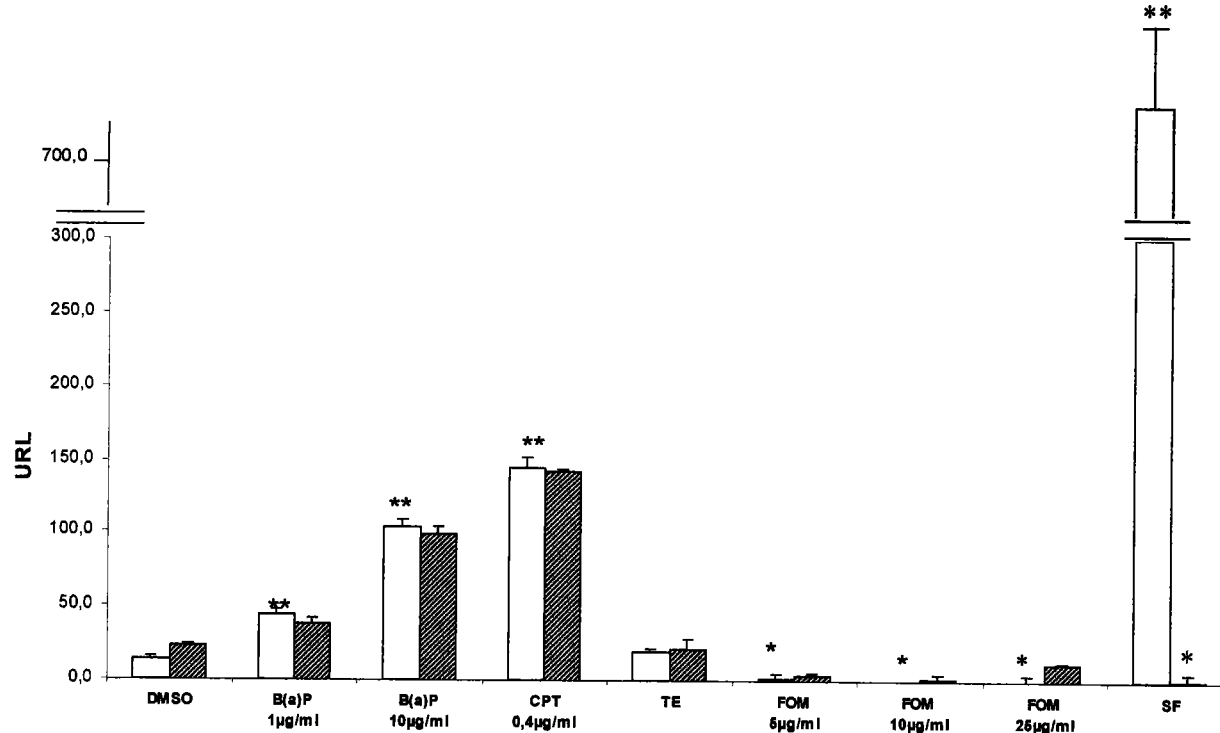


Figure 28. Fragmentation de l'ADN, mesurée à l'aide du kit 'Cellular DNA Fragmentation ELISA', dans les cellules SHE exposées au BaP, à la camptothécine (CPT), par rapport au témoin DMSO ; au fomesafen (FOM) et à un milieu sans sérum (SF), par rapport au témoin (TE) sans traitement. Les substances ont été appliquées en présence ou non de ZnCl₂ (100μM). ** Résultats significativement différents des cellules traitées au DMSO ($p < 0.01$), * résultats significativement différents des cellules témoins ($p < 0.05$), * résultats significativement différents par rapport au traitement sans zinc ($p < 0.01$).

après 7j d'exposition. Le zinc appliqué simultanément au BaP augmente le taux de transformation, mais ne modifie pas l'efficacité de clonage observée avec le BaP seul (Fig. 27A).

Le fomesafen se révèle être également un agent transformant qui induit une transformation morphologique de manière dose-dépendante aux concentrations de 1-2,5-5µg/mL. L'exposition au fomesafen favorise la formation des colonies et on note une efficacité de clonage plus élevée lors du traitement avec cette substance que dans les témoins. Le zinc augmente encore la transformation morphologique et l'efficacité de clonage des cellules exposées au fomesafen (Fig 27B).

La mesure des critères biochimiques caractéristiques de l'apoptose nécessite une biomasse cellulaire assez importante, de l'ordre de quelques milliers de cellules. Ceci exclut toute possibilité de mesurer l'apoptose dans les conditions de l'essai de transformation, dans lequel les cellules SHE sont ensemencées en densité clonale. Pour tester l'action du BaP et du fomesafen sur le processus apoptotique, nous avons quantifié la fragmentation de l'ADN par la méthode ELISA de dosage des fragments intracellulaires, dans les cellules SHE à forte densité, après quelques heures de traitement par les deux substances (Fig. 28). Le BaP induit la fragmentation de l'ADN typique de l'apoptose aux concentrations de 1 et 10µg/mL. Le fomesafen inhibe significativement la fragmentation à toutes les concentrations testées (5, 10 et 25µg/mL).

ZnCl₂ (100µM), utilisé seul ou en association avec le BaP ou le fomesafen, n'a aucun effet sur la fragmentation de l'ADN des cellules SHE, cultivées à 15% de sérum. Des essais complémentaires sur les effets du zinc sur l'apoptose ont montré qu'il faut augmenter les concentrations de zinc à 300µM et 1mM pour qu'il inhibe l'apoptose des cellules SHE en présence de sérum ; la concentration de 100µM est insuffisante pour en modifier les effets apoptotiques (Fig. 29). Il faut rappeler que cette concentration de 100µM de ZnCl₂ inhibait l'apoptose induite par un retrait de facteurs de croissance, c'est à dire dans des conditions où les cellules sont cultivées sans sérum.

Une analyse du zinc total et libre dans les milieux utilisés a été réalisée pour déterminer la biodisponibilité de cet élément par rapport aux cellules en culture (Tableau XI). Dans un milieu sans sérum supplémenté en ZnCl₂ (100µM), la quantité de zinc libre correspond à la quantité de zinc total ; par contre, dans un milieu contenant 15% de sérum de veau foetal supplémenté en ZnCl₂, le zinc libre est en quantité deux fois moindre que la quantité de zinc total suggérant une chélation ou une adsorption du zinc sur les protéines sériques. Pour une même concentration en ZnCl₂, le zinc est deux fois plus disponible dans un milieu sans sérum.

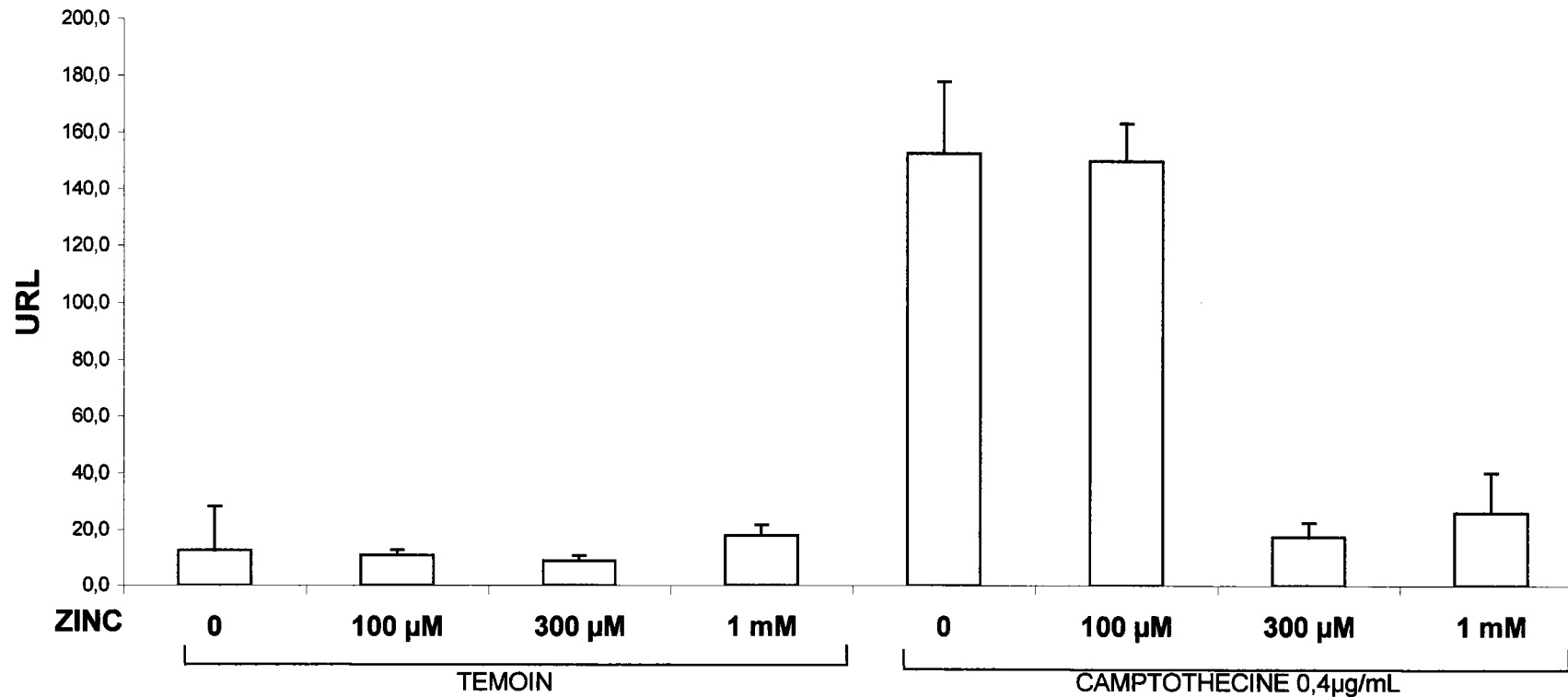


Figure 29. Fragmentation de l'ADN mesurée à l'aide du kit "Cellular DNA Fragmentation ELISA", dans le milieu intracellulaire des cellules SHE exposées à la camptothécine (0,4µg/mL) pendant 5 h, ou non exposées (TEMOIN). Les traitements ont été réalisés en présence ou non de ZnCl₂.

Tableau XI. Concentrations en zinc dans le milieu DMEM supplémenté ou non en sérum de veau fœtal (SVF) et en zinc. Pourcentages du métal mesurés dans le milieu après filtration sur une membrane de porosité 10kDa, en comparaison avec les concentrations totales de zinc.

	SVF	[Zn] en μM	% [Zn]		
			[Zn] en μM dans le milieu supplémenté en Zn	filtré au travers d'une membrane de porosité de 10kDa	fixé aux macromolécules > 10kDa *
DMEM	0 %	$8 \cdot 10^{-2}$	-	100	0
	15 %	8.4	100	100	0
			-	4	96
			100	50	50

* la fraction de zinc fixée aux macromolécules de taille supérieure à 10kDa est calculée comme étant la concentration totale de zinc – la concentration obtenue après filtration.

Discussion

Le zinc augmente le taux de transformation des cellules SHE lorsqu'il est utilisé seul ou en association avec des produits cancérigènes comme le BaP ou le fomesafen. L'expérience ne révèle pas si le zinc agit de manière additive ou synergique avec les cancérigènes testés. Cependant, on note une augmentation de la proportion des colonies, associée à l'augmentation de la transformation dans le cas d'une double exposition au zinc et au fomesafen, ce qui suggère un effet additif des deux produits.

L'augmentation du taux de transformation des colonies exposées au zinc et au BaP n'est pas liée à une hausse de l'efficacité de clonage. Dans ce cas, le zinc pourrait intervenir au niveau du processus de transformation en empêchant l'élimination des cellules les plus altérées par le BaP.

Casto et ses collaborateurs (1979) ont montré que le chlorure de zinc, sans affecter la fidélité de réplication de l'ADN, augmentait la fréquence de transformation des cellules SHE induite par un adénovirus. Ces données sont en accord avec les résultats que nous avons obtenus.

Le zinc à $100\mu\text{M}$ ne montre pas d'effet sur l'apoptose dans les essais à court terme lorsqu'il est testé dans un milieu supplémenté en sérum. Il aurait fallu vérifier l'activité de cet élément dans les conditions à long terme de l'essai de transformation, ce qui est impossible avec les techniques actuelles. Nous n'excluons pas une action anti-apoptotique du zinc dans l'essai de transformation même à cette faible concentration. Notre hypothèse est que le zinc agirait avec plus d'efficacité sur un phénomène apoptotique peu massif, intervenant lors de la transformation ; et une plus longue durée d'exposition renforce probablement son activité.

ZnCl₂ induces Syrian hamster embryo (SHE) cell transformation and increases Benzo(a)pyrene and Fomesafen effects

S. Alexandre, C. Rast, L. Orfila and Vasseur P.

Carcinogenesis, soumis.

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 (100µM) was shown to induce morphological transformation 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. The transforming effects of these two carcinogens on SHE cells were potentiated by 100µM zinc. The cloning efficiency of SHE cells seeded at clonal density was increased by zinc, fomesafen and furthermore by the mixture of the two chemicals. This increase in cell viability could be explained by the antiapoptotic action of zinc and fomesafen on SHE cells. These results corroborated the theory of a relationship between the inhibition of apoptosis and induction of cell transformation. On the other hand, the relationship was less clear in the case of BaP, whose toxicity on SHE cells was not modified by a co-treatment with zinc.

No change in *myc* and *bax* expressions was observed in zinc-treated SHE cells.

Key words : *apoptosis, interaction, morphological transformation, zinc*

Introduction

Apoptosis, a cell suicide pathway, is implicated in various physiological events such as cell development, differentiation and the elimination of damaged cells (1). 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 (2-6). Tumorigenicity is often associated with the disruption of the genes activating apoptosis, or with the activation of antiapoptotic agents (7). Zinc has also been shown to interfere with the apoptotic process. While zinc deficiency induces apoptosis *in vivo*

and *in vitro* under 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 (8). In a previous study, we demonstrated that programmed cell death in serum-deprived Syrian hamster embryo (SHE) cells was totally inhibited by $ZnCl_2$ (9). In these cells, the addition of Zn^{2+} prevented the dramatic downregulation of *c-myc* protooncogene expression which follows serum deprivation (S.Alexandre *et al.*, in preparation). 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 effects of two carcinogens, benzo(a)pyrene (BaP) and fomesafen, a diphenyl ether herbicide. BaP is a genotoxic carcinogen, used as a positive control in bioassays for genotoxicity and in the SHE cell transformation assay (10). Fomesafen is a non-genotoxic peroxisome proliferator, responsible for preneoplastic changes and hepatocellular carcinoma in long-term experiments on rodents (11). 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, which was carried out at clonal density.

Syrian hamster embryo (SHE) cells, used at early passages, constitute the basis of the *in vitro* transformation assay, for detecting genotoxic and non-genotoxic carcinogens (10, 12-14). 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 (15-17). 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 tumours when injected into isolog animals (12, 18).

In the present study, it will be shown that 100 μM zinc, added to the culture medium, induces neoplastic transformation in SHE cells and increases the transforming effects of BaP and fomesafen. These results will be discussed in relation to apoptosis and to the concentrations of available zinc in the test medium.

Materials and methods

Chemicals

Benzo[a]pyrene (C.A.S.n° 50-32-8) and camptothecin (C.A.S.n° 7689-03-4) were purchased from Sigma-Aldrich. Fomesafen (C.A.S. n° 72178-02-0) was kindly provided by L.Orfila. ZnCl₂ (C.A.S.n° 7646-85-7) was purchased from Merck. BaP and camptothecin were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO), fomesafen and ZnCl₂ 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.

SHE cell culture

Primary cells of Syrian hamster embryos at 13 days gestation were prepared as described by Pienta *et al.* (15) and modified by Elias *et al.* (19). 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% foetal calf serum (FCS; Hyclone), 2.2g/l NaHCO₃, and antibiotics (Gibco) at 37°C in a 10% CO₂ humidified atmosphere. Stock cells were preserved in liquid nitrogen in several ampoules and were used in the transformation and apoptosis detection assays.

Transformation assay

The transforming effect of chemicals was studied in three independent series of assays according to the procedure described previously (10,18-21). 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, pH 7, supplemented with 15% foetal calf serum). 100µM ZnCl₂ was introduced to the test medium at this time in zinc treated cells. 24hrs after seeding, BaP (1µg/mL) or fomesafen (1, 2.5 or 5µg/mL) was applied, either alone or in association with ZnCl₂, 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 morphological transformation (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.

Khi-2 test was used for statistical analysis.

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)-labelled DNA fragments. To summarise, after exposure to BrdU for 17 hrs, cells were reseeded into a microplate (10⁵ cells/well) and treated for 5 hrs. Supernatant and cell lysate were transferred into an anti-DNA precoated microtiter plate and analysed using the ELISA procedure. After incubation, DNA was fixed and denatured by exonuclease III (Sigma-Aldrich). DNA fragmentation was measured spectrophotometrically (at 450 nm, and 690

nm as the reference wavelength) after the anti-BrdU-peroxidase conjugate and the substrate solutions had been added. BrdU-labelled 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. Camptothecin, at the concentration of 0.4 µg/mL, 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.

RT-PCR analysis

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. The annealing temperature was 55°C and the primers used were: (1) *c-myc*: GATCAGCTGSAGATGRTGACC and TTGCGGTTGTTGCTGATCTG (product: 731 bp), (2) *bax*: TCC ACC AAG AAG CTG AGC GAG and CCA TCT TCT TCC AGA TGG TGA (product: 411 bp), (3) *actin*: GGAYGAYATGGAGAARATCTGG and CCTGYTTGCTGAYCCACATCTG (product: 845 bp), (4) *GAPDH*: TCCATGACAA-CTTTGGCATCGTGG and GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC (product: 377 bp).

Zinc analysis in the culture medium

Zinc concentrations were determined using atomic emission spectrometry (Beckman, Spectra—Span V, type DCP). The metal measurements were carried out in DMEM and in DMEM supplemented with 15% FCS, either with or without 100 µM zinc. Zinc was also measured in the media filtered through a membrane of 10-kDa porosity.

Results

In preliminary studies, the effects of different concentrations of ZnCl₂ on the cloning efficiency (CE) of SHE cells were evaluated in order to ascertain a non-toxic dose of Zn²⁺ which could be applied to SHE cells during the 8 day period of the cell transformation assay. While 300 µM, 1 mM and 10 mM ZnCl₂ were highly toxic and did not allow colony formation, 100 µM ZnCl₂ was found not to affect cloning efficiency in the experimental conditions of the MT assay. The concentration of 100 µM was even noted to slightly favor colony development, and consequently was used to study the effects of zinc on the cell transformation process.

The results of the SHE transformation assays on zinc-treated cells showed that the addition of 100 µM ZnCl₂ to the test medium raised cloning efficiency to 40%, compared to 34% in

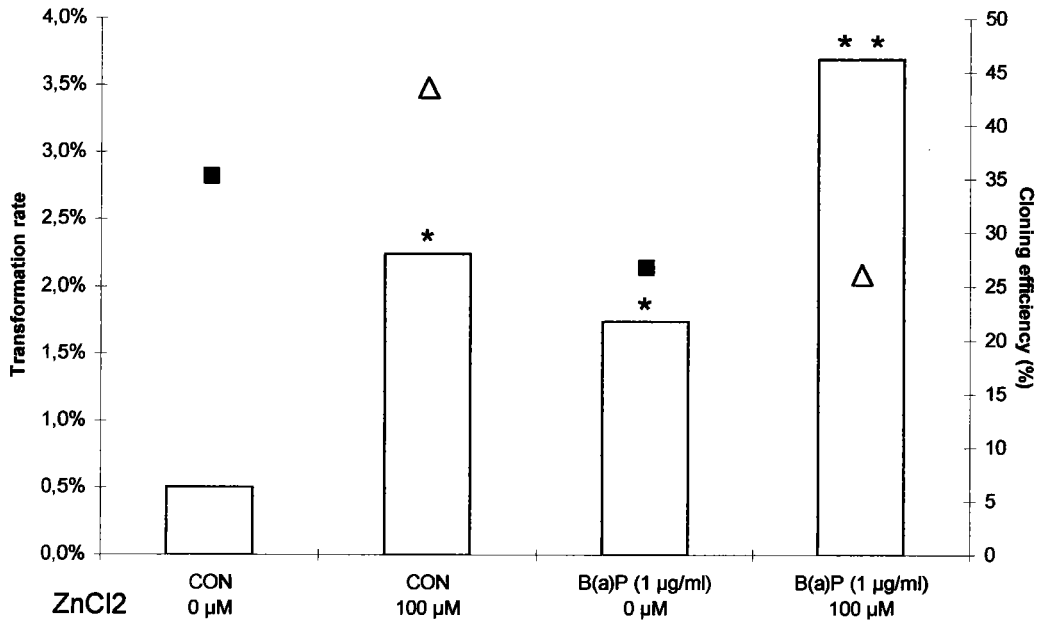


Fig. 1. Effect of B(a)P (1 μg/ml) and ZnCl₂ (100μM) on morphological transformation (histogram) of SHE cells and parallel evaluation of cloning efficiency in Zn-free medium (square) and in Zn-supplemented medium (triangle).
 * Transformation rate significantly different from the respective control (CON) without B(a)P ($p < 0.05$).
 * Transformation rate significantly different from the respective control without ZnCl₂ ($p < 0.05$).

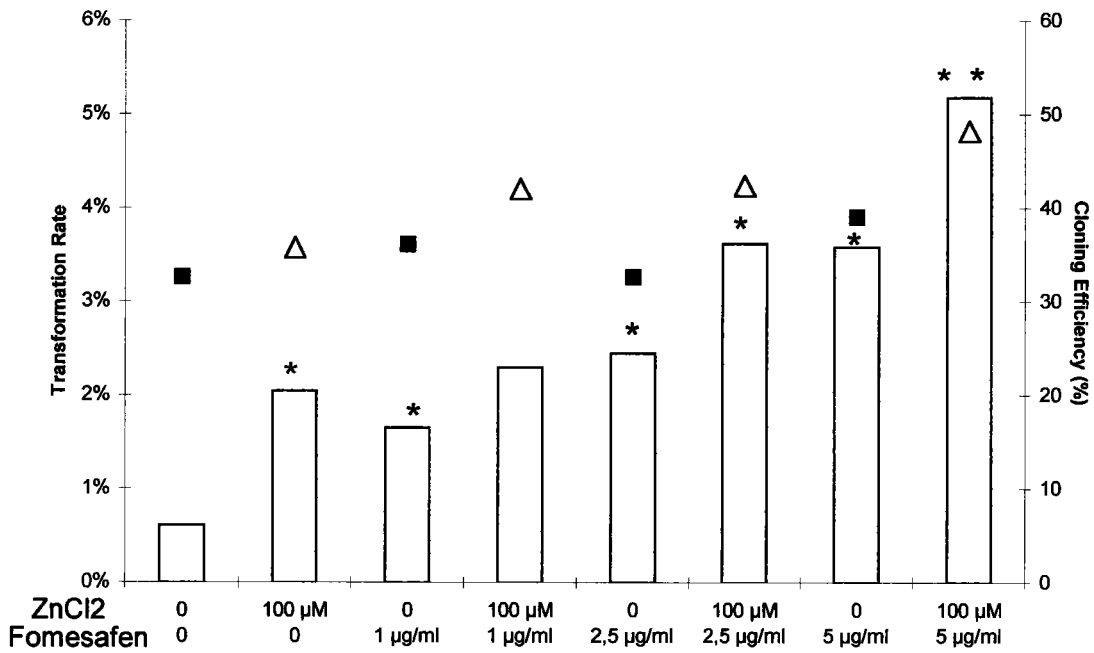


Fig. 2. Effect of fomesafen and ZnCl₂ (100μM) on morphological transformation (histogram) of SHE cells and, in parallel, cloning efficiency, with zinc (triangle) and without zinc (square).
 * Transformation rate significantly different from the respective control without fomesafen ($p < 0.05$).
 * Transformation rate significantly different from the respective control without ZnCl₂ ($p < 0.05$).

controls. This concentration significantly increased the transformation frequency of SHE colonies to 2.2%, in comparison with 0.5% in the controls (Table 1).

Table 1 : Effects of zinc, added to the culture medium, on cloning efficiency and transformation frequency in SHE cells seeded at clonal density in the MT assay.

[Zn] in μM	Total Nb of colonies	% cloning efficiency	Nb of transformed colonies	% transformation frequency
0	2568	34	14	0.5
100	3033*	40*	66*	2.2*

* significantly different from controls $p < 0.01$.

Nb : number.

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 ; the toxicity of BaP also had an effect on cloning efficiency, which fell from 35.3% in the control dishes, to 26.8% in the treated ones (Figure 1). A coexposure of SHE cells to ZnCl_2 and BaP, amplified transformation frequency to 3.7%. However, the decrease in cloning efficiency noted in BaP-exposed cells was not modified by Zn^{2+} application.

Fomesafen was shown to induce a dose-dependent morphological transformation of SHE cells. The transformation frequency increased from 0.6 % in the controls to 1.7%, 2.4% and 3.6% after exposure to 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fomesafen, respectively. A co-exposure of fomesafen-treated cells to ZnCl_2 amplified the transformation effects which reached 2.3%, 3.6% and 5.2% after treatment with 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fomesafen respectively (Figure 2). With regard to cloning efficiency, no toxicity was found with fomesafen ; a significant induction of cloning efficiency was even noted with 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ fomesafen. A co-exposure to ZnCl_2 , increased even more significantly the colony number registered with each concentration of fomesafen tested.

BaP and fomesafen were tested alone and in association with ZnCl_2 for their apoptotic effects in SHE cells cultured at a high density (Figure 3). The DNA fragmentation assay

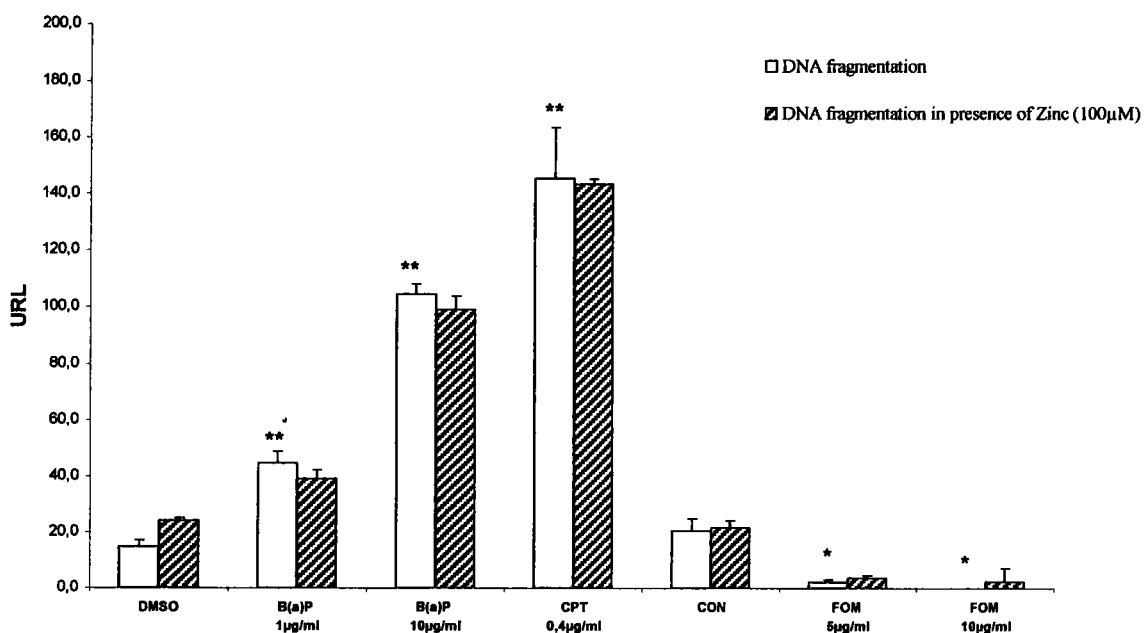


Fig. 3. DNA fragmentation measured by the Cellular DNA Fragmentation ELISA kit in SHE cells exposed to B(a)P (1 or 10µg/ml), Fomesafen (5 or 10µg/ml) and camptothecin 0.4µg/ml (CPT) used as a positive control. Cells exposed to BaP or Camptothecin were compared to cells exposed to DMSO (DMSO). Cells exposed to Fomesafen (FOM) were compared to untreated cells (CON). Chemicals were applied for 5 hrs with or without ZnCl₂ (100µM). The method based on BrdU labelling of DNA allowed the spectrophotometric quantification (450nm) of fragments due to apoptosis in cell lysate. ** Results significantly different from DMSO-treated cells ($p < 0.01$) and *results significantly different from control cells ($p < 0.05$).

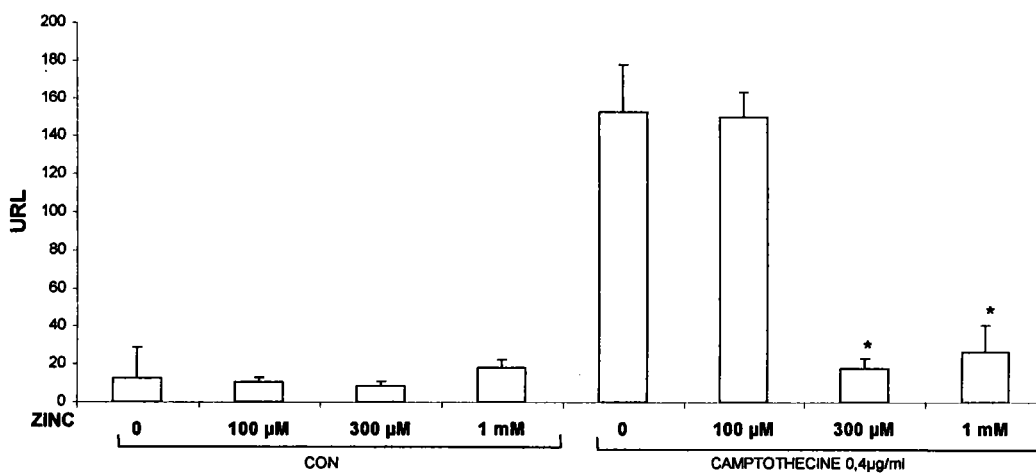


Fig. 4. DNA fragmentation measured by the Cellular DNA Fragmentation ELISA kit in SHE cells exposed to camptothecin (0.4µg/ml) for 5hrs versus non-treated cells (CON). Chemicals were applied with or without ZnCl₂. The method based on BrdU labelling of DNA allowed the spectrophotometric quantification (450nm) of fragments due to apoptosis in cell lysate.

* Results significantly different from camptothecin without zinc ($p < 0.01$).

demonstrated an induction of apoptosis after 5 hrs of exposure to 1µg/mL BaP, which intensified with 10µg/mL BaP. On the other hand, fomesafen was shown to reduce DNA fragmentation in a significant manner at 5 and 10 µg/mL and in a extended range of concentrations (data not shown). 100µM ZnCl₂ applied with either BaP or fomesafen did not modify the results obtained with these chemicals used alone. In cells treated with 0.4µg/mL camptothecin, used as a positive control for the induction of apoptosis, a high level of DNA fragmentation was registered ; yet, 100µM ZnCl₂ did not reduce DNA fragmentation (Figure 4). A dramatic decrease in fragmentation was only observed after the addition of 0.3 and 1mM zinc. The results demonstrated that the chemically-induced apoptosis in SHE cells cultured in DMEM supplemented with 15% FCS could be inhibited by zinc added at high concentrations, but not with 100 µM ZnCl₂.

The gene expression of *c-myc* and *bax* measured after 5hrs 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 (Figure 5).

Table 2 : Zinc concentrations in DMEM medium with or without foetal calf serum (FCS) and zinc. Percentage of the metal measured in the media after filtration through a 10-kDa porosity membrane (Mb) in comparison to the total concentrations.

FCS	[Zn] in µM	[Zn] in µM	% [Zn]	
			in Zn-supplemented medium	filtered through a 10-kDa porosity Mb
0 %	8. 10 ⁻²	-	100	0
		100	100	0
15 %	8.4	-	4	96
		100	50	50

* the fraction bound to macromolecules > 10-kDa was calculated as (total concentration – filtered concentrations)

Zinc was analyzed in DMEM medium with or without 15 % FCS, and after addition of 100 µM ZnCl₂. (6.5 mg/l zinc). The concentration was about 8.10⁻² µM (5µg/l) in DMEM, and

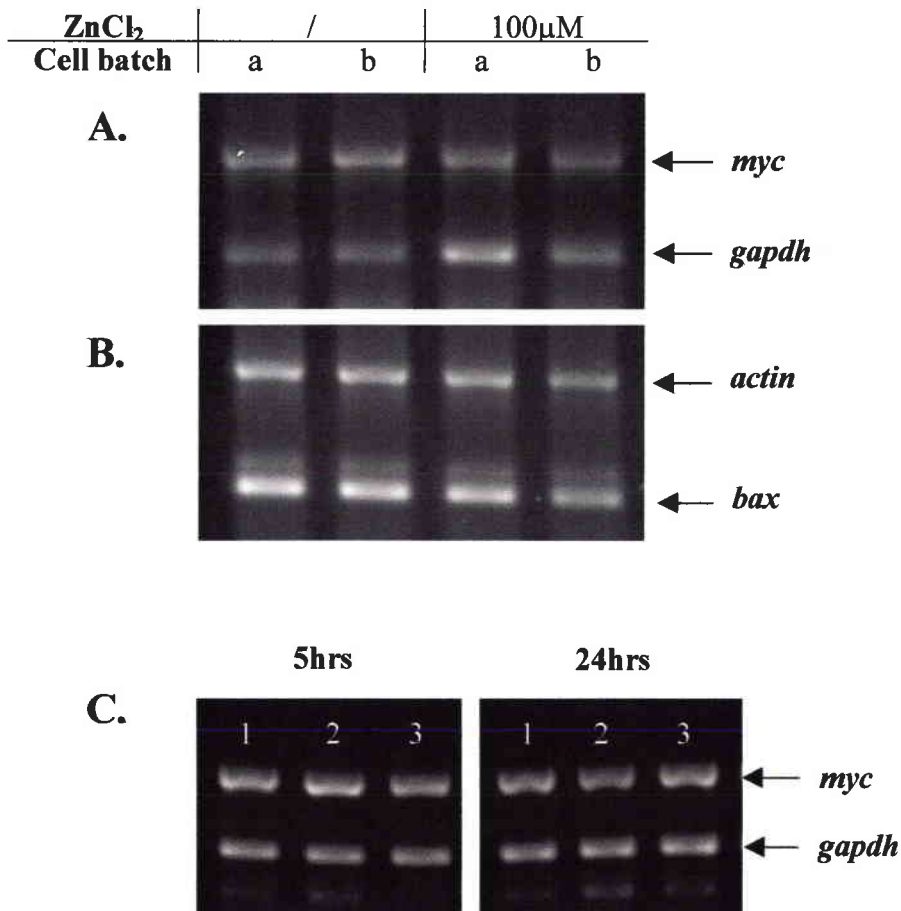


Fig. 5. RT-PCR analyses of *c-myc* (A) and *bax* expression (B) in two different batches of SHE cells exposed during 5 hrs to a complete medium supplemented or not with ZnCl₂ (100μM). Measures of *c-myc* expression in SHE cells treated with BaP (C) at the concentration of 0.1μg/ml (2) or 1μg/ml (3) during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

reached 8.4 μM (550 $\mu\text{g/l}$) in DMEM supplemented with 15 % FCS (Table 2). The bioavailability of the metal was studied by measuring concentrations in the medium filtered through a membrane of 10-kDa porosity. Results showed that zinc concentrations were identical in the filtered and nonfiltered DMEM serum-free medium. In the DMEM supplemented with 15% FCS, only 4% of the initial zinc concentration was measured in the filtered medium. When 100 μM zinc was added to this medium, approximately 50 μM of the metal was found in the filtered fraction, which corresponded to 50 % of this element bound to molecules of size > 10 kDa. These results indicated an adsorption of zinc to macromolecules of the serum, thus reducing zinc bioavailability.

Discussion

In this work, results obtained in the SHE cell transformation assays clearly demonstrated the implication of ZnCl_2 in neoplastic transformation. However, zinc has long been recognized as being a non-mutagenic agent with low toxicity. It has only been shown to induce tumours after local injection, and it is widely accepted that exposure to zinc alone does not represent in itself a carcinogenic risk to humans (22). Casto *et al.* (23) demonstrated that zinc chloride did not affect the fidelity of DNA synthesis, but could enhance the frequency of adenovirus transformation in Syrian hamster embryo cells, which corroborates the present results.

The study confirmed the transforming potencies of BaP on SHE cells. These positive results for cell transformation were expected since 1 $\mu\text{g/mL}$ BaP is commonly used as a positive control in cell transformation assay. BaP was demonstrated to slightly induce apoptosis and this result was linked to the lower cloning efficiency found in the transformation assay when cells were exposed to this chemical.

Fomesafen was found to exhibit transforming effects on SHE cells from 1 $\mu\text{g/mL}$ to 5 $\mu\text{g/mL}$ and showed a dose-response relationship. These transforming properties were predictable, since several carcinogenic hepatic peroxisome proliferators had been shown to induce SHE morphological transformation (24-26). Yet, it was necessary to test a range of concentrations in order to clarify the exact concentrations involved. Fomesafen prevented apoptosis as demonstrated by an inhibition of basal DNA fragmentation. This characteristic seemed to be expressed in the transformation assay as well, where fomesafen maintained cell survival and

enhanced colony formation. The significant rise in the number of colonies registered at 5 $\mu\text{g/mL}$ suggests a positive action on cell proliferation.

The relationship between antiapoptotic effects and the increase in cloning efficiency of fomesafen would suggest that apoptosis would occur in the MT assay, in SHE cells seeded at clonal density. The relationship between cloning efficiency and apoptosis has not been established at lower concentrations than 5 $\mu\text{g/mL}$, but would need to be studied in the conditions of the cell transformation assay.

The occurrence of apoptosis cannot be demonstrated in SHE cells seeded at clonal density, because the number of cells used in the transformation assay is too low and not compatible with the sensitivity of biochemical and immunological analyses for detecting the molecular signals of programmed cell death. In the present work, apoptosis has been measured on SHE cells plated at a high density. However, it cannot be certified that sensitivity and behaviour of cells are the same at high or clonal densities.

The increase in cloning efficiency observed in zinc-treated cells in each experiment allowed us to find a similitude between the patterns of action of zinc and of fomesafen. Zinc and fomesafen are both antiapoptotic chemicals, and share the property of increasing both transformation frequency and cloning efficiency. The enhancement in the transformation rate observed in the case of co-exposure to zinc and fomesafen also coincided with an increase in colony proliferation. Thus, these results are consistent with the hypothesis that the inhibition of apoptosis, by increasing cell viability, 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.

Other authors studying the mechanism through which hepatic peroxisome proliferators (HPP) induce hepatocarcinogenicity, had also shown apoptosis to be suppressed in hamster hepatocytes in response to HPP treatment (27). Rolfe et al. (28) concluded that both the suppression of apoptosis and induction of mitosis may be required for hepatocarcinogenicity. Dhalluin *et al.* (5) also demonstrated that an inhibition of apoptosis by the HPP diethyl hexyl phthalate, paralleled the induction of *bcl-2* and resulted in a superinduction of ornithine decarboxylase and in SHE cell proliferation.

The results obtained with BaP support the above hypothesis that cell transformation may be induced by the inhibition of apoptosis, which increases the viability of DNA-damaged cells.

Indeed, BaP induced both apoptosis in SHE cells and transformation frequency, which was enhanced in zinc treated cells. In the latter case, the toxicity of BaP, expressed as a decrease in cloning efficiency, was maintained despite ZnCl₂ treatment. Therefore, the increase in neoplastic transformation when cells were exposed concurrently to BaP and ZnCl₂ was not due to an increase in the number of colonies. Rather, it can be suggested that the mutagenicity of BaP may be responsible for genomic alteration leading to apoptosis. In the presence of antiapoptotic agents, altered cells will remain viable and lead to morphologically-transformed colonies. This explanation is only satisfactory if zinc inhibits apoptosis in the conditions of the MT assay, which has not yet been demonstrated.

100 µM zinc could not be shown to reduce apoptosis in SHE cells plated at a high density, whether they were controls or treated with BaP or fomesafen. The antiapoptotic effects of zinc were recorded only at higher concentrations, as was shown with the positive control camptothecin, the effects of which were inhibited only with 0.3 or 1mM of ZnCl₂. However, these concentrations did not allow cells to grow during long periods of time and could not be evaluated as regards cell transformation.

The concentration of 100 µM zinc, which had been shown to block apoptosis in growth factor deprived SHE cells grown in serum-free DMEM (9), exhibited no antiapoptotic effects in cells grown in DMEM supplemented with 15 % serum. This was explained by a reduction in the bioavailability of zinc. Measurements of zinc concentrations showed that a high fraction was bound to macromolecules, which resulted in bioavailable concentrations far below 100 µM in the presence of 15% FCS. A concentration of 50 µM was measured in the medium filtered through a 10-kDa membrane, suggesting that the bioavailable zinc fraction is probably lower than this level, since additional adsorption on biological molecules of a smaller size cannot be excluded. Free and ionic zinc are active forms involved in the biological activity of the metal : their concentrations are governed mainly by the pH and by the composition of intra and extracellular biological fluids. In our study, DMEM was at pH 7.0 which favored the bioavailability of the metal, but the presence of serum appeared to be the main factor influencing this parameter.

The concentrations of zinc which inhibit apoptosis in a variety of cells, drawn from bibliographic data, range between 0.1 mM and 1 mM (8). The inhibition was dose-dependent for zinc, yet great variations were recorded in the effective concentrations reported by the authors. These variations can be partly explained by differences in zinc availability, which

depends on the experimental conditions used, as well as the cell type. Not only the quantity of serum used to supplement medium, but also its composition may influence adsorption, and consequently, the results obtained with both metals and organic chemicals.

Apoptosis in BaP-treated cells could not be linked with changes in *c-myc* expression. In SHE cells supplied with growth factors, i.e. in serum-supplemented medium, basal *c-myc* expression is stable throughout the cell cycle. It is known that upon serum withdrawal, *c-myc* mRNA and the resulting protein levels decline until they are undetectable (29, 30). It was also demonstrated in SHE cells that apoptosis induced by growth factor deprivation was associated with a dramatic decrease in *c-myc* expression (9). This decrease was prevented by zinc, which inhibited cell death despite deprivation of growth factors. This antiapoptotic effect of zinc was accompanied with the maintenance of *c-myc* expression. In the present study, no induction in *c-myc* expression was recorded after zinc treatment of SHE cells in serum-supplemented DMEM medium.

We investigated the effects of zinc on *bax* expression, since zinc had been shown to suppress the increase of Bax caused by apoptosis in human premonocytic cells treated with H₂O₂ (31). No modification of *bax* expression by zinc was noted in SHE cells plated at a high density; this was in agreement with previous results which did not demonstrate an antiapoptotic effect of zinc in the experimental conditions used. 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 in order to elucidate the mechanism of zinc action. As zinc was not shown to exhibit antiapoptotic effects, additional studies on genomic expression were not conducted.

The establishment of relationships between apoptosis and morphological cell transformation were impeded by the technical impossibility of measuring apoptosis in cells in the experimental conditions of cell transformation because cell density was too low. Cell density has already been mentioned as a factor differing in the experimental conditions used to measure apoptosis, from those used to measure cell transformation.

In conclusion, we found that ZnCl₂ could induce morphological transformation. The transforming potencies of BaP and fomesafen were also increased by ZnCl₂ application. The results obtained with zinc demonstrated that mechanisms responsible for cell transformation

are sensitive to very low concentrations of Zn^{2+} . The targets of zinc which would explain its effects on cell transformation remain unclear. However two hypotheses may be put forward : (i) the inhibition of apoptosis, by extending the viability of altered cells, results in an increase in transformation frequency ; (ii) the targets of zinc related to the enhancement of cell transformation are different from those responsible for its antiapoptotic effects.

The first hypothesis implies that apoptosis occurs during the SHE cell transformation assay. Further investigation would therefore be needed (i) to improve the sensitivity of apoptosis detection methods for small numbers of cells ; (ii) to explore how cell susceptibility to apoptosis may be influenced by cell density ; (iii) to relate apoptotic signalling pathways and cell proliferation to morphological transformation in SHE cells.

Additional studies would also be necessary to determine whether zinc influences *bcl-2* expression and to elucidate the relationship between *c-myc* and SHE cell transformation, as well as fundamental investigations into the mechanisms of deregulation of both cell cycle control and of differentiation.

References

1. Wyllie,A.H., Kerr,J.F.R. and Currie,A.R. (1980) Cell death : the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306.
2. Christov,K.T., Guzman,R.C., Swanson,S.M., Thordarson,G., Talamantes,F. and Nandi,S. (1996) Cell proliferation and apoptosis during mammary carcinogenesis in pituitary isografted mice. *Carcinogenesis*, **17**, 1741-1746.
3. Wyllie,A.H. (1992) Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.*, **11**, 95-103.
4. Schulte-Hermann,R., Bursch,W., Grasl-Kraupp,B., Török,L., Ellinger,A., and Müllauer,L. (1995) Role of active cell death (apoptosis) in multi-stage carcinogenesis. *Toxicol. Lett.*, **82/83**, 143-148.
5. Dhalluin,S., Gate,L., Vasseur,P., Tapiero,H., and 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.
6. Wyllie,A.H. (1997) Apoptosis and carcinogenesis. *Eur. J. Cell Biol.*, **73**, 189-197.
7. Staunton,M.J. and Gaffney,M.D. (1998) Apoptosis : basic concepts and potential significance in human cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **122**, 310-319.
8. Sunderman,F.W. (1995) The influence of zinc on apoptosis. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, **25**, 134-142.
9. Alexandre,S., Rast,C., Nguyen-Ba,G. and Vasseur,P. (2000) Detection of apoptosis induced by topoisomerase inhibitors and serum deprivation in Syrian hamster embryo cells. *Exp. Cell Res.*, **255**, 30-39.
10. 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., and Kouri,R.E. (1986) An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environ. Mutagenesis*, **8**, 77-98.
11. Krijt,J., Stranska,P., Sanitak,J., Chlumska,A. and Fakan,F. (1999) Liver preneoplastic changes in mice treated with the herbicide fomesafen. *Hum. Exp. Toxicol.*, **18**, 338-344.
12. Berwald,Y. and Sachs,L. (1963) *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens. *Nature*, **200**, 1182-1184.
13. Bessi,H., Rast,C., Rether,B., Nguyen-Ba,G. and Vasseur,P. (1995) Synergistic effects of chlordane and TPA in multistage morphological transformation of SHE cells. *Carcinogenesis*, **16**, 237-244.
14. Cruciani,V., Rast,C., Durand,M.J., Nguyen-Ba,G. and 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.

15. Pienta, R.J., Poiley, J.A. and 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.
16. Barrett, J.R. and Ts'o, P.O.P. (1978) Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3761-3765.
17. Barrett, J.R., Crawford, D.D., Mixer, L.O., Schectmen, L.M., Ts'o, P.O.P. and Pollack, R. (1979) Correlation of *in vitro* growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. *Cancer Res.*, **39**, 1507-1510.
18. 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. and Yamasaki, H. (1999) Cell transformation assays as predictors of human carcinogenicity, the reports and recommendations of ECVAM workshop 39. *ATLA*, **27**, 745-767.
19. Elias, Z., Poirot, O., Pezerat, H., Suquet, H., Schneider, O., Daniere, M.C., Terzetti, F., Baruthio, F. and Cavalier, C. (1989) Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **10**, 2043-2052.
20. Lasne, C., Lu, Y.P., Orfila, L., Ventura, L. and Chouroulinkov, I. (1990) Study of various transforming effects of the anabolic agents trenbolone and testosterone on syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **11**, 541-547.
21. Bessi, H., Rast, C., Nguyen-Ba, G. and 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.
22. Leonard, A., Gerber, G.B. and Leonard, F. (1986) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mut. Res.*, **168**, 343-353.
23. Casto, B.C., Meyers, J. and 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.
24. Mikalsen, S.O., Holen, I. and Sanner, T. (1990) 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.
25. Mikalsen, S.O., Kaalhus, O., Reith, A. and Sanner, T. (1990) Role of catalase and oxidative stress in hepatic peroxisome proliferator-induced morphological transformation of Syrian hamster embryo cells. *Int. J. Cancer*, **46**, 950-957.
26. Cruciani, V., Rast, C., Alexandre, S., Nguyen-Ba, G. and Vasseur, P. (1999) Peroxisome proliferator-induced transformation of Syrian hamster embryo cells : influence of experimental procedures. *Toxicol. in vitro*, **13**, 445-457.
27. James, N.H. and 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.
28. Rolfe, M., James, N.H. and 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.
29. Waters, C.M., Littlewood, T.D., Hancock, D.C., Moore, J.P. and Evan, G.I. (1991) *c-myc* protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene*, **6**, 797-805.
30. Dean, M., Levine, R.A., Ran, W., Kindy, M.S., Sonenshein, G.E. and Campisi, J. (1986) Regulation of *c-myc* transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9161-9166.
31. Fukamachi, Y., Karasaki, Y., Sugiura, T., Itoh, H., Abe, T., Yamamura, K. and Higashi, K. (1998) Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of Bcl-2/Bax ratio. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **246**, 364-369.

V. DISCUSSION

Le but de ce travail était d'étudier *in vitro* la relation entre l'apoptose et la transformation cellulaire des cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE). Il convenait, au préalable, de définir les conditions générant l'apoptose et plus précisément de déterminer si l'induction ou l'inhibition de l'apoptose dans ces cellules pouvait influencer le taux de transformation cellulaire. Afin de nous assurer de la validité des techniques employées dans la détection de l'apoptose, nous avons étudié en parallèle, comme témoin, la lignée des cellules HL60, qui constitue un modèle classique de l'apoptose, bien documenté dans la littérature.

Induction, détection et caractéristiques de l'apoptose des cellules SHE et HL60

Plusieurs substances ont été testées pour leur capacité à induire l'apoptose des cellules SHE, comme les inhibiteurs de topoisomérases (camptothécine et étoposide), le 5-fluorouracile, le méthylméthanesulfonate, le benzo(a)pyrene et la vinblastine. Aucune de ces substances ne manifeste un pouvoir apoptotique important sur les cellules primaires SHE. Par contre, un retrait du sérum du milieu de culture entraîne une mort cellulaire, de type apoptotique, très nette et très rapide. Nous avons choisi le retrait des facteurs de croissance comme inducteur d'apoptose de référence, dans les cellules SHE. Cette sensibilité des cellules SHE à la privation de sérum peut s'expliquer par le caractère primaire de ce type cellulaire. En effet, le retrait des facteurs de croissance est souvent utilisé dans les lignées pour synchroniser les cellules en phase G_0 (Coats *et al.*, 1996). Les cellules SHE n'ont pas le temps d'entrer en quiescence et meurent très rapidement après une exposition à un milieu sans sérum. On retrouve d'ailleurs cette forte dépendance des cellules SHE aux facteurs de croissance dans l'essai de transformation morphologique, qui requiert un sérum d'une qualité excellente pour permettre le clonage des cellules.

Les cellules HL60 étant peu sensibles à une déficience du milieu en facteurs de croissance, deux inhibiteurs de topoisomérases, l'étoposide et la camptothécine, ont été appliqués pour induire l'apoptose de cette lignée. Les cellules HL60 ont été utilisées dans cette étude essentiellement pour valider les méthodes employées. Dans cette optique, l'utilisation de deux types d'inducteurs différents ne nous a pas semblé gênante.

Les cellules SHE comme la lignée HL60 en apoptose présentent les caractéristiques classiques du processus de mort cellulaire programmée, à savoir la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire, des fragments intracellulaires d'ADN, une configuration en barreaux d'échelle de ces fragments après migration en gel d'agarose. Par

contre, l'activation de la caspase-3, que l'on retrouve dans les cellules HL60 au cours du processus de mort cellulaire, n'a pas pu être mise en évidence dans cellules SHE privées de sérum. L'apoptose des cellules SHE est accompagnée d'une inhibition de l'expression de *myc*, alors que dans les cellules HL60 exposées aux inhibiteurs de topoisomérases ou à un milieu sans sérum, l'expression de *myc* reste stable.

Les deux types cellulaires se distinguent également par le processus de dégradation de la PARP au cours de l'apoptose. Le clivage de la protéine a été visualisé par deux techniques en Western blot. La première utilise simplement un anticorps anti-PARP (C-2-10). La seconde utilise l'anticorps LP96-10, qui met en évidence le poly(ADP-ribose) après activation de la polymérase et de ses fragments par leur substrat, le NAD⁺. Cette méthode est basée sur le maintien des capacités de l'enzyme et des fragments de la molécule, à synthétiser du poly(ADP-ribose) après la migration et le transfert sur membrane, dans la mesure où le site catalytique et le domaine de fixation du polymère sont restés fonctionnels. Rappelons que le poly(ADP-ribose) synthétisé servira à augmenter la charge négative des protéines sur lesquelles il se fixe, ce qui modifie leur configuration spatiale ; la molécule la plus apte à fixer le polymère est la PARP elle-même. Dans les cellules HL60, la PARP subit un clivage unique et spécifique qui permet l'émergence du fragment 89kDa, stable et considéré comme une caractéristique du processus apoptotique. La PARP des cellules SHE en apoptose est également dégradée, mais aucun fragment stable n'est détecté.

Dans différents types cellulaires et notamment la lignée HL60, la production d'un fragment de 89kDa est le résultat de l'activation de la caspase-3, qui clive les protéines au niveau d'un site DEVDG, entre l'Asp216 et la Gly217. Le site DEVDG de la PARP se situe juste à l'extrémité de la zone de reconnaissance de l'anticorps anti-PARP utilisé. Dans les cellules SHE, l'absence de fixation de l'anticorps sur le fragment attendu, alors que cet anticorps reconnaît la PARP entière, suggère un décalage du site de clivage, et une dégradation de la protéine, vraisemblablement par un processus indépendant de la caspase-3. Cette hypothèse semble confirmée par l'absence d'activité de la caspase-3 dans les cellules SHE en apoptose. La méthode mettant en évidence la PARP et ses fragments par leur activité de synthèse du polymère est une technique intéressante à double titre. D'une part, elle permet de révéler d'autres fragments que celui de 89kDa, s'ils possèdent le domaine catalytique, et le domaine d'automodification qui fixe le polymère. D'autre part, cette méthode utilisant des anticorps anti-polymère peut s'appliquer à la détection de la PARP dans tous les types cellulaires, puisque la structure du poly(ADP-ribose) ne varie pas en fonction des espèces, ce qui n'est pas le cas de la structure de la PARP. La détection de l'activité polymérasique dans les

échantillons de cellules SHE en apoptose n'a révélé qu'un fragment provisoire, de l'ordre de 89kDa, qui disparaît rapidement au cours de la mort cellulaire. Ces résultats suggèrent que la dégradation de la PARP ne s'arrêterait pas après le premier clivage produisant un fragment proche de 89kDa, mais se poursuivrait en générant des fragments dont le site de reconnaissance de l'anticorps anti-PARP et/ou le domaine de fixation du polymère sont altérés ; en effet, la détection d'une activité polymérisique nécessite non seulement un site catalytique fonctionnel, mais également un site de liaison du polymère qui soit opérationnel. Dans la technique utilisée, seul le polymère lié de manière covalente à la PARP ou à ses fragments est reconnu ; le polymère synthétisé, mais non fixé est éliminé par un lavage au SDS.

La stabilisation de la protéine P53 a également été analysée en relation avec le processus apoptotique. Les cellules HL60 sont *p53*-nulles et cette protéine ne participe donc pas au processus apoptotique de ce type cellulaire. Dans les cellules SHE primaires, P53 ne présente pas de mutation et s'accumule uniquement après une exposition aux inhibiteurs de topoisomérase et au 5FU, mais ne répond pas au BaP, au MMS ou à la vinblastine. De même, un milieu sans sérum induit l'apoptose des cellules SHE de manière indépendante à l'accumulation de P53. Le caractère fonctionnel de la protéine stabilisée est mis en évidence dans les cellules SHE exposées aux inhibiteurs de topoisomérase par l'induction simultanée de l'expression du gène *p21*, qui est essentiellement sous la dépendance de l'activité transcriptionnelle de P53. Une induction de *p21* indépendante de P53 a été décrite dans certains cas (Macleod *et al.*, 1995). La protéine P21 a le rôle principal de bloquer le cycle cellulaire. Elle protégerait également les cellules contre la mise en place du processus apoptotique (Polyak *et al.*, 1996), ce qui expliquerait le faible taux de mort cellulaire des cellules SHE exprimant P21. Il serait intéressant d'analyser le cycle cellulaire des cellules SHE exposées aux inducteurs du gène *p21*, notamment les inhibiteurs des topoisomérase, ce qui permettrait d'observer les éventuels arrêts en phase G₁ ou G₂.

Aucun des stimuli testés sur les cellules SHE, à savoir le retrait des facteurs de croissance et l'exposition aux inhibiteurs de topoisomérase, ne permet d'induire des modifications de l'expression du gène *bax*, qui est impliqué dans certains cas dans l'induction de l'apoptose, en balance avec les autres membres de la famille Bcl-2. Une régulation transcriptionnelle de *bax* n'intervient pas dans le processus apoptotique des cellules SHE soumises à un retrait des facteurs de croissance ou aux inhibiteurs de topoisomérase. Cependant, il aurait été intéressant d'analyser les autres membres régulateurs de l'apoptose qui interagissent avec Bax,

ainsi que les modifications post-transcriptionnelles de ces protéines. Des essais sur l'expression du gène *bcl-2* et sur la protéine correspondante ont été tentés dans cette étude ; ils n'ont cependant donné aucun résultat. Il faut savoir que pour détecter les protéines de hamster, le choix des anticorps est souvent aléatoire, étant donné que les fournisseurs ne garantissent qu'exceptionnellement la réactivité de leurs anticorps avec cette espèce. Il en va de même pour l'ADN qui est rarement séquencé chez le hamster ; les amorces que nous utilisons sont déduites des séquences d'autres espèces, sans certitude qu'elles conviennent à la séquence du hamster.

Les cellules SHE privées de sérum ne semblent pas emprunter une voie apoptotique liée à l'inactivation de la protéine kinase Akt, dont la phosphorylation dépend des facteurs de croissance et de survie. Aucune variation de l'état de phosphorylation de cette protéine n'a en effet été relevée en parallèle à un retrait du sérum.

Effet du zinc dans le processus apoptotique

Le zinc, reconnu pour ses propriétés anti-apoptotiques dans de nombreux types cellulaires, s'est révélé être un inhibiteur puissant de l'apoptose induite par la privation des facteurs de croissance dans les cellules SHE, et par les inhibiteurs de topoisomérases dans les cellules de la lignée HL60. On observe, avec le zinc sous forme de chlorure, une absence totale des modifications morphologiques liées à la mort cellulaire programmée ; la fragmentation de l'ADN, de même que la dégradation de la PARP disparaissent complètement dans les deux types cellulaires.

Les cibles réelles du zinc au niveau des mécanismes de l'apoptose ne sont pas encore définies. Il inhibe les endonucléases responsables de la fragmentation de l'ADN (Cohen et Duke, 1984) et l'activation des caspases liées à l'exécution de l'apoptose (Perry *et al.*, 1997 ; Chai *et al.*, 1999) ; il semblerait également que le zinc agisse, dans certains cas, sur le ratio des protéines Bcl-2/Bax et aurait un rôle dès la phase de décision du processus apoptotique (Fukamachi *et al.*, 1998).

Pour notre part, nous avons mis en évidence une action du zinc sur l'expression du gène *myc*. L'inhibition de l'apoptose par le zinc est en relation avec le maintien de l'expression de *myc* dans les cellules SHE privées de sérum. Ces résultats prouvent que l'activité du zinc se situe bien en amont de la phase d'exécution de l'apoptose et agit au niveau décisionnel. Le zinc n'a, par contre, aucune action sur l'expression du gène *bax*. Il n'est pas exclu cependant que le zinc agisse sur la régulation des autres protéines de la famille Bcl-2, notamment celles qui inhibent l'activité pro-apoptotique de Bax.

Quant aux concentrations de zinc utilisées, nous avons vu que la concentration de $100\mu\text{M}$, nécessaire à l'inhibition de l'apoptose des cellules SHE dans un milieu sans sérum, n'est pas suffisante pour empêcher la mort des cellules cultivées dans un milieu supplémenté en sérum, dans le cas des cellules exposées à la camptothécine par exemple. En effet, les protéines sériques diminuent de manière importante la biodisponibilité du zinc, comme l'ont prouvé les analyses du zinc total et libre dans les différents milieux de culture. Dans l'étude de l'apoptose par les essais à court terme de détection intracellulaire de la fragmentation de l'ADN, il faut utiliser un milieu contenant une concentration en zinc total de $300\mu\text{M}$ pour inhiber la mort cellulaire des cellules SHE soumises à une concentration de $0,4\mu\text{g/mL}$ de camptothécine. Cependant, cette quantité de zinc réduit fortement la fixation des cellules à leur support et s'est révélée non viable à long terme. Par ailleurs, les essais de clonage sur 7 jours ont montré que des concentrations supérieures à $100\mu\text{M}$ (200 ou $300\mu\text{M}$) réduisaient la formation des colonies et se révélaient donc toxiques à long terme. Il pourrait être intéressant de tester les effets d'une exposition en zinc beaucoup plus courte (de quelques heures), au début de l'essai de transformation morphologique, mais à une concentration supérieure à $100\mu\text{M}$.

Inhibition de l'apoptose et transformation morphologique

ZnCl_2 , appliqué seul à la concentration de $100\mu\text{M}$, augmente le taux de transformation et augmente également l'efficacité de clonage des cellules SHE. De plus, il potentialise les effets transformants des deux substances cancérigènes testées, le fomesafen qui est un cancérigène non-génotoxique, inhibiteur de l'apoptose et le BaP qui est un agent génotoxique, inducteur de l'apoptose.

Des substances inhibitrices de la mort cellulaire programmée comme le fomesafen et le zinc augmentent le phénotype transformé dans les cellules SHE. La hausse de la transformation semble corrélée à une augmentation de l'efficacité de clonage, ce qui laisse penser que le nombre plus important de colonies transformées en présence d'agents anti-apoptotiques résulterait d'un déficit dans l'élimination des cellules altérées qui auraient été éliminées par une apoptose plus efficace.

Le BaP ($1\mu\text{g/mL}$) est toxique, comme le montre la diminution de l'efficacité de clonage suite à son application dans le test de transformation morphologique ; le BaP induit également le processus apoptotique, ce qui confirme son activité répressive sur la croissance cellulaire et sur la formation des colonies. Le zinc empêcherait l'apoptose des cellules génétiquement

altérées par le BaP, ce qui expliquerait l'augmentation du nombre de colonies transformées lorsque les cellules SHE sont exposées au milieu supplémenté en zinc et en BaP.

Le zinc agit sur la transformation à une concentration de 100 μ M ; cependant, cette concentration n'entraîne pas d'inhibition de la mort cellulaire programmée lorsque le milieu est supplémenté en sérum dans les conditions de détection de l'apoptose. Les essais mis en œuvre pour mesurer le processus apoptotique sont des protocoles à court terme, qui doivent être réalisés sur des cellules ensemencées à forte densité. Ces conditions ne correspondent pas à celles de l'essai de transformation morphologique pour lequel les cellules sont ensemencées en densité clonale et se développent sur 8 jours. Ceci peut expliquer les différences de sensibilité des cellules au zinc. Les essais à court terme ne révèlent que les effets du zinc sur les premières phases du traitement, alors que l'apoptose peut se produire à tous les stades du développement du phénotype transformé. Rappelons que l'apoptose joue un grand rôle dans la régulation de la population tumorale (Wyllie, 1992 ; Kerr *et al.*, 1994). Les essais à court terme ne peuvent mettre en évidence tous les processus de transformation et les phénomènes apoptotiques qui leur sont associés. L'apoptose lors de la transformation ne doit pas être un phénomène massif, on peut poser l'hypothèse que la concentration de zinc utilisée est suffisante pour inhiber la mort cellulaire dans les cellules SHE en transformation.

Même si nous n'avons pas pu prouver que le zinc agissait bien en inhibant l'apoptose, à la concentration utilisée dans l'essai de transformation morphologique, sa capacité à augmenter l'efficacité de clonage nous laisse penser qu'il maintient la viabilité cellulaire. Certaines substances cancérigènes non-génotoxiques ont des effets transformants qui peuvent être expliqués par leurs capacités anti-apoptotiques. Ainsi, les inducteurs des proliférateurs de peroxyosomes, comme le clofibrate et le di(2-ethylhexyl)phtalate sont des agents induisant la transformation morphologique des cellules SHE (Cruciani *et al.*, 1999). Ils se sont également révélés inhiber l'apoptose dans les cellules SHE lorsqu'ils sont associés au TPA, ce qui pourrait expliquer les phénomènes de synergie et l'augmentation de la fréquence de transformation observée lors d'une co-exposition des cellules SHE à ces substances et au TPA (Dhalluin *et al.*, 1998). Les effets anti-apoptotiques pourraient expliquer la potentialisation de l'activité néoplasique des cancérigènes génotoxiques par des agents "promoteurs de tumeur" non-génotoxiques, mais aussi la potentialisation observée lorsque d'autres agents anti-apoptotiques sont associés. Leur combinaison renforce leurs effets, comme cela a été observé avec le TPA et les HPP, ainsi qu'avec Zn²⁺ et le fomesafen.

Afin d'apporter des éléments complémentaires à la compréhension de l'inhibition de l'apoptose en relation avec l'augmentation du taux de transformation, il aurait été intéressant d'approfondir la relation entre une hausse de la transformation spontanée et une augmentation de l'efficacité de clonage.

Importance du zinc, notamment du zinc labile et biodisponible.

La concentration en zinc total ne représente pas la fraction active de zinc, qui est très faible comparée à la fraction de cet élément liée aux macromolécules. Autant une déficience en zinc est préjudiciable en induisant anormalement l'apoptose, autant une surcharge peut être dommageable en inhibant le processus de la mort cellulaire et en limitant ainsi l'élimination des cellules anormales. La fraction de zinc biodisponible *in vivo* doit donc faire l'objet d'une régulation délicate et complexe. La fraction de zinc active physiologiquement est étroitement dépendante de la teneur en protéines. A ce titre, les protéines de type métallothionéines doivent jouer un rôle essentiel dans la régulation des teneurs en zinc, compte tenu de leur caractère inductible qui revêt donc une importance fondamentale. Il serait utile de mieux connaître les concentrations de zinc actives dans l'organisme, afin de pouvoir interpréter les résultats expérimentaux par rapport à ces concentrations physiologiques et d'analyser les effets du zinc en tenant compte de la probabilité que ces effets puissent se manifester *in vivo*.

Transformation cellulaire et expression génique

La difficulté de l'étude des mécanismes de perturbations moléculaires associés à la transformation néoplasique tient à la faible quantité de cellules disponibles pour les analyses. En effet, si l'on veut mettre en évidence les modifications qui surviennent dans les colonies morphologiquement transformées, qu'il s'agisse de l'étude de l'apoptose ou des expressions génique ou protéique, on se heurte au problème de sensibilité des techniques analytiques qui requièrent de disposer d'une biomasse cellulaire importante même pour les techniques passant par une étape intermédiaire d'amplification (PCR).

Pour pallier à ce problème de sensibilité, nous avons travaillé sur un pool important de cellules, obtenu dans des conditions différentes, c'est à dire en passant par un tapis cellulaire, alors que les cellules sont cultivées en densité clonale dans l'essai de transformation. Or rien ne prouve que la réactivité cellulaire est identique en densité clonale ou en tapis cellulaire. Tant que les problèmes de sensibilité des techniques persisteront, il sera difficile d'expliquer

les mécanismes de la transformation et les étapes de transition d'une cellule d'un stade normal à un stade transformé, d'autant que le schéma de transition n'est certainement pas unique, et emprunte vraisemblablement différentes voies en fonction du type de traitement effectué.

Dans les travaux ultérieurs sur l'apoptose ou l'expression des gènes, en relation avec la transformation morphologique, les techniques mises en œuvre devraient être mieux adaptées aux conditions de l'essai de transformation. Des études sur les différences de comportement des cellules en fonction des conditions de culture (densité cellulaire, durée de culture,...) seraient utiles pour améliorer la mise en évidence des processus de transformation et des phénomènes associés.

La compréhension du processus apoptotique des cellules SHE pourrait être améliorée par l'étude des protéines de la famille Bcl-2, qui interagissent avec Bax ; des modifications de leur niveau d'expression ainsi que des modifications post-transcriptionnelles pourraient être à l'origine de l'induction de l'apoptose.

Il serait également intéressant d'approfondir les relations entre la mort cellulaire induite par la privation de sérum et les modifications de l'expression du gène myc, ainsi que l'action du zinc sur ces deux facteurs, afin de déterminer le mécanisme du développement de l'apoptose.

Les concentrations de zinc utilisées in vitro devraient être comparées aux concentrations que l'on retrouve physiologiquement afin de mieux se rapprocher des conditions in vivo.

Enfin, l'adaptation aux conditions de l'essai de transformation morphologique, des techniques d'analyse de l'apoptose et des modifications liées à la transformation néoplasique, permettrait d'expliquer de manière plus cohérente les relations entre les modifications cellulaires et le phénotype néoplasique.

VI. CONCLUSION

L'objectif de cette étude était de tester l'hypothèse selon laquelle une inhibition de l'apoptose pouvait favoriser le développement d'un processus néoplasique.

Différents aspects de l'apoptose des cellules SHE, telles l'induction et la répression du processus de mort cellulaire et les méthodes de détection du phénomène, ont été analysés. Pour avoir un élément de comparaison et nous assurer de la validité des techniques employées, la lignée des cellules lymphoïdes humaines HL60, dont l'apoptose est souvent décrite dans la littérature, a été étudiée en parallèle aux cellules SHE. Nous avons également tenté de caractériser le mécanisme apoptotique des cellules SHE en nous intéressant à la stabilisation de la protéine P53, à l'expression des gènes *myc*, *p21* et *bax*, à l'activation de la caspase-3, au clivage de la PARP et à la phosphorylation d'Akt. Le zinc sous forme de chlorure a ensuite été testé, en tant qu'inhibiteur de l'apoptose, sur les différents paramètres exprimés lors de la mort cellulaire.

Les cellules SHE sont peu sensibles aux inducteurs chimiques de l'apoptose (inhibiteurs de topoisomérases, BaP, MMS, VB, 5FU) et entrent rapidement en apoptose après un retrait des facteurs de croissance. Les cellules HL60, par contre, sont très sensibles aux inhibiteurs de topoisomérases mais ne réagissent pas au manque de sérum dans le milieu de culture.

Dans ces modèles cellulaires, le processus apoptotique se caractérise par des modifications de la morphologie nucléaire et une fragmentation spécifique de l'ADN. Une dégradation de la PARP est observée dans les cellules en apoptose ; cependant, aucun fragment 89kDa, caractéristique de l'apoptose dans de nombreux types cellulaires et notamment la lignée HL60, n'est détecté dans les cellules SHE. De même, aucune activité caspase-3 n'accompagne la mort cellulaire des cellules SHE privées de sérum. Ainsi, le processus apoptotique ne peut être mis en évidence que par l'association de plusieurs techniques, car des critères fiables dans certains types de cellules, ne sont pas valables pour d'autres modèles cellulaires. C'est le cas du fragment 89kDa de la PARP et de l'activation de la caspase-3, qui n'accompagnent pas l'apoptose des cellules SHE.

Des modifications de l'expression du gène *myc* ne sont observées que dans le cas d'une apoptose induite par une privation de sérum dans les cellules SHE, où *myc* est inhibé dès le retrait des facteurs de croissance. Quel que soit le traitement, l'expression de *myc* reste stable dans les lignées de cellules transformées, HL60 ou lignée Tr des cellules SHE, qui se sont révélées peu sensibles à la privation de sérum. Le maintien de l'expression de ce gène semble lié au maintien de la viabilité cellulaire dans un milieu sans sérum.

Le retrait des facteurs de croissance n'entraîne, dans les cellules SHE, ni de stabilisation de la protéine P53, ni d'augmentation de l'expression du gène *p21*, comme cela a été observé après exposition aux inhibiteurs de topoisomérase. Aucune induction de l'expression du gène *bax*, ni de modification de la phosphorylation de la protéine Akt, n'est notée en parallèle au retrait du sérum.

L'apoptose des cellules SHE qui suit la privation des facteurs de croissance se caractérise donc essentiellement par l'inhibition de l'expression de *myc*.

Pour clarifier les mécanismes du processus apoptotique dans ce type cellulaire, il faudrait par la suite étudier la régulation des autres protéines qui interagissent avec Bax, inducteur de la mort cellulaire, notamment Bcl-2, au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel.

Le zinc est un inhibiteur puissant de l'apoptose des cellules SHE et HL60. Il agirait en maintenant le taux d'expression du gène *myc* dans les cellules SHE privées de sérum. La cible du zinc dans le processus apoptotique semble donc se situer en amont de la phase d'exécution de l'apoptose par les caspases et les endonucléases, au niveau de la phase décisionnelle qui impliquerait une inhibition de l'expression de *myc*.

*Des études complémentaires sur les relations entre *myc* et la mort cellulaire des cellules SHE permettraient de mieux comprendre les mécanismes particuliers qui conduisent les cellules SHE vers l'apoptose.*

L'étude du zinc dans l'essai de transformation morphologique montre que cet inhibiteur de l'apoptose augmente à la fois l'efficacité de clonage et le taux de transformation morphologique des cellules SHE. Le zinc amplifie les effets transformants du BaP et du fomesafen. La concentration de zinc total ayant une activité dans l'essai de transformation est de 100µM ; or, cette concentration n'est pas assez élevée pour mettre en évidence un effet anti-apoptotique de cet élément dans les essais à court terme, lorsque le milieu contient du sérum ; les protéines sériques diminuent en effet la biodisponibilité du zinc. Des concentrations supérieures à 100µM, qui entraînent l'inhibition de l'apoptose à court terme, altèrent la viabilité des cellules à long terme et ne sont pas applicables à l'essai de transformation morphologique.

Afin de prouver que c'est réellement par ses capacités d'inhiber l'apoptose que le zinc agit sur la transformation néoplasique des cellules SHE, les techniques de mise en évidence de l'apoptose devront être adaptées aux conditions de l'essai de transformation morphologique, notamment à sa durée et à sa faible densité cellulaire.

L'augmentation de la viabilité cellulaire observée avec le zinc et avec le fomesafen pourrait être liée aux propriétés transformantes de ces deux substances, l'augmentation du nombre de colonies transformées s'expliquant par un défaut d'élimination des cellules altérées, qui ont échappé à l'apoptose.

Cette étude a mis en évidence que des agents inhibiteurs d'apoptose augmentaient le taux de transformation des cellules SHE. Ces résultats confortent l'hypothèse selon laquelle la transformation néoplasique serait la conséquence d'un dysfonctionnement du processus apoptotique.

D'autres travaux seraient nécessaires pour confirmer cette relation. Le développement de techniques permettant de détecter un processus apoptotique à l'échelle d'une colonie, plutôt que d'une population cellulaire, serait indispensable pour analyser les implications de l'apoptose dans la transformation néoplasique.

VII. REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Adams J.M. et Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-1326.

Alarcon R.M., Rupnow B.A., Graeber T.G., Knox S.J. et Giaccia A.J. (1996) Modulation of c-Myc activity and apoptosis *in vivo*. *Cancer Res.*, **56**, 4315-4319.

Allen R.T., Cluck M.W. et Agrawal D.K. (1998) Mechanisms controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 427-445.

Althaus F.R., Bachmann S., Höfferer L., Kleczkowska H.E., Malanga M., Panzeter P.L., Realini C. et Zweifel B. (1995) Interactions of poly(ADP-ribose) with nuclear proteins. *Biochimie*, **77**, 423-432.

Alvarez-Gonzalez R. et Mendoza-Alvarez H. (1995) Dissection of ADP-ribose polymer synthesis into individual steps of initiation, elongation, and branching. *Biochimie*, **77**, 403-407.

Amati B., Dalton S., Brooks M.W., Littlewood T.D., Evan G.I. et Land H. (1992) Transcriptional activation by the human c-Myc oncoprotein in yeast requires interaction with Max. *Nature*, **359**, 423-426.

An S. et Knox K.A. (1996) Ligation of CD40 rescues Ramos-Burkitt lymphoma B cells from calcium ionophore- and antigen receptor-triggered apoptosis by inhibiting activation of the cysteine protease CPP32/Yama and cleavage of its substrate PARP. *FEBS Lett.*, **386**, 115-122.

Ashkenazi A. et Dixit V.M. (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science*, **281**, 1305-1308.

Attardi L.D. et Jacks T. (1999) The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 48-63.

Auvinen M., Paasinen A., Andersson L.C. et Hölttä E. (1992) Ornithine decarboxylase activity is critical for cell transformation. *Nature*, **360**, 355-358.

Barrett J.C. et 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.C., Crawford D.D., Mixer L.O., Schechtman L.M., Ts'o P.O.P. et Pollack R. (1979) Correlation of *in vitro* growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. *Cancer Res.*, **39**, 1504-1510.

Bello-Fernandez C., Packham G. et Cleveland J.L. (1993) The ornithine decarboxylase gene is a transcriptional target of c-Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 7804-7808.

Berenblum I. (1941) The mechanism of carcinogenesis: a study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. *Cancer Res.*, **1**, 807.

Bernardi R., Negri C., Donzelli M., Guano F., Torti M., Prosperi E. et Scovassi A.I. (1995) Activation of poly(ADP-ribose)polymerase in apoptotic human cells. *Biochimie*, **77**, 378-384.

Bérout C. et Soussi T. (1998) p53 gene mutation: software and database. *Nucl. Acids Res.*, **26**, 200-204.

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

Berwald Y. et Sachs L. (1965) *In vitro* transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.*, **35**, 641-661.

Bortner C.D., Oldenburg N.B.E. et Cidlowski J.A. (1995) The role of DNA fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, **5**, 21-26.

Boulikas T. (1993) Poly(ADP-ribosylation), DNA strand breaks, chromatin and cancer. *Toxicol. Lett.*, **67**, 129-150.

Boyd K.E., Wells J., Gutman J., Bartley S.M. et Farnham P.J. (1998) c-Myc target gene specificity is determined by a post-DNA-binding mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13887-13892.

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

Brunet A., Bonni A., Zigmond M.J., Lin M.Z., Juo P., Hu L.S., Anderson M.J., Arden K.C., Blenis J. et Grennberg M.E. (1999) Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a forkhead transcription factor. *Cell*, **96**, 857-868.

Burgering B.M.T et Coffey P.J. (1995) Protein kinase B (c-Akt) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature*, **376**, 599-602.

Calmels S., Hainaut P. et Ohshima H. (1997) Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.*, **57**, 3365-3369.

Casto B.C., Meyers J. et 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.

Chai F., Truong-Tran A.Q., Ho L.H. et Zalewski P.D. (1999) Regulation of caspase activation and apoptosis by cellular zinc fluxes and zinc deprivation: a review. *Imunol. Cell Biol.*, **77**, 272-278.

Chen J., Jackson P.K., Kirschner M.W. et Dutta A. (1995) Separate domains of p21 involved in the inhibition of Cdk kinase and PCNA. *Nature*, **374**, 386-388.

Cherbonnel-Lasserre C. et Dosanjh M.K. (1997) Suppression of apoptosis by overexpression of Bcl-2 or Bcl-x_L promotes survival and mutagenesis after oxidative damage. *Biochimie*, **79**, 613-617.

Chouroulinkov I. et Lasne C. (1976) Cancérogenèse chimique en culture de tissus: critères et tests de transformation. *Environmental Pollution and Carcinogenic Risks. INSERM.*, **52**, 207-228.

Claassen G.F. et Hann S.R. (1999) Myc-mediated transformation: the repression connection. *Oncogene*, **18**, 2925-2933.

Coats S., Flanagan W.M., Nourse J. et Roberts J.M. (1996) Requirement of p27^{Kip1} for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science*, **272**, 877-880.

Cohen G.M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.*, **326**, 1-16.

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

Cole M.D. et McMahon S.B. (1999) The Myc oncoprotein: a critical evaluation of transactivation and target gene regulation. *Oncogene*, **18**, 2916-2924.

Collins S.J., Gallo R.C. et Gallagher R.E. (1977) Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. *Nature*, **270**, 347-349.

Cruciani V., Rast C., Alexandre S., Nguyen-Ba G. et Vasseur P. (1999) Peroxisome proliferator-induced transformation of Syrian hamster embryo cells: influence of experimental procedures. *Toxicol. In Vitro*, **13**, 445-457.

Dantzer F., Schreiber V., Niedergang C., Trucco C., Flatter E., delaRubia G., Oliver J., Rolli V., Ménissier-deMurcia J. et deMurcia G. (1999) Involvement of poly(ADP-ribose)polymerase in base excision repair. *Biochimie*, **81**, 69-75.

Dean M., Levine R.A., Ran W., Kindy M.S., Sonenshein G.E. et Campisi J. (1986) Regulation of *c-myc* transcription and mRNA abundance by serum growth factors and cell contact. *J. Biol. Chem.*, **261**, 9161-9166.

DelBino G., Lassota P. et Darzynkiewicz Z. (1991) The S-phase cytotoxicity of camptothecin. *Exp. Cell Res.*, **193**, 27-35.

DelPeso L., Gonzalez-Garcia M., Page C., Herrera R. et Nunez G. (1997) Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*, **278**, 687-689.

Desnoyers S., Shah G.M., Brochu G., Hoflack J.C., Verreault A. et Poirier G.G. (1995) Biochemical properties and function of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. *Biochimie*, **77**, 433-438.

Dhalluin S., Elias Z., Cruciani V., Bessi H., Poirot O., Rast C., Gate L., Pages N., Tapiero H., Vasseur P. et Nguyen-Ba G. (1998) Two-stage exposure of Syrian-hamster-embryo cells to environmental carcinogens: superinduction of ornithine decarboxylase correlates with increase of morphological-transformation frequency. *Int. J. Cancer*, **75**, 744-749.

Dhalluin S., Gate L., Vasseur P., Tapiero H. et 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 tetradecanoyl-phorbol acetate. *Carcinogenesis*, **18**, 2217-2223.

DiPaolo J.A., Donovan P.J. et Nelson R.L. (1969) Quantitative studies of *in vitro* transformation by chemical carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.*, **42**, 867-876.

DiPaolo J.A., Nelson R.L. et Donovan P.J. (1971) Morphological, oncogenic, and karyological characteristics of Syrian hamster embryo cells transformed *in vitro* by carcinogenic polyaromatic hydrocarbons. *Cancer Res.*, **31**, 1118-1127.

Donzelli M., Negri C., Mandarino A., Rossi L., Prosperi E., Frouin I., Bernardi R., Bürkle A. et Scovassi A.I. (1997) Poly(ADP-ribose) synthesis: a useful parameter for identifying apoptotic cells. *Histochem. J.*, **29**, 831-837.

Dudek H., Datta S.R., Franke T.F., Birnbaum M.J., Yao R., Cooper G.M., Segal R.A., Kaplan D.R. et Greenberg M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, **275**, 661-665.

Durand M.J., Cruciani V., Alexandre S., Hoflack J.C., Bessi H., Blaise C. et Vasseur P. (1997) In vitro assays for detection of non-genotoxic carcinogens. Dans : *Microscale aquatic toxicology: advance techniques and practice* (Wells P.G., Lee N. et Blaise C., eds), CRC Press, Floride, **8**, 129-140.

Duriez P.J., Desnoyers S., Hoflack J.C., Shah G.M., Morelle B., Bourassa S., Poirier G.G. et Talbot B. (1997) Characterization of anti-peptide antibodies directed towards the automodification domain and apoptotic fragment of poly(ADP-ribose)polymerase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1334**, 65-72.

Earle W.R. (1943) Production of malignancy *in vitro*. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *J. Natl. Cancer Inst.*, **4**, 165-212.

El-Deiry W.S. (1998) p21/p53, cellular growth control and genomic integrity. Dans : *Current topics in microbiology and immunology, cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors* (Vogt P.K. et Reed S.I., eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **227**, 121-137.

Elias Z., Poirot O., Pezerat H., Suquet H., Schneider O., Danière M.C., Terzetti F., Baruthio F., Fournier M. et Cavelier C. (1989) Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, **12**, 1811-1816.

Elias Z., Poirot O., Schneider O., Marande A.M., Danière M.C., Terzetti F., Pezerat H., Fournier J. et Zalma R. (1995) Cytotoxic and transforming effects of some iron-containing minerals in Syrian hamster embryo cells. *Cancer Detect. Prevent.*, **19**, 405-414.

Evan G. et Littlewood T. (1998) A matter of life and cell death. *Science*, **281**, 1317-1322.

Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Land H., Brooks M., Waters C.M., Penn L.Z. et Hancock D.C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, **69**, 119-128.

Facchini L.M. et Penn L.Z. (1998) The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB J.*, **12**, 633-651.

Fearnhead H.O., Rodriguez J., Govek E.E., Guo W., Kobayashi R., Hannon G. et Lazebnik Y.A. (1998) Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 13664-13669.

Fischer G., Kent S.C., Joseph L., Green D.R. et Scott D.W. (1994) Lymphoma models for B cell activation and tolerance. X. Anti- μ -mediated growth arrest and apoptosis of murine B cell lymphomas is prevented by the stabilization of myc. *J. Exp. Med.*, **179**, 221-228.

Fuchs S.Y., Adler V., Buschmann T., Wu X. et Ronai Z. (1998) Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination. *Oncogene*, **17**, 2543-2547.

Fukamachi Y., Karasaki Y., Sugiura T., Itoh H., Abe T., Yamamura K. et Higashi K. (1998) Zinc suppresses apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **246**, 364-369.

Geley S., Hartmann B.L., Kapelari K., Egle A., Villunger A., Heidacher D., Greil R., Auer B. et Kofler R. (1997) The interleukin 1 β -converting enzyme inhibitor *CrmA* prevents Apo1/Fas- but not glucocorticoid-induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage and apoptosis in lymphoblastic leukemia cells. *FEBS Lett.*, **402**, 36-40.

Gibson A.W., Cheng T. et Johnston R.N. (1995) Apoptosis induced by c-Myc overexpression is dependent on growth conditions. *Exp. Cell Res.*, **218**, 351-358.

Green D.R. et Reed J.C. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**, 1309-1312.

Haupt Y., Maya R., Kazaz A. et Oren M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, **387**, 296-303.

Heikkila R., Schwab G., Wickstrom E., Loke S.L., Pluznik D.H., Watt R. et Neckers L.M. (1987) A *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry S phase but not progress from G₀ to G₁. *Nature*, **328**, 445-449.

Hemmings B.A. (1997) Akt signaling: linking membrane events to life and death decisions. *Science*, **275**, 628-630.

Janus F., Albrechtsen N., Dornreiter I., Wiesmüller L., Grosse F. et Deppert W. (1999) The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. *Cell. Mol. Life Sci.*, **55**, 12-27.

Kakunaga T. (1973) A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from Balb/3T3. *Int. J. Cancer*, **12**, 463-473.

Kass G.E.N et Orrenius S. (1999) Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ. Health Perspect.*, **107**, 25-35.

Kerr J.F.R, Winterford C.M. et Harmon B.V. (1994) Apoptosis: its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, **73**, 2013-2026.

Krijt J., Stranska P., Sanitrak J., Chlumska A., Fakan F. (1999) Liver preneoplastic changes in mice treated with the herbicide fomesafen. *Hum. Exp. Toxicol.*, **18**, 338-344.

Land H., Parada L.F. et Weinberg R.A. (1983) Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature*, **304**, 596-602.

Larsen A.K. et Skladanowski A. (1998) Cellular resistance to topoisomerase-targeted drugs: from drug uptake to cell death. *Biochim. Biophys. Acta*, **1400**, 257-274.

Lasne C. (2000) Non-genotoxic carcinogens detection: the performance of *in vitro* cell transformation assays. Enregistrement N°99-1785, Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, Paris.

Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G. et Earnshaw W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**, 346-347.

Léonard A., Gerber G.B. et Léonard F. (1986) Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of zinc. *Mut. Res.*, **168**, 343-353.

Lozano G. et Montes de Oca Luna R. (1998) MDM2 function. *Biochim. Biophys. Acta*, **1377**, M55-M59.

Macleod K.F., Sherry N., Hannon G., Beach D., Tokino T., Kinzler K., Vogelstein B. et Jacks T. (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev.*, **9**, 935-944.

Martinou J.C. (1999) Key to the mitochondrial gate. *Nature*, **399**, 411-412.

Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Ménissier-deMurcia J. et deMurcia G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose)polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 3563-3571.

Masson M., Rolli V., Dantzer F., Trucco C., Schreiber V., Fribourg S., Molinete M., Ruf A., Alves Miranda E., Niedergang C., Hunting D., Gowans B., Schulz G.E., Ménissier-deMurcia

- J. et deMurcia G. (1995) Poly(ADP-ribose) polymerase: structure-function relationship. *Biochimie*, **77**, 456-461.
- Meßmer U.K., Reimer D.M., Reed J.C. et Brüne B. (1996) Nitric oxide induced poly(ADP-ribose) polymerase cleavage in RAW 264.7 macrophage apoptosis is blocked by Bcl-2. *FEBS Lett.*, **384**, 162-166.
- Meßmer U.K., Reimer D.M. et Brüne B. (1998) Protease activation during nitric oxide-induced apoptosis: comparison between poly(ADP-ribose) polymerase and U1-70kDa cleavage. *Eur. J. Pharmacol.*, **349**, 333-343.
- Ménissier-deMurcia J., Molinete M., Gradwohl G., Simonin F. et deMurcia G. (1989) Zinc-binding domain of poly(ADP-ribose)polymerase participates in the recognition of single strand breaks on DNA. *J. Mol. Biol.*, **210**, 229-233.
- Mignon A., Rouquet N. et Joulin V. (1998) Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose: un enjeu thérapeutique pour demain ? *Médecine/sciences*, **14**, 9-17.
- Milner A.E., Grand R.J.A., Waters C.M. et Gregory C.D. (1993) Apoptosis in Burkitt lymphoma cells is driven by *c-myc*. *Oncogene*, **8**, 3385-3391.
- Muschel R.J. et McKenna W.G. (1996) Alterations in cell cycle control during tumor progression: effects on apoptosis and response to therapeutic agents. Dans : *Current topics in microbiology and immunology, attempts to understand metastasis formation II* (Günther U. et Birchmeier W., eds), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **213**, 197-213.
- Nesbit C.E., Tersak J.M. et Prochownik E.V. (1999) *MYC* oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, **18**, 3004-3016.
- Nicholson D.W. et Thornberry N.A. (1997) Caspases: killer proteases. *TIBS*, **22**, 299-306.
- Nicholson D.W., Ali A., Thornberry N.A., Vaillancourt J.P., Ding C.K., Gallant M., Gareau Y., Griffin P.R., Labelle M., Lazebnik Y.A., Munday N.A., Raju S.M., Smulson M.E., Yamin T.T., Yu V.L. et Miller D.K. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, **376**, 37-43.

- Obaya A.J., Mateyak M.K. et Sedivy J.M. (1999) Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene*, **18**, 2934-2941.
- OliverPozo F.J., delaRubiaSanchez G., Niedergang C., Ménissier-deMurcia J. et deMurcia G. (1998) La poly(ADP-ribose)polymérase: un facteur de survie. *Médecine/sciences*, **14**, 1196-11203.
- Park I.C., Park M.J., Lee S.H., Choe T.B., Jang J.J et Hong S.I. (1998) Increased susceptibility of the c-Myc overexpressing cell line, SNU-16, to TNF-alpha. *Cancer Lett.*, **125**, 17-23.
- Patel T., Gores G.J. et Kaufmann S.H. (1996) The role of proteases during apoptosis. *FASEB J.*, **10**, 587-597.
- Perry D.K., Smyth M.J., Stennicke H.R., Salvesen G.S., Duriez P., Poirier G.G. et Hannun Y.A. (1997) Zinc is a potent inhibitor of the apoptotic protease, caspase-3. *J. Biol. Chem.*, **272**, 18530-18533.
- Persson H. et Leder P. (1984) Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene. *Science*, **225**, 718-721.
- Pfeifer G.P. et Holmquist G.P. (1997) Mutagenesis in the P53 gene. *Biochim. Biophys. Acta*, **1333**, M1-M8.
- Pich A. (1998) p53 expression, proliferative activity and prognosis in cancer. *Cancer J.*, **11**, 223-228.
- Pienta R.J., Poiley J.A. et 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.
- Polyak K., Waldman T., He T.C., Kinzler K.W. et Vogelstein B. (1996) Genetic determinants of p53-induced apoptosis and growth arrest. *Genes Dev.*, **10**, 1945-1952.

- Porter A.G. et Jänicke R.U. (1999) Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ.*, **6**, 99-104.
- Prendergast G.C. (1999) Mechanisms of apoptosis by c-Myc. *Oncogene*, **18**, 2967-2987.
- Raff M.C. (1992) Social control on cell survival and cell death. *Nature*, **356**, 397-400.
- Reznikoff C.A., Brankow D.W. et Heidelberger C. (1973) Establishment and characterization of a cloned line of C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of division; *Cancer Res.*, **33**, 3231-3238.
- Rosenthal D.S., Ding R., Simbulan-Rosenthal C.M.G., Vaillancourt J.P., Nicholson D.W. et Smulson M. (1997) Intact cell evidence for the early synthesis, and subsequent late apoptin-mediated suppression, of poly(ADP-ribose) during apoptosis. *Exp. Cell Res.*, **232**, 313-321.
- Sakaguchi K., Herrera J.E., Saito S., Miki T., Bustin M., Vassiliev A., Anderson C.W. et Appella E. (1998) DNA damage activates p53 through a phosphorylation-acetylation cascade. *Genes Dev.*, **12**, 2831-2841.
- Sakamuro D. et Prendergast G.C. (1999) New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene*, **18**, 2942-2954.
- Salazar A.M., Ostrosky-Wegman P., Menendez D., Miranda E., Garcia-Carranca A. et Rojas E. (1997) Induction of p53 protein expression by sodium arsenite. *Mut. Res.*, **381**, 259-265.
- Schmidt E.V. (1999) The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*, **18**, 2988-2996.
- Scovassi A.I., Denegri M., Donzelli M., Rossi L., Bernardi R., Mandarino A., Frouin I. et Negri C. (1998) Poly(ADP-ribose) synthesis in cells undergoing apoptosis: an attempt to face death before PARP degradation. *Eur. J. Histochem.*, **42**, 251-258.
- Shah G.M., Kaufmann S.H. et Poirier G.G. (1995) Detection of poly(ADP-ribose) polymerase and its apoptosis-specific fragment by a nonisotopic activity-Western blot technique. *Anal. Biochem.*, **232**, 251-254.

Shah G.M., Shah R.G. et Poirier G.G. (1996) Different cleavage pattern for poly(ADP-ribose) polymerase during necrosis and apoptosis in HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **229**, 838-844.

Shi Y., Glynn J.M., Guilbert L.J., Cotter T.G., Bissonnette R.P. et Green D.R. (1992) Role for *c-myc* in activation-induced apoptotic cell death in T cell hybridomas. *Science*, **257**, 212-214.

Shimizu S., Narita M. et Tsujimoto Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-487.

Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., Newmeyer D.D., Wang H.G., Reed J.C., Nicholson D.W., Alnemri E.S., Green D.R. et Martin S.J. (1999) Ordering the cytochrome *c*-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J. Cell Biol.*, **144**, 281-292.

Soldatenkov V.A., Prasad S., Notario V. et Dritschilo A. (1995) Radiation-induced apoptosis of Ewing's sarcoma cells: DNA fragmentation and proteolysis of poly(ADP-ribose) polymerase. *Cancer Res.*, **55**, 4240-4242.

Staunton M.J. et Gaffney E.F. (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.

Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M. et Kroemer G. (1996) Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.*, **184**, 1331-1341.

Thompson C.B. (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.

Thompson C.B., Challoner P.B., Neiman P.E. et Groudine M. (1985) Levels of *c-myc* oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle. *Nature*, **314**, 363-366.

Thornberry N.A. et Lazebnik Y. (1998) Caspases: enemies within. *Science*, **281**, 1312-1316.

Thut C.J., Goodrich J.A. et Tjian R. (1997) Repression of p53-mediated transcription by MDM2: a dual mechanism. *Genes Dev.*, **11**, 1974-1986.

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. et Kouri R.E. (1986) An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environ. Mutagenesis*, **8**, 77-98.

Ubol S., Park S., Budihardjo I., Desnoyers S., Montrose M.H., Poirier G.G., Kaufmann S.H. et Griffin D.E. (1996) Temporal changes in chromatin, intracellular calcium, and poly(ADP-ribose) polymerase during Sindbis virus-induced apoptosis of neuroblastoma cells. *J. Virol.*, **70**, 2215-2220.

Uchida K. et Miwa M. (1994) Poly(ADP-ribose)polymerase: structural conservation among different classes of animals and its implications. *Mol. Cell. Biochem.*, **138**, 25-32.

Vasseur P., Alexandre S., Rast C., Nguyen-Ba G., Elias Z. et Poirot O. (1998) Cell transformation assays. Dans : *Non-genotoxic carcinogens: mechanisms based detection methods*. Enregistrement N°98-1376, Ministère de l'aménagement du territoire et de l'environnement, Paris.

Wang X.W. (1999) Role of p53 and apoptosis in carcinogenesis. *Anticancer Res.*, **19**, 4759-4771.

Wang X.W. et Harris C.C. (1997) p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. *J. Cell. Physiol.*, **173**, 247-255.

Waters C.M., Littlewood T.D., Hancock D.C., Moore J.P. et Evan G.I. (1991) c-myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene*, **6**, 797-805.

Wertz I.E. et Hanley M.R. (1996) Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS*, **21**, 359-364.

- Whitacre C.M. et Berger N.A. (1997) Factors affecting topotecan-induced programmed cell death: adhesion protects cells from apoptosis and impairs cleavage of poly(ADP-ribose)polymerase. *Cancer Res.*, **57**, 2157-2163.
- Wolf D. et Rotter V. (1985) Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 790-794.
- Wu M., Arsura M., Bellas R.E., Fitzgerald M.J., Lee H., Schauer S.L., Sherr D.H. et Sonenshein G.E. (1996) Inhibition of c-myc expression induces apoptosis of WEHI 231 murine B cells. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5015-5025.
- Wyllie A.H. (1980) Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**, 555-556.
- 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. et Currie A.R. (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251-306.
- Xu J., Xu Y., Nguyen Q., Novikoff P.M. et Czaja M.J. (1996) Induction of hepatoma cell apoptosis by c-myc requires zinc and occurs in the absence of DNA fragmentation. *Am. J. Physiol.*, **270**, G60-G70.
- Yang J. et Duerksen-Hughes P. (1998) A new approach to identifying genotoxic carcinogens: p53 induction as an indicator of genotoxic damage. *Carcinogenesis*, **19**, 1117-1125.
- Yonish-Rouach E. (1997) A question of life or death: the p53 tumor suppressor gene. *Path. Biol.*, **45**, 815-823.
- Zalewski P.D., Forbes I.J. et 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). *Biochem. J.*, **296**, 403-408.

Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Decaudin D., Macho A., Hirsch T., Susin S.A., Petit P.X., Mignotte B. et Kroemer G. (1995) Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. Exp. Res.*, **182**, 367-377.

Zamzami N., Susin S.A., Marchetti P., Hirsch T., Gomez-Monterrey I., Castedo M. et Kroemer G. (1996) Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.*, **183**, 1533-1544.

VIII. ANNEXE

CELL TRANSFORMATION ASSAYS

Dans : *Non-genotoxic carcinogens: mechanisms based detection methods.*

Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement, N° 98-1376

P. Vasseur, S. Alexandre, C. Rast, Centre des Sciences de l'Environnement, BP 94025, Metz 57040 Cédex. Fr.

G. Nguyen-Ba, Laboratoire de Pharmacologie Cellulaire et Moléculaire, CNRS-URA 1218, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 92290 Châtenay-Malabry. Fr.

Z Elias, O. Poirot, Institut National de la Recherche et de la Sécurité, 54000 Vandoeuvre. Fr

ABSTRACT

This paper reviews cell transformation studies conducted by French scientific groups involved in research on the *in vitro* detection of carcinogens and on the mechanisms of carcinogenicity. Three cellular systems have been used over the last 25 years : mouse established cell lines BALB/3T3 and C3H10T $\frac{1}{2}$, and primary Syrian golden hamster embryo cells (SHE). The criterium for transformation was type III-morphologically-transformed foci, which could be observed several weeks after the BALB/3T3 and C3H10T $\frac{1}{2}$ cells had been plated. In SHE cells, seeded at clonal density for testing, the criteria were morphological changes consisting in the criss-crossing and piling up of cells within transformed colonies.

It was shown that these three cell systems were reliable detectors of *in vivo* carcinogens. Sensitivity and the speed of the appearance of the transformed phenotype, were also considered in their performances.

The studies have led us to conclude that the SHE cell transformation assay offers advantages over systems using established cell lines, due to the normality of cells, their very low spontaneous transformation, their capacity for metabolic activation and the rapidity of phenotypic changes. Protocols can be optimized for the screening of weak carcinogens and non-genotoxic carcinogens, through the use of initiation-promotion protocol for cell exposure and the renewal of the test medium. The SHE cell transformation assay completes the battery of *in vitro* screening assays for chemical carcinogenicity. More specifically, this test could fill the gap in the detection of non-genotoxic carcinogens which escape *in vitro* screening under European legislation concerning chemicals.

1. DEFINITION OF CELL TRANSFORMATION

In vitro cell transformation is the conversion process of normal to neoplastic-like cells having oncogenic properties. It has been shown that cells from morphologically-transformed colonies progress towards immortality, and ultimately malignancy, with a significantly higher frequency than cells from normal colonies (Di Paolo *et al.*, 1971, Elias *et al.*, 1989, 1995). Berwald and Sachs (1963) were the first to demonstrate that chemical carcinogens can induce neoplastic transformation in Syrian embryo cells and that cells derived from morphologically transformed colonies were capable of tumour formation when injected into a suitable host animal. It was shown that *in vitro* neoplastic transformation is a multistage process which closely mimics *in vivo* carcinogenesis (Barrett and Tso's, 1978). Therefore, the transformation of mammalian culture cells by a variety of chemicals has been used for more than three decades in studies on the mechanisms of carcinogenesis.

The morphologically-transformed (MT) phenotype is characterized by the loss of contact inhibition and of density-dependent inhibition of cells, resulting in a random orientation (or criss-cross) pattern of growth in three dimensions. Transformed cells show an increased basophilia and an increased nuclear to cytoplasmic ratio. These changes either precede or occur concomitantly with genomic alterations.

A transformed phenotype is a criterium integrating the multiple structural and functional disturbances which affect cell membrane transfers, cytoskeleton, transduction pathways, transcription, translation and any other mechanisms involved in the control of cell cycle, cell proliferation and differentiation. Therefore, multiple epigenetic mechanisms may be the targets of carcinogens whose action is not limited to the genome. As recent advances in carcinogenesis have underlined the crucial role of epigenetic effects in the multiple process of conversion of non-tumorigenic mammalian cells to a neoplastic state, it appeared urgent to be able to detect non-genotoxic carcinogens with *in vitro* methods, instead of long term animal experiments.

In vitro cell transformation assays are quite interesting for this purpose, since they could allow us to identify genotoxic and non-genotoxic carcinogens.

2. BACKGROUND

The interest in the use of transformation assays first appeared with the key observation by Earle (1943) that morphological changes in cell culture were associated with the oncogenicity of these cells *in vivo*. Later Berwald and Sachs (1963) confirmed the oncogenicity of SHE cells which presented a transformed phenotype after exposure to chemical carcinogens *in vitro*. Thereafter, a number of studies demonstrated the close correlation between the ability of compounds from different chemical classes to induce tumours *in vivo* and morphological transformation *in vitro* (DiPaolo *et al.*, 1969; Pienta *et al.*, 1977; Barrett *et al.*, 1979).

In parallel to Earle's studies, Berenblum in 1941 developed the concept of "initiation-promotion" from his experiments on mouse skin cancer. He demonstrated the role of tumour promoters which synergize the effects of DNA damaging agents (initiators). Tumour promoters, when applied after an initiator, allow cells to progress from an initiated to a transformed state, gaining immortality and malignancy. This discovery emphasized the fact that carcinogens may affect one or all of the stages of cancer development, including initiation, promotion and progression.

Although this simplifies a complex reality, carcinogens are usually classified in two groups :

(i) genotoxic carcinogens ; for which the primary biological activity is the alteration of DNA sequence (Butterworth, 1990). They are capable of initiating cells (initiators). Some initiators may also act on all the other stages of the carcinogenic process (complete carcinogens)

(ii) non-genotoxic carcinogens, or epigenetic carcinogens, which do not induce directly structural DNA changes, but interfere with the normal regulatory mechanisms of cell proliferation and differentiation and may yield genotoxic events as secondary effects. They increase the survival of initiated cells, promote their expansion (promoters) and/or change promoted cells into potentially malignant cells (progressors). These carcinogens may act through a variety of mechanisms, such as :

- interference on transduction signals which control normal cell growth and differentiation, including activation of protein kinase C and inhibition of protein phosphatases,
- activation of polyamine synthesis through the activation of ornithine decarboxylase (ODC)
- production of free radicals,
- alteration of cytoplasmic membranes and disturbance of cell-cell communication,
- inhibition of apoptotic mechanisms,

- modification of the methylation profile of DNA,
- activation of protooncogenes and/or inactivation of tumour suppressor genes through indirect mechanisms,...

Non-genotoxic carcinogens, as well as genotoxic ones, can be identified in long term animal experiments. Under European legislation, these assays are conducted for medicines, food additives and some pesticides, but are not required for other chemicals which are only tested *in vitro* or through short-term experiments. As *in vitro* standard methods for the detection of potential carcinogens are mainly based on genetic changes, non-genotoxic carcinogens will thus escape *in vitro* screening for carcinogens.

This problem is of the utmost importance : according to the US National Toxicology Program, nearly 40% of carcinogens are non-genotoxic. Thus, there is an urgent need for the standardization of *in vitro* screening methods for non-genotoxic carcinogens as well. Cell transformation assays which can detect genotoxic and non-genotoxic carcinogens are good candidates for this purpose.

3. PRINCIPLES OF THE DIFFERENT TRANSFORMATION ASSAYS IN USE

In vitro, morphological cell transformation is the endpoint commonly studied : with fibroblast cultures, MT is characterized by a piling up of cells in a criss-cross pattern, representing a loss of growth inhibition and of cell-cell orientation at confluency. Subsequent passages of such transformed cells result in the acquisition of other characteristics related to a malignant state, including the ability to grow in a semi-solid medium and the capacity to produce tumours in syngeneic or immunosuppressed animals (IARC, 1980). This transformed phenotype can be observed in established cell lines, as well as in primary cell cultures.

Several cellular models have been studied by French scientists for their sensitivity to transforming agents, since the first experiments of Berwald and Sachs in 1963. The main cell systems include :

(i) Syrian golden hamster embryo cells (SHE), used by Berwald and Sachs (1963), then by Di Paolo *et al.* (1969, 1971, 1972), Pienta *et al.* (1977), Barrett and Ts'o (1978), Barrett *et al.* (1978, 1984), ...

(ii) mouse established cell lines :

- BALB/3T3, clone A31 (Kakunaga, 1972)
- C3H 10T1/2 (Chen and Heidelberger, 1969 ; Reznikoff *et al.*, 1973)

In these three systems, particularly in SHE cells system, spontaneous transformation is very low.

Advantages of established cell lines include their easy culture *in vitro*. Yet, established cell lines are aneuploid and consist of abnormal cells whose capacity to metabolize xenobiotics is limited. The main disadvantage of these systems is the long period of time (several weeks) necessary for cell transformation to be scored.

In contrast, SHE cells are normal diploid cells, with significant metabolizing capacities. The time necessary for morphological transformation is short (8-10 days). Yet, the culture of primary SHE cells depends greatly on the presence of growth factors in the serum, more so than in established cell lines. The SHE cell transformation system has been used extensively to elucidate the mechanisms of carcinogenesis (Barrett and Ts'o, 1978 ; DiPaolo *et al.*, 1969,1972 ; Pienta *et al.*, 1977). This test system is now applied in France, to a greater extent than established cell lines.

The protocols, which were used in screening, are summarized below.

C3H 10T1/2 cells were obtained from Dr C. Heidelberger's laboratory (University of Southern California, Comprehensive Cancer Centre, Los Angeles, CA) and assays carried out according to the method of Mondal *et al.* (1976). Approximately two thousand cells were plated for transformation and 100-200 for plating efficiency, in 60 mm dishes containing Eagle's basal medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and incubated in a humidified incubator at 37°C in 5% CO₂ in air. Treatment started twenty four hours after plating. The medium was then replaced with fresh medium twice weekly before the cells became confluent, and once a week thereafter. The dishes were stained after 8 days for plating efficiency and after 40 days for the transformation assay. Cells were fixed with 95% ethanol and stained with 10% Giemsa. The criterium for transformation was the presence of morphologically-transformed foci, four to six weeks after the cells had been plated. Generally, only type III morphologically-transformed foci were scored, since these foci produced a high yield of sarcomas when injected into immunosuppressed syngeneic mice (Reznikoff *et al.*, 1973). Cytotoxicity by plating efficiency was measured on separate dishes. The transformation frequency was calculated as the number of transformed foci seen in the dishes plated for transformation, taking into account the number of cells surviving after treatment (plating efficiency).

BALB/3T3 cells were obtained from Dr H. Yamazaki (IARC, Lyon, France). Cell cultures were conducted in MEM supplemented with FCS. Transformation assays were carried out according to the method of Kakunaga (1973). Ten thousand cells were seeded in 60 mm Petri dishes in complete medium. After cell attachment, the medium was replaced by PBS containing the test substance. Several hours later, in short treatment experiments, cells were washed with PBS and re-fed with complete medium. The medium was changed twice a week for the next 4 weeks.

SHE cells were prepared as described by Pienta *et al.* (1977, 1978) and Di Paolo (1980), with slight modifications. To resume, SHE target cells were obtained from pre-selected primary cell cultures of individual Syrian hamster embryos at 13 days of gestation. The tissues, excepting eyes and viscera, were digested in trypsin or dispase (Elias *et al.*, 1989). Cells were pelleted by centrifugation and cultured in DMEM supplemented with 15% FCS. Approximately 200-300 target cells were seeded onto a feeder layer of 60 000 irradiated cells (5000 rad X-ray irradiation) in complete medium in 60 mm Petri dishes. The cells were treated 24 hours later. On day 8 or 10 depending on the studies, plates were washed with PBS, and cells were fixed and stained.

Colonies were scored for morphological transformation which consisted of criss-crossing and piling up of cells.

In some initial studies on SHE cells, protocols were similar to the procedures used for established cell lines and transformed foci were scored after 25 days. Five thousands (transformation) and 2 000 cells (plating efficiency) were plated in 60 mm dishes in complete medium. Cells were treated 24 hours later. After treatment, the medium was changed and then replaced twice weekly with the complete medium without chemical treatment. Plating efficiency was measured on day 8.

4. MORPHOLOGICAL TRANSFORMATION INDUCED BY CHEMICALS. FRENCH STUDIES

In vitro cell transformation studies were initiated in France by Chouroulinkov and his collaborators. These authors first demonstrated that a two-stage malignant transformation of rat embryonic fibroblasts could be obtained in tissue cultures sequentially treated with BaP and TPA. Malignant transformation was characterized by (i) the morphological alterations of cells

cloned in liquid medium, (ii) the ability of cells to form colonies in agar medium, and (iii) the formation of tumours when cells were reinjected into rats. Malignancy was found after 19 passages in TPA-supplemented medium of cells which had been initiated for 2 hours with BaP. No tumorigenicity was found in initiated cells or TPA treated cells (Lasne *et al.*, 1974). Treatment with croton oil or TPA accelerated the malignant transformation of rat embryo cells initiated with BaP (Lasne *et al.*, 1977), which confirmed results obtained with mouse cells by Mondal *et al.* (1976). These studies showed that substances with promoting activity could be detected *in vitro* using cells previously treated with an initiator (Chouroulinkov and Lasne, 1976 ; 1978). DMBA, MCA and MNNG were used later as initiators in *in vitro* cell transformation systems. These results were at the origin of the use of sequential treatment applied to established cell lines and SHE cells, in order to detect initiator or promoter-like activities. The initiation-promotion protocol is generally used as the second stage of screening, when no transforming effects could be found after treatment with the tested substance alone.

Thereafter, these authors studied the carcinogenicity of environmental factors on cell transformation systems, such as the focus assays in SHE primary cells and C3H 10T1/2 cell lines. They showed the transforming and promoting effects of pickled vegetables, which were one of the foodstuffs known to be responsible for the high incidence of oesophageal cancer in Linxia county in China. It was discovered that direct transforming effects of pickled vegetable extracts (PVE) were found on SHE cells after 25 days of experimentation, while no induction of transformed foci could be observed in C3H 10T1/2 cells. The deficient metabolizing capacities of the established cell lines were evoked to explain the negative results. As transformation in C3H10 T1/2 was found when cells had been preinitiated with 0.1 µg/ml MCA, this indicated that promoting-like substances were present in the extract and that two-stage exposure enhanced the sensitivity of the focus assay on C3H 10T1/2 cells (Cheng *et al.*, 1980). Besides BaP, quercetine, and nitroso compounds, dimethylthiotetranitrosodiiron (Roussin's red) was identified as one of the promoting substances in PVE responsible for the transforming effects *in vitro*. The transforming effects paralleled the induction of hyperplasia in mouse skin treated with this nitroso compound (Cheng *et al.*, 1981, 1982) (Table 1).

The high sensitivity of SHE cells compared with C3H 10T1/2 was confirmed in other studies by these authors, on :

- the flame retardants tris(2,3dibromopropyl)phosphate and tris(2-chloroethyl)orthophosphate, which were positive in SHE cells whereas a very low transforming activity was found with C3H 10T1/2 (Sala *et al.*, 1982),
- opium pyrolysates, capable of inducing mouse skin tumours and associated with the high incidence of oesophageal cancer in north-east Iran (Friesen *et al.*, 1985) (Table 1)
- naphthofurans : the 2-nitro-methoxy derivatives induced cell transformation in SHE cells at lower concentrations than in C3H 10T1/2, epidermal hyperplasia on mouse skin in short term tests (Venegas *et al.*, 1984) and tumorigenicity in mouse skin long-term studies (Lasne *et al.*, 1987). These substances were also characterized as genotoxic, as reflected by chromosomal aberrations in V79 cells and SCE in human lymphocytes (Venegas *et al.*, 1985 ; Lasne *et al.*, 1989)
- polycyclic hydrocarbons, such as BaP (Lasne *et al.*, 1990b), BaP and chrysene with their corresponding 6-nitro derivatives (Sala *et al.*, 1987). The aromatic nitro compounds, which were initiators on mouse skin, could be detected in the SHE cell transformation assay, while negative results were obtained on C3H 10T1/2 (Table 1).

The performances of BALB/3T3 cells were investigated at the same time in studies with the initiators BaP, MNNG, MCA, and the tumour promoter TPA. Sensitivity appeared comparable to SHE cells for these compounds, as reported in Lasne *et al.* (1990b), and as summarized in Tables 1 and 2. Yet the transforming potency of 6-nitrochrysene (Sala *et al.*, 1987) and sodium fluoride could not be detected in BALB/3T3 in contrast to SHE cells. BALB/3T3 gave a response to NaF only after a sequential exposure of the cells initiated with 0.1 µg/ml MNNG (Lasne *et al.*, 1988).

As studies in general revealed variability due to test-related conditions, experimental factors such as concentrations of positive controls (MNNG and TPA), the length of treatment, sequence of treatment with an initiation-promotion procedure, and the concentration of serum were thoroughly investigated in order to optimize the test response and to reduce these factors of variability. Lu *et al.* (1986, 1988) suggested using an orthogonal design method to study cell transformation. This method was also applied to demonstrate the *in vitro* transforming activities of asbestos fibres, such as crysotile and crocidolite (Table 3).

BALB/3T3 and SHE transformation assays were also applied to study the carcinogenicity of diesel exhausts. An experimental test equipment was successfully implemented in order to directly expose cells to the gaseous and particulate emissions. It appeared that cytotoxicity was due to the particulate phase. A direct transforming activity could not be concluded either in BALB or SHE cells. Yet a promoting activity could be demonstrated in SHE cells previously initiated with 0.1 µg/ml BaP and subsequently exposed for 30 min. to diesel emissions.

By the end of the eighties, the interest of the SHE morphological cell transformation assay had been shown clearly and this test system was adopted by other research groups involved in *in vitro* carcinogenicity studies.

Elias *et al.* (1989) showed the transforming effects on Syrian hamster embryo cells of poorly soluble chromium pigments. They demonstrated the oncogenicity of cloned morphologically transformed colonies which presented neoplastic behaviour in syngeneic animals and could grow in soft agar. The solubilization of particulate CrVI was responsible for the intracellular Cr load which was the causative agent for these effects (Elias *et al.*, 1991). A synergism between Cr and Pb was also demonstrated (Table 3). Elias *et al.* (1995, 1996c) also investigated the transforming effects of mineral fibres. The SHE cell transformation assay allowed us to class these materials according to their carcinogenic potency. The transforming potency of asbestos fibres is related to the bioavailability of divalent iron responsible for the induction of oxidative stress and the formation of oxygen reactive species. The role of physio-chemical parameters on the transforming potencies of several silica dusts has also been studied (Elias *et al.*, 1996c).

In the category of organic chemicals, several suspected or confirmed carcinogens were shown to induce the morphological transformation of SHE cells (Table 4). Besides polycyclic aromatic hydrocarbons and phorbol esters, several compounds induced transformation of SHE cells when used alone: methoxyacetaldehyde which is the main metabolite of the ethylene glycol methyl ether (EGME) (Elias *et al.*, 1996a), some hepatic peroxisomal proliferators such as di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) (Elias *et al.*, 1996b) and its metabolite mono(2-ethylhexyl)phthalate (MEHP), clofibrate and its structural analog, methylclofenapate (Cruciani *et al.*, 1997a), the organochlorinated pesticide chlordane (Bessi *et al.*, 1995) and the anabolic agents, trenbolone and testosterone (Lasne *et al.*, 1990a). Generally, carcinogens presenting little or no transforming activity when tested alone, gave unambiguous positive results in

sequential treatments conducted with an initiation-promotion protocol. Chlorothalonil (Bessi *et al.*, 1994) and benzoyl peroxide (Elias *et al.*, 1996b) were non-genotoxic carcinogens which potentiated the effects of initiators (BaP or DMBA) and behaved as promoters (Table 4). Clofibrate, which presented initiator properties, could also behave as a promoter (Elias *et al.*, 1996b) and induce transformation by itself, depending on the experimental conditions (Cruciani *et al.*, 1997a, 1997b ; Dhalluin *et al.*, 1996) Most of the other non-genotoxic carcinogens tested could be considered initiator-like, since they were shown to synergize TPA effects in cells pretreated with these substances. These synergistic effects with TPA do not necessarily mean that these chemicals are initiators. Potentiation may result from the alteration of cell homeostasis through an action on both genetic and epigenetic targets. Direct or indirect disturbances on DNA metabolism and on sequences of molecular events governing cell kinetics may occur, with dramatic consequences such as the induction of neoplastic transformation. On the other hand, DNA alteration cannot be excluded for some compounds, even if their genotoxicity has not been detected with current methods.

Some of these compounds were studied in parallel for their ability to inhibit gap junctional intercellular communication (GJIC). No relationship was found. While chlordane inhibited GJIC, chlorothalonil had no effects (Durand *et al.*, 1998). In the case of HPPs, their effects on GJIC did not seem to be related to cell transformation : the effects were transient and the observed inhibition too short (disappearing in less than 15 min.) to influence SHE transformation (Cruciani *et al.*, 1997b).

Cruciani *et al.* (1998) also looked for ways to increase the sensitivity of the SHE cell transformation system. These authors suggested renewing the test medium during the 7 d. period of cell exposure, which would maintain the concentrations of the active compound at a stable level and reduce adsorption effects. They also confirmed that a test medium at pH 7.0 as is usually applied, allows us to identify a transforming potential more accurately. The use of pH 6.7 alone as recommended by Leboeuf et Kerckaert (1986, 1987) did not appear to be suitable for every transforming substance, although this procedure could offer advantages in some cases.

5. ADVANTAGES, LIMITATIONS AND VALIDATION

The SHE cell transformation assay offers advantages over test systems using established cell lines, due to the normality of the cells, the very low (if any) spontaneous transformation, their capacity for metabolic activation and rapidity of phenotypic changes. Results from different studies with the same compounds appeared reproducible (Tables 3 and 4). Yet some discrepancies can be found. Indeed, one of the limitations of this assay relates to the inter and intralaboratory variations due to subjectivity in the scoring of transformed colonies, especially at low transformation frequency. This problem could be overcome by a clear definition of the criteria, which must reflect the degree of morphological transformation: colonies may be partially or totally transformed, leading to an altered or transformed phenotype, respectively. These states have to be defined in view of harmonization.

The other limitation concerns the necessity to prepare primary cultures periodically. Cells from various preparations are not equally susceptible to transformation quantitatively speaking. These differences can be minimized by selecting batches of primary cultures prepared from single litters of hamster embryos. Cells need to be screened for their susceptibility to known carcinogens, in the specific experimental conditions which will be used. The composition of fetal calf serum (FCS) appears a critical factor known to influence the cloning efficiency and the transformation frequency as well. Growth factors in different batches of FCS would need to be controlled in order to reduce the inter-laboratory variability. In future, great progress will result from the identification of these active factors. At the present time, the use of only FCS of very high quality can be recommended in order to optimize the performances of the test.

An interlaboratory exercise involving three independent laboratories which tested eight model and five coded chemicals was organized by Tu *et al.* (1986). A consensus was obtained when similar experimental conditions, including batches of cells and serum were used. The relevance of the SHE cell transformation assay was underlined. It was also concluded that some of the approaches to be explored would include in attempts to amplify the expression of the transformed phenotype or/and the transformation frequency, in order to avoid equivocal responses at low transformation frequency.

The use of an initiation-promotion protocol seems to fulfil these requirements. Thus a strategy consisting of a two-step screening is advisable. During a first step, the compound could be tested alone, either at pH 6.7 or at pH 7.0. If negative results are obtained, a second stage of

testing may involve an initiation-promotion procedure in order to enhance sensitivity in the detection of carcinogenicity.

6. CONCLUSION

A large number of studies have established the relevance of the Syrian hamster embryo clonal transformation assay to human and rodent carcinogen data bases. The relationship between a transformed phenotype of colonies and *in vivo* malignancy has been confirmed. Protocols can be optimized for the screening of weak carcinogens through the sequential treatment of SHE cells (initiation-promotion protocol) and the use of semi-static test conditions (renewal of the test medium).

This is the only assay that can detect both genotoxic and non-genotoxic carcinogens as well as interactions between agents to appreciate the dangers of human mixed exposure. As no reliable tests have been validated for non-genotoxic carcinogens which escape the *in vitro* screening for carcinogens under European legislation, the SHE cell transformation assay will contribute to completing the battery of short term *in vitro* assays for assessing the carcinogenic potential of chemicals

This assay will technically improve the Directive 67/548/EU for the control of chemicals and the regulation of hazardous substances.

REFERENCES

1. BARRETT J. C., CRAWFORD D. D., MIXTER L. O., SCHECHTMAN L. M., TS'O P. O. P. & POLLACK R., 1979. Correlation of *in vitro* growth properties and tumorigenicity of Syrian hamster cell lines. *Cancer Research*, 39, 1504-1510.
2. BARRETT J.C., HESTERBERG T.W. & THOMASSEN D.G., 1984. Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis, *Pharmacological Reviews*, 36, 53S-70S.
3. BARRETT J. C. & TS'O P. O. P., 1978. Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75, 3761-3765.
4. BERENBLUM I., 1941. The mechanism of carcinogenesis: a study of the significance of cocarcinogenic action and related phenomena. *Cancer Research*, 1, 807.
5. BERWALD Y. & SACHS L., 1963. *In vitro* cell transformation with chemical carcinogens. *Nature*, 200, 1182-1184.
6. 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.

7. 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.
8. BUTTERWORTH B., 1990. Consideration of both genotoxic and non-genotoxic mechanisms in predicting carcinogenic potential. *Mutation Research*, 239, 117-132.
9. CHEN Y. & HEIDELBERGER C., 1969. Quantitative studies on the malignant transformation of mouse prostate cells by carcinogenic hydrocarbons *in vitro*. *International Journal of Cancer*, 4, 166-178.
10. CHENG S.J., SALA M., LI M.H., COURTOIS I. & CHOUROULINKOV I., 1981. Promoting effect of Roussin's red identified in pickled vegetables from Linxian China. *Carcinogenesis*, 2 (4), 313-319.
11. CHENG S.J., SALA M., LI M.H. & CHOUROULINKOV I., 1982. Esophageal Cancer in Linxian County, China : a possible etiology and mechanism (initiation and promotion). In *Carcinogenesis*, Hecker E. (Ed.), Raven Press, New-York, 7, 167-174.
12. CHENG S.J., SALA M., LI M.H., WANG M.Y., POT-DEPRUN J. & CHOUROULINKOV I., 1980. Mutagenic, transforming and promoting effect of pickled vegetables from Linxian county, China. *Carcinogenesis*, 1, 685-692.
13. CHOUROULINKOV I. & BOGGETTO N., 1987. Intérêt des études *in vitro* pour la caractérisation biologique des émissions diesel. *Pollution Atmosphérique-Pollution de l'air par les transports (colloque)*, 124-134.
14. CHOUROULINKOV I. & LASNE C., 1976. Cancérogénèse chimique en culture de tissus : critères et tests de transformation. *Environmental Pollution and Carcinogenic Risks*. INSERM, 52, 207-228.
15. CHOUROULINKOV I. & LASNE C., 1978. Two stage (initiation-promotion) carcinogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Bulletin du Cancer*, 65, 255-264.
16. CHOUROULINKOV I., LASNE C. & BOGGETTO N., 1987. Etude des effets cytotoxiques et cancérogènes (transformants) des émissions automobiles par exposition directe des cellules en culture. Convention 87306, Ministère de l'Environnement. Paris.
17. CRUCIANI V., 1997a. Effets de proliférateurs de peroxisomes hépatiques sur la transformation morphologique et la communication intercellulaire des cellules SHE et sur la coopération métabolique des cellules V79. *Thèse de Doctorat de l'Université de Metz. France*, 109 p.
18. CRUCIANI V., BESSI H., ALEXANDRE S., DURAND M.J., RAST C., NGUYEN-BA & VASSEUR P., 1996. SHE cell transformation assay as a predictive system for carcinogenicity of PAH and non-genotoxic carcinogens. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 10, 307-314.
19. CRUCIANI V., DURAND M.J., RAST C., NGUYEN-BA G. & VASSEUR P., 1997b. Comparative effects of clofibrate and MCP on morphological transformation and intercellular communication of SHE cells. *Carcinogenesis*, 18 (4), 701-706.
20. CRUCIANI V., MIKALSEN S.O., VASSEUR P. & SANNER T., 1997c. Effects of peroxisome proliferators and 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate on intercellular communication and connexin43 in two hamster fibroblast systems. *International Journal of Cancer*, 73, 240-248.
21. CRUCIANI V., RAST C., ALEXANDRE S., NGUYEN-BA G. & VASSEUR P., 1998. Peroxisome proliferator-induced transformation of Syrian hamster embryo cells : influence of experimental procedures. *Toxicology In Vitro*, submitted.
22. DHALLUIN S., CRUCIANI V., RAST C., VASSEUR P., TAPIERO H. & NGUYEN-BA G., 1996. Staged exposure of SHE cells to clofibrate and TPA : correlation between morphological transformation, ornithine decarboxylase and metalloprotease activities. *Cellular Pharmacology*, 3, 23-28.

23. DI PAOLO J. A., 1980. Quantitative *in vitro* transformation of Syrian golden hamster embryo cells with the use of frozen stored cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 64, 1485-1489.
24. DI PAOLO J.A., DONOVAN P.J. & NELSON R.L., 1969. Quantitative studies of *in vitro* transformation by chemical carcinogens. *Journal of the National Cancer Institute*, 42, 867-876.
25. DIPAULO 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.
26. DI PAOLO J.A., NELSON R.L. & DONOVAN P.J., 1972. *In vitro* transformation of Syrian hamster embryo cells by diverse chemical carcinogens. *Nature*, 235, 278-280.
27. DURAND M.J., CRUCIANI V., ALEXANDRE S., HOFLACK J.C., BESSI H., BLAISE C. & VASSEUR P., 1998. *In vitro* assays for detection of non-genotoxic carcinogens. In *Microscale Testing in Aquatic Toxicology : Advances, Techniques and Practice*, Wells P.G., Lee K. & Blaise C. (Eds), CRC Lewis Publishers, Florida, 8, 129-140.
28. EARLE W.R., 1943. Production of malignancy " *in vitro* ". IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. *The Journal of the National Cancer Institute*, 4, 165-212.
29. ELIAS Z., DANIERE M.C., MARANDE A.M., POIROT O., TERZETTI F. & SCHNEIDER O., 1996a. Genotoxic and/or epigenetic effects of some glycol ethers : results of different short-term tests, *Occup. Hygiene*, 2, 187-212.
30. ELIAS Z., POIROT O., BARUTHIO F. & DANIERE M.C., 1991. Role of solubilized chromium in the induction of morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by particulate chromium (VI) compounds. *Carcinogenesis*, 12, 1811-1816.
31. ELIAS Z., POIROT O., DANIERE MC, TERZETTI F., MARANDE AM, DHALLUIN S. & NGUYEN-BA G., 1996b. Etude du test de transformation de cellules embryonnaires de hamster syrien comme modèle de détection des cancérogènes non génotoxiques. *INRS, Etudes et Recherches. Fiches Scientifiques et Techniques*, Rapport N°B.3/1.028, 1-16.
32. ELIAS Z., POIROT O., DANIERE M.C., TERZETTI F., MARANDE A.M., DZWIGAJ S., PEZERAT H. & FUBINI B., 1996c. Etude comparative de l'effet transformant de différents types de particules de silice en fonction de leurs propriétés physico-chimiques. *INRS, Etudes et Recherches. Fiches Scientifiques et Techniques*, Rapport N°B.4/1.037, 1-16.
33. ELIAS Z., POIROT O., PEZERAT H., SUQUET H., SCHNEIDER O., DANIERE M.C., TERZETTI F., BARUTHIO F., FOURNIER M. & CAVELIER C., 1989. Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, 10, 2043-2052.
34. ELIAS Z., POIROT O., SCHNEIDER O., MARANDE A.M., DANIERE M.C., TERZETTI F., PEZERAT H., FOURNIER J. & ZALMA R., 1995. Cytotoxic and transforming effects of some iron-containing minerals in Syrian hamster embryo cells. *Cancer Detection and Prevention*, 19 (5), 405-414.
35. FRIESEN M., O'NEILL I.K., MALAVEILLE C., GARREN L., HAUTEFEUILLE A., CABRAL J.R.P., GALENDO D., LASNE C., SALA M., CHOUROULINLOV I., MOHR U., TURUSOV V., DAY N.E. & BARTSCH H., 1985. Characterization and identification of 6 mutagens in opium pyrolysates implicated in oesophageal cancer in Iran. *Mutation Research*, 150, 177-191.
36. IARC MONOGRAPHS, 1980. Long-term and short-term screening assays for carcinogens : a critical appraisal. In *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*, Lyon, France, suppl. 2, 426.
37. KAKUNAGA T., 1972. In *Topics in Chemical Carcinogenesis*, Nakahara X., Takayama S., Sugimura T. & Odashima S. (Eds.), Tokyo, University of Tokyo Press, 31-34.

38. KAKUNAGA T., 1973. A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from Balb/3T3. *International Journal of Cancer*, 12, 463-473.
39. LASNE C., GENTIL A. & CHOUROULINKOV I., 1974. Two stage malignant transformation of rat fibroblasts in tissue culture. *Nature*, 247, 490-491.
40. LASNE C., GENTIL A. & CHOUROULINKOV I., 1977. Two stage carcinogenesis with rat embryo cells in tissue culture. *British Journal of Cancer*, 35, 722-729
41. LASNE C., LOWY R. & VENEGAS W., 1989. *In Vitro* induction of sister-chromatid exchanges after G₀ exposure of human lymphocytes to five naphthofurans. *Mutagenesis*, 4 (1), 27-30.
42. LASNE C., LU Y. P. & CHOUROULINKOV I., 1988. Transforming activities of sodium fluoride in cultured Syrian hamster embryo and BALB/3T3 cells. *Cell Biology and Toxicology*, 4, 311-324.
43. LASNE C., LU Y. P., ORFILA L., VENTURA L. & CHOUROULINKOV I., 1990a. Study of various transforming effects of the anabolic agents trenbolone and testosterone on Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis*, 11, 541-547.
44. LASNE C., ORFILA L. & CHOUROULINKOV I., 1990b. The relationship between DNA-alkali-labile sites and carcinogenesis in mammalian cells. In *Mechanisms of Environmental Mutagenesis-Carcinogenesis*, Kappas A. (Ed.), Plenum Press, New-York, 183-198.
45. LASNE C., VENEGAS W., ROYER R. & CHOUROULINKOV I., 1987. Initiating, promoting and carcinogenic activities of three naphthofurans in mouse skin long-term study. *Japanese Journal of Cancer Research*, 78, 565-570.
46. LEBOEUF R. A. & KERCKAERT G. A., 1986. The induction of transformed-like morphology and enhanced growth in Syrian hamster embryo cells grown at acidic pH. *Carcinogenesis*, 7, 1431-1440.
47. LEBOEUF R. A. & KERCKAERT G. A., 1987. Enhanced morphological transformation of early passage Syrian hamster embryo cells cultured in medium with a reduced bicarbonate concentration and pH. *Carcinogenesis*, 8, 689-697.
48. LU Y.P., LASNE C. & CHOUROULINKOV I., 1986. Use of an orthogonal design method to study two-stage chemical carcinogenesis in BALB/3T3 cells. *Carcinogenesis*, 7, 893-898.
49. LU Y.P., LASNE C., LOWY R. & CHOUROULINKOV I., 1988. Use of an orthogonal design method to study synergistic effects of asbestos fibres and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in the BALB/3T3 cell transformation system. *Mutagenesis*, 3, 355-362.
50. MONDAL S. & HEIDELBERGER C., 1976. Transformation of C3H/10T1/2 Cl8 mouse embryo fibroblasts by ultraviolet irradiation and phorbol esters. *Nature*, 260, 710-711.
51. PIENTA R. J., POILEY J. A. & LEBHERZ W. B., III, 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.
52. PIENTA R.J., LEBHERZ W.B. & TAKAYAMA S., 1978. Malignant transformation of cryopreserved early passage Syrian golden hamster cells by 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)-acrylamide. *Cancer Letters*, 5, 245-251.
53. REZNIKOFF C.A., BERTRAM J.S., BRANKOW D.W. & HEIDELBERGER C., 1973. Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to post confluence inhibition of cell division. *Cancer Research*, 33, 3239-3249.
54. SALA M., GU Z.G., MOENS G. & CHOUROULINKOV I., 1982. *In vivo* and *in vitro* biological effects of the flame retardants Tris(2,3-dibromopropyl)phosphate and Tris(2-chlorethyl)orthophosphate. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 18 (12), 1337-1344.

55. SALA M., LASNE C., LU Y.P. & CHOUROULINKOV I., 1987. Morphological transformation in three mammalian cell systems following treatment with 6-nitrochrysene and 6-nitrobenzo(a)pyrene. *Carcinogenesis*, 8, 503-507.
56. 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. W., SPALDING J. & KOURI R. E., 1986. An interlaboratory comparison of transformation in Syrian hamster embryo cells with model and coded chemicals. *Environmental Mutagenesis*, 8, 77-98.
57. VASSEUR P., BESSI H., CRUCIANI V., MELCHIOR F. & RAST C , 1993a. Validation des essais de transformation cellulaire *in vitro* sur cellules SHE pour la détection des cancérogènes chimiques. Rapport d'Etude. Ministère de l'Environnement.
58. VASSEUR P., BESSI H. & RAST C., 1993b. Validation d'essais de transformation cellulaire *in vitro* sur cellules embryonnaires d'Hamster Syrien. Rapport de contrat SRETIE/MERE/90112/91169. Ministère de l'Environnement.
59. VENEGAS W., LASNE C., LOWY R., BUISSON J.P. & CHOUROULINKOV I., 1985. Naphthofurans induced chromosomal aberrations detected in metaphase, anaphase and telophase V79 Chinese hamster cells. *Mutation Research*, 157, 53-62.
60. VENEGAS W., SALA M., BUISSON J.P., ROYER R. & CHOUROULINKOV I., 1984. Relationship between the chemical structure and the mutagenic and carcinogenic potentials of five naphthofurans. *Cancer Research*, 44, 1969-1975

Table 1 : Comparison of results of transformation assays carried out on C3H 10T1/2, SHE and BALB/3T3 cells after a continuous or a two-stage exposure to **organic compounds or complex mixtures of pyrolysates, food extracts and diesel exhausts**.
Range of the concentrations tested including the lowest observed effective concentration (LOEC) in µg/ml.

Compound or product Concentration in µg/ml	C3H 10T1/2					SHE					BALB 3T3					In vivo experiment	Ref.
	conc. range tested		response type*			conc. range tested		response type*			conc. range tested		response type*				
	lowest	highest	C	P	LOEC	lowest	highest	C	P	LOEC	lowest	highest	C	P	LOEC		
Polycyclic aromatic hydrocarbons																	
BaP	25		+		25	0.5	2	+		0.5	0.25	1	+		0.25	Epid. hyperplasia	44
BaP	2.5		+		2.5	0.5	5	+		0.5	1	4	+		1		55
6-nitro-BaP	2.5	10	-			0.6	2.4	+/- _a		1.2	1.2	10	+/-		1.2		
Chrysene	10	15	-			3	9	-/+		6	3	9	-				
6-nitro-chrysene	10	15	-			3.6	10.8	+		10.8	3.6	10.8	-				
3-Methylcholanthrene	1		+		1												60
Sodium fluoride						75	800	+		75	25	400	-	+ _b			42
Naphthofurans																	
2-nitro-7-methoxynaphto(2,1-b)furan	0.01	0.03	+		0.2	0.01	0.2	+ _c		0.01						Epid. hyperplasia ++	60
2-nitro-8-methoxynaphto(2,1-b)furan	0.01	0.2	+		0.2	0.01	0.2	+		0.01						+++	
Opium pyrolysates																	
Opium-pipe scrapings	60		-			50	80	+		70						Mouse skin tum -	35
Opium pyrolysates	50		-			20	50	+		20						-	
Morphine pyrolysates	5		-			0.5	3	+		1						++	
Foodstuffs																	
Pickled vegetable extract (PVE)	20	60	-			10	40	+ _d		40							12
	1	10		+	1												
Dimethylthiotetranitrosodiiron	0.5	2	-					-								+ Epid. hyperpl.	11
				+	0.5												
Diesel exhausts (direct exposure to gas and particles)																	
						3 _e	30	-			10	45	-				13, 16
									+	30							

* C : continuous exposure ; P : promoter-like response.

a -/+ low transforming effect ; - : negative ; b : see table ; c : no dose-response relationship ; d : transformed cell foci on SHE confluent cells ;

e : treatment time in minutes (European cycle)

Table 2 : Results of cell morphological transformation assays on BALB/3T3 cells after a continuous or a two-stage exposure to **organic compounds**. Range of inactive or/and active concentrations including the lowest observed effective concentration (LOEC in M).

Compound / BALB/3T3 cells	Continuous exposure				Two-stage exposure					Ref.	In vivo* carcinogenicity (IARC)
	conc. range tested in M		results	LOEC	conc. range tested in M		initiator	promoter	LOEC		
	lowest	highest			lowest	highest	-like	-like			
CHEMICALS											
<i>N-nitroso compounds</i>											
MNNG	7.10 ⁻⁷	2.10 ⁻⁶	+	2.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁶		+		2.10 ⁻⁶	42	+ C
	34.10 ⁻⁸	2.10 ⁻⁶	+	7.10 ⁻⁷	34.10 ⁻⁸	2.10 ⁻⁶	+/- _a		7.10 ⁻⁷	48	
<i>Phorbol esters</i>											
TPA	8.10 ⁻⁸	8.10 ⁻⁷	+	8.10 ⁻⁸						48	Skin TP
	16.10 ⁻⁸	32.10 ⁻⁸		16.10 ⁻⁸	32.10 ⁻⁸			+	32.10 ⁻⁸	42	
	4.10 ⁻⁷	8.10 ⁻⁷	+	4.10 ⁻⁷	4.10 ⁻⁷			+	4.10 ⁻⁷	49	
<i>Polycyclic aromatic hydrocarbons</i>											
BaP	4.10 ⁻⁶		+	4.10 ⁻⁶						42	+C/Skin
	1.10 ⁻⁶	4.10 ⁻⁶	+	1.10 ⁻⁶						55	
6-nitro-BaP	4.10 ⁻⁶	40.10 ⁻⁶	+/- _b	4.10 ⁻⁶						55	+C/Skin
Chrysene	13.10 ⁻⁶	40.10 ⁻⁶	-							55	+C/Skin
6-nitro-chrysene	13.10 ⁻⁶	40.10 ⁻⁶	-							55	-
Methylcholanthrene	7.10 ⁻⁶		+	7.10 ⁻⁶						42	+ C/Skin

MNNG : methyl nitro nitroso guanidine ; BaP : benzo(a)pyrene ; TPA : 12-*O*-tetradecanoyl-13-phorbol acetate ; a : low transforming effect

a : low transforming effect ; b : no linear dose-response relationship ; - : negative

* +C carcinogenic ; TP : tumour-promotor

Table 3 : Results of the morphological transformation assays on BALB/3T3 and SHE cells after a continuous or a two-stage exposure to inorganic compounds. Range of inactive or/and active concentrations including the lowest observed effective concentration (LOEC).

Compound	Cells	Continuous exposure				Two-stage exposure					Ref.	In vivo carcinogen. (IARC)
		conc. range tested		results	LOEC	conc. range tested		results		LOEC		
		lowest	highest			lowest	highest	initiator -like	promoter -like			
FIBRES in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$												
Chrysotile (Asbestos fibers)	BALB/3T3	0.005	10	+	1	0.005	10	++		0.5	49	+C/Lu, Mes ; HC
Crocidolite		0.1	10	-		0.1	10	+		10	49	+C/Lu, Mes ; HC
Chrysotile (Asbestos fibers)	SHE	0.1	0.6	+	0.1	0.05	0.2	+	-	0.05	31	+C/Lu, Mes ; HC
Xonotlite (Silicate fibers)		4	32	-		8	16	-	-		31	-
SILICA in $\mu\text{g}/\text{ml}$												
Quartz Min-U-Sil5	SHE	2	30	+	2						32	+C/Lu ; HC
Cristobalite		2	15	+	2						32	+C/Lu ; HC
Diatomaceous earth		2	8	+	2						32	?
synthetic amorphous		8	30	-							32	-
Nemalite		2.5	15	+	2.5						34	+C/Lu
Biotite		20	80	+	20						34	+C/Lu
Magnetite		20	80	+	20						34	+C/Lu
Goethite		80	320	-							34	-
CHROMIUM salts in $\mu\text{g Cr}/\text{ml}$												
Ca chromate	SHE	0.06	0.4	+	0.06						30, 33	+C/Lu
Sr chromate		0.06	0.25	+	0.06						30, 33	+C/Lu
Zn chromate		0.1	0.5	+	0.1						30, 33	+C/Lu ; HC
Pb chromate (b)		0.4	1.8	+	0.4						30, 33	+C/Lu
Ba chromate		1	8	-/+ _a	2						33	?
Zn chromate pigments		0.06	0.5	+	0.06						33	+C/Lu ; HC
Pb chromate pigments		0.04	2	+	0.04						33	+C/Lu
SODIUM fluoride in $\mu\text{g}/\text{ml}$	BALB/3T3	75	800	-		25	50	+		50	42	
									+	25		

(a) -/+ low transforming effect ; - : negative ; * C :carcinogen ; Lu :lung ; Mes :mesothelium ; HC :human carcinogen

(b) synergic effect Cr/Pb exposure (30)

Table 4 : Results of SHE cell morphological transformation assays after a continuous or a two-stage exposure to organic compounds. Range of inactive or/and active concentrations including the lowest observed effective concentration (LOEC in M).

Compound / SHE cells	Continuous exposure			Two-stage exposure					Ref.	In vivo carcinogenicity (IARC)
	conc. range tested in M		results	conc. range tested in M		initiator	promoter	LOEC		
	lowest	highest	LOEC	lowest	highest	-like	-like	LOEC		
CHEMICALS										
<i>Glycol ethers and der.</i>										
EGME	4.10 ⁻²	32.10 ⁻²	-						29	n.r.
Methoxyacetaldehyde	1.10 ⁻⁴	3.10 ⁻⁴	+	1.10 ⁻⁴					29	n.r.
<i>Nitro alkanes</i>										
1-nitropropane	5.10 ⁻³	4.10 ⁻²	-	1.10 ⁻²	4.10 ⁻²	+	-	2.10 ⁻²	31	-
2-nitropropane	1.10 ⁻²	4.10 ⁻²	-	1.10 ⁻²	4.10 ⁻²	+	-	1.10 ⁻²	31	+C/Liver
<i>Peroxides</i>										
Benzoyl peroxide	1.10 ⁻⁵	6.10 ⁻⁵	-	2.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁵	-	+	2.10 ⁻⁵	31	skin TP
	4.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁴	-	4.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁴		+	4.10 ⁻⁵	57	
						+ _b		4.10 ⁻⁴		
<i>Phorbol esters</i>										
TPA	16.10 ⁻⁸		+	16.10 ⁻⁸			++	16.10 ⁻⁸	6, 7, 43	skin TP
	8.10 ⁻⁸	16.10 ⁻⁸	+	8.10 ⁻⁸			++	8.10 ⁻⁸	31	
4 α -TPA	8.10 ⁻⁸	16.10 ⁻⁸	-	8.10 ⁻⁸	16.10 ⁻⁸		-		31	-
<i>Phthalic acid derivatives</i>										
Di(2-ethylhexyl)phthalate	1.10 ⁻⁴	8.10 ⁻⁴	+	1.10 ⁻⁴					31	+C/Liver
	25.10 ⁻⁶	1.10 ⁻⁴	+	25.10 ⁻⁶					17, 21	
Mono(ethylhexyl)phthalate	5.10 ⁻⁵	15.10 ⁻⁵	+	5.10 ⁻⁵ ⁽²⁾	5.10 ⁻⁵	15.10 ⁻⁵	-	-	17, 21	
Phthalic anhydride	5.10 ⁻⁵	4.10 ⁻⁴	-	2.10 ⁻⁴	4.10 ⁻⁴		-	-	31	-

Compound / SHE cells	Continuous exposure				Two-stage exposure					Ref.	In vivo* carcinogen. (IARC)
	conc. range tested in M		results	LOEC	conc. range tested in M		results				
	lowest	highest			lowest	highest	-like initiator	-like promoter	LOEC		
Polycyclic aromatic hydrocarbons											
BaP	4.10 ⁻⁷	4.10 ⁻⁶	+	4.10 ⁻⁷						43	+ C/Skin
	4.10 ⁻⁷	3.10 ⁻⁶	+	4.10 ⁻⁷	4.10 ⁻⁷	3.10 ⁻⁶	++		4.10 ⁻⁷	31	
	4.10 ⁻⁶		+	4.10 ⁻⁶	4.10 ⁻⁷		++		4.10 ⁻⁷	6,7,17-22	
	2.10 ⁻⁶	8.10 ⁻⁶	+	2.10 ⁻⁶						55	
6-nitro-BaP	2.10 ⁻⁶	8.10 ⁻⁶	+	4.10 ⁻⁶						55	+ C/Skin
Chrysene	13.10 ⁻⁶	40.10 ⁻⁶	-							55	-
6-nitro-chrysene	13.10 ⁻⁶	40.10 ⁻⁶	+/-	40.10 ⁻⁶						55	+ C/Skin
DMBA	2.10 ⁻⁷	12.10 ⁻⁶	+	2.10 ⁻⁷						18	+ C/Skin
	8.10 ⁻⁷	32.10 ⁻⁷	+	8.10 ⁻⁷	8.10 ⁻⁷	32.10 ⁻⁷	+		8.10 ⁻⁷	31	
PESTICIDES											
Chlordane	2.10 ⁻⁶	20.10 ⁻⁶	+	20.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁶	20.10 ⁻⁶	+	-	2.10 ⁻⁶	7	+C/Liver
	5.10 ⁻⁶	30.10 ⁻⁶	-		10.10 ⁻⁶	40.10 ⁻⁶	+	-	10.10 ⁻⁶	31	
Chlorothalonil	2.10 ⁻⁷	2.10 ⁻⁶	-		2.10 ⁻⁷	2.10 ⁻⁶	-	+	8.10 ⁻⁷	6	+C/Kidney
DRUGS											
Clofibrate	1.10 ⁻⁴	8.10 ⁻⁴	-		4.10 ⁻⁴	8.10 ⁻⁴	+	+	4.10 ⁻⁴	31	+C/Liver
	25.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁴	+	25.10 ⁻⁶ _a	25.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁴	+		25.10 ⁻⁶ _a	22, 58	
	25.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁴	+	1.10 ⁻⁴	25.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁴	+	-	2.10 ⁻⁴	17, 19, 21	
Diethylstilbestrol	4.10 ⁻⁶	16.10 ⁻⁶	+/- _b	8.10 ⁻⁶	8.10 ⁻⁶	32.10 ⁻⁶	+	-	16.10 ⁻⁶	31	+C/MG,AG, Hy,HC
methyl-clofenapate	25.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁴	+	1.10 ⁻⁴ ₍₂₎ 5.10 ⁻⁵ ₍₃₎	25.10 ⁻⁶	2.10 ⁻⁴	+	+	5.10 ⁻⁵	17, 19, 21	+C/Liver
trenbolone	37.10 ⁻⁷	37.10 ⁻⁵	+	37.10 ⁻⁶	37.10 ⁻⁷	37.10 ⁻⁶	+		37.10 ⁻⁷	43	
testosterone	35.10 ⁻⁷	35.10 ⁻⁵	+	17.10 ⁻⁶	35.10 ⁻⁷	35.10 ⁻⁶	+		35.10 ⁻⁷		

BaP : benzo(a)pyrene ; DMBA : dimethylbenzanthracene ; EGME : ethylene glycol monomethyl ether ; TPA : 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate ;
a: 2 renewals and pH 7.35 of the test medium instead of 7.0 in (d5,6,7) ; (2)(3) : 1 or 2 renewals of the test medium during the 7 day exposure
b: +/- low transforming effect ; - negative
* : C carcinogen ; MG mammary gland ; AG Adrenal gland ; Hy hypophyse ; n.r. not reported ; HC human carcinogen ; TP tumour-promotor

Dans ce travail, nous avons étudié la relation qui pouvait exister entre l'apoptose et la transformation néoplasique des cellules embryonnaires de hamster Syrien (SHE) en culture. L'étude montre que les cellules SHE sont peu sensibles aux inducteurs chimiques de l'apoptose comme les inhibiteurs de topoisomérases, le 5-fluorouracile, le méthyl méthane sulfonate, la vinblastine ou le benzo(a)pyrene. Une privation des facteurs de croissance entraîne au contraire une apoptose importante et rapide dans ce type cellulaire. Le phénomène apoptotique des cellules SHE suite à une privation du sérum se caractérise par les modifications nucléaires classiques, comme la condensation de la chromatine ou la fragmentation du noyau, par une dégradation de l'ADN en barreaux d'échelle, par le maintien de l'intégrité des membranes, par une inhibition de la transcription du gène *myc*. Par contre, l'apoptose de ce type cellulaire n'est pas associée à l'apparition du fragment 89kDa de la poly(ADP-ribose)polymérase, ni à l'activation de la caspase-3.

Le zinc, sous forme de chlorure, inhibe totalement l'apoptose des cellules SHE et permet le maintien de l'expression du gène *myc*. Appliqué seul, ainsi qu'en association avec le benzo(a)pyrene ou le fomesafen, le zinc augmente le taux de transformation morphologique des cellules cultivées en densité clonale. L'action positive de cet élément sur la survie des cellules laisse penser qu'une augmentation du taux de transformation pourrait être la conséquence d'un dysfonctionnement du processus de mort cellulaire.

In this work, we studied the relationship between the apoptosis process and the neoplastic transformation in Syrian hamster embryo (SHE) cells. Results showed that SHE cells were little sensitive to apoptosis chemical inducers as topoisomerase inhibitors, 5-fluorouracile, methyl methane sulfonate, vinblastine or benzo(a)pyrene. A growth factor withdrawal in this cell type drove to an important and fast apoptotic phenomenon. The apoptosis induced by a serum depletion was characterised by nuclear modifications, such as chromatin condensation and nucleus fragmentation, by a DNA ladder pattern of degradation, by the maintain of membrane integrity and by an inhibition of *myc* transcription.

However, the apoptosis of SHE cells was not associated with the appearance of a 89kDa fragment of the poly(ADP-ribose)polymerase protein or with the activation of the caspase-3.

Zinc chloride totally inhibited apoptosis in SHE cells and allowed to maintain *myc* expression. When it was applied alone, or in association with benzo(a)pyrene or fomesafen, zinc enhanced the morphological transformation rate of SHE cells cultured at clonal density. The positive action of this element on the cell survival reinforce the hypothesis that an enhancement in cell transformation may result from a dysfunction of cell death.