



AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

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

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

UNIVERSITE DE METZ

1993

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention "Toxicologie de l'Environnement"

soutenue le 9 Juillet 1993

TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE DES CELLULES SHE ET COMMUNICATION INTERCELLULAIRE DES V79 APPLIQUEES A LA DETECTION DE CANCEROGENES NON GENOTOXIQUES

Halima BESSI

MEMBRES DU JURY

Professeur **P. VASSEUR** - Université de Metz - Directeur de thèse

Docteur **G. NGUYEN-BA** - CNRS- Villejuif - rapporteur

Professeur **B. RETHER** - Université de Strasbourg - rapporteur

Docteur **Z. ELIAS** - INRS Vandoeuvre les Nancy

Professeur **E. M. BELKHADIR** - Doyen de la Faculté des Sciences de Meknès

Docteur **J. F. FERARD** - Université de Metz

1993

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention "Toxicologie de l'Environnement"

soutenue le 9 Juillet 1993

**TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE
DES CELLULES SHE ET
COMMUNICATION INTERCELLULAIRE DES V79
APPLIQUEES A LA DETECTION DE
CANCEROGENES NON GENOTOXIQUES*****Halima BESSI***

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19930385
Cote	S/M3 93/12
Loc	Mayasau

MEMBRES DU JURYProfesseur **P. VASSEUR** - Université de Metz - Directeur de thèseDocteur **G. NGUYEN-BA** - CNRS- Villejuif - rapporteurProfesseur **B. RETHER** - Université de Strasbourg - rapporteurDocteur **Z. ELIAS** - INRS Vandoeuvre les NancyProfesseur **E. M. BELKHADIR** - Doyen de la Faculté des Sciences de MeknèsDocteur **J. F. FERARD** - Université de Metz

*Ce travail a été réalisé
au Laboratoire de Toxicologie,
du Centre des Sciences de l'Environnement,
sous la Direction du Professeur P. VASSEUR.*

*C'est le moment pour moi de rendre hommage
au Professeur I. CHOULOULINKOV,
qui m'a soutenue tout au long de cette étude.
Fasse que ce travail soit fidèle à sa pensée.*

Remerciements

De simples mots ne peuvent exprimer ma profonde reconnaissance, mon admiration et mon respect pour le Professeur P. VASSEUR, qui m'a accueillie dans son laboratoire pour la réalisation de ce travail.

Votre bienveillance à mon égard, votre soutien et la confiance que vous m'avez accordée sur le plan de la recherche, resteront inoubliables pour moi.

Grâce à vous, mon séjour en France a été fructueux, tant sur le plan professionnel que sur le plan humain.

Mes sincères remerciements sont adressés au Docteur G. NGUYEN-BA, chercheur au CNRS (Villejuif) pour le soutien et l'intérêt qu'il a toujours accordé à cette étude.

Je vous remercie d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail.

Je voudrais témoigner ma reconnaissance pour sa collaboration, au Professeur B. RETHER du Laboratoire de Biologie Végétale Appliquée à l'I.U.T. de Strasbourg, qui, malgré ses nombreuses occupations, a accepté de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je désire vivement remercier le Professeur Z. ELIAS pour son accueil dans son unité et ses précieux conseils. Je lui suis reconnaissante d'avoir accepté de participer à ce jury,

Je souhaite remercier le Professeur J.F. FERARD pour ses conseils et l'intérêt constant qu'il a manifesté à l'égard de mon travail ; je lui suis reconnaissante de participer à ce jury.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer ma gratitude au Professeur E. BELKHADIR, Doyen de la Faculté de Meknès, qui a été à l'origine de ma venue en France et qui me fait l'honneur de figurer parmi les membres de ce jury.

Merci à Claudine RAST, j'ai apprécié la qualité de ton travail et ton sincère amour pour la recherche. J'ai apprécié également ton amitié.

Un grand merci à Maryline et Nathalie qui, par leur gentillesse et leur efficacité, ont grandement contribué à l'élaboration de cette thèse.

Je souhaite témoigner ma reconnaissance à Anne-Marie, Marie-Cécile, Carole, Véronique, Lucie, Sophie, Chantal, Jean-Christophe, Ali et Fabrice. Je leur adresse mes plus vifs remerciements pour leur aide, le soutien et l'amitié qu'ils m'ont apportés.

Enfin une pensée toute particulière pour Claude et Omar, ma "petite famille" de Metz, je suis fière d'avoir connu des gens aussi "grands".

Un grand merci à tous les amis de Metz.

Ce moment important me semble idéal pour témoigner à mes parents, à Taoufiq, toute mon affection et ma reconnaissance pour l'amour, la confiance et le soutien sans faille qu'ils m'ont accordés ; je leur dédie ce travail.

Le financement de ces travaux a été assuré par le Ministère de l'Environnement et par une bourse du Gouvernement Français dans le cadre de l'Action Intégrée entre l'Université de Metz et la Faculté de Meknès.

L'aide financière de la CEE (contrat STEP-CT91-0146-DTEE) a contribué également à mener cette étude à terme.

Que les responsables de ces organismes en soient remerciés.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AMPC	: Adénosine monophosphate cyclique
ARN	: Acide ribonucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
B(a)P	: Benzo(a)pyrène
CHO	: Ovaires d'hamster chinois
DFMO	: d-Difluorométhylornithine
DG	: Diacylglycérol
DMEM	: Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle medium)
DMSO	: Diméthyl sulfoxide
DXME	: Dexaméthasone
EC	: Efficacité de clonage
HGPRT	: Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase
HPA	: Hydrocarbures polycycliques aromatiques
IP3	: Inositol triphosphate
KBq	: Kilobecquerel
ODC	: Ornithine décarboxylase
PBS	: Phosphate buffered saline : Tampon phosphate
PIP2	: Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PKc	: Proteine Kinase C
SCE	: Echange de chromatides soeurs (sister chromatides exchange)
SDS	: Sodium dodecyl hydrogénosulfate
SHE	: Embryons d'Hamster syrien
6-TG	: 6-thioguanine
TPA	: 12-0-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate
UDS	: Synthèse non programmée de l'ADN (unsheduled Synthesis DNA)

SOMMAIRE

Page

INTRODUCTION

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I - Historique de la cancérogénèse	3
II - Concepts des mécanismes de la cancérogénèse	4
III - Mécanismes génétiques de la cancérogénèse chimique	6
A - Dommages et réparation de l'ADN	6
B - Principaux types de mutations	8
C - Systèmes de réparation	9
D - Méthodes d'étude des altérations de l'ADN	10
D.1 - Essais relatifs aux mutations géniques	
D.2 - Essais relatifs aux mutations chromosomiques	
D.3 - Essais relatifs aux effets sur l'ADN	
D.4 - Méthodes de détection des adduits à l'ADN	
IV - Mécanismes épigénétiques : implications dans la cancérogénèse	12
A - Mécanismes de transmission du signal mitotique	13
B - Inhibition de la communication intercellulaire	14
C - Propriétés de l'ester de phorbol, 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate ou TPA	17
C.1 - Action sur la protéine kinase C et la mobilisation du Ca^{++}	
C.2 - TPA et inflammation	
C.3 - Génération de radicaux libres et des formes actives de l'oxygène	
C.4 - Induction de l'activité ODC et de la biosynthèse des polyamines	
C.5 - Inhibition de la communication intercellulaire	
C.6 - Inhibiteurs des effets du TPA	
D - Propriétés des cancérogènes non génotoxiques autres que les esters de phorbol	24
D.1 - Les promoteurs type TPA	
D.2 - Les promoteurs type non TPA	
V - Transformation cellulaire in vitro, rôle dans la cancérogénèse	26
VI - Chlordane	
A - Production et utilisation	29
B - Métabolisme, résidus et toxicité	30
C - Données sur la cancérogénicité du chlordane	30
VII - Chlorothalonil	
A - Production et utilisation	33
B - Métabolisme	34
C - Effets toxiques	35
D - Données sur la cancérogénicité du chlorothalonil	35

MATERIEL et METHODES

I - Les produits chimiques	37
A - Benzo(a)pyrène (B(a)P)	
B - 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA)	
C - Dexaméthasone	
D - 2 Amino-6-mercaptopurine ou 6-thioguanine (6-TG)	
II - Substances et échantillons étudiés	38
A - Chlordane	
B - Chlorothalonil	
C - Extraits organiques d'un lixiviat de déchet B et d'un percolat de décharge T4	
III - Le test d'Ames	39
A - Réactifs biologiques	
B - Protocole et expression des résultats	
IV - Test d'inhibition de la coopération métabolique sur cellules V79	41
A - Réactifs biologiques	
B - Principe	
C - Protocole du test	
D - Expression des résultats	
V - Essai de transformation cellulaire sur cellules d'embryons de Hamster syrien (SHE)	43
A - Réactifs biologiques	
A.1 - Préparation des cellules primaires d'embryons de Hamster syrien (SHE)	
A.2 - Sélection préliminaire de sérum, cellules et milieu de culture	
B - Principe	
C - Protocoles	
C.1 - Effet transformant complet	
C.2 - Effet initiateur	
C.3 - Effet promoteur	
D - Expression des résultats	
VI - Etude de l'activité ODC sur cellules SHE	48
A - Principe	
B - Protocole	
C - Expression des résultats	
VII - Mesure du Ca^{2+} cytoplasmique libre en cytométrie de flux par utilisation du "Fluo 3"	50
A - Réactifs biologiques	
B - Principe	
C - Protocole	

VIII - Recherche des adduits à l'ADN du chlordane par la méthode de post-marquage sur les cellules SHE	51
--	----

- A - Préparation et traitement des cellules
- B - Isolement et purification de l'ADN
- C - Détection des adduits

- C.1 - Etapes enzymatiques
- C.2 - Etapes chromatographiques
- C.3 - Autoradiographie des plaques et comptage de la radioactivité des spots

- D - Calcul du nombre d'adduits

RESULTATS

Partie I

Etude de la mutagénicité du chlordane, du chlorothalonil et des extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B

I - Chlordane	56
II - Chlorothalonil	56
III - Percolat de décharge et lixiviat de déchet	
A - Percolat T4	57
B - Lixiviat B	58

Partie II

Etude de l'inhibition de la coopération métabolique entre des cellules fibroblastiques de la lignée V79 par le chlordane, le chlorothalonil et des extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B

I - Inhibition de la coopération métabolique par le chlordane	61
II - Inhibition de la coopération métabolique par le chlorothalonil	62
III - Inhibition de la coopération métabolique par les extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B	62

Partie III

Etude des effets du chlordane, du chlorothalonil et des extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B, sur la transformation des cellules d'embryon de Hamster syrien (SHE)

I - Chlordane	
A - Traitement par le chlordane seul	64
B - Traitement séquentiel par le chlordane et le TPA	64
C - Traitement séquentiel par le B(a)P et le chlordane	65
D - Action de la dexaméthasone sur les effets combinés du chlordane et du TPA	66
II - Chlorothalonil	
A - Traitement par le chlorothalonil seul	66
B - Traitement séquentiel par le chlorothalonil et le TPA	67
C - Traitement séquentiel par le B(a)P et le chlorothalonil	67

III - Transformation morphologique des cellules (SHE) par les extraits organiques de T4 et B	
A - Extrait organique du percolat de décharge T4	68
A.1 - Traitement par l'extrait organique T4 seul	
A.2 - Traitement séquentiel par l'extrait organique du percolat T4 et le TPA	
A.3 - Traitement séquentiel par le B(a)P et l'extrait organique du percolat T4	
B - Extrait organique du lixiviat B	70
B.1 - Traitement par l'extrait organique du lixiviat B seul	
B.2 - Traitement séquentiel par l'extrait organique du lixiviat B et le TPA	
B.3 - Traitement séquentiel par le B(a)P et l'extrait organique du lixiviat B	
Partie IV	
Effet du chlordane sur l'activité ODC des cellules SHE	
A - Cinétique d'induction de l'ODC par le chlordane	77
B - Effets du chlordane sur l'activité ODC induite par le TPA	77
Partie V	
Effet du chlordane sur le taux Ca^{2+} intracellulaire des cellules SHE	
A - Modulation du Ca^{2+} libre intracellulaire par l'ionomycine	79
B - Effet du chlordane sur le taux du Ca^{2+} intracellulaire libre des cellules SHE	79
C - Effets du TPA sur le taux de Ca^{2+} intracellulaire libre des cellules SHE prétraitées au chlordane	80
D - Effets du chlorothalonil sur le taux de Ca^{2+} intracellulaire libre des cellules SHE	80
Partie VI	
Mise en évidence d'adduits sur l'ADN des cellules SHE en présence et en absence du chlordane	83
DISCUSSION GENERALE	87
CONCLUSION	93

INTRODUCTION

La cancérogénicité est l'une des formes de toxicité des polluants les plus redoutables de par le caractère complexe, souvent inéluctable du cancer, et ses manifestations tardives. Hygiénistes et environnementalistes se sentent désarmés pour prévenir et combattre un processus dont la plupart des mécanismes leur échappe.

La stratégie de prévention, au niveau environnemental, consiste actuellement à réglementer voire interdire, sur la base de données expérimentales ou épidémiologiques, l'usage des substances à propriétés cancérogènes susceptibles de se retrouver à terme dans l'environnement.

La détection des potentialités cancérogènes avant commercialisation d'une substance repose sur deux approches : la première est l'expérimentation animale avec la réalisation d'essais à long terme ; la deuxième, complémentaire ou alternative à la précédente, est l'approche "*in vitro*" basée sur la mise en oeuvre d'essais à court terme sur cultures de cellules procaryotes et eucaryotes.

Les essais stantardisés et préconisés par la législation dans ce but ont, pour principe, de détecter des effets sur l'ADN, par exemple des modifications structurales ou des altérations du caryotype. Ces essais permettent d'identifier des substances "génotoxiques" ; mais les cancérogènes agissant sur des cibles autres que le génome échapperont à un tel screening.

Le caractère néoplasique de cancérogènes agissant par des mécanismes épigénétiques ne peut être détecté dans le cadre de la réglementation actuelle, qu'à la suite d'expérimentation à long terme chez l'animal. Il n'existe pas d'essais *in vitro* stantardisés qui répondent à cet objectif. Conscientes des lacunes de la réglementation actuelle, les instances internationales, CEE, OCDE ont incité récemment au développement de ces méthodes.

Notre travail s'inscrit dans ce contexte et concerne la détection *in vitro* des cancérogènes non génotoxiques. Cette détection est basée sur les propriétés de ces substances d'activer la prolifération cellulaire, de perturber le contrôle de la croissance et de la différenciation des cellules et de potentialiser l'action des agents génotoxiques en favorisant la multiplication des cellules initiées.

Les essais mis en oeuvre étudient :

- la transformation morphologique des cellules embryonnaires d'Hamster syrien SHE selon Berwald et Sachs (1963), DiPaolo *et al.* (1969), Chouroulinkov et Lasne (1978),
- la communication intercellulaire de lignées de cellules de Hamster chinois V79 selon Trosko (1979),
- l'activité de l'ornithine décarboxylase.

Ces essais, intégrant différents schémas d'application pour la transformation cellulaire, ont été étudiés pour leur capacité à détecter des potentialités cancérogènes de contaminants de l'environnement et à apporter des informations sur le profil d'action probable.

Deux pesticides chlorés, le chlordane et le chlorothalonil, reconnus comme étant cancérogènes chez l'animal mais non mutagènes, ont été testés à l'aide de cette batterie d'essais.

Des lixiviats de déchets et percolats de décharge ultimes ont été étudiés dans les mêmes conditions.

L'ensemble de cette étude permettra de discuter d'une stratégie applicable à l'évaluation de la cancérogénicité des substances chimiques, à celle des milieux environnementaux et de leurs sources de contamination.

La première partie de ce travail est une synthèse bibliographique des principes de la cancérogénèse chimique impliquant des mécanismes génétiques et épigénétiques. Certains mécanismes d'action de cancérogènes non génotoxiques et leur cibles potentielles seront présentés afin de justifier du choix des méthodes utilisées dans cette étude ; ils seront illustrés à l'aide du TPA (12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate) qui est l'un des promoteurs de tumeurs les mieux connus.

Les deuxième et troisième parties seront consacrées respectivement aux matériel et méthodes et aux résultats obtenus avec la batterie d'essais mis en oeuvre.

Des investigations complémentaires ont été nécessaires pour expliquer les profils d'action observés avec le chlordane et ont concerné :

- la mesure des adduits à l'ADN qui a été réalisée par le Professeur B.Rether du laboratoire de biologie végétale appliquée à l'IUT de l'Université de Strasbourg

- la mesure des flux calciques réalisée, avec la collaboration du Docteur G. Nguyen-Ba, sous la direction du Docteur Z. Mishal dans le service de cytofluométrie, IRSC-CNRS de Villejuif.

Une étude des potentialités mutagènes de ces échantillons a été réalisée, au préalable, à l'aide du test d'Ames qui est, classiquement, le premier essai *in vitro* mis en oeuvre permettant de juger d'une réaction sur l'ADN, afin de vérifier les données bibliographiques concernant les deux pesticides conformément au schéma classique d'évaluation.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Historique de la cancérogénèse

Le cancer est une maladie très ancienne. Des paléopathologistes ont observé des lésions néoplasiques sur des os de dinosaures ; de même, l'autopsie de momies a révélé l'existence de tumeurs osseuses (Zimmerman, 1977).

L'association entre les facteurs environnementaux et le cancer, n'est pas nouvelle : dès 1700, Ramazzini relevait la fréquence élevée de cancers de sein chez les religieuses, en liaison avec leur style de vie. En 1761, le physicien John Hill soulignait la fréquence des polypes nasaux chez des sujets habitués à priser le tabac. Quelques années plus tard, en 1775, Percival Pott décrivait pour la première fois un cas de maladie professionnelle et faisait le lien entre l'exposition des jeunes ramoneurs à la suie des cheminées et le développement des cancers du scrotum chez ces sujets, une fois parvenus à l'âge adulte (Miller, 1978). En 1918, Yamagiwa et Ichikawa réalisaient la première épreuve de cancérogénèse chimique en laboratoire, en induisant des tumeurs cutanées de l'oreille de lapin par applications répétées de goudrons.

En 1924, Kennaway isolait des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des goudrons de houille et réussissait à identifier et à synthétiser l'un des composés les plus actifs, le benzo(a)pyrène (B(a)P).

Depuis, de nombreux travaux ont permis de déceler le pouvoir cancérogène de plusieurs familles chimiques (Kennaway, 1924 ; Hueper, 1966 ; Sugimura *et al.*, 1977 ; Kasai *et al.*, 1980 ; Bartsh et Tomatis, 1983 ; Gold *et al.*, 1984 ; Merletti *et al.*, 1984 ; Vainio *et al.*, 1985).

Parallèlement à la cancérogénèse expérimentale, les études épidémiologiques soulignaient que la plupart des cancers humains (60 à 90 %) serait liée à des facteurs environnementaux incluant aussi bien le tabac, les aliments, les produits pharmaceutiques, les polluants atmosphériques, que le mode de vie des individus (Higginson et Muir, 1977 ; Doll et Peto 1981 ; Johnson, 1982 ; Cullen, 1986).

De l'ensemble de ces travaux, il apparaît que la cancérogénèse résulte d'une interaction complexe et dynamique entre l'individu et son environnement.

II. Concepts des mécanismes de la cancérogénèse

Le concept selon lequel la mutagénicité est une propriété intrinsèque des cancérogènes, est maintenant admis depuis de nombreuses années. Dès 1914, Boveri rapportait que la présence d'anomalies chromosomiques serait à l'origine de la formation de tumeurs malignes. Plus tard, Miller et Miller (1947) mettaient l'accent sur le rôle de l'activation métabolique dans l'expression de la cancérogénicité des HAP. Brookes et Lawley (1964) montraient que certains cancérogènes chimiques présentaient la propriété de se lier à l'ADN. Miller (1970), Miller et Miller (1977) mettaient en évidence que la propriété commune de cancérogènes de structure très diverse était leur caractère électrophile : l'électrophilie leur confère la propriété de se lier par covalence aux sites nucléophiles des macromolécules cellulaires, en particulier à ceux de l'ADN qui constitue la cible la plus critique des cancérogènes.

Une altération de l'ADN, si elle n'est pas réparée avant la division cellulaire, peut constituer l'un des premiers événements du processus de cancérogénèse, désigné sous le terme d'"initiation".

La mutation, est un élément initiateur du cancer d'autant plus probable qu'elle touche des gènes essentiels au contrôle de la division cellulaire, comme des protooncogènes ou encore des gènes suppresseurs de tumeurs.

L'activation anormale des protooncogènes en oncogènes est à l'origine du dérèglement des voies présidant à la croissance et à la différenciation cellulaire et peut augmenter la probabilité de transformation néoplasique et de cancérisation des cellules. Les travaux de Brown *et al.* (1990) et de Sukumar (1990) démontrent l'implication des protooncogènes en cancérogénèse et en particulier celle d'une mutation spécifique du protooncogène *Ha-ras* dans l'initiation des cancers mammaires chez les rongeurs. Par ailleurs, la transfection d'animaux par l'oncogène viral *v-Ha-ras* qui permet de sauter l'étape d'initiation dans l'induction expérimentale des tumeurs cutanées chez la souris, illustre encore le rôle de cet oncogène en cancérogénèse (Bailleul *et al.*, 1989).

Les gènes suppresseurs de tumeurs entraînent un dérèglement de la croissance et de la différenciation cellulaire, s'ils sont inactivés, contrairement aux protooncogènes qui perturbent ces mécanismes une fois activés. L'inactivation de ces gènes essentiels peut résulter de plusieurs mécanismes : soit les deux allèles du gène sont inactivés par suite de mutations (Cavenee *et al.*, 1983), soit seul l'allèle dominant est muté (Sapienza, 1990) ; ou encore, la dégradation protéolytique du produit de ces gènes est accélérée, ainsi qu'il a été avancé pour expliquer l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs (Scheffner *et al.*, 1990) dans le cas du rétinoblastome (Knudson, 1971 ; 1985).

Le concept du processus multiétape dans la cancérogénèse a été introduit par Berenblum et Shubik (1947) ; ces auteurs ont montré qu'un traitement séquentiel de la peau de souris par le benzo(a)pyrène appliqué une seule fois et à faible dose, suivi d'applications répétées d'huile de croton, potentialisait l'action cancérogène du B(a)P en augmentant fortement la production de tumeurs cutanées et en raccourcissant leur délai d'apparition. Ces travaux sont à l'origine du concept de la cancérogénèse chimique en deux étapes : initiation et promotion.

L'étape de la "progression" a été introduite ensuite par plusieurs auteurs (Nowell, 1976) ; cette étape est caractérisée par une augmentation de l'instabilité génétique se manifestant par des anomalies du nombre et de la structure des chromosomes. Ces anomalies ont été constatées aussi bien *in vitro*, dans les cellules en culture, qu'*in vivo* dans les cellules de tumeurs solides, au cours de leur évolution vers la malignité.

Cette subdivision de la cancérogénèse en trois étapes, initiation, promotion et progression, est utilisée pour des raisons de simplification ; elle est fondamentalement discutable, puisque chaque étape pourrait, elle-même, être subdivisée en plusieurs événements moléculaires (Bishop, 1987 ; Weinberg , 1989). Ceci est d'autant plus évident que six événements génétiques et épigénétiques indépendants ont été très tôt distingués dans certains types de cancers tel que le cancer colorectal (Cairns, 1975).

L'initiation, la promotion et la progression sont, néanmoins, les étapes les mieux définies en cancérogénèse expérimentale :

- l'*initiation* aboutit à l'altération structurale et persistante de l'ADN ; cette atteinte peut résulter de l'exposition cellulaire à des facteurs chimiques, physiques (radiations), ou biologiques (virus,...), ou d'erreurs au cours de la réplication de l'ADN.

Les cellules "initiées" réagiraient moins aux signaux inter et intra cellulaires qui régulent la croissance et l'homéostasie cellulaire, tels que les facteurs "négatifs" de croissance qui induisent la différenciation terminale ou programment la mort d'une cellule normale (Yuspa et Harris, 1982 ; Wiley *et al.*, 1984 ; Yuspa et Poirier, 1988 ; Rotello *et al.*, 1991).

Les dérivés dits génotoxiques qui produisent des dommages au niveau de l'ADN, contribuent en partie ou en totalité à l'initiation cellulaire. Ces dérivés sont donc des *initiateurs* potentiels et sont utilisés comme tels en cancérogénèse expérimentale *in vivo* ou *in vitro*.

- la *promotion* est l'étape généralement associée à la phase de prolifération cellulaire des cellules initiées. Elle correspond à une période de latence plus ou moins prolongée qui précède l'expression du cancer sous forme de tumeurs. Cette étape implique la sélection et l'expansion clonale des cellules initiées (Harris, 1991). La prolifération cellulaire dérégulée, augmenterait la probabilité d'erreurs et de dommages génétiques, qui, en s'accumulant dans les cellules, peuvent favoriser l'évolution du processus de cancérogénèse.

L'ester de phorbol, TPA (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate) est le promoteur de référence : c'est l'un des principes actifs de l'huile de croton. Cette substance a été et reste très utilisée en cancérogénèse expérimentale afin d'élucider les mécanismes dits "épigénétiques" de la promotion tumorale.

- la *progression*, qui est aussi une étape mal élucidée, correspond à l'ensemble des événements qui induisent la conversion d'une tumeur bénigne en une tumeur maligne et participent à leur évolution. La progression tumorale se caractérise par une augmentation de l'instabilité génétique des cellules et par leur capacité progressive à échapper aux contrôles cellulaires et à évoluer très activement vers l'autonomie. Ces cellules finiront par envahir les tissus voisins en développant des métastases : c'est l'étape ultime et souvent irrémédiable du processus cancéreux.

III - Mécanismes génétiques de la cancérogénèse chimique

A - Dommages et réparation de l'ADN

Au fur et à mesure de l'étude des mécanismes d'action des cancérogènes, il est apparu que la propriété d'endommager la structure et/ou les fonctions de l'ADN était partagée par une grande variété de cancérogènes, qui ont de ce fait été qualifiés de "génétoxiques". Cette capacité à endommager l'ADN résulte souvent de la fixation covalente de la substance génotoxique à l'ADN, en formant des "adduits" ; la réactivité vis-à-vis de l'ADN peut être évaluée à l'aide de produits marqués par la mesure d'un indice, le "Covalent Binding Index" ou CBI, selon la méthode de Lutz (1979). Le caractère réactif ou électrophile a ainsi été déterminé pour différentes classes de cancérogènes.

Les conséquences biologiques de la formation d'adduits, dépendent de la nature de ces adduits et de leur localisation sur la molécule d'ADN. Par exemple, la méthylation de la guanine sur l'azote 7 est moins mutagène que sur l'oxygène 6, puisque dans le premier cas, l'azote méthylé peut encore participer à l'établissement de liaisons hydrogènes avec la cytosine, tandis que le deuxième cas entraîne un mésappariement avec la thymine : au terme de deux cycles réplcatifs, l'erreur est fixée sous la forme d'une transition GC $\Rightarrow$ AT (Loveless, 1969 ; Bartsch *et al*, 1983).

Certains adduits provoquent une importante distorsion de la molécule d'ADN et sont hautement mutagènes, tels que les adduits des métabolites de l'aflatoxine B1 sur 7N-G (Venitt et Parry, 1984). D'autres entraînent des mutations ponctuelles par substitution, délétion ou addition de bases. Des mutations chromosomiques peuvent aussi en résulter, comme dans le cas où l'alkylation de l'ADN entraîne une dépurination suivie d'un clivage hydrolytique.

Toutefois certaines substances sont capables d'induire des mutations, sans que l'on puisse mettre en évidence de liaison covalente à l'ADN : les intercalants qui s'insèrent entre deux plans de bases en sont un exemple. Des mutations génomiques peuvent aussi résulter de l'interaction avec d'autres cibles que l'ADN, telles que le fuseau mitotique.

La cellule a la capacité de réparer son ADN lésé ; schématiquement, trois situations peuvent se présenter suite à l'activation des mécanismes de réparation:

- la réparation est parfaite, et la molécule d'ADN est ramenée à son état initial sans laisser de mutations.
- les capacités de réparation sont insuffisantes pour remédier aux altérations trop importantes ; le blocage de la réplication de l'ADN qui en résulte, peut provoquer la mort de la cellule, auquel cas la mutation n'a aucun risque de se manifester.
- la réparation est imparfaite et l'ADN lésé n'est pas restitué dans son état initial : ce processus peut conduire à des altérations stables génétiquement transmissibles. Ce troisième type de réponse aboutit donc à la fixation de la lésion, qui sera transmise aux générations ultérieures de cellules sous forme d'une mutation.

En toxicologie génétique, il est classique de considérer que tout agent exogène ou endogène qui endommage l'ADN et/ou induit une réaction de réparation indicatrice de dommages préexistants au niveau du génome, est un cancérrogène potentiel.

Ashby et Tennant (1990) ont étudié la corrélation entre la réactivité vis-à-vis de l'ADN, la mutagénicité évaluée sur *Salmonella typhimurium* his- et la cancérogénicité *in vivo* sur des rongeurs, pour 301 substances appartenant à des catégories chimiques très diverses. Ils ont trouvé une étroite corrélation entre la réactivité d'une molécule vis-à-vis de l'ADN exprimée par sa structure chimique et son potentiel mutagène ; mais la relation de ces deux caractères avec la cancérogénicité chez l'animal est loin d'être aussi bonne.

Ainsi, l'essai sur *Salmonella* apparaît très sensible aux composés de structure électrophile et conclut à la mutagénicité de 84% de ces composés ; mais il donne aussi 33% de faux positifs dans la mesure où il classera "génotoxique" 33% des substances non cancérogènes dont la structure présente un caractère réactif. Une autre limite de ce test de mutagénèse est son incapacité à détecter des cancérogènes "inertes" vis-à-vis de l'ADN.

Ces travaux soulignent le fait qu'actuellement les essais de génotoxicité *in vitro* ne peuvent refléter tous les stades du processus de la cancérogénèse et que le principal intérêt de ces méthodes réside dans l'identification des substances capables d'altérer l'ADN et d'induire la phase initiale du processus de cancérisation. Mais d'autres événements génétiques et/ou épigénétiques seront nécessaires avant le stade de tumeur et de malignité.

Etant donné la complexité du processus cancérogène par rapport à la simplicité relative des essais à court terme, il apparaît que, même si l'intérêt de ces essais est indéniable en terme de potentialité génotoxique, leur interprétation en terme de risque cancérogène nécessite par contre, la plus grande prudence.

B - Principaux types de mutations

Le terme de mutation désigne tout changement du contenu informatif du matériel génétique, qui est transmis aux générations suivantes de cellules ou d'individus. Les altérations du contenu informatif de l'ADN et de son organisation peuvent revêtir des degrés divers et aller de la simple modification d'un nucléotide dans un codon, à celle du nombre de chromosomes dans le génome.

On peut donc distinguer 3 grandes classes de mutations : les mutations ponctuelles ou géniques, les mutations chromosomiques et les mutations génomiques.

. Les *mutations ponctuelles ou géniques* portent sur une ou quelques séquences de nucléotides au niveau d'un ou de plusieurs codons d'un gène. Ce type de mutation peut être le résultat de :

- substitution de paires de bases (c.à.d. remplacement d'une base par une autre),

- délétion ou insertion d'une ou de plusieurs bases au sein d'un ou de plusieurs codons : ceci entraîne un décalage du cadre de lecture du code génétique de l'ADN ; ce type de mutation est appelé "frameshift".

Les mutations "directes" résultent dans la perte de la fonction normale d'un produit génique, contrairement aux mutations "reverses" qui restaurent la fonction d'un gène ayant subi une mutation préalable.

. Les *mutations chromosomiques* se caractérisent par des altérations morphologiques de la structure de l'ADN, détectables par l'examen des cellules au stade de la métaphase pendant la mitose. Les mutations chromosomiques résultent de la cassure et de la recombinaison du matériel chromosomique durant le cycle cellulaire ; elles incluent des inversions et des translocations de chromosome.

Les *mutations génomiques* se caractérisent par un changement du nombre de chromosomes. Le génome haploïde est multiplié par 2 dans les cellules diploïdes ou euploïde ; lorsqu'il est multiplié par un facteur différent de 2, il y a polyploïdie. L'aneuploïdie se caractérise par la perte ou le gain d'un chromosome au cours de la division cellulaire.

C - Systèmes de réparation

L'ADN n'est pas une cible passive, la réponse de la cellule vis-à-vis des agressions se manifeste par l'activation de différents systèmes de réparation, ainsi qu'il a déjà été dit plus haut.

Les réparations dites fidèles telles que la réparation par excision-resynthèse de base ou de nucléotide, par réponse adaptative ou par photoréactivation, restituent généralement un ADN identique à son état initial : aucune mutation ne s'exprime chez la descendance.

D'autres systèmes de réparation erronée comme la réparation SOS, permettent à la cellule de survivre et de se diviser mais au risque d'acquérir des mutations supplémentaires. La réparation erronée est une source majeure de mutation.

D - Méthodes d'étude des altérations de l'ADN

D.1 - Essais relatifs aux mutations géniques

Les essais les plus largement utilisés sont ceux effectués des organismes simples procaryotes (bactéries) ou eucaryotes, réalisés sur des levures, des cellules d'insectes, des cellules de mammifères (cellules fibroblastiques d'origine ovarienne CHO, ou pulmonaire V79 de Hamster chinois).

Essais sur Procaryotes : Test d'Ames

Le test d'Ames est un test de mutation réverse, développé par Ames *et al.*, (1975) . C'est le test bactérien le plus utilisé pour la détection des propriétés génotoxiques des produits chimiques et d'échantillons environnementaux complexes.

Ce test utilise plusieurs souches de *Salmonella typhimurium*, portant chacune un type de mutation différent dans l'opéron codant pour la biosynthèse de l'histidine. Ces bactéries auxotrophes pour cet acide aminé sont donc incapables de se multiplier en milieu déficient en histidine.

L'exposition de ces mutants his^- à des mutagènes, entraîne la réversion du gène muté : les bactéries redevenues prototrophes pour l'histidine (révertants his^+) récupèrent simultanément la capacité de croître et de former des colonies en milieu dépourvu d'histidine. Le pouvoir mutagène est évalué par l'augmentation du taux de mutants reverses his^+ induits par l'exposition à la substance testée.

Contrairement aux mammifères, les bactéries sont déficientes en système enzymatique pour la métabolisation de pro-mutagènes en métabolites électrophiles capables d'interagir avec l'ADN. Pour pallier à cette déficience, le milieu d'essai est supplémenté par une fraction cytoplasmique d'hépatocytes de mammifères (S₉ mix) riche en monooxygénases et en cofacteurs enzymatiques. L'essai est effectué sans et avec S₉ mix afin de détecter les mutagènes respectivement actifs directement ou après métabolisation.

Un autre essai de mutation réverse sur des mutants *E. coli* auxotrophes pour le tryptophane est également utilisé en toxicologie génétique.

Test de mutation génique sur cellules eucaryotes

Des souches mutants de la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont été développées pour la détection des mutations directes ou reverses, de type substitutions de paires de bases et décalage du cadre de lecture.

Les essais sur cellules de mammifères CHO ou V79 sont actuellement les plus utilisés après le test d'Ames, pour la détection des mutations géniques. Ils utilisent des mutants déficients pour l'enzyme hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase (HGPRT⁻).

D.2 - Essais relatifs aux mutations chromosomiques

La détection des aberrations chromosomiques et des effets clastogènes se traduisant par la présence de micronoyau(x) dans le cytoplasme fait appel à des essais sur cultures de cellules de mammifères ou à des expérimentations *in vivo* sur vertébrés, le plus souvent sur mammifères.

D.3 - Essais relatifs aux effets sur l'ADN

La détection de la synthèse d'ADN hors réplication constitue la base de tests de génotoxicité sur cellules de mammifères en culture et *in vivo*. L'activité des systèmes de réparation est mesurée par le taux d'incorporation d'un nucléotide tritié dans l'ADN des cellules dont le cycle cellulaire est bloqué.

L'étude de l'échange de chromatides soeurs (SCE) dans l'ADN des cellules de mammifères rentre également dans cette catégorie d'essais. Les SCE sont des échanges réciproques de matériel génétique au niveau de loci apparemment homologues ; on en connaît encore mal les mécanismes, mais ils sont considérés comme des indicateurs sensibles de l'exposition à des substances génotoxiques.

D.4 - Méthodes de détection des adduits à l'ADN

La mesure des adduits à l'ADN permet d'évaluer l'électrophilie d'une substance et son degré de réactivité vis-à-vis de l'ADN.

Différentes méthodes ont été successivement proposées pour quantifier et identifier ces adduits : la mesure du Covalent Binding Index (Lutz, 1979), la méthode de post-marquage au ³²P (Randerath et al., 1981), les méthodes immunochimiques (Wild, 1990) les méthodes chromatographiques (Shuker et al., 1991) et les méthodes fluorimétriques (Weston et Bowman, 1991).

IV - Mécanismes épigénétiques : implications dans la cancérogénèse

Si le cancer est au stade final une maladie des gènes des cellules néoplasiques, la genèse de la maladie et sa progression semblent être gouvernés par un principe moteur qui est un déséquilibre entre signaux de régulation. C'est en provoquant ce déséquilibre à un niveau génétique ou épigénétique, que les agents cancérogènes de toute nature font basculer certaines cellules de l'état normal vers un état cancéreux.

Si l'impact des agents génotoxiques sur le génome peut être assez aisément détecté ; il est, par contre, très difficile d'identifier celui des cancérogènes non génotoxiques d'autant que les cibles sont multiples et varient d'une classe de promoteurs à l'autre ; les mécanismes épigénétiques sont complexes et loin d'être élucidés.

Tous les promoteurs identifiés partagent cependant la propriété d'induire la prolifération cellulaire, autrement dit d'induire l'hyperplasie.

La croissance cellulaire est régulée par un ensemble d'agents extracellulaires polypeptidiques, stimulateurs comme les facteurs de croissance et les hormones, et d'agents inhibiteurs, dont l'équilibre concourt à maintenir l'état normal de la cellule. La prolifération cellulaire est aussi réglée par la différenciation qui restreint la division cellulaire, en modifiant le statut de la cellule.

Dans ces processus, les signaux que la cellule reçoit de son environnement, sont essentiels. Des stimuli touchant la transmission des signaux mitogènes de l'extérieur de la cellule jusqu'au noyau, ou altérant les échanges entre la cellule et son environnement, peuvent créer un déséquilibre susceptible d'engendrer une prolifération anarchique. Tant que l'origine du déséquilibre est exogène, l'hyperplasie est réversible ; par contre, dès que le déséquilibre est d'origine endogène et inscrit génétiquement, il peut aboutir à un néoplasme.

L'importance des voies de signalisation intracellulaires et de la communication intercellulaire, dans le maintien de l'homéostasie des cellules, est apparue à la suite des études sur le mécanisme d'action de promoteurs connus, comme les esters de phorbol ; ces études ont montré que ces promoteurs affectaient pour la plupart, les voies de la croissance et/ou de la différenciation cellulaire.

Ces voies de signalisation et de communication seront rappelées brièvement, afin de situer l'impact potentiel des cancérogènes non génotoxiques et celui des promoteurs connus, dont l'action s'inscrit à leur niveau.

A - Mécanismes de transmission du signal mitotique

La transmission des signaux mitogènes de l'extérieur de la cellule jusqu'au noyau, quelle que soit la voie empruntée et les intermédiaires mis en jeu, suit un schéma général dont les étapes impliquent successivement :

. *la fixation d'un facteur de croissance sur son récepteur membranaire, ce qui induit un changement de la conformation de la partie interne du récepteur et déclenche la suite des réactions,*

. *l'activation d'une ou de plusieurs protéines kinases, à laquelle succède une cascade d'activation d'autres kinases et de phosphorylations,*

. *l'activation par phosphorylation des facteurs transcriptionnels à l'origine de la réplication de l'ADN et de la division cellulaire.*

Deux voies de transmission du signal mitotique sont bien décrites : la voie des phosphatidylinositols et celle de la tyrosine kinase (figure 1).

La voie des phosphatidylinositols est celle empruntée par des facteurs de croissance comme le PDGF (platelet derived growth factor) dont la voie de signalisation implique la phospholipase C à l'intérieur de la membrane et les phosphatidylinositols. L'activation de la lipase hydrolyse le phosphatidylinositol-4,5-diphosphate (PIP_2) en diacylglycérol (DG) et inositol triphosphate (IP_3).

L' IP_3 induit la libération des ions Ca^{++} stockés dans le réticulum endoplasmique, ainsi qu'un influx d'ions Ca^{++} à partir du milieu extracellulaire.

Le diacylglycérol (DG) au sein de la membrane, active la protéine kinase C (PKC) ; cette activation, dépendante de la concentration en Ca^{++} et en phospholipides entraînera (i) la phosphorylation de protéines à sérine et thréonine, (ii) l'activation de l'antiport Na^+/H^+ qui gouverne l'entrée de Na^+ et la sortie des protons de la cellule.

L'élévation du pH et du calcium intracellulaire, la phosphorylation de molécules cibles constitueront les éléments clé du signal mitotique.

Le TPA, par analogie structurale au diacylglycérol et d'autres promoteurs apparentés à l'ester de phorbol peuvent activer directement la PKC et donc déclencher les étapes suivantes aboutissant à la réponse mitotique. Cette interaction est une démonstration directe qu'un cancérigène non génotoxique peut interférer directement dans le circuit de stimulation de la prolifération cellulaire.

La voie des tyrosines kinases suivie par l'EGF (epidermal growth factor) fait intervenir le récepteur de l'EGF, une protéine kinase spécifique des résidus tyrosine ; cette kinase activerait l'antiport Na^+/H^+ et participerait à l'ouverture des canaux calciques.

L'activation du récepteur d'EGF est suivie également d'une augmentation de la concentration de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPC), par activation de l'adényl cyclase.

Quels que soient les facteurs de croissance et les voies empruntées, les réponses immédiates de la cellule à la stimulation d'un mitogène sont les mêmes : le pH du cytoplasme s'élève, la concentration intracellulaire en ions Ca^{++} augmente ; ces événements se traduisent au niveau de l'ADN par l'expression instantanée de proto-oncogènes comme c-fos, c-myc et c-jun, qui aboutit à l'induction de la division cellulaire.

L'identification des cibles de promoteurs de tumeurs "type", et une meilleure connaissance des mécanismes de la croissance et de la prolifération cellulaire ont permis de définir des points d'impact potentiels des cancérogènes non génotoxiques, ce sont :

- les voies de transmission du signal mitotique,
- la protéine kinase C,
- l'activation de protooncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs,
- l'activation d'enzymes clés dans la chaîne de biosynthèse des polyamines, par exemple l'activation de l'ornithine décarboxylase (ODC),
- la synthèse des phospholipides et leur conversion en médiateurs de l'inflammation tels que les prostaglandines,
- la génération de radicaux libres,
- l'altération structurale et fonctionnelle de la membrane cytoplasmique.

Cette liste est loin d'être exhaustive mais illustre la multiplicité des mécanismes épigénétiques potentiels de la cancérogénèse. La complexité et la diversité de ces processus expliquent la difficulté d'identifier les événements responsables du processus tumoral.

B - Inhibition de la communication intercellulaire

La communication intercellulaire est essentielle pour le maintien de l'homéostasie des tissus. Dans la majorité des tissus, les cellules sont liées par des canaux transmembranaires : Gap junctions (Gjs), qui permettent le passage direct d'une cellule à l'autre, d'ions et de molécules de faible poids moléculaire (< 1000 daltons), (Loewenstein, 1979 ; Hertzberg et Johnson, 1988).

Ces molécules pouvant être des nucléotides, des nucléotides cycliques, des acides aminés, du glutathion, de l'inositol triphosphate et des ions de calcium (Lawrence *et al.*, 1978 ; Saez *et al.*, 1989).

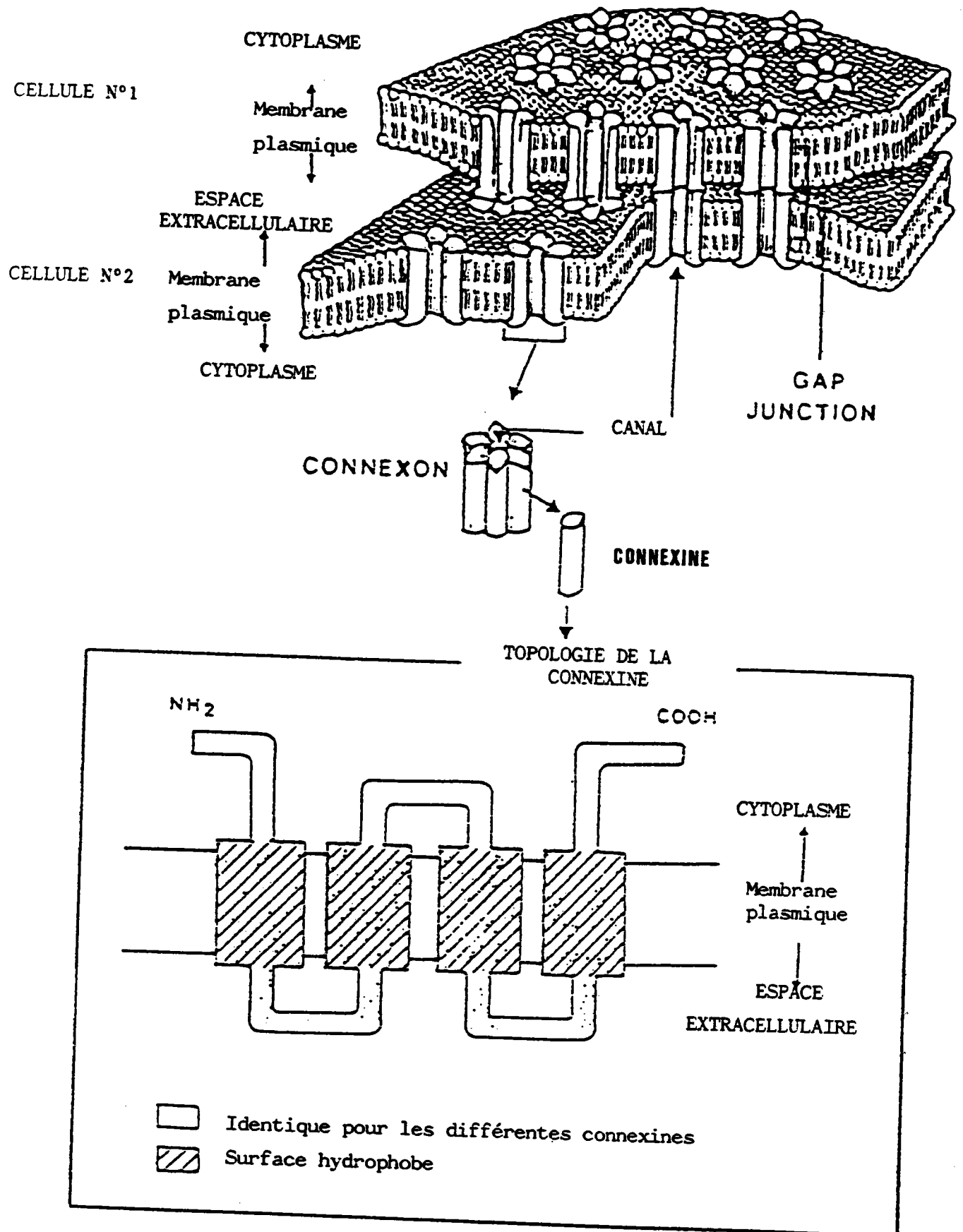


Figure 2: Vue schématique des Gap junctions dans la membrane et topologie des connexines.
(Yamasaki *et al.*, 1990).

Les Gap junctions n'ont pas une structure globale identique d'un tissu à l'autre mais possèdent une structure de base similaire. Elles sont formées par un ensemble de protéines membranaires, les connexines, dont certaines ont été clonées (Paul, 1986 ; Kumar et Gilula, 1986 ; Beyer *et al.*, 1988 ; Zhang et Nicholson, 1989). Le groupement de six connexines forme un connexon qui constitue un demi canal dans chaque membrane cytoplasmique et prend place en face du connexon de la cellule opposée pour établir un canal complet (Figure 2).

La topologie des connexines au sein de la membrane étudiée par plusieurs groupes de chercheurs (Goodenough *et al.*, 1988 ; Milks *et al.*, 1988 ; Zhang et Nicholson, 1989) montre que la protéine serait pliée en deux au sein de la membrane sous forme de M et présenterait deux zones extracellulaires et trois zones cytoplasmiques où seraient localisées les terminaisons amines et carboxyles.

Les zones cytoplasmiques correspondent aux régions variables d'une connexine à l'autre et renferment des séquences qui peuvent être phosphorylées par la tyrosine kinase, la kinase dépendante de l'AMP cyclique et la PKC (Hertzberg et Johnson, 1988).

Le degré de la communication intercellulaire par les Gap junctions est régulé par le nombre de canaux présents au sein de la membrane, ainsi que par le nombre de canaux ouverts et donc fonctionnels.

Le caractère fonctionnel des Gap junctions serait soumis à un double système de contrôle par l'AMP cyclique qui augmente la perméabilité membranaire et la PKC qui la diminue par phosphorylation des protéines (Gainer et Murray, 1986 ; Saez *et al.*, 1986 ; Takeda *et al.*, 1987 ; Saez *et al.*, 1990).

L'inhibition de la communication intercellulaire à travers les Gap junctions par des promoteurs a été mise en évidence par plusieurs auteurs (Murray et Fitzgerald, 1979 ; Trosko *et al.*, 1982 ; Fitzgerald et Murray, 1980 ; Williams, 1980 ; Yamasaki *et al.*, 1985). Le tableau 1, présenté ci-contre résume les résultats obtenus par l'IARC (Yamasaki, 1990) sur l'inhibition de la communication intercellulaire, par une série de promoteurs, *in vivo*, sur des systèmes cellulaires différents.

Un effet suppresseur de la transformation est exercé par des cellules normales sur des cellules transformées, lorsque ces deux types cellulaires établissent des junctions fonctionnels. (Mehra *et al.*, 1986 ; Dotto *et al.*, 1988 ; Bigmani *et al.*, 1988).

Tableau 1 : Comparaison des effets promoteurs in vivo et des effets d'inhibition de la communication intercellulaire via les gap junctions (GJIC) par la méthode de microinjection de jaune de lucifer d'une série de substances chimiques (Fitzgerald et Yamasaki, 1990).

Substance (a)	Promotion in vivo	Type cellulaire (b) utilisé pour l'essai GJIC	Inhibition de la communication intercellulaire
TPA	+	3T3, SHE, RLE HLE, V79, NHEK, NMEK	+
PDD	+	3T3, NMEK	+
PDBu	+	3T3, NMEK	+
Mezerein	+	3T3, NMEK	+
Diacylglycerol	+	3T3	+
PRA	+	3T3, NMEK, RLE	+
DL-ZAMI 1305	±	V79	+
DDT	+	V79	+
BHA	+	V79, 3T3	+
Phenobarbital	+	V79	+
		HLE-normal	-
		HLE-SV40 trans.	+
		Rat Hep (in 3T3 coculture)	+
		3T3 (in rat Hep coculture)	-
		RLE	-
BHT	+	V79	-
Na deoxycholic acid	+	V79	-
Lithocholic acid	+	V79	-
Benzoyl peroxide	+	V79	-
Anthralin	+	V79	-
		NMEK	-
Elevated pH	+	3T3	+
Ascorbate	+	3T3	-
Uracil	+	3T3	-
TGF-β (in vitro)	+	3T3	-
Human placenta extract	?	3T3	-
3,3',4,4'-PCB	+	HLE, V79, NHEK	-
2,2',4,4',5,5'-PCB	+	HLE, V79, NHEK	+
2,3,4,4',5,-PCB	+	HLE, V79, NHEK	+
2,2',5,5'-PCB	-	HLE	±
		NHEK	+
Maté extracts	?	3T3	-
(H ₂ O, Et. acetate)			
Okadaic acid	+	NMEK, NHEK	-
Chrysotile asbestos ^C			
Amosite asbestos ^C		HMC, RLE	-
Glass fibres ^C			

(a) PDD, Phorbol-12,13 didecanoate ; PDBu, phorbol-12,13-dibutyrate ; DL-ZAMI 1305, DL-1-(2nitro-3-methyl-phenoxy)-3-tert-butyl-amino-propan-2-ol ; DDT, dichlorodiphenyltrichloroethane ; BHA, butyl hydroxyanisole ; BHT, butylated hydroxytoluene ; TGF-β, transforming growth factor β ; PCB, polychlorinated biphenyl.

(b) 3T3, Balb/c 3T3 ; SHE, cellules d'embryon d'hamster syrien ; RLE, cellules épithéliales de foie de rat ; HLE, cellules épithéliales de foie humain, V79, cellules fibroblastiques, V79 d'amster chinois ; NHEK, Keratinocytes épidermiques normales d'homme, NMEK, Keratinocytes épidermiques de souris normales ; HMC, cellules mesothéliales humaines.

(c) cancérigène pour l'homme.

La co-culture de cellules C3H10T1/2 normales et transformées aboutit à la suppression de la prolifération de cellules transformées lorsque des Gap junctions sont présents et fonctionnels (Mehta *et al.*, 1986).

L'existence de Gap junctions hétérologues entre des cellules NIH 3T3 normales et des cellules Balb/c3T3 transfectées par myc s'accompagne d'une suppression de la prolifération clonale des cellules transfectées. Dans le cas d'une absence de Gap junctions entre les NIH 3T3 normales et des cellules transfectées par ras et src, la prolifération de ces dernières est maintenue (Bigmani *et al.*, 1988).

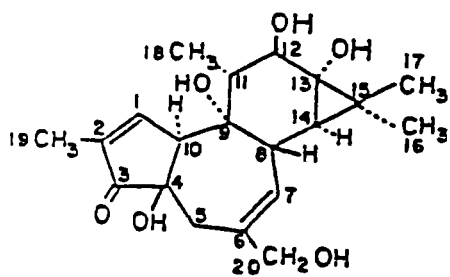
In vivo, la tumorigénicité de cellules épidermiques transformées greffées sur un animal isologue est supprimée quand ces dernières sont associées à un nombre important de cellules normales (Dotto *et al.*, 1988).

Cette corrélation n'est cependant pas systématique, des agents promoteurs comme l'acide lithocholique et des acides déoxycholiques n'inhibent pas la communication intercellulaire sur les cellules de la lignée V79. Ces exceptions soulignent le fait que l'inhibition de la communication intercellulaire n'est pas un mécanisme d'action intrinsèque de tous les promoteurs.

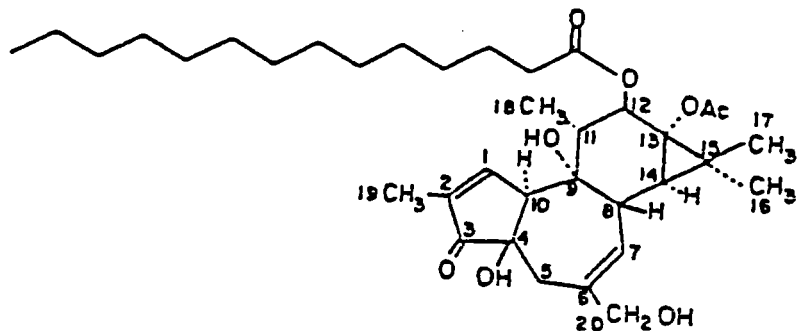
L'ensemble de ces travaux soulignent l'importance de l'inhibition de la communication intercellulaire dans la cancérogénèse.

La suite de cette étude bibliographique traite des aspects des mécanismes épigénétiques les mieux connus impliqués dans les phénomènes de cancérogénèse. L'ester de phorbol, 12-O-tétradécanoyl phorbol-13-acétate ou TPA, a été choisi comme modèle de promoteur tumoral ; le TPA est le plus puissant promoteur connu, il a fait l'objet avec d'autres promoteurs identifiés plus récemment, de nombreux travaux qui ont contribué à élucider certains des mécanismes de la cancérogénèse épigénétique.

Dans un deuxième temps, nous présenterons d'autres promoteurs tumoraux, en soulignant les particularités de leur mécanisme d'action et leurs caractères différentiels éventuels par rapport au TPA.



Molécule de PHORBOL



12-O-Tétradécanoyl-phorbol-13-acétate
(TPA)

Figure 3 : Structure développée d'une molécule de phorbol
et du TPA

C - Propriétés de l'ester de phorbol, 12-0-tétradécanoyl phorbol-13-acétate ou TPA

Les esters de phorbol constituent la famille la mieux étudiée des promoteurs connus.

Flashentranger en 1930 isola pour la première fois le phorbol à partir de l'huile de croton, extraite des graines d'une euphorbiacae : *croton tiglium*.

La molécule du phorbol de formule chimique $C_{20}H_{28}O_6$, renferme un noyau diterpène et des groupements hydroxyles (figure 3). Le phorbol en lui même est inactif mais ses diesters possèdent un pouvoir cancérogène ; ces derniers ont été bien définis chimiquement (Hecker, 1968), en particulier le TPA formé par estérification de l'hydroxyde en 12 par l'acide myristique et de l'hydroxyle en 13 par l'acide acétique. Certaines modifications structurales telles que l'estérification de l'hydroxyle en position 20, une liaison ester en position 13, l'ouverture du noyau cyclopropane et la substitution de l'acide gras par un acétate en position 12, réduisent fortement ou détruisent complètement l'activité biologique des diesters de phorbol (Rochette-Egly, 1978).

Le passage en position α de l'hydroxyle en 4, ou sa méthylation rend la molécule complètement inactive.

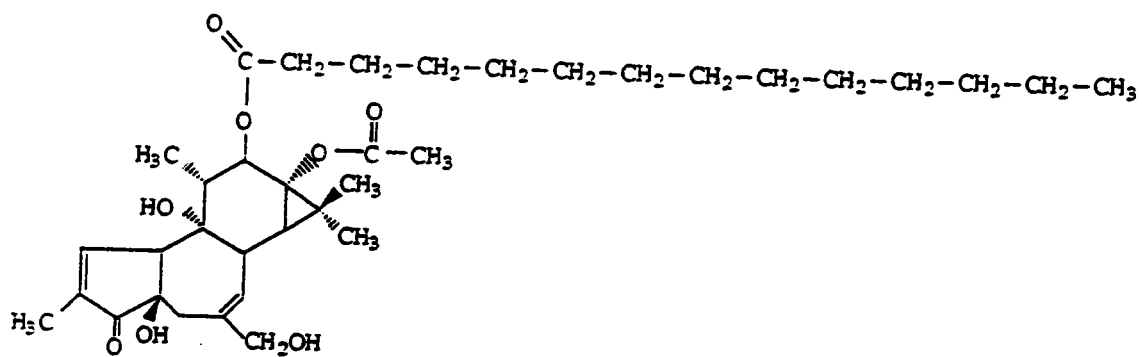
Une autre voie d'inactivation du TPA est sa conjugaison avec un acide gras de longue chaîne pour donner le TPA-20-acylate ; ce dernier est plus lipophile que le TPA mais inactif quant à l'induction de tumeurs sur la peau de souris, dans un schéma initiation-promotion.

La métabolisation du TPA se fait par déacylation du groupement ester à la position 12 et 13, qui résulte en la formation de mono esters : phorbol-13-acétate (PA) et 12-0-tétradécanoyl phorbol (TP) ; ces métabolites, plus hydrophiles que le TPA, sont inactifs ou peu actifs comme promoteurs (Hecker, 1968).

Le TPA n'est pas mutagène sur bactéries et cellules de mammifères (Weinstein, 1980).

Il est caractérisé par son potentiel à induire des tumeurs sur la peau de souris, préalablement exposée à des doses subcancérogènes de cancérogènes connus. Le TPA induit les mêmes effets sur d'autres tissus (ovaires, estomac, intestin) aussi bien chez le rat que chez la souris, lorsqu'il est appliqué selon un schéma initiation- promotion, tel que celui utilisé par Berenblum.

TPA :



Diacylglycérol :

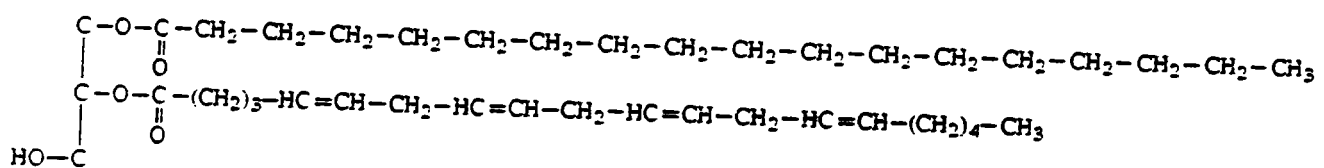


Figure 4 : Structures développées du TPA et du diacylglycérol

L'application répétée du TPA sur la peau de différentes souches de souris entraîne, également, la génération de tumeurs malignes à la suite d'une période de latence très prolongée (Chouroulinkov et Lazar, 1974); ces études ont souligné la sensibilité spécifique des différentes souches vis-à-vis du TPA, attribuée à une certaine prédisposition de l'animal hôte due à la présence constitutive de cellules initiées.

L'application topique du TPA sur la peau de souris est à l'origine d'une multitude de réponses biochimiques et morphologiques. Parmi les effets observés, 3 événements apparaissent corrélés le plus avec l'action promotrice du TPA :

- l'induction rapide d'une réaction inflammatoire au niveau du derme,
- l'induction de l'activité de l'ornithine décarboxylase (ODC), enzyme clé de la voie des polyamines,
- l'apparition d'une hyperplasie par multiplication active des cellules épidermiques (Weinstein, 1988 ; Fisher *et al.*, 1989).

Ces effets sont souvent associés à l'activation de la protéine kinase C (Castagna *et al.*, 1982 ; Nishizuka, 1984) et sont accompagnés de la génération de radicaux libres et de formes actives de l'oxygène (Fujita *et al.*, 1984).

C.1 - Action sur la protéine kinase C et la mobilisation du Ca⁺⁺

Le TPA, de part son analogie partielle avec le diacylglycérol (figure 4) , active la PKC aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Castagna *et al.*, 1982 ; Nishizuka, 1984).

La capacité des esters de phorbol à activer la PKC est bien corrélée avec leur potentiel tumorigène (Nishizuka, 1984). La distribution de la PKC à travers plusieurs tissus est similaire à celle des sites de liaison des esters de phorbol (Ashendal *et al.*, 1983).

Les esters de phorbol, à la différence du diacylglycérol et des activateurs endogènes de la PKC, ne sont pas métabolisés rapidement : ils restent actifs longtemps, une fois intercalés au sein de la membrane cellulaire. (Castagna *et al.*, 1982).

Le TPA agit en synergie avec les ionophores de Ca²⁺ (A23187) pour l'activation de la PKC. Le Ca²⁺ provoquerait une rapide redistribution de la protéine kinase C du cytoplasme vers la membrane plasmique et rendrait ainsi les cellules plus sensibles aux effets des esters de phorbol (May *et al.*, 1985 ; Wolf *et al.*, 1985).

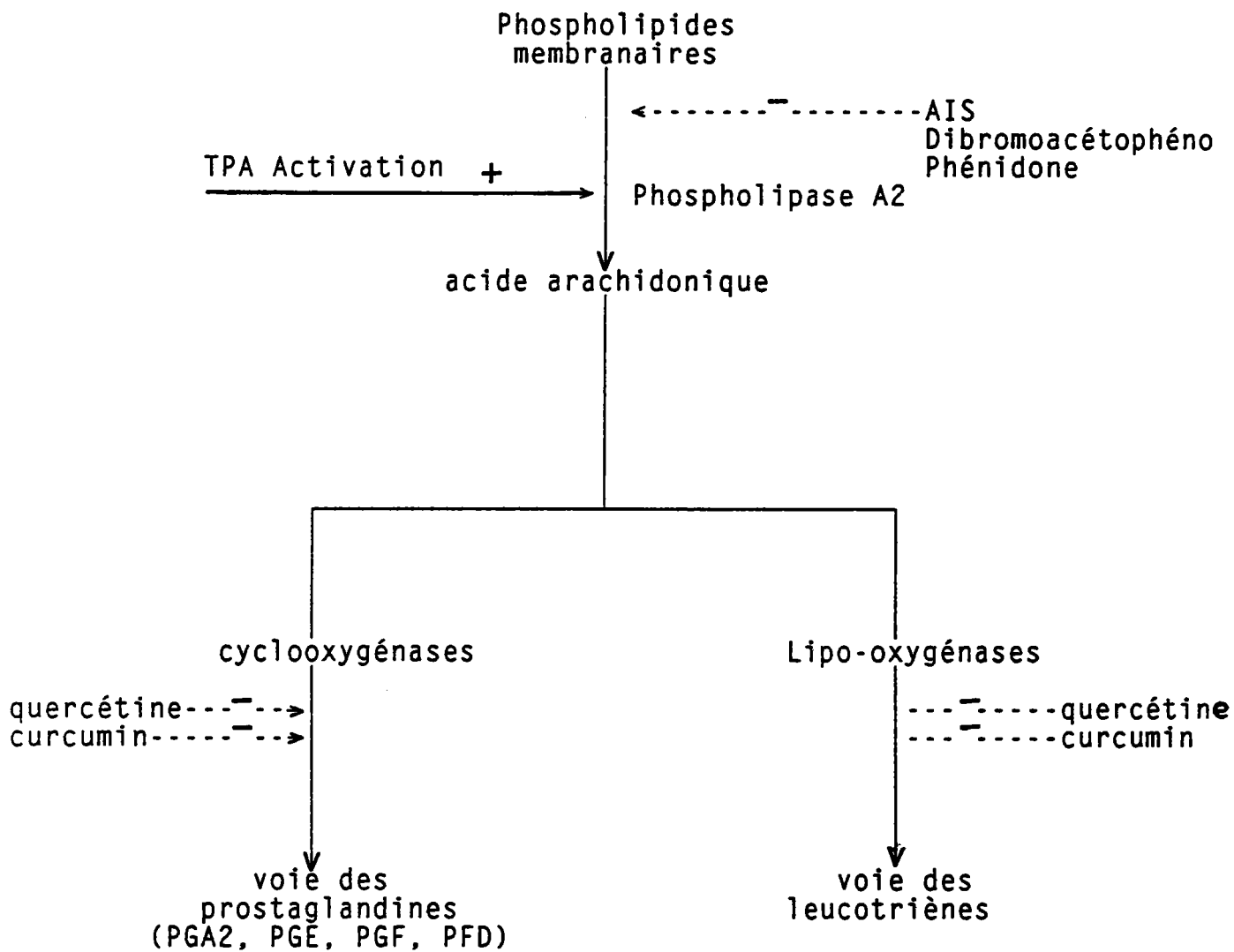


Figure 5 : Mobilisation et métabolisme de l'acide arachidonique.
 (+) site d'action des activateurs.
 (-) site d'action des inhibiteurs.

La PKC exercerait un contrôle de "feed back" négatif sur plusieurs étapes participant à son activation : elle induirait une diminution du taux de l'IP₃, en stimulant son hydrolyse par activation de la phosphatase IP₃, ou en bloquant l'hydrolyse des phospholipides inositol en DG et IP₃. Alternativement, la PKC stimulerait l'élimination du Ca²⁺ intracellulaire par activation du transport Ca²⁺ ATPase (Nishizuka, 1988).

Le TPA peut donc stimuler l'action double de la PKC ; néanmoins, ne se dégradant pas rapidement, son action persiste et la liaison prolongée de la PKC avec la membrane peut initier la dégradation de la PKC et sa disparition de la cellule (Nishizuka, 1988).

L'élimination de la PKC par cette voie, supprimerait le contrôle exercé par cet enzyme dans la régulation des fonctions cellulaires et entraînerait une prolifération incontrôlée en présence de stimuli mitogènes.

C.2 - TPA et inflammation

Les études sur le rôle des prostaglandines et le métabolisme de l'acide arachidonique dans la tumorigénicité ont été menées suite à la mise en évidence d'infiltrations et de modifications de la perméabilité vasculaire induites par le TPA, sur la peau de souris.

Des taux élevés de prostaglandines ont été détectés dans les urines d'animaux développant des néoplasies, ainsi que dans des cellules transformées en culture.

L'acide arachidonique et ses métabolites n'existent pas à l'état libre dans le milieu intra ou extra-cellulaire en l'absence de stimulation physique, chimique ou hormonale. Il est stocké sous forme d'acides gras liés d'une façon covalente au second carbone des phosphoglycérides membranaires. Le TPA provoque le relargage de l'acide arachidonique à partir des phospholipides membranaires par activation de la phospholipase A₂, figure 5.

L'acide arachidonique libre est le substrat d'enzymes qui conduisent à la synthèse des acides gras médiateurs de l'inflammation par deux voies distinctes :

- la voie des prostaglandines synthétases incluant les cyclooxygénases et prostaglandines endoperoxydases ; cette voie produit une prostaglandine intermédiaire, PGA₂, qui constitue le substrat d'autres enzymes impliqués dans la synthèse des prostaglandines : PGE, PGF et PFD,

- la voie des lipooxygénases qui résulte en la formation d'acides gras hydroperoxydes. Elle est à l'origine de la production de leucotriènes (Flower et Blackwell, 1979 ; Weinstein, 1980 ; Fisher *et al.*, 1989).

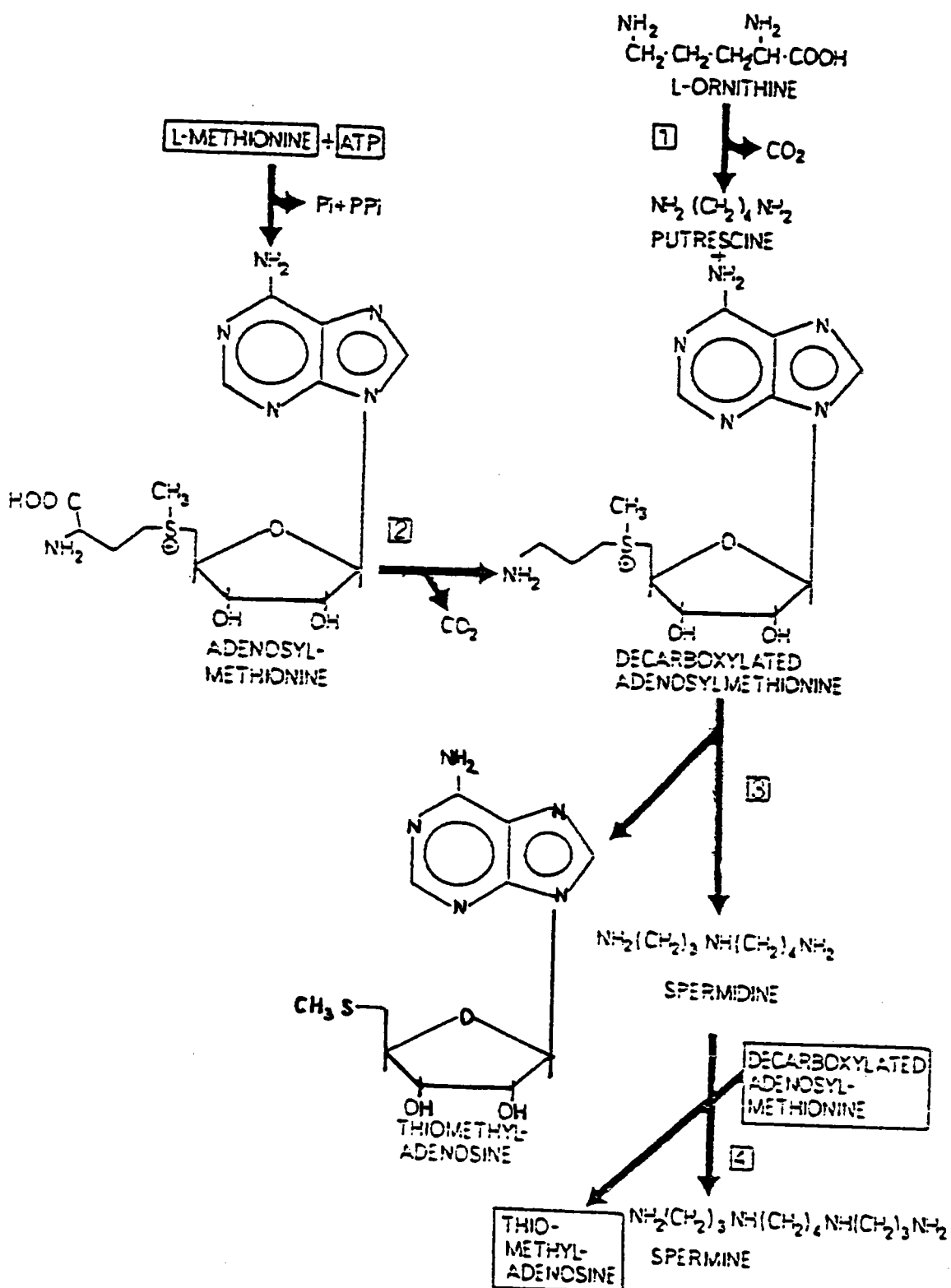


Figure 6 : Voies de biosynthèse des polyamines dans les tissus de mammifères.
(Jänne *et al.*, 1978).

C.3 - Génération de radicaux libres et des formes actives de l'oxygène

L'implication de radicaux libres, particulièrement ceux dérivés de la molécule d'oxygène dans la cancérogénèse chimique, a fait l'objet de plusieurs revues (Cerutti, 1985 ; Troll et Wiesner, 1985).

En réponse à des promoteurs, les neutrophiles et les macrophages augmentent leur consommation en oxygène, oxydent le glucose et génèrent $O_2^{\cdot -}$ et H_2O_2 (De Chatelet *et al.*, 1976 ; Kensler et Trush, 1981). L'interaction du TPA avec la PKC est suivie par l'activation d'une oxydase pyridine dépendante localisée dans la membrane plasmique (Patriarca *et al.*, 1970 ; Fujita *et al.*, 1984).

Le TPA module également les systèmes de défense de la cellule contre les agents oxydants en inactivant la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase. (Solanki *et al.*, 1981).

Le traitement par des antioxydants phénoliques ou par des enzymes de détoxification tels que la SOD ou la catalase, inhibe plusieurs actions des promoteurs aussi bien sur la peau de souris que sur des cellules transformées en culture (Kozumbo *et al.*, 1985 ; Weitzman *et al.*, 1985).

Ainsi, la génération de radicaux libres actifs par des cancérogènes non génotoxiques, doit jouer un rôle dans les phénomènes de promotion. Les mécanismes moléculaires exacts de leur participation, restent encore obscurs.

C.4 - Induction de l'activité ODC et de la biosynthèse des polyamines

Les polyamines jouent un rôle important dans la croissance et la différenciation cellulaire ; toute interférence dans leur biosynthèse peut perturber ces processus (Heby, 1981).

Les principaux précurseurs des polyamines sont : l'ornithine et la S-adénosyl-L-méthionine. La putrescine, précurseur de la spermidine et de la spermine, est formée directement par décarboxylation directe de l'ornithine, cette réaction est catalysée par l'*ornithine décarboxylase* (ODC), figure 6.

L'ODC serait l'enzyme clé de la biosynthèse des polyamines et jouerait un rôle modulateur sur toutes les fonctions cellulaires qu'elle contrôlent, en particulier la croissance et la différenciation.

L'ODC est largement distribué dans tous les tissus de mammifères, son activité basale est relativement faible (Scalabrino et Feridi, 1981). La plus grande partie de cette activité ODC est localisée dans le cytosol, une faible fraction est détectée dans certains organites cellulaires et dans le noyau (Morgan, 1987).

L'intérêt accordé à cet enzyme, comme marqueur biochimique de la transformation tumorale, est dû à la détection d'une activité ODC importante dans des cellules tumorales de cancers humains, tels que le cancer de colon (Sumiyoto *et al.*, 1991) et le cancer de l'estomac (Okuzumi *et al.*, 1991).

De même, l'application du TPA, sur la peau de souris, induit une augmentation rapide et transitoire du taux de l'ODC, suivie par une accumulation de polyamines dans les cellules épidermiques (Astrup et Boutwell, 1982 ; Takigawa *et al.*, 1982 ; Coffino *et al.*, 1988 ; Nguyen-Ba *et al.*, 1988).

L'activité ODC peut être stimulée par des facteurs de croissances, des hormones de croissance, la teneur en acides aminés et en ions dans le milieu (Jänne *et al.*, 1978 ; Tabor et Tabor, 1984).

La stimulation de l'activité ODC peut être obtenue également par renouvellement du milieu (Glimour *et al.*, 1985) et l'addition du sérum dans le milieu (Nguyen-Ba *et al.*, 1989).

Le TPA agit en synergie avec des facteurs de croissance, pour l'induction de l'activité ODC dans des cellules néoplasiques de Hamster mais pas sur des cellules normales (O'Brien *et al.*, 1988).

L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de l'ODC, α -difluoro-méthyl-ornithine (DFMO), inhibe la promotion de tumeurs induites par le TPA sur la peau de souris (Takigawa, 1982).

De même, l'application de la dexaméthasone sur la peau de souris, préalablement traitée par le TPA, montre à la fois une inhibition de la réaction inflammatoire dans le derme et une inhibition de l'ODC épidermique (Nguyen-Ba et Chouroulinkov, 1989 ; Nguyen-Ba *et al.*, 1992).

L'ODC est caractérisée par une demi-vie très courte de 10 à 30 minutes (Rüssel et Snyder, 1969), liée à une dégradation de la protéine enzymatique par des protéases. (Isomaa *et al.*, 1983 ; Seely *et al.*, 1982).

O'Brien *et al* (1987), ont identifié une nouvelle forme d'ODC de poids moléculaire plus élevé, produite dans des cellules épidermiques de tumeurs induites par des esters de phorbol ; cette forme d'ODC échapperait à la régulation qui contrôle le taux d'ODC dans les cellules normales, et conférerait aux cellules transformées une croissance sélective.

La régulation de l'activité ODC cytoplasmique induite par le TPA se ferait en phase post-transcriptionnelle, essentiellement par des métallo-protéases ; l'action protéolytique intervenant dans la dégradation rapide de l'enzyme peut être modulée par la dexaméthasone, mais elle varie également selon l'étape de la transformation cellulaire (Robert, 1991).

Ces travaux sont confirmés par ceux de Murakami *et al.* (1992), qui identifient la 26S proteasome, qui serait l'enzyme responsable de la dégradation de l'ODC. La modulation de l'activité ODC au niveau de sa dégradation protéolytique masque peut-être un autre mécanisme d'action du TPA.

C.5 - Inhibition de la communication intercellulaire

La communication intercellulaire qui s'établit normalement à travers les "Gap junctions" empêcherait l'expression de l'état initié d'une cellule, si elle est entourée de cellules normales ; par contre si cette communication est inhibée, le phénotype initié apparaît.

L'induction de la prolifération clonale de cellules initiées est une caractéristique de la majorité des promoteurs ; l'inhibition de la communication intercellulaire par ces derniers est l'un des mécanismes épigénétiques invoqués dans la cancérogénèse (Lowenstein, 1979 ; Murray et Fitzgerald, 1979 ; Yotti *et al.*, 1979 ; Yamasaki *et al.*, 1985 ; Sugie *et al.*, 1987).

Le TPA inhibe la communication intercellulaire des cellules (V79) d'Hamster chinois, des cellules épidermiques de souris, des cellules de lignée Balb/C3T3 et des hépatocytes de rat (Murray et Fitzgerald, 1979 ; Williams, 1980 ; Fitzgerald *et al.*, 1989).

Une bonne corrélation existe entre la capacité des esters de phorbol à inhiber la communication intercellulaire et l'induction de tumeurs *in vivo* ; en effet, le phorbol et le 4- α -phorbol-12-13-didecanoate, connus comme non promoteurs de tumeurs sur la peau *in vivo*, n'inhibent pas la communication intercellulaire (Yotti *et al.*, 1979).

Les mécanismes d'inhibition de la communication intercellulaire par le TPA, impliqueraient la phosphorylation des protéines des Gap junctions (Takeda *et al.*, 1987). La libération de l'acide arachidonique induite par le TPA donnerait des composés actifs au niveau des Gap junctions incluant les métabolites de la voie des lipooxygénases, les radicaux libres, les produits de peroxydation de lipides et l'acide arachidonique lui-même. (Saez *et al.*, 1990).

L'inhibition de la communication intercellulaire par le TPA est réduite sous l'effet d'agents anti-promoteurs tels que l'acide rétinolique (Rogers *et al.*, 1990) et l'AMP cyclique (Roseng *et al.*, 1992).

Néanmoins, le TPA n'inhibe pas la communication intercellulaire des cellules épidermiques de la peau de souris *in vivo* et *in vitro* (Kam et Pitts, 1988 ; Pasti *et al.*, 1988).

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des inhibiteurs du TPA et de leurs effets.

Substance	Formation de tumeur	hyperplasie	Activité ODC	Acide arachidonique		Activité oxydante	PKC	GJIC	Références
				PLA2	Cycl OX Lipo OX				
TPA	+	+	+	+	+	+	+	-	
AIS	- (a)		- (b)	-(a,b)					(a) Slaga, 1980 Schwartz et al., 1977
Rétinoïdes	- (c)		- (c)						(b) Belman et Troll, 1972 Nguyen-Ba et al., 1992
Inhibiteurs de protéases	- (d)		- (d)						(c) Verma et Boutwell, 1977 (d) Slaga, 1980
AMP cyclique Forskoline	- (e)								(e) Roseng et al., 1992
Quercétine	- (f)		- (f)		- (g)		-(g)		+(e) +(e) (f) Kato et al., 1983 (g) Gschwendt et al., 1983 Newmark, 1987
Curcumin		- (h)			- (h)	- (h)			(h) Levin et al., 1977 Hughes et al., 1989 Huang et al., 1991
DFMO	- (i)		- (i)						(i) Slaga et al., 1978 Takigawa et al., 1982
Phénidone	- (j)			(-)site non spécifié (j)					(j) Fischer et al., 1989 (k) Tamaoki et al., 1986. (l) Sako et al., 1988 Yamamoto et al., 1989
Dibromo-acétophénone	- (j)			- (j)					(m) Kosumbo et al., 1985.
Staurosporine	± (l)		+ (l)			- (l)	-(k)		
BHA	± (m)		- (m)			- (m)			

AIS = Antiinflammatoires stéroïdiens.

DFMO = α -difluoro-méthyl-ornithine.

BHA = butyl hydroxyanisole.

ODC = ornithine décarboxylase.

PLA₂ = Phospholipase A₂.

Cycl. OX = cyclooxygénases.

Lip. OX = lipooxygénases.

PKC = Protéine Kinase C.

GJIC = Communication intercellulaire par les Gap junctions.

C.6 - Inhibiteurs des effets du TPA.

Compte-tenu de la multitude des effets du TPA *in vivo* et *in vitro*, il est difficile de déterminer lesquelles de ces réponses induites participent à l'effet promoteur du TPA.

L'utilisation d'un grand nombre d'inhibiteurs et de modulateurs des événements observés, a permis d'élucider l'importance de chaque événement dans le processus de formation de tumeurs.

Les inhibiteurs étudiés sont des inhibiteurs de l'*hyperplasie*, de l'*activité ODC* et la *synthèse des polyamines*, de la *synthèse des prostaglandines* et des inhibiteurs de la *protéine Kinase C*. Les *antioxydants* et les inhibiteurs de *protéases* ont été également utilisés comme inhibiteurs de la promotion (tableau 2).

Des *anti-inflammatoires stéroïdiens* tels que : le cortisol, la dexaméthasone et la fluocinolone acétonide, inhibent la promotion de tumeurs par le TPA (Schwartz *et al.*, 1977, Slaga, 1980).

Les effets inhibiteurs de la dexaméthasone s'accompagnent d'une diminution de l'activité ODC dans le compartiment épidermique (Belman et Troll, 1972 ; Nguyen-Ba et Chouroulinkov, 1989).

Le DFMO, les rétinoïdes, la quercétine ainsi que des complexants de radicaux libres tels que le butyl hydroxyanisole (BHA), inhibent également l'activité de l'ornithine décarboxylase (Verma et Boutwell, 1977 ; Slaga *et al.*, 1978).

Le phénidone, dibromoacétophénone, quercétine et curcumin exercent une action inhibitrice sur l'effet promoteur du TPA, aux niveaux de la phospholipase A2, les lipooxygénases et/ou cyclooxygénases (Levin *et al.*, 1977 ; Gschwendt *et al.*, 1983 ; Hughes *et al.*, 1989 ; Fischer *et al.*, 1989 ; Huang *et al.*, 1991)

La staurosporine, inhibiteur puissant de la protéine kinase C (Tamaoki *et al.*, 1986 ; Kiyoto *et al.* 1987), inhibe la phosphorylation de protéines induite par le TPA (Yamamoto *et al.*, 1989); elle supprime également la génération de superoxydes à partir de leucocytes polynucléaires (Sako *et al.*, 1988 ; Yamamoto *et al.*, 1989)

Des agents inhibiteurs de protéases se révèlent être des inhibiteurs de la promotion induite par le TPA ; il en est de même pour des agents, tel que la forskoline, qui entraînent l'augmentation du taux de l'AMP cyclique intracellulaire (Slaga, 1980, Roseng *et al.*, 1992).

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des effets des promoteurs type TPA et non TPA selon Fujiki et Sugimura, 1987 ; Fujiki et al., (1989) ; Levine et al., (1990).

Promoteur	Formation de tumeurs	Irritation	pouvoir d'adhésion HL60	ODC	AA	activité oxydante	liaison PDGF-récepteur	liaison EGF-récepteur	Ph.2A	PKC	GJIC	Références plus récentes et remarques
TPA	+	+	+	+	+	+		-		+	-	
<u>Type TPA</u>												d redistribution de la PKC e décharge Ca ²⁺ de R.E. d Redistribution de la PKC
Téléocidines	+	+	+	+	+			-		+		
Aplysiatoxines	+	+	+	+	+			-		+		
<u>Type non TPA</u>												
Palytoxine (d,e)	+	+	-	-	+	+		-		-	SE	
Thapsigargine	+	+	-	-						-		
Acide okadaïque	+ a	+ a		+ a			- b		a -	(+)		
Staurosporine d	±	+	-	+ ^C	+	-				-		

SE = Sans effet.

GJIC = Communication intercellulaire par les Gap junctions.

ODC = ornithine décarboxylase.

AA = Acide arachidonique.

Ph.2A = Phosphatase 2A.

PKC = Protéine kinase C

(+) = Activation indirecte de la PKC.

a : Suganuma et al., 1988

b : Dean et al., 1991

c : Jiang et al., 1992

d : Kiley et al., 1992

e : Thastrup et al., 1990

D - Propriétés des cancérogènes non génotoxiques autres que les esters de phorbol.

Plusieurs classes de promoteurs qui diffèrent structurellement des esters de phorbol ont été identifiées au cours des vingt dernières années. Fujiki *et al.* (1989). se sont intéressés spécialement à des promoteurs appartenant à des classes de toxines marines. Leurs résultats sur les mécanismes d'action de ces promoteurs leur ont permis de distinguer : des promoteurs type TPA et des promoteurs type non TPA selon leur capacité à se lier ou non au récepteur membranaire des esters de phorbol : la PKC (tableau 3).

D.1 - Les promoteurs type TPA

Les promoteurs type TPA incluent les téléocidines et aplysiatoxines qui sont des toxines marines, isolées respectivement du mycélium de *Streptomyces mediodidus* et d'une algue bleue marine.

Le TPA, téléocidines et aplysiatoxines ont des structures très différentes, mais se lient au même récepteur membranaire, la PKC, avec des affinités différentes liées à la lipophilie de chaque classe (Fujiki *et al.* 1989 ; Nishizuka, 1984).

L'activation de la Protéine Kinase C par les promoteurs type TPA, entraîne la phosphorylation de la tyrosine des récepteurs des facteurs de croissance épidermiques (EGF) et l'inhibition de la liaison spécifique de l'EGF à ses récepteurs membranaires.

L'induction de l'adhésion des cellules HL60, en suspension à l'état normale, a été observée pour tous les promoteurs type TPA (Fujiki et Sugimura, 1987).

D.2 - Les promoteurs type non TPA

La classe des promoteurs type non TPA comprend la palytoxine, la thapsigargine, l'acide okadaïque, la staurosporine ; ces promoteurs ne se lient pas aux récepteurs membranaires des esters de phorbols et n'activent pas la PKC (tableau. 3).

La *palytoxine* est une toxine hydrophile, dont la structure a été déterminée en 1981, par Moore et Hirota.

D'une part, la palytoxine n'inhibe pas la liaison spécifique 3H-TPA du TPA à ses récepteurs, n'active pas la PKC, n'inhibe pas la communication intercellulaire et n'induit pas l'activation de l'ODC.

D'autre part, elle induit ou agit en synergie avec le TPA pour le relargage de prostaglandines à partir de macrophages (Levine *et al.*, 1990), elle stimule également la génération d'anions superoxydes à partir de neutrophiles (Fujiki *et al.*, 1989).

L'inhibition de la liaison des EGF à leurs récepteurs par la palytoxine se fait par une voie différente de celle des promoteurs type TPA, elle est indépendante de la PKC et du taux intra et extracellulaire des ions Ca^{2+} , elle apparaît faciliter l'influx du Na^+ à travers la pompe Na^+/H^+ .

La *thapsigargine*, isolée des racines de *Thapsia garganica*, induit un certain nombre de réponses cellulaires (tableau. 3) qui seraient activées par un seul événement commun : l'augmentation prononcée et rapide du Ca^{2+} cytosolique libre.

La thapsigargine provoque une décharge directe du Ca^{2+} stocké dans les compartiments intracellulaires sans l'hydrolyse des inositolphospholipides membranaires, mais en agissant comme inhibiteur spécifique et puissant de l'ATPase Ca^{2+} dépendante, du réticulum endoplasmique (Thastrup *et al.*, 1990).

L'*acide okadaïque* est un composé polyether, isolé d'une éponge noire *Halichondria okadai*, sa structure chimique a été déterminée par Tashibana *et al.*, (1981) ; il est le promoteur, type non TPA, le plus puissant et induit notamment une forte augmentation de l'activité ODC dans les tissus gastriques des rongeurs (Suganuma *et al.*, 1988).

L'acide okadaïque inhibe la phosphatase 2A (Sassa *et al.*, 1989) ; il induit ainsi une activation indirecte de la PKC, en favorisant les cascades de phosphorylation impliquées dans la réponse mitotique (Haystead *et al.*, 1989).

La *staurosporine* est un alcaloïde microbien, qui exerce une action double dans le phénomène de la promotion :

Elle agit comme inhibiteur puissant de plusieurs protéines kinases en particulier la PKC, en entraînant ainsi l'inhibition des effets des promoteurs type TPA (Tamaoki *et al.*, 1986 ; Kiyoto *et al.*, 1987). Mais la staurosporine agit également comme irritant et induit des effets caractéristiques de promoteurs tels que : le relargage de prostaglandines et l'induction de l'activité ODC (Jiang *et al.*, 1992).

Il est sûr que la liste des promoteurs, cités dans cette étude bibliographique, est loin d'être exhaustive ; néanmoins, elle illustre la variabilité des mécanismes épigénétiques qui peuvent être impliqués dans le processus de la cancérogénèse. Cette variabilité peut être à l'origine des effets de synergisme qui peuvent être observés entre différents promoteurs.

V - La transformation cellulaire *in vitro*, rôle dans la cancérogénèse

On appelle *transformation cellulaire* le processus de conversion de cellules normales cultivées *in vitro* en cellules qui présentent des propriétés morphologiquement propres aux cellules néoplasiques et qui, inoculées à des animaux isologues, développent des tumeurs (Elias, 1993).

Comme le processus de cancérogénèse *in vivo*, la transformation néoplasique *in vitro* est un processus progressif qui implique plusieurs étapes qualitativement différentes depuis l'initiation jusqu'au stade tumorigène (Barrett et Ts'o, 1978 ; Kakunaga et Yamasaki, 1985 ; Thomassen et al., 1985).

L'essai de la transformation morphologique de cellules en culture, occupe une place importante et particulière parmi les différents systèmes d'étude de la cancérogénèse. Le phénotype transformé est le critère étudié qui exprime les modifications morphologiques résultant de l'ensemble des altérations génotoxiques et/ou épigénétiques qui peuvent s'opérer au cours de plusieurs cycles de division des cellules cultivées en présence d'un agent environnemental à risque.

La transformation cellulaire sur cellules mime *in vitro*, les différentes étapes de la tumorigénicité *in vivo* et répond ainsi au but recherché : la détection d'une activité cancérogène.

Cet essai est effectué sur des systèmes cellulaires de mammifères, généralement des cellules fibroblastiques ; il offre l'avantage d'avoir des voies métaboliques d'activation et de détoxification plus proches des conditions *in vivo* (en particulier les systèmes utilisant des primocultures).

Ces systèmes offrent également les avantages d'être relativement simples, rapides et moins coûteux que les expérimentations animales.

La transformation cellulaire *in vitro* a été réalisée pour la première fois par Berwald et Sachs (1963), sur des cultures primaires et secondaires de cellules d'embryon de Hamster syrien (SHE), traitées au benzo(a)pyrène et au méthylcholanthrène et repiquées régulièrement quand elles atteignaient la confluence.

TABLEAU 3Bis : Transformation des fibroblastes. Principales caractéristiques structurales et fonctionnelles.

Morphologie cellulaire

Microscope optique : Pléiomorphisme; augmentation de la basophilie cytoplasmique, du nombre et de la dimension des nucléoles, du rapport nucléus/cytoplasme; cytoplasme rétracté, désorganisation de l'actine.

Microscope électronique : Changements topographiques de la surface; aspect irrégulier, dentelé, présence de nombreuses microvillosités.

Caractéristiques de surface

- modifications de glycoprotéines et glycolipides; diminution ou disparition de la fibronectine
- perte d'antigènes, apparition ou réapparition de néoantigènes
- perturbations de la perméabilité, des transports actifs et des charges électriques
- augmentation de la fluidité membranaire
- modifications des enzymes de surface
- modifications du cytosquelette interne associé à la membrane
- augmentation de l'agglutinabilité cellulaire par des lectines.

Autres modifications biochimiques

- diminution du taux d'AMP cyclique
- augmentation de la glycolyse anaérobie
- augmentation de la production de l'enzyme activateur du plasminogène : activité fibrinolytique accrue.

Modifications chromosomiques

Caractéristiques de croissance

- abolition de l'inhibition de la motilité cellulaire au contact
- perte de l'inhibition de croissance densité-dépendante . . .
- sérum-dépendance pour croissance, diminuée
- abolition de la dépendance d'ancrage.
- potentiel de croissance *in vitro*, illimité

Morphologie de la culture cellulaire altérée : population cellulaire enchevêtrée, empilée, pluristratifiée; nombreuses mitoses; densité de saturation accrue.

Croissance en milieu semi-solide.

In vivo : Tumorigénicité.

Les cellules témoins avaient une durée de vie limitée (à peu près 4 passages), alors que les cultures traitées ont développé des foyers de cellules capables de proliférer d'une façon continue : cellules transformées. L'inoculation subcutanée de ces cellules transformées sur des hamsters adultes, a produit progressivement la croissance de tumeurs au point d'injection. Ce résultat est d'une importance majeure et met en évidence le critère transformation cellulaire *in vitro* comme outil prédictif de la cancérogénèse *in vivo*.

En 1965, les mêmes auteurs ont développé un essai quantitatif de transformation par le traitement de cellules SHE à une densité clonale. L'examen des colonies formées permet de distinguer les colonies normales des colonies morphologiquement transformées. Une grande proportion de colonies transformées (3-14 %) a été observée chez les cellules traitées mais pas chez les cellules témoins.

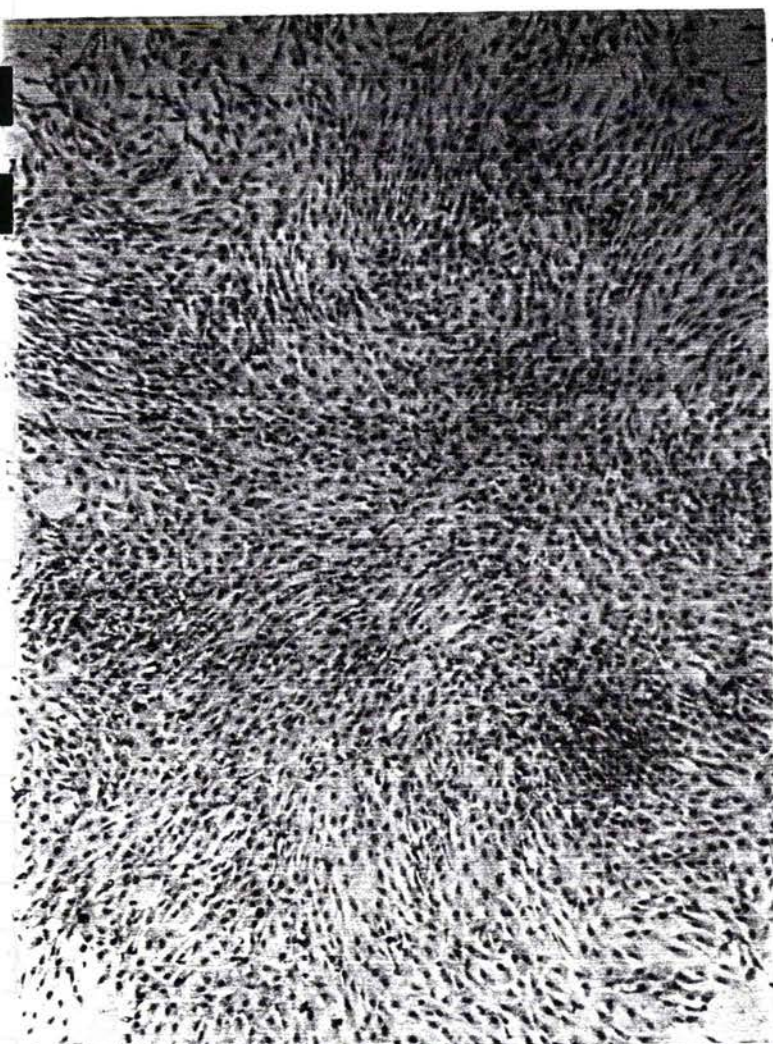
D'autres tests de transformation cellulaire ont été développés sur des *lignées établies* de cellules fibroblastiques. Les deux seuls systèmes qui ont été utilisés au niveau international, avec le test sur SHE, et qui ont fait l'objet d'études inter-laboratoires en vue d'une validation utilisent :

- * la lignée C3H10T1/2 développée et clonée à partir de la prostate de souris adulte C3H par Chen et Heidelberger (1969) et Reznikoff *et al.* (1973),

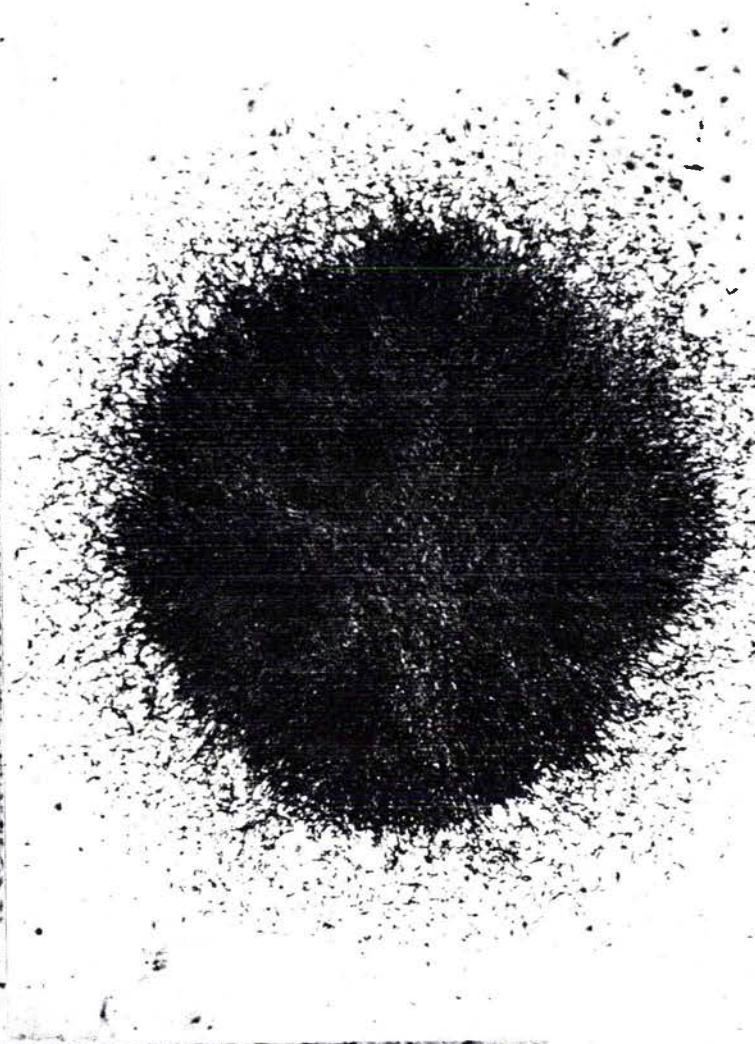
- * la lignée de fibroblastes de souris, Balb/c3T3, développée à partir de Balb/c (Aaronson et Todaro, 1968), et reclonée par Di Paolo *et al.* (1972) ainsi que par Kakunaga (1973).

Les principales modifications structurales, biochimiques et fonctionnelles des fibroblastes au cours du processus de transformation néoplasique induit par les cancérogènes sont présentées dans le tableau 3 bis.

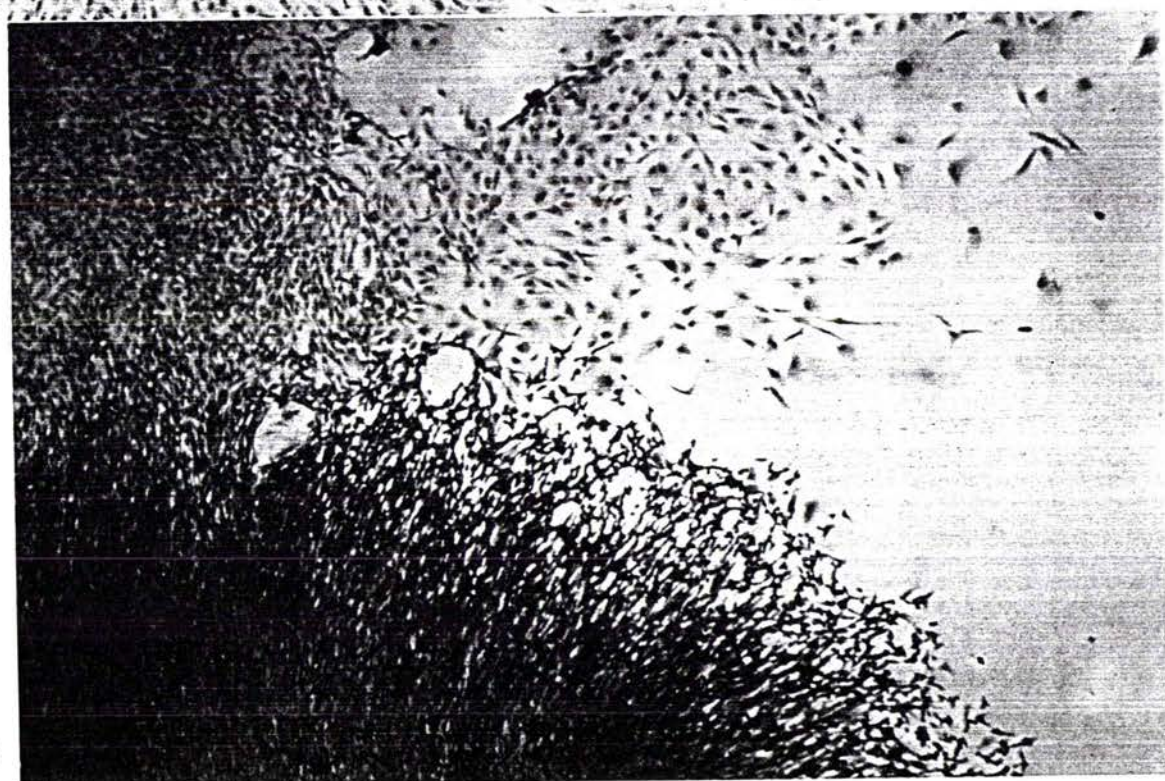
Les fibroblastes transformés présentent des modifications cytologiques touchant toute l'architecture cellulaire auxquelles sont associées des perturbations fonctionnelles de croissance : les cellules échappent aux mécanismes normaux de contrôle de la croissance, continuent à se diviser, s'enchevêtrent et s'empilent. La transformation morphologique est prise en compte comme critère de l'effet transformant dans les systèmes fibroblastiques utilisés pour la détection des cancérogènes : les colonies transformées pour les cellules SHE (figure 6 bis) et les foyers de transformation pour les cellules des lignées établies C3H10T1/2 et Balb/c3T3.



a



b



c

Figure 6 bis : a. colonie normale, b. colonie transformée, c. périphéries d'une colonie normale et d'une colonie transformée.

Chouroulinkov et Lasne (1978) ont reproduit *in vitro*, sur des SHE, la cancérogénèse en deux phases pour étudier les mécanismes de la cancérogénèse non génotoxique et de détecter les cancérogènes épigénétiques. Ils ont été, avec Mondal et Heidelberg (1976) sur la lignée C3H10T1/2, les premiers à démontrer l'augmentation du taux de transformation cellulaire lors de l'association d'un initiateur (type B(a)P) et d'un promoteur, le TPA et l'analogie avec la cancérogénèse en deux étapes décrite, *in vivo*, par Berenblum (1941).

Un grand nombre de substances a été testé sur le système SHE, incluant des agents alkylants, des hydrocarbures aromatiques polycycliques, nitrosamines et nitrosamides, amines aromatiques, colorants aminoazo, hormones, sels de métaux et divers autres composés (Barrett et al., 1984 ; Di paolo et al., 1969, 1972 ; Pienta et al., 1977, 1981 ; Riverdal et Sanner, 1982, 1985 ; Lasne *et al.*, 1974 ; Elias *et al.*, 1989 ; Roseng *et al.*, 1992).

Cet essai s'est montré très sensible à la détection de cancérogènes pour l'homme qui restaient non actifs dans des tests de génotoxicité classiques : l'amiante (Hesterberg et Barrett, 1984), l'arsenic (Lee et al, 1985), Le benzène (Amacher et Zelljadt, 1973 ; Barrett et Lamb, 1985), le diéthylstilboestrol (Barrett et al, 1981).

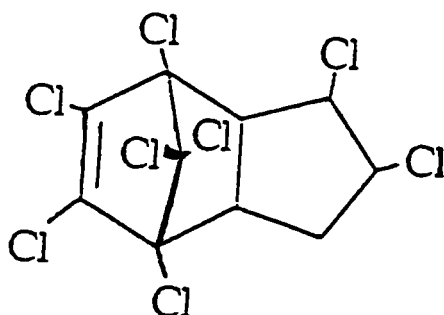
Ce système a cependant, quelques limites qui entravent son utilisation comme un test de routine, qui sont :

- * la sensibilité variable des différents lots de cellules à la transformation, en fonction de l'embryon dont elles dérivent et de la qualité du sérum utilisé, qui implique la réalisation d'essais préliminaires pour le choix de lots appropriés. Ceux-ci doivent donner une efficacité de clonage adéquate pour l'interprétation des résultats et la meilleure réponse transformante pour des cancérogènes connus.

- * la lecture est subjective, mais cette difficulté est atténuée par une expérience avancée du lecteur ainsi que par des lectures effectuées indépendamment par plusieurs personnes.

Les tests de transformation cellulaire sont les plus aptes, parmi les tests de cancérogénèse à court terme, à détecter *in vitro* le potentiel cancérogène d'une substance tant génotoxique que non génotoxique (épigénétique).

VI - Chlordane



A - Production et utilisation

Le chlordane est un insecticide organochloré utilisé dès 1950 ; il a été largement produit aux Etats-Unis où sa production atteignait 9500 tonnes en 1974 (WHO, 1988). Ses usages agricoles concernaient la protection des cultures de maïs et de pommes de terre, le traitement des arbres ornementaux et des pelouses .

Son utilisation en agriculture a été interdite assez tôt, mais il est resté autorisé jusqu'à ces dernières années pour la protection du bois contre les termites. La quantité de chlordane utilisée pour la lutte contre les termites aux Etats-Unis est passée de 4500 t en 1980 (Eswortly, 1985) à 1800 t en 1986 (US-Environmental Protection Agency, 1987). Le Japon en 1986 (Takamiya, 1990), puis les Etats-Unis et la CEE ont successivement interdit le chlordane en tant que termicide.

La teneur maximale de résidus de chlordane est de 0,02 mg/Kg dans les céréales (J.O. du 25/2/1989), elle est fixée à 0,05 mg/Kg pour les fruits et légumes (J.O. du 22/9/1992).

La DL50 du chlordane, administré par voie orale sur le rat, est de 460 mg/Kg de poids corporel (J.O. du 28/3/1989).

La forte liposolubilité et la stabilité du chlordane expliquent sa rémanence élevée, exprimée par un temps de demi-vie dans l'environnement d'une dizaine d'années (Conway, 1982). Malgré ces inconvénients qui sont à l'origine de sa limitation d'emploi, le chlordane reste encore utilisé dans plusieurs pays où la réglementation est moins stricte voire inexistante.

B - Métabolisme, résidus et toxicité du chlordane

Le chlordane technique contient des isomères cis et trans ainsi que des impuretés mineures d'heptachlore et de nonachlore.

Le chlordane est rapidement absorbé au niveau de la partie gastrointestinale et à travers la peau des rongeurs.

La voie majeure de métabolisation du chlordane cis et trans se fait par époxydation en oxychlordane.

L'heptachlore, formé par déhydrochlorination, constitue un métabolite mineur des isomères du chlordane. Cette voie génère l'époxyde d'heptachlore et d'autres produits d'hydroxylation.

D'autres voies de métabolisation sont proposées telles que la déchlorination du chlordane en monochlorodihydrochlordène ou le remplacement d'atomes de chlore par des groupements hydroxyles pour former des métabolites hydroxylés éliminés dans les selles.

Aucune augmentation du chlordane trans et cis n'a été notée dans le sang de souris traitées par le chlordane (0,48 mg/animal) pendant 29 jours. Le chlordane induirait son propre métabolisme.

Des résidus de chlordane ont été trouvés dans le sang d'opérateurs et de sujets humains non directement exposés à ce pesticide (Wariishi *et al.*, 1986) ainsi que dans le lait de nourrices (Miyazaki *et al.* 1980).

De par sa lipophilie, le chlordane s'accumule dans les tissus adipeux et les organes riches en graisse comme le tissu hépatique (Nogushi, 1985).

Le chlordane comme les autres pesticides organochlorés a des effets excitants sur le système nerveux central, se traduisant par des convulsions ; il induirait des ulcères gastriques selon Boyd et Taylor (1969). Au niveau cellulaire, le chlordane à 0,5 mM entraînerait des altérations de la membrane mitochondriale, une inhibition du transport d'électrons et de la phosphorylation oxydative (Ogata *et al.*, 1989).

C - Cancérogénicité et génotoxicité du chlordane

Des cas de neuroblastomes chez des enfants ont été associés à une exposition pré et post natale au chlordane utilisé comme termiticide.; des cas de leucémies ont été reliées également à l'exposition de sujets adultes au chlordane et à l'heptachlore (Infante et Freeman, 1978 ; Infante *et al.*, 1978) ; mais la part de chacun de ces deux dérivés dans les effets observés n'est pas connue.

Aucune corrélation claire n'a été établie entre l'exposition au chlordane et l'augmentation de l'incidence d'hépatocarcinomes ou d'autres cancers chez l'homme (Hayes *et al.*, 1965 ; Hayes, 1982).

Les données sur l'hépatocancérogénicité du chlordane chez les rongeurs sont controversées : la plupart des travaux montrent une induction de tumeurs par le chlordane chez la souris (Epstein 1976 ; World Health Organisation, 1984). Les effets sur le rat sont moins évidents : le chlordane induit en effet une augmentation de l'incidence des nodules hépatiques chez des rats mâles et femelles après 80 semaines de traitement à des doses de l'ordre de 200 à 400 mg/Kg pour les mâles et 120 à 240 mg/kg pour les femelles, mais n'augmente pas le taux de tumeurs (National Cancer Institute, 1977). Cette variabilité apparente de la cancérogénicité du chlordane *in vivo* chez les rongeurs pourrait s'expliquer par des caractères de spécificité d'espèce et le niveau des concentrations testées.

In vitro, le chlordane n'induit pas de mutation reverse sur les souches TA100 et TA98 de *Salmonella Typhimurium his⁻*. (Simmon *et al.* 1977 ; Mortelmans *et al.*, 1986). Il n'induirait pas de mutations géniques sur les cellules eucaryotes : les essais de mutation reverse sur des cellules épithéliales de foie de rat, mutants au locus HGPR^T, sont restés négatifs (Telang *et al.*, 1982a) ; il en est de même des essais sur les lignées de cellules fibroblastiques D.550 d'origine humaine (Tong *et al.*, 1982) et V79 de hamster (Tsushimito *et al.*, 1983).

Le chlordane serait également dénué d'activité clastogène sur l'ADN de plasmides isolés à partir d'*E. coli* (Griffin *et al.*, 1978)

Les seuls travaux faisant état d'une activité génotoxique du chlordane sont ceux de Ahmed *et al.* (1977a, 1977b) qui rapportent des résultats positifs de deux essais de mutagénèse : essai de mutation reverse sur des cellules V79 au niveau du locus de l'ouabaïne et essai d'induction de la synthèse non programmée de l'ADN (UDS) sur des cellules fibroblastiques humaines transformées SV40. Ces résultats peuvent être liés à une contamination du chlordane testé, par des impuretés, tel que l'heptachlore, et doivent être considérés avec prudence.

Le chlordane a été rapporté comme pouvant induire une augmentation des échanges de chromatides soeurs (SCE), *in vivo* sur des poissons mudminnow et *in vitro* sur lignées de cellules de lymphome humain (Sobti *et al.*, 1983 ; Vigfusson *et al.*, 1983)

L'hépatocancérogénicité du chlordane et l'absence en général d'effets génotoxiques ont conduit certains auteurs à suggérer que cette substance exercerait ses effets cancérogènes par un mécanisme épigénétique (Williams, 1980).

L'administration de chlordane, à des concentrations de 25 mg/kg dans l'alimentation pendant 25 semaines à un groupe de souris traitées préalablement à la N-nitrosodiéthylamine (20 mg/l d'eau de boisson pendant 14 jours), a été suivie d'une augmentation de l'incidence d'adénomes et de carcinomes hépatiques ; le chlordane apparaît donc agir comme un promoteur, qui potentialiserait les effets des initiateurs (Williams et Numoto, 1984).

Le chlordane s'est montré être un inhibiteur de la communication intercellulaire sur des primocultures d'hépatocytes de souris et de rat, ainsi que sur des lignées de cellules épithéliales de foie de rat (ARL), et de lignées V79 (Telang *et al*, 1982b ; Tsushimoto *et al*, 1983 ; Ruch *et al*, 1990). Cet effet serait dû au chlordane lui-même et non à ses métabolites, ainsi que l'ont montré Ruch *et al*, (1990), en utilisant des inhibiteurs des monooxygénases de type cytochrome P450 (le SKF - 525 A, monoxyde de carbone ou butoxyde de piperonyl). Ils ont aussi montré que l'inhibition était moindre en présence d'AMP cyclique.

Le chlordane, à la concentration de 1 μ M, stimule la protéine kinase C, d'une manière similaire au TPA (Moser et Smart, 1989). La stimulation de la PKC par le chlordane est dépendante du calcium ; en présence de Ca^{2+} exogène, la stimulation de la PKC par le chlordane est cinq fois supérieure à celle induite par le TPA. L'activation de la PKC par le chlordane est dépendante des phospholipides et peut être inhibée par la quercétine.

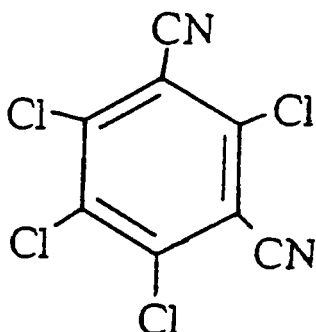
Suzaki *et al*. (1988) ont montré que le chlordane augmente la concentration de calcium intracellulaire dans des leucocytes polynucléaires.

Cette étude suggère que le mécanisme des effets de promoteur tumoral du chlordane, impliquerait une modification des concentrations de calcium intracellulaire, couplée avec une activation de la PKC.

Nous avons essayé, au cours de ce travail, d'apporter une contribution à l'étude des mécanismes épigénétiques de l'action cancérigène du chlordane. Nous avons étudié l'effet du chlordane, d'une part sur la transformation des cellules embryonnaires de hamster Syrien et d'autre part sur la communication intercellulaire des cellules V79.

Nous avons préalablement étudié les effets mutagènes de la substance, lesquels avaient donné lieu à des résultats contradictoires.

VII - Chlorothalonil



Noms chimiques : Tétrachloroisophtalonitrile ; 2,4-5,6 tétrachloro 1-3-benzendicarbonitrile

A - Production et utilisation

Le chlorothalonil est un pesticide organochloré utilisé pour ses propriétés fongicides ; il est commercialisé sous différents noms, Daconil 2787, Bravo, Nopocide,... Ses utilisations agricoles concernent le traitement des fruits et légumes, des céréales, des arachides en particulier et aussi celui des pelouses et des plantes ornementales ; le chlorothalonil est aussi utilisé pour la conservation des peintures et des colles.

La production commerciale a débuté aux Etats-Unis en 1969, avec une production annuelle de 5000 tonnes (U.S. Tariff. Commission, 1971). Au Japon, le taux de production annuelle est estimé à 3000 tonnes. La substance n'est pas produite en Europe, où elle serait importée des USA.

La teneur maximale de résidus de chlorothalonil est de 0,02 mg/kg dans les céréales (J.O. du 25/2/89) ; elle est fixée à 0,2 mg/kg pour les bananes et à 1 mg/kg pour les tomates, melons et cornichons (J.O. du 22/9/92).

La dose journalière acceptable de chlorothalonil chez l'homme recommandée par le Comité mixte OMS/FAO pesticides (1990) est de 0,03 mg/kg/j.

Le chlorothalonil, à la différence de la majorité des dérivés organochlorés est biodégradable, son temps de demi-vie dans les sols serait de 2,5 à 3 mois (Stallard et Wolf, 1967). Les voies oxydatives de biotransformation conduisent à la formation de dérivés hydroxylés, notamment en 4 (Szalkowski et Stallard, 1976) ; le dérivé 4-hydroxylé est aussi formé après hydrolyse. Le chlorothalonil serait également peu bioaccumulable, ainsi qu'il a été montré chez les poissons par Davies (1988).

B - Métabolisme

Suite à l'administration de chlorothalonil marqué (^{14}C) à une dose de 1 mg/kg p.c. à des rats Sprague Dawley, moins de 6 % de la radioactivité serait retrouvée dans le sang ou les urines dans les 48 heures qui suivent le traitement (Chin *et al.*, 1981). Après un traitement par gavage à l'aide d'une dose de 50 mg/kg à des rats, 3 % de la radioactivité était retrouvée en 96 heures dans les urines, plus de 90 % étant éliminé par les fèces.

Le chlorothalonil serait éliminé par voie urinaire sous forme de thiols. La quantité de thiols métabolisés serait liée à l'activité de la microflore intestinale ; elle serait plus importante chez le rat que chez le chien ou le singe . 0,5 % de la radioactivité serait fixée au niveau des tissus, 0,05 % au niveau rénal (Rapport Ministère de l'Environnement, 1991).

Après administration orale chez le rat, la distribution du chlorothalonil serait maximale au niveau des reins, qui renferment 0,25 % de la dose administrée par gramme de tissu, avec 81 % de la radioactivité répartie dans le cytosol et 54 % dans les mitochondries ; aucune liaison covalente à l'ADN des cellules rénales n'a été rapportée (Chouroulinkov, 1990).

Le chlorothalonil réagit avec les composés sulfhydryles ; il a été trouvé lié aux histones de cellules de thymus de veau et au noyau de cellules de foie de rat, mais pas à l'ADN *in vitro* (Rosanoff et Siegel, 1981).

La métabolisation du chlorothalonil impliquerait la formation de conjugués au glutathion qui seraient convertis au niveau du rein en thiols sous l'action de l'enzyme b-lyase . Une partie de ces thiols est excrétée par voie urinaire après méthylation. Une autre partie après une réaction avec des groupes "sulfhydryles", pourrait entraîner un dysfonctionnement des mitochondries, se traduisant par une réduction des teneur en ATP, une inhibition de l'activité Na^+/K^+ ATPasique suivie d'une entrée passive d'eau et la formation de vacuoles ; les cellules finissent soit par mourir, soit par développer une hyperplasie entraînant la formation de tumeurs (Chouroulinkov, 1990).

C - Effets toxiques

Le chlorothalonil est sensibilisant ; des dermatites sévères ont été observées chez le personnel agricole manipulant ce fongicide (Horiuchi et Ando, 1980) et les travailleurs exposés à des produits de conservation du bois (Bach et Pederson, 1977 ; Spindeldreier et Deichmann, 1980).

La DL₅₀ du chlorothalonil chez la souris femelle ICR est de 6000 mg/kg et de 2,5 mg/kg lors d'administrations respectivement par voie orale et intrapéritonéale (Yoshikawa et Kawai, 1966). Chez le rat, la DL₅₀ est supérieure à 10 g/kg (Spencer, 1973).

Le chlorothalonil se montre très toxique pour le poisson, avec une CL₅₀-96 h de 10 à 30 µg/l, chez *Salmo spp* et *Galaxias spp* (Davies, 1985a). Des valeurs de CL₅₀ à 8 jours de 250 µg/l et 430 µg/l ont été enregistrées respectivement chez la truite arc-en-ciel et le poisson chat. La toxicité élevée du chlorothalonil chez les poissons serait liée à sa métabolisation rapide en conjugués du glutathion (Davies *et al.*, 1985b).

D - Données sur la cancérogénicité du chlorothalonil

Le chlorothalonil n'induit pas de mutation réverse chez les souches TA98 et TA100 de *Salmonella typhimurium his⁻*, en présence et en absence d'activation métabolique (Kawachi *et al.*, 1980). Le chlorothalonil ne s'est pas non plus révélé mutagène chez deux microorganismes eucaryotes : *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus nidulans* (De Bertoldi *et al.*, 1980).

Des études de mutagénèse sur des cellules de mammifères (V79 et Balb/c3T3) ont confirmé l'inactivité du chlorothalonil à induire des mutations géniques (MEV, 1990).

Kawachi *et al.*, (1980) n'ont pas observé d'aberrations chromosomiques sur des cellules fibroblastiques de poumons d'hamster traitées au chlorothalonil. Cette substance n'induit pas de micronoyaux chez le rat, la souris et le hamster chinois (MEV, 1990).

Plusieurs études de cancérogénèse *in vivo* ont été réalisées. Le chlorothalonil n'a pas entraîné d'induction de tumeurs, administré dans l'alimentation à des souris femelles et mâles durant 80 semaines, à doses élevées de 2688 et 5375 ppm en moyenne dans la nourriture pour les mâles (soit 385 et 770 mg/kg/j p.c.), et pour les femelles de 3000 et 6000 ppm (soit 430 et 860 mg/kg/j p.c.). La durée de cette étude a été jugée insuffisante.

Par contre, administré à des rats mâles et femelles durant 80 semaines, à des concentrations de 5063 ppm et de 10126 ppm en moyenne dans les aliments (soit 250 et 500 mg/kg/j p.c.), le chlorothalonil a induit des adénomes et des adénocarcinomes de l'épithélium tubulaire rénal (NCI, 1978).

Sur la base de ces résultats et par suite de l'absence de données chez l'homme liée à la commercialisation récente du chlorothalonil (1969), l'IARC avait conclu en 1983 que les données disponibles étaient insuffisantes pour évaluer la cancérogénicité du chlorothalonil chez l'homme et les animaux d'expérience.

D'autres études ont ultérieurement confirmé le pouvoir cancérogène expérimental du chlorothalonil.

Une étude de deux ans sur des souris mâles Charles River (CD 1) recevant une alimentation renfermant 15, 40, 175 et 750 ppm de chlorothalonil a montré que les doses sans effet étaient de :

- . 40 ppm pour les lésions rénales au niveau des tubules proximaux, soit une dose sans effet de 4,5 mg/kg/j p.c.
- . 175 ppm pour les effets tumorigènes au niveau des reins, soit 21 mg/kg p.c.
- . 15 ppm pour ce qui concerne l'hyperplasie et l'hyperkératose au niveau stomachal, soit 1,8 mg/kg/j p.c.

Dans une autre étude, des rats Fischer 344 ont reçu par le biais de l'alimentation, pendant 27 mois pour les mâles et 30 mois pour les femelles, des teneurs en chlorothalonil de 40, 80 et 175 mg/kg p.c. par jour : des tumeurs rénales, de l'hyperplasie rénale et des tumeurs du pré-estomac ont été observées.

L'étude a été renouvelée dans des conditions quasiment identiques avec des doses de 1,8 3,8 15 et 175 mg/kg p.c. par jour, a confirmé ces résultats, en évaluant le niveau des doses sans effet à :

- . 3,8 mg/kg/j p.c. pour l'effet tumorigène au niveau rénal,
- . 1,8 mg/kg/j p.c. pour l'hyperplasie rénale et pré-stomachale

Ces résultats soulignent la sensibilité plus élevée du rat aux effets tumorigènes du chlorothalonil par rapport à la souris.

Les rapports de la Commission d'évaluation du Ministère de l'Environnement (Paris) sur l'écotoxicité du chlorothalonil (1990-1991), concluent que la substance serait cancérogène chez le rat et plus faiblement chez la souris, avec une spécificité d'organes : rein et pré-estomac ; les tumeurs du pré-estomac seraient des "séquelles" de l'effet irritant.

Compte tenu de ses effets cancérogènes chez le rat et la souris, se manifestant avec une spécificité d'organe marquée, de son caractère irritant au niveau des muqueuses et de l'absence de propriétés mutagène et génotoxique, le chlorothalonil peut être classé parmi les cancérogènes non génotoxiques qui agiraient par des mécanismes épigénétiques.

MATERIEL ET METHODES

I - Les produits chimiques

A - Benzo(a)pyrène (B(a)P)

Formule brute : $C_{20}H_{12}$

Poids moléculaire : 252,3

Cristaux jaunes

Insoluble dans l'eau

Soluble dans le benzène, toluène, xylène, l'acétone et le DMSO.
(Sigma.B.1760)

B - 12-0-tétradécanoyl-Phorbol-13-acétate (TPA)

Formule brute : $C_{36}H_{56}O_8$

Poids moléculaire : 616,8

Corps gras soluble dans l'acétone et dans le DMSO.
(Sigma.P.8139)

C - Dexaméthasone (DXME)

Stéroïde de synthèse, de la famille des glucocorticoïdes

Formule brute : $C_{22}H_{29}FO_5$

Poids moléculaire : 392,5

Poudre blanche, légèrement soluble dans l'eau

Soluble dans l'acétone, l'éthanol et le chloroforme
(Sigma.D.4902)

D - 2 Amino-6-Mercaptopurine ou 6-thioguanine (6-TG)

La 6-thioguanine est un analogue de la purine

Formule brute : $C_5H_5N_5S$

Poids moléculaire : 167,2

Poudre blanche

Soluble dans l'eau légèrement basique
(Sigma.A.4882)

II - Substances et échantillons étudiés

A - Chlordane

Insecticide organochloré

Formule brute : $C_{10}H_6Cl_8$

Poids moléculaire : 409,78.

Liquide visqueux, de couleur ambrée

Insoluble dans l'eau

Soluble dans l'acétone et le DMSO

Le chlordane technique est constitué souvent d'un mélange d'isomères de chlordane et peut contenir aussi une proportion minime de composés liés structurellement tels que des isomères d'heptachlor.

Pureté : 97%

(Riedel-de Haën. 35535. lots 03200 & 10870)

B - Chlorothalonil

Formule brute : $C_8Cl_4N_2$

Poids moléculaire : 265,89

Cristaux blancs

Insoluble dans l'eau

Soluble dans le xylène, le cyclohexane, l'acétone et le kérosène

Pureté : 99%

(Interchim. Chem. Service.PS.1020.Lot 69.6A)

C - Extraits organiques d'un lixiviat de déchet B et d'un percolat de décharge T4

Les extraits organiques de 2 lixiviats de déchets T4 et B, ont été étudiés :

T4 : correspond au percolat recueilli à la sortie d'une alvéole d'un centre d'enfouissement technique,

B : est le lixiviat obtenu par extraction aqueuse d'un déchet de boue d'hydroxyde métallique d'industrie chimique.

L'extraction a été réalisée selon le protocole AFNOR-X31-210 : 75 grammes ont été extraits à 2 reprises par agitation pendant 16 heures à l'aide de 0,75 litre d'eau.

Préparation des extraits organiques :

750 ml de chaque lixiviat ont été épuisés par 3 extractions successives au dichlorométhane (rapport 1/10) à pH basique, neutre et acide. Les fractions organiques sont ensuite réunies et séchées sur sulfate de sodium anhydre. Après élimination du dichlorométhane sous vide à basse température, le résidu est repris dans 9 ml de DMSO. Le facteur de concentration est de 83.

souche	gène affecté	Type de mutation	réversion	réparation	Lipopoly saccharide	Facteur R	Plasmide PAQ1	Nombre de révertants spontanés par boîte
TA 97a	<u>his</u> D 6610	Décalage du Cadre de lecture	- 1 pb	uvrB ⁻	<u>rfa</u>	PKM 101		90-180
TA 98	<u>his</u> D 3052	Décalage du Cadre de lecture	+ 1 pb	uvrB ⁻	<u>rfa</u>	PKM 101		30-50
TA 100	his G 46	Substitution de paire de bases	G → A C → T	uvrB ⁻	<u>rfa</u>	PKM 101		120-200
TA 102	<u>his</u> G 428	Substitution de paire de bases	A → G T → C		<u>rfa</u>	PKM 101	PAQ 1 (x 30)	240-320

pb : paire de bases.

Tableau 4 : Caractéristiques génétiques des souches TA 97a, TA 98, TA 100 et TA 102, de *Salmonella typhimurium*.

III - Le test d'Ames.

A - Réactifs biologiques

Les souches bactériennes utilisées dérivent de la souche : *Salmonella typhimurium* LT₂ et sont porteuses de plusieurs mutations. Les quatre souches bactériennes TA97a, TA98, TA100 et TA102 utilisées nous ont été fournies par le laboratoire de B. Ames.

En plus des mutations *his*⁻, les souches possèdent des mutations supplémentaires qui augmentent leurs capacités à détecter les agents mutagènes (tableau 4) :

- la *mutation rfa* affecte le lipopolysaccharide de la membrane externe de la bactérie et augmente la perméabilité des souches aux molécules de grande taille.
- la *mutation uvr B* entraîne une déficience du processus de réparation par excision, de sorte qu'un grand nombre de lésions primitives de l'ADN ne sont pas réparées. Cette mutation confère aux souches une sensibilité plus grande à des agents susceptibles d'endommager l'ADN. Cette mutation résulte d'une délétion qui touche le gène biotine, ces souches sont donc auxotrophes pour la biotine.
- le *facteur R* : l'introduction dans les bactéries du plasmide PKM101 augmente le taux de mutations induites par accroissement notable d'erreurs au cours de la réplication.
- le *plasmide PAQ1* : seule TA102 possède ce plasmide qui porte le gène histidine muté. Le plasmide étant présent en un grand nombre d'exemplaires (n = 30), le nombre de cibles pour les agents génotoxiques est considérablement augmenté. Ceci permet de détecter les agents mutagènes à des doses beaucoup plus faibles, sans avoir à fragiliser les souches par des mutations de type *uvrB* dont TA102 est exempte.

Les caractères génétiques sont contrôlés tous les 6 mois, ou lors de chaque renouvellement du stock des souches, selon la technique de Maron et Ames (1983). Les souches sont stockées à -80°C.

La transformation métabolique est assurée par l'ajout dans le milieu d'essai, d'un homogénat de foie de rat contenant des enzymes monooxygénases type cytochrome P450 et d'un système générateur de NADPH (mix).

les enzymes sont obtenus à partir de rats mâles (200 g environ) traités à l'Aroclor 1254 injecté par voie intrapéritonéale à la dose de 500 mg/kg de rat. Après broyage du foie mélangé à du KCl (0,15 M), l'homogénat est centrifugé à 9000 g pendant 10 min à + 4°C. Le surnageant post-mitochondrial S₉ est alors prélevé et réparti stérilement en cryotubes conservés à - 80°C.

L'activité métabolisante du S₉ doit être évaluée, afin de définir le rapport S₉/mix optimal à utiliser dans les essais. A cet effet, nous avons mesuré l'activité du S₉ aux concentrations (0 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,20 et 0,3 ml S₉/ml mix) sur TA98, en présence d'un cancérigène indirect : le benzo(a)pyrène à 0.5 et 1 µg/ml. La concentration de 0,025 ml S₉/ml mix, nous a donné le meilleur taux de réversion et a été retenue pour la suite des essais.

B - Protocole

Le test consiste à dénombrer le nombre de révertants obtenus sur un milieu dépourvu d'histidine, après 48 heures d'incubation à 37°C d'une culture de bactéries (de 10⁹ bactéries/ml) en présence de la substance à tester à concentration donnée.

Deux séries d'essais sont réalisées avec ou sans S₉ mix, chaque série d'essai portant sur 4 concentrations et un témoin ; ces essais sont effectués en triplicats.

Les contrôles positifs et les témoins solvants éventuels, sont testés en parallèle. Les contrôles positifs ne nécessitant pas d'activation métabolique sont : l'azide de sodium (10 µg/bte) pour TA 100, 9-aminoacridine (40 µg/bte) pour TA 97a , 2-nitrofluorène (0,5 µg/bte) pour TA 102.

Les mutagènes indirects de référence sont le benzo(a)pyrène (0,5 µg/bte) pour les souches TA 100, TA 98 et TA 97a et le danthron (50 µg/bte) pour TA 102.

Le mode opératoire et la procédure suivie sont ceux préconisées par Ames *et al.* (1983).

Le résultat du test d'Ames est considéré positif si pour l'une au moins des concentrations testées, le nombre de révertants induits est égal ou supérieur au double du nombre de révertants spontanés, sur une ou plusieurs souches, avec et/ou sans S₉ mix.

La validité du test est assurée par la réponse positive obtenue avec les contrôles positifs.

Le taux de révertants spontanés de chacune des souches est donné par Ames *et al.* (1975) (tableau 4).

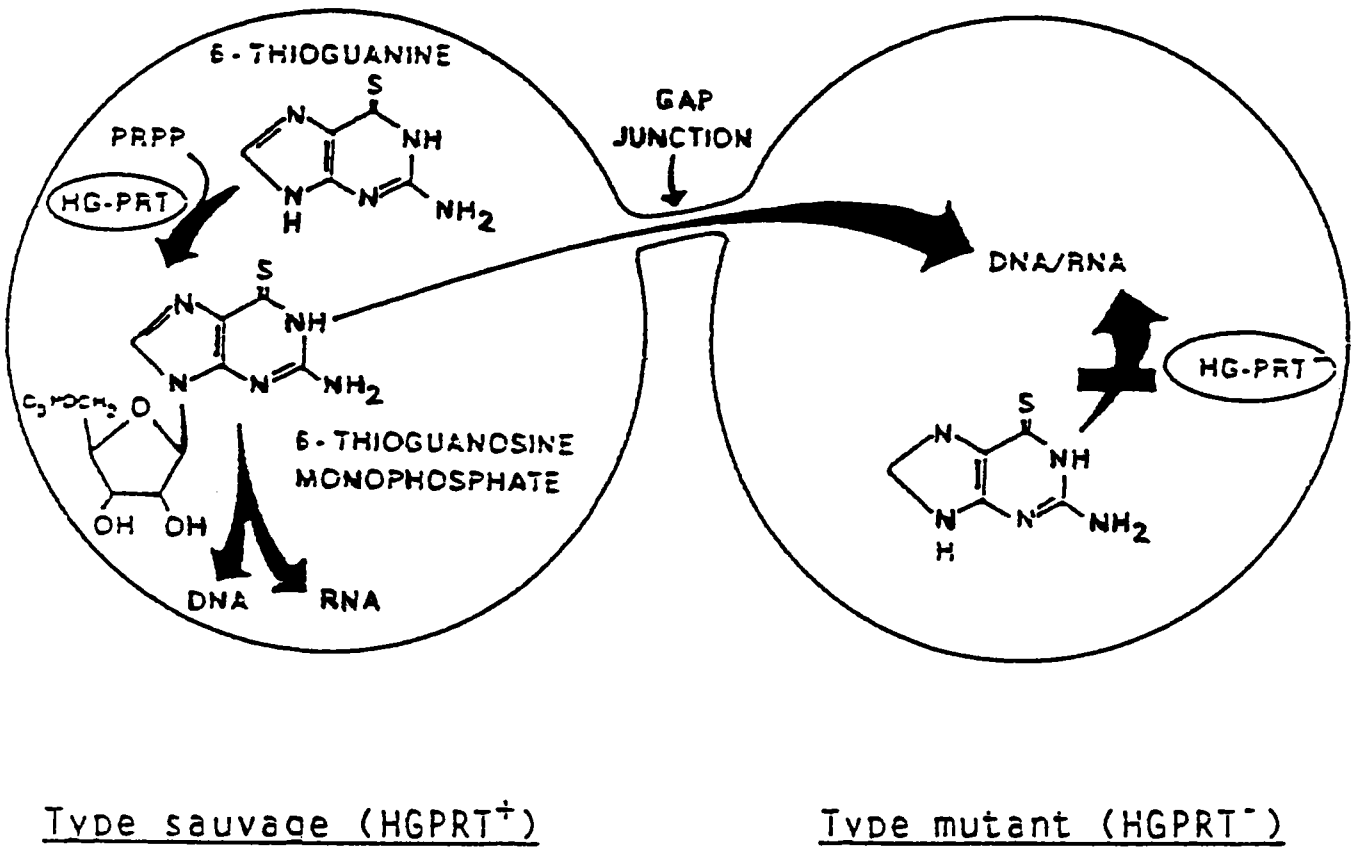


Figure 7 : Illustration du mécanisme par lequel se fait la coopération métabolique sur des cellules fibroblastiques de la lignée V79, au locus HGPRT . (Trosko *et al.*, 1982).

IV - Test d'inhibition de la coopération métabolique sur cellules V79

A - Réactifs biologiques

Il s'agit de la lignée V79 de cellules fibroblastiques pulmonaires de hamster chinois. Deux types de cellules V79, normales et mutées au locus (HGPRT), sont utilisés.

Ces 2 types de cellules, nous ont été donnés par le Dr Z. Elias de l'INRS de Nancy.

Les cellules sont stockées dans de l'azote liquide à raison de 3 millions de cellules par tube dans du milieu DMEM modifié de pH 7,35 et additionné de 20 % de sérum de veau foetal (SVF) et de 10 % de DMSO.

B - Principe

Essai de coopération métabolique

Cet essai, développé par Trosko *et al.* (1979) utilise des cellules V79. Lorsque des cellules mutantes déficientes en hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT⁻), sont cocultivées avec des cellules de type sauvage (HGPRT⁺), dans un milieu contenant la 6-thioguanine, les cellules de type sauvage capable de phosphoryler la 6-thioguanine forment un métabolite toxique : la 6-thioguanosine monophosphate.

Le transfert de ce métabolite toxique vers les cellules HGPRT⁻ n'a lieu que s'il y a un contact entre les deux types cellulaires. Ce transfert assuré par les Gap junctions (figure 7) vers les cellules HGPRT⁻ entraîne la mort de ces cellules.

Ce test d'inhibition de la coopération métabolique consiste à évaluer le taux de cellules V79, HGPRT⁻ capable de développer des colonies lorsqu'elles sont cocultivées avec des cellules V79, HGPRT⁺ en présence de 6-thioguanine.

C - Protocole du test

Le milieu utilisé pour les essais est le DMEM modifié pH 7,35 à 10% de sérum de veau foetal (SVF).

Les essais sont réalisés en boîte de 60 mm de diamètre, à raison de 10 boîtes par série d'essai.

Le protocole peut être résumé comme suit,

** ensemencement en boîte :*

Série A : 100 cellules V79 résistantes, apportées dans 4 ml de milieu complet (10% SVF),

Série B : 100 cellules V79 résistantes et 7×10^5 cellules sensibles, chaque type de cellules est apporté par 2 ml de milieu,

** ajout de la 6-thioguanine et traitement :*

- quatre heures après l'ensemencement, 4 ml de 6-TG à 10 $\mu\text{g/ml}$ dans le milieu sont ajoutés par boîte (concentration finale 5 $\mu\text{g/ml}$),
- la substance à tester est ajoutée aux 8 ml de milieu d'essai, par l'intermédiaire de 16 μl de solvant ; la teneur du solvant utilisé est de 0,2 %,
- les témoins négatif (solvant) et positif (TPA à 0,001 $\mu\text{g/ml}$) sont testés pour chaque série d'essai,
- incubation 3 jours à 37°C dans une atmosphère humidifiée à 5% CO_2 ,
- changement de milieu et remplacement par 4 ml de milieu contenant uniquement la 6-TG à 5 $\mu\text{g/ml}$,
- après une nouvelle période d'incubation de 5 jours, les boîtes sont lavées avec une solution tampon phosphate (PBS), les colonies cellulaires fixées au méthanol absolu et colorées avec Giemsa (10 %). Le comptage des colonies de la série A détermine l'efficacité de clonage et celui de la série B, le pourcentage des cellules résistantes récupérées.

Pour qu'une expérience soit retenue, il faut qu'elle remplisse les critères suivants :

- l'efficacité de clonage du témoin est $> 75 \%$,
- la récupération des cellules résistantes chez le témoin négatif de la série B est $< 35 \%$,
- la récupération des cellules résistantes dans la série B TPA (témoin positif) est $> 80 \%$.

D - Expression des résultats

$$R/T = \frac{\% \text{ de récupération de la série traitée à la concentration } x}{\text{Pourcentage de récupération du témoin négatif}}$$

Un résultat est considéré :

-	si	$R/T < 2$
+	si	$2 < R/T < 3$
++	si	$3 < R/T < 4$
+++	si	$4 < R/T < 5$
++++	si	$R/T > 5$

Un produit est considéré comme inhibiteur de la coopération métabolique, entre les cellules V79, si un résultat positif a été obtenu pour au moins deux concentrations successives au cours de deux expériences indépendantes. Une relation dose-effet n'est pas exigée.

V - Essai de transformation cellulaire sur cellules d'embryons d'hamster syrien (SHE)

A - Réactifs biologiques

A.1 - Préparation des cellules primaires d'embryons d'hamster Syrien (SHE)

- Des femelles âgées de 2 mois et demi à 3 mois sont accouplées en période d'oestrus pendant 12 heures, avec un mâle de 3 à 4 mois. Le premier jour de gestation correspond au jour où l'on retire le mâle.
- Les femelles gestantes de 12-13 jours sont anesthésiées à l'éther, saignées par les carotides, et les embryons sont prélevés stérilement. Après deux lavages au PBS, les organes différenciés à ce stade (yeux, coeur et viscères) sont retirés.

A partir de cette étape, chaque embryon sera préparé séparément ou avec un autre embryon et découpé finement avant de subir 3 digestions successives par la dispase :

- 10 ml de dispase à 1,2 unité sont additionnés à chaque embryon et l'ensemble est transvasé dans un erlenmeyer. La digestion se fait sous agitation magnétique pendant 10 minutes à 37°C.

- Le surnageant de la première digestion est éliminé, la fraction tissulaire est reprise et soumise à 2 digestions successives par 25 ml de dispase pendant 15 min à 37°C.

- Les surnageants de la 2ème et 3ème digestion sont récupérés après filtration sur gaze stérile afin d'éliminer les petits fragments et agglomérats cellulaires. L'action de la dispase est inactivée par ajout du sérum de veau foetal.

- Les surnageants sont centrifugés à 1000 t/min pendant 10 minutes. Les culots sont remis en suspension dans un milieu complet, c'est-à-dire additionné de 15 % de sérum de veau foetal. Les cellules sont dénombrées dans du bleu de trypan et sontensemencées à raison de 4×10^6 cellules par boîte de pétri de 100 mm de diamètre et incubées à 37°C dans une étuve à 10 % CO₂.

- Le changement de milieu se fait 24 heures après l'ensemencement.

- Après 48 heures, les cellules sont presque confluentes, elles sont trypsinées (0,25 %) et congelées dans du milieu à 10 % SVF et 10 % DMSO ($1,5 \times 10^6$ cellules/tube). La congélation se fait par paliers successifs, 3 heures à - 20°C, 1 nuit à - 80°C et ensuite dans l'azote liquide.

- Chaque lot de cellules provenant d'un ou de deux embryons sera testé pour l'efficacité de clonage et la transformation par le B(a)P à 1 µg/ml. Le lot de cellules qui donnera les meilleurs résultats, pour les deux critères cités, sera retenu pour servir de stock de cellules cibles dans les tests de transformation.

- Les lots de cellules qui donnent des résultats moins satisfaisants, seront cultivés et utilisés comme cellules nourricières, après irradiation à 5000 rads et conservation dans l'azote liquide (à raison de 5 millions de cellules par cryotube).

A.2 - Sélection préliminaire de sérum, cellules et milieu de culture

Lots de cellules cibles : L, G, A1, A7, A2, A3, A8, A9, A10, A4/5,

Lots de cellules nourricières : B, A4/5, A10,

Lots de sérum : - Labsystems 2964, 2503, 3237, 3238
 - Boehringer : 291, 316
 - J-Bio 47,104,9-463
 - Eurobio : 685831
 - Gibco : 06290H

Concentrations de sérum : 12 %, 15 %, 20 %.

Milieux de culture : - Milieu DMEM modifié pH 7,35 (Gibco O74 1600)

Les différents facteurs énumérés ci-dessus, sont aussi importants les uns que les autres pour l'obtention d'une efficacité de clonage élevée et d'une grande sensibilité des cellules vis-à-vis de la transformation induite par le B(a)P. Les éléments soulignés ont été utilisés pour l'ensemble des essais.

B - Principe

Le test consiste à cloner un faible nombre de cellules, dites cellules cibles, en présence d'une substance donnée. L'observation de l'aspect morphologique des colonies, formées après 8 jours d'incubation, permet de mettre en évidence la capacité de la substance testée à induire la transformation morphologique des cellules.

L'efficacité de clonage des cellules SHE étant faible, des cellules nourricières leurs sont associées pendant le test. Les cellules nourricières qui ont gardé leur capacité de métabolisation, et permettent aux cellules cibles de se multiplier et de former des colonies.

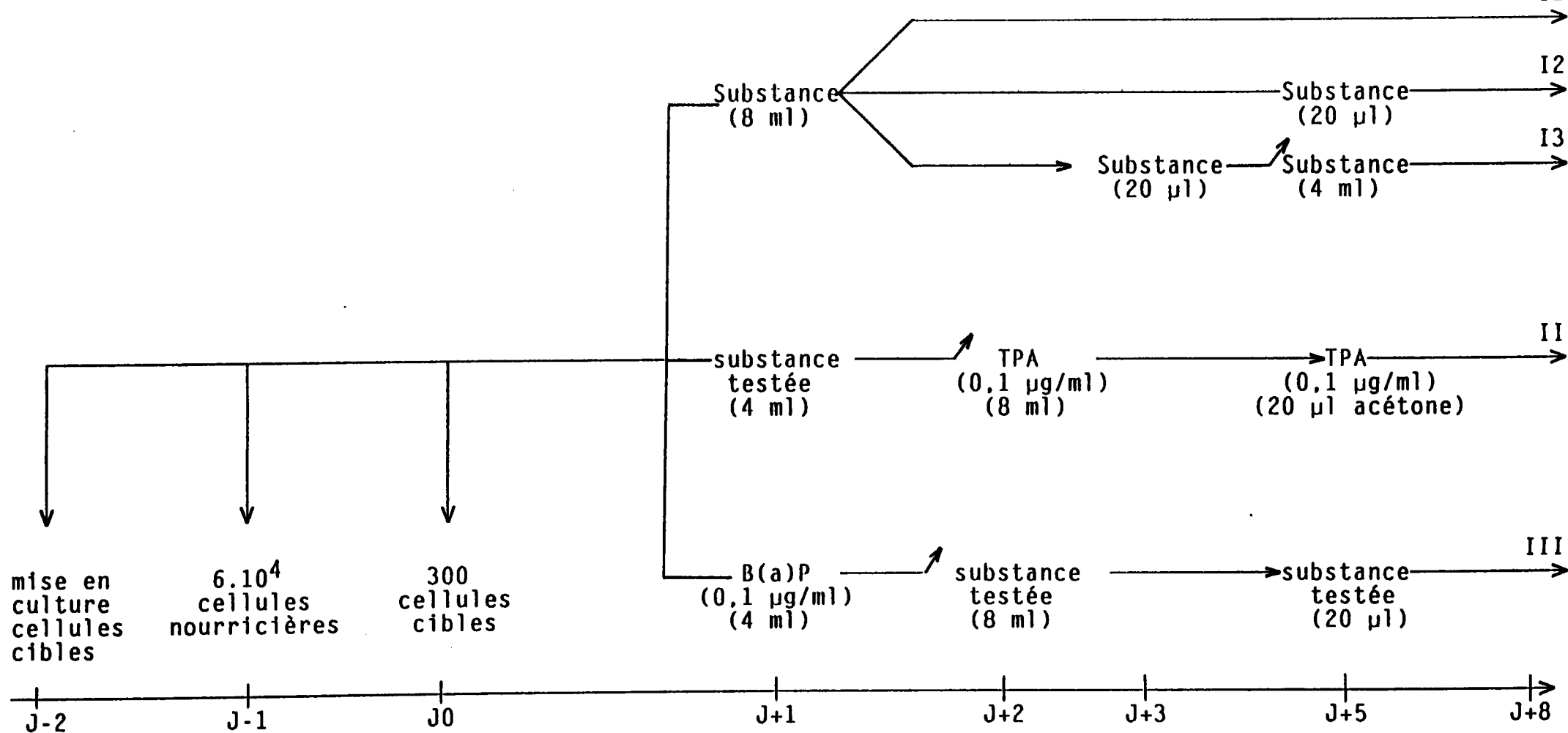


Figure 8 : Protocoles pour l'étude de la transformation cellulaire sur SHE.

- * Effet de la substance testée après une (I1), deux (I2) et trois (I3) applications.
- * Effet d'un traitement séquentiel par la substance testée et le TPA (II)
- * Effet d'un traitement séquentiel par le B(a)P et la substance testée (III).

———↗ : changement de milieu.

C - Protocoles

Le test est effectué selon la procédure développée par Di Paolo (1980) et modifiée par Lu (1988). Nous avons utilisé 300 cellules cibles et 60000 cellules irradiées.

Les essais sont réalisés en boîtes de 60 mm de diamètre, à raison de 10 boîtes par concentration. Pour les traitements, la concentration du solvant est de 0,2 % dans le milieu.

Chaque expérience est répétée au moins deux fois

J-2 : Les cellules cibles sont décongelées et mises en culture dans 5 ml de milieu à 15 % de sérum de veau foetal (SVF) après élimination du milieu de congélation, contenant le DMSO, par centrifugation à 700 t/minutes pendant 5 minutes,

J-1 : - Changement de milieu pour les cellules cibles,
- répartition des cellules nourricières à raison de 60000 cellules nourricières par boîte, dans 2 ml de milieu complet,

J0 : Ensemencement de 300 cellules cibles, sur les mêmes boîtes contenant la couche nourricière, dans 2 ml de milieu complet.

A partir de cette étape, le protocole de traitement diffère selon que la substance est testée comme cancérigène complet, initiateur ou promoteur (figure 8).

C.1 - Effet transformant complet

La capacité d'une substance à induire la transformation des cellules SHE est testée après 1, 2 ou 3 applications selon les modalités suivantes :

* pour 1 application, la substance est ajoutée à J1 dans 4 ml de milieu complet, le milieu reste inchangé pendant les 8 jours d'essai (I1).

* pour 2 applications, le 1^{er} traitement à J1 appliqué dans les mêmes conditions que précédemment est suivi d'un 2^{ème} traitement à J5, dans 20 µl, sans changement de milieu (I2).

* pour 3 applications, le 1^{er} traitement à J1 est suivi d'un 2^{ème} traitement à J3, dans 20 µl de solvant, sans changement de milieu. Le 3^{ème} traitement est effectué à J5 avec renouvellement de milieu.

A J8, pour les 3 modalités de traitement, les cellules sont fixées à l'éthanol absolu pendant 10 minutes et colorées au Giemsa à 10% pendant 20 minutes (I3).

C.2 - Effet initiateur

La substance à tester est ajoutée à J1 et laissée 24 heures au contact des cellules. A J2, le milieu est éliminé puis remplacé par 8 ml de milieu contenant le promoteur de référence, le TPA, à une concentration de 0,1 µg/ml. A J5, une seconde application de TPA est effectuée sans changement de milieu ; au 8ème jour, les cellules sont fixées à l'éthanol absolu et colorées au Giemsa (II).

C.3 - Effet promoteur

24 heures après l'ensemencement, les cellules sont traitées par un initiateur connu, le benzo(a)pyrène à la dose de 0,1 µg/ml (dose non transformante). Le B(a)P est laissé au contact des cellules pendant 24 heures puis le milieu est changé à J2 par un milieu contenant la substance à tester à la concentration désirée ; à J5, un deuxième traitement est effectué sans changement de milieu, par introduction de la substance dans 15 µl de solvant. A J8, les cellules sont fixées et colorées comme précédemment (III).

D - Expression des résultats

Deux critères sont évalués :

- l'efficacité de clonage (en %) qui est le nombre de colonies formées par rapport au nombre de cellules mises en culture, détermine la toxicité de la substance étudiée.

$$EC (\%) = \frac{\text{Nombre total de colonies formées}}{\text{Nombre de cellulesensemencées}} \times 100$$

- le taux de transformation (en %) exprimé par le nombre de colonies transformées par rapport au nombre de colonies présentes (plus de 50 cellules par colonie), détermine le potentiel transformant de la (ou les) substance(s) étudiée(s).

$$T (\%) = \frac{\text{Nombre de colonies transformées}}{\text{Nombre total de colonies formées}} \times 100$$

VI - Etude de l'activité ODC sur cellules SHE

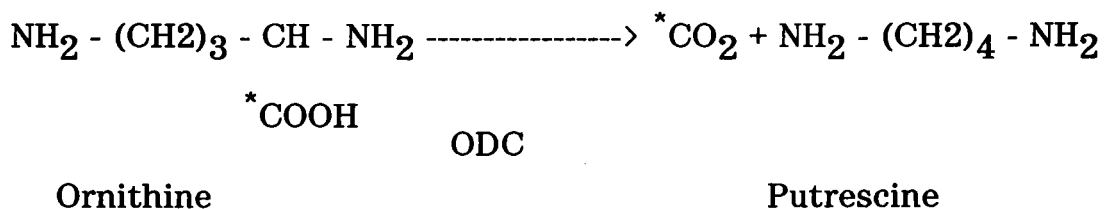
Les cellules SHE proviennent du même lot que celles utilisées pour les essais de transformation cellulaire.

L'activité ODC a été étudié uniquement, sur des cellules SHE traitées au chlordane, seul ou associé au TPA.

Cette partie de notre étude a été réalisée dans le laboratoire du Docteur G. Nguyen-Ba du CNRS de Villejuif.

A - Principe

Le dosage de l'activité ornithine décarboxylase (ODC) se fait par mesure du taux de $^*\text{CO}_2$ dégagé, après clivage de l'ornithine-substrat marquée au ^{14}C (Lichti *et al.*, 1983).



Il s'agit donc de piéger le CO_2 dégagé par un filtre de cellulose imprégné de 50 μl de KOH 2N et le quantifier par mesure de la radioactivité du filtre en scintillation liquide.

B - Protocole

** ensemencement des SHE :*

les cellules SHE sont ensemencées dans des boîtes Costar à 12 puits, à raison de 20000 cellules/ml.

** traitement des cellules :*

le traitement débute quand les cellules ont atteint la confluence. Le milieu de traitement est : DMEM modifié à pH 6,7 additionné de 5 % SVF. Ces conditions de traitement permettent d'avoir des valeurs d'ODC plus élevées et plus régulières. Elles facilitent ainsi la détection de toute modification de l'activité ODC par une substance chimique (Robert, 1990).

- chaque puits contenant un tapis de cellules confluentes est lavé 2 fois avec du PBS.
- le produit (ou les produits) à tester est introduit dans 2 ml de milieu à 5% SVF ; la concentration en DMSO est de 0,2 %.
- après le temps de traitement (37°C, 10% CO_2), les puits sont lavés au PBS et les boîtes Costar congelées à -80°C pour le dosage biochimique de l'ODC.

*** déclenchement de la réaction enzymatique :**

Les essais sont réalisés à la température de 4°C, jusqu'au déclenchement de la réaction enzymatique à 37°C.

- les cellules sont traitées successivement par les substances suivantes :

200 µl	d'H ₂ O distillé
50 µl	d'une solution de Tris HCL pH = 7,5 à 400 mM (concentration finale 50 mM)
50 µl	d'une solution de Pyridoxal phosphate à 320 µM (concentration finale 40 µM)
50 µl	d'une solution de Dithiotréitol à 20 mM (concentration finale 2,5 mM)
50 µl	d'une solution d'Ornithine + (¹⁴ C)Orn à 3,2 mM (concentration finale 0,4 mM)

la concentration en ¹⁴C-L-ornithine est de 0.1 µCi (3.7 KBq).

- La boîte Costar à 12 puits est ensuite recouverte d'un parafilm perforé au niveau de chaque puits sur lequel est déposé un filtre de cellulose (GF/C Whatman) imprégné de 50 µl KOH 2N pour piéger le CO₂ dégagé lors de la réaction enzymatique. Un second parafilm est ajouté de façon à fermer hermétiquement la boîte.

- l'incubation s'effectue dans un bain-marie à 37°C sous agitation pendant 60 min.

- la réaction est stoppée par injection de 50 µl d'acide perchlorique 2N par puits, suivie d'une nouvelle incubation à 37°C, 60 min pour permettre l'adsorption totale de CO₂.

- les protéines sont dissoutes par 50 µl de NAOH 5N par puits.

* la *mesure de la radioactivité* incorporée dans chaque filtre est mesurée par scintillation liquide.

* la *mesure de la quantité des protéines* est déterminée en présence de bleu de Coomassie, selon la méthode de Bradford (1976).

C - Expression des résultats

L'activité ODC est exprimée en nmoles de CO₂ relarguées par mg de protéine en 60 minutes.

VII - Mesure du Ca^{2+} cytoplasmique libre en cytométrie de flux par utilisation du Fluo 3

A - Réactif biologique

La mesure du Ca^{2+} cytoplasmique libre a été effectuée uniquement sur des cellules traitées au chlordane, chlorothalonil et TPA.

Les cellules SHE sontensemencées à raison de 20000 cellules/ml dans du milieu DMEM à pH 7,35 et 10 % SVF en boîtes de pétri de 30 mm de diamètre.

B - Principe

Il est basé sur l'utilisation d'un chromophore fluorescent, le Fluo 3, capable de se lier aux ions de calcium libre.

La liaison du Fluo 3 avec des ions Ca^{2+} entraîne une augmentation de la fluorescence, qui est fonction de la quantité de calcium lié. Cette intensité de fluorescence est mesurée à l'aide d'un cytomètre de flux équipé d'une source laser d'excitation et d'un filtre correspondant à la longueur d'onde de la fluorescence émise (Minta *et al.*, 1989) ; elle traduit indirectement le taux d'ions de calcium libre intracellulaire.

C - Protocole

Quand les cellules sont à 60 % de confluence, le milieu est éliminé et remplacé par 2 ml de tampon Hanks contenant le Fluo 3 à 4,5 $\mu\text{g/ml}$; le tampon Hanks contient également du Pluronic F-127 à 75 $\mu\text{g/ml}$, qui facilite la pénétration du Fluo 3 dans les cellules.

- après 20 minutes de contact, le milieu contenant le Fluo 3 est enlevé et remplacé par 2 ml de Hanks à 1 % SVF, pendant 30 minutes.

- les cellules sont lavées et mises dans 1 ml de tampon Hepes salin pendant 10 minutes.

- les cellules sont traitées par ajout de 10 à 50 μl de la substance à tester sous microscope relié à la source laser.

L'ionomycine, un ionophore de calcium, est utilisé comme contrôle positif.

Les mesures de fluorescence des cellules observées sous microscope, sont enregistrées, traitées par ordinateur et représentées graphiquement (Confocal System Laser Scanning Microscope-Meridian ACAS570).

- le tracé obtenu, reflète les niveaux de concentration en calcium libre intracytoplasmique et ses variations lors d'un traitement.

VIII - Recherche des adduits à l'ADN du chlordane par la méthode de post-marquage sur les cellules SHE

Ces essais ont été réalisés en collaboration avec le professeur B. Rether, du laboratoire de biologie végétale appliquée. IUT Louis Pasteur. Strasbourg.

A - Préparation et traitement des cellules

La détection d'adduits a été réalisée uniquement sur des cellules SHE traitées par le chlordane. Le chlorothalonil et les extraits des déchets T4 et B n'ont pas été étudiés dans cette partie.

- Les cellules sontensemencées à raison de 1,5 millions de cellules par boîte de 100 mm de diamètre, dans 10 ml de milieu complet (DMEM modifié pH 7,35 à 15% SVF). 4 boîtes sont préparées par série de traitement.

- Un changement de milieu est effectué 24 heures après l'ensemencement,

- A 48 heures, le milieu est éliminé et remplacé par 10 ml de milieu contenant :

- * 0,2 % de DMSO pour la série Témoin.

- * chlordane à 10 µg/ml pour la série Essai 1.

- * chlordane à 10 µg/ml pour la série Essai 2.

le traitement est de 24 heures pour les séries Témoin et Essai 1 et de 48 heures pour la série Essai 2.

- Après trypsination et centrifugation, 3 tubes de 250 mg de biomasse cellulaire ont été préparés par série de traitement et congelés dans de l'azote liquide.

B - Isolement et purification de l'ADN

Après décongélation et élimination du milieu, l'isolement de l'ADN a été effectué sur 220 mg de culot cellulaire. Pour chaque traitement, l'essai est répété 3 fois.

La composition des tampons et réactifs utilisés figure dans l'annexe II.

L'extraction des acides nucléiques a été réalisée, selon la technique de Dunn *et al.* (1988) en lysant les cellules par digestion à la protéinase K (1 mg/ml) dans un tampon SET pH 8 à 0,5 % SDS .

La purification des acides nucléiques est assurée par 3 extractions successives au phénol, phénol/chloroforme + 4 % d'alcool isoamylique (v/v) puis au chloroforme à 4% d'alcool isoamylique effectuées sur le lysat. Les acides nucléiques ainsi extraits sont précipités à l'éthoxyéthanol à -20°C.

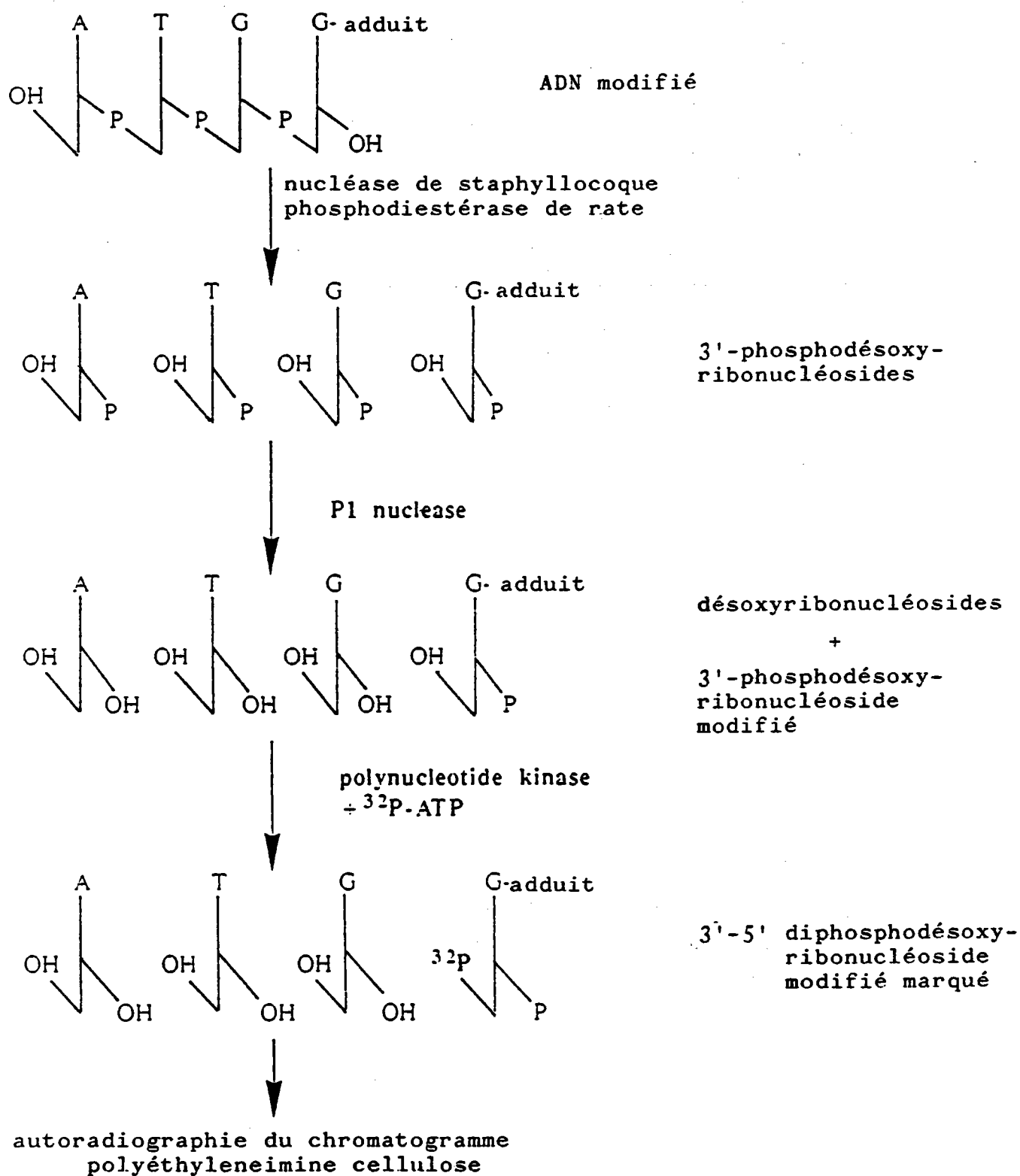


Figure 9 : Procédure simplifiée de la méthode de ^{32}P -post-marquage des nucléotides d'un hydrolysate d'ADN (Randerath et al., 1981)

La *purification de l'ADN* a été faite par digestion enzymatique des ARN par une solution de ribonucléases (RNase A à 0,1 mg/ml + 1000 unités/ml RNase T1) dans le tampon SET. L'ajout de la protéinase K à 10 mg/ml dans le tampon SET permet ensuite l'hydrolyse des RNases. L'ADN est ensuite extrait par 3 traitements successifs au phénol, phénol/chloroforme + 4 % d'alcool isoamylique (v/v) puis au chloroforme à 4 % d'alcool isoamylique. L'ADN est précipité par l'éthoxyéthanol, centrifugé, dissous dans 100 µl d'eau distillée et conservé à - 20°C.

Le *dosage de l'ADN* est effectué par la mesure des absorbances à 260 et 280 nm. Sa pureté est estimée après calcul du rapport R.

$$R = \frac{DO_{260}}{DO_{280}}$$

si R = 1,8 l'ADN est pur

si R > 1,8 l'ADN est contaminé par des ARNs

si R < 1,8 l'ADN est contaminé par des protéines

Pour le calcul de la concentration en ADN, on utilise la formule suivante établie à partir du coefficient d'absorption molaire :

Une valeur de DO₂₆₀ nm de 1 correspond à 50 µg d'ADN/ml de la dilution.

L'intégrité de l'ADN est vérifiée par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose (0,8 %).

C - Détection des adduits

La détection des adduits à l'ADN sur des cellules SHE en présence ou en absence de chlordane a été réalisée par la technique de post-marquage au ³²P (Randerath *et al.*, 1981 ; Reddy et Randerath, 1986 ; Rether *et al.*, 1990).

C.1 - Etapas enzymatiques (figure 9)

Après séchage d'aliquots de 10 µg d'ADN, une *hydrolyse enzymatique de l'ADN* en 3'phosphodésoxyribonucléosides est assurée par deux enzymes : la phosphodiesterase de rate (10,7 unités/µl) et la nucléase de staphylocoque (47 unités/µl).

La *nucléase P1* possède une activité 3'-phosphatasique, elle va donc déphosphoryler essentiellement les phosphates en 3' des nucléotides normaux et non les nucléotides hypermodifiés à cause de leur encombrement stérique.

Le marquage des adduits se fait par traitement à la T4 polynucléotide kinase (30 unités/ μ l), qui catalyse le transfert du phosphate terminal 32 (P)ATP à la terminaison OH en 5' des 3'phosphodésoxyribonucléosides. Le marquage est suivi par un traitement à l'apyrase qui permet l'hydrolyse de l'ATP en AMP + PPi.

C.2 - Etapas chromatographiques

Migration D1 :

Les échantillons sont déposés à 2 cm du bas d'une plaque de polyéthylénéimine(PEI)-cellulose et sont espacés entre eux de 2 cm. Un papier Whatman est agrafé à l'extrémité supérieure de la plaque afin d'"aspirer" le solvant au delà de la limite supérieure de la couche et d'éluer les nucléotides normaux, le 32 (P)ATP résiduel et le * PPi hors de la zone de migration des adduits. Du phosphate monosodique à 1,7 M pH 5,6 est utilisé comme solvant.

Après migration de 16 à 20 heures, le bord supérieur de la plaque avec le papier Whatman est découpé et éliminé. La plaque est lavée à l'eau distillée afin d'enlever les solvants salins.

Empreinte, découpage et transfert :

Après avoir autoradiographié la plaque, l'empreinte obtenue est quadrillée. Un rectangle de 15 mm x 25 mm est découpé dans la partie inférieure de la plaque au niveau de chaque dépôt puis transféré sur une nouvelle plaque. Cette découpe est maintenue sur la nouvelle plaque par de petits aimants durant la 2ème migration (D2).

La *migration D2*, se fait dans 75 ml de tampon de formiate de lithium 5,3 M et d'urée 8,5 M pH 3,5. La durée de la migration est d'environ 5 heures.

La *migration D3*, se fait dans le sens perpendiculaire à la précédente donnant ainsi la séparation bidimensionnelle des adduits.

Le solvant utilisé est un tampon phosphate monosodique 0,7 M pH 6,8 dilué à 85 %. La migration dure 3 heures.

La *migration D4*, se fait dans le même sens que la dimension 3. Il s'agit essentiellement d'un "lavage" permettant d'éluer la radioactivité non liée à la présence d'adduits, le solvant utilisé est le phosphate monosodique 1,7 M pH6. La migration est d'environ 3 heures.

Après chaque migration, les plaques sont lavées deux fois à l'eau pendant 7 minutes pour enlever le solvant absorbé sur les plaques.

C.3 - Autoradiographie des plaques et comptage de la radioactivité des spots

Les plaques sont autoradiographiées en présence d'un écran intensificateur de rayonnements à - 80°C de 6 à 36 heures, suivant le cas.

Après révélation, les spots sont repérés sur les plaques grâce aux empreintes sur les films. La PEI-cellulose correspondant à chaque spot est grattée et récupérée pour un comptage de radioactivité en Cerenkov dans un spectromètre à scintillation (SL32, Inter technique).

D - Calcul du nombre d'adduits

Le calcul du nombre d'adduits a été effectué à partir du comptage de la radioactivité des spots et de l'activité spécifique de l'ATP radioactif utilisé.

Nous savons que 1 Ci correspond à 2,2.10¹² DPM (désintégrations par minute) et que l'ATP* utilisé est à 3000 Ci/mmole. Ainsi le calcul montre que 6600 DPM correspond à 1 fmole (10⁻¹⁵ mole) d'ATP*. D'autre part, il a été montré que 1 fmole correspond à 0,33 adduit pour 10⁹ nucléotides (Dunn, 1989).

PARTIE I : Etude de la mutagénicité du chlordane, du chlorothalonil et des extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B.

Le test le plus connu et le plus largement utilisé pour la détection de la mutagénèse de produits chimiques et d'échantillons environnementaux complexes est le test d'Ames qui mesure leur capacité à induire des altérations génétiques (mutations géniques). Malgré les limites de ce test bactérien (ex : faux positifs et faux négatifs), il est généralement reconnu comme un important outil de détection de potentialités mutagènes et éventuellement cancérogènes. Nous avons choisi le test d'Ames, dans un premier temps, pour évaluer la mutagénicité de deux pesticides organochlorés (chlordane et chlorothalonil) et d'extraits organiques de deux fractions aqueuses de déchets solides (T4 et B). Les résultats obtenus, par le biais de ce test, constitueront une première information sur la génotoxicité de ces produits, complétée par les données des autres tests de cancérogénicité effectués au cours de ce travail ; ces résultats seront exploités également pour comprendre les mécanismes d'action des produits testés.

I - Chlordane

Une gamme assez large de concentrations du chlordane a été testée : 0 ; 40 ; 64 ; 128 ; 160 et 320 µg/bte. Le chlordane est introduit dans 100 µl de DMSO par boîte.

Le chlordane, à ces concentrations, n'induit pas d'augmentation de révertants his⁺ sur aucune des souches testées : TA 98, TA 97a, TA 100 et TA 102 (tableau 1, annexe II).

Aucune augmentation significative du nombre de révertants n'a été observée, que le test ait été conduit en présence ou en absence de S₉ mix. Ceci suggère que le chlordane ou ses métabolites formés *in vitro* par les monooxygénases du S₉, reste inactif quant à l'induction de mutations par substitution de paires de bases (TA 100 et TA 102) ou par décalage de cadre de lecture de code (TA 97a et TA 98).

Aucune des concentrations testées ne s'est révélée toxique pour les 4 souches utilisées.

Ces résultats confirment l'inactivité du chlordane à induire des mutations sur TA100 et TA98, ainsi qu'il avait été montré par d'autres auteurs (Simmon et al., 1977 ; Probst et al., 1981 ; Gentile et al., 1982 et Mortelman et al., 1986), et démontrent l'absence de mutagénicité sur les souches TA97a et TA102.

II - Chlorothalonil

La gamme de concentrations de chlorothalonil testée est : 0,4 ; 0,8 ; 1,6 ; 2,4 et 4 µg/bte. Le chlorothalonil est introduit par 100 µl d'acétone par boîte.

Les résultats obtenus montrent que le chlorothalonil n'augmente pas le nombre de mutants reverses his⁺, sur les souches testées, en présence ou en absence de S₉ mix (tableau 2, annexe II).

Les concentrations testées ne présentent pas de toxicité vis-à-vis des 4 souches bactériennes utilisées.

Peu d'études ont été faites ou du moins publiées concernant le potentiel mutagène du chlorothalonil. Cependant, les quelques références bibliographiques existantes, limitées à un rapport du Ministère de l'Environnement, évaluant les risques mutagènes et cancérogènes du chlorothalonil et un bref monographe de l'IARC de Lyon, convergent pour classer ce produit comme non mutagène.

Ces résultats confirment ceux obtenus par Kawachi et al., (1980), concernant l'absence de potentiel mutagène du chlorothalonil vis-à-vis des souches TA 98 et TA 100, et montrent que ce dernier est également inactif sur TA 97a et TA 102.

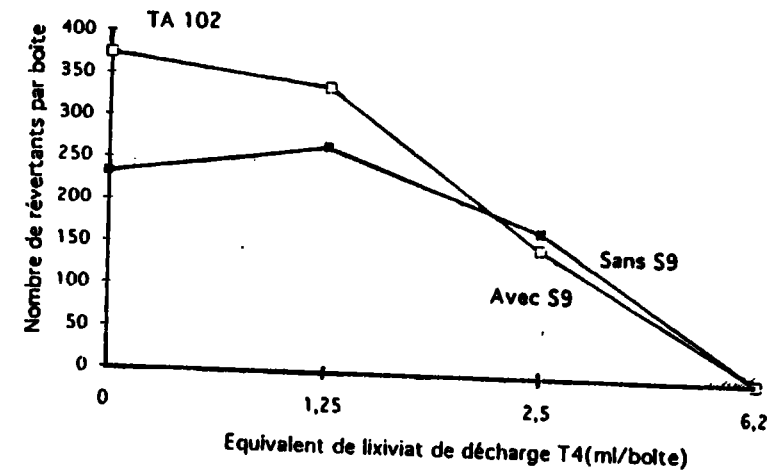
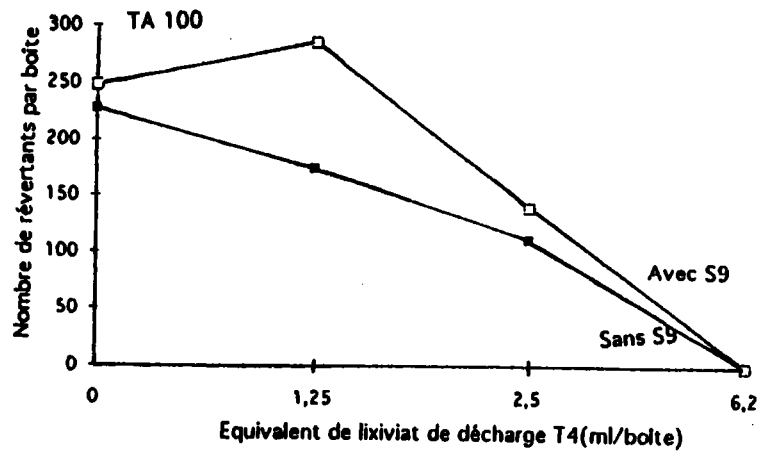
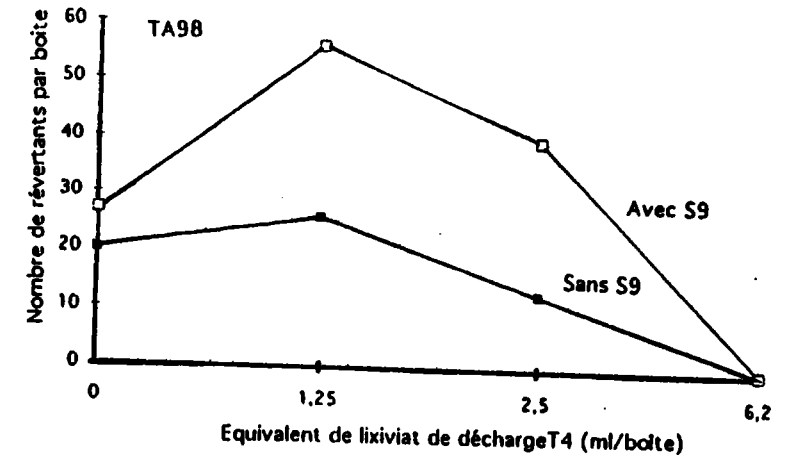
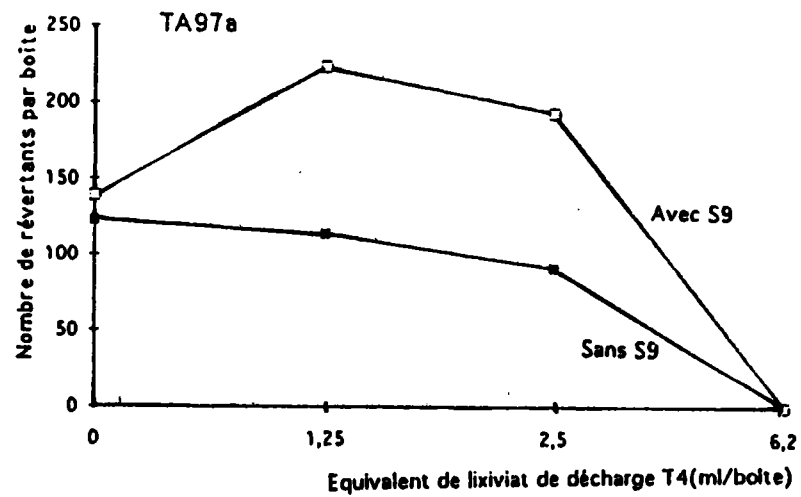


Figure 10: Induction de mutations par l'extrait organique du percolat T4 sur TA 97a, TA 98, TA 100 et TA 102.

III - Lixiviats de décharge

L'évaluation du potentiel mutagène de lixiviats de décharge s'inscrivait dans le cadre d'une étude générale qui visait à définir la démarche à adopter pour évaluer le potentiel génotoxique des déchets solides destinés à l'enfouissement technique (c'est à dire la mise en décharge contrôlée) et leur impact à court et long terme au niveau environnemental.

Le test d'Ames effectué sur les extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B, a été réalisé au sein de notre laboratoire par L. Lambolez.

Une analyse chimique a été réalisée pour chacun des échantillons ; les tableaux 3a et 4a de l'annexe II, résument les résultats obtenus.

A - Percolat T4

L'extrait organique T4 a été testé pour son potentiel mutagène à 3 concentrations qui correspondent à un volume équivalent à 1,25 ; 2,5 et 6,2 ml de lixiviat par boîte.

Les 4 souches bactériennes répondent différemment (figure 10) ; aucune induction d'augmentation de révertants his^+ n'a été enregistrée sur TA 100 et TA 102 en présence ou en absence de S_9 mix. Une réponse positive a par contre été observée en présence de S_9 sur TA 98 à la concentration équivalente à 1,25 ml de lixiviat par boîte, avec un facteur d'induction égal à 2. Une légère induction du nombre de révertants d'un facteur 1,6 en présence d'une activation métabolique, a été observée également sur TA 97a, pour la même concentration.

Le facteur d'induction diminue respectivement à une valeur de 1,48 et de 1,4 pour TA 98 et TA 97a lorsque les souches sont traitées par une concentration plus élevée de 2,5 ml ; ceci peut être expliqué par l'inhibition de la croissance bactérienne par suite d'un effet toxique qui masquerait l'expression de la mutagénicité.

Pour la concentration d'extrait organique, équivalente à 6,2 ml de lixiviat par boîte, une toxicité de 100 % a été observée sur toutes les souches utilisées. La souche TA 102 se montre plus sensible vis-à-vis de cet échantillon puisqu'une toxicité de l'ordre de 60 % est observée quand T4 est testé à 2,5 ml par boîte en présence de S_9 mix.

Ainsi, la mutagénicité de l'extrait organique du lixiviat T4 qui s'exprime uniquement après activation métabolique, témoigne des propriétés promutagènes de cette fraction complexe induisant des mutations par insertion ou délétion de paires de bases.

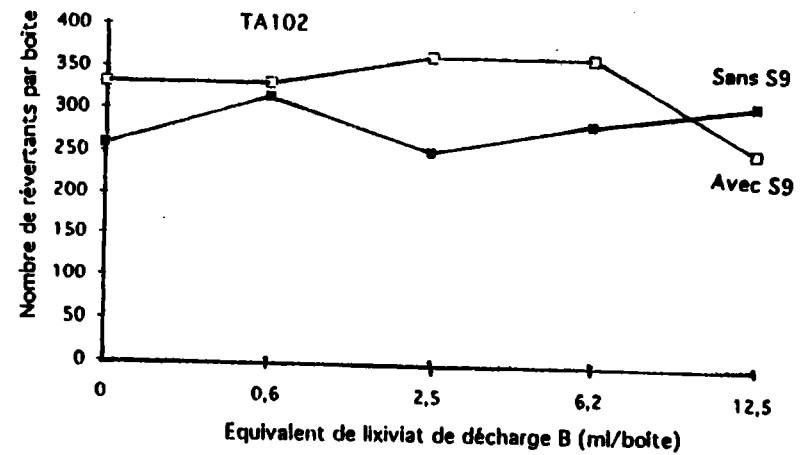
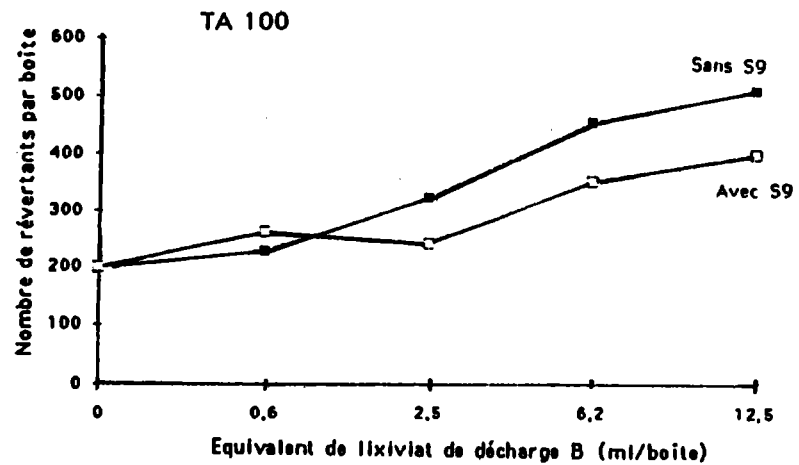
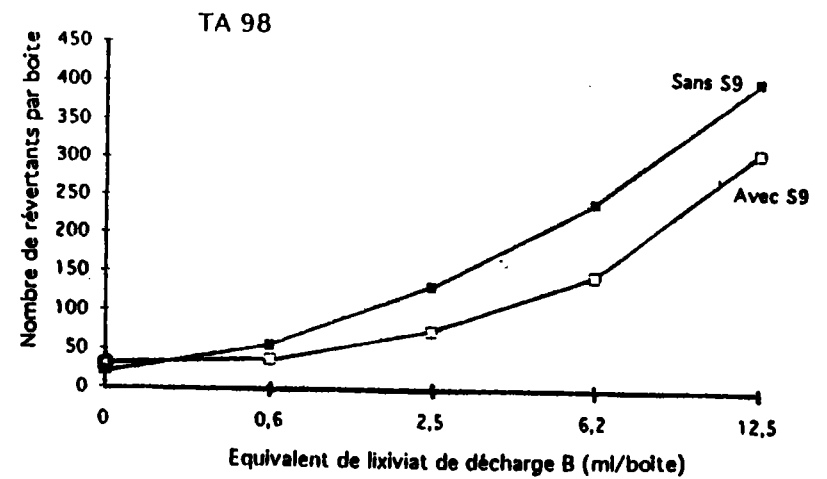
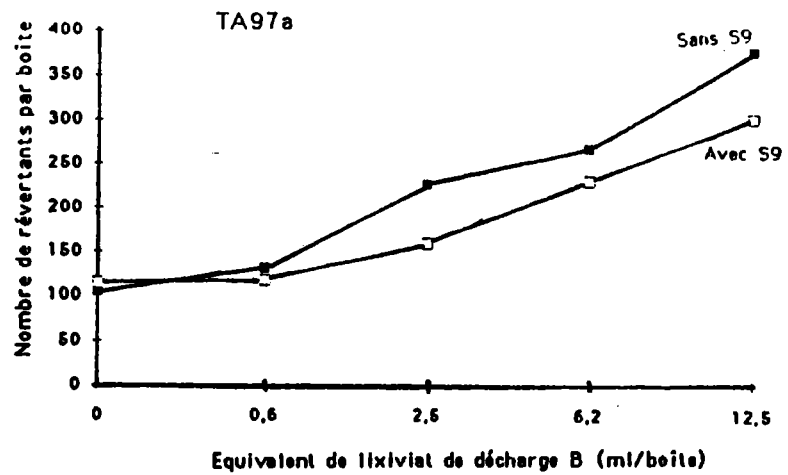


Figure 11 : Induction de mutations par l'extrait organique du lixiviat B sur TA 97a, TA 98, TA 100 et TA 102.

L'analyse chimique réalisée sur le lixiviat T4 dans le but d'établir une relation possible entre la composition chimique et l'activité mutagène de l'échantillon, est présentée dans le tableau 3a, annexe II.

Cette analyse a révélé la présence d'hydrocarbures (12 µg/ml) et de phénols (4 µg/ml) qui se retrouveraient respectivement à des teneurs de 15,25 µg/boîte et 5 µg/boîte quand l'équivalent de 1,25 ml de percolat est incorporé par boîte.

La réponse positive enregistrée pour l'extrait organique de ce lixiviat serait due, théoriquement, aux teneurs de l'échantillon en hydrocarbures et phénols ; une identification des hydrocarbures et des phénols présents, nous aurait permis de discuter d'une façon plus précise la nature des produits responsables de la réponse positive et d'établir une corrélation entre la composition chimique et l'impact biologique.

B - Lixiviat B

L'extrait organique du lixiviat B a été testé à une gamme de concentrations correspondant à des volumes équivalents à 0,6 ; 2,5 ; 6,2 et 12,5 ml de lixiviat par boîte.

L'extrait organique induit une réponse positive très nette avec TA 97a, TA 98 et TA 100 avec et sans activation métabolique. Une relation dose-effet a été obtenue pour les 3 souches ; par exemple, le facteur d'induction pour TA 98 est de 2,67 et de 19 lorsque l'extrait est incorporé respectivement à des volumes correspondant à 0,6 et 12,5 ml de lixiviat par boîte (figure 11).

Si on compare la sensibilité des différentes souches vis-à-vis du pouvoir mutagène de cet échantillon, on peut conclure que la souche TA 98 est la plus sensible, avec un facteur d'induction de 19 pour la concentration maximale testée, suivie par la souche TA 97a avec un facteur d'induction de 3,63 et la souche TA 100 dont le facteur d'induction est de 2,58 pour la même concentration.

Une légère toxicité a été observée sur la souche TA 102 à la concentration maximale testée en présence de S₉.

Après activation métabolique, on observe généralement une diminution de l'activité mutagène ; ainsi, le facteur d'induction passe de 19 sans activation métabolique à 10 avec activation métabolique pour TA 98 et 12,5 ml équivalent de lixiviat par boîte.

Ces résultats témoignent de la présence de mutagènes directs, ne nécessitant pas d'activation métabolique pour s'exprimer.

Si l'on exclut l'hypothèse d'une adsorption de mutagènes indirects par le S_9 , l'activité des mutagènes directs dans cet échantillon serait plus élevée que celle des mutagènes indirects, si l'on en juge par la diminution du facteur d'induction, en présence d'activation métabolique.

La diminution de l'activité mutagène en présence de S_9 mix, pourrait s'expliquer par la génotoxicité plus faible des mutagènes indirects par rapport aux mutagènes directs.

La réponse positive, après activation métabolique, peut être liée aux métabolites formés, mais aussi aux mutagènes directs non métabolisés.

L'analyse effectuée sur le lixiviat B, n'apporte aucune information quant à la nature éventuelle du ou des produits responsables de cette réponse positive (tableau 4a, annexe II).

Ce cas souligne la difficulté rencontrée souvent par de nombreux auteurs pour établir une corrélation entre l'analyse chimique réalisée conformément à la réglementation et la réponse biologique de milieux environnementaux complexes.

PARTIE II : Etude de l'inhibition de la coopération métabolique entre des cellules fibroblastiques de la lignée V79 par le chlordan, le chlorothalonil et des extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B.

L'absence de génotoxicité du chlordan et du chlorothalonil, et leur caractère tumorigène *in vivo*, militeraient en faveur d'une activité cancérogène par des mécanismes épigénétiques. C'est cette hypothèse que nous testerons dans la suite.

Nous avons donc étudié, dans cette deuxième partie, l'effet du chlordan et du chlorothalonil sur l'inhibition de la coopération métabolique entre des cellules fibroblastiques (V79) résistantes et sensibles à la 6-thioguanine, selon le protocole de Trosko *et al.*, (1982).

Nous avons testé, également, l'inhibition de la communication intercellulaire par les extraits organiques des échantillons T4 et B, sachant qu'ils se sont révélés mutagènes dans le test d'Ames.

Tableau 5 : Résultats des essais d'INHIBITION DE LA COOPERATION METABOLIQUE sur les cellules V79 cultivées en présence de CHLORDANE.

CHLORDANE µg/ml	0	10	12	15	18	20*	25*	TPA 0.001
nbre col/10 bte série A série B	1027 264	986 691	864 952	894 1032	899 1128	663 1181	258 804	982 1190
T (%)	25,7							
R (%)		70	110	115	125	178	312	121
$\frac{R}{T}$	1	2,72	4,28	4,47	4,86	6,93	12,14	4,71
Réponse	-	+	+++	+++	+++	++++	++++	+++
Toxicité %	0	4	16	13	12,5	35	75	4

T % = Taux de récupération des cellules résistantes chez le Témoin.

R % = Taux de récupération des cellules résistantes chez les traitées

* Toxicité supérieure à 30 %

Tableau 6 : Résultats des essais d'INHIBITION DE LA COOPERATION METABOLIQUE sur les cellules V79 cultivées en présence de CHLOROTHALONIL.

ESSAI 2

CHLOROTHALONIL µg/ml	0	0,05	0,08	0,1	0,15	0,2	0,5	TPA 0,001
nbre col/10 btes série A série B	843 288	727 272	1076 270	680 247	722 242	810 347	763 371	749 897
T (%)	34,2							
R (%)		37,4	25,1	36,3	33,5	42,8	48,6	119,8
$\frac{R}{T}$		1,1	0,7	1,1	1	1,3	1,4	2,67
Réponse	-	-	-	-	-	-	-	+

I - Inhibition de la coopération métabolique par le chlordan

La gamme de concentration choisie, à l'issue d'essais de toxicité, est la suivante :

0, 10, 12, 15, 18, 20 et 25 $\mu\text{g/ml}$ de milieu de culture. Le chlordan est introduit par l'intermédiaire du DMSO, utilisé à la concentration de 0,2 %.

L'effet du chlordan sur l'inhibition de la coopération métabolique entre des cellules V79 résistantes et sensibles à la 6-thioguanine, est présenté dans le tableau 5.

A la plus faible concentration testée (10 $\mu\text{g/ml}$), le chlordan inhibe la coopération métabolique entre les cellules résistantes et les cellules sensibles, ce qui permet aux cellules résistantes d'échapper à la toxicité de la 6-TG métabolisée par les V79 sensibles. Le nombre de colonies formées à partir de ces cellules résistantes est 2,7 fois plus élevé que dans le milieu témoin.

Ce nombre augmente au fur et à mesure que les concentrations en chlordan s'accroissent.

A la concentration de 18 $\mu\text{g/ml}$ en chlordan, la récupération des cellules résistantes est presque totale : le rapport (R/T) de 4,86 est équivalent à celui observé lorsque la coopération métabolique entre ces cellules est inhibée par le TPA à 0,001 $\mu\text{g/ml}$.

La toxicité enregistrée augmente avec la concentration en chlordan testée, elle atteint respectivement 35 % et 75 % pour les concentrations 20 et 25 $\mu\text{g/ml}$.

Ces résultats suggèrent que le chlordan non mutagène, exercerait ses effets cancérigènes *in vivo*, entre autre par l'inhibition de la communication intercellulaire. Il se révèle, en cela, comparable à d'autres pesticides organochlorés (heptachlor, DDT, dieldrin), qui se sont montrés inhibiteurs de la communication intercellulaire (Williams, 1981 ; Telang *et al.*, 1982 ; Tsushimoto *et al.*, 1983). Les effets d'inhibition des GJIC exercés par des organochlorés sur la membrane plasmique, semblent être une caractéristique de cette classe de produits.

Nos résultats sont en accord avec ceux de Kurata *et al.* (1982) sur la lignée V79 et ceux de Telang *et al.* (1982) sur des cellules épithéliales de foie de rat (ARL) qui avaient mis en évidence une inhibition des communications intercellulaires par des concentrations en chlordan comprises entre 0,4 à 20 $\mu\text{g/ml}$.

Tableau 7 : Résultats d'essais d'INHIBITION DE LA COOPERATION METABOLIQUE
sur les cellules V79 cultivées en présence de différents volumes de
l'EXTRAIT ORGANIQUE CONCENTRE DU PERCOLAT DE DECHARGE T4.

ESSAI 2

Volume équivalent de percolat T4 µl/ml	0	3.2	16.2	32	81	TPA 0.001
nbre col/10 btes série A série B	668 261	640 305	643 263	688 282	678 315	749 897
T (%)	39.1					
R (%)		47.7	40.9	41	46.5	119.8
$\frac{R}{T}$		1.2	1	1	1.2	3.06
Réponse	-	-	-	-	-	+

Tableau 8 : Résultats d'essais d'INHIBITION DE LA COOPERATION METABOLIQUE sur les
cellules V79 cultivées en présence de différents volumes de l'EXTRAIT ORGANIQUE
CONCENTRE DU LIXIVIAT DE DECHET B.

Volume équivalent de lixiviat B µl/ml	0	0.16	1.6	3.2	16.2	162	TPA
nbre col./10 btes série A série B	789 126	731 91	782 131	670 118	713 102	779 159	737 656
T %	16						
R %		12	17	18	14	20	89
R/T		0.75	1.06	1.13	0.88	1.25	5.56
Réponse		-	-	-	-	-	+++++

II - Inhibition de la coopération métabolique par le chlorothalonil

Une première gamme de concentrations a été testée : 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,15 et 0,2 µg/ml.

Les résultats obtenus montrent qu'aucune des concentrations testées ne s'est révélée positive, le taux de récupération des cellules résistantes reste identique à celui du témoin, ce qui indique que le chlorothalonil n'affecte pas la formation et le fonctionnement des Gap junctions entre les cellules V79 sensibles et résistantes à la 6-thioguanine.

Un deuxième essai a été effectué avec une gamme de concentrations un peu plus large : 0,05 ; 0,08 ; 0,1 ; 0,15 ; 0,2 et 0,5 µg/ml de chlorothalonil.

Les résultats obtenus (Tableau 6) confirment les précédents concernant l'absence d'inhibition de la coopération métabolique par le chlorothalonil.

On peut conclure alors que le chlorothalonil n'altère pas la communication intercellulaire, du moins sur les cellules fibroblastiques de la lignée V79 et dans nos conditions expérimentales.

III - Inhibition de la coopération métabolique sur les cellules V79, par les extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B

La gamme de concentrations testée, pour les 2 extraits, correspond à des volumes équivalents à 0,16 ; 1,6 ; 3,2 ; 16,2 et 162 µl de lixiviat par ml de milieu.

L'extrait T4 n'entraîne pas d'inhibition de la coopération métabolique sur les cellules V79. Le nombre de colonies formées, en présence de l'échantillon aux concentrations non toxiques, est comparable à celui des témoins.

Une toxicité totale a été enregistrée pour la concentration maximale testée, correspondant à 162 µl de lixiviat par ml.

Un deuxième essai a été effectué avec la gamme de concentrations correspondant aux volumes équivalents à 0 ; 3,2 ; 16,2 ; 32 et 81 µl de lixiviat par ml. Aucune toxicité n'a été enregistrée à ces concentrations. Les résultats confirment que les micropolluants présents dans l'extrait T4 n'inhibent pas la communication intercellulaire sur les cellules V79 (tableau 7).

L'extrait du lixiviat B n'inhibe pas la communication intercellulaire des cellules fibroblastiques de la lignée V79 aux concentrations testées, ces dernières sont exemptes de toxicité (tableau 8).

L'extrait organique T4 s'avère plus toxique que l'extrait B vis-à-vis des cellules V79, cette différence de toxicité avait été déjà constatée sur les souches bactériennes de *Salmonella typhimurium*, utilisées pour le test d'Ames.

Partie III : Etude des effets du chlordane, du chlorothalonil et d'extraits organiques du percolat T4 et du lixiviat B, sur la transformation des cellules d'embryons d'hamster syrien (SHE).

La transformation morphologique est un critère de cancérogénèse *in vitro*, intégrant l'ensemble des altérations génétiques et épigénétiques au niveau cellulaire, susceptibles de conduire *in vivo* à un cancer. Elle peut être observée :

- 1) après une seule application d'une substance cancérogène,
- 2) après plusieurs applications répétées dans le cas d'une substance à profil d'activité de promoteur,
- 3) ou lors de l'application séquentielle d'un initiateur (substance génotoxique) et d'un promoteur appliqué par la suite, une ou plusieurs fois selon le schéma classique Initiation-Promotion.

Dans ces essais réalisés sur les cellules SHE, plusieurs protocoles calquant ces différents schémas d'application, ont été mis en oeuvre afin de discerner le profil d'activité dominant de l'échantillon et voir s'il pouvait assurer la transformation à lui seul ou lors de l'activité conjointe d'un initiateur (B(a)P) ou d'un promoteur (TPA).

Chacun des échantillons testés a donc été étudié selon différentes modalités de traitement par :

- l'échantillon seul appliqué une et plusieurs fois,
- B(a)P (0,1 µg/ml) pendant 24 heures, suivi de l'échantillon,
- l'échantillon (pendant 24 heures) suivi du TPA (2 applications de 0,1 µg/ml).

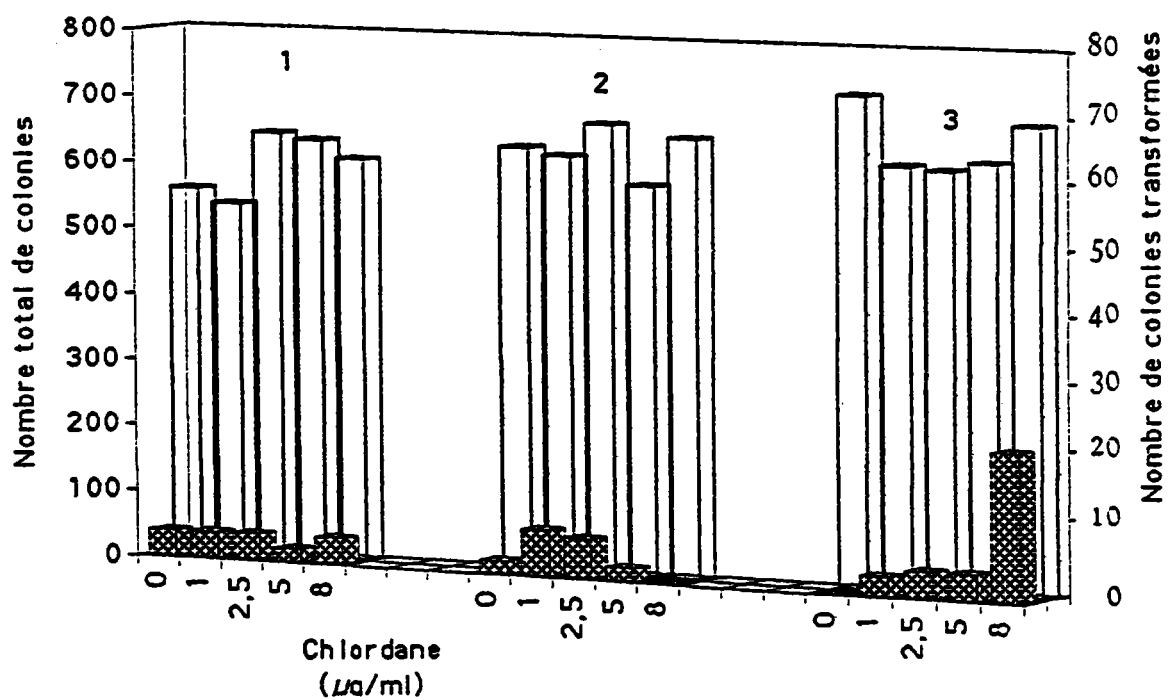


Figure 12 : Transformation morphologique des SHE après une, deux ou trois applications de chlordane.

I - Chlordane.

A - Traitement par le chlordane seul

Deux séries de concentrations de chlordane (0 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 8 $\mu\text{g/ml}$ et 0 ; 5 ; 8 ; 20 ; 40 $\mu\text{g/ml}$) ont été testées au cours de deux expériences indépendantes ; trois modalités de traitement : une application, deux applications et 3 applications, correspondant à 1, 2 ou 3 ajouts de chlordane ont été étudiées.

Les résultats présentés dans le tableau 9 , montrent que la fréquence de transformation morphologique des cellules SHE n'est pas augmentée après 1 ou 2 applications de chlordane.

Une augmentation du pourcentage de transformation est observée après 3 applications de chlordane à la concentration de 8 $\mu\text{g/ml}$. Le pourcentage de transformation passe, en effet, de 0 à 3,2 % lors de la première expérience (figure 12) et de 0,4 à 1,2 % à la seconde.

Une toxicité du chlordane, après 1 application, est notée dès la concentration de 20 $\mu\text{g/ml}$, l'efficacité de clonage n'est alors que de 14 % alors qu'elle atteint 19 % chez les témoins.

Après 2 applications, une toxicité est enregistrée à la même concentration mais elle est plus élevée : l'efficacité de clonage passe de 23 % chez les témoins à 8 %.

La toxicité n'apparaît à la concentration de 8 $\mu\text{g/ml}$ qu'après 3 applications.

B - Traitement séquentiel par le chlordane et le TPA

L'effet transformant du chlordane appliqué pendant 24 heures avant le traitement par le TPA, a été étudié au cours de 3 expériences conduites séparément. Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

Au cours de la première expérience, on observe une augmentation du pourcentage de colonies transformées pour la concentration en chlordane de 8 $\mu\text{g/ml}$, appliqué avant les deux traitements au TPA à 0,1 $\mu\text{g/ml}$. Le taux de transformation induit par le TPA seul est de 4,7 %, il passe à 11 % en présence du chlordane (figure 13).

Ces effets de synergie entre le chlordane et le TPA sont retrouvés lors de la deuxième et la troisième expérience, pour des concentrations en chlordane de 20 et 16 $\mu\text{g/ml}$ respectivement.

Le taux de transformation du TPA augmente de 8,8 % à 19,8 % en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ de chlordane au 2ème essai ; il augmente de 8 à 13 % avec 16 $\mu\text{g/ml}$ de chlordane au 3ème essai.

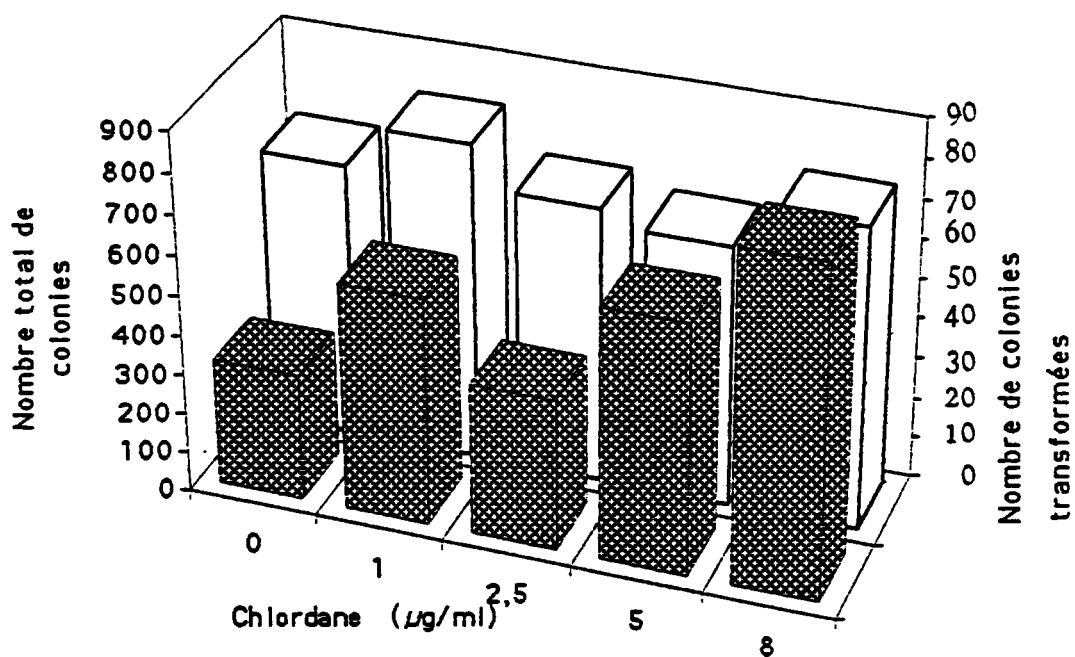


Figure 13 : Transformation morphologique des SHE après le traitement séquentiel par le chlordane et le TPA.

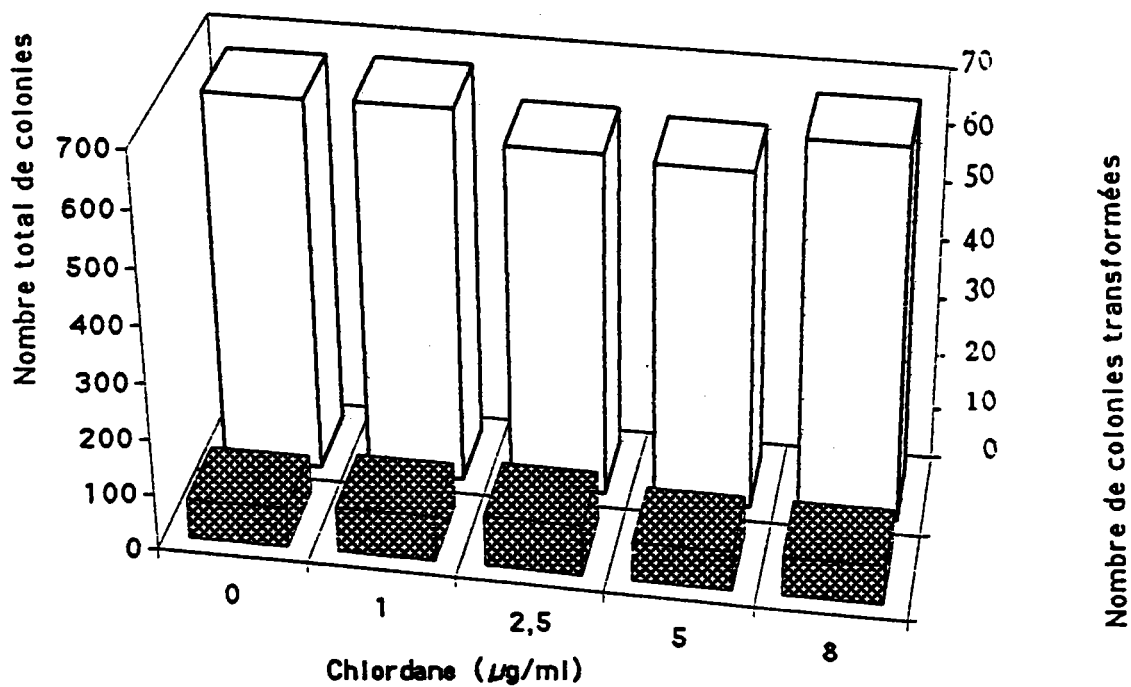


Figure 14 : Transformation morphologique des SHE après le traitement séquentiel par le B(a)P et le chlordane.

Si l'on considère les taux de transformation obtenus avec le chlordane et le TPA, appliqués séparément, on peut conclure que ces résultats ne résultent pas d'une simple additivité de leurs effets respectifs mais d'une interaction entre les effets du TPA et du chlordane.

Nous avons effectués des essais supplémentaires en appliquant le chlordane (1) simultanément au TPA ou (2) à la suite d'un traitement au TPA, afin de voir si l'ordre de la séquence de traitement influençait les résultats.

L'application simultanée du chlordane et du TPA, deux et trois fois, entraîne comme précédemment une augmentation du taux de transformation qui s'élève de 4,3 % pour deux applications en présence du TPA seul, à 11,5 % en présence de chlordane à 16 µg/ml. Pour 3 applications de TPA, le taux de transformation passe de 16 % à 36 % en présence du pesticide (tableau 5, annexe II).

Par contre, l'effet de synergie est quasiment inexistant lorsque le chlordane est appliqué 2 fois *après* un traitement par le TPA.

L'effet de potentialisation des effets transformants du TPA par le chlordane semble donc s'opérer uniquement lorsque les 2 produits sont appliqués en simultané, ou lorsque le traitement au chlordane précède un traitement répété au TPA.

Si on se réfère au modèle (Initiation-Promotion), utilisé in vivo pour l'étude de la cancérogénèse en deux étapes, l'augmentation de la transformation des cellules SHE, provoquée par un traitement séquentiel par le chlordane et le TPA, peut conduire à assimiler le chlordane à un initiateur.

Ce résultat remet en cause le caractère "non génotoxique" du chlordane, mais il peut aussi traduire l'existence d'une synergie TPA-Chlordane ne faisant appel qu'à des mécanismes épigénétiques ; ce qu'il nous faudra éclaircir par la suite.

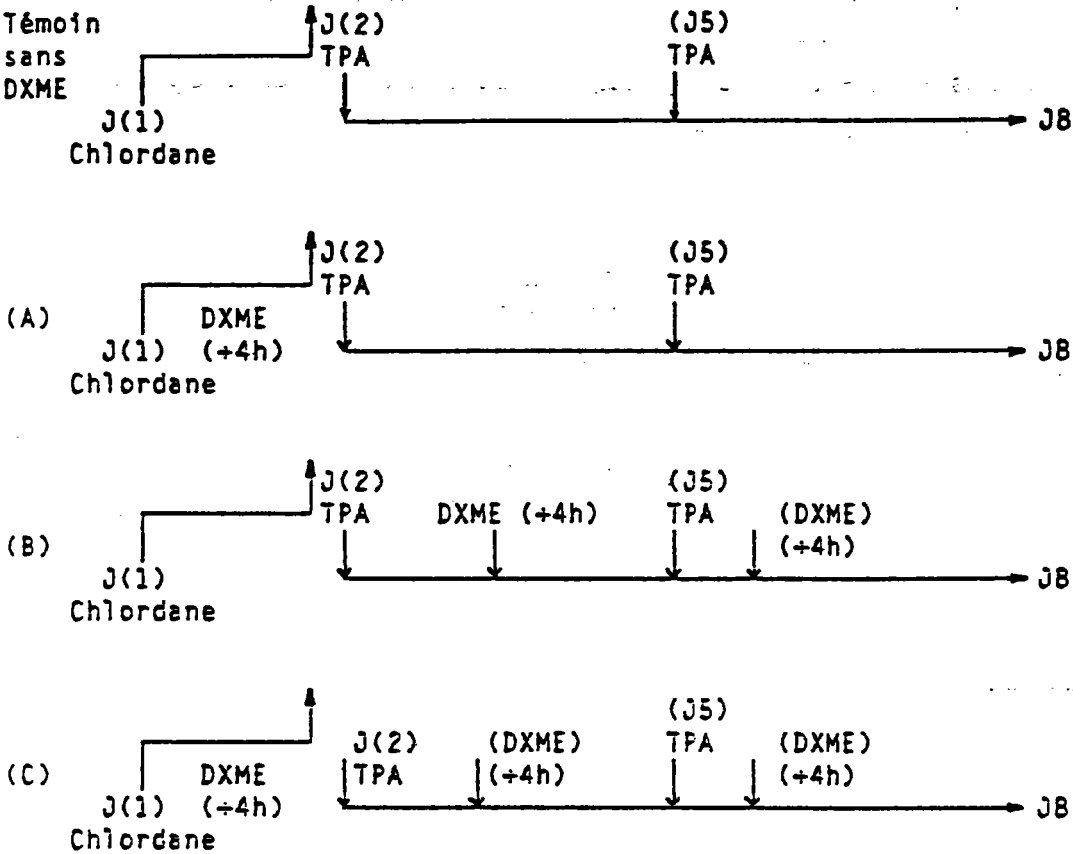
C - Traitement séquentiel par le B(a)P et le chlordane

Les effets du chlordane sur la transformation des cellules SHE prétraitées par le B(a)P à 0,1 µg/ml pendant 24 heures, ont été étudiés aux concentrations de : 0 ; 1 ; 2,5 ; 5 et 8 µg/ml et 0 ; 5 ; 8 ; 20 et 40 µg/ml, au cours de deux séries d'essais (tableau 10).

Les résultats obtenus, montrent que les fréquences de transformation, 1,1 % et 2,3 %, induites respectivement par le B(a)P seul au cours de la première et la seconde expérience, ne sont pas augmentées suite au traitement par le chlordane (figure 14).

Le chlordane n'agit donc pas comme un promoteur de type TPA, dans le schéma expérimental de la cancérogénèse en deux étapes, appliqué à la transformation morphologique des cellules SHE.

Figure 15 : Effet de la DEXAMETHASONE sur l'action combinée du CHLORDANE ET DU TPA sur la transformation des SHE. (3 protocoles).



J(1) DXME 11 µg/ml

J8

Protocole	Concentration µg/ml		Efficacité de clonage %	Nbre de col. trans.	Taux de transf. %
	Chlordane	TPA		Nbre de col.totales	
A	0	0.1	37	3/1099	0.3
	8	0.1	29	6/870	0.7
	16	0.1	31	20/943	2.1
B	0	0.1	38	11/1130	1
	8	0.1	34	13/1020	1.3
	16	0.1	34	19/1012	1.9
C	0	0.1	34	10/1020	1
	8	0.1	38	1/1128	0.1
	16	0.1	24	17/706	2.4
DXME 11 µg/ml	0	0	35	0/951	0
Témoïn sans DXME	0	0.1	25	55/735	7.5
	8	0.1	23	52/677	7.7
	16	0.1	20	77/590	13.1

D - Action de la dexaméthasone sur les effets combinés du chlordané et du TPA

La dexaméthasone (DXME), donnée comme un inhibiteur des effets épigénétiques du TPA et d'autres promoteurs, a été utilisée à la concentration de 11 µg/ml, afin d'évaluer la part des mécanismes épigénétiques dans la transformation morphologique observée sur des cellules SHE traitées successivement par le chlordané et le TPA.

Les résultats obtenus montrent que le traitement à la dexaméthasone entraîne une inhibition complète des effets de synergie chlordané-TPA, qui peut s'expliquer par l'inhibition des effets transformant du TPA seul par DXME.

Les pourcentages de transformation pour 16 µg/ml de chlordané s'abaissent de 13 % sans DXME à 2,2 %, 1,9 % et 2,4 % en présence du corticoïde appliqué selon les protocoles A, B et C respectivement.

Que la DXME soit appliquée :

- à J₁ quatre heures après le chlordané (protocole A),
- à J₂ et J₅ quatre heures après les deux traitements au TPA (protocole B)
- ou à J₁, J₂ et J₅ quatre heures après tous les traitements (protocole C).

elle entraîne l'inhibition de la transformation observée lors d'un traitement séquentiel par le chlordané et le TPA.

Les pourcentages de transformation correspondant aux 3 modalités d'application de la DXME sont respectivement 2,2 %, 1,9 % et 2,4 % comparés à 13 % lorsque le test se déroule sans application de la DXME en présence de 16 µg/ml de chlordané. (figure 15)

II. Chlorothalonil

A - Traitement par le chlorothalonil seul

Le chlorothalonil a été testé dans un premier temps aux concentrations de 0 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,4, 0,5 ; 0,6 µg/ml. Ces concentrations se sont révélées trop toxiques comme en témoignent l'efficacité de clonage qui passe de 24 % chez les témoins à 5 % à la concentration de 0,5 µg/ml en chlorothalonil (tableau 11).

Une gamme de concentrations plus faibles a été utilisée dans une deuxième étape : 0 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,2 ; 0,3 ; 0,5 µg/ml.

Les résultats présentés dans le tableau 11, montrent que le chlorothalonil appliqué 1, 2 ou 3 fois, n'induit aucune augmentation significative de la transformation morphologique des cellules SHE (figure 16).

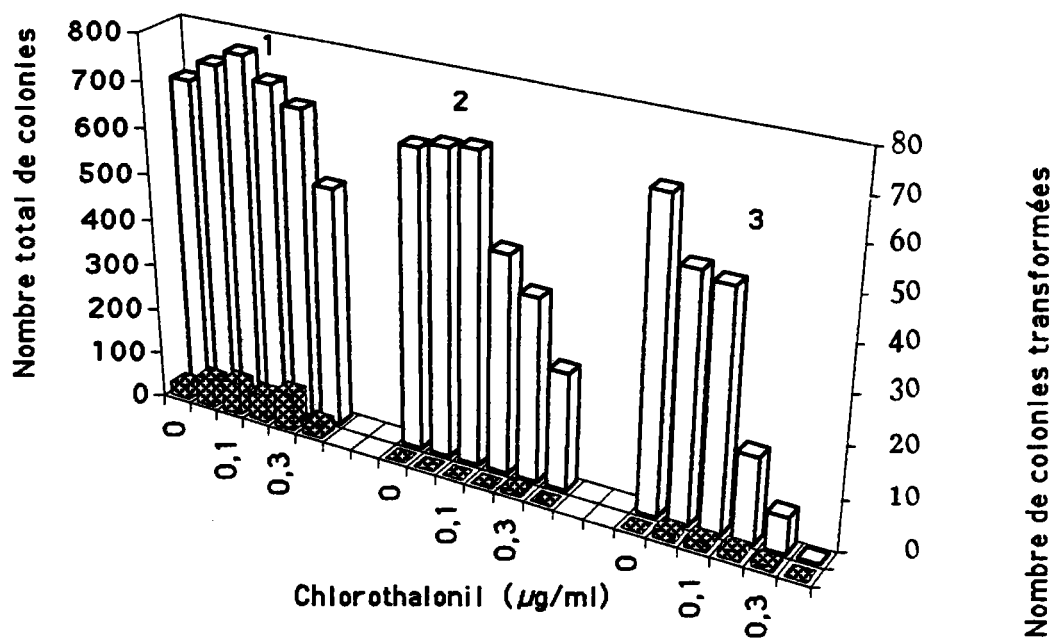


Figure 16 : Transformation morphologique des SHE après une, deux ou trois applications de chlorothalonil.

Le chlorothalonil s'avère toxique à partir de 0,2 µg/ml après 2 et 3 applications, l'efficacité de clonage diminue respectivement de 22 % à 13 % et de 22 % à 6%.

Après 3 applications, les faibles augmentations des pourcentage de transformation de 1 % et 1,3 % enregistrées respectivement à 0,2 et 0,3 µg/ml, peuvent difficilement être prises en considération du fait de la toxicité élevée de ces concentrations.

Ces essais permettent de conclure que le chlorothalonil à des concentrations non toxiques n'induit pas la transformation morphologique des cellules SHE, lorsqu'il est appliqué seul.

B - Traitement séquentiel par le chlorothalonil et le TPA

Lorsque le chlorothalonil est appliqué pendant les 24 heures qui précèdent la phase de traitement par le TPA selon le schéma expérimental initiation-promotion, aucune augmentation significative n'a été observée aux concentrations testées (tableau 6, annexe II).

Aucune toxicité du chlorothalonil n'a été enregistrée dans ces conditions.

C - Traitement séquentiel par le B(a)P et le chlorothalonil

Le B(a)P a été utilisé en tant qu'initiateur aux concentrations 0,1 et 0,2 µg/ml.

Le chlorothalonil a été testé comme promoteur aux concentrations de 0, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 et 0,6 µg/ml avec 1 ou 2 traitements.

Lorsque le B(a)P est utilisé à 0,1 µg/ml et suivi d'une application de chlorothalonil à 0,5 µg/ml, le pourcentage de transformation est de 2,6 % au lieu de 1,6 % chez les témoins B(a)P ; une faible toxicité est observée à cette concentration.

Après deux applications de chlorothalonil à 0,5 µg/ml, on observe une augmentation significative du taux de transformation qui s'élève de 3 % chez les témoins B(a)P 0,1 µg/ml, à 7,7 % en présence du pesticide ; néanmoins, la toxicité observée à cette concentration nous a amené à confirmer ce résultat (expérience 2).

La deuxième expérience, effectuée dans les mêmes conditions, confirme l'augmentation du taux de transformation lors d'un traitement séquentiel par le B(a)P suivi de deux applications au chlorothalonil. Le pourcentage de transformation de 1,9 % lié au B(a)P seul, passe à 4,3 % pour 0,2 µg/ml de chlorothalonil et à 13 % pour 0,6 µg/ml de chlorothalonil (tableau 12).

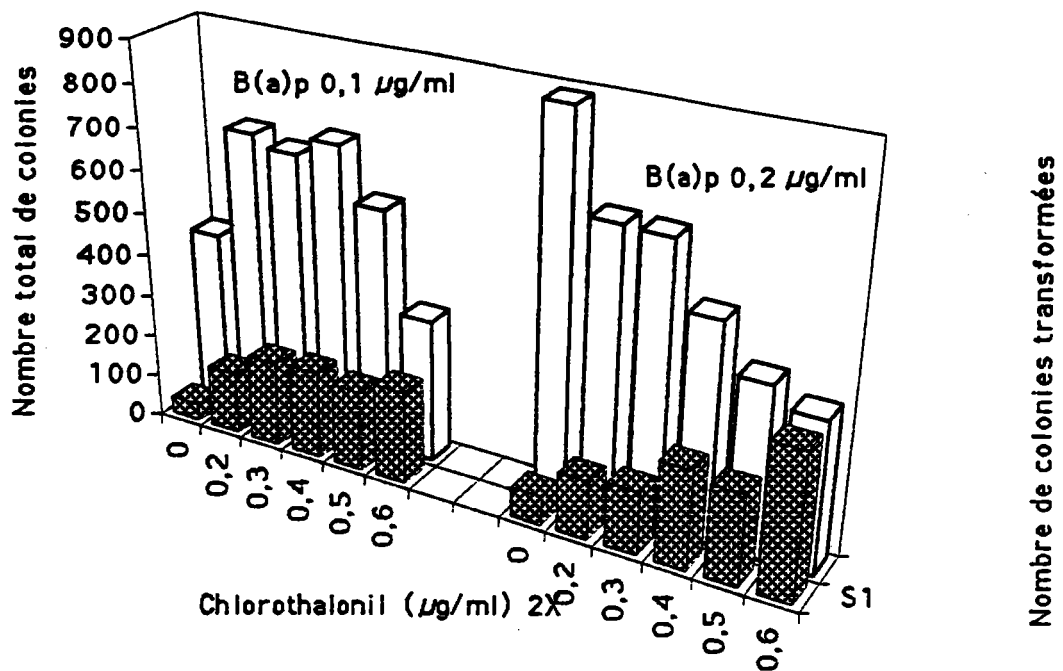


Figure 17 : Transformation morphologique des SHE après le traitement séquentiel par le B(a)P (0,1 ou 0,2 µg/ml) et le chlorothalonil

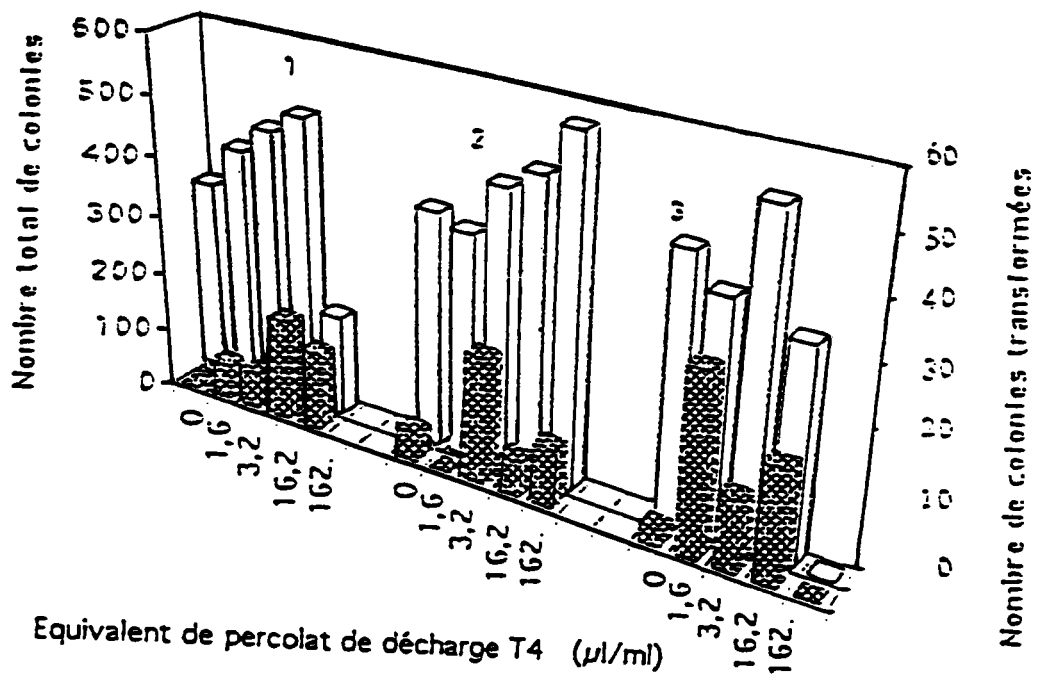


Figure 18 : Transformation morphologique des SHE par une, deux ou trois applications de l'extrait organique du percolat T4.

Lorsque les cellules sont prétraitées au *B(a)P* à 0,2 µg/ml, et qu'un *seul traitement de chlorothalonil* est effectué, une faible augmentation de la fréquence de transformation est notée pour les concentrations de 0,5 et 0,6 µg/ml du pesticide. Le nombre absolu de colonies transformées s'élève de 14 chez les témoins *B(a)P* à 21 pour ces deux concentrations.

Après 2 applications de *chlorothalonil*, l'augmentation du taux de transformation est nettement plus importante : la fréquence passe de 1,6 % chez les témoins *B(a)P* (0,2 µg/ml) à 19,5 % après les deux applications supplémentaires de *chlorothalonil* à 0,6 µg/ml (tableau 19). Mais l'augmentation du taux de transformation est déjà notable à 0,2 µg/ml du fongicide (figure 17).

La concentration de 0,2 µg/ml de *B(a)P*, donne une réponse quantitativement plus importante que celle obtenue avec 0,1 µg/ml.

Cette différence peut être expliquée par un degré d'altération du génome plus important à 0,2 µg/ml.

D'après ces résultats, le chlorothalonil semble agir comme un promoteur classique dans le schéma expérimental initiation-promotion.

L'application répétée du chlorothalonil est nécessaire pour observer une réponse positive après que les cellules aient été prétraitées à 0,1 µg/ml ou à 0,2 µg/ml de benzo(a)pyrène.

III - Transformation morphologique des cellules (SHE) par les extraits organiques de T4 et B

A - Extrait organique du percolat de décharge T4

A.1 - Traitement par l'extrait organique T4 seul

La gamme de concentrations testée correspond à des volumes équivalents à 0 ; 1,6 ; 3,2 ; 16,2 et 162 µl de percolat de décharge par ml de milieu ; l'extrait est en solution dans le DMSO présent à la concentration de 0,2 % dans le milieu.

Les résultats obtenus après une, deux et trois applications de l'extrait organique T4, sont présentés par la figure 18. (tableau 7a, annexe II).

Un seul traitement par cet échantillon appliqué même à faible concentration suffit à induire la transformation des cellules SHE ; par exemple, la concentration équivalente à un volume de 16,2 µl de percolat par ml, entraîne une augmentation de la fréquence de transformation de 3,5 %.

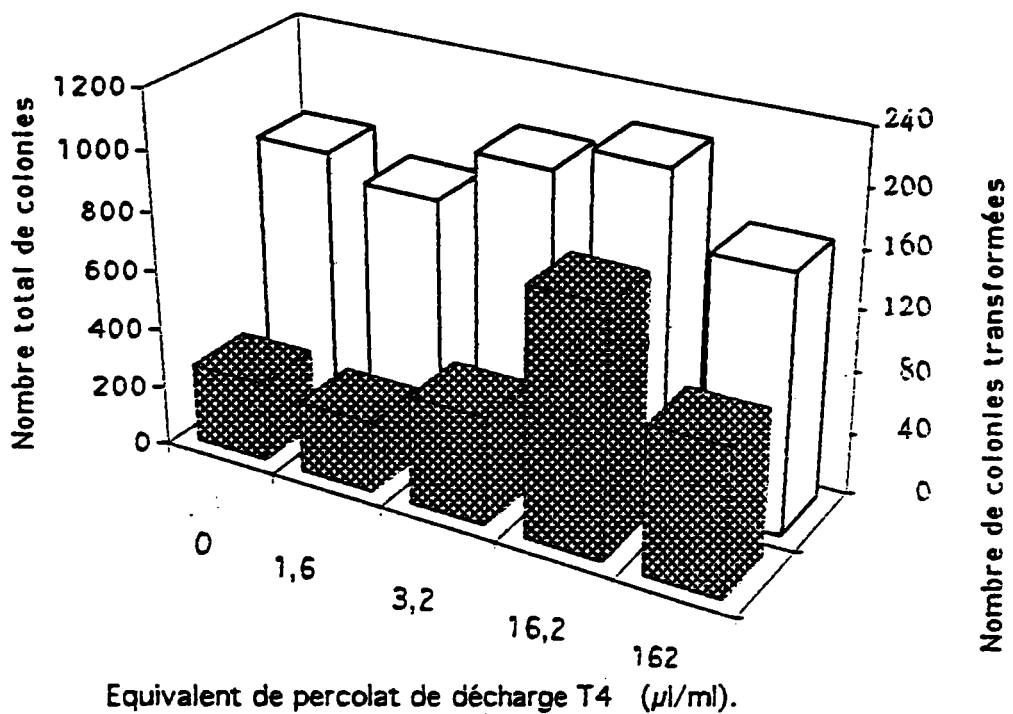


Figure 19 : Transformation morphologique des SHE après le traitement séquentiel par l'échantillon T4 et le TPA.

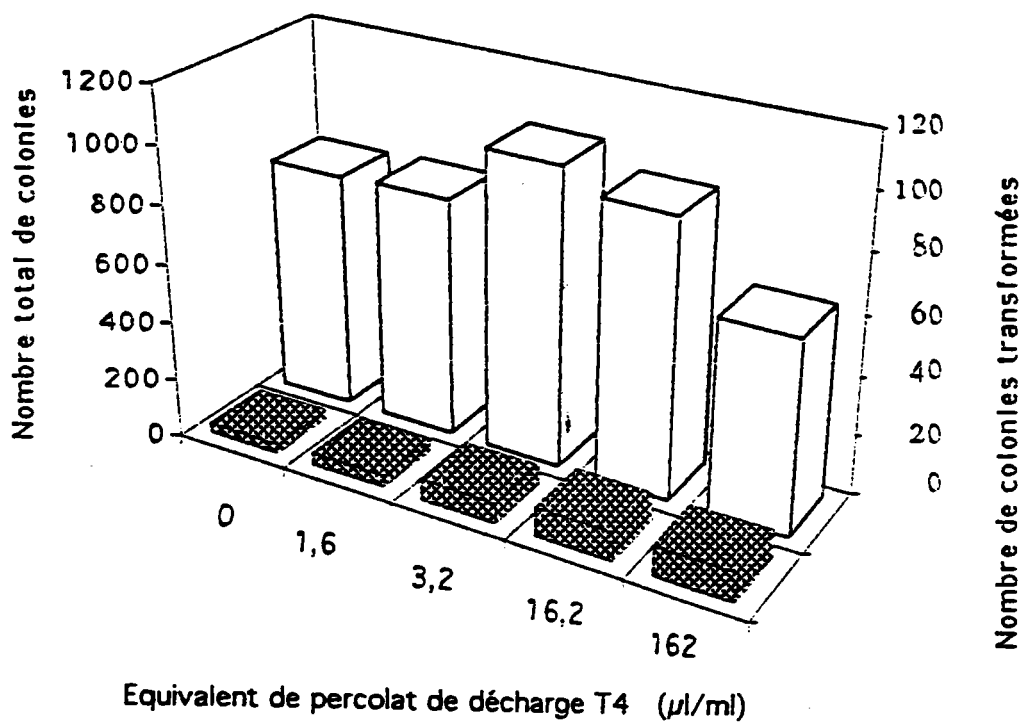


Figure 20 : Transformation morphologique des SHE après le traitement séquentiel par le B(a)P et l'échantillon T4.

Le taux de transformation est augmenté également après 2 et 3 applications dès la concentration équivalente à 1,6 µl de percolat par ml, il est respectivement de 4,6 % et de 7,7 %. Mais aucune relation dose-effet n'est notée lorsque les concentrations augmentent.

Une toxicité est observée pour une concentration d'extrait équivalent à 162 µl de percolat par ml, après 1 ou 2 applications ; elle s'exprime dès 16,2 µl après 3 applications.

A.2 - Traitement séquentiel par l'extrait organique de T4 et le TPA.

La même gamme de concentrations a été utilisée pour étudier les effets transformants lors d'un traitement séquentiel par l'extrait organique du percolat T4 pendant 24 heures, suivi par le TPA.

Les résultats présentés, figure 19, montrent qu'une application de l'extrait organique, précédant deux applications de TPA de 0,1 µg/ml à J2 et J5, augmente la transformation morphologique des cellules SHE dès une concentration équivalent au volume de 3,2 µl de percolat par ml ; un taux de transformation de 15 %, soit 3 fois supérieur à celui induit par le TPA seul (5,9 %), a été observé à la concentration correspondant à un volume de 16,2 µl de percolat par ml de milieu, (tableau 7a bis, annexe II).

L'extrait organique du lixiviat T4 agit donc comme initiateur dans le processus de la transformation cellulaire des SHE.

A.3 - Traitement séquentiel par le B(a)P et l'extrait organique du percolat T4.

Une gamme de concentrations identique à la précédente, a été utilisée pour évaluer les effets transformants du percolat T4 sur des cellules prétraitées 24 heures par 0,1 µg/ml de B(a)P.

Aucune des concentrations testées n'a augmenté nettement la fréquence de transformation des cellules. La plus forte concentration induit un pourcentage de transformation de 1,5 % alors que le taux de transformation induit par le B(a)P seul est de 0,4 % (figure 20).

L'ensemble des essais montre que l'extrait organique T4 se comporte comme initiateur dans le processus d'induction de la transformation cellulaire des SHE in vitro ; il induit également une augmentation du taux de transformation lorsqu'il est appliqué seul sur les cellules SHE. Mais il n'induit pas d'augmentation nette de la transformation sur des cellules prétraitées au B(a)P.

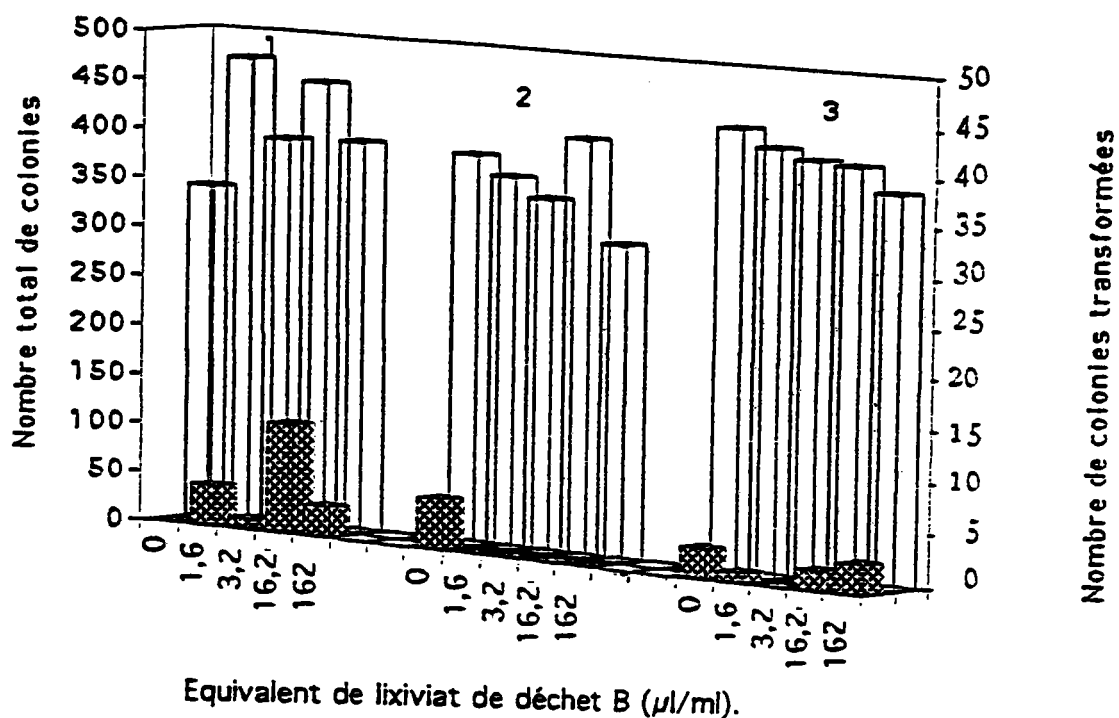


Figure 21 : Transformation morphologique des SHE après une, deux ou trois applications de l'extrait organique du lixiviat B.

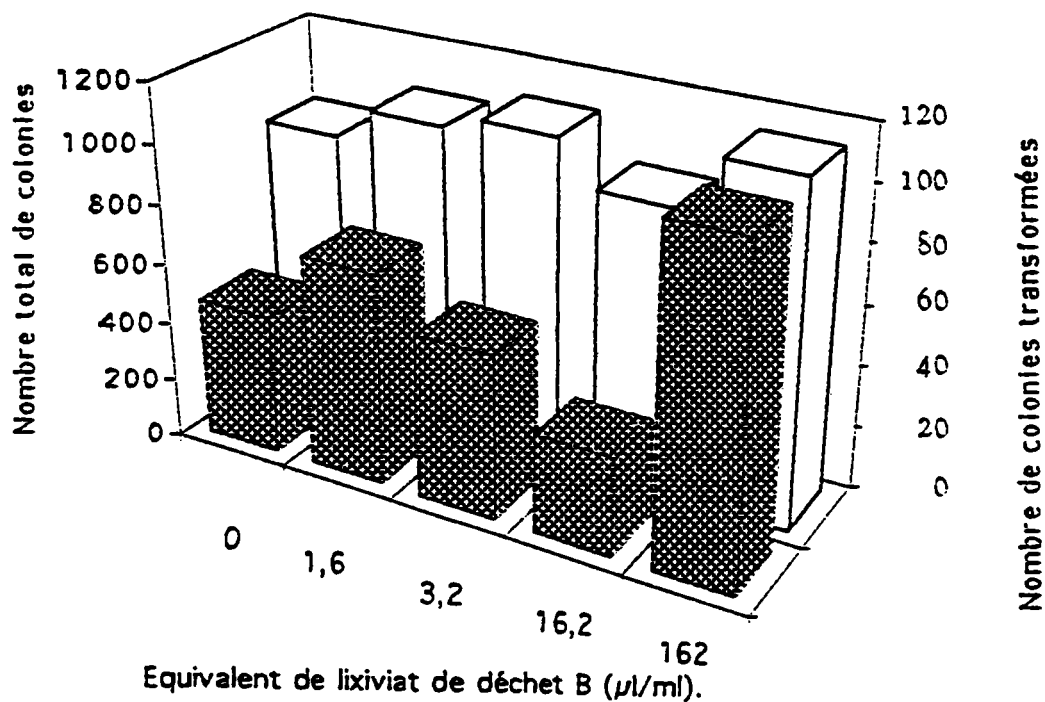


Figure 22 : Transformation morphologique des SHE après le traitement séquentiel par l'échantillon B et le TPA.

B - Extrait organique de lixiviat B

B.1 - Traitement par l'extrait organique du lixiviat B.

Les concentrations testées correspondent à des volumes équivalents à 0 ; 1,6 ; 3,2 ; 16,2 et 162 μ l de lixiviat par ml de milieu.

Après 1 application, seule la concentration correspondant à un volume de 16,2 μ l de lixiviat par ml, augmente la fréquence de transformation ; celle ci est de 2,4 % alors que celle des témoins est nulle (figure 21).

Aucune concentration de l'extrait organique du lixiviat appliquée deux ou trois fois, n'entraîne d'augmentation de la transformation morphologique des cellules SHE.

Aucune toxicité n'a été observée sur les SHE, lors d'un traitement unique ou multiple par cet échantillon (tableau 8, annexe II).

L'extrait organique de ce lixiviat semble n'avoir qu'un faible potentiel à induire la transformation cellulaire sur les cellules SHE ; cet effet s'est manifesté uniquement lors d'un seul traitement par une concentration correspondant au volume de 16,2 μ l de lixiviat par ml.

B.2 - Traitement séquentiel par l'extrait organique du lixiviat B et le TPA

L'effet initiateur des micropolluants de l'échantillon B a été testé sur la même gamme de concentrations que précédemment.

Les résultats obtenus montrent une augmentation nette de la transformation des SHE, après un traitement séquentiel par l'échantillon à une concentration équivalent à 162 μ l de lixiviat par ml pendant 24 heures, suivi par un traitement répété au TPA. La fréquence de transformation est de 9,7 % comparée à 5 % chez les cellules exposées au TPA seul (figure 22).

Les micropolluants de l'extrait organique du lixiviat B agissent en initiateurs pour la transformation morphologique des cellules SHE.

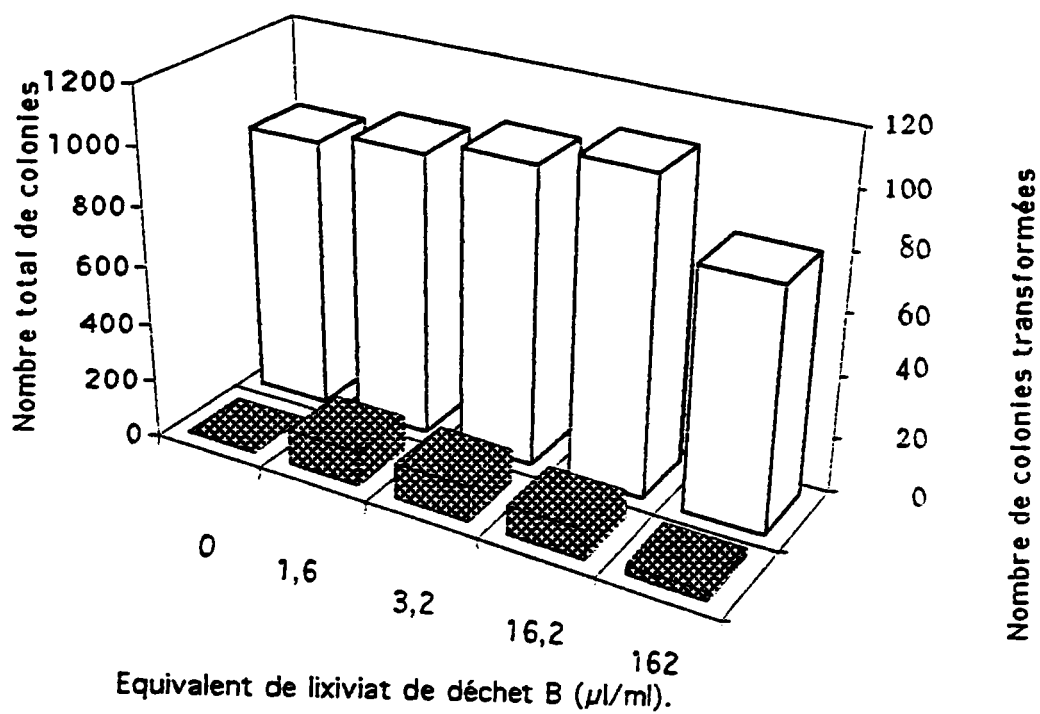


Figure 23 : Transformation morphologique des SHE après le traitement séquentiel par le B(a)P et l'échantillon B.

B.3 - Traitement séquentiel par le B(a)P et l'extrait organique du lixiviat B

La même gamme de concentrations a été testée pour étudier l'effet promoteur de cet échantillon.

Les résultats obtenus montrent une très légère augmentation de l'ordre de 0,4 % à 1,2 % de la transformation morphologique, sur les cellules prétraitées par le B(a)P et exposées ensuite à l'échantillon (figure 23). Les taux d'augmentation observés restent néanmoins comparables à ceux notés avec l'extrait B, appliqué seul, aux mêmes concentrations (tableau 8bis, annexe II).

Comme T4, l'extrait organique du lixiviat B agit comme initiateur de la transformation induite sur les SHE par le TPA, il induit faiblement la transformation lorsqu'il est appliqué seul ou sur des cellules prétraitées par le B(a)P.

Ces résultats confirment le caractère génotoxique des extraits organiques des lixiviats T4 et B, déjà mis en évidence sur les souches de Salmonella typhimurium utilisées dans le test d'Ames.

Tableau 9 : Effets du CHLORDANE sur la transformation des cellules SHE après UNE, DEUX ET TROIS APPLICATIONS.
(2 expériences indépendantes).

Nombre de jour d'application	Chlordane µg/ml	EXPERIENCE 1			EXPERIENCE 2		
		Efficacité de clonage %	Transformation		Efficacité de clonage %	Transformation	
			Colonies Transform./ Colonies totales	Taux de transformation %		Colonies Transform./ Colonies totales	Taux de transformation %
1 application (J 1) Protocole I	0	18	4/554	0.7	19	2/573	0.4
	1	18	4/532	0.8	NT	-	-
	2.5	21	4/642	0.6	NT	-	-
	5	21	2/633	0.3	18	9/541	1.7
	8	20	4/606	0.7	18	3/548	0.6
	16	NT	-	-	NT	-	-
	20	NT	-	-	14	3/424	0.7
	40	NT	-	-	0	0	0
2 applications (J 1, J 5) Protocole I	0	21	2/634	0.3	24	4/710	0.6
	1	22	7/623	1.1	NT	-	-
	2.5	22	6/673	0.9	NT	-	-
	5	19	2/583	0.3	23	0/688	0
	8	22	0/656	0	20	2/586	0.3
	16	NT	-	-	NT	-	-
	20	NT	-	-	8	0/251	0
	40	NT	-	-	0	0	0
3 applications (J 1, J 3, J 5) Protocole I	0	24	0/730	0	18	2/534	0.4
	1	21	3/627	0.5	NT	-	-
	2.5	21	4/622	0.6	NT	-	-
	5	21	4/635	0.6	18	0/547	0
	8	23	22/692	3.2	15	5/436	1.2
	16	NT	-	-	NT	-	-
	20	NT	-	-	0	0	0
	40	NT	-	-	0	0	0
1 application (J 1)	B(a)P*	12	25/363	6.9	13	23/378	6.1

B(a)P* (1 µg/ml) utilisé comme contrôle positif de la transformation.

NT : non testé.

Tableau 10 : Effets d'un traitement SEQUENTIEL par CHLORDANE ET LE TPA et d'un traitement séquentiel par le B(a)P ET LE CHLORDANE sur la transformation des cellules SHE.

Protocole	Initiateur µg/ml	Promoteur µg/ml	EXPERIENCE 1			EXPERIENCE 2			EXPERIENCE 3		
			EC ^a %	Colonies transf./ Colonies totales	Taux de transformation %	EC ^a %	Colonies transf./ Colonies totales	Taux de transformation %	EC ^a %	Colonies transf./ Colonies totales	Taux de transformation %
II	Chlordane	TPA									
	0	0.1	23	32/686	4.7	20	53/600	8.8	25	55/735	7.5
	1	0.1	26	57/791	7.2	NT	-	-	NT	-	-
	2.5	0.1	23	38/689	5.5	NT	-	-	NT	-	-
	5	0.1	22	63/652	9.7	20	27/599	6.2	NT	-	-
	8	0.1	25	83/755	11	17	49/495	9.9	23	52/677	7.7
	16	0.1	NT	-	-	NT	-	-	20	77/590	13.1
	20	0.1	NT	-	-	15	81/408	19.8	NT	-	-
	40	0.1	NT	-	-	0	0	0	NT	-	-
III	B(a)P	Chlordane									
	0.1	0	22	7/662	1.1	22	15/647	2.3	NT	NT	NT
	0.1	1	22	8/664	1.2	NT	-	-	-	-	-
	0.1	2.5	20	9/608	1.5	NT	-	-	-	-	-
	0.1	5	20	7/599	1.2	21	19/624	3	-	-	-
	0.1	8	22	7/660	1.1	16	0/487	0	-	-	-
	0.1	16	NT	-	-	NT	-	-	-	-	-
	0.1	20	NT	-	-	7	0/208	0	-	-	-
	0.1	40	NT	-	-	0	0	0	-	-	-
B(a)P ^b			12	25/363	6.9	13	23/378	6.1	8	17/150	11.5
Acetone ^c			23	5/690	0.7	22	1/663	0.2	24	2/720	0.3
B(a)P											
0.1			NT	NT	NT	19	58/578	10	NT	NT	NT

EC^a : Efficacité de clonage.

B(a)P^b : (1 µg/ml) utilisé comme contrôle positif de la transformation.

Acetone^c : (0,2 %) utilisé comme témoin négatif de la transformation pour la série B(a)P.

Tableau 11 : Effets du CHLOROTHALONIL sur la transformation des SHE après UNE, DEUX OU TROIS APPLICATIONS (2 expériences indépendantes).

Nombre et jour d'application	Concentration µg/ml	EXPERIENCE 1			EXPERIENCE 2		
		Efficacité de clonage %	TRANSFORMATION		Efficacité de clonage %	TRANSFORMATION	
			colonies transformées/ colonies totales	Taux de transformation %		colonies transformées/ colonies totales	Taux de transformation %
1 application (J 1) Protocole I1	0	23	3/687	0.9	25	0/746	0
	0.05	24	6/730	0.8	NT	-	-
	0.1	25	7/763	0.9	NT	-	-
	0.2	24	6/715	0.8	25	0/737	0
	0.3	23	8/675	1.2	21	0/627	0
	0.4	NT	-	-	13	3/398	0.8
	0.5	19	3/519	0.6	5	0/148	0
	0.6	NT	-	-	2	0/68	0
2 applications (J 1, J 5) Protocole I2	0	22	0/645	0			
	0.05	22	0/658	0			
	0.1	22	0/666	0			
	0.2	16	0/470	0			
	0.3	13	1/395	0.3			
	0.4	NT	-	-			
	0.5	8	0/253	0			
	0.6	NT	-	-			
3 applications (J 1, J 3, J 5) Protocole I3	0	22	0/664	0			
	0.05	20	2/530	0.4			
	0.1	17	2/514	0.4			
	0.2	6	2/188	1.1			
	0.3	3	1/80	1.3			
	0.4	NT	-	-			
	0.5	0	0	0			
	0.6	NT	-	-			
B(a)P *	1 µg/ml	(7) 14	17/277	6.1	15	30/462	6.5

B(a)P* (1 µg/ml) utilisé comme contrôle positif de la transformation.

() nombre de boîtes.

Tableau 12 : Effets d'un traitement SEQUENTIEL par LE B(a)P ET LE CHLOROTHALONIL sur la transformation des cellules SHE.
(2 expériences indépendantes).

Initiateur B(a)P (24h)	Promoteur CHLOROTHALONIL		EXPERIENCE (1)			EXPERIENCE (2)		
			Efficacité de clonage %	TRANSFORMATION Colonies transf./ colonies totales	Taux %	Efficacité de clonage %	TRANSFORMATION colonies transf./ colonies totales	Taux %
µg/ml	µg/ml	Jour(s) d'application						
0.1	0	J2				28	14/854	1.6
-	0.05					NT	-	-
-	0.1					NT	-	-
-	0.2					26	16/769	2
-	0.3					24	10/726	1.3
-	0.4					25	15/742	2
-	0.5					23	18/694	2.6
-	0.6					NT	-	-
0.1	0	J2, J5	21	19/627	3	28 (5)	8/416	1.9
-	0.05		22	5/656	0.8	NT	-	-
-	0.1		19	3/575	0.5	NT	-	-
-	0.2		16	8/478	1.7	23	29/680	4.3
-	0.3		12	3/360	0.8	22	40/653	6.1
-	0.4		NT	-	-	17	41/696	8.3
-	0.5		7	17/220	7.7	19	38/569	6.8
-	0.6		NT	-	-	11	44/337	13
0.2	0	J2				29	14/871	1.6
-	0.2					27	9/803	1.1
-	0.3					25	11/755	1.5
-	0.4					26	15/774	1.9
-	0.5					24	21/729	2.9
-	0.6					23	21/674	3.1
-	0	J2, J5				30	14/885	1.6
-	0.2					22	28/659	4.2
-	0.3					22	30/655	4.6
-	0.4					17	47/508	9.3
-	0.5					13	43/398	10.8
-	0.6					12	69/354	19.5

NT : non testé.

() : nombre de boîtes.

PARTIE IV : Effet du chlordane sur l'activité ODC des cellules SHE

Dans le but d'éclaircir quelques aspects du mécanisme d'action du chlordane dans la potentialisation des effets transformants induits par le TPA sur les cellules SHE ; les effets du chlordane ont été testés sur :

- l'activité ODC sur les cellules SHE (Partie IV),
- le flux de calcium intracellulaire libre (Partie V),
- la formation d'adduits sur les SHE (Partie VI).

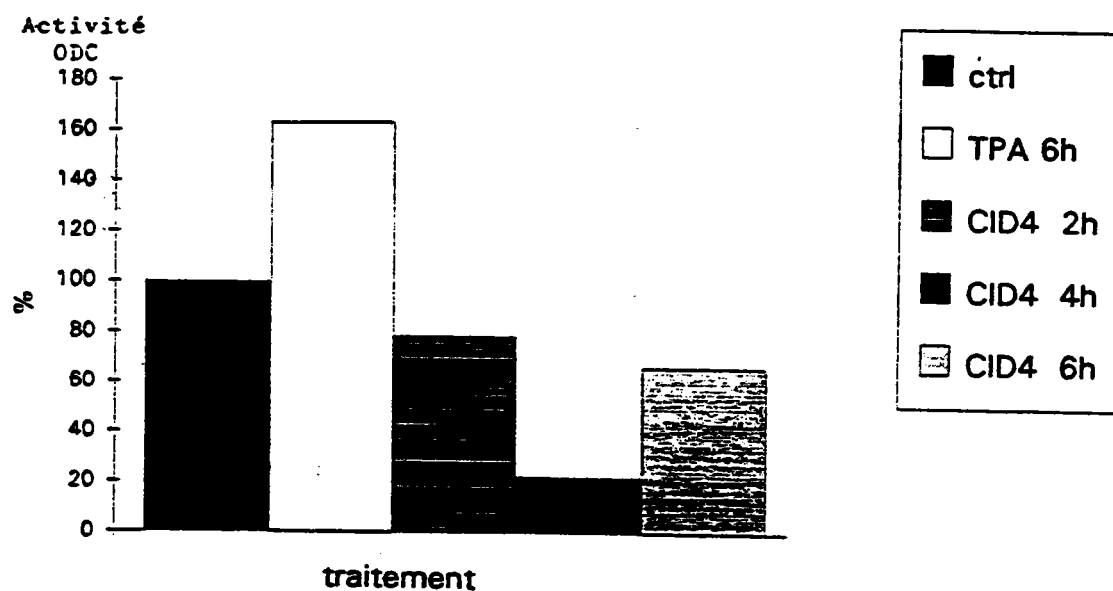


Figure 24 : Effet du chlordanes ($4\text{ }\mu\text{g/ml}$) sur l'activité ODC des cellules SHE après deux, quatre et six heures de traitement.

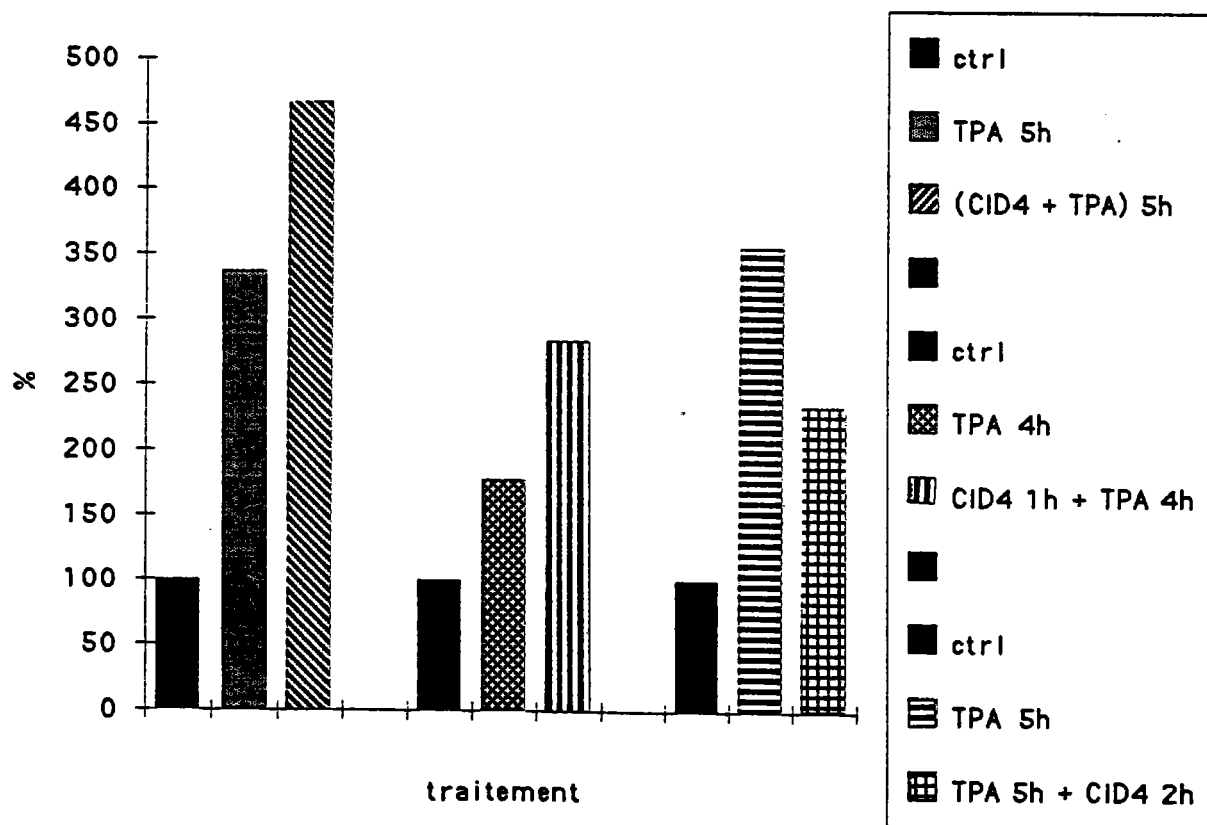


Figure 25 : Activité ODC des cellules SHE après :

- traitement en simultanée par le chlordanes $4\text{ }\mu\text{g/ml}$ et le TPA $0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$.
- traitement séquentiel par le chlordanes ($4\text{ }\mu\text{g/ml}$) et le TPA ($0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$) avec ou sans changement de milieu.
- traitement séquentiel par le TPA ($0,1\text{ }\mu\text{g/ml}$) et le chlordanes ($4\text{ }\mu\text{g/ml}$) sans changement de milieu.

I - Cinétique d'induction de l'ODC par le chlordane

Lorsque le chlordane est ajouté aux cellules SHE à la concentration finale de 4 $\mu\text{g/ml}$, l'activité ODC diminue légèrement après 2 heures avec une valeur minimale à 4 h, une reprise d'augmentation de l'activité ODC est constatée après 6 heures de traitement (figure 24).

L'étude de la cinétique d'induction de l'ODC par le TPA (0,1 $\mu\text{g/ml}$) dans les mêmes conditions expérimentales, a montré que l'activité ODC augmente rapidement atteignant un pic 5 heures après le début du traitement (Robert, 1991). Le temps $t = 5$ heures est retenu comme temps d'incubation, temps nécessaire pour étudier la modulation par le chlordane de l'activité ODC induite par le TPA.

II - Effets du chlordane sur l'activité ODC induite par le TPA

Dans un premier temps, les cellules SHE sont traitées en simultanée par le chlordane (4 $\mu\text{g/ml}$) et le TPA (0,1 $\mu\text{g/ml}$), pendant 5 heures, on observe une augmentation de l'activité ODC égale à la somme de l'activité ODC induite séparément par le TPA et le chlordane.

Pour simuler les conditions dans lesquelles le chlordane potentialisait l'effet transformant du TPA, les cellules ont été traitées successivement par le chlordane et le TPA. On constate alors que le traitement au chlordane pendant 1 heure suivi d'un traitement au TPA pendant 4 heures, augmente l'activité ODC déjà induite par le TPA.

Cet effet de synergie est accentué si le chlordane est laissé dans le milieu pendant le traitement au TPA.

Si le chlordane est appliqué pendant 2 heures sur des cellules préalablement traitées au TPA pendant 3 heures, on assiste à une diminution de l'activité ODC comparé au taux d'induction par le TPA (figure 25).

L'étude de l'activité protéolytique montre une augmentation du taux de protéases, induit par le chlordane, atteignant un pic à $t = 2$ heures, suivie par une diminution progressive vers le taux basal après 5 heures de traitement (figure 26).

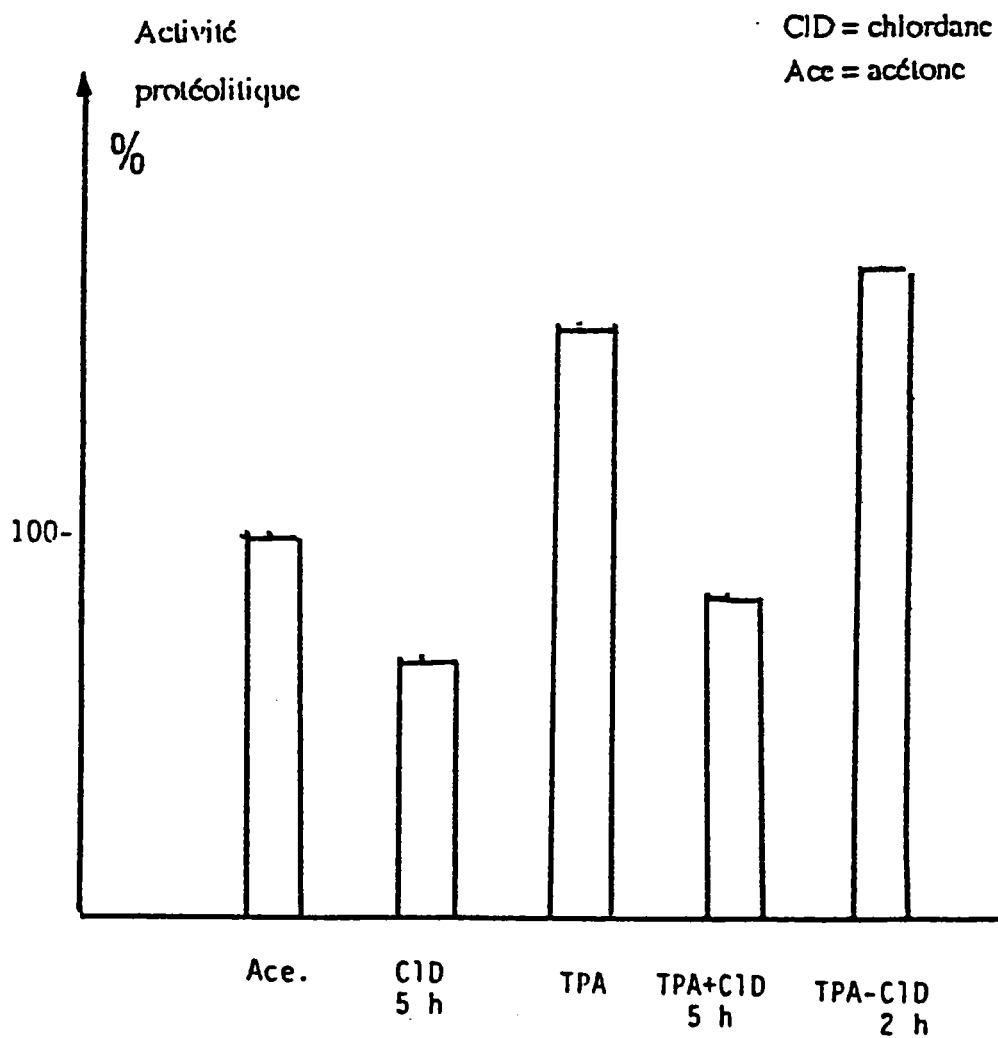
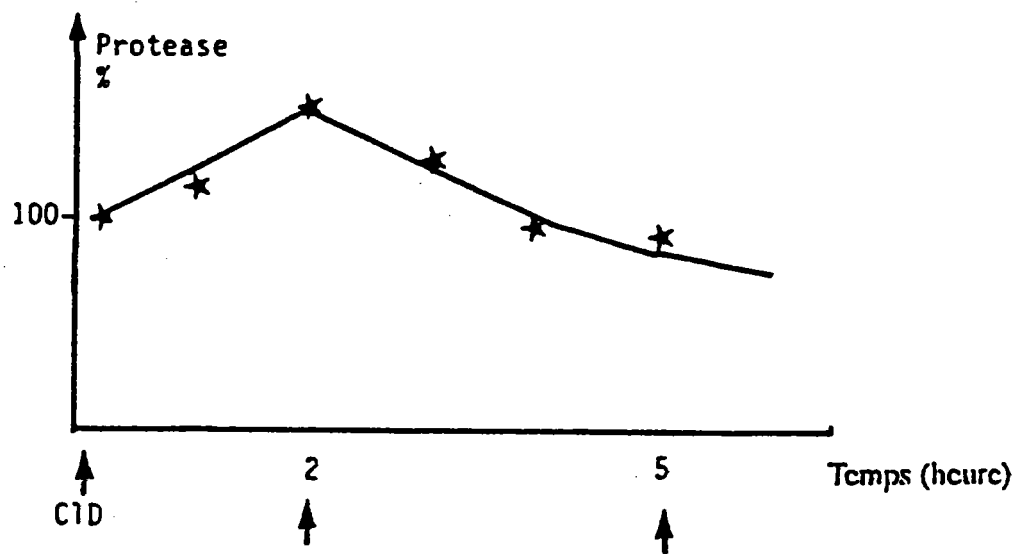


Figure 26 . Modulation de l'activité de la protéase 70 KDa des cellules SHE par le chlordan et le TPA.

L'activité de la protéase 70 KDa est responsable de la dégradation des ARNm du gène de l'ODC. L'augmentation de l'activité protéolytique induite par le chlordane et le TPA, explique la diminution de l'activité ODC enregistrée avec chacune de ces substances ; les périodes de traitement nécessaires à la modulation de ces deux activités coïncident.

Des études plus approfondies, sur les propriétés protéolytiques du chlordane, seraient nécessaire pour démontrer la régulation post-transcriptionnelle par le chlordane de l'activité ODC induite par le TPA.

PARTIE V : Effet du chlordane sur le taux Ca^{2+} intracellulaire des cellules SHE

I - Modulation du Ca^{2+} libre intracellulaire par l'Ionomycine

L'Ionomycine (Sigma I0634), un ionophore de calcium, a été utilisé comme témoin positif au cours de cette expérience. Il facilite la pénétration du Ca^{2+} extracellulaire dans le milieu intracellulaire et permet de vérifier que la complexation du fluo 3 par les ions de Ca^{2+} résulte en une augmentation de la fluorescence.

Après application de 10 μl d'ionomycine, le taux de fluorescence augmente progressivement pour atteindre un plateau à $t = 100$ secondes. Ce type d'évolution du taux de Ca^{2+} intracellulaire typique des ionophores de Ca^{2+} traduit une pénétration progressive des ions de Ca^{2+} libre du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire.

Ce résultat témoigne de la validité des conditions expérimentales et de la qualité des cellules SHE.

Il est à noter, si l'on en juge par le taux de fluorescence des différentes cellules à $t = 0$ que le taux d'incorporation du fluo 3 est variable d'une cellule à l'autre ; la normalisation des données permet de prendre en considération cette variabilité.

II - Effet du chlordane sur le taux du Ca^{2+} intracellulaire libre des cellules SHE

Le traitement des cellules SHE par le chlordane à 8 $\mu\text{g/ml}$ entraîne une légère augmentation de la fluorescence avec un flash à 270 secondes traduisant une montée rapide de Ca^{2+} libre dans le milieu intracellulaire (figure 27).

Ces fluctuations de la fluorescence traduisent deux événements:

- de $t = 0$ à $t = 230$ secondes, la légère augmentation du taux de Ca^{2+} intracellulaire correspondrait à un faible influx de calcium extracellulaire,

- de $t = 230$ à $t = 310$ secondes, le pic de fluorescence observé, dû à une augmentation rapide et importante du Ca^{2+} libre intracellulaire, traduirait une libération des ions Ca^{2+} à partir d'un stock intracellulaire, probablement le réticulum endoplasmique.

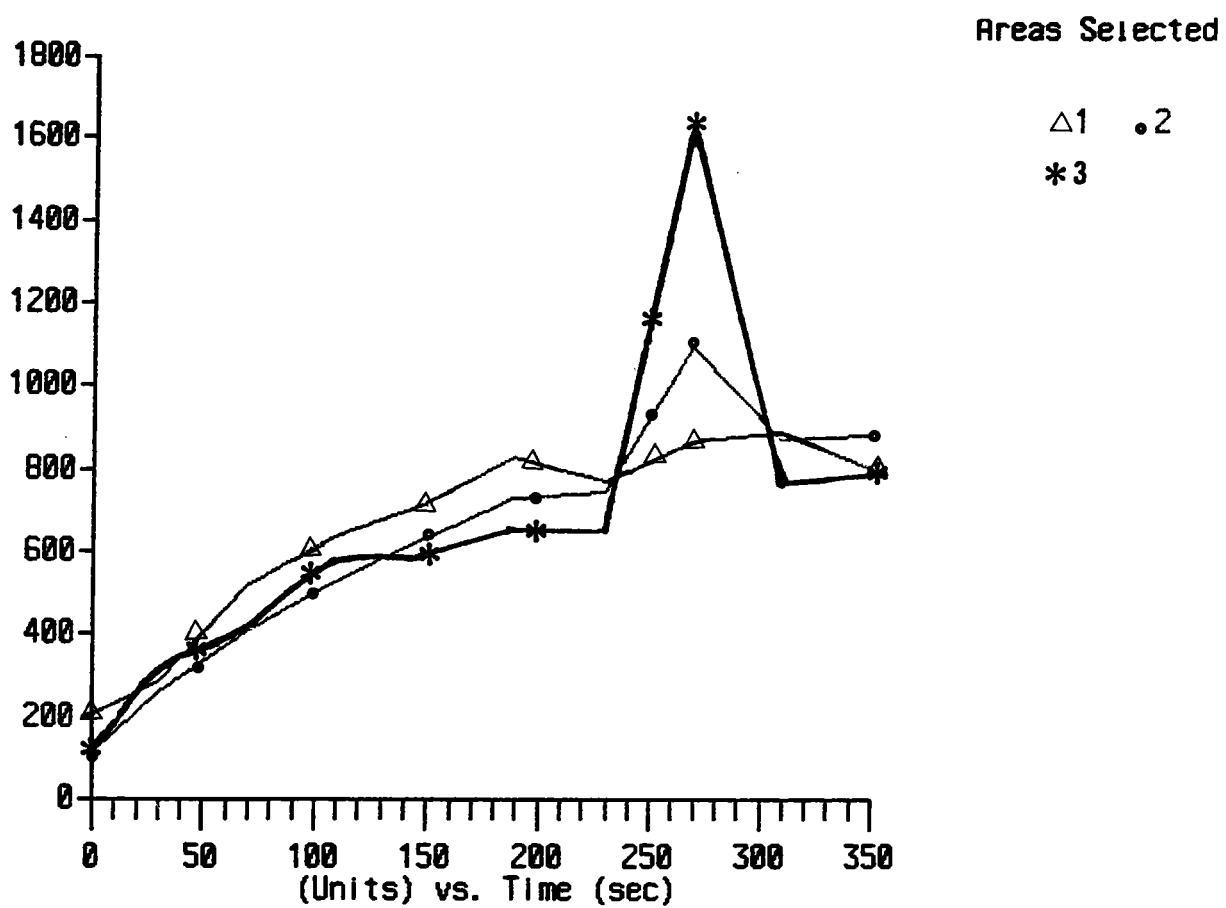


Figure 27 : Modulation du taux de Ca^{2+} libre intracellulaire des cellules SHE traitées par le chlordane seul ($8 \mu\text{g/ml}$).

III - Effets du TPA sur le taux de Ca^{2+} intracellulaire libre des cellules SHE prétraitées au chlordane

L'application du TPA à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sur des cellules SHE non traitées auparavant, nous a permis de constater que le TPA n'induit aucun changement de fluorescence dans les 800 secondes qui suivent le traitement.

Si cette application de TPA à 0,1 $\mu\text{g/ml}$ réalisée sur des cellules prétraitées au chlordane à 8 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24 heures, on assiste à une augmentation spectaculaire du taux du Ca^{2+} intracellulaire se traduisant par un flash dans les cinquantes premières secondes qui suivent l'application.

Une deuxième application au TPA à la même concentration, a permis d'observer un deuxième flash dans le même laps de temps (50 secondes) (Fig 28).

Si l'on substitue le TPA par le chlordane, aucune réponse n'est observée.

Le prétraitement des cellules SHE par le chlordane à 8 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24 heures semble affecter des structures ou des fonctions cellulaires. Suite à ces modifications, le TPA semble moduler le taux intracellulaire du Ca^{2+} libre d'une façon rapide qui peut traduire une libération des ions de Ca^{2+} stockés dans le milieu intracellulaire. Ces observations peuvent constituer des données importantes pour expliquer la potentialisation des effets transformants du TPA par le chlordane observée auparavant sur les mêmes cellules.

Ces essais ont été répétés plusieurs fois lors d'expériences séparées. Les résultats confirment l'augmentation des concentrations en Ca^{2+} intracytoplasmiques à la suite d'une première exposition au chlordane. L'augmentation des flux de Ca^{2+} à l'intérieur de la cellule qui suit l'ajout de TPA n'a lieu que si les cellules ont été prétraitées au chlordane. Ces résultats militent en faveur d'une implication des flux calciques dans les effets de synergie chlordane-TPA observés.

IV - Effets du chlorothalonil sur le taux de Ca^{2+} intracellulaire libre des cellules SHE

Le traitement des cellules par le chlorothalonil à 0,2 $\mu\text{g/ml}$ dans les mêmes conditions n'entraîne aucune modulation du taux de Ca^{2+} intracellulaire.

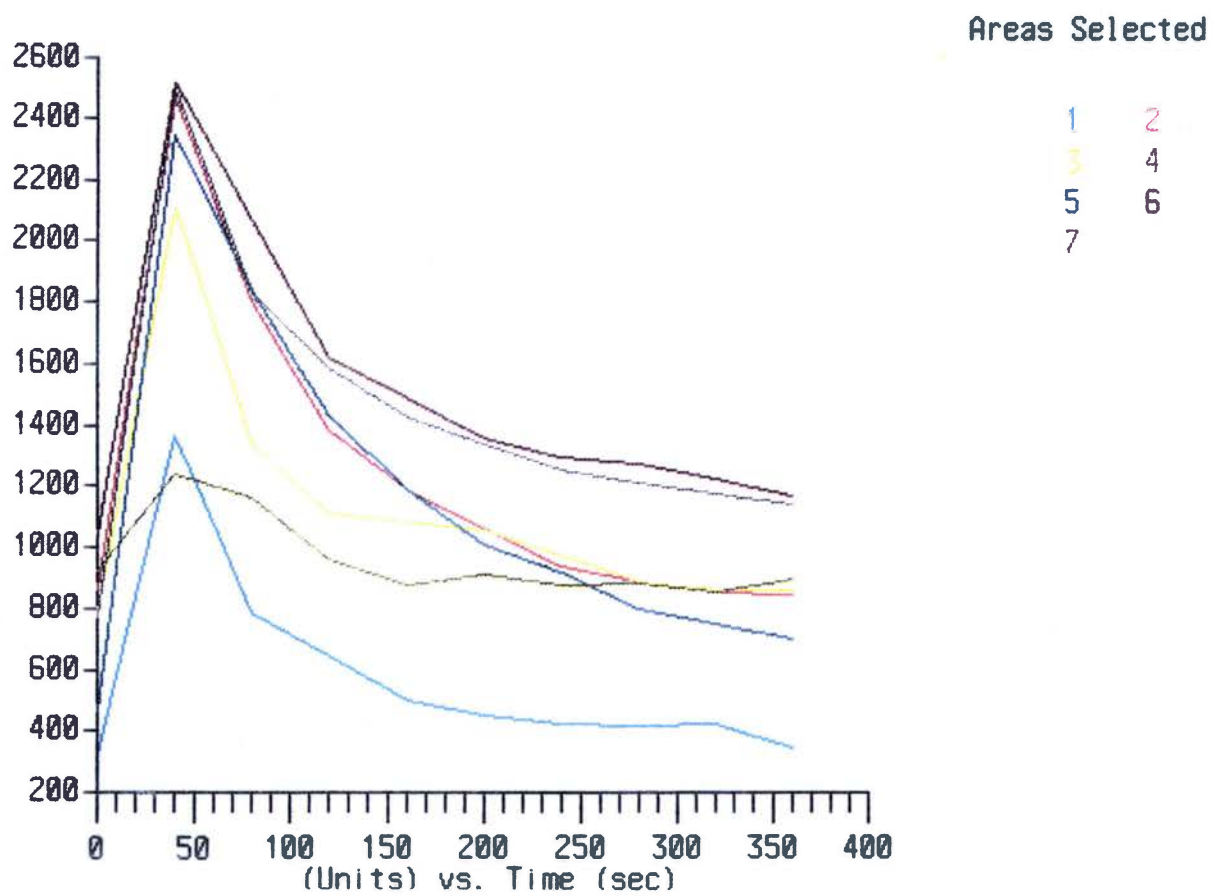
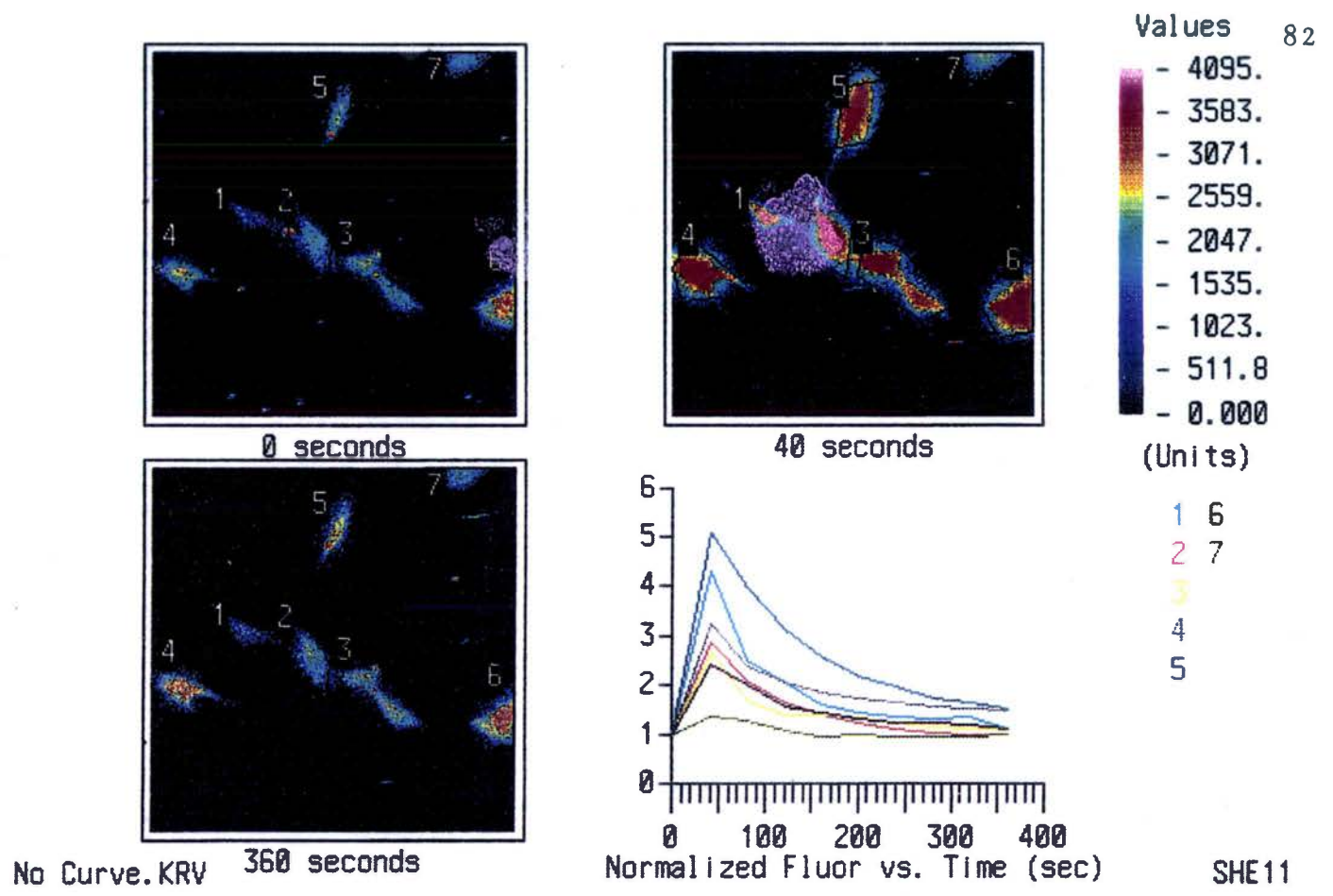


Figure 28 : Augmentation du taux de Ca^{2+} libre intracellulaire des cellules SHE prétraitées au chlordane ($4 \mu\text{g/ml}$) puis traitées par une seconde application de TPA ($0,1 \mu\text{g/ml}$).

PARTIE VI : Mise en évidence d'adduits sur l'ADN des cellules SHE en présence et en absence de chlordane

La figure 29, montre les autoradiogrammes obtenus après post-marquage au ^{32}P des hydrolysats d'ADN isolés à partir de cellules appartenant à 3 lots de traitement :

- a - Cellules témoin (DMSO 0,2 %)
- b - Cellules SHE traitées au chlordane à 10 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24 heures
- c - Cellules SHE traitées au chlordane à 10 $\mu\text{g/ml}$ pendant 48 heures.

Sur les autoradiogrammes apparaît un certain nombre de tâches ou spots correspondant aux bases hypermodifiées sur l'ADN. On peut visualiser, sur chacun des autoradiogrammes (a, b et c), 17 taches majeures et 10 taches mineures. Les spots majeurs et mineurs visualisés sur les 3 essais ont le même site de migration, ce qui permet de dire qu'il n'y a pas de différences qualitatives entre les spots obtenus sur les 3 autoradiogrammes.

Ces observations indiquent que le chlordane appliqué aux cellules SHE, à la concentration de 10 $\mu\text{g/ml}$ pendant 24 heures ou 48 heures, n'induit pas d'adduits supplémentaires sur l'ADN.

Sur le plan quantitatif, les comptages de la radioactivité de l'ensemble de spots, ont permis de déterminer le nombre d'adduits totaux pour 10^9 nucléotides (tableau 13).

Cependant, on pourrait concevoir que des différences puissent exister quant au nombre d'adduits pour un même spot présent dans les 3 échantillons. Là encore, les résultats présentés dans le tableau 13 montrent qu'il n'y a pas de différences significatives entre les essais témoin et traités .

Ainsi, les valeurs trouvées pour les adduits totaux, autant pour le témoin que pour les cellules traitées, sont tout à fait similaires, les différences minimales observées ne sont absolument pas significatives, compte-tenu de la méthode employée.

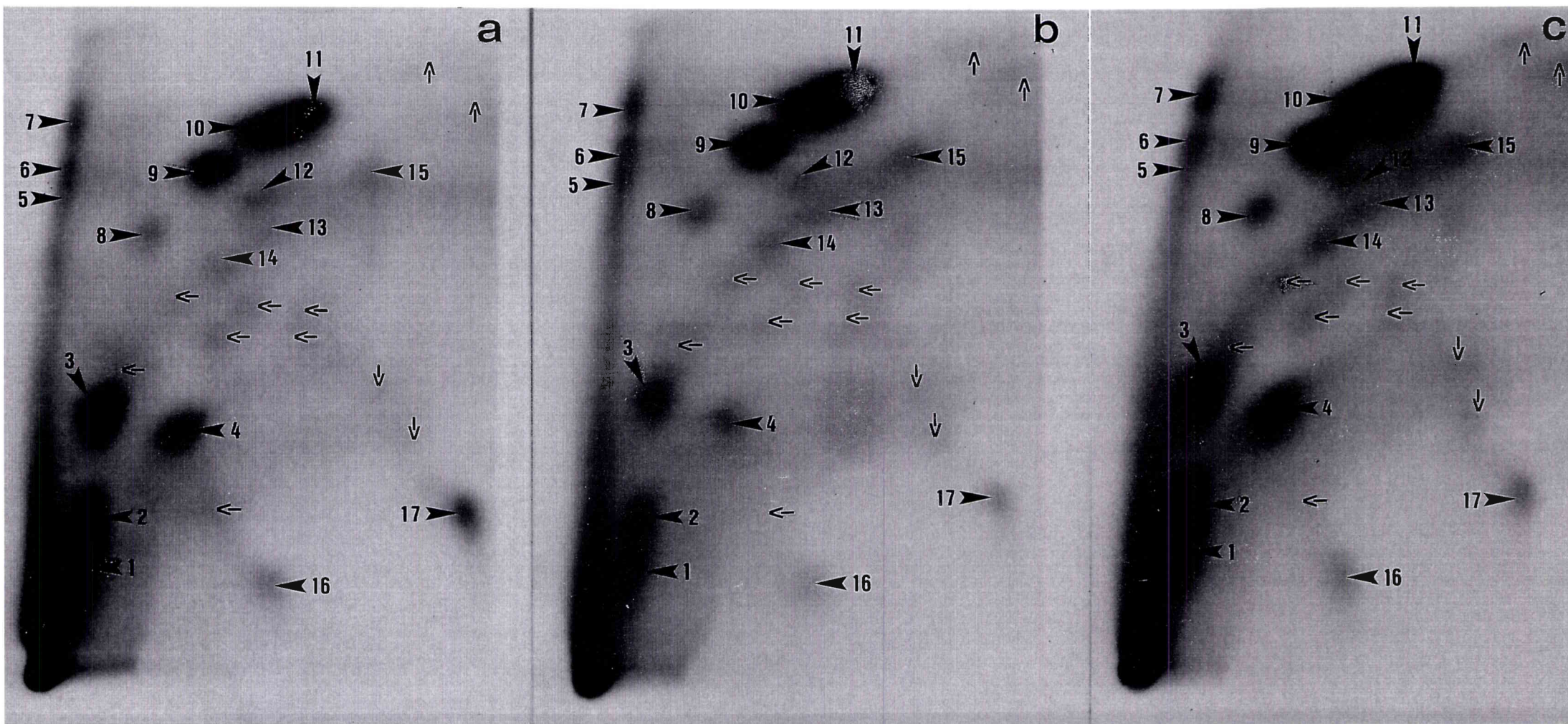


Figure 29 : Autoradiogrammes des adduits obtenus par post-marquage d'un hydrolysate de DNA, isolé à partir de cellules SHE cultivées en présence et en absence de chlordane.

a. témoin ; b. cellules traitées à 10 $\mu\text{g/ml}$ de chlordane pendant 24 heures.

c. cellules traitées à 10 $\mu\text{g/ml}$ de chlordane pendant 48 heures.

Les spots numérotés correspondent à des taches majeures, les taches mineures sont indiquées par de petites flèches.

Spot n°	Nombre d'adduits pour 10 ⁹ nucléotides		
	a	b	c
1	7,7	5,3	9,6
2	20,7	15,2	26,9
3	18,7	14	20,5
4	4,7	8	9,3
5	6,8	3,3	4,5
6	2,2	3,2	3
7	2,6	3,7	2,1
8	2,6	3,4	5,6
9	13,9	18,7	24,2
10	17,8	24,4	25,6
11	16,1	17	28,4
12	4	3,3	4,3
13	1,8	3,3	4,2
14	2,4	2,7	4,7
15	4	5,1	5,3
16	1,5	2,2	2,1
17	4,7	1,8	2,2
Total	132,2	134,6	182,5

Tableau 13 : Nombre d'adduits pour 10⁹ nucléotides pour les 17 spots majeurs des radiogrammes. a) témoin ; b) traitées 24 heures ; c) traitées 48 heures.

En se basant sur les données qualitatives et quantitatives, on peut donc conclure que le chlordane, d'une part, n'induit pas d'adduits supplémentaires sur les cellules SHE, et que d'autre part, il n'induit pas d'augmentation quantitativement parlant des adduits endogènes.

Il reste à expliquer la présence des adduits endogènes, présence qui peut paraître surprenante de prime abord. Il faut noter que la technique utilisée, c'est à dire le post-marquage, à l'inverse de la technique par marquage direct à l'aide d'un xénobiotique radioactif, présente l'avantage de mettre en évidence l'ensemble des adduits sur l'ADN.

Parmi ces adduits, certains peuvent être induits par des molécules présents naturellement dans la cellule. Dans notre cas où des cultures cellulaires sont utilisées, la présence des adduits endogènes peut être liée à des facteurs provenant du milieu de culture ou à des facteurs d'origine maternel.

D'autres travaux ont également montré la présence d'adduits dans les tissus animaux et humains non exposés à des xénobiotiques (Gupta, 1985 ; Everson *et al.*, 1986 ; Wong *et al.*, 1986). Randerath *et al.* (1986) ont démontré qu'il existe chez le rat une corrélation entre l'apparition des adduits endogènes et l'âge de l'animal, le vieillissement favorisant cette apparition. Nous avons affaire, dans le cas présent, à des embryons, mais il n'est pas exclu que des facteurs intrinsèques à la femelle en gestation aient pu être transférés aux embryons par la voie placentaire.

d'échantillons T4 et B obtenus au moyen du test d'Ames, du test d'inhibition de la coopération métabolique sur V79 et de l'essai de transformation cellulaire sur SHE.

	µg/bte	ml éq/bte	Ames <i>S. typhimurium</i> -S9 +S9	Coopération métabolique V79	Transformation cellulaire/SHE			
					1 applic.	3 applic.	avant TPA	après B(a)P
CHLORDANE	0 1 5 8 16 25 ----- 128	0 40 320	- -	INHIBITION de 8 à 25 µg/ml	-	POSITIF à 5 - 8 µg/ml	POSITIF de 5 à 20 µg/ml	-
CHLOROTHALONIL	0 0,05 0,2 0,3 0,5 0,6 ----- 1,6	0 0,125 4	- -	-	-	POSITIF 0,2 → 0,3 µg/ml	-	POSITIF 0,2 → 0,6
extrait T4	0 0,16 1,6 ↓ 162 ----- 500 ↓ 2500			-	POSITIF dès 0,16 µl/ml	POSITIF	POSITIF de 3,2 → 162 µl/ml	FAIBLEMENT POSITIF
extrait B	0 0,16 1,6 ↓ 162 ----- 240 1000 5000				-	-	POSITIF à 162 µl/ml	FAIBLEMENT POSITIF

DISCUSSION GENERALE

Les résultats obtenus avec le test d'Ames, l'essai d'inhibition de la coopération métabolique et l'essai de transformation cellulaire, sur les deux substances, chlordane et chlorothalonil, d'une part et sur les extraits d'échantillons environnementaux complexes d'autre part, sont synthétisés dans le tableau 14 peuvent se résumer comme suit :

- le chlordane, non mutagène sur la base du test d'Ames, inhibe la communication intercellulaire et induit la transformation morphologique des cellules SHE après 3 applications répétées aux concentrations de 5 et 8 µg/ml ou lors d'une association avec le TPA.
- le chlorothalonil ne donne de réponse positive que sur les cellules SHE : il provoque la transformation cellulaire après 3 applications répétées de 0,2 et 0,3 µg/ml ou lorsqu'il est appliqué après le B(a)P ; ces derniers résultats faisant assimiler ce dérivé à un promoteur. La cytotoxicité très élevée du chlorothalonil justifie de ses utilisations en tant que biocide et explique le niveau très faible des concentrations testées.
- Les deux extraits complexes se sont montrés génotoxiques avec le test d'Ames, après activation métabolique pour l'échantillon T4, avec et sans activation métabolique pour l'échantillon B. Aucun effet sur la coopération métabolique n'a été enregistré. Par contre, ils se sont révélés actifs sur la transformation morphologique des cellules SHE.
 - . L'échantillon T4 a induit la transformation après une seule application à la concentration de 0,16 µl/ml et s'est montré également très actif lorsqu'il est suivi du TPA, ce qui témoigne d'une forte activité génotoxique de type initiateur.
 - . L'échantillon B présente également un profil initiateur, étant donné le taux de transformation élevé des cellules SHE lorsque son application est suivie de celle du TPA.

Ces résultats appellent plusieurs commentaires.

- L'essai de transformation morphologique des cellules SHE est le seul essai à avoir répondu positivement aux quatre échantillons testés :
 - aux deux pesticides, non génotoxiques mais cancérigènes chez l'animal,
 - et aux deux extraits qui se sont révélés génotoxiques avec le test d'Ames.

Dans le cas de *substances mutagènes*, la réponse peut apparaître après une seule application pour peu que la concentration d'exposition des cellules soit suffisamment élevée dans la gamme des concentrations non cytotoxiques ; la réponse est plus manifeste lorsque l'application est suivie de celle d'un promoteur fort comme le TPA.

Par exemple, l'extrait B reste sans effet après 1, 2 ou 3 applications ; le résultat est nettement positif à la concentration de 162 μ l d'équivalent lixiviat par ml, après l'action du TPA.

Ces essais sur les deux extraits soulignent la sensibilité du système SHE très supérieure à celle du test d'Ames, étant donné qu'au niveau de concentrations testées sur SHE, aucune réponse positive n'est obtenue sur Salmonella typhimurium. Le percolat T4 et le lixiviat B testés bruts sans étape de concentration des micropolluants ne s'étaient pas révélés mutagènes ; à la concentration équivalente à 0,6 ml de lixiviat B par boîte, ce qui correspond à 240 μ l/ml de suspension bactérienne gélosée, le test d'Ames était resté négatif.

Dans le cas des *substances non génotoxiques* comme le chlordane et le chlorothalonil, la transformation cellulaire est induite essentiellement après répétition des applications (3 en général), si l'échantillon est testé seul. L'utilisation d'un schéma initiation-promotion améliore la sensibilité par la synergie des effets possibles avec un initiateur et un promoteur.

Les résultats obtenus avec le chlordane nous incitent à la prudence avant de classer "initiateur" ou "promoteur" une substance sur la seule positivité obtenue après traitement séquentiel substance-TPA ou B(a)P-substance respectivement.

L'absence d'adduits supplémentaires sur l'ADN des cellules SHE traitées au chlordane par rapport aux contrôles, a confirmé les données bibliographiques concluant au caractère non génotoxique du pesticide, évitant ainsi qu'un label d'"initiateur" ne soit abusivement décerné au chlordane. Il nous semble important de retenir de cette induction du taux de transformation lors du traitement séquentiel chlordane-TPA, que *des effets d'interaction peuvent résulter d'une potentialisation des effets de substances au mécanisme d'action différent et complémentaire, sans qu'il s'agisse nécessairement, d'une combinaison initiateur-promoteur.*

- Le test d'inhibition de la coopération métabolique selon Trosko *et al.*, (1979), n'a permis de retenir que le chlordane comme substance inhibitrice de la communication intercellulaire. Les réponses négatives obtenues avec les trois autres échantillons montrent que ce critère est moins révélateur d'une potentialité cancérogène *in vitro* que l'essai de transformation cellulaire.

L'inhibition de la communication entre cellules est un élément de déstabilisation de l'homéostasie cellulaire suffisant, mais non indispensable au processus de transition des cellules normales vers l'état tumoral.

L'essai d'inhibition de la coopération métabolique étant effectué sur des lignées cellulaires V79, la déficience partielle en enzymes de métabolisation de ce système est un élément à prendre en considération avant de conclure à l'absence totale d'effet sur la communication intercellulaire des échantillons ayant répondu négativement ; c'est le cas, en particulier, du chlorothalonil et de l'échantillon T4 dont la toxicité peut être due aux métabolites, ainsi qu'il ressort des données de la littérature pour le chlorothalonil et des résultats du test d'Ames pour T4.

La réalisation d'essais d'inhibition de coopération métabolique en présence de fraction S₉ aurait été utile pour lever cette incertitude.

- Cette étude démontre que l'absence de génotoxicité n'est pas une garantie d'innocuité : *des potentialités cancérogènes impliquant des mécanismes épigénétiques peuvent exister, même si la recherche des altérations structurales du génome s'est révélée négative*.

La stratégie d'évaluation d'un potentiel cancérogène *in vitro* basée sur des essais de mutagénèse ou d'activité de réparations de l'ADN est insuffisante dans la mesure où les cancérogènes agissant par des mécanismes ne relevant pas d'altération du génome échapperont au screening.

Le protocole d'évaluation des substances chimiques nouvelles selon les directives actuelles, qui consiste à mettre en oeuvre, d'abord des essais de mutagénicité sur bactéries, comme le test d'Ames, et à ne pousser les investigations sur cellules eucaryotes que pour les substances détectées positives lors de ce premier screening, est insuffisante et discutable pour les mêmes raisons.

Les résultats de cette étude soulignent bien que d'autres effets touchant la communication intercellulaire, l'activation de kinases, ou d'autres mécanismes peuvent conduire à la transformation cellulaire, alors que la substance est dépourvue d'activité mutagène sur bactéries.

Ce sont au contraire les substances négatives en mutagénicité qui mériteraient de faire l'objet d'investigations supplémentaires, pour la recherche de ces potentialités épigénétiques. Dans l'état actuel de la législation et de la pratique, ces potentialités cancérogènes par mécanismes "épigénétiques" ne sont détectées que lors des expérimentations animales à long terme. Ces essais sont requis pour l'homologation des produits phytosanitaires, mais non pour la notification des substances chimiques.

De telles substances sont donc commercialisées et rejetées dans l'environnement en toute impunité. *Leur détection est d'autant plus importante que les milieux environnementaux renferment une multiplicité de micropolluants dont l'interaction est inéluctable et pourra favoriser le développement de processus cancéreux.*

Peu d'essais ont été développés pour détecter des potentialités cancérogènes épigénétiques *in vitro*.

. La détection d'une perturbation de la communication intercellulaire est significative de telles potentialités mais l'intégrité du mécanisme n'est pas non plus, une garantie d'innocuité comme l'ont montré ces résultats.

. L'essai de transformation morphologique des cellules SHE est intégrateur de l'ensemble des modifications biochimiques, structurales et fonctionnelles induites par les cancérogènes et semble être le modèle d'élection pour la détection *in vitro* de cette catégorie de substances.

Ce modèle permet, par ailleurs, de détecter à la fois les cancérogènes génotoxiques et épigénétiques. La mise en oeuvre de plusieurs protocoles incluant l'application de la substance seule d'une part, ou associée à un initiateur ou un promoteur d'autre part, permet d'augmenter les performances de ce système. Son intérêt est indiscutable ; il faut cependant reconnaître que cette mise en oeuvre implique des séries d'essais assez lourds.

Les conditions expérimentales que nous avons utilisées sont celles préconisées par Chouroulinkov et Lasne (1978). D'autres auteurs ont proposé certaines modifications afin d'augmenter la sensibilité de l'essai et d'en simplifier le protocole. Ainsi, Elias *et al.* (1989) et Rivedal et Sanner, (1992) utilisent un milieu de culture à pH 7,0 au lieu du pH 7,35 initial, et considèrent que les performances de l'essai s'en trouvent augmentées.

Leboeuf (1987) préconise un pH acide de 6,7 qui permettrait d'atteindre une sensibilité élevée tout en ne traitant les cellules qu'une seule fois, sans avoir à renouveler le milieu pendant les 7 jours d'exposition. Il faut souligner que si le pH acide du milieu augmente le taux de transformation des cellules SHE exposées à ces cancérogènes, il augmente également leur taux de transformation spontanée, lié en partie à l'inhibition des communications intercellulaires par l'acidité du milieu ; cela se traduit par l'aspect des colonies qui sont beaucoup moins belles qu'au pH physiologique.

Il serait intéressant de comparer les performances de ces différentes méthodes pour optimiser le protocole de l'essai de transformation morphologique des cellules SHE, avec le souci de gagner à la fois en sensibilité et en facilité de mise en oeuvre.

- Il serait souhaitable de rechercher les potentialités cancérogènes également dans les milieux environnementaux et leurs sources de contamination représentées par les effluents de diverses origines : domestique, industrielle et agricole. Actuellement, aucun essai répondant à cet objectif n'est exigé par la réglementation. Le seul test

biologique requis est l'essai de toxicité aiguë sur daphnies évaluant la mortalité après 24 heures ; il est question d'y ajouter dans l'avenir un test d'inhibition de la reproduction de ces microcrustacés.

Quoi qu'il en soit, ce contrôle est insuffisant et devrait prendre en compte le risque cancérogène. C'est pour souligner la réalité de ce risque au niveau environnemental et inciter à sa prévention que nous avons entrepris préalablement à ce travail, une étude de la génotoxicité des lixiviats de déchets solides stockés en décharge.

Cette étude a fait l'objet d'une publication qui figure en annexe II. Le test d'Ames utilisé alors avait mis en évidence la présence de micropolluants mutagènes dans les lixiviats de certains échantillons et a souligné ainsi, le risque génotoxique pour l'environnement aquatique, des eaux de lessivage ou de percolation de ces déchets.

L'analyse physicochimique visant à identifier les micropolluants responsables de la toxicité n'avait pas donné de résultats satisfaisants. L'analyse des traces, malgré la sensibilité des techniques analytiques, est effectivement très difficile:

Si le screening analytique ne permet pas d'expliquer un risque identifié, a fortiori l'analyse physicochimique standard qui ne mesure que des paramètres globaux, sera insuffisante pour évaluer un risque cancérogène. Ceci apparaissait aussi des résultats des échantillons T4 et B dont les bilans analytiques ne reflètent pas la toxicité. C'est la raison pour laquelle il nous paraît indispensable d'inclure un minimum d'essais biologiques dans la stratégie du contrôle environnemental.

En matière de cancérogénèse, il est nécessaire d'appréhender et de prévenir , d'une part, le risque génotoxique, d'autre part le risque lié aux cancérogènes épigénétiques. L'étude des percolat de décharge et lixiviats de déchet donne un exemple des essais qui peuvent être appliqués dans cet objectif.

. Le test d'Ames est bien approprié pour une évaluation de la génotoxicité de par sa simplicité et sa rapidité et il nous paraît recommandé en première approche.

Les investigations complémentaires ne nous semblent pas indispensables en cas de positivité, l'information étant suffisante pour alerter et inciter à la prévention.

En cas de réponse négative par contre, la question reste posée de la pertinence et de la sensibilité de ce test à détecter l'ensemble des cancérogènes, c'est, à notre sens, dans ce cas que des investigations complémentaires seraient souhaitables.

- Cette étude a également permis d'éclaircir quelques aspects du mécanisme d'action du chlordane. Cet organochloré paraît modifier les flux de calcium libre intracytoplasmique, comme cela avait été noté pour d'autres de ses congénères de type DDT.

Cette augmentation des flux calciques pourrait expliquer les effets de synergie avec le TPA ; il a été montré en effet que les effets du TPA étaient potentialisés par un ionophore de calcium A 23187 avec des répercussions sur (1) l'activation de la PKC elle même dépendante du taux de calcium et (2) l'induction de la cascade de l'acide arachidonique (Moser et Smart, 1989).

L'interaction chlordane-TPA se reflète également sur l'activité de l'ODC : L'activité basale de l'ODC augmenté déjà par le TPA, est encore accrue lors d'un traitement préalable ou simultané par le chlordane.

Il serait intéressant d'élucider les mécanismes de ces effets, voir s'ils relèvent de mécanismes autres que l'influx calcique et comment s'inscrivent dans ce contexte les effets observés sur l'activité protéasique cytosolique de la 70 KDa dans la régulation post-transcriptionnelle de l'ODC.

Les mécanismes d'induction de l'activité ODC n'ont été qu'abordés au cours de cette étude pour montrer l'intérêt de ce critère, également très significatif d'une perturbation de la croissance et de la division cellulaire. Une étude plus poussée des cinétiques d'activité de l'ODC en fonction des modalités de traitement par le chlordane seul ou associé au TPA aurait été nécessaire pour mieux appréhender cette voie fondamentale.

Il en est de même des essais sur l'activité protéasique que nous n'avons qu'abordés, grâce au concours de l'équipe de G. NGUYEN-BA et H. TAPIERO.

CONCLUSION

Ce travail a concerné la détection *in vitro* des *cancérogènes non génotoxiques* et l'étude des performances de trois essais à détecter les potentialités cancérogènes des contaminants de l'environnement :

- . le test de mutagénèse sur *Salmonella typhimurium his⁻*,
- . l'inhibition de la communication intercellulaire des cellules de la lignée V79,
- . et l'essai de la transformation morphologique des cellules embryonnaires d'hamster syrien SHE.

Deux pesticides chlorés, le chlordane et le chlorothalonil, cancérogènes chez l'animal mais non mutagènes, ont été testés à l'aide de cette batterie d'essais.

Des lixiviats de déchets ultimes et percolats de décharge ont été également étudiés dans les mêmes conditions.

L'ensemble de ces travaux ont montré l'intérêt d'utiliser des modèles cellulaires en vue de la détection de cancérogènes environnementaux, et l'étude de leur profil d'action, qu'il s'agisse de substances pures ou de milieux complexes,.

- Le chlordane non mutagène dans le test d'Ames, inhibe la coopération métabolique entre les cellules V79 et potentialise la transformation morphologique et l'activité ODC des SHE induites par le TPA.

Les effets de synergie entre le chlordane et le TPA peuvent trouver une explication dans l'augmentation des flux intracellulaires de calcium libre des cellules SHE prétraitées au chlordane et soumises à l'action supplémentaire de l'ester de phorbol.

- Le chlorothalonil n'induit pas de mutation sur les souches bactériennes de *Salmonella* et n'inhibe pas la coopération métabolique des cellules V79 ; il se comporte comme un promoteur si l'on en juge par l'augmentation de la transformation des cellules SHE prétraitées au B(a)P.

- Le caractère génotoxique des concentrés organiques des échantillons de percolat de décharge et de lixiviats de déchets ultimes est mis en évidence par le test d'Ames et confirmé par la transformation des cellules SHE observée lors d'un traitement par l'échantillon seul ou suivi par un traitement au TPA.

Ces deux extraits se montrent inactifs quant à l'inhibition de la coopération métabolique des cellules V79.

L'essai de transformation morphologique des cellules SHE, utilisé parallèlement au test d'inhibition de la coopération métabolique sur les cellules de la lignée V79 et au test de mutagénèse sur *Salmonella typhimurium*, se révèle le plus sensible à la détection des actions tant génotoxiques qu'épigénétiques des agents chimiques.

Cet essai apparaît bien représentatif des perturbations biochimiques, fonctionnelles et structurales susceptibles de dérégler les mécanismes de contrôle de la croissance et de la prolifération cellulaire et de faire transiter une cellule de l'état normal vers l'état transformé.

L'essai de transformation morphologique des cellules SHE semble être le modèle d'élection pour la détection in vitro des cancérrogènes ; il mériterait d'être intégré dans la batterie des essais in vitro mis en oeuvre pour la prévision des potentialités cancérrogènes des contaminants de l'environnement et des xénobiotiques, dans le but de la prévention du risque cancérogène en général.

Il resterait à optimiser encore la méthodologie de cet essai et voir comment il est possible de réduire la variabilité des réponses par un meilleur contrôle des spécificités physiologiques des cellules, de la qualité du sérum ou par des modifications des conditions expérimentales telles que le pH. Une validation, en cours, au niveau international permettrait de mieux tirer profit des capacités de l'essai de transformation cellulaire des SHE à détecter les cancérrogènes environnementaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AARANSON S.A. and TODARO G.J., 1968.
Development of 3T3-like lines from BalB/c mouse embryo cultures transformation susceptibility to SV40. *J. Cell. Physiol* 72, 141-148.
- AFNOR X31-210, 1988.
Déchets. Essai de lixiviation. T95J.
- AHMED F.E., HART R.W. and LEWIS N.J., 1977a.
Pesticide induced DNA damage and its repair in cultured human cells. *Mutation Research* 42, 161-174.
- AHMED F.E., LEWIS N.J. and HART R.W., 1977b.
Pesticide induced ouabain resistant mutants in chinese hamster V79 cells. *Chem. Biol. Interactions*. 19, 369-374.
- AMACHER D.E. and ZELLJADT I., 1973.
The morphological transformation of Syrian hamster embryo cells by chemical reported non-mutagenic to *Salmonella typhimurium*. *Carcinogenesis* 4, 291-295.
- AMES B.N., McCANN J. and YAMASAKI E., 1975.
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- ASHBY J. and TENNANT R.W., 1990.
Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the U.S. NTP. *Mutat. Res.* 257, 29-306.
- ASHENDAL C.L., STALLER J.M. and BOUTWELL R.K., 1983.
Protein kinase activity associated with a phorbol ester receptor purified from mouse brain. *Cancer Res.* 43, 4333-4337.
- ASTRUP E. and BOUTWELL R.K., 1982.
Ornithine decarboxylase activity in chemically induced mouse skin papillomas. *Carcinogenesis* 3 (3), 303-308.
- BACH B. and PEDERSEN N.B., 1977.
Contact dermatitis from a wood preservative containing tetra chloroisophthalonitrile. *Contact Dermatitis* 3, 142.
- BAILLEUL B., BROWN K., RAMSDEN M., AKHURST R.J., FEE F. and BALMAIN A., 1989.
Chemical induction of oncogene mutations and growth factor activity in mouse skin carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* 81, 23-27.
- BAIRD W.M. and BOUTWELL R.K., 1971.
Tumor promoting activity of phorbol and four diesters of phorbol in mouse skin. *Cancer Res.* 31, 1074-1079.
- BARRETT J.C. and LAMB P.W., 1985.
Tests with the Syrian hamster embryo cell transformation assay. In Ashby J., De Serres F.J., Draper M., Ishidate M., Margolin B., Matters B., Shelby B.D. (Eds) : *Evaluation of short-term tests for carcinogens*. Amsterdam : Elsevier SC Publ. 623-628.
- BARRETT J.C., WONG A., MC LACHLAN J.A., 1981.
Diethylstilbestrol induces neoplastic transformation of cells in culture without measurable somatic mutation at low loci. *Science*. 212, 1402-1404.

BARRETT J.C. 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.

BARRETT J.C., HESTERBERG T.W. and THOMASSEN D.G., 1984.

Use of cell transformation systems for carcinogenicity testing and mechanistic studies of carcinogenesis. *Pharmacol. Rev.* 36, 535-705.

BARTSCH H., TERRACINI B., MALAVEILLE C., TOMATIS L., WAHRENDORF J., BURN G. and DODET B., 1983.

Quantitative comparison of carcinogenicity, mutagenicity and electrophilicity of 10 direct-acting alkylating agents and of the initial 06 : 7-alkylguanine ratio in DNA with carcinogenic potency in rodents. *Mutat. Res.* 110, 181-219.

BARTSCH H. and TOMATIS L., 1983.

Comparison between carcinogenicity and mutagenicity based on chemicals evaluated in the IARC monographs. *Environ. Health Perspect.* 47, 305-317.

BELMAN S. and TROLL W., 1972.

The inhibition of croton oil-promoted mouse skin tumorigenesis by steroid hormones. *Cancer Res.* 32, 450-454.

BERENBLUM I., 1941.

Carcinogenesis as a biological problem. North Holland Co, Amsterdam.

BERENBLUM I. and SHUBIK P., 1947.

A new quantitative approach to the study of the stages of chemical carcinogenesis in the mouse skin *Br. J. Cancer* 1, 383-389.

BERWALD Y. and SACHS L., 1963.

"In vitro" cell transformation with chemical carcinogens. *Nature (London)* 200, 1182-1184.

BERWALD Y. and SACHS L., 1965.

"In vitro" cell transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. *J. Nat. Cancer. Inst.* 35, 641-661.

BEYER E.C., GOODENOUGH D.A. and PAUL D.L., 1988.

The connexins, a family of related gap junctions proteins. In : Hertzberg E.L. and Johnson R.G. (Eds). *Gap junctions*, Alan R. Liss, Inc. New-York, 165-175.

BIGMANI M., ROSA S., FALCONE G., TATO F., KATOH F., YAMASAKI H., 1988.

Specific viral oncogens cause differential effects on cell-to-cell communication, relevant to the suppression of the transformed phenotype by normal cells. *Mol carcinogen* 1, 67-75.

BISHOP J.M., 1987.

The molecular genetics of cancer. *Science* 235, 305-311.

BOVERI T.H., 1929.

The origin of malignant tumors. Williams and Wilkins, Baltimore MD.

BRADFORD M., 1976.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.

BROOKES P. and LAWLEY P.D., 1964.

Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of mouse skin : relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxyribonucleic acid. *Nature* 202, 781-784.

BROWN K., BUCHMANN A. and BALMAIN A., 1990.

A carcinogen induced mutations in the mouse C-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 538-542.

CAIRNS J., 1975.

Mutation, selection and natural history of cancer. *Nature* 225, 197-200.

CASTAGNA M., TAKAI Y., KAIBUCHI K., SANO K., KIKKAWA U. and NISHIZUKA Y., 1982.
Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.

CAVENEY W.K., DRYJAE T.P., PHILLIPS R.A., BENEDICT W.F., GODBOUT R., GALLIE B.L., MURPHREE A.L., STRONG L.C. and WHITE R.L., 1983.

Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature (London)* 305, 779-784.

CERUTTI P.A., 1985.

Prooxidant states and tumor promotion. *Science* 227, 375-381.

CHEN Y. and HEIDELBERGER C., 1969.

Quantitative studies on the malignant transformation of mouse prostate cells by carcinogenic hydrocarbons "in vitro". *Int. J. Cancer* 4, 166-178.

CHIN B.H., McGLOIN J.E., SPANGLER N.L. and HEILMAN R.D., 1981.

Chlorothalonil equivalents in the blood and urine of rats following oral, endotracheal and dermal administration of ¹⁴C-Chlorothalonil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 258-261.

CHOUROULINKOV I. and LAZAR P., 1974.

Action cancérigène et cocancérigène du 12-0-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate (TPA) sur la peau de souris. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 278, série D, 3027-3030.

CHOUROULINKOV I. and LASNE C., 1978.

Two stage (initiation-Promotion) carcinogenesis in vivo and in vitro. *Bulletin du cancer* 65 (3).

COFFINO P. and LICHUAN CHEN E., 1988.

Nucleotide sequence of the mouse ornithine decarboxylase gene. *Nucleic Acids Research* 16 (6), 2731-2732.

CONWAY R.A., 1982.

Environmental Risk Analysis for chemicals. Van Nostrand Reinhold Co : New-York.

CULLEN J.W., 1986.

Design of cancer prevention studies. *Cancer Detection Prev.* 9, 125-138.

DAVIES P.E., 1985a.

The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. III. Metabolism enzymatic and detoxification in *Salmo* spp. and *Galaxias* spp. *Aquat. Toxicol.* 7, 277-299.

DAVIES P.E., 1985b.

The toxicology and metabolism of chlorothalonil in fish. II. Glutathione conjugates and protein binding. *Aquat. Toxicol.* 7, 265-275.

DAVIES P.E., 1988.

Disappearance rates of chlorothalonil (TCIN) in the aquatic environment. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 405-409.

DEAN N.M., MORDAN L.J., TSE K., MOOBERY S.L. and BOYNTON A.L., 1991.

Okadaic acid inhibits PDGF-induced proliferation decreases PDGF receptor number in C3H/10T1/2 mouse fibroblasts. *Carcinogenesis* 12, 665-670.

- DE BERTOLDI M., GRISELLI M., GIOVANNETTI M. and BARALE P., 1980.
Mutagenicity of pesticides evaluated by means of gene-conversion in *Saccharomyces cerevisiae* and in *Aspergillus nidulans*. *Environ. Mutagenesis* 2, 359-370.
- DE CHATELET L.R., SHIRLEY P.S. and JOHNSON R.B. Jr., 1976.
Effect of phorbol myristate acetate on the oxidative metabolism of human polymorphonuclear leucocytes. *Blood* 47, 545-554.
- DI PAOLO J.A., 1980.
Quantitative *in vitro* transformation of Syrian hamster embryo cells using frozen stored cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 64, 1485-1489.
- DI PAOLO J.A., NELSON R.L. and DONOVAN P.J., 1972.
In vitro transformation of Syrian hamster embryo cells by diverse chemical carcinogens. *Nature* 235, 278-280.
- DI PAOLO J.A., DONOVAN P. and NELSON R., 1969.
Quantitative studies of in vitro transformation by chemical carcinogens. *J. Natl. Cancer Inst.* 42, 867-876.
- DOLL R. and PETO R., 1981.
The causes of cancer : quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J. Natl. Cancer. Inst.* 66, 1191-1308.
- DOTTO G.P., WEINBERG R.A. and ARIZA A., 1988.
Malignant transformation of mouse primary keratinocytes by Harvey sarcoma virus and its modulation by surrounding normal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 6389-6393.
- ELIAS Z., POIROT O., PEZERAT H., SUQUET H., SCHNEIDER O., DANIERE M.C., TERZETTI F., BARUTHIO F., FOURNIER M. and CAVELIER C., 1989.
Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 10, 2043-2052.
- ELIAS Z., 1993.
Transformation et cancérogénèse. Essais en cours de validation. Formation Continue mars 1993, Metz-France.
- EPSTEIN S.S., 1976.
Carcinogenicity of heptachlor and chlordane. *Sci. Total. Environ.* 6, 103-154.
- ESWORTLY R.F., 1985.
Preliminary quantitative usage analysis of chlordane. Washington D.C., US Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs.
- EVERSON R.B., RANDERATH E., SANTELLA R.M., CETALO R.C., AVITTS T.A. and RANDERATH K., 1986.
Detection of smoking related covalent DNA adducts in human placenta. *Science* 231 : 54-57.
- FISCHER S.M., CAMERON G.S., BALDWIN J.K., JASHEWAY D.W., PATRICK K.E. and BELURY M.A., 1989.
The arachidonic acid cascade and multistage carcinogenesis in mouse skin. *Skin Carcinogenesis : Mechanisms and Human Relevance*, 249-264.
- FITZGERALD D.J. and MURRAY A.W., 1980.
Inhibition of intracellular communication by tumor promoting phorbol esters. *Cancer Res.* 40, 2935-2937.

FITZGERALD D.J., MESNIL M., OYAMADA M., TSUDA H., ITO N. and YAMASAKI H., 1989.
Changes in gap junctions protein (connexin 32) gene expression during rat liver carcinogenesis. *J. Cell. Biochem.* 41, 97-102.

FITZGERALD D.J. and YAMASAKI H., 1990.
Tumor Promotion : models and assay systems. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis* 10, 89-102.

FLASCHENTRAGER B., 1930.
Z. Angew. Chem. 43, 1011-1012.

FLOWER R.J. and BLACKWELL G.J., 1979.
Anti-inflammatory steroids induce biosynthesis of a phospholipase A2 inhibitor which prevents prostaglandin generation. *Nature* 278, 29 March.

FUJIKI H. and SUGIMURA T., 1987.
New classes of tumor promoters : Teleocidin, Aplysiatoxin and Palytoxin. In Klein G. and WEINHOUSE S. (Eds). *Advances in Cancer Research*. Academic Press London, vol. 49, 223-264.

FUJIKI H., SUGANUMA M. and SUGIMURA T., 1989.
Significance of new environmental tumor promoters. *Enviro. Carcino. Revs. (J. Envir. Sci. Hlth.)* 7, 1-51.

FUJITA I., IRITA K., TAKESHIGE K. and MINAKAMI S., 1984.
Diacylglycerol, 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol, stimulates superoxide-generation from human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 120, 318-324.

GAINER H.S.T.C. and MURRAY A.W., 1986.
The effect of cAMP on tumour promoter responses mediated by C-Kinase. *Experimental Cell Research* 166, 171-179.

GENTILE J.M., GENTILE G.J., BULTMAN J., SECHRIEST R., WAGNER E.D. and PLEWA M.J., 1982.
An evaluation of the genotoxic properties of insecticides following plant and animal activation. *Mutation Research.* 101, 19-29.

GLIMOUR S.K., AVDALOVIC N., MADARA T. and O'BRIEN T.G., 1985.
Induction of ornithine decarboxylase by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in hamster fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* 260 (30), 16439-16444.

GOLD S., SAWYER C.B., MAGAW R., BACKMAN G.M., DE VECIANA M., LEVINSON R., HOOPER N.K., HAVENDER W.R., BERNSTEIN L., PETO R., PIKE M.C. and AMES B.N., 1984.
A carcinogenic potency data base of the standardized results of animal bioassays. *Environ. Health Perspect.* 58, 9-319.

GOODENOUGH D.A., PAUL D.L. and JESAITIS L., 1988.
Topological distribution of two connexin 32 antigenic sites in intact and split rodent hepatocyte gap junctions. *J. Cell. Biol.* 107, 1817-1824.

GREEN S., 1991.
The search for molecular mechanisms of non-genotoxic carcinogens. *Mutation Research* 248, 371-374.

GRIFFIN D.E. and HILL W.E., 1978.
In vitro breakage of plasmid DNA by mutagens and pesticides. *Mutation Res* 52, 161-169.

GUPTA R.C., 1985.
Enhanced sensitivity of ³²P-postlabeling analysis of aromatic carcinogen : DNA adducts. *Cancer Res* 45, 5656-5662.

GSCHWENDT M., HORN F., KITTSTEIN W. and MARKS F., 1983.

Inhibition of the calcium and phospholipid dependant protein kinase activity from mouse brain cytosol by quercetin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 444-447.

HARRIS C.C., 1991.

Chemical and physical carcinogenesis : advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res. (suppl.)* 51, 5023-5044.

HAYES W.J., 1982.

Pesticide studies in man. Williams and Wilkins, Baltimore, MD, 172-283.

HAYES W.J. Jr, DALES W.E. and BURSE V.W., 1965.

Chlorinated hydrocarbons pesticides in the fat of people in New Orleans. *Life Sci.* 4, 1611-1615.

HAYSTEAD T.A.J., SIM A.T.R., CARLING R.C., TSUKITANI Y., COHEN P. and HARDIE D.G., 1989.

Effects of the tumor promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature* 337, 78-81.

HEBY O., 1981.

Role of polyamines in the control of cell proliferation and differentiation. *Differentiation* 19, 1-20.

HECKER E., 1968.

Cocarcinogenic principles from the seed oil of croton tiglium and from other Euphorbiaceae. *Cancer Res.* 28, 2338-2349.

HERTZBERG E.L. and JOHNSON R.G., 1988.

Gap junctions. Alan R. Liss. Inc. New-York.

HESTERBERG T.W. and BARRETT J.C., 1984.

Dependence of asbestos and mineral dust induced transformation of mammalian cells in culture on fiber dimension. *Cancer Res.* 44, 2170- 2180.

HIGGINSON J. and MUIR C.S., 1977.

Determination of the importance of environmental factors in Human cancer : the role of epidemiology. *Bull. Cancer* 64, 365-384.

HILL J., 1961.

Cautions against the immoderate use of Snuff. Baldwin R. and Jacobson J. (Eds), London.

HORIUCHI N. and ANDO S., 1980.

Contact dermatitis due to pesticides for agricultural use (Jpn). *Jpn. J. Dermatol.* 90. *Pestic. Abstr.* 3, 80-1644.

HUANG M.T., SMART R.C., WONG C.O. and CONNEY A.H., 1991.

Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipooxygenase and cyclooxygenases activities in mouse epiderms. *Cancer Res.* 51, 813-819.

HUEPER W.C., 1966.

Occupational and environmental cancers of the respiratory system. In : *Recent Results in Cancer Res.*, 3, 112-114.

HUGHES M.F., CHAMULITRAT W., MASEN R.P. and ELING T.E., 1989.

Epoxidation of 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene via a hydroperoxide dependent mechanism catalyzed by lipooxygenases. *Carcinogenesis* 10, 2075-2080.

IARC Monographs, 1983.

On the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Volume 30. IARC, Lyon, France.

INFANTE P.F., EPSTEIN S.S. and NEWTON W.A., 1978.

Blood dyscrasias and childhood tumors and exposure to chlordane and heptachlor. Scand.J. Work & Health.

INFANTE P.F. and FREEMAN C., 1978.

Cancer mortality among workers exposed to chlordane. J. Occup. Med. 29, 908-909.

ISOMAA V.V., PAJUNEN A.E., BARDIN C.W. and JÄNNE O.A., 1983.

Ornithine decarboxylase in mouse kidney : purification , characterization and radio immunological determination of the enzyme protein. J. Biol. Chem. 258, 6735-6740.

JÄNNE J., PÖSÖ H. and RAINA A., 1978.

Polyamines in rapid growth and cancer. Biochemica and Biophysica Acta 473, 241-293.

JIANG H., YAMAMOTO S. and KATO R., 1992.

Staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor, augments phorbol ester-cause ornithine decarboxylase induction in mouse epidermis. Carcinogenesis 13, 355-359.

JOHNSON C.J., 1982.

Environmental and Health effects of the nuclear industry and nuclear weapons : a current evaluation. Ecology of Disease 1, 135-152.

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.

KAKUNAGA T. and YAMASAKI H. (Eds), 1985.

Transformation assays of established cell lines : mechanisms and applications. IARC Scientific publications n° 67, Lyon. International Agency for Research on Cancer.

KAM E. and PITTS J.D., 1988.

Effects of the tumor promoter 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate on junctional communication in intact mouse skin : persistence of homologous communication and increase of epidermal-dermal coupling. Carcinogenesis 9, 1389-1394.

KASAI H., YAMAIZUMI Z., WAKABAYASHI K., NAGAO M., SUGIMURA T., YOKOYAMA S., MIYAZAWA T., SPINGARN N.E., WEISBURGER J.H. and NISHIMURA S., 1980.

Potent novel mutagens produced by broiling fish under normal conditons. Proc. Jpn. Acad. 56B, 278-283.

KATO R., NAKADATE T., YAMAMOTO S. and SUGIMURA T., 1983.

Inhibition of 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate induced tumor promotion and ornithine decarboxylase activity by quercetin : possible involvment by lipooxygenase inhibition. Carcinogenesis. 4, 1301-1305.

KAWACHI T., YAHAGI T., KADA T., TAZIMA Y., ISHIDATE M., SASAKI M. and SUGIYAMA T., 1980.

Cooperative programme on short-term assays for carcinogenicity in Japan. In : MONTESANO, Bartsch H. and Tamatis L. (eds). Molecular and cellular aspects of carcinogen screening tests, IARC Scientific Publications n° 27, Lyon, 323-330.

KENNAWAY E.L., 1924.

The formation of a cancer producing substance from isoprene. J. Path. Bact. 27, 233.

KENSLER T.W. and TRUSH M.A., 1981.

Inhibition of phorbol ester-stimulated chemiluminescence in human polymorphonuclear leucocytes by retinoic acid and 5,6-epoxyretinoic acid. *Cancer Res.* 41, 216-222.

KIYOTO I., YAMAMOTO S., AIZU E. and KATO R., 1987.

Staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor, fails to inhibit 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate caused ornithine decarboxylase induction in isolated mouse epidermal cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 740-746.

KNUDSON A.G., 1971.

Mutation and Cancer : statical study of retinoblastoma. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 68, 820-823.

KNUDSON A.G., 1985.

Hereditary cancer, oncogens and antioncogens. *Cancer Res.* 45, 1437-1443.

KOZUMBO W.J., TRUSH M.A. and KENSLER T.W., 1985.

Are free radicals involved in tumor promotion ? *Chem. Biol. Interact.* 54, 199-207.

KUMAR N.M. and GILULA N.B., 1986.

Cloning and characterization of human and rat liver C DNAs coding for a gap junction protein. *J. Cell. Biol.* 103, 767-776.

KURATA M., HIROSE K. and UMEDA M., 1982.

Inhibition of metabolic cooperation in chinese hamster cells by organochlorine pesticides. *Gann.* 73, 217-221.

LASNE C., GENTIL A. and CHOUROULINKOV I., 1974.

Two stage malignant transformation of Syrian hamster cells. *Nature* 247, 490-491.

LAWRENCE T.S., BEERS W.H. and GILULA N.B., 1978.

Hormonal stimulation and cell communication in coculture. *Nature.* 272, 501-506.

LEBOEUF R.A. and 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(5), 689-697.

LEE T.C., OSHIMURA M., BARRETT J.C., 1985.

Comparison of arsenic induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and chromosome effects in syrian hamster embryo cells in culture. *Carcinogenesis.* 6, 1421-1426.

LEVIN W., WOOD A.W., LU A.Y.H., RYAN D., WEST S., THAKKER D., YAGI H., JERINA D.M. and CONNEY A.H., 1977.

Role of purified cytochrome P-448 and epoxide hydase in the activation and detoxification of benzo(a)pyrene. In Jerina D.M. (Ed). *Drug metabolism concepts*, ACS symposium series n° 44. American chemical society, Washington DC, 99-126.

LEVINE L., FUJIKI H., HILDA B., GJIKA B. and VANASKIS H.V., 1990.

Production of antibodies and development of a radioimmunoassay for palytoxin. In Hall S. and Strichartz G. (Eds), *Marine Toxins : origin, structure and molecular pharmacology*. American Chemical Society, Washington DC.

LITCHI U. and GOTTESSMAN M., 1983.

Genetic evidence that a phorbol ester tumor promoter stimulated ornithine decarboxylase activity by a pathway that is independant of cyclic AMP-dependent protein kinases in CHO cells. *J. Cell Physiol.* 113, 433-439

LOEWENSTEIN W.R., 1979.

Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochem. Biophys. Acta.* 560, 1-65.

LOVELESS A., 1969.

Possible relevance of 60 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosamines and nitrosamides. *Nature* 233, 206-207.

LU Y.P., 1988.

Application d'une méthode orthogonale à l'étude de la cancérogénèse chimique en deux phases sur cellules *in vitro*. Thèse de Doctorat, Paris V.

LUTZ W.K., 1979.

In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. *Mutation Research* 65, 289-356.

MADHUKAR B.V., YONEYAMA M., MATSUMURA F., TROSKO J.E. and TSUSHIMOTO G., 1983.

Alteration of calcium transport by tumor promoters, 12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate and p,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane, in the chinese hamster V79 fibroblast cell line. *Cancer Letters* 18, 251-259.

MAY W.S., SAHYOUN N., WOLF M. and CUATRECASAS P., 1985.

Role of intracellular calcium mobilization in the regulation of protein kinase C-mediated membrane processes. *Nature* 317, 549-551.

MEHTA P.P., BERTRAM J.S. and LOWENSTEIN W.R., 1986.

Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell.* 44, 187-196.

MERLETTI F., HESELTINE E., SACACCI R., SIMONATO L., VAINIO H. and WILBOURN J., 1984.

Target organs for carcinogenicity of chemicals and industrial exposure in humans : a review of results in the IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *Cancer Res.* 44, 2244-2250.

MIKALSEN S.O. and SANNER T., 1993.

Intercellular communication in colonies of Syrian hamster embryo cells and the susceptibility for morphological transformation. *Carcinogenesis* 14 (2), 251-257.

MILKS L.C., MUKAR N.M., HOUGTEN R., UNWIN N. and GIBULA N.B., 1988.

Topology of the 32 Kd liver gap junction protein determined by site-directed antibody localizations. *EMBO J.* 7, 2967-2975.

MILLER E.C. and MILLER J.A., 1947.

The presence and significance of bound aminoazo dyes in the livers of rats fed p-dimethylamino-azobenzene. *Cancer Res.* 7, 468-480.

MILLER J.A., 1970.

Carcinogenesis by chemicals : and overview-G.H.A. Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 30, 559-576.

MILLER J.A. and MILLER E.C., 1977.

Ultimate chemical carcinogens as reactive mutagenic electrophiles. In Hiatt H.H., Watson J.D. and Winsten J.A. (Eds), *origins of human cancer (Book B)*, Cold spring Harbor laboratory, Cold spring Harbor, 605-627.

MILLER E.C., 1978.

Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals : Presidential Address. *Cancer Res.* 38, 1479-1496.

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT (MEV), 1990.

Rapport de la Direction de la Prévention des Pollutions. Mission de Contrôle des Produits : Evaluation des risques mutagènes et Cancérogènes liés à l'exposition au chlorothalonil. Février 1990, Rapporteur I. Chouroulinkov.

MINISTERE DE L'ENVIRONNEMENT (MEV), 1991.

Informations complémentaires concernant le chlorothalonil et son emploi pour la protection du bois. XIème réunion de la Commission d'Evaluation de l'Ecotoxicité des Substances Chimiques, Doc. n° 211/911C.

MINTA A., KAO J.P.Y. and TSEIN R.Y., 1989.

Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores. *J. Biol. Chem.* 246, 8171.

MIYAZAKI T., YAMAGISHI T. and MATSUMOTO M., 1985.

Isolation and structure elucidation of some components in technical grade chlordane. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 14, 475-483.

MONDAL S. and HEIDELBERGER C., 1976.

Transformation of C3H/10T1/2 C18 mouse fibroblasts by ultraviolet irradiation and phorbol esters. *Nature* 260, 710-715.

MORGAN D.M.L., 1987.

Polyamines. *Essays in Biochemistry* 23, 83-115.

MORTELMANS K., HOWORTH S., LAWLOR T., SPECK W., TAINER B. and ZEIGER E., 1986.

Salmonella mutagenicity tests : II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ. Mutagenesis* 8 (Suppl. 7), 1-119.

MOSER G.J. and SMART R.C., 1989.

Hepatic tumor-promoting chlorinated hydrocarbons stimulate protein kinase C activity. *Carcinogenesis* 10 (5), 851-856.

MURAKAMI Y., MATSUFUJI S., KAMEJI T., HAYASHI S., IGARASHI K., TAMURA T., TANAKA K. and ICHIHARA A., 1992.

Ornithine decarboxylase is degraded by the 26S proteasome without ubiquitination. *Nature* 30, 597-599.

MURRAY A.W. and FITZGERALD D.J., 1979.

Tumor promoters inhibit metabolic cooperation in cocultures of epidermal and 3T3 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91 (2), 395-401.

National Cancer Institute, 1977.

Bioassay of chlordane for possible carcinogenicity, Technical Report series n° 8, Washington DC, Department of Health, Education and Welfare, Publication N° DHEW (NIH), 77-808.

NCI, 1978.

Bioassay of chlorothalonil for possible carcinogenicity. Tech. Rep. Ser. n° 41, DHEW Publ. n° (NIH) 78-841, Washington DC, US Government Printing Office.

NEWMARK H.L., 1987.

Plant phenolics as inhibitors of mutational and precarcinogenic events. *Can. J. Physiol.* 65, 461-466.

NGUYEN-BA G., CHOUROULINKOV I. et TRUHAUT R., 1988.

Mécanisme épigénétique de la promotion tumorale. Interrelation entre l'inflammation et l'activité d'ornithine décarboxylase induites in vivo par le cancérogène 12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate. *C.R. Acad. Sci., Paris*, 307, série III, 229-234, 1988.

NGUYEN-BA G. and CHOUROULINKOV I., 1989.

Epidermal cell proliferation and modulation of the protective potency of dexamethasone against phorbol ester-induced ornithine decarboxylase activity. *Carcinogenesis* 10 (4), 793-796.

NGUYEN-BA G., ROBERT S., LASNE C., VENTURA L., CHOUROULINKOV I., VAN KREIJL C.F., STEEG H.V. and TRUHAUT R., 1992.

Induction spécifique par l'ester de phorbol de la transcription du gène et de l'activité d'ornithine décarboxylase dans deux lignées de cellules épithéliales témoins et transformées. Effet modulateur des agents anti-inflammatoires. *C.R. Acad. Sci. Paris*, t. 314 (III), 485-492.

NISHIZUKA Y., 1984.

The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 308, 693-698.

NISHIZUKA Y., 1988.

The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.

NOGUSHI N., 1985.

Epidemiological studies of chlordane for termite prevention. II. Metabolism of chlordane in exposed rats. *Okayama Igakkai Zasshi* 97, 327-339 (in Japanese).

NOWELL P.C., 1976.

The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.

NOWELL P.C., 1986.

Mechanisms of tumor progression. *Cancer Res.* 46, 2203-2207.

O'BRIEN T.G., HIETALA O., O'DONNELL K. and HOLMES M., 1987.

Activation of mouse epidermal tumor ornithine decarboxylase by GTP : evidence for different catalytic forms of the enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8927-8931.

OGATA M., IZUSHI F., ETO K., SAKAI R., INOUE B. and NOGUCHI N., 1989.

Effect of chlordane on hepatic mitochondrial respiration. *Toxicology Letters* 48, 67-74.

OKUZUMI J., YAMANE T., KITAO Y., TOKIWA K., YAMAGUSHI T., FUJITA Y., NISHINO H., IWASHIMA A. and TAKAHASHI T., 1991.

Increased mucosal ornithine decarboxylase activity in human gastric cancer. *Cancer Res.* 51, 1448-1451.

PASTI G., RIVEDAL E., YUSPA S.H., HERALD C.L., PETIT G.R. and BLUMBERG P.M., 1988.

Contrasting duration of inhibition of cell-cell communication in primary mouse epidermal cells by phorbol 12,13-dibutyrate and by bryostatin 1. *Cancer Res.* 48, 447-451.

PATRIARCA P., ZATTI M., CRAMER R. and ROSSI F., 1970.

Stimulation of the respiration of polymorphonuclear leucocytes by phospholipase C. *Life Sci.* 9, 841-849.

PAUL D.L., 1986.

Molecular cloning of c DNA for rat liver gap junction protein. *J. Cell. Biol.* 103, 123-134.

PIENTA R.J., 1980.

Evaluation and relevance of the syrian hamster embryo cell system. In Williams G.M., Kroes R., Waaijers H.W., Van de Poll K.W. (Eds). *The predictive value of short term screening tests in carcinogenicity evaluation*, Elsevier/North Holland, Biomedical Press. Amsterdam, 149-169.

PIENTA R.J., LEBHERZ W.B. and SCHUMAN R.F., 1981.

The use of cryopreserved Syrian hamster embryo cells in a transformation test for detecting chemical carcinogens. In : Stick H.F., San R.H.C. (Eds). Short term tests for chemical carcinogens, Springer-Verlag, N.Y., 323-337.

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.

PROBST G.S., McMAHON R.E., HILL L.E., THOMPSON C.Z., EPP J.K. and NEAL S.B., 1981. Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures : a comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds. *Environmental Mutagenesis* 3, 11-32.

RANDERATH E., AVITTS T.A., REEDY M.V., MILLER R.H., EVERSON R.B. and RANDERATH K., 1986.

Comparative ^{32}P analysis of cigarette smoke induced DNA damage in human tissues and mouse skin. *Cancer Res.*, 46 : 5869-5877.

RANDERATH K., REEDY M.V. and GUPTA R.C., 1981.

^{32}P -labelling test for DNA damage. *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6126-6129.

REDDY M.V. and RANDERATH K., 1986.

Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ^{32}P -postlabelling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, 7, 1543-1551.

RETHIER B., PFOHL-LESZKOWICZ P., GUILLEMAUT and KEITH G., 1990.

Benzo(a)pyrene induces nuclear-DNA adducts in plant cell suspension culture. Detection by (^{32}P) post-labelling. *FEBS Lett*, 263, 172-174.

REZNIKOFF C.A., BERTRAM J.S., BRANKOW D.W. and 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 Res.* 33, 3239-3249.

RIVEDAL E. and SANNER T., 1992.

Regulation of gap junctional communication in Syrian hamster embryo cells by retinoic acid and 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis* 13 (2), 199-203.

RIVEDAL E. and SANNER T., 1985.

Retinoids have different effects on morphological transformation and anchorage independent growth of Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 6 (7), 955-958.

RIVEDAL E. and SANNER T., 1982.

Promotional effect of different phorbol esters on morphological transformation on hamster embryo cells. *Cancer Lett.* 17, 1-8.

ROBERT S., 1991.

Rôle de l'ornithine décarboxylase dans le processus de cancérogénèse épigénétique. Induction et modulation de son activité au cours de la transformation cellulaire. Thèse de Doctorat, Université de Metz.

ROCHETTE-EGLY C., 1978.

Contribution à l'étude des altérations membranaires induites par un promoteur de tumeurs, le 12-0-tétradécanoylphorbol-13-acétate dans les cellules embryonnaires de rat en culture secondaire. Thèse de Doctorat, Paris VI.

ROGERS M., BERESTECKY J.M., HOSSAIN M.Z., GUO H., KADLE R., NICHOLSON B.J. and BERTRAM J.S., 1990.

Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and protein. *Molecular carcinogenesis* 3, 335-343.

ROSANOFF K.A. and SIEGEL M.R., 1981.

Mechanisms of action and fate of the fungicide chlorothalonil in biological systems. 3. Interaction with mammalian DNA, histones and isolated rat liver nuclei. *Pestic. Biochem. Physiol.* 6, 120-128.

ROSENG L.E., RIVEDAL E. and SANNER T., 1992.

Effect of cAMP elevating compounds on inhibition of gap junctional communication and induction of morphological transformation in Syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 13, 1803-1809.

ROTELLO R.J., LIEBERMAN R.C., PURCHIO A.F. and GERSHENSON L.E., 1991.

Coordinated regulation of apoptosis and cell proliferation by transforming growth factor beta 1 in cultured uterine epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3412-3415.

RUCH R.J., FRANSSON R., FLODSTROM S., WARNGARD L. and KLAUNIG J.E., 1990.

Inhibition of hepatocyte gap junctional intercellular communication by endosulfan, chlordane and heptachlor. *Carcinogenesis* 11 (7), 1097-1101.

RUSSEL D.H. and SNYDER S.H., 1969.

Amine synthesis in regenerating rat liver : extremely rapid turnover of ornithine decarboxylase. *Mol pharmacol* 5, 253-262.

RUSSEL D.H. and DURIE B.G.M., 1978.

Polyamines as biochemical markers of normal and malignant growth. Rowen Press, New-york.

SAEZ J.C., SPRAY D.C. and HERTZBERG E.L., 1990.

Gap junctions : biochemical properties and functional regulation under physiological and toxicological conditions. *In Vitro Toxicology* 3 (1), 69-73.

SAEZ J.C., CONNER J.A., SPRAY D.C. and BENNETT M.V.L., 1989.

Hepatocyte gap junctions are permeable to a second messenger, inositol 1,4,5 triphosphate and to calcium ions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2708-2712.

SAEZ J.C., SPRAY D.C., NAIRN A.C., HERTZBERG E.L., GREENGARD P. and BENNETT M.V.L., 1986.

CAMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-KDa principal gap junction polypeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2473-2477.

SAKO T., TAUBER A.I., JENG A.Y., YUSPA S.H. and BLUMBERG P.M., 1988.

Contrasting actions of staurosporine a protein kinase C inhibitor, on human neutrophils and primary mouse epidermal cells. *Cancer Res.* 48, 4646-4650.

SAPIENZA C., 1990.

Genome imprinting, cellular mosaicism and carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 3, 118-121.

SASSA T., RICHTER W.W., UDA N., SUGANUMA M., SUGURI H., YOSHIZAWA S., HIROTA M. and FUJIKI H., 1989.

Apparent "activation" of protein kinase by okadaic acid class tumor promoters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 159, 939-944.

SCALABRINO G. and FERIDI M.E., 1981.

Polyamines in mammalian tumors. *Advances in Cancer Research* 35, 151-268.

- SCHEFFNER M., WERNESS B.A., HUIBREGTSE J.M., LEVINE A.J. and HOWLEY P.M., 1990.
The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 63, 1129-1136.
- SCHWARTZ J.A., VIAJE A., SLAGA T.J., YUSPA S.H., HENNINGS H. and LICHTI U., 1977.
Fluocinolone acetonid : a potent inhibitor of mouse skin tumor promotion and epidermal DNA synthesis. *Chem. Biol. Interactions*. 17, 331-347.
- SEELY J.E., PÖSÖ H. and PEGG A.E., 1982.
Effect of androgens on turnover of ornithine decarboxylase in mouse kidney : studies using labeling of the enzyme by reaction with (14C) -difluoromethylornithine. *J. Biol. Chem.* 257, 7549-7553.
- SHUKER D.E., FRIESEN M.D., GARREN L. and PREVOST V., 1991.
A rapid gas chromatography-masse spectrometry method for the determination of urinary-3-methyladenine : application in human subjects. In O'Neill I.K., Chen J. and Bartsch H. (Eds), *Relevance to human cancer of N-Nitrosocompounds, Tobacco Smoke and Mycotoxins*, IARC Sci. Publ. 105, IARC, Lyon, 102-106.
- SIMMON V.F., KAUFMAN K. and TARDIFF R.G., 1977.
Mutagenic activity of chemicals identified in drinking water. *Dev. Toxicol. Environ. Sci.* 2, 249-258.
- SKALKOWSKI M.B. and STALLARD D.E., 1976.
Effect of pH on the hydrolysis of chlorothalonil. *J. Agric. Food Chem.* 25, 208-210.
- SLAGA T.J., FISHER S.M., VIAJE A., BERRY D.L., BRACKEN W.M., LECLERC S. and MILLER D.R., 1978.
Inhibition of tumor promotion by anti-inflammatory agent : an approach to the biochemical mechanism of promotion. In Slaga T.J., Sivak A. and Boutwell R.K. (Eds) *Carcinogenesis : Mechanisms of tumor promotion and carcinogenesis*. Raven Press, New-York, Vol. 2, 173-195.
- SLAGA T.J., 1980.
Anti-inflammatory steroids : potent inhibitors of tumor promotion. In Slaga, T.J. (Ed) *Carcinogenesis : A comprehensive survey*. Raven Press, New-York, Vol. 5, 111-126.
- SOBTI R.C., KRISHAN A. and DAVIES J., 1983.
Cytokinetic and cytogenetic effect of agricultural chemicals on human lymphoid cells in vitro. II : Organochlorine Pesticides. *Arch. Toxicol.* 52, 221-231.
- SOLANKI V., RANA R.S. and SLAGA T.J., 1981.
Diminution of mouse epidermal superoxide dismutase and catalase by tumor promoters. *Carcinogenesis* 2, 1141-1146.
- SPENCER E.Y., 1973.
Guide to the chemicals used in crop protection . Research Branch, Agriculture Canada, Publ. 1093, 6th ed, London, Ont. University of Western Ontario, p. 120.
- SPINDELDREIER A. and DEICHMAN B., 1980.
Contact dermatitis against a wood preservative with a new fungicidal agent (Ger). *Dermatosen* 28, 88-90.
- STALLARD D.E. and WOLF A.L., 1967.
The fate of 2,4,5,6-tetrachloroisophthalonitrile (Daconil 2787R) in soil. Diamond Shamrock Chemical Co. Report.
- SUGANUMA M., FUJIKI H., SUGURI H., YOSHIZAWA S., HIROTA M., NAKAYASU M., OJIKI M., WAKAMATSU K., YAMADA K. and SUGIMURA T., 1988.
Okadaic acid : an additional non phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85, 1768-1771.

SUGIE S., MORI H. and TAKAHASHI M., 1987.

Effect of in vivo exposure to the liver tumor promoters phenobarbital or DDT on the gap junctions of rat hepatocytes : a quantitative freeze-fracture analysis. *Carcinogenesis* 8, 45-51.

SUGIMURA T., KAWACHI T., NAGAO M., YAYAGI T., SEINO Y., OKAMOTO T., SHUDO K., KOSUGE T., WAKABAYASHI K., LITAKA Y. and ITAI A., 1977.

Mutagenic principle(s) in tryptophan and phenylalanine pyrolysis products. *Proc. Jpn. Acad.* 53, 58-61.

SUKUMAR S., 1990.

An experimental analysis of cancer : role of ras oncogenes in multistep carcinogenesis. *Cancer Cells. (Cold Spring Harbor)* 2, 199-204.

SUYIMOTO H., BAER A.R. and WARGOVICH J., 1991.

Heterogeneity of ornithine decarboxylase during mouse colon carcinogenesis and in human colon tumors. *Cancer Res.* 51, 2069-2072.

SUZAKI E., INONE B., OKIMASU E., OGATA M. and UTSUMI K., 1988.

Stimulative effect of chlordane on the various functions of the guinea pig leucocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 93, 137-145.

TABOR C. and TABOR H., 1984.

Polyamines. *Ann. Rev. Biochem.* 53, 749-790.

TAKAMIYA K., 1990.

Interruption of chronic chlordane exposure and plasma residue levels in occupational workers. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.* 44, 905-909.

TAKEDA A., HASHIMOTO E., YAMAMURA H. and SHIMAZU T., 1987.

Phosphorylation of liver gap junction protein by protein kinase C. *Federation of European Biochemical Societies* 210 (2), 169-172.

TACHIBANA K., SCHEWER P.J., TSUKITANI Y., KIKUCHI H., VAN ENGEN D., CLARDY J., GOPICHAND Y. and SHMITZ F.J., 1981.

Okadaic acid acytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 2469-2471.

TAKIGAWA M., VERMA A.K., SIMSIMAN R.C. and BOUTWELL R.K., 1982.

Polyamine biosynthesis and skin tumor promotion : Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-promoted mouse skin tumor formation by the irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, -difluoromethylornithine. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 105, 969-976.

TAMAOKI T., NOMOTO H., TAKAHASHI I., KATO Y., MORIMOTO M. and TOMITA F., 1986.

Staurosporine a potent inhibitor of phospholipid/Ca²⁺-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 135, 397-402.

TELANG S., TONG C. and WILLIAMS G.M., 1982a.

Induction of mutagenesis by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons but not by organochlorine pesticides in the ARL/HGPRT mutagenesis assay. *Naylor Dana Inst. for Disease Prevention, American Hlth. Fdn., Valhalla, New-York* 10595.

TELANG S., TONG G. and WILLIAMS G.M., 1982b.

Epigenetic membrane effects of a possible tumor promoting type on cultured liver cells by the non-genotoxic organochlorine pesticides chlordane and heptachlor. *Carcinogenesis* 3, 1175-1178.

TERZAGHI-HOWE M., 1987.

Inhibition of carcinogen-altered rat tracheal epithelial cell proliferation by normal epithelial cells in vivo. *Carcinogenesis* 8 (1), 145-150.

THASTRUP O., CULLEN P.J., DROBAK B.K., HANLEY M.R. and DAWSON A.P., 1990.
Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca^{2+} stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 2466-2470.

THOMASSEN D.G., GILMER T.M., ANNAB L.A. and BARRETT J.C., 1985.
Evidence for multiple steps in neoplastic transformation of normal and preneoplastic syrian hamster embryo cells following transfection with harvey murine sarcoma virus oncogene (V-Ha-ras). *Cancer Res.* 45, 726-732.

TONG C., FAZIO M. and WILLIAMS G.M., 1982.
Rat hepatocytes-mediated mutagenesis of human cells by carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons but not organochlorine pesticides. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 167, 572-575.

TROLL W. and WIESNER R., 1985.
The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 25, 509-528.

TROSKO J.E., 1979.
Elimination of metabolic cooperation in chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science* 206, 1089-1091.

TROSKO J.E., JONE C. and CHANG C.C., 1984.
The use of in vitro assays to study and to detect tumour promoters. World Health Organization IARC. Models, Mechanisms and Etiology of tumors promotion, IARC Sc Publ. N° 56, Lyon.

TROSKO J.E., YOTTI L.P., WARREN S.T., TSUSHIMOTO G. and CHANG C.C., 1982.
Inhibition of cell-cell communication by tumor promoters. *Carcinogenesis* 7, 565-585.

TSUSHIMOTO G., CHANG C.C., TROSKO J.E. and MATSUMURA F., 1983.
Cytotoxic, Mutagenic and cell-cell communication inhibitory properties of DDT, lindane and chlordane on Chinese hamster cells in vitro. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12, 721-730.

US Tariff commission, 1971.
Synthetic organic chemicals. US Production and Sales - 1969 (TC Publ. 412) Washington DC, US Government Printing Office, 192.

US Environmental Protection Agency, 1987.
Chlordane, heptachlor, aldrin and dieldrin (Technical Report Document). Washington D.C., Office of Pesticides and Toxic Substances.

VAINIO H., HEMMINKI K. and WILBOURN J., 1985.
Data on the carcinogenicity of chemicals in the IARC monograph programme. *Carcinogenesis* 6, 1653-1665.

VASSEUR M., 1989.
Les produits des proto-oncogènes. Dans "Les Virus Oncogènes", Hermann (Eds), 503-549.

VENITT S. and PARRY J.M., 1984.
Background to mutagenicity testing. In Venitt S. and Parry J.M. (Eds), *Mutagenicity testing a practical approach* IRL Press Oxford Washington DC.

VERMA A.K. and BOUTWELL R.K., 1977.

Vitamin A acid (Retinoic acid), a potent inhibitor of 12-O-tetra decanoyl-phorbol-13-acetate induced ornithine decarboxylase activity in mouse epidermis. *Cancer Res.* 37, 2196-2201.

VIGFUSSON N.V., VYSE E.R., PERNSTEINER C.A. and DAWSON R.J., 1983.

In vivo induction of sister-chromatid exchange in *Umbra limi* by the insecticides endrin, chlordane, diazinon and guthion. *Mutation Research* 118, 61-68.

WARIISHI M., SUZUKI and NISHIYAMA K., 1986.

Chlordane residues in normal human blood. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 36, 635-643.

WEINBERG R.A., 1989.

Oncogens, antioncogens and the molecular basis of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* 49, 3713-3721.

WEINSTEIN I.B., 1980.

Evaluating substances for promotion, cofactor effects and synergy in the carcinogenic process. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology* 3, 89-101.

WEINSTEIN I.B., 1988.

The origine of human cancer : Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment. *Cancer Research* 48, 4135-4143.

WEITZMAN S.A., WEITBER A.B., CLARK E.P. and STOSSEL T.P., 1985.

Phagocytes as carcinogens : Malignant transformation produced by human neutrophiles. *Science* 227, 1231-1233.

WESTON A. and BOWMAN E.D., 1991.

Fluorescence detection of benzo(a)pyrene-DNA adducts in human bang. *Carcinogenesis* 12, 1445-1449.

WHO, 1988.

Chlordane Health and Safety Guide. Health and Safety Guide n° 14, Geneva.

WILD C.P., 1990.

Antibodies to DNA alkylation adducts as analytical tool in chemical carcinogenesis. *Mutat. Res.* 233, 219-233.

WILLEY J.C., MOSER C.E. Jr., LECHNER J.F. and HARRIS C.C., 1984.

Differential effects of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate on cultured normal and neoplastic human bronchial epithelial cells. *Cancer Res.* 44, 5124-5126.

WILLIAMS G.M., 1980.

Classification of genotoxic and epigenetic hepatocarcinogens using liver culture assays. *Annals N.Y. Acad. Sci.* 349, 273-282.

WILLIAMS G.M., 1981.

Liver carcinogenesis : the role for some chemicals of an epigenetic mechanism of liver-tumour promotion involving modification of the cell membrane. *Fd Cosmet. Toxicol.* 19, 577-583.

WILLIAMS G.M. and NUMOTO S., 1984.

Promotion of mouse liver neoplasms by the organochlorine pesticides chlordane and heptachlor in comparison to dichlorodiphenyltrichloroethane. *Carcinogenesis* 5, 1689-1696.

WOLF M., LEVINE H., MAY S., CUATRECASAS P. and SAHYOUN N., 1985.

A model for intracellular translocation of protein kinase C involving synergism between Ca^{2+} and phorbol esters. *Nature* 317, 546-549.

- WONG D., MITCHELL C.E., WOLF R.K., MAUDERLY J.L. and JEFFREY A., 1986.
Identification of DNA damage as a result of exposure of rats to diesel engine exhaust. *Carcinogenesis* 7 : 1595-1597.
- WORLD Health Organisation, 1984.
Chlordane. *Environmental Health Criteria* 34, Geneva.
- YAMAGIWA K. and ICHIKAWA K., 1918.
Experimental study of the pathogenesis of carcinoma. *J. Cancer Res.* 3, 1-21.
- YAMAMOTO S., KIYOTO I., AIZU E., NAKADATE T., HOSODA Y. and KATO R., 1989.
Differential inhibition by staurosporine, a potent protein kinase C inhibitor of 12-tetradecanoylphorbol-13-acetate caused skin tumor promotion, epidermal ornithine decarboxylase induction hyperplasia and inflammation. *Carcinogenesis* 10, 1315-1322.
- YAMASAKI H., 1990.
Gap junctional intercellular communication and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11 (7), 1051-1058.
- YAMASAKI H., ENOMOTO T., SHIBA Y., KANNO Y. and KAKUNAGA T., 1985.
Intercellular communication capacity as a possible determinant of transformation sensitivity of BALB/c 3T3 clonal cells. *Cancer research* 45, 637-641.
- YAMASAKI H., HOLLSTEIN M., MESNIL M., MARTEL N. and AGUELON A.M., 1987.
Selective lack of intercellular communication between transformed and nontransformed cells as a common property of chemical and oncogene transformation of BALB/c 3T3 cells. *Cancer research* 47, 5658-5664.
- YOSHIKAWA H. and KAWAI K., 1966.
Toxicity of phthalodinitrile and tetrachlorophthalodinitrile. I. Acute toxicity in mice. *Ind. Health* 4, 11-15.
- YOTTI L.P., CHANG C.C. and TROSKO J.E., 1979.
Elimination of metabolic cooperation in chinese hamster cells by a tumor promoter. *Science* 206, 1089-1091.
- YOUNG S., PARKER P.J. and ULLRICH A., 1985.
Down regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *Biochem. J.* 224, 775-779.
- YUSPA S.H. and POIRIER M.C., 1988.
Chemical carcinogenesis : from animal models to molecular models in one decade. *Adv. Cancer Res.* 50, 25-70.
- YUSPA S.H. and HARRIS C.C., 1982.
Molecular and cellular basis of chemical carcinogenesis. In Schottenfeld and Fraumeni J.F. (Eds), *Cancer Epidemiology and Prevention*, pp 23-43, Philadelphia W.B. Saunders Co.
- ZHANG J.L. and NICHOLSON B.J., 1989.
Sequence and tissue distribution of a second protein of hepatic gap junctions, C x 26, as deduced from its c DNA. *J. Cell Biol.* 109, 3391-3401.
- ZIMMERMAN M.R., 1977.
An experimental study of mummification pertinent to the antiquity of cancer. *Cancer* 40, 1358-1362.

ANNEXE I

Milieux et tampons pour la culture cellulaire.

1 - Milieu de Eagle modifié par Dulbecco (DMEM H16) pH 7,4

Composants	mg/l
NaCl	6400,0
KCl	400,0
CaCl ₂ (anhyd)	200,0
MgSO ₄ 7H ₂ O	200,0
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	125,0
Glucose	1000,0
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	0,1
L-arginine HCL	84,0
L-valine	94,0
Glycine	30,0
L-serine	42,0
L-cystine 2HCl	63,0
L-tyrosine	104,0
choline Cl	4,0
Nicotinamidine	4,0
D-Ca-Pantothenate	4,0
L-Histidine HCl H ₂ O	42,0
L-isoleucine	105,0
L-leucine	105,0
L-lysine HCl	146,0
L-méthionine	30,0
Phénylalanine	66,0
L-thréonine	95,0
L-tryptophane	16,0
Pyridoxal HCl	4,0
Thiamine HCl	4,0
Riboflavine	0,4
Acide Folique	4,0
I-inositol	7,2
L-glutamine	584,0
Rouge de phénol	15,0
NaHCO ₃	3700,0
Pyruvate de Na	110,00

Référence Gibco 074-1600.

2 - Milieu de Eagle modifié par Dulbecco pH 6.7

<u>Amino-acides</u>	mg/l
L-arginine HCL	84
L-cystine	48
L-glutamine	584
Glycocolle	30
L-Histidine H ₂ O	42
L-isoleucine	105
L-leucine	105
L-lysine HCl	146
L-méthionine	30
L-phénylalanine	66
L-sérine	42
L-thréonine	95
L-tryptophane	16
L-tyrosine	72
L-valine	94
Pyruvate-Na	110

<u>Vitamines</u>	mg/l
Acide Folique	4,0
choline Chlorure	4,0
l-Inositol	7,2
Nicotinamide	4,0
D-Ca-Pantothénate	4,0
Pyridoxal HCl	4,0
Riboflavine	0,4
Thiamine	4,0

<u>Sels et autres composants</u>	mg/l
KCl	400
CaCl ₂	200
NaCl	6400
NaHCO ₃	750
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	124
Fe(NO ₃) ₃ 9H ₂ O	0,1
MgSO ₄ 7H ₂ O	200
Glucose	1000
Rouge de phénol	5

Référence : ce milieu a été réalisé sur demande auprès de la maison Eurobio.

3 - Solution de PBS sans calcium ni magnésium.

<u>Composants</u>	<u>g/5 litres eau bidistillée.</u>
NaCl	40,00
KCl	400
NaH ₂ P04H ₂ 0	124
KH ₂ PO ₄	1,00

4 - Solution de trypsine 0,25 % ph 7,00.

<u>Composants</u>	<u>g/5 litres eau bidistillée.</u>
NaCl	40,00
KCl	400
NaH ₂ P04H ₂ 0	124
KH ₂ PO ₄	1,00
Trypsine	12,50

Milieux pour la préparation de l'ADN

- Etoxyéthanol (Riedel de H)

- Tampon SET

100 mM NaCl 585 mg)
20 mM EDTA 584 mg) 100 ml
50 mM Tris 605 mg)
dissoudre et ajuster à pH = 8

- SET/SDS

Tampon SET + 0,5 % SDS → réajuster pH

- Phénol → équilibré avec 0,1 M Tris-HCl pH8

- saturer le phénol avec de l'eau après l'avoir fondu
- 500 ml phénol saturé + 500 ml Tris HCl M pH8
agiter - laisser décanter - soutirer le phénol
- reprendre phénol avec 500 ml Tris-HCl M
faire de même
- reprendre phénol avec 500 ml Tris-HCl 0,1 M pH8
laisser décanter → prendre le pH du Tris qui doit
être de 7,6
- si pH pas bon → remettre 500 ml Tris-HCl M pH8
- congeler le phénol en laissant du Tris-HCl sur le phénol

- Chloroforme + isomylalcool

24 parts chloroforme + 1 part alc. isomylalcool

- Phénol-chloro-alcool isomylalcool

1 part phénol équilibré + 1 part mil. chloro. isomylalcool

- Protéinase K Sigma P0390

préparer extemporanément : 1 mg/ml dans SET/SDS

- RNases A Sigma R 4875

T1 Sigma R 8251

- RNase 1 préparer extemporanément : 0,1 mg/ml dans SET
- RNase T1 vortexer RNase T, suspension dans son flacon
d'origine et additio. T1 à la solution RNase Z pour
avoir 1000 unités/ml

ANNEXE II

Tableau 1a: Résultats du test d'Ames sur le CHLORDANE.
 Nombre de révertants induits par le CHLORDANE sur les différentes souches
 de *Salmonella typhimurium* his⁻, avec (+S₉) ou sans (-S₉) activation métabolique

CHLORDANE µg/bte	Nombre de colonies par boîte							
	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉	-S ₉	+S ₉
0	98±20	87±12	19±6	32±6	217±22	202±36	298±13	323±14
40	109± 5	98± 7	19±7	25±6	199± 8	220±24	302±11	311± 2
64	140±34	108± 4	23±2	28±7	179±40	181±37	315±23	316± 4
128	122±13	108±11	22±5	23±5	202±16	179±36	297±43	350±23
160	125±19	102± 7	20±5	24±9	201±22	183± 7	323±16	343±17
320	109± 5	93±13	16±7	26±5	203±12	191±12	313±20	259±35
Témoins positifs								
9-AA	273±26		57± 3		466±34		716±23	1010±53
2 NF								
NaN ₃								
HC								
B(a)P								
Dt		321±17	85±17		301±15			

Tableau 2a: Résultats du test test d'Ames du CHLOROTHALONIL.

Nombre de révertants induits par le CHLOROTHALONIL sur les différentes souches de *Salmonella typhimurium* his⁻, avec (+S_g) ou sans (-S_g) activation métabolique

CHLOROTHALONIL µg/bte	Nombre de colonies par boîte							
	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	-S _g	+S _g	-S _g	+S _g	-S _g	+S _g	-S _g	+S _g
0	98±20	87±12	19±6	32±6	217±22	202±36	298±13	323±14
0.4	116± 9	100±16	17±3	24±8	235±12	217±21	315± 6	340±18
0.8	86± 6	84± 7	21±6	26±3	227± 5	245±13	302±13	332±23
1.6	109± 8	101±18	21±4	25±6	224±41	228± 8	311±26	315±11
2.4	100±12	93±10	17±2	19±4	210±12	198± 2	311± 6	316±23
4	102± 5	94± 6	18±5	23±5	206± 6	199±13	292±17	306±25
Témoins positifs								
9-AA	273±26		57± 3		466±34		716±33	
2 NF								
NaN ₃								
HC								
B(a)P								
Dt	321±17		85±17		301±15	1010±53		

9-AA : 9 Amino-acridine (40 µg/bte)
 2 NF : 2 Nitrofluorène (0,5 µg/bte)
 NaN₃ : Sodium Azide (2,5 µg/bte)
 HC : Hydroperoxyde de cumène (7,5 µg/bte)
 B(a)P : Benzo(a)pyrène (1 µg/bte)
 Dt : Danthron (50 µg/bte)

Tableau 3a : Résultats d'analyse chimique du percolat T4.
(analyses effectuées par IRH-Nancy selon les
méthodes normalisées AFNOR)

Teneurs en mg/l	T4
PHOSPHORE TOTAL	33,3
N T K	2013
N de NH ₄	1207
D C O	9638
CHLORURES	6800
SULFATES	1164
SULFURES	6,4
CALCIUM	63,9
HYDROCARBURES	12,2
PHENOLS	4,2
CYANURES TOTAUX	0,10
MERCURE	0,001
ARSENIC	0,271
ETAIN	1,07
ZINC	1,23
CUIVRE	0,094
PLOMB	0,72
CHROME	0,97
CADMIUM	0,064

Tableau 4a : Résultats d'analyse chimique du lixiviat B.
(analyses effectuées par IRH-Nancy selon les
méthodes normalisées AFNOR)

Teneurs en mg/l	B
D C O	1094
CHLORURES	72
SULFATES	63
CALCIUM	498
HYDROCARBURES	< 0,1
MERCURE	0,0002
ARSENIC	0,0007
PHENOLS	1,1
CYANURES TOTAUX	0,015
ZINC	0,05
CUIVRE	< 0,25
PLOMB	< 0,05
CHROME	< 0,05
CADMIUM	< 0,05

Tableau 5a : Induction de transformation morphologique sur les (SHE) par le CHLORDANE et le TPA APPLIQUES EN SIMULTANEE.

Concentration µg/ml		Nombre d'application	Taux de clonage %	Nbre de col. trans.	fréquence de transf. %
Chlordane	TPA			Nbre de col.totales	
0	0.1	2	27	35/808	4.3
8	0.1	2	17	56/523	10.7
16	0.1	2	13	46/399	11.5
0	0.1	3	27	130/815	16
8	0.1	3	19	102/571	17.9
16	0.1	3	17	164/453	36.2

Tableau 6a : Effets d'un traitement SEQUENTIEL par le CHLOROTHALONIL ET LE TPA sur les cellules SHE.

Initiation CHLOROTHALONIL		Promotion (TPA)	efficacité de clonage %	Nbre colonies <u>transformées</u>	Taux de transf. %
Conc (µg/ml) 24 h		Conc (µg/ml) x 2 applic.		Nbre colonies totales	
0		0.1	26	44/770	5.7
0.05		0.1	26	24/781	3.1
0.1		0.1	23	40/698	5.7
0.2		0.1	22	36/659	5.5
0.3		0.1	24	50/723	6.9
0.5		0.1	27	31/805	3.9

Tableau 8a : Effets de L'EXTRAIT ORGANIQUE DU LIXIVIAT B sur la transformation des cellules SHE après UNE, DEUX ET TROIS APPLICATIONS.

Protocole	Jour(s) d'application	Volume équivalent lixiviât µl/ml	Efficacité de clonage %	Nbre de col. trans.	Taux de transf. %
				Nbre de col.totales	
I1	J1	0	11	0/339	0
		1.6	17 (9)	4/472	0.9
		3.2	13	1/392	0.3
		16.2	15	11/452	2.4
		162	13	3/395	0.8
I2	J1-J5	0	13	5/392	0.8
		1.6	12	0/373	0
		3.2	11	0/354	0
		16.2	14	0/417	0
		162	11	0/315	0
I3	J1, J3 et J5	0	15	3/440	0.7
		1.6	14	1/423	0.2
		3.2	14	0/414	0
		16.2	14	2/411	0.5
		162	13	3/387	0.8

() nombre de boîtes

Tableau 8a bis : Effet de L'EXTRAIT ORGANIQUE DU LIXIVIAT B, appliqué EN ASSOCIATION AVEC LE TPA ET LE B(a)P, sur la transformation des SHE

Protocole	Initiateur lixiviât * volume µl/ml	Promoteur TPA (J2,J5) µg/ml	Efficacité de clonage %	Nbre de col. trans.	Taux de transf. %
				Nbre de col.totales	
II	0	0.1	31	47/936	5
	1.6	0.1	35	71/1044	6.8
	3.2	0.1	36	55/1090	5.1
	16.2	0.1	32	33/950	3.5
	162	0.1	38	110/1131	9.7
III	Initiateur B(a)P µg/ml	Promoteur B (J2,J5) µl/ml *			
	0.1	0	31	0/924	0
	0.1	1.6	32	12/967	1.2
	0.1	3.2	34	12/1015	1.2
	0.1	16.2	36	10/1072	0.9
	0.1	162	27	3/823	0.4

* volume équivalent du lixiviat B en µl/ml.

Tableau 7a : Effets de l'EXTRAIT ORGANIQUE DU PERCOLAT T4 sur la transformation des cellules SHE après UNE, DEUX ET TROIS APPLICATIONS.

Protocole	jour(s) d'application	Volume équivalent percolat µl/ ml	Efficacité de clonage %	Nbre de col. trans.	Taux de transf. %
				Nbre de col.totales	
I1	J1	0	11	0/339	0
		1.6	17 (8)	6/408	1.5
		3.2	15	6/453	1.3
		16.2	16	17/487	3.5
		162	6 (9)	13/169	7.7
I2	J1 - J5	0	13	5/392	0.8
		1.6	15	21/458	4.6
		3.2	16	6/491	1.2
		16.2	19	10/570	1.8
		162	Tox	-	-
I3	J1, J3 et J5	0	15	3/440	0.7
		1.6	12	30/386	7.7
		3.2	18	12/533	2.3
		16.2	13	19/348	5.5
		162	Tox	-	-

() nombre de boîtes.

Tableau 7a bis : Effets de l'EXTRAIT ORGANIQUE DU PERCOLAT T4 appliqué en ASSOCIATION AVEC LE TPA ET LE B(a)P sur la transformation des SHE.

Protocole	Initiateur percolat T4 volume* µl/ml	Promoteur TPA (J2,J5) µg/ml	Efficacité de clonage %	Nbre de col. trans.	Taux de transf. %
				Nbre de col.totales	
II	0	0.1	30	53/896	5.9
	1.6	0.1	27	48/822	5.8
	3.2	0.1	33	73/1004	7.3
	16.2	0.1	36	165/1093	15.1
	162	0.1	29	98/856	11.5
III	Initiateur B(a)P µg/ml	Promoteur T4 (J2, J5) µl/ml*			
	0.1	0	30	3/807	0.4
	0.1	1.6	27	4/815	0.5
	0.1	3.2	34	7/1015	0.7
	0.1	16.2	31	10/941	1.1
	0.1	162	22	10/654	1.5

* volume de équivalent de percolat T4 en µl/ml.

Genotoxicity of Hazardous Leachates from Solid Wastes Evaluated for Environmental Impact with the Ames Test

H. BESSI

*Faculté des Sciences de Meknès,
B.P. 4010, Beni M'hamed, Meknès, Maroc*

J.F. FERARD and P. VASSEUR*

*Centre des Sciences de l'Environnement,
1, rue des Récollets, 57000 Metz, France*

F. COLIN

*Institut de Recherche Hydrologiques,
11 bis, rue Gabriel Péri, 54500 Vandoeuvre les Nancy, France*

E. BELKHADIR

*Faculté des Sciences de Meknès,
B.P. 4010, Beni M'hamed, Meknès, Maroc*

ABSTRACT

Fourteen series of toxic wastes from various origins (metallurgy, chemical industries, incinerators, industrial treatment plants, etc.) have been studied for their genotoxic properties with the *Salmonella* reversion assay. To consider realism of environmental impact, a strategy is proposed to assess genotoxicity of the water-soluble fraction of the wastes. Water-extractable micropollutants were further concentrated by liquid-liquid extraction or lyophilization prior to genotoxicity testing.

None of the 14 crude aqueous fractions was shown to be mutagenic. On the contrary, positive responses were registered on the concentrated phases of two solid wastes derived from one chemical industry and from the treatment of organophosphorus wastewaters. Chemical analysis did not reveal the presence of known mutagens in the positive extracts. Interacting effects between micropollutants is thus hypothesized to explain genotoxicity.

* To whom all correspondence should be addressed.

Environmental Toxicology and Water Quality: An International Journal

Vol. 7, 71-86 (1992)

© 1992 John Wiley & Sons, Inc.

CCC1053-4725/92/01071-16\$04.00

INTRODUCTION

Solid industrial toxic wastes are complex mixtures of substances that can potentially threaten the quality of the environment through water infiltration and runoff. A study of their environmental impact is necessary in order to monitor their discharge under the safest conditions. Their mutagenic potential certainly deserves to be evaluated as genotoxicity is by far the most feared of the toxic effects displayed by environmental contaminants.

Genotoxicity studies are generally conducted on organic concentrated extracts of solid wastes (Hopke *et al.*, 1982; Babish *et al.*, 1983; Donnelly *et al.*, 1985, 1987a, 1987b; Kocan *et al.*, 1986; Fabacher *et al.*, 1988; Engl *et al.*, 1988; West *et al.*, 1988). Nevertheless, studies on water extracts or water leachates seem more realistic and appropriate in order to determine the environmental impact of solid wastes. The latter strategy was followed in our study, where the environmental impact of 14 hazardous industrial wastes from various origins was evaluated with respect to genotoxicity.

Mutagenicity assays were initially carried out on the crude aqueous phase obtained after water extraction and then on concentrated fractions of water-extractable micropollutants.

Samples displaying genotoxicity were analytically characterized in order to establish relationships between chemical composition and mutagenic activity.

Mutagenicity was evaluated by means of the Ames test. This bioassay has been shown to be well suited for the screening of complex mutagenic environmental mixtures. It is rapid and easy to carry out as compared to other more sparingly used assays with eukaryotic cells. In fact, most investigations on the genotoxicity of hazardous waste extracts were carried out with the *Salmonella* reversion test.

The *Salmonella* assay has been used in the screening of treatment plant sewage (Hopke *et al.*, 1982; Babish *et al.*, 1983); aquatic sediments (Donnelly *et al.*, 1987a; Fabacher *et al.*, 1988; West *et al.*, 1988); industrial wastewaters (Van Hoof and Verheyden, 1981; Holmbom *et al.*, 1984; Donnelly *et al.*, 1985; Meier *et al.*, 1987; De Marini *et al.*, 1987a, 1987b; Waters *et al.*, 1989); and river, underground, recycled, treated, and tap waters (Prein *et al.*, 1978; Gruener *et al.*, 1979; Heartlein *et al.*, 1981; De Marini *et al.*, 1982; Athanasiou *et al.*, 1983; Douglas *et al.*, 1986).

The *Salmonella* assay was shown to be as sensitive as eukaryotic bioassays used in the mutagenicity testing of environmental samples, which comprised surface waters, contaminated effluents, wastewaters (Heartlein *et al.*, 1981; De Marini *et al.*, 1982, 1987a, 1987b; Athanasiou

et al., 1983; Meier *et al.*, 1987; Waters *et al.*, 1989), treatment plant sewage (Hopke *et al.*, 1982), and aquatic sediment (Donnelly *et al.*, 1987a, 1987b). The eukaryotic bioassays employed were reverse mutation bioassay on *zea mays*, micronucleus test, DNA repair test, UDS, sister chromatid exchanges, and chromosomal aberrations on CHO or other cells.

Nevertheless, a few studies have shown that mammalian *in vitro* bioassays may be more sensitive than the *Salmonella* test for detecting mutagenicity in raw, recycled, and treated waters (Gruener *et al.*, 1979; Douglas *et al.*, 1986), and aquatic sediment (Engl *et al.*, 1988; Fabacher *et al.*, 1988; West *et al.*, 1988).

In vivo assays have also been conducted to evaluate the genotoxic potential of such wastes, but to a lesser extent. Aquatic sediments, effluents, and river waters were shown to be genotoxic when tested with sister chromatid exchange and/or chromosomal aberrations tests on fish (Prein *et al.*, 1978; Hooftman and Vink, 1981; Van der Gaag and Van de Kerkhoff, 1985; Kocan *et al.*, 1986). However, many practical problems may be encountered with such tests. Generally, these experiments are difficult to conduct with complex toxic mixtures. They are also more expensive and time-consuming than microbial bioassays. Moreover, when extracts have to be tested, *in vivo* genotoxicity experiments are impractical because extracts are usually available in only small quantities.

MATERIALS AND METHODS

Test Samples

The complex environmental mixtures studied consisted of 14 different industrial wastes whose origins are illustrated in Table I. Leaching procedure was as follows:

- Thirty grams of solid waste was extracted three times with 1 : L of demineralized water for 16 h. The three aqueous extracts were combined, and pH was adjusted to a value inside 5.5 and 8.5.
- Fifty milliliters of the crude aqueous extract was stored at 4°C until mutagenicity testing. The remaining volume was divided into two parts, which were used for liquid-liquid extraction and lyophilization (Fig. 1).

Concentration of Organic Pollutants by Liquid-Liquid Extraction

Extractions were performed from the crude aqueous sample with the organic solvent, dichloromethane, at pH 7, 12, and 2.

TABLE I

Mutagenicity of 14 industrial solid wastes evaluated with the Ames test conducted on crude water extracts, and two concentrated fractions

Sample	Origin of solid industrial wastes	Mutagenic response			
		Crude extract	Concentrated fraction		
			Liquid-liquid extraction	Lyophilization	
A	Slags from lead industry	-	-	-	-
B	Slags from zinc industry	-	-	-	-
C	Incinerator dusts from a chemical industry	-	-	-	-
D	Electrofilter ashes from a garbage furnace	-	-	-	-
E	Incinerator residues from a chemical industry	-	-	-	-
F	Sludges from a settling tank of a chemical industry	-	+	-	-
G	Sludges from the treatment of crystal glass work wastewaters	-	-	-	-
H	Slags from lead industry	-	-	-	-
I	Sludges from the biological treatment of cosmetic manufacture wastewaters	-	-	-	-
J	Paint sludges	-	-	-	-
K	Filtration residues from the treatment of organophosphorus wastewaters	-	+	-	+
L	Degreaser residues from an industrial treatment plant	-	-	-	-
M	Sludges from an abrasive manufacture	-	-	-	-
N	Paint sludges	-	-	-	-

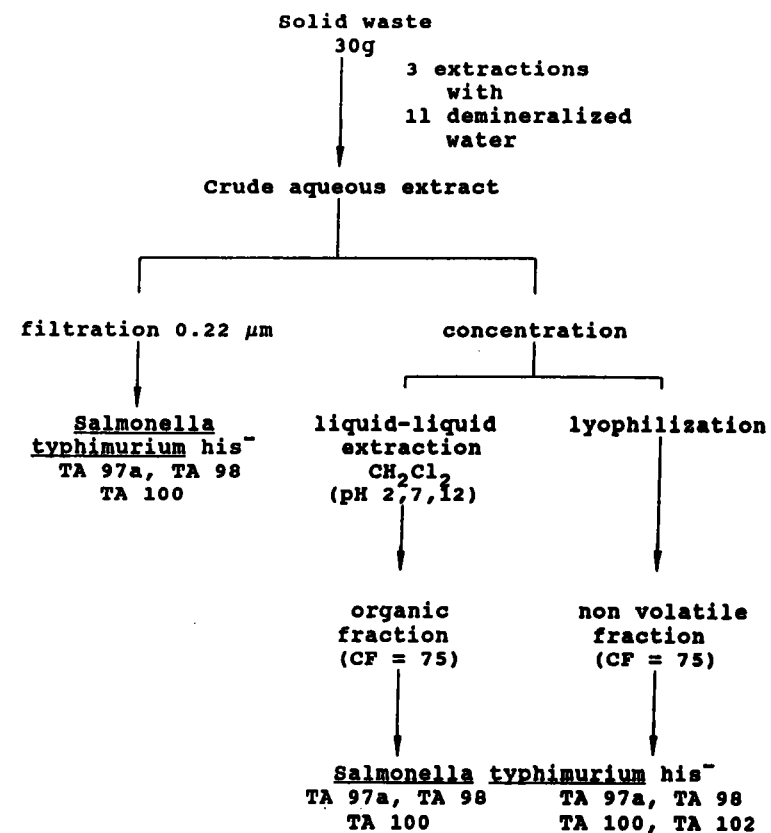


Fig. 1. Sample processing scheme (CF: = concentration factor.)

For each pH, extraction was repeated twice. The aqueous phase was adjusted to the required pH with NaOH (5N) or HCl (5N). The organic extracts were dried over anhydrous sodium sulphate. The extracts were then combined and the solvent was removed on a rotavapor. The residue was dissolved in 6.3 mL of dimethyl sulfoxide in order to fulfill the *Salmonella* bioassay requirements. The concentration factor was therefore 75. A higher concentration factor could not be obtained, due to the limited volume of aqueous extracts available.

Concentration of Mineral and Nonvolatile Organic Pollutants by Lyophilization

Aliquots of the crude leachate were lyophilized (Hetosicc CD52 lyophilizer). The dried residues were dissolved with an adequate volume of

sterile bidistilled water; the concentration factor was the same as for organic concentrates.

Bacterial Tester Strains

The standard tester strains—TA97a, TA98, TA100, and TA102—of *Salmonella typhimurium* were kindly supplied by Dr. Bruce N. Ames (University of California, Berkeley, CA). The plate incorporation assay was conducted according to Maron and Ames (1983).

The crude aqueous samples, the organic extracts, and the freeze-dried samples were tested in duplicate in two independent experiments; a minimum of five dose levels of each sample were studied with and without enzyme activation.

Crude sample and organic extracts were tested on the standard set of tester strains—TA97a, TA98, and TA100. The freeze-dried samples were also tested on TA102 strain, because they may have contained oxidative agents selectively revealed by this strain. Preliminary tests ensured that final dose levels selected were outside the toxic range to *Salmonella* strains. Revertant colonies were counted after 48–72 h of incubation at 37°C. The response was considered positive when the average for at least one dose level was greater than twice the average response for the solvent control.

Positive and negative controls were included in each experiment. Direct positive controls were sodium azide (10 µg/plate) for TA100, 9-aminoacridine (40 µg/plate) for TA97a, 2-nitrofluorene (0.5 µg/plate) for TA98, and cumene hydroperoxide (75 µg/plate) for TA102. Benzo(a)-pyrene (1 µg/plate) was used with every strain, except TA102, in order to ensure performance of the metabolic enzyme activity of the S_9 fraction. Dimethyl sulfoxide and sterilized water were used as negative controls.

The crude samples and freeze-dried fractions were filtered through a 0.22-µm membrane to ensure sterility, which was further checked on 0.1-mL aliquots.

Metabolic Activation System

Metabolic activation in the mutagenicity assay was as described by Ames (1975). Microsomal enzymes were obtained from rats (Sprague-Dawley) induced with Aroclor 1254. The activity of the S_9 mix was evaluated on TA98, using different dose levels of benzo(a)pyrene (Fig. 2). Afterward, 2.5% S_9 mix were chosen for metabolic activation in all experiments.

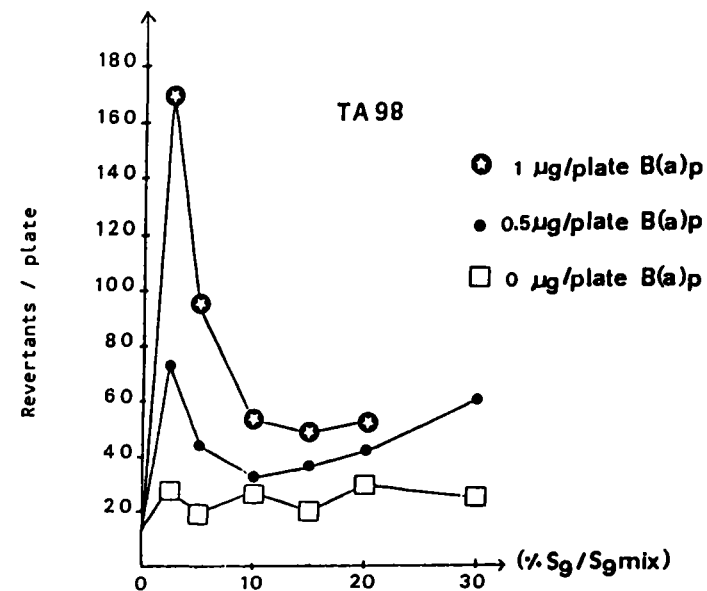


Fig. 2. Dose-response effects of benzo(a)pyrene in the presence of different concentrations of S_9 .

RESULTS AND DISCUSSION

Table I summarizes the results obtained with the *Salmonella* bioassay. All of the 14 crude samples gave a negative response on TA98, TA97a, and TA100, with or without metabolic activation. The highest dose of each sample tested for mutagenicity (500 µL/plate) did not increase the spontaneous mutation frequency in the experimental conditions used. Unconcentrated samples could then be considered as nontoxic and non-mutagenic.

Toxicity experiments conducted on organic extracts with a volume of 100 µL/plate revealed that 4 samples (H, I, K, L) were toxic. Therefore, the quantities tested for mutagenicity were reduced for these extracts and did not exceed 50 µL. The Ames assays showed that mutagenicity was registered with the F and K organic concentrated fractions. These results are presented in Table II.

The F organic extract gave a clear positive response with TA98 and TA97a. Only a slight mutagenic activity was detected with TA98 without enzymatic activation. The addition of S_9 mix increased mutagenic activity. A positive response on TA97a was detected only after the addition of S_9 mix. Only a slight mutagenic activity was registered

TABLE II
Results of the *Salmonella* assays carried out on the concentrated organic fraction of the F and K water leachates

Sample	Assay no.	Dose per plate μL or μg^a	Total His ⁺ revertants per plate Mean $\pm$ SD					
			TA98		TA97a		TA100	
			- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉
F	I	0	11 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1	103 $\pm$ 6	121 $\pm$ 4	75 $\pm$ 21	87 $\pm$ 16
		25	13 $\pm$ 4	32 $\pm$ 1 ^c	121 $\pm$ 9	184 $\pm$ 13	97 $\pm$ 1	117 $\pm$ 6
		50	14 $\pm$ 2	49 $\pm$ 4 ^c	119 $\pm$ 1	179 $\pm$ 25	96 $\pm$ 1	149 $\pm$ 3
		100	26 $\pm$ 2 ^c	61 $\pm$ 3 ^c	104 $\pm$ 7	245 $\pm$ 5 ^c	88 $\pm$ 4	177 $\pm$ 22 ^c
	B(a)p ^b	1	—	170 $\pm$ 18	—	678 $\pm$ 67	—	379 $\pm$ 49
	NaN ₃ ^b	10	—	—	—	—	2050 $\pm$ 23	—
	II	0	17 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	94 $\pm$ 3	110 $\pm$ 8	99 $\pm$ 1	103 $\pm$ 0
		50	16 $\pm$ 1	67 $\pm$ 8 ^c	92 $\pm$ 13	158 $\pm$ 64	105 $\pm$ 19	131 $\pm$ 43
		100	16 $\pm$ 3	107 $\pm$ 25 ^c	119 $\pm$ 14	215 $\pm$ 11 ^c	112 $\pm$ 1	177 $\pm$ 8
		200	15 $\pm$ 1	179 $\pm$ 9 ^c	137 $\pm$ 3	278 $\pm$ 7 ^c	120 $\pm$ 0	198 $\pm$ 0
	B(a)p	1	—	124 $\pm$ 1	—	412 $\pm$ 121	—	352 $\pm$ 49
	NaN ₃	10	—	—	—	—	2044 $\pm$ 6	—
K	I	0	11 $\pm$ 2	16 $\pm$ 1	103 $\pm$ 6	121 $\pm$ 4	75 $\pm$ 21	87 $\pm$ 16
		10	29 $\pm$ 4 ^c	42 $\pm$ 4 ^c	323 $\pm$ 57 ^c	735 $\pm$ 210 ^c	94 $\pm$ 18	283 $\pm$ 27 ^c
		25	10 $\pm$ 1	23 $\pm$ 6	21 $\pm$ 12	139 $\pm$ 16	0	0
		50	0	0	0	0	0	0
	B(a)p	1	—	170 $\pm$ 18	—	678 $\pm$ 67	—	379 $\pm$ 49
	NaN ₃	10	—	—	—	—	2050 $\pm$ 23	—
	II	0	17 $\pm$ 2	22 $\pm$ 3	94 $\pm$ 3	110 $\pm$ 8	99 $\pm$ 1	103 $\pm$ 0
		5	20 $\pm$ 4	33 $\pm$ 4	782 $\pm$ 18 ^c	841 $\pm$ 30 ^c	193 $\pm$ 18 ^c	240 $\pm$ 26 ^c
		10	27 $\pm$ 1	39 $\pm$ 1	736 $\pm$ 4 ^c	836 $\pm$ 30 ^c	83 $\pm$ 26	207 $\pm$ 4 ^c
		15	21 $\pm$ 4	42 $\pm$ 6	259 $\pm$ 78 ^c	572 $\pm$ 10 ^c	22 $\pm$ 8	105 $\pm$ 33
	B(a)p	1	—	124 $\pm$ 1	—	412 $\pm$ 121	—	352 $\pm$ 44
	NaN ₃	10	—	—	—	—	2044 $\pm$ 6	—

^a Doses of positive controls expressed in $\mu\text{g}/\text{plate}$.

^b B(a)p: benzo(a)pyrene; NaN₃: sodium azide.

^c Positive results.

with TA100 with S_9 mix. These results revealed that direct and indirect mutagens were present in this organic extract, which displayed selective effects on the bacterial strains.

No mutagenic response was detected with the lyophilized extract of the F sample.

Chemical analysis of the F organic extract revealed the presence of benzenic compounds, but no polycyclic aromatic hydrocarbons were detected (Fig. 3).

The chemicals identified are not known to be mutagenic. This suggests that interacting effects between micropollutants may be responsible for the genotoxic response.

The K organic extract was mutagenic with the three strains TA97a, TA98, and TA100 (Table II). The mutagenic response in the two strains (TA98 and TA100) was positive only with metabolic activation, while TA97a exhibited a clear positive response with or without S_9 mix, the addition of enzymatic mixture increased the mutagenic potential of this sample.

TA97a was the most sensitive strain with respect to mutagenicity of the K organic extract: the efficiency of 5 μ L/plate in inducing the number of revertants was more than twice the activity of 1 μ g/plate benzo(a)pyrene (Table II). Considering that organic micropollutants in the organic extract were 75 times more concentrated than in the aqueous leachate suggests that a mutagenic response could have been obtained on TA97a with 375 μ L of the crude aqueous extract. However, this was not observed as a volume of 500 μ L did not increase the number of revertants. This discrepancy in these results leads to the hypothesis that interacting effects between micropollutants could depend on their concentrations and on the extraction solvent used; another explanation is that genotoxic compounds of the crude aqueous extract were adsorbed on suspended particles—thus, they were retained on the 0.22- μ m membrane, but could be extracted by dichloromethane.

A mutagenic response was also obtained with the lyophilized fraction of leachate K (Table III). TA98 was the only strain exhibiting a clear positive response, with and without metabolic activation.

The addition of S_9 mix increased the mutagenic activity while decreasing the toxicity of the tested sample.

These results indicate that the micropollutants contained in the organic and lyophilized concentrates displayed genotoxic properties differing qualitatively as they related to different *Salmonella* strains. These results suggest that the nature of the micropollutants in the two concentrated fractions is not the same. They also emphasize that using several methods of concentration applied to different classes of chemicals is necessary for a valuable mutagenicity screening of complex

TABLE III
Results of the *Salmonella* assays carried out on the lyophilized fraction of the K water leachate

Sample	Assay No.	Dose per plate μ L or μ g ^a	Total His ⁺ revertants per plate Mean $\pm$ SD					
			TA98		TA97a		TA100	
			- S_9	+ S_9	- S_9	+ S_9	- S_9	+ S_9
K	I	0	20 $\pm$ 4	25 $\pm$ 0	134 $\pm$ 23	175 $\pm$ 10	88 $\pm$ 0	90 $\pm$ 4
		5	22 $\pm$ 4	80 $\pm$ 1 ^c	142 $\pm$ 52	104 $\pm$ 2	70 $\pm$ 4	70 $\pm$ 1
		10	20 $\pm$ 2	87 $\pm$ 4 ^c	161 $\pm$ 29	118 $\pm$ 12	60 $\pm$ 6	72 $\pm$ 4
		25	22 $\pm$ 1	23 $\pm$ 2	136 $\pm$ 33	186 $\pm$ 6	37 $\pm$ 10	67 $\pm$ 3
		50	17 $\pm$ 7	25 $\pm$ 3	149 $\pm$ 1	189 $\pm$ 13	13 $\pm$ 3	67 $\pm$ 1
	B(a)p ^b NaN ₃ ^b 9-AA ^b 2-NF ^b CHP ^b	100	19 $\pm$ 0	25 $\pm$ 10	153 $\pm$ 32	151 $\pm$ 18	15 $\pm$ 0	65 $\pm$ 4
		1	—	167 $\pm$ 13	—	614 $\pm$ 48	—	195 $\pm$ 32
		10	—	—	—	—	642 $\pm$ 90	—
		20	—	—	428 $\pm$ 12	—	—	—
		0.5	140 $\pm$ 18	—	—	—	—	—
II		75	—	—	—	—	—	—
		0	14 $\pm$ 3	27 $\pm$ 1	119 $\pm$ 21	181 $\pm$ 35	85 $\pm$ 2	108 $\pm$ 11
		0.25	24 $\pm$ 1 ^c	31 $\pm$ 1	138 $\pm$ 2	165 $\pm$ 25	82 $\pm$ 1	98 $\pm$ 7
		0.5	36 $\pm$ 8 ^c	36 $\pm$ 1	134 $\pm$ 1	150 $\pm$ 11	103 $\pm$ 2	91 $\pm$ 2
		1	44 $\pm$ 0 ^c	46 $\pm$ 5	141 $\pm$ 11	196 $\pm$ 18	84 $\pm$ 0	98 $\pm$ 6
	B(a)p NaN ₃ 9-AA 2-NF CHP	2.5	47 $\pm$ 0 ^c	61 $\pm$ 11 ^c	138 $\pm$ 15	248 $\pm$ 18	103 $\pm$ 19	98 $\pm$ 2
		5	26 $\pm$ 1	81 $\pm$ 5 ^c	125 $\pm$ 5	317 $\pm$ 8	101 $\pm$ 5	85 $\pm$ 8
		10	19 $\pm$ 4	88 $\pm$ 6 ^c	112 $\pm$ 17	254 $\pm$ 5	78 $\pm$ 4	98 $\pm$ 9
		100	17 $\pm$ 10	30 $\pm$ 11	129 $\pm$ 19	156 $\pm$ 40	46 $\pm$ 17	79 $\pm$ 6
		1	—	127 $\pm$ 1	—	308 $\pm$ 31	—	251 $\pm$ 5
III	B(a)p NaN ₃ 9-AA 2-NF CHP	10	—	—	—	—	2060 $\pm$ 17	—
		20	—	—	428 $\pm$ 12	—	—	—
		0.5	120 $\pm$ 2	—	—	—	—	—
		75	—	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	1431 $\pm$ 87	—

^a Doses of positive controls expressed in μ g/plate.

^b B(a)p: benzo(a)pyrene; NaN₃: sodium azide; 9-AA: 9-aminoacridine; 2-NF: 2-nitrofluorene; CHP: cumene hydroperoxide.

^c Positive results.

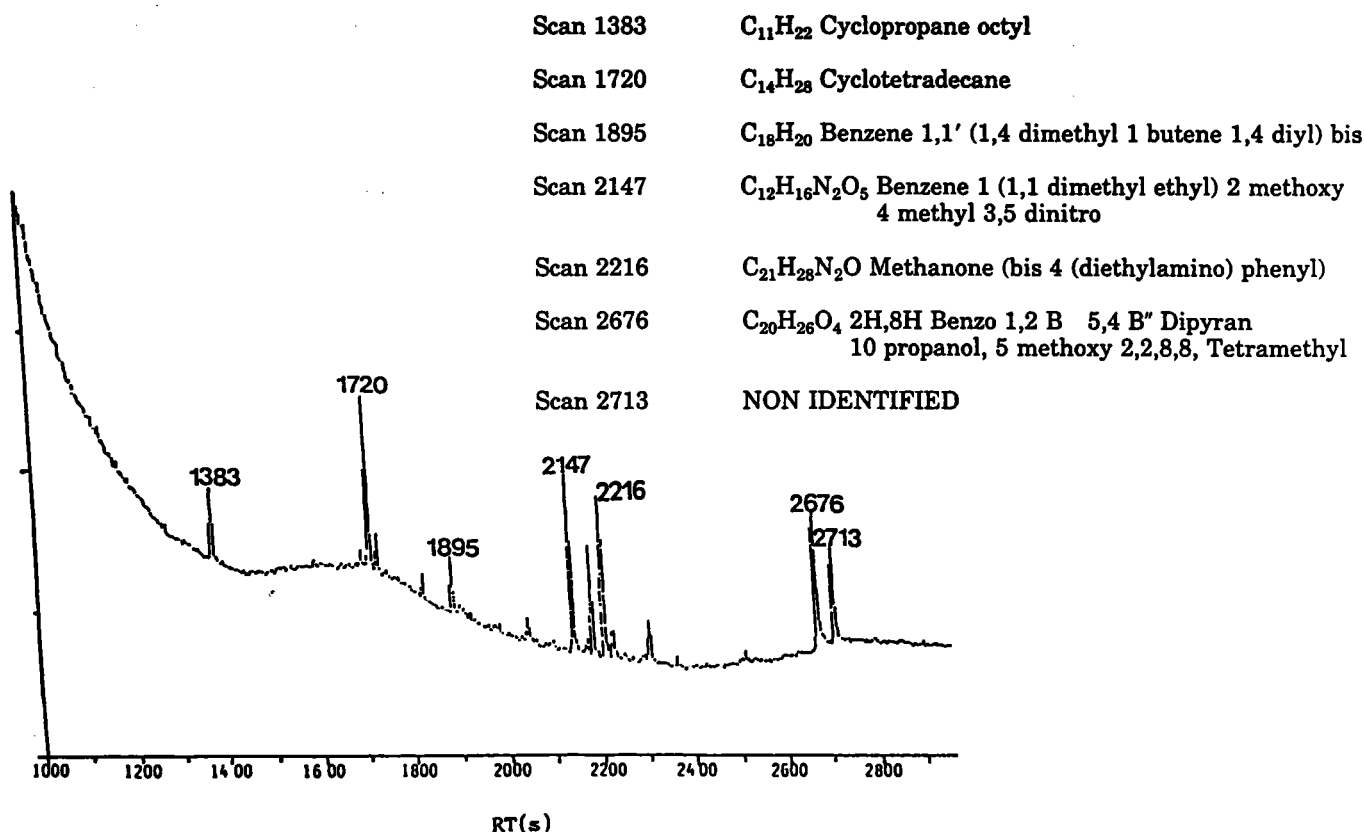


Fig. 3. CPG/MS chromatogram of the F organic fraction.

TABLE IV
Identified compounds in organic extract of K leachate by GC/MS

Compound	Formula	Order of concentration
Phosphorodithioic acid, dipropyl ester	$C_6H_{15}O_2P_1S_2$	≥ 10 mg/L
5 Chloro 2(3H) benzoxazolone	$C_7H_4Cl_1NO_2$	≥ 10 mg/L
Phosphorodithioic acid S,S'-methylene-O,O',O'-tetraethylester	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$	≥ 10 mg/L
Phosphorodithioic acid S [(6-chloro-2-oxo-3(2H)-benzoxazolyl)methyl] O,O' diethyl ester	$C_{12}H_{15}Cl_1N_1O_4P_1S_2$	≥ 10 mg/L
Dioctyl phthalate	$C_{24}H_{38}O_4$	≥ 10 mg/L
Phosphorothioic acid S_2 (1-cyano-1-methylethyl)amino-2-oxo	$C_{10}H_{19}N_2O_4P_1S_1$	Traces
Phosphorothioic acid S (chloromethyl)O,O',diethylester		Traces
2(3H) benzoxazolone 5 chloro	$C_7H_4Cl_1NO_2$	Traces
6 Phenyl 2 pyridone		Traces
Soufre 8.S8		Traces

liquid samples. The chemicals identified in the organic extract were organophosphorus compounds (Table IV). None of the identified substances are known to be mutagenic.

It is possible that the concentrations of the reactive genotoxic compounds in the mutagenic fractions were below the detection limits of the analytical instruments. Interacting effects of combined micropollutants is another plausible hypothesis explaining genotoxic activity.

None of the 12 other wastes containing inorganic residues derived from metallurgy, incinerator dusts and ashes released pollutants displaying mutagenicity under our experimental conditions.

These results suggest that wastes containing organic substances may be more environmentally harmful than mineral residues. Nevertheless, screening a wide variety of industrial wastes is necessary for corroboration of this statement.

CONCLUSION

The conclusion of this work is that 2 samples among 14 industrial solid wastes tested were mutagenic. These were sludges from a chemical industry and residues from the treatment of organophosphorus wastewaters.

The experimental strategy consisted of studying the genotoxicity of water-soluble micropollutants released from solid wastes, which is realistic and representative of actual environmental conditions. It obviates criticism on the significance of positive results for the aquatic environment: this would arise from exclusively undertaking an organic extraction of micropollutants of the solid wastes, as is generally done.

This study clearly shows that genotoxic compounds can be removed from industrial wastes by water leaching. It would be valuable to apply such genotoxicity screening to a wide variety of industrial wastes; it could provide useful information for improving the monitoring of toxic wastes in controlled discharges.

This research was sponsored jointly by the Ministry of Environment and the Ministry of Foreign Affairs, within a cooperative program between the Universities of Meknes and Metz. The authors are grateful for their financial aid.

References

- Ames, B.N., J. McCann, and E. Yamazaki. 1975. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*-mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31:347-364.
- Athanasiou, K., and S.A. Kyrtopoulos. 1983. Mutagenic and clastogenic effects of organic extracts from the Athenian drinking water. *Sci. Total. Environ.* 27:113-120.
- Babish, J.G., B.E. Johnson, and D.J. Lisk. 1983. Mutagenicity of municipal sewage sludges of American cities. *Environ. Sci. Technol.* 17:272-277.
- De Marini, D.M., D.J. Brusick, and J. Lewtas. 1987b. Use of limited protocols to evaluate the genotoxicity of hazardous wastes in mammalian cell assays: Comparison to *Salmonella*. *J. Toxicol. Environ. Health.* 22:225-239.
- De Marini, D.M., J.P. Inmon, J.E. Simmons, E. Berman, T.C. Pasley, S.H. Warren, and R.W. Williams. 1987a. Mutagenicity in *Salmonella* of hazardous wastes and urine from rats fed these wastes. *Mutat. Res.* 189:205-216.
- De Marini, D.M., M.J. Plewa, and H.E. Brockman. 1982. Use of four short-term tests to evaluate the mutagenicity of municipal water. *J. Toxicol. Environ. Health.* 9:127-140.
- Donnelly, K.C., K.W. Brown, and D. Campbell. 1987a. Chemical and biological characterization of hazardous industrial waste. I. Prokaryotic bioassays and chemical analysis of a wood-preserving bottom-sediment waste. *Mutat. Res.* 180:31-42.
- Donnelly, K.C., K.W. Brown, and B.R. Scott. 1987b. Chemical and biological characterization of hazardous industrial waste. II. Eukaryotic bioassay of a wood-preserving bottom sediment. *Mutat. Res.* 180:43-53.
- Donnelly, K.C., K.W. Brown, J.C. Thomas, and P. Davol. 1985. Evaluation of the hazardous characteristics of two petroleum wastes. *Hazard. Waste. Hazard. Mater.* 2:191-208.
- Douglas, G.R., E.R. Nestmann, and G. Lebel. 1986. Contribution of chlorination to the mutagenic activity of drinking water extracts in *Salmonella* and Chinese hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.* 69:81-87.
- Engl, S., M.J. Plewa, and P.K. Hopke. 1988. Analysis of the genotoxicity of municipal sewage sludge extracts with sister chromatid exchange in cultured human lymphocytes. *Water Air Soil Pollut.* 42:117-128.
- Fabacher, D.L., C.J. Schmitt, and J.M. Besser. 1988. Chemical characterization and mutagenic properties of polycyclic aromatic compounds in sediment from tributaries of the great lakes. *Environ. Toxicol. Chem.* 7:529-543.
- Gruener, N., and M.P. Lockwood. 1979. Mutagenicity and transformation by recycled water. *J. Toxicol. Environ. Health.* 5:663-670.
- Heartlein, M.W., D.M. De Marini, A.J. Katz, J.C. Means, M.J. Plewa, and H.E. Brockman. 1981. Mutagenicity of municipal water obtained from an agricultural area. *Environ. Mutagen.* 3:519-530.
- Holmbom, B., R.H. Voss, R.D. Mortimer, and A. Wong. 1984. Fractionation, isolation and characterization of Ames mutagenic compounds in kraft chlorination effluents. *Environ. Sci. Technol.* 18:333-337.
- Hoofstman, R.N., and G.J. Vink. 1981. Cytogenetic effects on the eastern mudminnow, *Umbra pygmaea*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo(a)pyrene, and river water. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 5:261-269.
- Hopke, P.K., M.J. Plewa, J.B. Johnston, D. Weaver, S.G. Wood, R.A. Larson, and T. Hinstley. 1982. Multitechnique screening of Chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity. *Environ. Sci. Technol.* 16:140-147.
- Kocan, R.M., and D.B. Powell. 1986. Anaphase aberrations: An *in vitro* test for assessing the genotoxicity of individual chemicals and complex mixtures, P. 75-86. In M.D. Waters, S.S. Sandhu, J. Lewtas, L. Claxton, G. Strauss, and S. Neasnow (eds.), *Short Term Genetic Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures* (Vol. 4). Plenum Press, New York.
- Maron, D.M., and B.N. Ames. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113:173-215.
- Meier, J.R., W.F. Blazak, E.S. Riccio, B.E. Stewart, D.F. Bishop, and L.W. Condie. 1987. Genotoxicity properties of municipal wastewaters in Ohio. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16:671-680.
- Prein, A.E., G.M. Thie, G.M. Alink, and J.H. Koeman. 1978. Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. *Sci. Total. Environ.* 9:287-291.

- Van der Gaag, M.A., and J.F.J. Van de Kerkhoff. 1985. Mutagenicity testing of water with fish: A step forward to a reliable assay. *Sci. Total Environ.* 47:293-298.
- Van Hoof, F., and J. Verheyden. 1981. Mutagenic activity in the river Meuse in Belgium. *Sci. Total Environ.* 20:15-22.
- Waters, L.C., R.L. Schenley, B.A. Owen, P.J. Walsh, A.W. Hsie, R.L. Jolley, M.V. Buchanan, and L.M. Condie. 1989. Biotesting of wastewater: A comparative study using the *Salmonella* and CHO assays systems. *Environ. Mol. Mutagen.* 14:254-263.
- West, W.R., P.A. Smith, G.M. Booth, and M.L. Lee. 1988. Isolation and detection of genotoxic components in a black river sediment. *Environ. Sci. Technol.* 22:224-228.

Résumé

TRANSFORMATION MORPHOLOGIQUE DES CELLULES SHE ET COMMUNICATION INTERCELLULAIRE DES V79 APPLIQUÉES A LA DETECTION DE CANCÉROGENES NON GÉNOTOXIQUES.

Ce travail a concerné l'étude des performances de trois essais *in vitro* à détecter les potentialités cancérogènes génotoxiques ou épigénétiques des contaminants de l'environnement.

Cette détection est basée sur les propriétés de ces substances d'activer la prolifération cellulaire, de perturber le contrôle de la croissance et de la différenciation des cellules et de potentialiser l'action des agents génotoxiques tels que le B(a)P ou l'action des agents non génotoxiques dits promoteurs tels que le TPA.

Les essais mis en oeuvre étudient :

- l'induction de mutations géniques sur des souches de *Salmonella typhimurium* his⁻,
- l'inhibition de la communication intercellulaire entre des cellules de lignée V79 sensibles ou résistantes à la 6-thioguanine,
- la transformation morphologique des cellules embryonnaires d'Hamster Syrien.

Deux pesticides chlorés, le chlordane et le chlorothalonil, cancérogènes chez l'animal mais non mutagènes, ont été testés à l'aide de cette batterie de tests.

Des lixiviats de déchets ultimes et des percolats de décharge ont été également étudiés dans les mêmes conditions.

Les résultats obtenus montrent que :

- le chlordane non mutagène dans le test d'Ames inhibe la coopération métabolique entre les cellules V79, il potentialise la transformation morphologique et l'activité ODC des cellules SHE induites par le TPA.

Les effets de synergie entre le chlordane et le TPA peuvent trouver une explication dans l'augmentation des flux intracellulaires de calcium libre des cellules SHE prétraitées au chlordane, et soumises à l'action consécutive du TPA.

- Le chlorothalonil n'induit pas de mutation sur les souches bactériennes de *Salmonella* et n'inhibe pas la coopération métabolique des cellules V79 ; il se comporte comme un promoteur si l'on en juge par l'augmentation de la transformation des cellules SHE prétraitées au B(a)P.

- Le caractère génotoxique des concentrés organiques des percolats de décharge et de lixiviats de déchets ultimes est mis en évidence par le test d'Ames, et confirmé par la transformation des cellules SHE observée lors d'un traitement par l'échantillon seul, ou suivi par un traitement au TPA.

Ces deux échantillons se montrent inactifs quant à l'inhibition de la coopération métabolique des cellules V79.

L'étude des performances de ces trois tests milite en faveur de l'essai de transformation cellulaire qui s'est avéré nettement plus sensible à la détection des altérations tant génotoxiques qu'épigénétiques.

Mots clés : - Transformation morphologique - Communication intercellulaire -

- Cancérogénèse épigénétique - Mutagénicité - Chlordane - Chlorothalonil -
- Polluants environnementaux.